

REGULATION DES APC/C INHIBITORS ERP1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Nadine R. Rauh

München, den 02.03. 2006

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Alle dargestellten Experimente sind, soweit nicht anders angegeben, von mir selbst durchgeführt worden. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Nadine R. Rauh

München, den 02.03.2006

Tag der Abgabe: 02.03.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2006

Erstgutachter: Professor Dr. Erich A. Nigg

Zweitgutachter: Professor Dr. Stefan Jentsch

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	6
SUMMARY	7
ABKÜRZUNGEN	9
1 EINLEITUNG	13
1.1 Teilung von Zellen	13
1.2 Zellzyklus und mitotische Teilung	13
1.3 Meiotische Teilung	15
1.3.1 Von der undifferenzierten Stammzelle bis zum befruchtungsfähigem Ei	16
1.3.2 Entdeckung von <i>Maturation-Promoting-Factor (MPF)</i> und <i>Cytostatic Factor (CSF)</i>	17
1.3.3 Identifizierung von CyclinB/Cdk1 als MPF	19
1.4 Suche nach der CSF-Aktivität	20
1.4.1 APC/C als Ziel des CSF	24
1.4.2 Aufhebung des CSF-Arrest	25
1.4.3 Emi1 als möglicher zytostatischer Faktor	29
1.4.4 XErp1/Emi2 als CSF Faktor	34
2 ERGEBNISSE	37
2.1 Xenopus Erp1 – XErp1	37
2.1.1 Die subzelluläre Lokalisation von XErp1	37
2.1.2 Modifizierungen von XErp1 in <i>Xenopus</i> -Ei-Extrakt	38
2.1.3 Regulation des Abbaus von XErp1	42
2.2 Humanes Erp1 – hErp1	51
2.2.1 hErp1 besitzt eine funktionelle F-Box	51
2.2.2 Lokalisation	52
2.2.3 Überexpression von hErp1	57
2.2.4 Der Abbau von hErp1 in <i>Xenopus</i> -Ei-Extrakt	58
3 DISKUSSION UND AUSBLICK	61
3.1 Erp1 als CSF-Faktor	61
3.1.1 Regulation von XErp1 im Laufe des Zellzyklus	61

3.1.2	Die zentrosomale Lokalisation von Erp1	65
3.1.3	hErp1 als APC/C-Inhibitor.....	66
3.1.4	Regulation von hErp1	66
3.1.5	Emi1 und Erp1/Emi2	67
4	MATERIAL UND METHODEN.....	71
4.1	Proteinbiochemische Methoden.....	71
4.1.1	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	71
4.1.2	Konzentrationsbestimmungen von Proteinen und Nukleotiden	74
4.1.3	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	74
4.1.4	Präparative SDS-PAGE	75
4.1.5	Far Western – Analysen.....	76
4.1.6	CaMKII-Kinase-Assay.....	76
4.2	Molekularbiologische Methoden	76
4.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	76
4.2.2	Hitze-kompetente <i>E.coli</i> -Zellen	76
4.2.3	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen.....	77
4.2.4	Transformation Hitze-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	77
4.2.5	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> -Zellen	77
4.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNS.....	77
4.2.7	Agarose-Gele	77
4.2.8	Gelextraktion.....	78
4.2.9	Amplifikation von DNS mittels PCR.....	78
4.2.10	Restriktionsverdau von Plasmiden	79
4.2.11	Ligation von DNS	79
4.2.12	Zielgerichtete Mutagenese	79
4.3	Zellbiologische Methoden.....	81
4.3.1	Kultivierung von Zellen	81
4.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	81
4.3.3	Transfektion von Zellen	82
4.3.4	siRNA	82
4.3.5	Zellzyklusanalyse mittels FACS	82
4.3.6	Herstellung von Antikörpern	83
4.3.7	Arbeiten mit <i>Xenopus laevis</i>	83
4.3.8	Mikroskopische Arbeiten.....	85
4.4	Materialien	86
4.4.1	Verwendete primäre Antikörper	86
4.4.2	Chemikalien für die Färbung von DNS	86
4.4.3	Verwendete sekundäre Antikörper.....	87

4.4.4	Verwendete Bakterienstämme	87
4.4.5	Verwendete Plasmide	87
4.4.6	Verwendete Peptide	89
4.4.7	Verwendete Geräte	89
5	LITERATUR.....	91
6	LEBENS LAUF	95
7	DANKSAGUNG	97
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	98
9	ANHANG: VERÖFFENTLICHUNGEN	101

Zusammenfassung

Um eine Parthenogenese zu verhindern, arretieren reife Oozyten von Wirbeltieren in der Metaphase der Meiose II. Diese biochemische Aktivität wurde 1971 als *Cytostatic factor* (CSF; Zytostatischer Faktor) beschrieben. Einzelne wichtige Komponenten wurden im Laufe der Zeit identifiziert, aber deren Zusammenspiel noch nicht aufgeklärt. Eine wichtige Rolle spielt dabei der *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C), eine Ubiquitin-Ligase welche Zellzyklus regulierende Proteine dem Abbau zuführt und somit den Beginn der Anaphase ermöglicht. Der APC/C ist in reifen Oozyten inaktiv und wird nach der Befruchtung aktiviert, so dass der Arrest aufgehoben wird. Des Weiteren sind für den Eintritt in die Anaphase II die Aktivitäten zweier Kinasen nötig. Erstens erfolgt während der Befruchtung ein Anstieg der Konzentration des intrazellulären Calciums, dies führt zur Aktivierung der Calmodulin-abhängigen-kinase-II (CaMKII). Allerdings waren die Substrate dieser Kinase bis jetzt unbekannt. Zweitens ist die Polo-like-kinase-1 (Plk1) essentiell für die Aufhebung des Metaphase II - Arrests. In *Xenopus* Eiextrakt konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der *Xenopus* Plk1 (Plx1) essentiell für den Eintritt in die Anaphase ist. Kürzlich wurde ein Inhibitor des APC/C in einem *Yeast-Two-Hybrid*-Screen mit inaktiver Plx1 als *bait* gefunden – *Xenopus*-Emi1-related-protein-1 (XErp1/Emi2*). Die Depletion dieses Proteins in *Xenopus*-Ei-Extrakt führt zu einem verfrühten Eintritt in die Anaphase. Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass CaMKII und Plx1 kooperieren, um XErp1 nach der Befruchtung zu inaktivieren, indem sie XErp1 für den Abbau markieren. Auch das humane Protein wurde kloniert und es wurde damit begonnen Versuche in Säugetierzelllinien durchzuführen. Erste Hinweise lassen darauf schließen, dass das humane Protein in gleicher Weise reguliert wird wie XErp1.

* in anderen Veröffentlichungen auch als Emi2 bezeichnet, in dieser Doktorarbeit wird im Folgenden nur der Name XErp1, bzw. hErp1 verwendet.

Summary

Vertebrate eggs awaiting fertilisation are arrested at metaphase of meiosis II by a biochemical activity termed cytostatic factor (CSF) to prevent parthenogenesis. This unique arrest is achieved by inhibiting the Anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), an ubiquitin-ligase that triggers anaphase onset and mitotic/meiotic exit by targeting securin and M-phase cyclins for degradation. Upon fertilisation a transient rise in free intracellular calcium causes APC/C activation. Additionally it is known that the activity of two kinases are necessary for the entry into anaphase, but the mechanism has not been revealed so far. Previously it has been shown that calcium induces the activation of the Calmodulin dependent kinase II (CaMKII), leading to the release from CSF arrest. But downstream targets of this kinase are not known so far. Another Serin/Threonin Kinase, *Xenopus* Polo like kinase (Plx1), is required to exit the metaphase arrest as well. But the mechanism hasn't been enlightened up to now. Recently our lab identified XErp1/Emi2* as a direct inhibitor of the APC/C in *Xenopus* egg extract. The degradation of XErp1 is dependent on a phosphodegron-motif in the very far N-Terminus which can be phosphorylated by the *Xenopus* Polo like kinase 1(Plx1). In my PhD thesis I could show that CaMKII plays a vital role in the regulation of XErp1 by targeting the protein for degradation upstream of Plx1 and thus allowing the exit of meiosis II. The human homologue of XErp1 could be cloned and studies with human cells were launched. There are first evidences that Erp1 has the same function and the same regulation in both species.

* also referred to as Emi2 in other publications

Die Arbeit wurde von Herrn Dr. Thomas U. Mayer betreut und vom Juli 2002 bis Januar 2006 in seiner Arbeitsgruppe „*Chemical Genetics*“ am Max Planck Institut für Biochemie angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Schmidt, A., Duncan, P.I., Rauh, N.R., Sauer, G., Fry, A.M., Nigg, E.A., and Mayer, T.U. (2005). *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev.*, **15**, 502-513.

Rauh, N.R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E. A. and Mayer T.U. (2005). CaMKII triggers exit from meiosis II by targeting the APC-inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* **437**, 1048-1052.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC/C	<i>Anaphase promoting complex/Cyclosome</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	Calmodulin abhängige Kinase II
Cdk1	Cyclin abhängige Kinase 1
CSF	<i>Cytostatic factor</i>
CSF-Extrakt	Zytoplasmatischer Extrakt aus reifen <i>Xenopus</i> -Oozyten
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Emi1	<i>Early mitotic inhibitor 1</i>
engl.	englisch
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fötales Kälberserum
ff.	fortfolgende
GVBD	<i>Germinal Vesicle Breakdown</i> (= Auflösung der Kernmembran)
IMAC	<i>Immobilized-metal-affinity-chromatography</i>
IVT	<i>In-vitro-Translation</i>
kDa	Kilodalton
LSC	<i>Laser scanning microscopy</i>
M	molar
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MPF	<i>Maturation Promoting Factor</i>
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
PAA	Polyacrylamid

PBD	Polo Box Domäne
PCR	Polymerase chain reaction
	negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der
pH	Hydroxidionen in wässriger Lösung
Plk1	<i>Polo like kinase 1</i>
Plx1	<i>Xenopus Polo like kinase 1</i>
Rca1	<i>Regulator of cyclin A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute - Umdrehungen in der Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SCF	<i>Skp1 Cullin F-Box</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	so genannten
U	Unit
vgl.	vergleiche
VI	Volllänge
wt	Wildtyp
XErp1	<i>Xenopus Emi1 related protein 1</i>
z.B.	zum Beispiel
ZBR	<i>Zinc binding region</i>

Aminosäuren

Alanin	A	Histidin	H	Threonin	T
Arginin	R	Isoleucin	I	Tryptophan	W
Asparagin	N	Leucin	L	Tyrosin	Y
Aspartat	D	Lysin	K	Valin	V
Cystein	C	Methionin	M		
Glutamin	Q	Phenylalanin	F		
Glutamat	E	Prolin	P		
Glycin	G	Serin	S		

Nukleotide

Adenin	A
Cytosin	C
Thymin	T
Guanin	G
Uracil	U

1 Einleitung

1.1 Teilung von Zellen

„Omnis cellulae e cellula“: Alle Zellen stammen von einer Zelle ab, dies erkannte der Berliner Pathologe Virchow bereits im Jahr 1855. Ohne die Zellteilung wären kein Wachstum und keine Fortpflanzung möglich. Die grundlegenden Prinzipien der Zellteilung sind von der Hefe bis zum Menschen konserviert. An die nächste Generation von Zellen müssen sowohl Zellorganellen, die für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels und lebenserhaltender Prozesse notwendig sind, als auch Erbinformation weitergegeben werden. Bei sich geschlechtlich fortpflanzenden Organismen wird zwischen der Teilung von somatischen Zellen (Körperzellen), der **Mitose**, und der **Meiose**, der Teilung von Gameten (Geschlechtszellen), unterschieden. Darauf soll in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

1.2 Zellzyklus und mitotische Teilung

Der Zellzyklus beschreibt den gesamten Lebenszyklus einer Zelle. Bei der Zellteilung ist es entscheidend, dass jede entstehende Tochterzelle exakt die gleiche Erbinformation weiterzugeben, da es bei einer fehlerhaften Weitergabe zur Aneuploidie (unnormale Chromosomenanzahl) kommen kann.

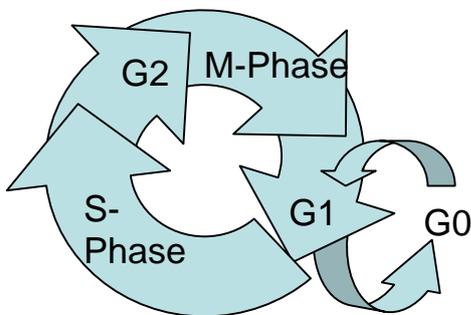


Abbildung 1-1: Die einzelnen Phasen des Zellzyklus. In der S-Phase erfolgt die Replikation der DNA. Die G2-Phase dient zur Kontrolle der richtigen Verdopplung der DNA. In der M-Phase erfolgt die Kern- und Zellteilung. In der G1-Phase bereitet sich die Zelle auf die bevorstehende Teilung vor. Zellen können den Zellzyklus auch verlassen, dann befinden sie sich in der sog. G0-Phase.

Der Zellzyklus ist in vier Phasen unterteilt: S-, G2-, M-, und G1-Phase. Zellen können sich außerdem noch in der G₀-Phase befinden, d. h. sie haben den Zellzyklus verlassen und können sich nicht weiter teilen, wie z.B. Nervenzellen. G1-, S- und G2-Phase werden zur Interphase zusammengefasst. In der ersten sog. *gap*-Phase, der **G1-Phase** kommt es zu einem Zellwachstum, in dieser Phase bereitet sich die Zelle auf die

bevorstehende Teilung vor. Wenn die Zelle eine bestimmte Größe erreicht hat, dann wird der *point-of-no-return* erreicht, d. h. die Zelle verlässt die G1-Phase und muss einen kompletten Zellzyklus durchlaufen. In der sich anschließenden S-Phase kommt es zur Verdopplung der DNS. Falls es dabei zu Fehlern gekommen ist, können diese in der zweiten *gap*-Phase, der **G2-Phase** repariert werden. In der darauf folgenden **M-Phase**, der Mitose und Zytokinese, erfolgt die Aufteilung der nun verdoppelten Erbinformation auf die zwei Tochterzellen. Die Mitose ist wiederum in fünf Phasen aufgeteilt, siehe Abbildung 1-2.

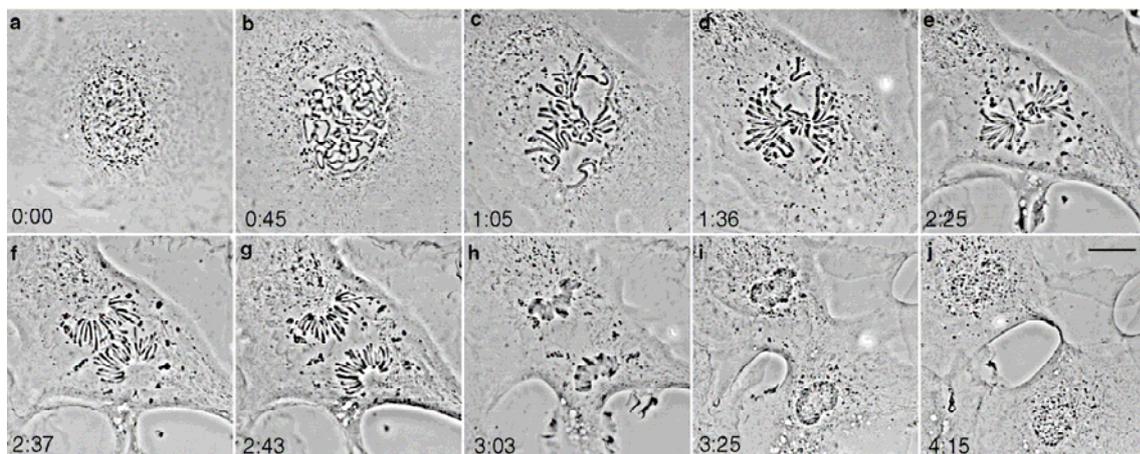


Abbildung 1-2: Die einzelnen Phasen der Mitose (Pines et al. 2001). Phasenkontrastmikroskopaufnahmen von Salamanderzellen. a) Prophase. b) Auflösung der Kernmembran. Beginnende Prometaphase. c) Prometaphase. d) Späte Prometaphase. e) Metaphase. f) Anaphase A. g) Anaphase B. h) frühe Telophase. i) Späte Telophase/Zytokinese. j) Zytokinese

Diese Einteilung wurde bereits vor über 100 Jahren von Eduard Strasburger (Prophase, Metaphase und Anaphase) und Martin Heidenhain (Telophase) anhand der sichtbaren Veränderung innerhalb der Zelle festgelegt. Nur in der Mitose kann man die Chromosomen, benannt von Walther Fleming, einzeln im Kern erkennen. In der **Prophase** wird die DNS „verpackt“, d.h. sie wird kondensiert um die Koordination der späteren Teilung zu erleichtern. Mit dem Auflösen der Kernmembran beginnt die **Prometaphase** und die Chromosomen werden mittels der sich aus Mikrotubuli zusammengesetzten Spindel in einer Ebene angeordnet. In der **Metaphase** befinden sich alle Chromosomen in der Äquatorialebene der Spindel, die sich zwischen den Spindelpolen (Zentrosomen) gebildet hat, sie formen die sog. Metaphase-Platte. Die Trennung der Schwesterchromatiden erfolgt in der anschließenden **Anaphase**, die wiederum in zwei Phasen unterteilt wird, erstens der Anaphase A, dort trennen sich die Schwesterchromatiden und zweitens der Anaphase B, bei der sich zusätzlich die Spindelpole voneinander wegbewegen. In der **Telophase** kommt es zur Neubildung der Kernmembran und in der **Zytokinese** schließlich zur eigentlichen Teilung der Zelle, der Trennung der beiden Tochterzellen.

1.3 Meiotische Teilung

In der Meiose wird der replizierte Chromosomensatz zweimal geteilt, d.h. es werden zwei aufeinander folgende Zellteilungen ausgeführt, Meiose I (Reduktionsteilung) und Meiose II (Äquationsteilung). Zum Vergleich sind in Abbildung 1-3 Mitose und Meiose gegenübergestellt. In der **Meiose I** paaren sich homologe Chromosomen und werden anschließend aufgeteilt. In dieser Phase kann es zwischen den homologen Chromosomen zu einem Austausch von Teilen der Erbinformation kommen, ein Vorgang der als Rekombination bezeichnet wird (engl. *Crossing over*). Homologen Chromosomen die Bereiche ihrer DNS austauschen, zeichnen sich durch sog. Chiasmata-Bildung (sg. Chiasma) aus. Dies ist eine Grundlage der geschlechtlichen Fortpflanzung, die Möglichkeit der genetischen Variabilität, da somit die entstandenen Gameten niemals die gleiche Erbinformation besitzen.

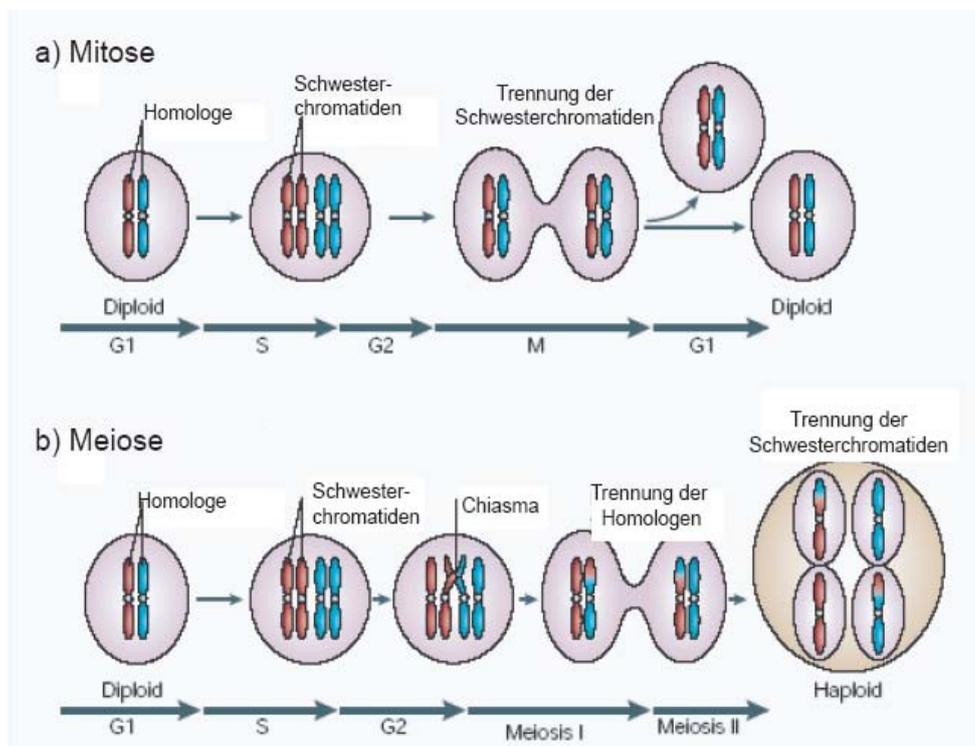


Abbildung 1-3: Ziel der Meiose ist es die Menge an Erbinformation zu reduzieren. a) In der Mitose entstehen diploide Tochterzellen. b) In der Meiose erfolgt eine zweimalige Teilung der Erbinformation, so dass vier haploide Tochterzellen entstehen. Teile der väterlichen und mütterlichen Erbinformation können ausgetauscht werden (Rekombination). (Marston et al. 2004)

Die **Meiose II** gleicht der Mitose insofern, dass hier die Schwesterchromatiden getrennt werden. Die neu entstanden Zellen aus einer meiotischen Teilung erhalten so einen haploiden Satz an Chromosomen, während die Tochterzellen die aus einer mitotischen Teilung hervorgegangen sind, einen diploiden Satz an Chromosomen enthalten. Damit

ist sichergestellt, dass bei der Befruchtung dem neuen Organismus wieder ein diploider Chromosomensatz zur Verfügung steht.

1.3.1 Von der undifferenzierten Stammzelle bis zum befruchtungsfähigem Ei

Im Gegensatz zum Spermium enthält das Ei alles, was zum Stoffwechsel und der Entwicklung des frühen Embryos nötig ist, wie z.B. Enzyme, mRNA, Zellorganellen und Nährstoffe. Die meisten Säugetiere, darunter auch der Mensch, produzieren während ihrer Lebenszeit nur eine geringe Anzahl an befruchtungsfähigen Eiern, während Amphibien Tausende davon in einer kurzen Zeitspanne produzieren können. Von daher eignen sich z.B. Frösche sehr gut als Modellorganismen zur Untersuchung von Eireifung und Befruchtung, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Man unterscheidet den animalen und vegetativen Pol einer Eizelle. Der vegetative Pol besteht hauptsächlich aus Proteinen und Nährstoffen, währenddessen der animale Pol, im dunkleren Abschnitt der Eizelle, den Zellkern enthält. In Abbildung 1-5 sind unreife und reife (befruchtungsfähige) Oozyten von *Xenopus laevis* abgebildet, ein sichtbarer Unterschied zwischen unreifen und reifen Oozyten ist die Bildung eines weißen Punktes, diesen besitzen nur reife Oozyten, da diese Oozyten in der Metaphase II arretieren, verdrängt dort der Spindelapparat die Pigmente.

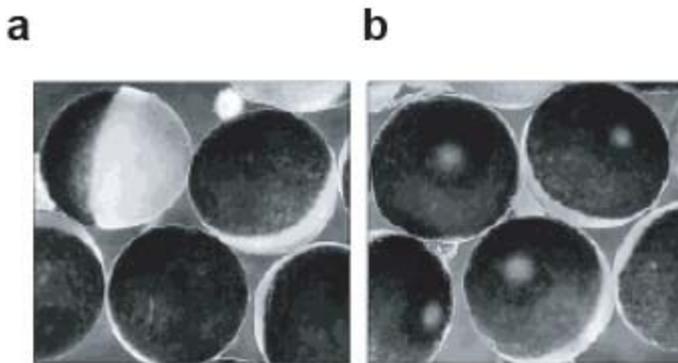


Abbildung 1-4: Unreife (a) und reife Oozyten (b) aus *Xenopus laevis* (Ferrell 1999). Reife Oozyten erkennt man an dem weißen Punkt im animalen Pol, der sich nach dem *Germinal vesicle breakdown* gebildet hat.

Die ersten erkennbaren morphologischen Veränderungen bei der Eireifung sind der sog. *Germinal-Vesicle-Breakdown* (*GVBD*, *germinal vesicle* entspricht dem Kern der Oozyte), dabei wird die Kernmembran aufgelöst und das Plasma des Kerns strömt ins Cytoplasma. Dann kondensieren die Chromosomen. Noch unreife *Xenopus* Oozyten liegen im **G2-Phase-Arrest** vor, in diesem Stadium können sie jahrelang bleiben. In multizellulären Organismen kommt das Signal für eine meiotische Teilung von den benachbarten Zellen. So beginnt beim Frosch nach einer Stimulation durch das Hormon Progesteron die Eireifung. Es erfolgt die Meiose I, die Aufteilung der homologen Chromosomen, es entstehen zwei unterschiedliche Tochterzellen, die spätere Oozyte und ein kleinerer Polkörper. Allerdings wird die Meiose nicht vollständig beendet. Es

kommt zu einem zweiten **Arrest in der Metaphase der Meiose II**. Für diesen Arrest ist eine biochemische Aktivität, genannt **Cytostatic Factor (CSF)** verantwortlich, auf diesen wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen. Erst durch die Befruchtung wird dieser Arrest aufgehoben und die Meiose mit der Äquationsteilung vollständig beendet, dabei wird erneut ein kleinerer Polkörper abgeschnürt. In Abbildung 1-4 ist die Eientwicklung und frühe embryonale Entwicklung dargestellt.

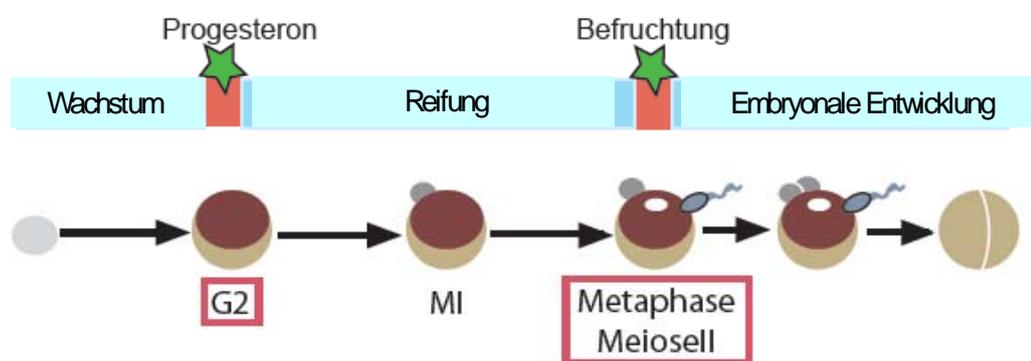


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung von Eiwachstum, Eireifung und Start der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis*. Oozyten arretieren zweimal während Ihrer Entwicklung. Nach einer Größenzunahme arretiert die unreife Oozyte in einem G2-ähnlichen Zustand, dieser kann durch Progesteron aufgehoben werden. Die Meiose I (MI) wird beendet und der erste Polkörper gebildet. Das zweite Mal kommt es bei der Metaphase der Meiose II zum Arrest. Dieser wird durch die Befruchtung aufgehoben und die Meiose II kann beendet werden. Es erfolgen die Bildung des zweiten Polkörpers, die Verschmelzung des weiblichen und des männlichen Pronuclei und der Start der frühen embryonalen Zellzyklen.

In den folgenden Kapiteln werden die bekannten molekularen Mechanismen beschrieben, die zu dem Metaphase II-Arrest in Oozyten führen.

1.3.2 Entdeckung von *Maturation-Promoting-Factor (MPF)* und *Cytostatic Factor (CSF)*

Die Bezeichnung ***Maturation-Promoting-Factor* (MPF; Reifungs-Fördernder Faktor)** wurde von Masui und Markert geprägt (Masui et al. 1971). Sie analysierten den Zellzyklus von Oozyten des Froschs *Rana pipiens*. Ihre Experimente wurden von früheren Theorien beeinflusst, die besagten, dass die Zellphysiologie von der Beziehung zwischen Kern und Zytoplasma bestimmt sei. Zusätzlich hatte Masui 1967 beobachtet, dass Hormone wie Progesteron nur Eier aktivieren, die in eine Lösung des Hormons gebracht wurden, jedoch nicht wenn das Hormon in die Eier injiziert wurde (Masui 1967). Masui und Markert nahmen an, dass im Zytoplasma eine Aktivität entstehen würde, welche zum GVBD führt und somit zur Reifung des Eis. Um diese Hypothese zu testen, entnahmen sie einer in der Metaphase II arretierten Eizelle (reifen Eizelle) Zytoplasma und injizierten dies in unreife Eizellen. Ab einer Menge von 5 nl injiziertem Zytoplasma begannen auch unreife Eier zu reifen, d.h. sie traten in den meiotischen Zellzyklus ein (Masui et al. 1971). Daraufhin wurde der Begriff ***Maturation-Promoting-Factor* (MPF)** geprägt, der im Zytoplasma einer reifen Oozyte

zu finden sein muss. Diese Aktivität erschien 6 h nach Behandlung mit Progesteron und nahm nach der Befruchtung des Eis ab. Um zu untersuchen, ob MPF auch eine Rolle in der Teilung von somatischen Zellen besitzt, entnahmen sie wiederum einem reifen Ei nach dem GVBD Zytoplasma und injizierten dies in eine Zelle eines Embryos im Zwei-Zell-Stadium. Entgegen ihren Erwartungen arretierte die Zelle in der Metaphase des Zellzyklus (Masui et al. 1971). Zytoplasma aus befruchteten Eiern als auch aus solchen, die noch keinen GVBD zeigten, konnten die Teilung nicht inhibieren. Nur in der reifen Eizelle muss sich also noch eine zweite Aktivität befinden, die einen Arrest nach der beginnenden Reifung erzeugt. Masui und Markert stellten daraufhin die Hypothese auf, dass das Zytoplasma zwischen der Meiose I und der Meiose II einen Faktor produzieren würde, der für den Metaphase II Arrest wichtig sei. Sie nannten diese Aktivität **Cytostatic Factor** (CSF). Auf diesen Faktor soll im Kapitel 1.3.4 näher eingegangen werden. In Abbildung 1-6 sind die Versuche zusammengefasst.

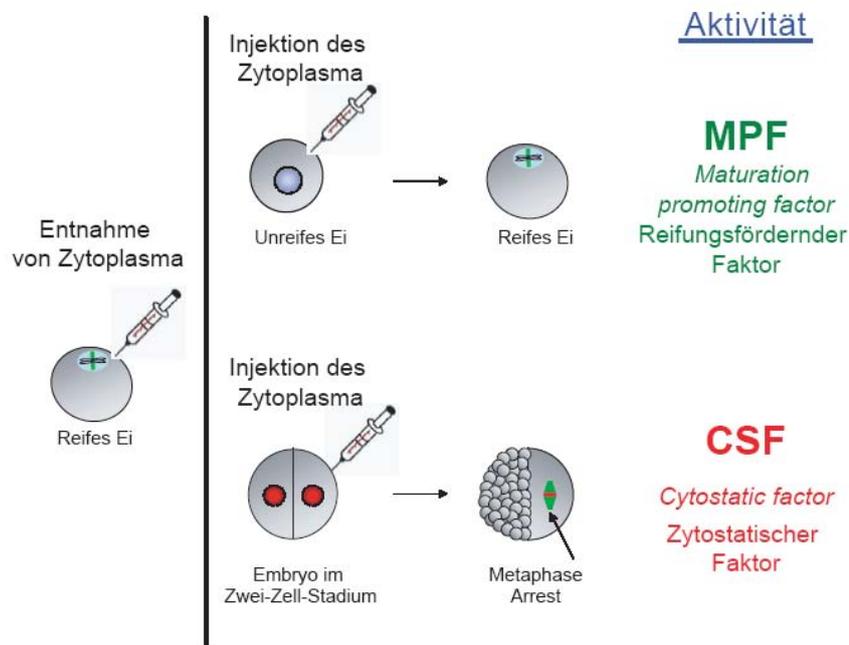


Abbildung 1-6: Die Entdeckung der Aktivitäten von MPF und CSF in reifen Oozyten. Masui und Markert konnten zwei Aktivitäten des reifen Eis nachweisen. Die Injektion von Zytoplasma aus reifen Eizellen in unreife Oozyten führte zu einer Reifung der Oozyte. Diese Fähigkeit der reifen Eizelle nannten sie MPF (Reifungsfördernder Faktor). Die Injektion von Zytoplasma aus reifen Eizellen in eine Zelle eines Embryos im Zwei-Zell-Stadium, führte zu einem Metaphase-Arrest in der injizierten Hälfte. Diese Aktivität bezeichneten Masui und Markert als CSF (Zytostatischer Faktor). Die MPF-Aktivität ist auch in späteren Zellteilungen zyklisch nachzuweisen, die CSF-Aktivität nicht.

Masui und Markert konnten weiter zeigen, dass eine Steigerung der MPF-Aktivität zu Beginn der Ei-Reifung den Eintritt in die Meiose ermöglicht. Für den Übergang von Meiose I zum Beginn der Meiose II nimmt die Aktivität teilweise ab und es kommt zum Auftreten der CSF-Aktivität, welche einen Arrest mit hoher MPF-Aktivität ermöglicht.

Nach der Befruchtung nimmt die CSF-Aktivität sprunghaft ab und ist in späteren Zellteilungen nicht mehr nachweisbar, im Gegensatz dazu ist die MPF-Aktivität auch in somatischen Zellteilungen zyklisch nachweisbar.

1.3.3 Identifizierung von CyclinB/Cdk1 als MPF

Der erste der versuchte den *Maturation Promoting Factor* zu isolieren, war Masui selbst. Er konnte zeigen, dass die Wirkung des MPF durch Calcium aufgehoben wird und dass Proteasen, aber nicht RNasen einen negativen Einfluss darauf besitzen. Von daher musste die Aktivität die Reifung zu induzieren von einem Protein stammen. Außerdem konnte er durch differentielle Zentrifugation die Sedimentationswert der MPF-Aktivität bestimmen, sie betragen 3S, 13S und 30S (Wasserman et al. 1976). Wassermann konnte an Untersuchungen mit Embryonen auch zeigen, dass die MPF Aktivität nicht eine Meiose-spezifische Aktivität ist, sondern auch eine Rolle in somatischen Zellen spielt (Wasserman et al. 1978). Die erste Aufreinigung des Proteinkomplexes gelang erst 1988 (Lohka et al. 1988). Lohka et al. konnten mittels chromatographischen Methoden einen Proteinkomplex aus *Xenopus* Oozyten aufreinigen, der aus einem 45-kDa und 32-kDa Protein bestand. Das 45-kDa Protein zeigte eine Kinaseaktivität, d.h. es konnte Phosphat auf Histon H1 übertragen. Um nachzuweisen, dass dieser Komplex tatsächlich MPF-Aktivität besitzt, benutzten sie ein zellfreies System, welches frühe embryonale Zellzyklen nachahmt. Dazu wird Zellextrakt aus *Xenopus* Eiern gewonnen und die Zellzyklusphase, d.h. Interphase oder Mitose, kann dann anhand des Zustands von zugegebener DNS bestimmt werden. Befindet sich der Extrakt in Interphase so sind Kerne sichtbar, ist er aber in der M-Phase so kann man kondensierte DNS erkennen. In Abbildung 1-7 sind die verschiedenen Stadien abgebildet. Der von Lohka et al. aufgereinigte Protein-Komplex kann die den Übergang von Interphase –Extrakt zu M-Phase-Extrakt induzieren.

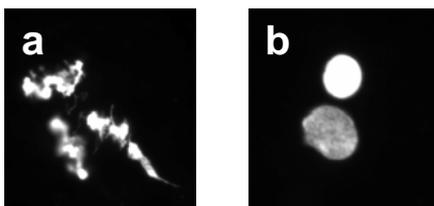


Abbildung 1-7: Erkennung des Zellzyklusstadiums von *Xenopus*-Ei-Extrakt anhand der DNS-Morphologie. a) Der Extrakt befindet sich in der M-Phase die DNS ist kondensiert. b) Der Extrakt befindet sich in der Interphase, es sind Kerne sichtbar.

Außerdem konnte man durch Injektion des Komplexes in unreife *Xenopus* Oozyten die Reifung induzieren. Es konnte also bestätigt werden, dass man den MPF-Faktor aufgereinigt hatte. Weitere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass es sich bei dem 32-kDa Protein um ein Homologes von $p34^{cdc2}$ handelt (Dunphy et al.; Gautier et al. 1988). $p34^{cdc2}$ wurde in einem Screen gefunden, mit dem man nach Zellzyklusmutanten in Hefe gesucht hat (Hartwell et al. 1970). Bei der größeren Untereinheit handelt es sich um Cyclin B (Gautier et al. 1990). Cross et al., 1988, und Nash et al., 1988, konnten zeigen, dass für die Aktivität Cycline und ihre Cdks zusammenkommen mussten. Damit wurde die Theorie von Tim Hunt bestätigt, der 1983 die Cycline entdeckte und einen Zusammenhang zwischen Zellzyklus und

Vorhandensein von Cyclinen postulierte (Evans et al. 1983). In seinen Experimenten konnte er zeigen, dass Cycline zyklisch gebildet und wieder abgebaut wurden, daher nahm er eine Rolle dieser Proteine im Zellzyklus an. Dass dieser Mechanismus auch unter den einzelnen Spezies konserviert ist, konnte Paul Nurse bestätigen. Er konnte einer *cdc2*-Hefemutante wieder die Fähigkeit geben sich zu teilen, indem er das humane Protein in dieser Mutante exprimierte (Lee et al. 1987). Die wichtige Funktion der Cycline im Zellzyklus wurde auch im Lauf der Jahre bestätigt (Murray 2004; Deshpande et al. 2005).

1.4 Suche nach der CSF-Aktivität

Wie schon in Kapitel 1.3.2 erwähnt, wurde die Bezeichnung CSF von Masui und Markert geprägt. In Abbildung 1-8 a ist ein Beispiel des klassischen Experiments gezeigt, welches die zytostatische Aktivität nachweist. Eine Zelle eines Zwei-Zell-Embryos von *Rana pipiens* arretiert nach der Injektion von Zytoplasma aus reifen Eizellen in der Metaphase. Dieses Experiment ist auch der klassische Nachweis für eine CSF-Aktivität eines Proteins. Nach Injektion des „CSF-Faktors“ sollte die Zelle nicht mehr in der Lage sein, sich teilen zu können. Im Gegensatz zum MPF ließen sich die Bestandteile des CSF bisher nicht aufreinigen.

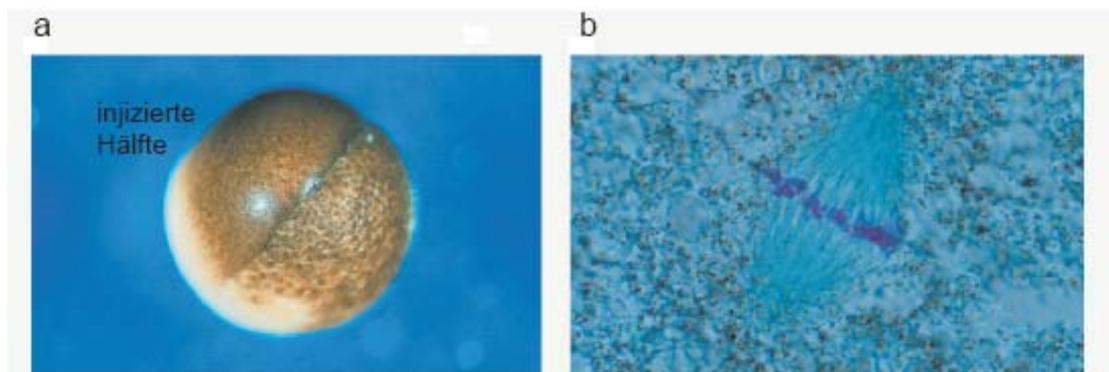


Abbildung 1-8: Mit CSF injizierter *Rana pipiens* Embryo (Masui 2001). In (a) sind die Hälften des Embryos erkennbar. Die rechte untere Hälfte hat sich weiter geteilt. Es sind viele kleine Zellen erkennbar, während sich die linke obere injizierte Zelle des Zwei-Zell-Embryos nicht weiter geteilt hat. In (b) ist die arretierte mitotische Spindel vergrößert dargestellt.

Daher wurden von Masui und Markert folgende Forderungen an den gesuchten zytostatischen Faktor gestellt, welche dieser zu erfüllen hatte, um ein Teil des oder der CSF zu sein (Masui, 2000):

1. Er muss während des Übergangs von Meiose I zu Meiose II aktiviert werden.
2. Er muss bei der Befruchtung oder Parthenogenese inaktiviert werden.
3. Er muss arretierte Zygoten mit denselben Merkmalen ausstatten, die beim unbefruchteten Ei zu finden sind (Metaphasespindel, hohe MPF-Aktivität, APC/C inaktiv).
4. Er muss reversibel die Teilung der Zygote inhibieren.

In den Jahren nach 1971 fand man mit Arbeiten an *Xenopus*-Extrakten heraus, dass der CSF im löslichen Teil des Eis zu finden ist und dass Calcium eine inaktivierende Wirkung auf den CSF besitzt und der Faktor durch EGTA-Zugabe stabilisiert werden kann. 1989 wurde das erste Mal ein Protein mit dem CSF in Verbindung gebracht – c-Mos, eine Serin/Threonin-Kinase (Sagata et al. 1989). Dieses Protein erfüllt mehrere CSF-Kriterien. Die Translation des Mos-Proteins wird während der Eireifung initiiert (Sagata et al. 1988) und die Injektion von mos-RNA in Zwei-Zell-Embryonen führt konzentrationsabhängig zu einem Metaphase-Arrest (Sagata et al., 1989). Die *downstream*-Substrate von c-mos wurden von mehreren Arbeitsgruppen aufgeklärt (Tunquist et al. 2003). Mos aktiviert eine MAP-Kinasekaskade: MEK/MAPK/p90^{RSK}. Dies führt schließlich zu einer Inhibierung des *Anaphase-promoting-complex* /Cyclosome (APC/C) (Tunquist et al. 2003). Mos wird zwar nach der Befruchtung inaktiviert, aber erst kurze Zeit später als MPF (Watanabe et al. 1991). Außerdem konnten Yew et al. zeigen, dass c-mos für den Beginn der Reifung von Oozyten nötig ist, aber dass der Übergang von Meiose I zu Meiose II noch zusätzliche Proteinsynthese benötigt. Die Injektion von MBP-mos in unreife Oozyten führt zu deren Reifung, in Gegenwart von Cycloheximid (ein Inhibitor der Proteinsynthese) allerdings wird nur die Meiose I beendet und kein CSF-Arrest mit hoher MPF-Aktivität etabliert (Yew et al. 1992). Es muss also noch eine andere Aktivität geben, damit der CSF-Arrest aufrecht erhalten bleibt. Die Verhinderung der Aktivierung des APC/C ist das Hauptziel bei der Aufrechterhaltung des Meiose II – Arrests. Der APC/C ubiquityliert Proteine und macht sie dadurch erkennbar für das Proteasom, welches die so markierten Proteine abbauen kann (Castro et al. 2005). Substrate für den APC sind unter anderem Cycline (siehe auch Kapitel 1.4.1). Es wird angenommen, dass Proteine wie Emi1 (*Early mitotic inhibitor 1*) als CSF-Faktor wirken können, in dem sie die Aktivierung des APC verhindern (Reimann et al. 2001). Eine nähere Beschreibung von der Funktion von Emi1 ist in Kapitel 1.4.3 zu finden.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Proteine, die bisher in Zusammenhang mit dem CSF gebracht wurden. In Abbildung 1-9 ist eine Übersicht von Proteinen schematisch dargestellt, die am CSF beteiligt sind.

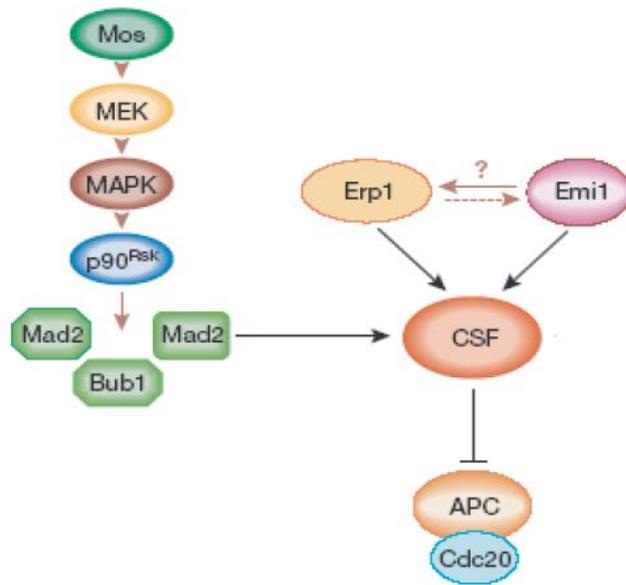


Abbildung 1-9: Schema bereits bekannter CSF-Komponenten (Castro et al. 2005). Die Kinase-Kaskade Mos/MEK/MAPK/p90Rsk führt zur Aktivierung des MPF während der Eireifung, außerdem werden dadurch Proteine aktiviert die MPF stabilisieren können. Erp1 und Emi1 können direkt die Inaktivierung von MPF durch die Inhibierung des APC/CCDC20-Komplexes verhindern.

Protein (e)	Funktion	Referenz
Mos/MEK/MAPK/p90 ^{rsk}	Kinasekaskade. Beteiligt an der Aktivierung und Stabilisierung von MPF während des Übergangs von Meiose I zu Meiose II.	Sagata et al., 1989; Tunquist und Maller, 2003; Übersichtsartikel Sagata, 1997; Fan et al., 2004
Bub1; Cdk2/Cyclin E	Beteiligt an der Etablierung des CSF, aber nicht an der Aufrechterhaltung.	Tunquist et al., 2002
CaMKII	Kinase. Wird durch die bei der Befruchtung auftretende Kalziumwelle aktiviert.	Lorca et al., 1993
Plx1 (<i>Polo like kinase Xenopus</i>)	Kinase. Ist an der Aktivierung des APC beteiligt.	Descombes & Nigg, 1998 Liu et al., 2004
Emi1	F-Box-Protein. Kann direkt <i>in vitro</i> den APC durch Bindung an Aktivierungsproteine inhibieren. Rolle als CSF-Faktor umstritten.	Reimann et al., 2001 Oshumi et al., 2004 Tung et al., 2005a
Cdc20	APC-Aktivator.	Fang et al., 1998 Reimann et al., 2001
Mad1 & Mad2	<i>Spindle checkpoint</i> Binden an CDC20 und verhindern dadurch eine APC/C-Aktivierung.	Tunquist et al., 2003
Xnf7	Ubiquitin Ligase. Kann den APC inhibieren.	Casaletto, 2005.
XErp1/Emi2	F-Box-Protein. Erfüllt mehrere CSF-Kriterien. Kann den APC inhibieren.	Schmidt et al., 2005; Tung et al., 2005b; Rauh, et al. 2005*

Tabelle 1: Übersicht der Proteine denen eine Aufgabe in der Etablierung, bzw. Aufrechterhaltung des Meiose II-Arrests zugeschrieben wird. * in dieser Arbeit besprochen

1.4.1 APC/C als Ziel des CSF

Der *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C) ist ein Ubiquitin-Ligase-Komplex, welcher aus mindestens zwölf Untereinheiten besteht (Vodermaier 2004). Ein Ubiquitylierungssystem besteht aus einer Proteinkaskade von drei Enzymen, E1, E2 und E3 (in diesem Fall E3 = APC/C) (Passmore et al. 2004). E1 aktiviert das Ubiquitin, durch die Bildung eines Thioesters. Dann wird das Ubiquitin ebenfalls durch einen Thioester auf das E2-Enzym übertragen und schließlich wird das Ubiquitin mittels des E3-Enzyms durch die Bildung einer Isopeptidbindung an ein Lysin auf das zu markierende Substrat übertragen.

Der APC/C markiert verschiedene regulatorische Proteine des Zellzyklus für den Abbau durch das Proteasom. Das Proteasom ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Komplex, welcher spezifische multiubiquitylierte Proteine erkennt und abbaut (Baumeister et al. 1998). Der APC/C selbst wird durch Phosphorylierung und durch zwei weitere Proteine, Cdh1 und Cdc20 reguliert. Die Expression von Cdc20 ist Zellzyklus-reguliert. So wird die Translation von Cdc20 in später G1, bzw. früher S-Phase gestartet und die höchste Proteinkonzentration an Cdc20 liegt in der Mitose vor, die Proteinmenge an Cdh1 hingegen ist nicht Zellzyklus-reguliert (Prinz et al. 1998). Cdc20 aktiviert den APC/C in G2 und früher Mitose, dies wird dann in der Anaphase und G1 von Cdh1 übernommen. Durch den APC/C werden zwei Stadien des Zellzyklus reguliert, die Trennung der Schwesterchromatiden und das Verlassen der Mitose. Durch das Markieren von Securin für den Abbau, wird ein Protein namens Separase aktiviert, welches die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden auflöst (Ciosk et al. 1998) und damit eine Trennung dieser erst möglich macht. Ebenfalls in der Anaphase wird Cyclin B durch den APC/C ubiquityliert (King et al, 1995), dies ermöglicht durch die Inaktivierung von Cdk1 das Verlassen der Mitose, bzw. Meiose. Der APC/C erkennt seine Substrate anhand von Sequenzmotiven, sog. D-Boxen (RxxL; (Glotzer et al. 1991), KEN-Boxen (KEN; (Pfleger et al. 2000), GxEN-Box (GxEN; (Castro et al. 2003) oder A-Boxen (RxLxPSN;(Castro et al. 2002; Littlepage et al. 2002). Als wichtiger Regulator des Zellzyklus ist er ein gutes Ziel für Proteine, die am CSF beteiligt sind. Der APC/C muss beim Übergang der Metaphase zur Anaphase aktiviert werden (Abbildung 1-10), daher ist zu erwarten, dass es die Aufgabe der Proteine, die am Metaphase II Arrest in *Xenopus* Oozyten beteiligt sind, ist, eine verfrühte Aktivierung des APC/C zu verhindern

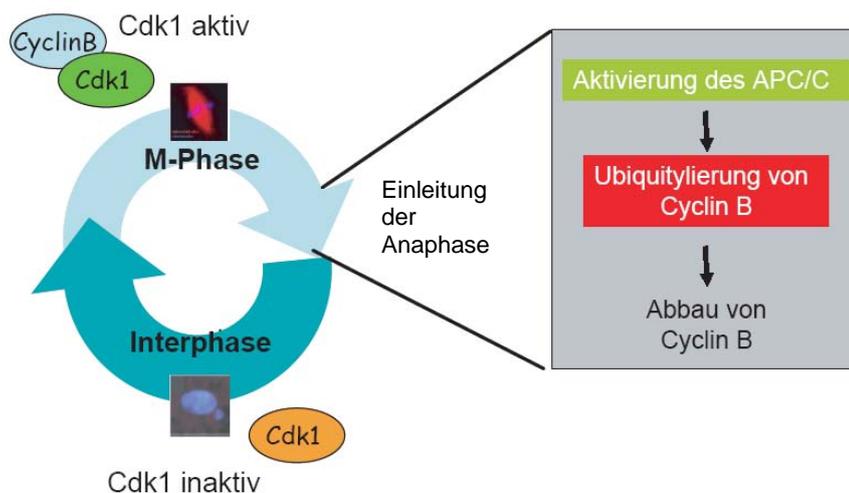


Abbildung 1-10: Die Aktivierung des APC/C ist notwendig für den Eintritt in die Anaphase. Um die M-Phase zu beenden, muss der APC/C aktiviert werden. Dieser ubiquityliert Cyclin B, und markiert somit Cyclin B für den Abbau durch das Proteasom. Cdk1 wird inaktiv und die M-Phase wird beendet.

1.4.2 Aufhebung des CSF-Arrest

Fünf wichtige Veröffentlichungen zum Verständnis der vorliegenden Doktorarbeit sollen im Folgenden näher dargestellt werden. Wie schon erwähnt ist bei der Befruchtung eines Eis eine Erhöhung des intrazellulären Calciums nachweisbar (Berridge 1993).

Die Erhöhung der Konzentration an Calcium führt zur Aktivierung der CaMKII.

In einer 1993 erschienenen Veröffentlichung von Doree und seinen Mitarbeitern, wurde nachgewiesen, dass dieses Calciumsignal nach der Befruchtung dazu führt, dass eine Kinase, die CaMKII (Calmodulin abhängigen Protein Kinase II) aktiviert wird (Lorca et al. 1993). Die Rolle des Calcium-Sensors hat dabei Calmodulin. Erst nach der Bindung an Calcium kann Calmodulin andere Enzyme aktivieren, wie die CaMKII. In Abwesenheit des Calcium-Signals inhibiert sich die Kinase, durch Bindung der autoinhibitorischen Domäne an die katalytische Domäne, selbst. Erst nach der Bindung von Ca^{2+} -Calmodulin an die regulatorische Domäne der Kinase wird die CaMKII aktiv. In Abbildung 1-11 ist die Struktur der CaMKII schematisch dargestellt.

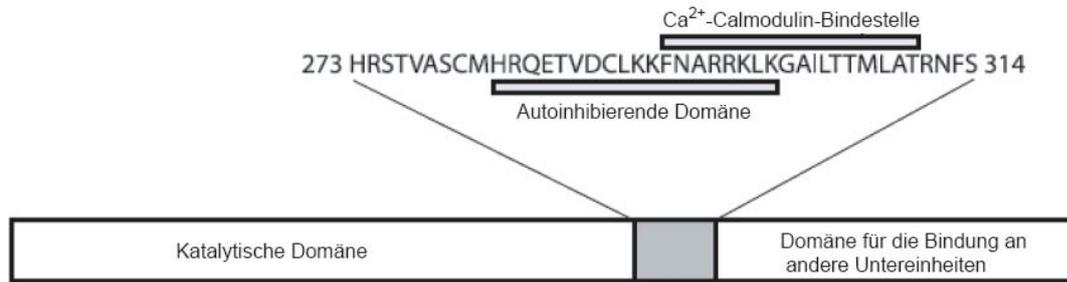


Abbildung 1-11: Struktur der CaMKII α (modifiziert nach Cruzalegui et al., 1992). Die Kinase kann in drei Hauptdomänen aufgeteilt werden. Der katalytischen Domäne, der regulatorischen Domäne und der Domäne die mit anderen CaMKII- α -Untereinheiten das Holoenzym bilden kann.

Eine verkürzte Form der CaMKII, die nur aus den Aminosäuren 1-290 besteht (ohne autoinhibierende Domäne), ist konstitutiv aktiv. Injiziert man diese in Metaphase II – Oozyten, führt dies zur Aufhebung des CSF-Arrest (Lorca et al., 1993). Auf der anderen Seite konnte man mittels eines Peptidinhibitors, der der aktivierenden Calmodulinbindestelle von CaMKII gleicht, konnte gezielt die Aktivierung von CaMKII durch Calcium-Zugabe verhindert werden und so ebenfalls der Abbau von Cyclin B (Lorca et al., 1993). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CaMKII das Ziel des Calcium-Signals ist und das aktive CaMKII für die Aufhebung des CSF-Arrests notwendig ist. Das Finden von den Substraten dieser Kinase ist also von großer Bedeutung für die Aufklärung der Natur des zytostatischen Faktors.

Plx1 ist nötig für die Aufhebung des CSF-Arrests.

Eine Rolle für eine weitere Serin/Threonin- Kinase –Plx1 (*Xenopus Polo like kinase*)– für die Regulation des CSF wurde 1998 von Descombes und Nigg postuliert. Man wusste bereits, dass Mitglieder der Familie der *Polo-like*-Kinasen wichtig für die Regulation verschiedener Zellzyklusstadien sind (Barr et al. 2004). Die Untersuchungen ob Plx1 für die Aufhebung des CSF-Arrests benötigt wird, wurden in *Xenopus*-Ei-Extrakten durchgeführt (Descombes und Nigg, 1998). Descombes und Nigg konnten zeigen, dass Plx1 in M-Phase-Extrakten eine 5-10fach höhere Aktivität als in Interphase besitzt. Um nun zu untersuchen, ob Plx1 für die Auflösung des CSF-Arrests benötigt wird, wurden Experimente durchgeführt, in welchen die Kinase-Aktivität von Plx1 einmal durch den Einsatz einer dominant-negativ wirkenden Mutante und einmal durch Depletion des Proteins aus CSF-Extrakt negativ beeinflusst wird. Eine Mutation von Asparagin 172 zu Alanin im katalytischen Zentrum von Plx1 führt zur Inaktivierung der Kinase. Als rekombinantes Protein eingesetzt, wirkt dieses dominant-negativ auf das endogene Protein. In Anwesenheit dieser Mutante kann CSF-Extrakt nicht mehr durch

Zugabe von Calcium in die Interphase übergehen und der Calcium-induzierte Abbau von Cyclin B findet nicht mehr statt. Auch eine Wegnahme des endogenen Proteins durch Antikörper verhindert den Calcium-Induzierten Übergang von der M-Phase in die Interphase. Dies kann durch exogene Zugabe von Plx1^{wt} wieder rückgängig gemacht werden, aber nicht durch Zugabe von der inaktiven Mutante. Diese Ergebnisse zeigen, dass Plx1 eine wichtige Rolle bei der Regulation des Ubiquitin-abhängigem Abbaus und somit dem Austritt aus dem CSF-Arrest einnimmt. Das von Descombes und Nigg von Ihren Daten abgeleitete Modell ist in Abbildung 1-12 wiedergegeben.

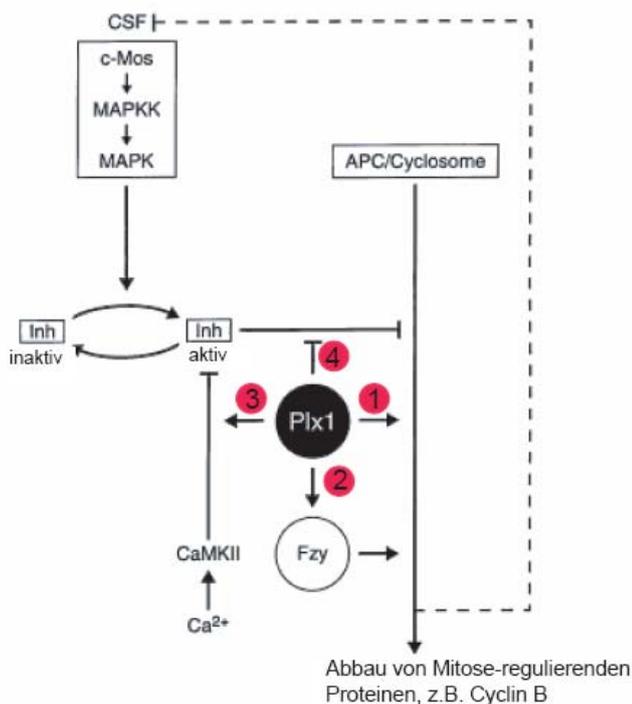


Abbildung 1-12: Modell wie Plx1 auf den Austritt aus der M-Phase wirken könnte (Descombes et al. 1998). In der Zeichnung sind die vier denkbaren Möglichkeiten durch die vier roten Kreise dargestellt. 1) Plx1 könnte direkt aktivierend auf den APC/C wirken, oder zweitens indirekt über Fzy/Cdc20, einem Aktivator des APC, die Ubiquitin-abhängige Proteolyse starten. Außerdem besteht die Möglichkeit der Existenz eines Inhibitors des APC/C und Plx1 könnte drittens einen positiven Einfluss auf die CaMKII-vermittelte Inaktivierung des potentiellen Inhibitors ausüben. Diesen könnte Plx1 viertens auch direkt inaktivieren und so einen Übergang von der Metaphase in die Anaphase ermöglichen.

Dargestellt sind die vier Möglichkeiten wie Plx1 beim Übergang von der M-Phase in die Interphase wirken könnte. Erstens könnte Plx1 direkt aktivierend auf den APC wirken, oder zweitens indirekt über Fzy/Cdc20, einem Aktivator des APC, die Ubiquitin-abhängige Proteolyse starten. Außerdem besteht die Möglichkeit der Existenz eines Inhibitors des APC/C und Plx1 könnte drittens einen positiven Einfluss auf die CaMKII-vermittelte Inaktivierung des potentiellen Inhibitors ausüben. Diesen könnte Plx1 viertens auch direkt inaktivieren und so einen Übergang von der Metaphase in die Anaphase ermöglichen.

Die Polo-Box-Domäne enthält eine Phosphopeptid-Bindestelle.

Bei der Betrachtung der Proteinstruktur der Polo-like-Kinase (das gleich gilt auch für die *Xenopus* Polo-like-Kinase, Plx1), kann man die Kinase in zwei Bereiche einteilen (Abbildung 1-13).



Abbildung 1-13 : Struktur der humanen Plk1. Plk1 kann in zwei Teile geteilt werden, der N-terminalen Kinase-Domäne und der C-terminalen Polo-Box-Domäne, welche wiederum aus zwei Polo-Boxen besteht.

Die Kinase enthält zwei Domänen, die N-terminale Kinase-Domäne und die sog. C-terminale Polo-Box-Domäne (PBD), die wiederum aus zwei sog. Polo-Boxen besteht. In der katalytischen Domäne befindet sich auch die sog. *T-Loop*-Region, Thr 210 bei der humanen Plk1 und Thr 201 bei Plx1. Bei Phosphorylierung dieses Threonins erhöht sich die Kinase-Aktivität von Plk/Plx1. Die Polo-Box ist auch charakteristisch für die Klasse dieser Kinasen. Zum Verständnis der Funktion der PBD trugen vor allem die 2003 erschienenen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um M.B.Yaffe bei (Elia et al. 2003a).

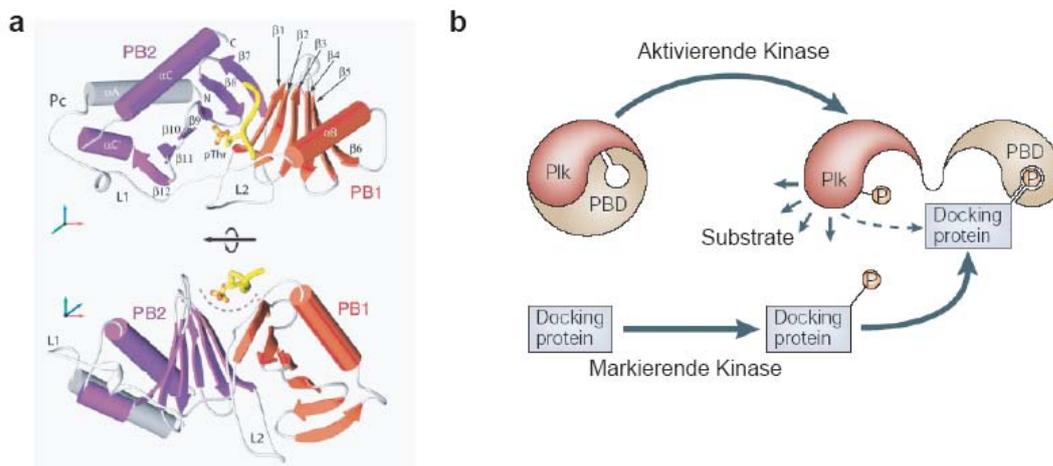


Abbildung 1-14: Röntgenstruktur der humanen Polo-Box-Domäne (Elia et al., 2003), Lokalisierung von Plk1 durch Bindung an phosphorylierte Proteine (Barr et al. 2004). a) Die einzelnen Polo-Boxen (PB1 = rot, PB2 = violett, Linker 1,2 = grau) sind in Ihrer Grundform ähnlich und bilden eine Struktur aus, die die Bindung des Phosphopeptids (gelb) in einer Mulde erlaubt. b) Es wird vermutet, dass die Aktivität von Plk1 nach der Bindung an phosphorylierte Proteine gesteigert wird und erst danach Polo ihre Substrate effizient phosphorylieren kann.

In der ersten Veröffentlichung konnten sie durch einen *Screen* mit dem sie nach Proteinen suchten, die an pSer/pThr-Peptiden binden können, beweisen, dass es sich bei

der Polo-Box-Domäne um eine solche Phosphopeptidbindestelle handelt (Elia et al. 2003a). Sie bestimmten auch eine optimale Bindungssequenz, S-(pT/pS)-(P/X), für die Polo-Box-Domäne. In ihrer zweiten Veröffentlichung zeigten sie die Röntgenstruktur der Polo-Box-Domäne von Plx1 mit einem gebundenen Peptid, damit auch ein Beweis auf molekularer Ebene, zusätzlich zu den biochemischen Ergebnissen aus ihrer anderen Veröffentlichung (Elia et al. 2003). Die Polo-Boxen sind in Ihrer Grundform ähnlich. Sie bilden zusammen eine Struktur aus, die dem Phosphopeptid erlaubt in einer Mulde mit einem positiven elektrostatischem Potential zu binden, dass ermöglicht Polo ihre Substrate effizient zu phosphorylieren (Abbildung 1-14).

Die Polo-Box-Domäne von Plx1 ist nötig für die Aufhebung des CSF-Arrests.

Die Arbeitsgruppe um Jim Maller konnte nachweisen, dass für den positiven Effekt von Plx1 auf den Eintritt in die Anaphase vor allem die PBD eine wichtige Rolle spielt (Liu et al. 2004). In ihren Versuchen verwendeten sie neben der inaktiven Mutante von Plx1 (Plx1^{N172A}) noch eine weitere Mutante von Plx1, die sog. Polo-Box-Mutante W408F, kombiniert mit der Mutante N172A (Plx1^{N172A,W408A}). Sie verglichen die beiden Mutanten in ihrer Fähigkeit den Calcium-Induzierten Übergang vom CSF-Arrest in die Interphase zu verhindern. In Anwesenheit der Doppelmutante Plx1^{N172A,W408A} konnte der Extrakt nach Calcium-Zugabe in die Interphase übergehen, im Gegensatz zu Plx1^{N172A}, die, wie schon von Descombes und Nigg gezeigt, den Calcium-induzierten Übergang verhinderte. Die Gruppe um Maller folgerte daraus, dass die direkte oder indirekte Wirkung auf den APC/C Polo-Box abhängig ist.

1.4.3 Emil als möglicher zytostatischer Faktor

Im April 2002 wurde im *Xenopus*-Ei-Extrakt ein weiteres Protein als möglicher zytostatischer Faktor beschrieben, Emil (*Early mitotic inhibitor 1*) aus *Xenopus laevis* (Reimann et al., 2002). In einer früheren Publikation hatte die Arbeitsgruppe das Protein bereits näher charakterisiert und als Regulator des APC/C in der frühen Mitose beschrieben, indem XEmil mit Cdc20 interagiert und so die Aktivierung des APC/C verhindert. Die direkte Inhibierung des APC/C konnte die Arbeitsgruppe auch in einem *in vitro* APC-Ubiquitylierungs Assay bestätigen, da *Xenopus* Emil die Ubiquitylierung von Cyclin B in diesem Assay verhindern kann (Reimann et al., 2001). Damit war die Voraussetzung (ein Protein welches den APC/C^{Cdc20}-Komplex inhibieren kann) erfüllt, um das Protein auch im Hinblick auf seine Fähigkeit als zytostatischer Faktor in der Meiose zu untersuchen. Das Protein enthält eine F-Box-Domäne und eine ZBR (*Zinc-binding-region*)-Region. F-Box-Proteine bilden einen Teil von SCF-Komplexen, SCF (Skp1-Cullin-F-Box-protein). SCF-Komplexe sind Ubiquitin-Ligasen ähnlich dem APC, dabei dienen F-Box-Proteine als Linker zwischen der Ubiquitinase

und dem Substrat (Cardozo et al. 2004; Vodermaier 2004). ZBR-Regionen können Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. *Xenopus* Emil scheint mehrere CSF-Kriterien (Kapitel 1.4) zu erfüllen, dies wird im Folgenden näher erläutert. Mit dem von der Arbeitsgruppe um Peter Jackson hergestellten Antikörper ist das endogene *Xenopus* Emil in reifen Oozyten nachzuweisen (Reimann et al., 2002). Die Verwendung dieses Antikörpers zur Depletion des Proteins aus CSF-Extrakt führt zu einem Calcium-unabhängigem Übergang in die Interphase, während ein Überschuss des Proteins (1 μ M) einen Calcium-induzierte Aufhebung des Arrests verhindern kann (Reimann et al., 2002). Des Weiteren konnte MPB-XEmil einen Metaphase-Arrest mit hoher MPF-Aktivität in einer Zelle eines Embryos im Zwei-Zell-Stadium induzieren (Reimann et al. 2001). Nach der Zugabe von Calcium zu CSF-Extrakt ist XEmil auch nicht mehr in der Lage Cdc20 zu binden (Reimann et al., 2002), ein Hinweis auf die Inaktivierung des Proteins nach der Befruchtung. XEmil schien also notwendig und ausreichend für die Aufrechterhaltung des CSF-Arrests zu sein. Allerdings wurde die Funktion von Emil als CSF-Faktor in einer im Jahr 2004 erschienenen Veröffentlichung in Zweifel gestellt (Ohsumi et al. 2004). Die Arbeitsgruppe um T. Kishimoto stellte selbst polyklonale Antikörper gegen Emil her und testete diese nach einer Affinitätsaufreinigung in *Western Blots*, um endogenes Emil in Zelllysaten nachzuweisen. Obwohl der Antikörper in der Lage war 1 ng rekombinantes Emil im *Western Blot* zu erkennen, konnten sie Emil erst im Gastrula-Stadium detektieren. Des Weiteren konnten sie durch Injektion von mRNA in unreife Oozyten und Untersuchung der Expression während der Eireifung zeigen, dass das Protein während des Übergangs von der Meiose I zur Meiose II abgebaut wird. Auch direkt in reifen Oozyten exprimiertes Protein ist instabil. Durch Zugabe von 300 nM WT-Emil, erst ab dieser Menge war das Protein in M-Phase-Extrakt stabil, können sie in *Xenopus*-Extrakt einen Metaphase-Arrest induzieren, allerdings kann dieser nicht durch Calciumzugabe aufgehoben werden. Die Arbeitsgruppe folgerte aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen, dass Emil wohl nicht zum CSF-Arrest in Oozyten beiträgt. Zwei wichtige Kriterien (siehe auch 1.4) wären nicht erfüllt, erstens ist das Protein in reifen Eizellen instabil, gerade wenn das Protein seine Funktion ausüben sollte und zweitens wäre die Regulation nicht an die Befruchtung gekoppelt, da es nicht calcium-abhängig inaktiviert wird. Peter Jackson und seine Arbeitsgruppe konnten allerdings mit einem neu hergestellten Antikörper das Protein in Oozyten nachweisen, gezeigt in einer 2005 erschienenen Veröffentlichung (Tung et al. 2005). Das Signal wurde spezifisch durch Emil-Protein blockiert. Dagegen wurde exogen zu Extrakt gegebenes WT-Emil in CSF-Extrakt abgebaut, während endogenes stabil ist. Sie folgerten daraus, dass es wohl für das endogene Protein einen stabilisierenden Faktor gibt, welcher Natur wurde nicht beschrieben. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte mit gegen mEmil gerichteten Antikörpern Emil wiederum auch in reifen Maus-Oozyten nachweisen (Paronetto et al. 2004).

Ein wichtiger Kritikpunkt ist zusätzlich, dass der gegen *Xenopus* Emil gerichtete Antikörper auch XErp1 immunpräzipitieren kann (Tung et al. 2005). So kann der

Effekt, der Depletion von *Xenopus* Emi1 und die dadurch ausgelöste Aufhebung des Arrests auch auf das Emi1-Homologe XErp1 zurückzuführen sein (Tung et al. 2005), damit wurde in Frage gestellt ob Emi1 für die Aufrechterhaltung des Arrests wirklich benötigt wird, oder ob die Depletion von XErp1 die calcium-unabhängige Aufhebung des Arrests bewirkt. Die Rolle von Emi1 als CSF-Faktor ist also umstritten.

1.4.3.1 Regulation von Emi1

Die Regulation der Aktivität von Emi1 durch den gezielten Abbau des Proteins wurde zuerst am humanen und am Maus-Protein aufgeklärt (Guardavaccaro et al. 2003; Margottin-Goguet et al. 2003). Sie konnten zeigen, dass der Abbau von Emi1 durch die Ubiquitin-Ligase SCF (Skp1-Cullin-F-Box-Protein) in Komplex mit dem F-Box-protein β -Trcp (*Beta-transducin repeats-containing-proteins*), vermittelt wird. Durch biochemische Untersuchungen kannte man bereits die Aminosäuresequenz, an die das F-Box-Protein bindet, DSG(X_{2+n})S, und die Substrate nach der Bindung dem SCF-Komplex zuführt (Yaron et al. 1998; Winston et al. 1999). Eine Interaktion wird aber nur durch vorherige Phosphorylierung der beiden Serine in der Sequenz ermöglicht. Daher wird die Sequenz, die den Abbau bestimmen kann, als Phosphodegron bezeichnet. Ein solches DSG-Phosphodegron findet sich im humanen Emi1, Aminosäuresequenz DS¹⁴⁵GXXS¹⁴⁹. Exogen in mitotischen *Xenopus*-Ei-Extrakt gegebenes humanes Emi1 wird abgebaut (Tung et al, 2005). Fragmente die das Phosphodegron nicht mehr besitzen oder eine Mutanten, in der die beiden Serine zu N mutiert wurden, sind stabil. Nur im mitotischen Extrakt konnten die β -Trcp und hEmi1-Proteine co-immunpräzipitiert werden. Auch überexprimierte Proteine in 293T-Zellen waren nur in der Lage zu co-immunpräzipitieren, wenn zuvor die Zellen mit Nocodazol in der Mitose arretiert wurden. Die Phosphorylierung des Phosphodegrons kann folglich nur in der Mitose stattfinden. Im Gewebe von Mensch und Maus existiert noch ein weiteres Paralog von β -Trcp1, β -Trcp2 (Hart et al. 1999). Von daher wollte die Arbeitsgruppe um Peter Jackson noch die Substratspezifität von β -Trcp1 in einer β -Trcp1- *Knock-out* Maus untersuchen (Guardavaccaro et al. 2003). Von Embryonen stammende Fibroblasten, so genannte MEFs (*Mouse embryonic fibroblasts*) können in Zellkultur kultiviert werden. Solche Zellen, die aus einer β -Trcp1^{-/-} Maus isoliert wurden, verweilen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen länger in der Mitose. Asynchrone Zellen zeigen eine Überduplikation an Zentrosomen und eine Anhäufung von multipolaren Spindeln, siehe auch

Abbildung *I-15*.

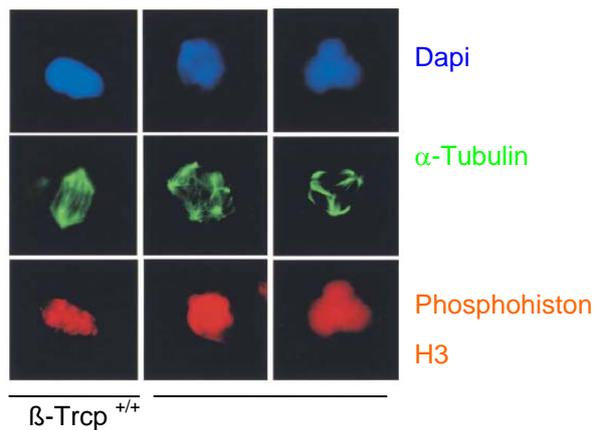


Abbildung 1-15: β -Trcp $^{-/-}$ MEF zeigen multipolare Spindeln und falsch angeordnete Chromosomen (Guardavaccaro et al. 2003).

In der ersten Spalte sind Wildtyp-Zellen abgebildet, sie zeigen eine bipolare Spindel (α -Tubulin) und richtig angeordnete Chromosomen. Die zwei anderen Spalten hingegen zeigen β -Trcp $^{-/-}$ -Zellen mit multipolaren Spindeln und nicht in einer Metaphase angeordnete Chromosomen.

75% der synchronisierten β -Trcp $^{-/-}$ -Zellen konnten die Mitose auch beenden. Ob ein Zytokinese-Defekt vorliegt wurde nicht untersucht. Sie stellten eine veränderte Kinetik im Abbau von Cyclin A und Cyclin B fest und folgerten daraus, dass der APC nur eingeschränkt funktioniert. Da Emi1 als APC-Inhibitor beschrieben wurde, untersuchten sie auch die Menge an diesem Protein und dessen Abbauverhalten in β -Trcp1 $^{-/-}$ MEF. Tatsächlich konnten sie in den *Knock-out* Zellen auch einen verzögerten Abbau von Emi1 in der Prometaphase bestätigen.

Rolle von Plk1 im Abbau von Emi1

2004 erschienen zwei Veröffentlichungen die eine Rolle für Plk1 in der Regulation von Emi1 beschreiben (Hansen et al. 2004; Moshe et al. 2004). Die Gruppen um Avram Hershko und Peter Jackson zeigen in ihren Arbeiten, dass Plk1 einen positiven Einfluss auf den Abbau des APC-Inhibitors besitzt, in dem Plk1 zu der Phosphorylierung der beiden Serine im Phosphodegron beiträgt. Die Kinase besitzt ihre höchste Aktivität in der Mitose, dies wurde bereits durch den Vergleich der Aktivitäten in Interphase und M-Phase-Extrakten aus *Xenopus laevis* gezeigt (Descombes et al. 1998). Emi1 wird zu Beginn der Mitose abgebaut (Reimann et al., 2001), zu einem Zeitpunkt bei dem die Aktivität von Plk1 ansteigt. Beide konnten zeigen, dass durch Plk1-Überexpression die Ubiquitylierung, bzw. der Abbau verstärkt auftritt. Hansen et al. konnten durch Plx1-Depletion in mitotischen *Xenopus* Extrakt zugegebenes in-vitro-translatiertes hEmi1 stabilisieren. Des Weiteren wurde in dieser Veröffentlichung auch die Interaktion zwischen Plk1 und hEmi1 mittels Überexpression in HEK293T-Zellen und anschließender Co-Immunpräzipitation untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass

die PBD von Plk1 mit dem N-Terminus von hEmi1 interagiert. Da Plk1 bevorzugt an bereits phosphorylierte Substrate bindet, wurde auch in beiden Veröffentlichungen die eventuelle Rolle von CyclinB-Cdk1 als „*Priming kinase*“ (Markierende Kinase) untersucht, die bereits von Margottin-Goguët et al. vorgeschlagen wurde. Moshe et al. verwendeten dazu einen *in vitro* SCF^{β-Trcp}-Ubiquitylierungsassay, um zu zeigen, dass *in vitro* die Ubiquitylierung von hEmi1 durch Zugabe von rekombinanter Plx1 angeregt werden konnte. Dazu war 20fach mehr Kinase, als endogen in mitotischen Extrakt vorkommend, nötig. Gab man allerdings rekombinanten CyclinB-Cdk1-Komplex zu der Reaktion, reichten physiologische Konzentrationen an Plx1. Sie folgerten daraus, dass für eine effiziente Ubiquitylierung von hEmi1 beide Kinasen benötigt werden. CyclinB-Cdk1 als „*priming kinase*“ für Plk1, welche das Phosphodegron phosphoryliert. Auch Hansen et al. konnten eine verstärkte Bindung zwischen rekombinanten β-TrCP und Emi1 nach der Phosphorylierung durch beide Kinasen feststellen. Allerdings schlossen sie eine nicht physiologische Bedeutung dieser Ergebnisse nicht aus.

1.4.4 XErp1/Emi2 als CSF Faktor

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, wurde von Descombes und Nigg die Existenz eines putativen Inhibitors des APC/C vorgeschlagen, bei dessen Inaktivierung Plx1 beteiligt sein kann und somit an der Aufhebung des CSF-Arrest. Um diesen Inhibitor zu finden, wurde in einem Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-screen mit einer *Xenopus* Oozyten cDNS-Bibliothek nach möglichen Interaktoren von Plx1 gesucht (Schmidt et al., 2005). Dabei wurde eine inaktive Variante von Plx1, Plx1^{N172A}, als *bait* verwendet, um dadurch besser Substrate durch sog. *substrate trapping* zu finden. Bei dieser Methode geht man davon aus, dass das Substrat länger mit dem Enzym interagiert, da die eigentliche Reaktion die das Substrat freisetzen würde, nicht mehr stattfinden kann. In diesem *Screen* wurde ein Protein gefunden, welches in seinem C-Terminus zu 39% identisch zu dem bereits bekannten APC/C-Inhibitor Emi1 ist (Schmidt et al. 2005). Aufgrund dieser Übereinstimmung wurde das Protein *Xenopus Emi1 related protein 1* (XErp1) benannt. XErp1 enthält, genau wie Emi1, eine F-Box-Domäne und eine ZBR im C-terminalen Bereich. Das Protein reichert sich während der Eireifung an und wird nach Calcium-Zugabe zu CSF-Extrakt abgebaut (Schmidt et al., 2005). Wegen seiner Homologie zu Emi1 wurde die Beteiligung von XErp1 am Metaphase II Arrest in Oozyten untersucht. Bei einer Inaktivierung von XErp1 durch Zugabe von Antikörper zu CSF-Extrakt, geht der Extrakt auch ohne Kalziumzugabe in die Interphase über. Dieser Effekt war spezifisch für XErp1, da durch Zugabe von C-terminalen Fragmenten, die der Antikörper nicht erkennt, konnte die Aufhebung des Arrests verhindert werden. Dafür war wie bei Emi1 eine intakte ZBR nötig, da XErp1 mit einer Mutation in dieser Region, den Übergang in die Interphase durch Zugabe von Calcium nicht verhindern konnte. Mittels Massenspektrometrie wurde nachgewiesen, dass der Antikörper gegen XErp1 kein *Xenopus* Emi1 erkennen kann. Bei einer Zugabe von 500 nM MBP-WT-XErp1 zu CSF-Extrakt hingegen, verhinderte dies eine Aufhebung des Arrests durch Calcium. Auch in einem direkten APC/C-Ubiquitylierungsassay konnte XErp1 diesen inhibieren. Es handelt sich bei XErp1 um den von Descombes und Nigg beschriebenen Inhibitor. In weiteren Experimenten wurde der funktionelle Bezug zu Polo erarbeitet. So wurde untersucht, ob katalytisch inaktive Plx1 die Aufhebung des CSF-Arrests verhindert, indem XErp1 als Effektor dient. Zusätzlich wurde geklärt, ob nur die Polo-Box-Domäne von Plx1 alleine einen dominant negativen Einfluss auf den Übergang vom CSF zu der Interphase haben kann, in Übereinstimmung mit der Veröffentlichung von Jim Maller und Kollegen (Liu et al., 2004). Die Polo-Box-Domäne allein konnte die calcium-induzierte Aufhebung des Arrests verhindern. Eine Variante der Polo-Box-Domäne, welche nicht mehr an Substrate binden konnte (siehe auch Material & Methoden, Plasmide) konnte dies nicht mehr. Um nun zu überprüfen, dass Plx1 nur die Aufhebung des Arrests verhindern kann, wenn XErp1 anwesend ist, wurde zu CSF, der die MBP-Polo-Box-Domäne, bzw. die MBP-Polo-Box-Mutante enthielt, Antikörper gegen XErp1 gegeben. Dieser Extrakt zeigte 60 min nach Zugabe des Antikörpers decondensierte DNS und die Cdk1-Aktivität war auch auf Interphase-Niveau gefallen.

Hinweise darauf, dass der Extrakt den Arrest verlassen hatte. Die Polo-Box-Domäne konnte nur bei Anwesenheit von XErp1 ihren dominant negativen Effekt ausüben. Zugegebenes radioaktiv markiertes IVT-XErp1^{wt} war unter Anwesenheit von MBP-Polo-Box^{wt} bei Zugabe von Calcium stabil, Plx1 beeinflusst also die Stabilität des APC/C-Inhibitors XErp1. Es wurde außerdem gezeigt, dass das Phosphodegron im N-Terminus von XErp1 den Abbau vermittelt (Schmidt et al., 2005 und Kapitel 2.1.3). Eine Mutation in diesem Bereich führt zu einer Stabilisierung des Proteins nach Calcium-Zugabe. Es konnte gezeigt werden, dass Plx1 *in vitro* in der Lage ist das Phosphodegron von XErp1 zu phosphorylieren (Schmidt et al., 2005). Der APC/C-Inhibitor XErp1 ist somit ein *downstream*-Substrat von Plx1 und Plx1 ist an dessen Inaktivierung bei der Aufhebung des Metaphase II-Arrests beteiligt (Abbildung 1-16). Ein Widerspruch ist allerdings warum XErp1 nicht bereits im CSF-Extrakt abgebaut wird, Descombes und Nigg konnten zeigen, dass Plx1 die höchste Aktivität im CSF-Extrakt besitzt. Diese Frage wird in dieser Doktorarbeit beantwortet und die Interaktion zwischen Plx1 und XErp1 näher untersucht. Insbesondere wurde die Regulation von XErp1 beim Calcium-Induzierten Übergang von CSF zur Interphase erforscht. Dazu wurden Versuche mit *Xenopus*-Extrakt und dem *Xenopus*-Protein durchgeführt. Auch erste Versuche mit dem humanen Homologen –hErp1- wurden ausgeführt. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass hErp1 eine ähnliche Funktion und Regulation besitzt, wie das *Xenopus* – Protein und es sich bei der Inaktivierung dieser Proteine um einen konservierten Mechanismus handelt.

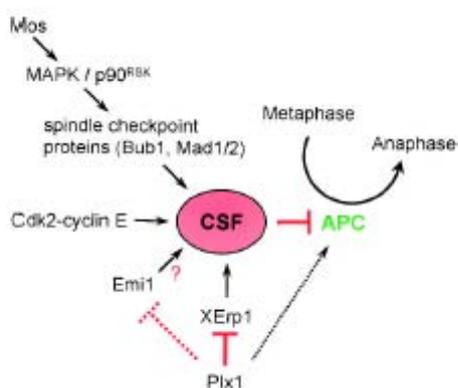


Abbildung 1-16: Plx1 bestimmt den Abbau des APC/C-Inhibitors XErp1 und damit die Aufhebung des CSF-Arrests (Schmidt et al., 2005). Neben anderen Wegen führt XErp1 zu einer Inhibierung des APC/C in reifen Eizellen. Um den Übergang von Metaphase zur Anaphase zu ermöglichen wird Plx1 für die Inaktivierung von XErp1 benötigt.

2 Ergebnisse

2.1 *Xenopus* Erp1 – XErp1

2.1.1 Die subzelluläre Lokalisation von XErp1.

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde von Dr. Peter Duncan ein *yeast-two-hybrid-Screen* durchgeführt, um mögliche Interaktoren von Plx1 zu finden. Dazu wurde eine inaktive Plx1-Variante als *bait* und eine *Xenopus* Oozyten-cDNS Bank verwendet. Neben anderen Interaktoren wurde auch XErp1 gefunden, dessen C-Terminus zu 39% identisch mit Emil ist. Zur Charakterisierung des endogenen Proteins, wurde von Dr. Peter Duncan ein polyklonaler Antikörper gegen XErp1 hergestellt. Als erstes wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die subzelluläre Lokalisation von XErp1 untersucht. Dazu wurde der Antikörper gegen das Antigen aufgereinigt und Immunfluoreszenzanalysen in Froschzellen (A6) durchgeführt. Es zeigte sich, dass das Protein während des Zellzyklus sowohl im Zytoplasma als auch am Centrosom zu finden ist (Abbildung 2-1). In der Metaphase wird das Signal an den Spindelpolen schwächer, stärker erscheint es wieder in der Telophase.

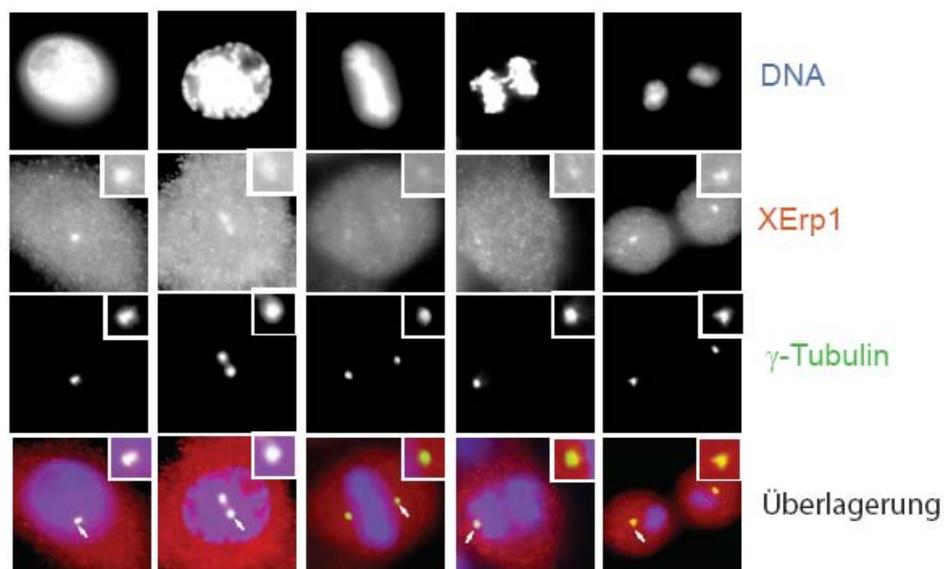


Abbildung 2-1: Subzelluläre Lokalisation von XErp1. Immunfluoreszenzaufnahmen von A6-Zellen nach Methanol-Fixierung. Von links nach rechts: Interphase, Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Durch Pfeile sind die Centrosomen markiert, die im Kästchen vergrößert dargestellt sind.

Um herauszufinden welcher Bereich von XErp1 für die zentrosomale Lokalisierung ausreichend ist, wurden verschiedene Fragmente des Proteins als Myc-Fusionsproteine in den pCS2-Vektor kloniert und in A6-Zellen transfiziert. Durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen wurde untersucht, ob eine Co-Lokalisation des

Fusionsproteins und γ -Tubulin, welches als Marker für das Zentrosom diente, nachgewiesen werden kann. In Abbildung 2-2 sind die verwendeten Fragmente von XErp1 und ihre Lokalisierung dargestellt.

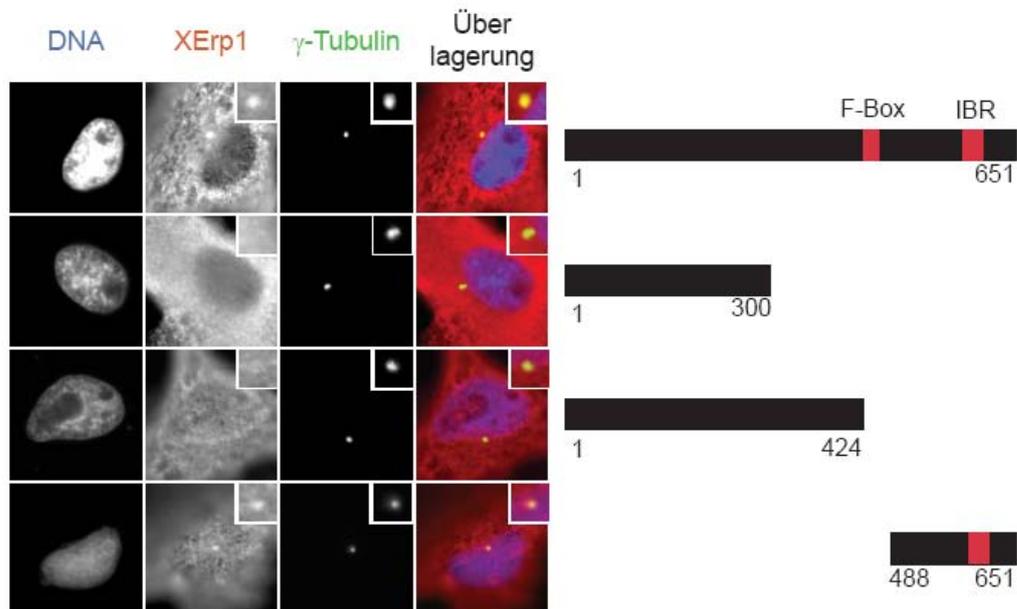


Abbildung 2-2: Die Aminosäuren 488 bis 651 reichen für die zentrosomale Lokalisierung von XErp1 aus. Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen von A6-Zellen, die Myc-XErp1-Fragmente exprimieren. Dargestellt sind Aufnahmen der einzelnen Kanäle, Myc-XErp1 (rot), γ -Tubulin (grün) und die Überlagerung der Kanäle. Zusätzlich ist das Zentrosom vergrößert gezeigt.

Das kleinste untersuchte Fragment welches noch eine zentrosomale Lokalisation zeigte, reichte von den Aminosäuren 488 bis 651. Dieses Fragment enthält nicht mehr die F-Box, aber den *In-Between-Ring-Finger*.

2.1.2 Modifizierungen von XErp1 in *Xenopus*-Ei-Extrakt

Um die Regulation von XErp1 im Laufe des Zellzyklus zu untersuchen, wurde das Verhalten von radioaktiv markiertem *in-vitro*-translatiertem (IVT) Protein in *Xenopus*-Extrakt untersucht. Zu zytoplasmatischem Extrakt aus reifen Eiern (im folgenden CSF-Extrakt benannt, siehe auch Material und Methoden), der Spermien als DNS-Quelle und Rhodamin-markiertes Tubulin enthielt, wurde IVT-Protein zugegeben und durch Calcium-Zugabe in Interphase getrieben und anschließend durch erneute Zugabe von CSF-Extrakt in die M-Phase überführt. Für die Prüfung des Zellzyklusstatus des Ei-Extrakts, wurden während des Experiments Proben entnommen und mikroskopisch analysiert. In Abbildung 2-3 ist der Verlauf des Experiments anhand der Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt.

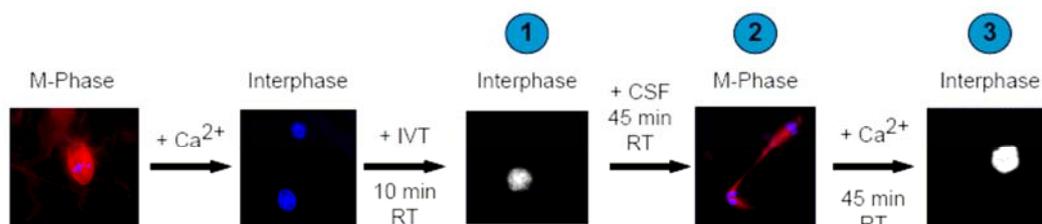


Abbildung 2-3: Während des Experiments wurde der Zellzyklusstatus anhand von Fluoreszenzaufnahmen überprüft.

Des Weiteren wurden zu den in Abbildung 2-4 angegebenen Zeiten Proben für ein Autoradiogramm entnommen, um eventuelle Unterschiede im Laufverhalten während der verschiedenen Zellzyklusstadien nachweisen zu können, um Hinweise auf Modifikationen wie Phosphorylierung oder auch Abbau zu erhalten. In Abbildung 2-4 ist das Autoradiogramm dargestellt.

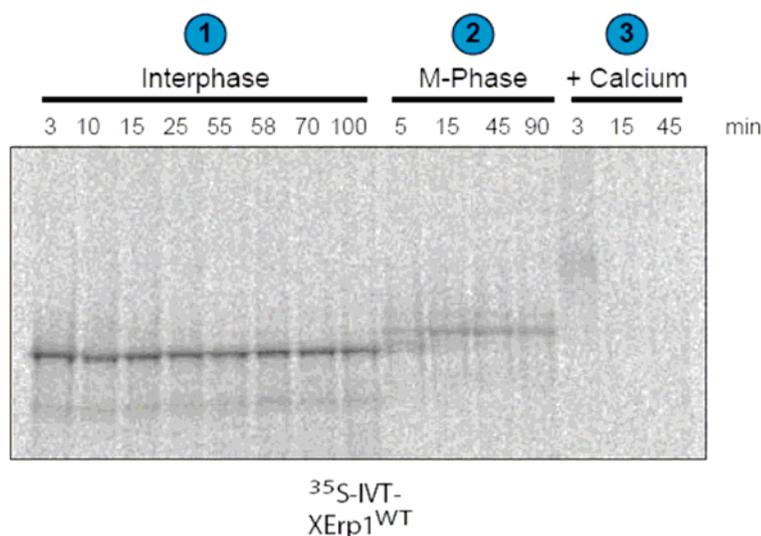


Abbildung 2-4: XErp1 erfährt während des Zellzyklus unterschiedliche Modifikationen und wird calcium-abhängig abgebaut. Die eingekreisten Zahlen entsprechen den verschiedenen Zellzyklusstadien der Abbildung 2-3.

Während der Interphase ist keine Veränderung des Laufverhaltens erkennbar, bei Eintritt in die M-Phase zeigt das Protein im SDS-Gel ein langsames Laufverhalten. Kurz nach Zugabe von Calcium ist eine noch langsamer laufende Form des Proteins im Autoradiogramm zu erkennen. Hierbei handelt es sich möglicherweise um eine ubiquitylierte Form des Proteins, da es anschließend abgebaut wird. Auch endogenes XErp1 (Schmidt et al., 2005) und ein MBP-Fusionsprotein zeigen das gleiche Verhalten (Daten nicht gezeigt).

2.1.2.1 XErp1 wird in CSF-Extrakt phosphoryliert.

Um nachzuweisen, ob es sich bei der langsamer laufenden Form von XErp1 in M-Phase-Extrakt um Phosphorylierung handelt, wurde ^{35}S -Myc-IVT von XErp1 zu CSF-Extrakt gegeben, immunpräzipitiert und mit Phosphatase aus Kälbermagen 1 Stunde bei 20°C behandelt. Danach wurde IVT zu Interphase-Extrakt gegeben und

immunpräzipitiert. In Abbildung 2-5 kann man erkennen, dass nach der Phosphatasebehandlung aus CSF-Extrakt immunpräzipitiertes Protein nun auf der gleichen Höhe läuft, wie aus der Interphase immunpräzipitiertes Protein.

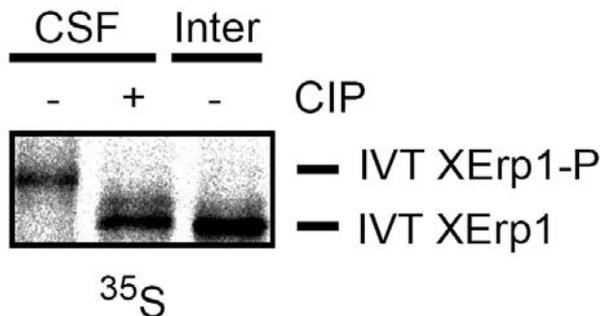


Abbildung 2-5: XErp1 wird im CSF-Extrakt phosphoryliert. ^{35}S -Myc-IVT-XErp1^{WT} wurde zu CSF-Extrakt, bzw. Interphase-Extrakt, gegeben, 20 min bei RT inkubiert, mit α -Myc-Antikörper immunpräzipitiert und mit Phosphatase (CIP) oder Puffer behandelt. Dargestellt ist das Autoradiogramm.

Aus diesem Ergebnis folgt, dass XErp1 in CSF phosphoryliert vorliegt.

2.1.2.2 Aminosäuren S43 und S63 werden im CSF-Extrakt phosphoryliert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass XErp1 in der M-Phase phosphoryliert wird, wurde nach möglichen mitotischen Phosphorylierungsstellen innerhalb des Proteins gesucht. Endogenes Protein aus CSF-Extrakt wurde immunpräzipitiert und mittels Massenspektroskopie analysiert. Diese Versuche wurden von Andreas Schmidt (IP) und in der Gruppe von Dr. Roman Körner (Massenspektroskopie) durchgeführt. S43 wurde als mögliche Phosphorylierungsstelle identifiziert. Bei der Analyse von Abbaumutanten des Proteins (dies wird in Kapitel 2.1.3 näher erörtert) konnten Hinweise gewonnen werden, die auch S63 als mögliche Phosphorylierungsstelle von XErp1 identifizierten. Diese beiden Serine wurden zu Alaninen mutiert und deren Verhalten im Extrakt analysiert. Zudem wurde eine Deletionsmutante kloniert, die kein S43 mehr erhält und eine Phosphorylierung von S63 unwahrscheinlich machen lässt, da ein verkürzter N-Terminus vorliegt. Die Proteine wurden als IVT-Produkte zu CSF-Extrakt gegeben und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden Proben für ein Autoradiogramm entnommen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen IVT-XErp1⁶³⁻⁶⁵¹ und IVT-XErp1^{S43A, S63A} keine starke Veränderung im Laufverhalten nach Inkubation in CSF-Extrakt (Abbildung 2-6a). Wahrscheinlich handelt es sich bei den beiden Serinen um die Hauptphosphorylierungsstellen während der M-Phase.

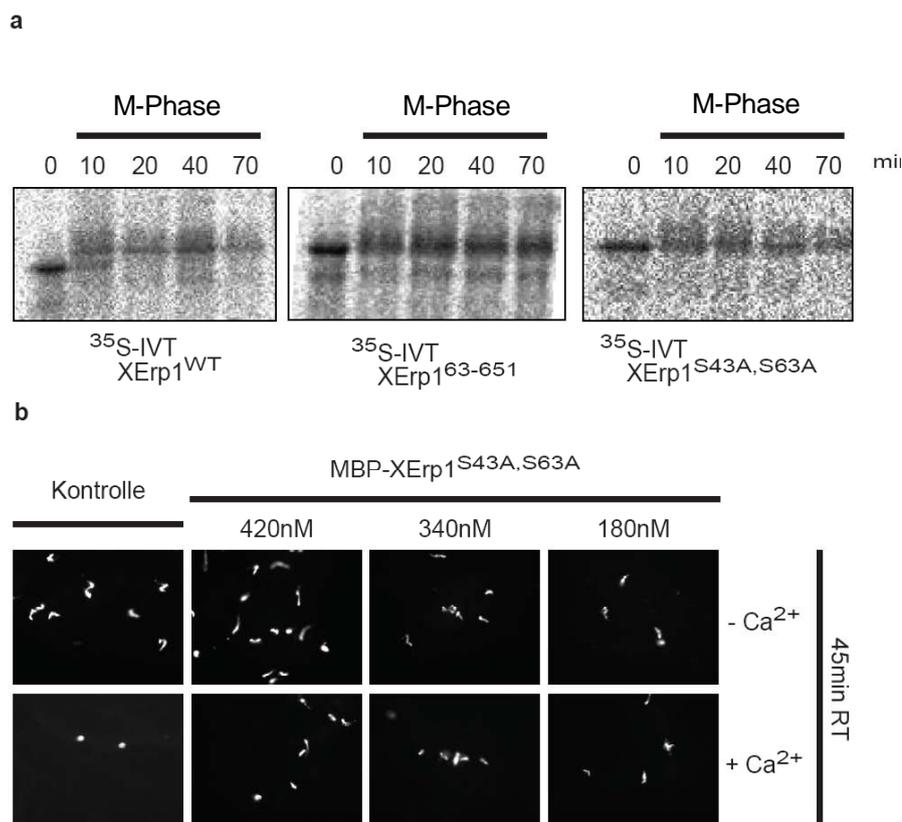


Abbildung 2-6: XErp1 S43 und S63 werden in CSF-Extrakt phosphoryliert. a) ³⁵S-IVT wurde auf Eis zu CSF-Extrakt gegeben (t = 0) und sofort auf Raumtemperatur (20°C) gebracht. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben für ein Autoradiogramm entnommen. b) MBP-XErp1^{S43AS63A}, bzw. Puffer (Kontrolle), wurde zu CSF-Extrakt gegeben, 20 min bei RT inkubiert. 45 min nach Zugabe von Calcium wurde Proben genommen, um die DNS-Morphologie zu untersuchen.

Exogen zugebenes MBP-XErp1 kann die Calcium-induzierte Auflösung des CSF-Arrest verhindern (Schmidt et al., 2005). Um zu überprüfen, ob Serin 43 und Serin 63 für die Aktivität von XErp1 in der Meiose verantwortlich sind, wurde die Doppelmutante auf ihre Fähigkeit untersucht, die Auflösung des Arrests zu verhindern. Dazu wurde MBP-Fusionsprotein zu CSF-Extrakt gegeben, als Kontrolle diente Pufferlösung. MBP-XErp1^{S43A, S63A} verhinderte einen Calcium-induzierten Übergang in die Interphase, zu erkennen an der noch kondensierten DNS (Abbildung 2-6 b). In der Kontrolle haben sich nach Calcium-Zugabe Kerne gebildet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei Serin 43 und Serin 63 um mitotische Phosphorylierungsstellen handelt, die aber nicht an der Regulation des Proteins in seiner Funktion als APC-Inhibitor beteiligt sind.

2.1.3 Regulation des Abbaus von XErp1

Die bisherigen Versuche deuten darauf hin, dass XErp1 nach Ca^{2+} - Zugabe zu M-Phase-Extrakt rasch abgebaut wird. Um Einblick in den Abbaumechanismus zu gewinnen, wurde die Proteinsequenz von XErp1 auf mögliche Abbausignale untersucht. Es konnten 3 unterschiedliche Arten von möglichen Abbausignalen in XErp1 identifiziert werden, wie in Abbildung 2-7 schematisch dargestellt. Es sind drei D-Boxen (RxxL), ein DSG-Motif (Megy et al. 2005) und ein GxEN-Motif (Castro et al. 2003) zu finden. Das DSG-Motif ist durch Phosphorylierung der Serine reguliert. Erst nach der Phosphorylierung der Serine kann die Sequenz vom $\text{SCF}^{\beta\text{-Trep}}$ -Ubiquitin-Ligase-Komplex, welcher das Protein für den proteasomalen Abbau markiert, erkannt werden (Fuchs et al. 2004). Von daher wird das DSG-Motif auch als Phosphodegron bezeichnet.

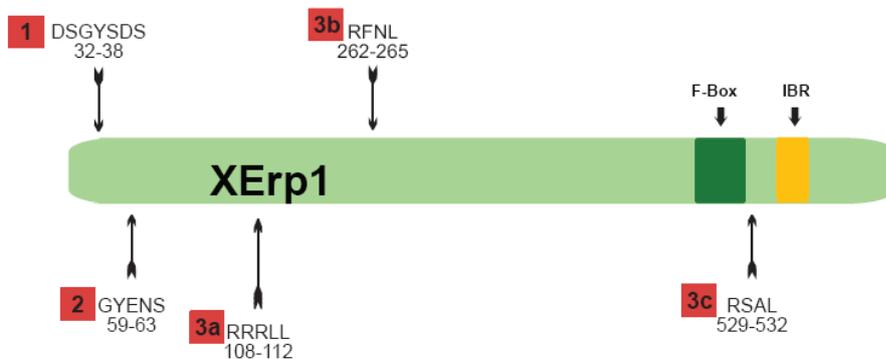


Abbildung 2-7: Mögliche Abbausignale in XErp1. Bei Betrachtung der Proteinsequenz sind drei potentielle Arten von Abbausignalen in XErp1 zu finden. Ein Phosphodegron (1) im N-Terminus, ein GxEN-Motiv (2) und drei D-Boxen (3 a-c).

Es wurden verschiedene Mutanten von XErp1 kloniert, die in den Abbausignalen verändert waren. Mit diesen Mutanten konnte man untersuchen, ob eines der potentiellen Abbausignale für den Zellzyklus-regulierten Abbau des Proteins verantwortlich ist. In Tabelle 2 sind die untersuchten Mutationen aufgelistet und die veränderten Aminosäuren gelb markiert.

Nr. in Abb.2-7	Art des Abbausignals	Abbausignal	Mutation
1	Phosphodegron für $\text{SCF}^{\beta\text{-Trep}}$	DS ³³ GYS ³⁶ DS ³⁸	DN ³³ GYN ³⁶ DS DN ³³ GYSDN ³⁸
2	GxEN-Motiv	G ⁵⁹ YE ⁶¹ NS	A ⁵⁹ YA ⁶¹ NS
3b	D-Box	R ²⁶² FNL	A ²⁶² FNL
3c	D-Box	R ⁵²⁹ SAL	A ⁵²⁹ SAL

Tabelle 2: Mutation der Abbausignale in XErp1.

Von diesen Mutanten wurden radioaktiv markierte IVT-Produkte im Hinblick auf den calcium-abhängigen Abbau in *Xenopus*-Extrakt untersucht. Dazu wurde IVT zu CSF-Extrakt gegeben und ein Teil des Extrakts mit Calcium inkubiert. Zu unterschiedlichen

Zeitpunkten wurden Proben für ein Autoradiogramm entnommen. Während der Experimente wurden auch Proben für die Untersuchung der DNS-Morphologie genommen (Daten nicht gezeigt), um auszuschließen, dass die Zugabe der IVT-Produkte den Übergang von M-Phase zu Interphase verhindert. ^{35}S -IVT-XErp1^{WT} wurde calcium-abhängig abgebaut (Abbildung 2-8a), entsprechend dem Abbauverhalten des endogenen Proteins (Schmidt et al., 2005).

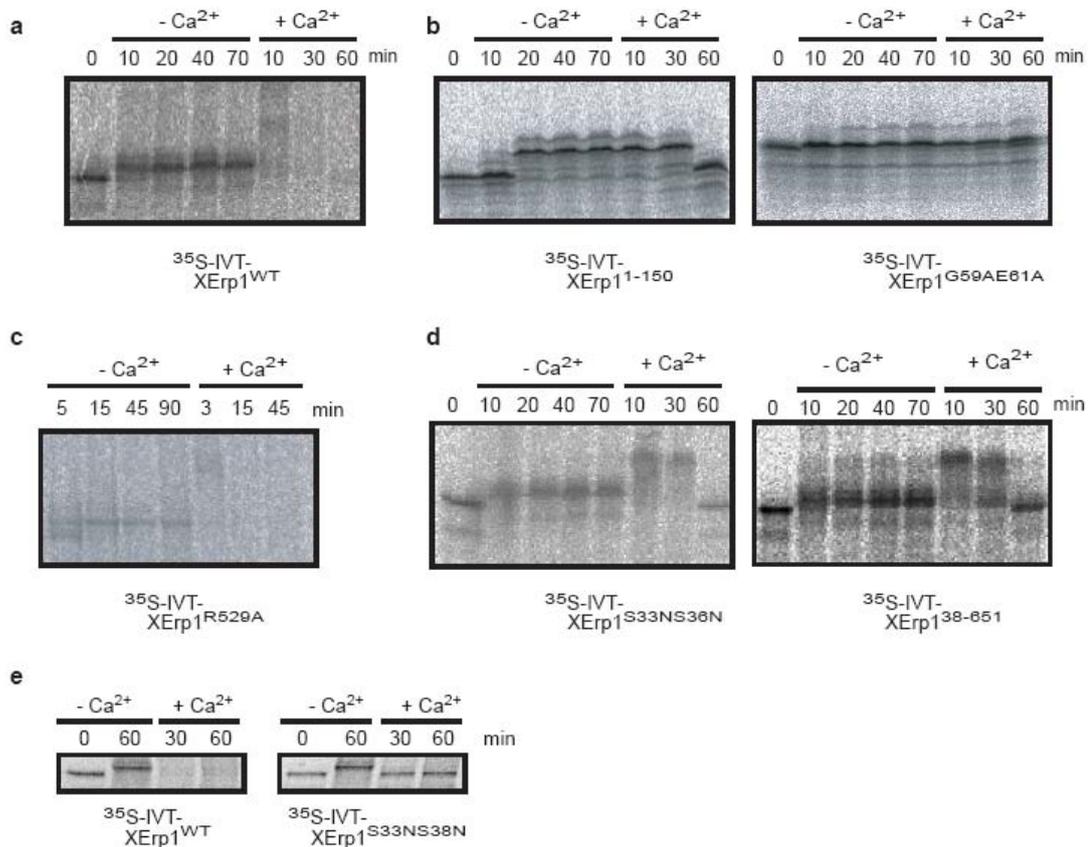


Abbildung 2-8: Ein DSG-Motiv im N-Terminus ist notwendig für den Calcium-abhängigen Abbau von XErp1. a) ^{35}S -IVT-XErp1^{WT} wurde auf Eis zu Extrakt gegeben und bei 20°C inkubiert. Zu einem Teil des Extrakts wurde Calcium gegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für ein Autoradiogramm entnommen. b-d) wurden behandelt wie in a).

Ein Fragment bestehend aus den ersten 150 Aminosäuren hingegen war stabil (Abbildung 2-8b), von daher wurde ausgeschlossen, dass die D-Box R¹⁰⁸RRLI als solche funktionell ist. Dass das DSG-Motiv, welches das Fragment bestehend aus den Aminosäuren 1-150 ebenso enthält, nicht ausgeschlossen werden kann, beruht darauf, dass Serine innerhalb des Motivs phosphoryliert werden müssen, um von SCF^{BTrep} erkannt zu werden. Die dafür verantwortliche Kinase kann eventuell nicht mehr an dieses Fragment binden. Auch die Mutation der GYEN-Sequenz führte zu keiner Stabilisierung des Proteins, auffällig war bei diesem Protein allerdings, dass es nach

Inkubation in CSF-Extrakt nicht im SDS-Gel langsamer läuft (Abbildung 2-8b). Bei der Mutation dieser Sequenz wurde möglicherweise eine Plx1-Phosphorylierungsstelle von Serin 63 verändert, da der Wildtyp in –2-Position zu dem Serin eine positiv geladene Aminosäure besitzt, dies könnte das veränderte Laufverhalten erklären (siehe auch Kapitel 2.1.2.2). Die Arginine der anderen D-Boxen wurden jeweils zu Alaninen mutiert. Die Analyse des Abbauverhaltens von XErp1^{R262A} (Daten nicht gezeigt) und XErp1^{R529A} (Abbildung 2-8c) zeigte keine Stabilisierung bei Zugabe von Calcium. XErp1 welches ein verändertes Phosphodegron besitzt wurde nicht calcium-abhängig abgebaut. Ein Fragment, welches das DSG-Motiv nicht mehr enthielt, war ebenso nach Calcium-Zugabe stabil. Das Phosphodegron im N-Terminus von XErp1 bestimmt also den Calcium-abhängigen Abbau von XErp1.

2.1.3.1 XErp1 wird nach Zugabe von Calcium phosphoryliert.

Wie man in Abbildung 2-8a erkennen kann, ist die Modifikation die XErp1 direkt nach Calcium-Zugabe erfährt, sehr kurzlebig. Diese hochmolekulare Form von XErp1 tritt nur innerhalb der ersten zehn Minuten nach Calcium-Zugabe auf. Um zu untersuchen, ob dies eine phosphorylierungs-abhängige Modifikation ist, wurde versucht, diese Form des Proteins durch Zugabe von Okadasäure, einem Inhibitor von Serin/Threonin-Phosphatasen, zu stabilisieren. Um den Abbau des Proteins von der Modifikation nach Calcium-Zugabe zu entkoppeln, wurde IVT-XErp1³⁸⁻⁶⁵¹ in CSF-Extrakt gegeben, Calcium zugegeben und nach 8 min der Extrakt in drei Fraktionen aufgeteilt. Zu den Fraktionen wurde jeweils Puffer, 1mM Okadasäure, bzw. Okadasäure und 100µM MG262 (ein Proteasom-Inhibitor) gegeben. Während des Experiments wurden Proben für ein Autoradiogramm entnommen. Da sich die hochmolekulare Form von XErp1 durch Zugabe von Okadasäure stabilisieren lässt (Abbildung 2-9), kann man daraus schlussfolgern, dass eine Phosphorylierung des Proteins auch bei der Modifikation nach Calcium-Zugabe eine direkte oder indirekte Rolle spielt. Die Zugabe von MG-262 hat keinen weiteren Einfluss auf die Modifikation besitzt, in Übereinstimmung mit der Vermutung, dass das N-terminale DSG-Motiv den Abbau bestimmt, welches beim untersuchten XErp1³⁸⁻⁶⁵¹ fehlt.

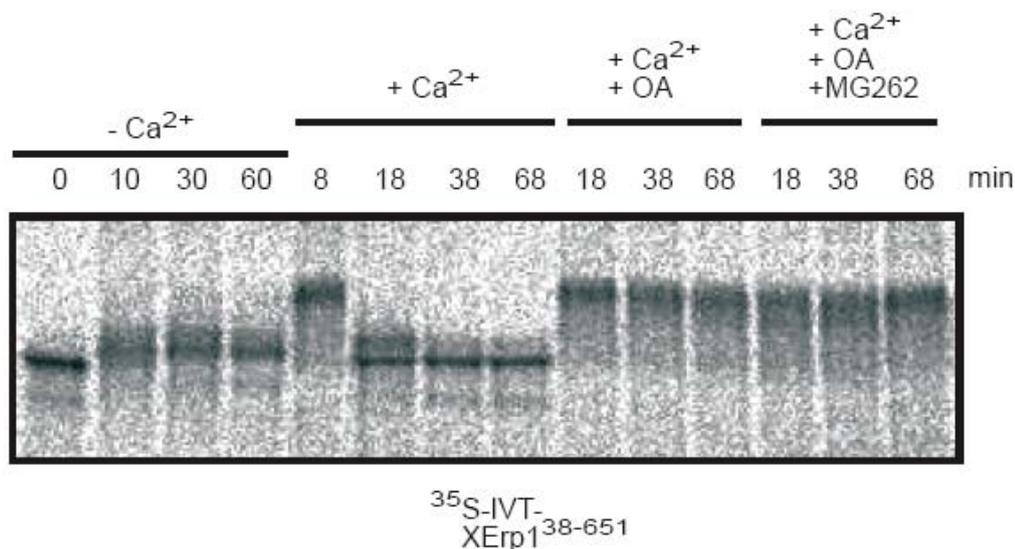


Abbildung 2-9: Nach Calcium-Zugabe wird XErp1 phosphoryliert. ³⁵S-IVT-XErp1³⁸⁻⁶⁵¹ wurde zu CSF-Extrakt gegeben. Acht Minuten nach Zugabe von Calcium wurde der Extrakt mit Puffer, Okadasäure oder mit Okadasäure und MG-262 inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für ein Autoradiogramm entnommen.

2.1.3.2 CaMKII phosphoryliert XErp1.

Die Modifikation von XErp1 direkt nach Calcium-Zugabe ist abhängig von einer Phosphorylierung (Abbildung 2-9). Wie in der Einleitung beschrieben, wird die CaMKII bei der Befruchtung durch den transienten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration aktiviert (Lorca et al. 1993). Von daher wurde in einem *in-vitro*-Kinase-Assay untersucht, ob CaMKII in der Lage ist XErp1 zu phosphorylieren. Als Substrat wurde XErp1^{WT} rekombinant als MBP-Fusionsprotein aufgereinigt. CaMKII war von NEB erhältlich. Für den Kinase-Assay wurde zuerst die CaMKII für 10 min durch Zugabe von Calcium und Calmodulin aktiviert und anschließend zu MBP-XErp1^{WT} gegeben. Als Kontrolle wurde nur Reaktionspuffer zu MBP-XErp1^{WT} gegeben. Wie in Abbildung 2-10 zu sehen, ist CaMKII in der Lage *in vitro* XErp1 zu phosphorylieren. MBP-Protein wurde nicht von CaMKII phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Es ist also von daher möglich, dass CaMKII nach ihrer Aktivierung XErp1 phosphoryliert, was möglicherweise zum Abbau von XErp1 führt.

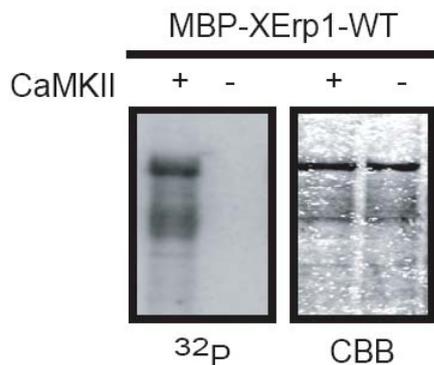


Abbildung 2-10: XErp1 ist ein Substrat von CaMKII. Es wurde ein in-vitro Kinase-Assay in Gegenwart von [γ - 32 P]-ATP durchgeführt. Dazu wurde MBP-XErp1 mit oder ohne aktive CaMKII bei 30°C inkubiert. Das Autoradiogramm (links) und das Coomassie Brilliant Blue (CBB) gefärbte SDS-Gel (rechts) sind gezeigt.

2.1.3.3 CaMKII kennzeichnet XErp1 als Substrat für Plx1.

Plx1 ist in der Lage die Serine des N-terminalen DSG-Motivs von XErp1 zu phosphorylieren (Schmidt et al., 2005). XErp1 ist aber in CSF-Extrakt stabil, obwohl Plx1 dort ihre höchste Kinaseaktivität besitzt (Descombes & Nigg, 1998). Da für die Phosphorylierung mittels Polo häufig eine bereits vorhandene Phosphorylierung im Substrat benötigt wird, damit Polo mit der PBD an sein Substrat binden kann, ist es nahe liegend zu vermuten, dass die Markierung durch die CaMKII geschieht. Sucht man in der Proteinsequenz von XErp1 nach Aminosäuresequenzen die der *consensus sites* für die CaMKII entsprechen (RxxS/T), so sind 10 mögliche Phosphorylierungsstellen zu finden, diese sind in

Abbildung 2-11 aufgelistet. Von diesen besitzen zwei ein Serin in -1 Position zu der phosphorylierbaren Aminosäure, dies würde die Bindung von der Polo-Box-Domäne ermöglichen.

R	E	K	S	139
R	I	P	S	145
R	D	G	S	162
R	S	S	T	195
R	E	T	S	316
R	R	L	S	335
R	L	S	T	336
R	V	H	S	384
R	Q	L	S	516
R	T	P	T	547

Abbildung 2-11: Mögliche CaMKII-Phosphorylierungsstellen von XErp1. Die *consensus sites* sind blau unterlegt. Rot eingrahmt sind die möglichen Stellen, die theoretisch eine durch CaMKII regulierte Polo-Box-Bindestelle schaffen.

Zuerst wurde untersucht, ob die Threonine 195, bzw. 336 einen Einfluss auf den Abbau von XErp1 haben. Dafür wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese die Threonine zu

Alaninen mutiert. ^{35}S -IVT-XErp1^{T195A}, bzw. ^{35}S -IVT-XErp1^{T336A} wurde zu CSF-Extrakt gegeben und der Calcium-abhängige Abbau analysiert. Es wurden nur geringe Mengen an IVT-Produkt zugegeben, um zu verhindern, dass der Übergang von CSF zur Interphase nicht durch die Zugabe von exogenem Protein beeinflusst wird (Abbildung 2-12b). Dies wurde durch die Analyse der DNS-Morphologie überprüft und zu bestimmten Zeiten Proben für ein Autoradiogramm entnommen. Wie man in Abbildung 2-12a erkennen kann, führt nur die Mutation von Threonin 195 zu einer Stabilisierung des IVT-Produkts bei Calcium-Zugabe.

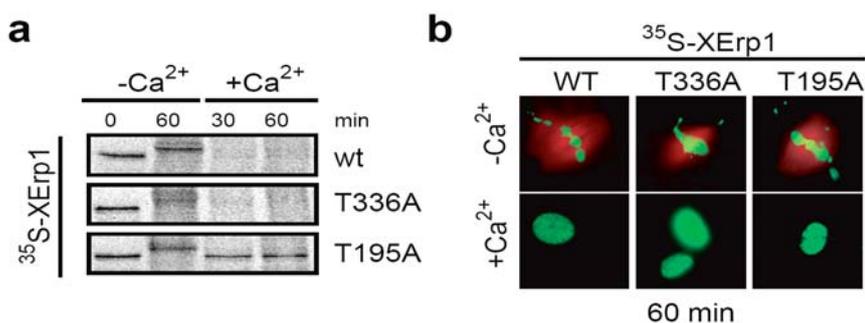


Abbildung 2-12: Die Mutation von T195 zu Alanin führt zu einer Stabilisierung von XErp1. ^{35}S -IVT-XErp1^{wt}, -XErp1^{T336A}, XErp1^{T195A} wurden zu *Xenopus*-Extrakt gegeben und der Calcium-abhängige Abbau untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für ein Autoradiogramm (a) genommen und die DNS-Morphologie, bzw. der Spindelaufbau (b) mikroskopisch untersucht.

Falls die CaMKII den Abbau von XErp1 durch die Schaffung einer Polo-Box-Bindungsstelle vermittelt, dann ist das in -1 Position stehende Serin essentiell für die Regulation des Abbaus. Daher wurde Serin 194 zu Alanin mutiert und ^{35}S -IVT-XErp1^{S194A} zu CSF-Extrakt gegeben und der Calcium-abhängige Abbau analysiert.

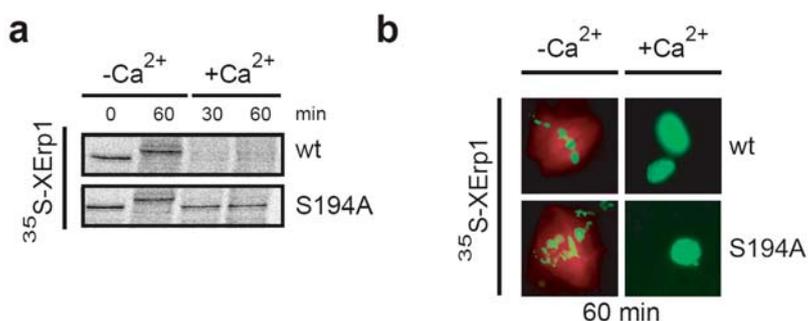


Abbildung 2-13: S194 ist notwendig für den Abbau von XErp1. ^{35}S -IVT-XErp1^{wt}, -XErp1^{S194A}, wurden zu *Xenopus*-Extrakt gegeben und der Calcium-abhängige Abbau untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für ein Autoradiogramm (a) genommen und die DNS-Morphologie, bzw. der Spindelaufbau (b) mikroskopisch untersucht.

Auch die Mutation von Serin 194 zu Alanin führt zu einer Stabilisierung des Proteins nach Calcium-Zugabe (Abbildung 2-13 a), in Übereinstimmung mit dem Modell, dass CaMKII eine Bindestelle für Plx1 schafft. Auch in diesem Fall verhinderte die Zugabe

von geringen Mengen an IVT-Produkt nicht den Übergang in die Interphase bei Calcium-Zugabe (Abbildung 2-13b). Um nun direkt zu untersuchen, ob CaMKII Threonin 195 phosphoryliert, um für Plx1 eine Bindestelle zu schaffen, wurden Far-Western-Experimente durchgeführt. Dazu wurden XErp1^{WT}, XErp1^{S194A}, XErp1^{T195A} und XErp1^{S33NS38N} als MBP-Fusionsproteine aufgereinigt. Diese Fusionsproteine wurden dann in einem in-vitro-Kinase-Assay mit CaMKII phosphoryliert und anschließend über ein SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses Gel wurde auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und diese über Nacht mit His-Plx1, MBP-PBD^{wt} und PBD^{mut} inkubiert. Gebundenes Protein wurde dann mittels α -Plx1-Antikörper detektiert.

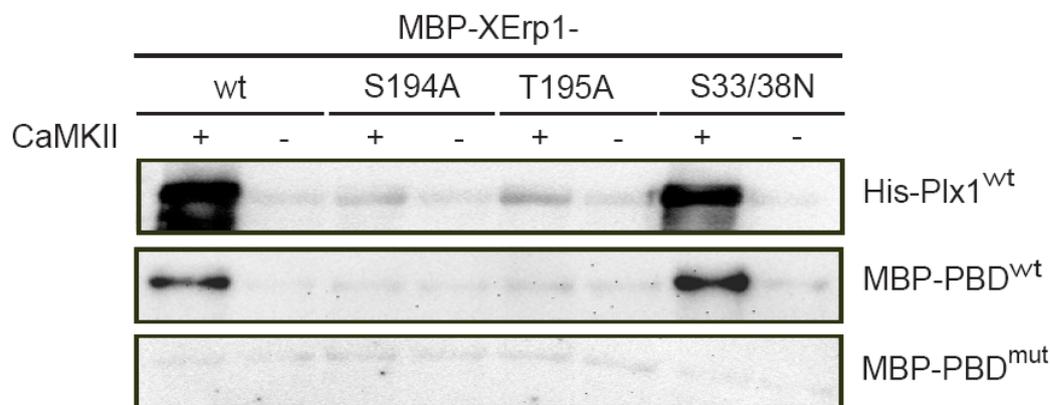


Abbildung 2-14: CaMKII schafft für Plx1 eine Bindestelle an XErp1. Die Bindung von His-Plx1^{wt}, MBP-PBD^{wt} und MBP-PBD^{mut} an XErp1 wurde mittels Far-Western-Analysen untersucht. MBP-XErp1 wurde mit CaMKII oder Puffer inkubiert, auf ein SDS-Gel übertragen und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und über Nacht mit His-Plx1^{wt}, MBP-PBD^{wt} und MBP-PBD^{mut} inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels α -Plx1 detektiert.

Wie vermutet, kann eine vorherige Phosphorylierung durch CaMKII die Bindung von His-Plx1, bzw. MBP-PBD^{wt}, an XErp1^{wt} verstärken (Abbildung 2-14). Dahingegen können His-Plx1 und MBP-PBD^{wt} nicht mehr mit den Mutanten MBP-XErp1^{S194A} und MBP-XErp1^{T195A} interagieren (Abbildung 2-14). Die Bindung an die phosphorylierte Phosphodegronmutante MBP-XErp1^{S33NS38N} ist nicht beeinflusst (Abbildung 2-14), in Übereinstimmung mit der Annahme, dass CaMKII an Threonin 195 eine Bindestelle für Plx1 schafft. MBP-PBD^{mut} ist, wie erwartet, nicht mehr in der Lage an XErp1 zu binden (Abbildung 2-14).

2.1.3.4 Threonin 195 wird phosphoryliert um XErp1 für den Abbau zu bestimmen

Für den Beweis, dass XErp1 im CSF-Extrakt nicht abgebaut wird, da keine Phosphorylierung von Threonin 195 erfolgt, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diese Aminosäure unabhängig von CaMKII zu einer Bindestelle für Plx1 zu machen. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurde zunächst Threonin 195 zu Glutamat, bzw. Aspartat mutiert, um eine Phosphatgruppe zu imitieren. ³⁵S-IVT-XErp1^{T195D}, bzw. ³⁵S-IVT-XErp1^{T195E} waren allerdings in CSF-Extrakt stabil (Daten nicht gezeigt). Von

daher wurde nach einem anderen Weg gesucht, um Threonin195 schon in CSF-Extrakt zu phosphorylieren. Dazu wurde in der CaMKII Phosphorylierungsstelle RXST¹⁹⁵LXD von XErp1 eine Mutation eingeführt, die dem essentiellen Motiv „S/TPXK“ für die Phosphorylierung durch Cdk1 entspricht. Da in CSF-Extrakt eine hohe Aktivität an Cdk1 vorhanden ist, könnte Cdk1 durch Phosphorylierung von Threonin 195 eine Bindestelle für Plx1 kreieren und somit XErp1 schon im CSF-Extrakt für den Abbau bestimmen. In Tabelle 3 ist der entsprechende Teil der Proteinsequenz von XErp1 gezeigt.

Wildtyp	Cdk1-Mutante
RXSTL ¹⁹⁶ XD ¹⁹⁸	RXSTP ¹⁹⁶ XK ¹⁹⁸

Tabelle 3: Einführung eines essentiellen Cdk1-Phosphorylierungsmotivs in XErp1.

Die Mutante wurde als IVT-Produkt in CSF-Extrakt im Hinblick auf ihr Abbauverhalten untersucht. Und tatsächlich wurde die Cdk1-Mutante bereits im CSF-Extrakt abgebaut, während der Wildtyp stabil war (Abbildung 2-15).

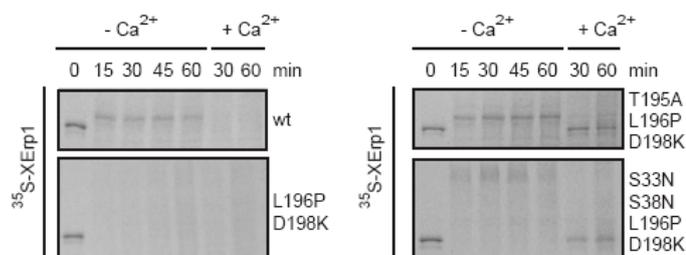


Abbildung 2-15: Die Phosphorylierung von Threonin 195 ist essentiell für den Abbau von XErp1. ³⁵S-IVT-XErp1^{wt}, -XErp1^{L196P,D198K}, -XErp1^{T195A,L196P,D198K}, oder -XErp1^{S33N,S38N,L196P,D198K} wurde zu CSF-Extrakt gegeben und bei RT inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für ein Autoradiogramm genommen.

Um zu überprüfen, dass hier die Regulation des Abbaus der des Proteins bei Calcium-Zugabe entspricht, wurden auch Threonin 195 zu Alanin mutiert, bzw. die Serine 33 und 38 zu Asparagin mutiert. Diese Mutanten wurden ebenfalls im Hinblick auf ihr Abbauverhalten untersucht. Auch hier führen die Mutationen zu einer Stabilisierung der Cdk1-Mutante. Damit ist gezeigt, dass der Abbauweg der Cdk1-Mutante dem des Wildtyps entspricht.

Die Polo-Box-Domäne alleine hat eine dominant-negative Wirkung auf Plx1 (Schmidt et al., 2005). Um nun eine weitere Bestätigung dafür zu erhalten, dass Plx1 auch beim Abbau der Cdk1-Mutante eine Rolle spielt, wurde versucht die Cdk1-Mutante durch Zugabe von PBD^{wt} im CSF-Extrakt zu stabilisieren. Tatsächlich wurde die Cdk1-Mutante von XErp1 durch Zugabe von MBP-PBD^{wt}, aber nicht durch Zugabe von MBP-PBD^{mut} stabilisiert (Abbildung 2-16a). ³⁵S-IVT-XErp1^{wt} wurde durch MBP-PBD^{wt} oder MBP-PBD^{mut} nicht beeinflusst (Abbildung 2-16a). Während des Experiments blieb der Extrakt in der M-Phase arretiert (Abbildung 2-16b).

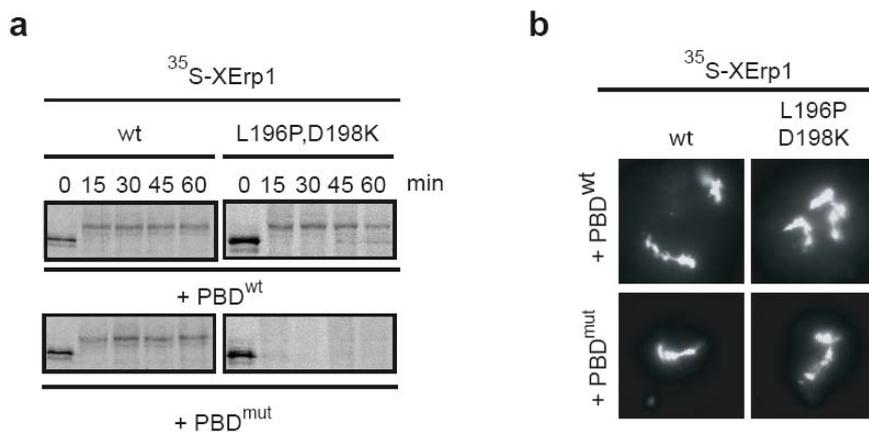


Abbildung 2-16: Die Aktivität von Plx1 wird auch für den Abbau der Cdk1-Mutante benötigt. Zu CSF-Extrakt wurde MBP-PBD^{wt}, bzw. – PBD^{mut} gegeben. In diesen Extrakten wurde das Abbauverhalten von ³⁵S-IVT-XErp1^{wt}, bzw. ³⁵S-IVT-XErp1^{L196P,D198K} untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für ein Autoradiogramm (a) und die DNS-Morphologie (b) untersucht.

Dies ist eine weitere Bestätigung dafür, dass die Cdk1-Mutante genauso wie der Wildtyp im Hinblick auf den Abbau reguliert wird. Eine Phosphorylierung von Threonin 195 wird benötigt, damit Plx1 an das Protein binden kann und daraufhin das Phosphodegron phosphoryliert. Dadurch wird das Protein für den SCF^{β-Trecp}-Komplex erkennbar und kann von diesem ubiquityliert werden.

2.2 Humanes Erp1 – hErp1

Das humane Protein wurde von Dr. Thomas Mayer aus einer humanen Hoden-cDNS-Bank mittels einer *Race*-PCR kloniert. hErp1 besteht aus 723 Aminosäuren und besitzt wie XErp1 eine F-Box und einen *In-Between-Ring-Finger* und besitzt eine theoretische Größe von 78,4 kDa.. Des Weiteren besitzt es zwei mögliche DSGX₂₋₃S-Motive, DS⁷⁶GYNE im N-Terminus, bzw. DS³³⁴GFNSLS in der Mitte des Proteins. In Abbildung 2-17 ist hErp1 schematisch dargestellt.



Abbildung 2-17: Schematischer Aufbau von hErp1. Das Protein enthält wie sein *Xenopus* Homolog eine F-Box und eine IBR-Domäne. Außerdem enthält es zwei putative Phosphodegrons, DS⁷⁶GYNE und DS³³³GFNSLS.

2.2.1 hErp1 besitzt eine funktionelle F-Box

F-box Proteine sind Bestandteile des SCF-Komplex, einem Ubiquitin-Ligase-Komplex, und sind für die Substratbindung verantwortlich. Die F-Box vermittelt die Bindung des F-Box-Proteins an Skp1 und damit an den SCF-Komplex. Für XErp1 ist bekannt, dass es im direkten Y2H mit Skp1 interagieren kann (Dr. Peter Duncan, persönliche Mitteilung). Diese Bindung ist wie bei allen F-Box-Proteinen von der F-Box abhängig. Dasselbe wurde für das humane Protein getestet.

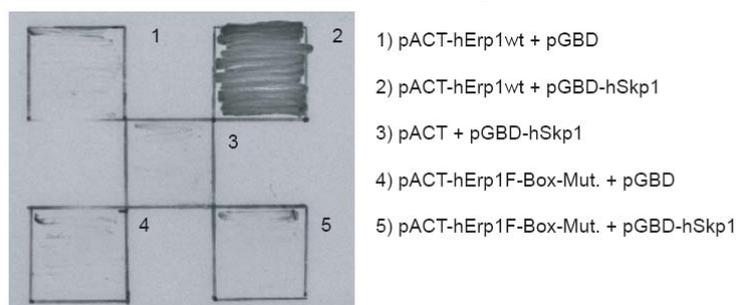


Abbildung 2-18: Die F-Box ist für die Bindung von hErp1 an hSkp1 essentiell. In einem gerichtetem Y2H-Screen wurden hErp1^{wt} und hErp1^{F-Box-mut} auf ihre Interaktion mit hSkp1 getestet. Gezeigt sind die Hefekulturen auf Selektionsplatten.

Dazu wurde der Wildtyp und eine F-Box-Mutante (siehe Material und Methoden) in den pACT-Vektor kloniert und das hSkp1 in den pGBD-Vektor. Freundlicherweise wurde uns hSkp1 von Dr. Alexander Buchberger zur Verfügung gestellt. Die beiden Vektoren wurden in Hefe transferiert und die Interaktion der beiden Proteine mittels Ausplattieren auf Selektionsplatten getestet. Wie Abbildung 2-18 zeigt, kann nur der Wildtyp mit hSkp1 in Interaktion treten, aber nicht die F-Box-Mutante.

2.2.2 Lokalisation

2.2.2.1 Lokalisation von überexprimierten hErp1 in HeLa-Zellen

Um die Lokalisation in Zellen zu bestimmen wurde hErp1^{wt} in pCS2-GFP, bzw. in pCS2-Myc kloniert und in HeLa-Zellen transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz eine etwaige subzelluläre Lokalisation bestimmt.

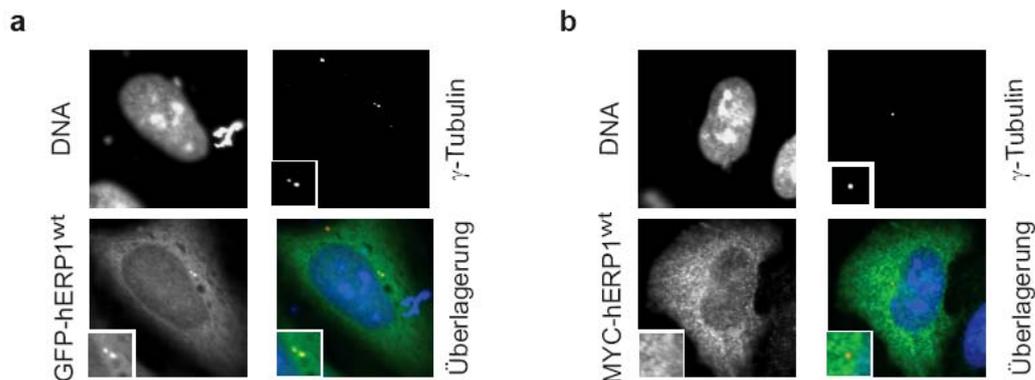


Abbildung 2-19: Überexpression von hErp1^{wt} in HeLa-Zellen. Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen, die hErp1^{wt} als GFP, bzw. MYC-N-terminales Fusionsprotein exprimieren. Die Zellen wurden eine halbe Stunde bei -20°C in einer hundertprozentigen Methanollösung fixiert. a) Es wurden HOECHST für das Anfärben der DNS, Maus-anti-γ-Tubulin/ Ziege-anti-Maus-Alexa^{red} für Zellen verwendet die mit dem GFP-Konstrukt transfiziert worden waren. b) Zellen wurden genauso behandelt wie in (a), nur das hier Hase-anti-Myc / Ziege-anti-Maus-Alexa^{green} zusätzlich verwendet wurde.

Das GFP-Fusionsprotein lokalisierte im Cytoplasma, ein stärkeres Signal war aber auch am Zentrosom erkennbar (Abbildung 2-19a), GFP alleine lokalisierte nicht am Zentrosom (Daten nicht gezeigt). Das Myc-Fusionsprotein lokalisierte ebenfalls im Zytoplasma, hier war allerdings kein ausgeprägtes zentrosomales Signal detektierbar (Abbildung 2-19b). Eine eindeutige Aussage über die subzelluläre Lokalisation hErp1 lässt sich nicht treffen.

2.2.2.2 Charakterisierung von endogenem hErp1

Um das endogene Protein zu charakterisieren wurden insgesamt vier polyklonale Antikörper gegen hErp1 hergestellt. In Abbildung 2-19 sind die Antigenbereiche schematisch dargestellt. Tabelle 4 gibt Auskünfte darüber, als welche Fusionsproteine die Antigene exprimiert wurden, wie diese Fusionsproteine aufgereinigt wurden (nativ oder denaturierend) und wie der Antikörper aus dem Serum aufgereinigt wurde.

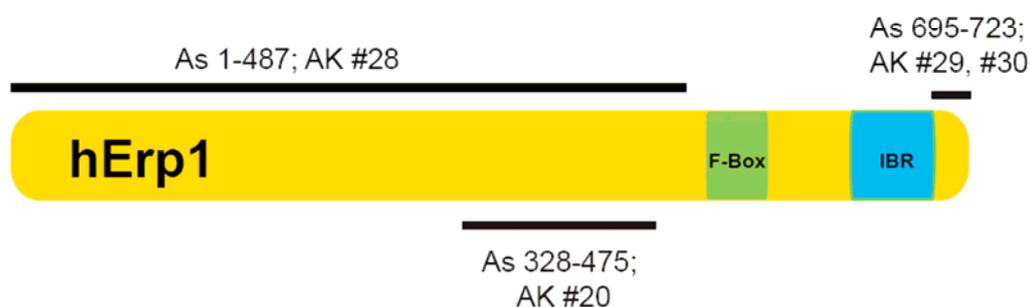


Abbildung 2-20: Darstellung der Bereiche von hErp1, die für die polyklonale Antikörpergewinnung genutzt wurden.

Antikörper- Nummer	Antigen	Aufreinigung Antigen	Aufreinigung Antikörper
# 20	His-hErp1 ³²⁸⁻⁴⁷⁵	Nativ IMAC + MonoQ	Affi15 + MBP-hErp1 ^{VI} -his
# 28	MBP-hErp1 ¹⁻⁴⁸⁷ -his	Tap-tag- Aufreinigung	1. NHS-Säule + MBP 2. Durchlauf auf NHS-Säule + MBP-hErp1 ¹⁻⁴⁸⁷ -his
# 29	KLH- hErp1 ⁶⁹⁵⁻⁷²³	-	Sulfo-Link+Peptid
# 30	KLH- hErp1 ⁶⁹⁵⁻⁷²³	-	Sulfo-Link+Peptid

Tabelle 4: Liste der im Rahmen der Doktorarbeit hergestellten Antikörper gegen hErp1. Aufgelistet sind die Antikörper, die in Abbildung 2-22 in Immunoblots getestet wurden.

2.2.2.2.1 Immunoblot-Analysen der hErp1-Antikörper

Die Antikörper, bzw. die erhaltenen Seren wurden sowohl in *Western-Blots* mit HeLaS3-Zelllysat (Abbildung 2-21), als auch in Immunfluoreszenzanalysen von HeLaS3-Zellen getestet (Abbildung 2-23). Alle Seren und aufgereinigte Antikörper

erkannten *in vitro*-translatiertes hErp1, in Zellysat wurden allerdings verschiedene Proteine erkannt.

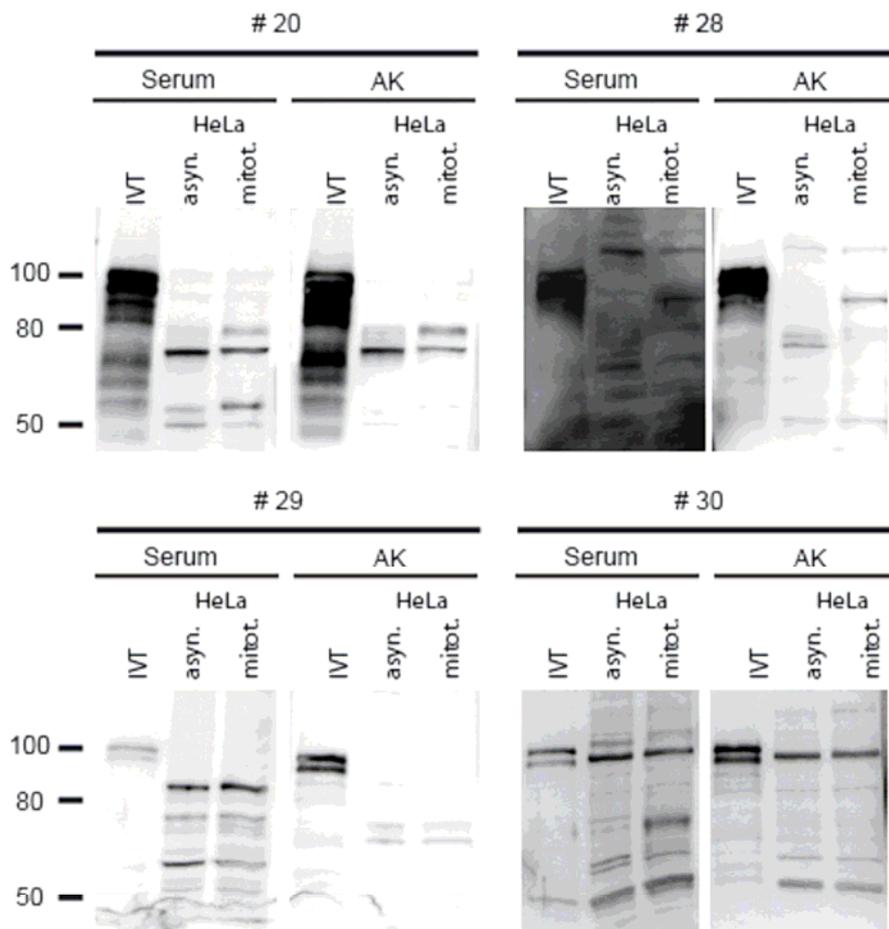


Abbildung 2-21: Immunoblot-Analysen der gegen hErp1 affinitätsaufgereinigten Antikörper. Dargestellt sind immer die Signale des Serums in einer Verdünnung von 1:500, bzw. das Signal des jeweiligen aufgereinigten Antikörpers in der Konzentration von 1 µg/ml. Die Spuren eines Gels wurden in der Reihenfolge von 1 µl einer hErp1VL-IVT, 20 µg asynchroner HeLa-Zellextrakt und Nocodazol (mitot.)-arretierter HeLa-Zellextrakt beladen.

Antikörper #29 wurde nicht weiter getestet, da dieser nach der Aufreinigung nur ein schwaches Signal im Immunoblot gab und Antikörper #30 mit dem gleichen Antigen hergestellt wurde und ein stärkeres Signal in Zellysaten zeigte. Die Spezifität der Antikörper wurde im Immunoblot gegen Zellysat aus siRNA-behandelten Zellen getestet. Allerdings erfolgte bei keinem Antikörper die Abnahme eines Signals in siRNA-behandeltem Zellysat (Abbildung 2-22). Um auszuschließen, dass die siRNA aus technischen Gründen nicht funktioniert hat und man deswegen keine Abnahme eines Signals beobachten konnte, wurde versucht soviel Protein aus Zellen zu immunpräzipitieren, dass man eine färbare Bande erhalten konnte, die man massenspektroskopisch analysieren konnte (Daten nicht gezeigt). Dies gelang aber bei keinem der getesteten Antikörper. Die Frage der Spezifität konnte somit noch nicht geklärt werden. Antikörper #30 der als einziger getesteter Antikörper im Zellysat ein

Protein erkennt, welches auf der gleichen Höhe wie das IVT-Produkt im SDS-Gel läuft, erkennt auch MBP-XEmi1 (Daten nicht gezeigt), daher könnte es sein, dass es sich bei der um 50 kD laufenden Bande um hEmi1 handelt, dessen theoretische Größe 51 kD beträgt.

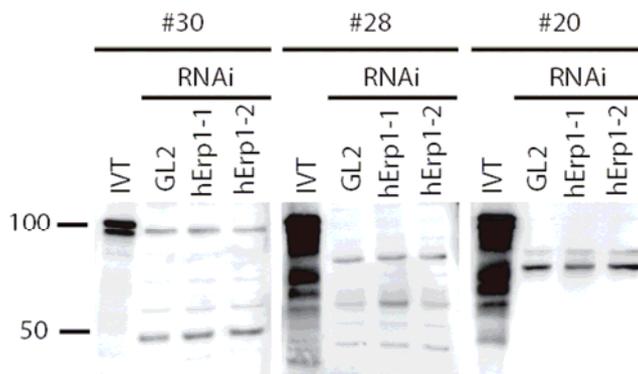


Abbildung 2-22: Immunoblotanalysen mit Zelllysaten aus RNAi-behandelten Zellen. Zelllysate von HeLa-Zellen die 72h mit Oligos gegen hErp1, bzw. Luciferase behandelt wurden, wurden im *Western-Blot* mit verschiedenen α -hErp1-Antikörpern analysiert.

2.2.2.2.2 Immunofluoreszenzanalysen mit hErp1-Antikörpern

In Immunfluoreszenzanalysen zeigten nur die Antikörper #28 und #30 eine subzelluläre Lokalisation. Dieses Signal wurde nach Kompetition des Antikörpers #30 mit dem Antigen und nach Kompetition mit GST-hErp1 des Antikörpers #28 schwächer bis gar nicht mehr erkennbar (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich hier also um ein spezifisches Signal, dass durch das Antigen kompetitiert werden kann. Die anderen Antikörper, bzw. Seren die keine subzelluläre Lokalisation des Proteins erkennen lassen, können hErp1 möglicherweise nicht erkennen, da der Bereich den diese Antikörper erkennen können nach der Fixierung maskiert ist.

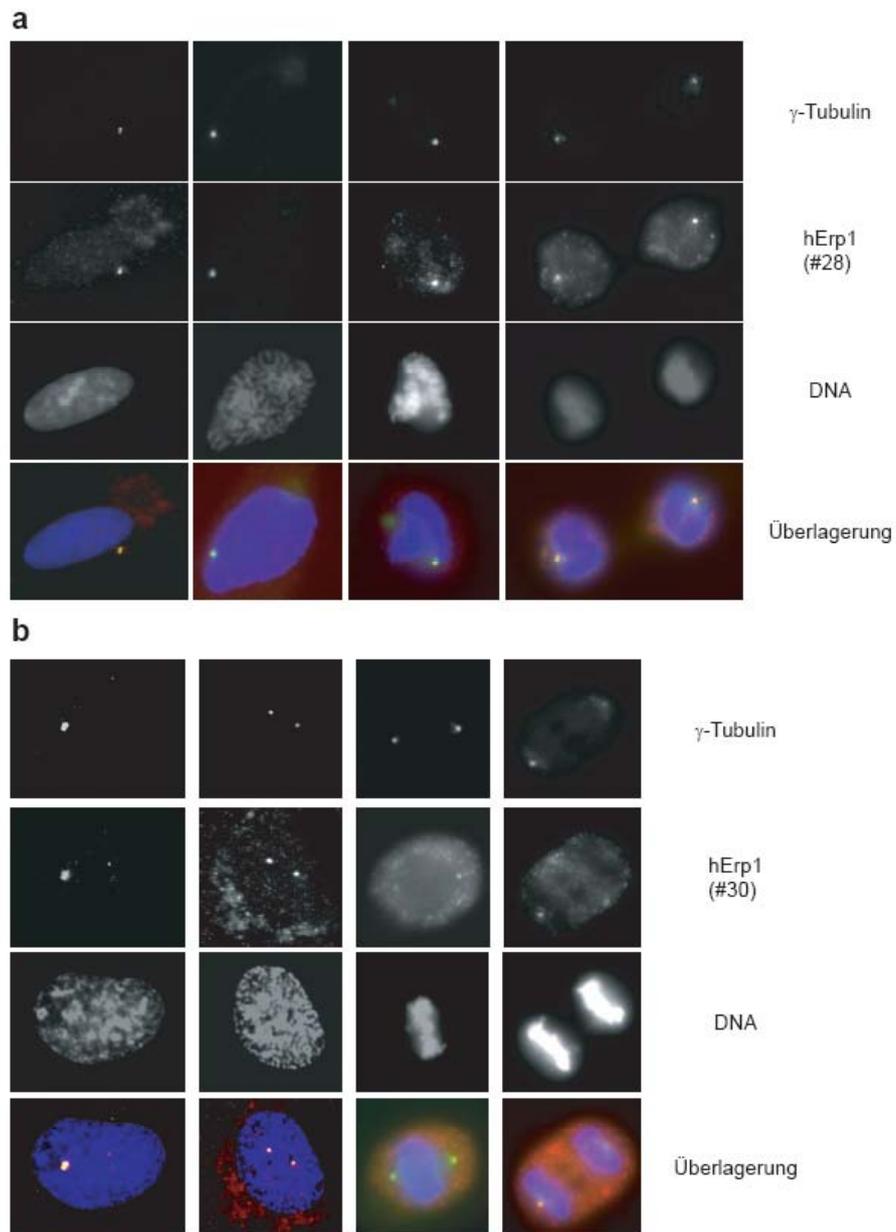


Abbildung 2-23: Immunfluoreszenzanalysen an Methanol-fixierten U2OS-Zellen. In (a) diente neben GTU188 der a-hErp1 Antikörper Nummer #28 als primärer Antikörper, in einer Konzentration von 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In(b) wurde der Antikörper #30 in einer finalen Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet.

2.2.3 Überexpression von hErp1

Da die Überexpression von hEml1 in HEK293T-Zellen zu einem Anstieg der G2/M-Population führt (Hsu et al. 2002), wurde mittels FACS-Analysen untersucht, ob die Überexpression von hErp1 in 293T-Zellen ebenfalls einen Einfluss auf den Zellzyklus besitzt. Dafür wurden 293T-Zellen mit pCS2-Myc, pCS2-GFP, pCS2-Myc-hErp1 und pCS2-GFP-hErp1 transfiziert. Die Zellen wurden nach 40 Stunden geerntet, mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt, um anschließend eine Zellzyklusanalyse durchzuführen.

a

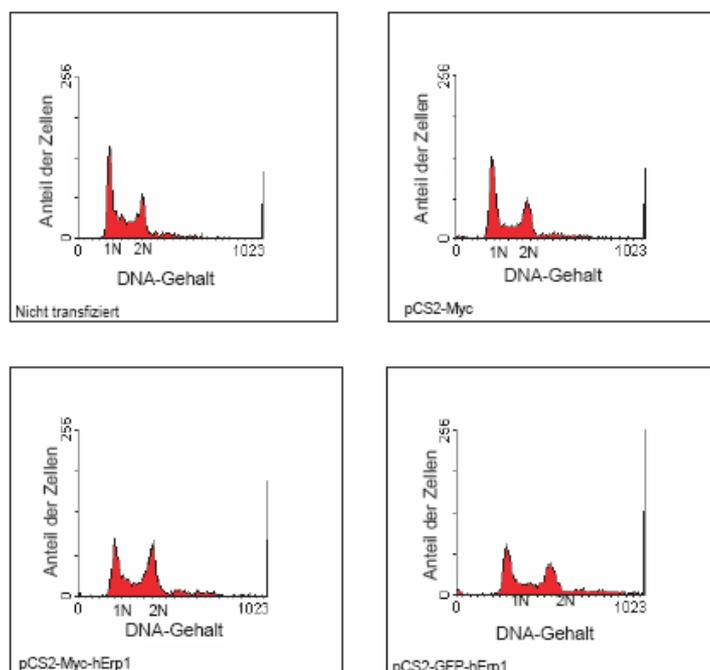
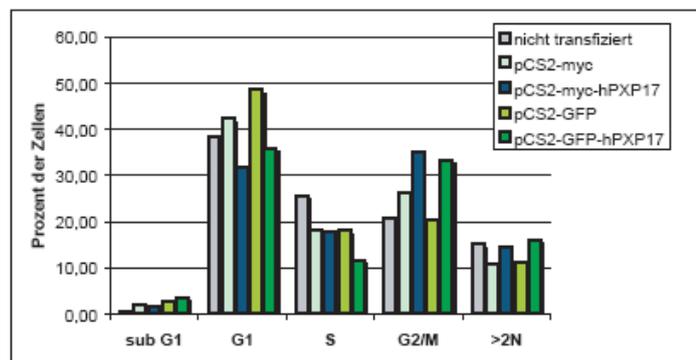


Abbildung 2-24: Die Überexpression von hErp1 führt zu einem Anstieg der G2/M-Population.

293T-Zellen wurden mit pCS2-Myc, pCS2-GFP-hErp1 und pCS2-Myc-hErp1 transfiziert. Nach 40h wurden die Zellen fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und eine FACS-Analyse durchgeführt. In (a) sind die Histogramme der einzelnen Transfektionen dargestellt. In (b) wurde der prozentuale Anteil der Zellen bezüglich ihres DNS-Gehalts graphisch dargestellt.

b



Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von Win MDI 2.8 ausgewertet. Abbildung 2-24a zeigt die erhaltenen Histogramme eines Transfektionsexperiments. Die Überexpression von hErp1 in 293T-Zellen führt zu einem Anstieg der G2/M-Population. Dieser Anstieg war unabhängig davon, ob hErp1 als GFP-Fusionsprotein

oder als Myc-Fusionsprotein in den Zellen exprimiert wurde. Der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde ebenfalls berechnet und als Diagramm in Abbildung 2-24 b dargestellt.

2.2.4 Der Abbau von hErp1 in *Xenopus*-Ei-Extrakt

Um zu untersuchen, ob der Abbau des humanen Proteins ähnlich reguliert wird, wie der Abbau des *Xenopus* Proteins, wurde zuerst analysiert, ob humanes Protein calcium-abhängig in *Xenopus*-Extrakt abgebaut wird. Dies war der Fall (Abbildung 2-25c). Wie in 2.2 beschrieben besitzt hErp1 zwei möglich DSG-Motive, DS⁷⁶GYENE und DS³³⁴GFNS³³⁸LS. Letzteres wurde näher untersucht, da bei dem ersten DSG-Motiv kein zweites Serin in unmittelbarer Nähe zu Serin 76 folgte, erst in einem Abstand von sechs Aminosäuren. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente war noch kein Substrat des SCF^{β-Trcp}-Komplexes bekannt, welches einen größeren Abstand zwischen den Serinen besaß. Um zu untersuchen ob das DSG-Motiv, welches im mittleren Bereich von hErp1 zu finden ist, nach einer Phosphorylierung der Serine mit dem SCF^{β-Trcp}-Komplex interagieren kann, wurden Bindungsstudien mit Peptiden durchgeführt. Zelllysate von 293T-Zellen, die mit Myc-β-Trcp transfiziert wurden, wurden mit Peptiden, die an Affi-Gel gekoppelt waren inkubiert. Diese Peptide enthielten die potentielle Interaktionsdomäne (xxDSGxxSxxx) von hErp1 einmal mit Serinen die eine Phosphatgruppe trugen, bzw. in der nicht phosphorylierten Form. Als Kontrolle diente die DSG-Sequenz eines bekannten SCF^{β-Trcp}-Substrats, β-Katenin, hier auch jeweils in der phosphorylierten Form, bzw. nicht phosphorylierte Form. Nach der zweistündigen Inkubation in Zelllysate wurden die *Beads* mit den gekoppelten Peptiden durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend gewaschen. Nur die Phosphopeptide konnte Myc-β-Trcp immunpräzipitieren (Abbildung 2-25 a). Um die DS³³⁴GFNS³³⁸LS-abhängige Interaktion von hErp1 und β-Trcp auch *in vivo* zu bestätigen, wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese die Serine 334 und 338 zu Alaninen mutiert und die Interaktion der Mutante mit β-Trcp untersucht. GFP-hErp1WT und GFP-hErp1^{S334A,S338A} wurden jeweils mit Myc-β-Trcp in 293T-Zellen transfiziert und Co-Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Nach der Immunpräzipitation der GFP-hErp1-Proteine mit α-GFP-Antikörpern wurde durch Immunoblot-Analysen untersucht, ob Myc-β-Trcp co-immunpräzipitiert werden konnte. In Abbildung 2-25 b sind die mit α-Myc, bzw α-GFP entwickelten Western Blots gezeigt. Doch die beiden Proteine, β-TrCP und hErp1, konnten auch noch interagieren, wenn das DSG-Motiv mutiert war, es lag also keine durch Phosphorylierung der Serine regulierte Interaktion vor. Diese war aber nicht auszuschließen, daher wurde das Abbauverhalten von ³⁵S-IVT-hErp1^{S334A,S338A} in *Xenopus*-Ei-Extrakt nach Zugabe von Calcium analysiert. Die Mutation führte allerdings zu keiner Stabilisierung des Proteins nach Calcium-Zugabe (Abbildung 2-25 c). Es kann ausgeschlossen werden, dass das DSG-Motiv, welches im mittleren Bereich von hErp1 zu finden ist, dessen Abbau reguliert.

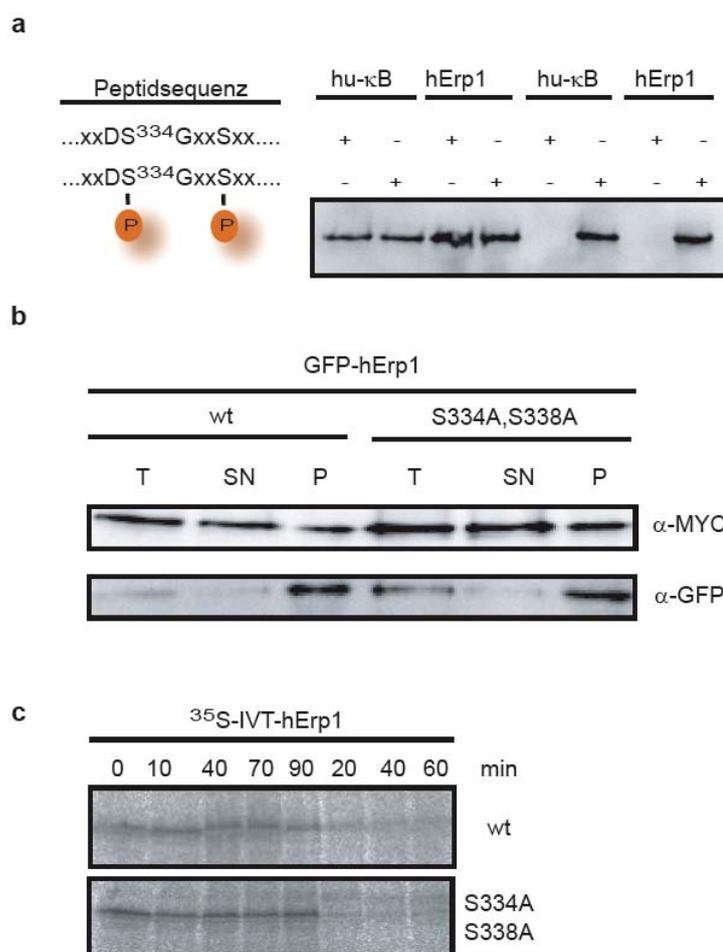


Abbildung 2-25: Das DS³³⁴G-Motiv bestimmt nicht den Abbau von hErp1. Zelllysate von 293T-Zellen, die mit Myc- β -TrCP transfiziert wurden, wurden mit Peptiden, die an Affi-Gel gekoppelt waren, inkubiert. Diese Peptide enthielten die mögliche phosphorylierte, bzw. nicht phosphorylierte Interaktionsdomäne von hErp1/ β -Katenin. Die Affi-Gel-Matrix wurde gewaschen und Proben für einen α -Myc-Western (a) genommen. b) 293T-Zellen wurden mit Myc- β Trcp und GFP-hErp1^{wt}, bzw. GFP-hErp1^{S334A,S338A} transfiziert. Aus den Zelllysaten wurden die GFP-Fusionsprotein mit α -GFP-Antikörper immunpräzipitiert. Hier sind der α -Myc und α -GFP-Western nach Immunpräzipitation gezeigt. c) ³⁵S-IVT-hErp1^{wt} und ³⁵S-IVT-hErp1^{S334A,S338A} wurden jeweils in CSF inkubiert und der Calcium-abhängige Abbau analysiert. Das Autoradiogramm ist dargestellt.

2.2.4.1 Die Mutation von T234 zu Alanin stabilisiert hErp1

CaMKII phosphoryliert XErp1 an T195, von daher wurde untersucht, ob man im humanen Protein einen konservierten Bereich an dieser Stelle finden kann. In Abbildung 2-26a ist das Alignment der beiden Proteine für den in Frage kommenden Abschnitt gezeigt. Es liegt keine vollständig konservierte *consensus site* für eine mögliche CaMKII-Phosphorylierungsstelle vor. Anstelle des Arginins ist ein Lysin zu finden, dies Aminosäure an Position -4 wird aber auch gegenüber anderen Aminosäuren von der CaMKII bevorzugt (Songyang et al. 1996)

a

```

XI  XErp1  RSST195 LDDSK
Hs  Erp1   KTST234 LDDSK

```

b

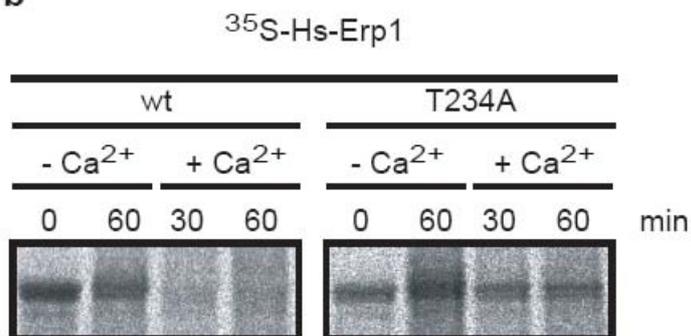


Abbildung 2-26: T234 ist für den Calcium-abhängigen Abbau von hErp1 notwendig. Die Proteinsequenzen von XErp1 und hErp1 wurden im Bereich von XErp1 T195 verglichen (a). b) T234 von hErp1 wurde zu Alanin mutiert. ³⁵S-IVT-hErp1^{wt} und ³⁵S-IVT-hErp1^{T234A} wurden zu CSF-Extrakt gegeben und der Calcium-abhängige Abbau untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für ein Autoradiogramm entnommen.

Es wurde eine Mutation an dieser Stelle eingeführt und das Abbauverhalten von ³⁵S-IVT-hErp1^{wt} und der Mutante ³⁵S-IVT-hErp1^{T234A} untersucht. Während der Wildtyp nach Calcium abgebaut wurde, war die Mutante stabil (Abbildung 2-26b).

3 Diskussion und Ausblick

3.1 Erp1 als CSF-Faktor

Um eine parthenogenetische Teilung („Jungferzeugung“) zu verhindern, liegt in Oozyten von Vertebraten ein sog. zytostatischer Faktor (engl. CSF) vor, der einen Arrest in der Metaphase II der Meiose bewirkt (Masui und Markert, 1971). Die Natur des zytostatischen Faktors konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Aus früheren Experimenten weiß man, dass diese CSF-Aktivität zum Zeitpunkt der Befruchtung abnimmt und die Meiose beendet werden kann (Masui und Markert, 1971). Eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung der CSF-Aktivität ist der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, welcher wiederum zur Aktivierung der CaMKII-Kinase (Lorca et al, 1993) führt. Neben der CaMKII ist auch die *Polo-like*-Kinase essentiell für die Aufhebung des Meiose II-Arrest (Descombes und Nigg, 1998). Effektoren dieser beiden Kinasen waren nicht bekannt. In dieser Arbeit konnten nun die Funktionen von CaMKII und Plx1 in Zusammenhang gebracht werden: CaMKII und Plx1 kooperieren um den APC/C-Inhibitors XErp1 für den Abbau zu markieren und somit die Aufhebung des Metaphase II-Arrests und die Vollendung der Meiose ermöglichen.

In Kapitel 1.4 sind die Bedingungen beschrieben die Masui und Markert aus Ihren Experimenten abgeleitet haben, die ein Protein erfüllen muss, um ein Teil oder der zytostatische Faktor zu sein. XErp1 erfüllt demnach die Bedingungen eines zytostatischen Faktors:

- 1.) XErp1 ist in reifen Oozyten nachzuweisen (Schmidt et al., 2005; Tung et al., 2005).
- 2.) XErp1 kann in Ei-Extrakt eine Metaphase-Arrest mit hoher Cdk1-Aktivität und inaktivem APC/C-Komplex induzieren und ist für den Arrest in der Metaphase essentiell (Schmidt et al., 2005; Tung et al., 2005).
- 3.) XErp1 wird bei der Befruchtung inaktiviert (Schmidt et al, 2005; Liu et al., 2005; Rauh et al., 2005; Hansen et al., 2006).

3.1.1 Regulation von XErp1 im Laufe des Zellzyklus

3.1.1.1 Aktivierung von XErp1

XErp1 lässt sich bereits in unreifen Oozyten nachweisen, d.h. bereits vor dem Eintritt in die Meiose (Schmidt et al, 2005). Nimmt man an, dass es sich bei XErp1 um einen

zytostatischen Faktor handelt, der den Metaphase-Arrest in der Meiose II verursacht, dürfte das Protein vor dem Reifen der Oozyten nicht aktiv sein, da es ansonsten bereits zu einem Arrest in der Meiose I kommen sollte. Da XErp1 bereits vor dem Eintritt in die Meiose nachzuweisen ist, muss es zu diesem Zeitpunkt in einer inaktiven Form vorliegen. Ein Hinweis auf ein mögliche Regulation der Aktivität von XErp1 ist ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel während des Übergangs von Meiose I zu Meiose II, zu einem Zeitpunkt zu dem der CSF aktiv wird (Schmidt et al., 2005). Auch in CSF-Extrakt zugegebenes und immunpräzipitiertes XErp1 zeigt ein langsames Laufverhalten im Vergleich zu immunpräzipitiertem XErp1 aus Interphase-Extrakt. Immunpräzipitiertes XErp1 aus CSF-Extrakt zeigte nach einer Phosphatasebehandlung ein gleiches Laufverhalten wie XErp1, welches aus Interphase-Extrakt immunpräzipitiert wurde (Abbildung 2-5). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Fähigkeit von XErp1 den APC/C zu inhibieren durch eine Phosphorylierung reguliert wird. Bei der Suche nach diesen Phosphorylierungsstellen wurden zwei Serine innerhalb des Proteins bestimmt, die bei Mutation nach Alanin, XErp1 ein schnelleres Laufverhalten im SDS-Gel ermöglichen (siehe Kapitel 2.1.2.2). Allerdings scheint die Phosphorylierung dieser Aminosäuren nicht für die Aktivierung des Proteins als APC/C-Inhibitor nötig zu sein, da die exogen zugegebene Mutante, genau wie der Wildtyp, einen Calcium-induzierten Übergang in die Interphase verhindern konnte (Abbildung 2-6). Ein Hinweis auf den Mechanismus der Aktivierung von XErp1 während der Eireifung wurde in einem direkten *in-vitro* APC/C^{CDC20}-Ubiquitylierungsassay mit MBP-XErp1^{VL,WT} gefunden. XErp1-Volllänge konnte die Ubiquitylierung des N-Terminus von Cyclin B nicht inhibieren (Thomas Mayer, persönliche Mitteilung), im Gegensatz zum C-Terminus, der alleine den APC/C inhibieren kann (Schmidt et al., 2005). Somit besteht die Möglichkeit einer Autoinhibition von XErp1 durch den N-Terminus, die bei einer Phosphorylierung des Proteins aufgehoben wird. Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Peter Jackson in einem *in-vitro* Ubiquitylierungsassay zeigen, dass auch die Volllänge von XErp1 den APC/C inhibieren kann (Tung et al. 2005). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Verwendung unterschiedlicher Substrate sein. In dem von Tung et al. durchgeführten Assay wurde Securin als Substrat verwendet und nicht der N-Terminus von Cyclin B, wie von Dr. Thomas Mayer. XErp1 könnte die Ubiquitylierung verschiedener Substrate des APC/C also unterschiedlich beeinflussen. Wenn allerdings XErp1, wie Emi, über Cdc20 seine inhibierende Wirkung auf den APC/C ausübt, wäre dies unwahrscheinlich. Und wenn die Volllänge von XErp1 bereits den APC/C-Komplex unreguliert, d.h. z.B. nicht durch die vorgeschlagene Phosphorylierung, inhibieren kann, warum erfolgt dann nicht bereits auch schon ein Zellzyklusarrest in der Meiose I, wo das Protein bereits nachgewiesen werden kann? Tung et al. zeigten dafür keine Erklärung. Ein direkter Vergleich der beiden Substrate könnte Aufschluss darüber geben.

3.1.1.2 Die Inaktivierung von XErp1 bei der Befruchtung

Wie schon in der Einleitung beschrieben, erfolgt nach der Befruchtung eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Calcium. Dies führt wiederum zur Aktivierung einer Kinase, der CaMKII (Lorca et al. 1993), diese Aktivierung ist auch notwendig für die Aufhebung des Arrests. Allerdings wurden bisher noch keine Substrate dieser Kinase gefunden. In dieser Arbeit werden nun Ergebnisse gezeigt, die XErp1 als Substrat von CaMKII zeigen (Abbildung 2-10). Die Phosphorylierung durch CaMKII bestimmt die Einleitung des Abbaus von XErp, dieser Abbau wird durch ein Phosphodegron innerhalb des N-Terminus des Proteins vermittelt (Abbildung 2-8). Bereits in der Veröffentlichung von Schmidt et al., 2005 konnte gezeigt werden, dass dieses Phosphodegron durch Plx1 phosphoryliert wird. Descombes und Nigg konnten 1998 zeigen, dass Plx1 ihre höchste Aktivität in der M-Phase besitzt, eine Phosphorylierung könnte theoretisch stattfinden. Es stellt sich die Frage, warum erfolgt dann der Abbau nicht bereits in der M-Phase? Man weiß aus anderen Veröffentlichungen, dass Plx1-Kinase ihre Substrate oft erst nach einer Phosphorylierung durch eine andere Kinase erkennt. Und hier kommt die CaMKII ins Spiel. CaMKII kennzeichnet XErp1 als Substrat für Plx1. Zwei der zehn möglichen CaMKII-Phosphorylierungsstellen innerhalb von XErp1 können eine Polo-Box-Bindungsstelle nach Phosphorylierung generieren (Abbildung 2-11). Dabei handelt es sich um XErp1^{T195} und XErp1^{T336}, bei beiden Threoninen befindet sich ein Serin in der -1 Position, dies würde theoretisch eine Plx1-Bindung nach erfolgter Phosphorylierung ermöglichen (Elia et al., 2003). Um herauszufinden ob diese Threonine für die Regulation des Abbaus von XErp1 wichtig sind, wurden diese zu Alaninen mutiert, so dass keine Phosphorylierung an diesen Stellen des Proteins mehr möglich war. Nur eine der beiden Mutationen, XErp1^{T195A}, führt zu einer Stabilisierung des Proteins nach Calcium Zugabe zu CSF-Extrakt (Abbildung 2-12). Auch die Mutation des Serins 194 in -1 Position ermöglichte eine Stabilisierung des Proteins. Um zu zeigen, dass CaMKII T195 phosphoryliert, um die Bindung von Plx1 zu ermöglichen, wurden Far Western Experimente durchgeführt. Dabei konnten sowohl Plx1^{wt} und die PBD-Domäne nur an bereits durch CaMKII phosphoryliertes XErp1 binden. Eine Bindung von Plx1^{wt} und der PBD-Domäne an die Mutanten XErp1^{S194A} und XErp1^{T195A} war nicht nachzuweisen, in Übereinstimmung mit dem Modell, dass CaMKII eine Bindestelle für Plx1 schafft. In einer anderen Veröffentlichung im Jahr 2005 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CaMKII und Plx1 kooperieren um XErp1 zu inaktivieren (Liu et al. 2005). Allerdings wurde keine Erklärung über den genauen Mechanismus oder Phosphorylierungsstellen gegeben. Dass durch die Phosphorylierung von XErp1T195 eine PBD-Bindestelle geschaffen wird, wurde durch die Analyse einer weiteren Mutante bestätigt. Das Protein wurde so verändert, dass eine Phosphorylierung von T195 bereits in CSF stattfinden konnte, da eine Cdk1-*consensus-site* eingeführt wurde. Diese Mutante wurde als radioaktiv markiertes IVT-Produkt zu CSF-Extrakt gegeben und es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für ein Autoradiogramm entnommen. Dieses ist in

Abbildung 2-15 dargestellt und wie man dort erkennen kann, wird diese Mutante bereits im CSF abgebaut. Für die Bestätigung, dass man den Plx1-abhängigen Abbauweg des Proteins getroffen hat, wurde untersucht, ob man diese Mutante wieder durch Zugabe einer dominant-negativen Variante von Polo stabilisieren kann. Wie Abbildung 2-16 zeigt war das möglich. Der Abbauweg der Mutante im CSF-Extrakt erfolgt also nach dem gleichen Mechanismus wie der Abbauweg des Wildtyps nach Calcium-Zugabe.

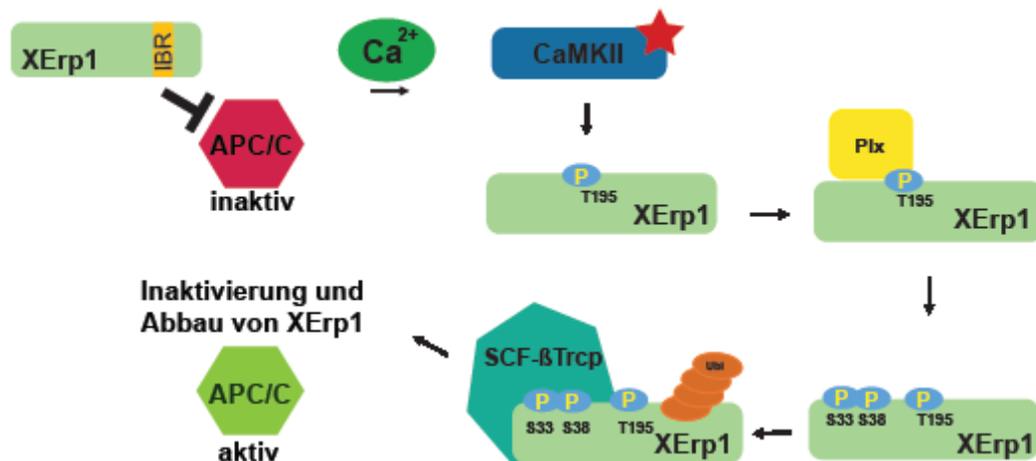


Abbildung 3-1: CaMKII und Plx1 kooperieren, um eine Aufhebung des Meiose II-Arrests durch Initiierung des Abbaus von XErp1 zu ermöglichen. In reifen Oozyten arretiert XErp1 den APC/C um den Meiose II-Arrest aufrecht zu erhalten. Nach der Befruchtung und dem daraus resultierenden Calcium-Signal wird die CaMKII aktiviert. Diese phosphoryliert XErp1 an Threonin 195, dies macht XErp1 wiederum erkennbar für Plx1, welche das Phosphodegion im N-Terminus von XErp1 phosphoryliert. XErp1 wird von der SCF^{β-Trcp} erkannt und ubiquityliert. Daraufhin wird XErp1 vom Proteasom abgebaut und der APC/C aktiviert. Dies ermöglicht die Aufhebung des Meiose II-Arrests.

Diese Daten unterstützen ein Modell in dem CaMKII und Plx1 kooperieren, um den APC/C-Inhibitor XErp1 zu inaktivieren und somit die Vollendung der Meiose II ermöglichen (Abbildung 3-1). In reifen Oozyten kann XErp1 den APC/C inhibieren und ein weiteres Fortschreiten des Zellzyklus ist nicht möglich. Nach der Befruchtung kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration an Calcium und somit zu einer Aktivierung der CaMKII. Diese phosphoryliert nun XErp1 an T195. Diese Phosphorylierung generiert eine Bindestelle für die Polo-Box-Domäne von Plx1. Plx1 kann daraufhin das Phosphodegion im N-Terminus von XErp1 phosphorylieren. Durch diese Phosphorylierung wird XErp1 nun wiederum erkennbar für den SCF^{β-Trcp}-Komplex, der das Protein nun ubiquityliert und somit für den Abbau durch das Proteasom bestimmt. Da nun der Inhibitor des APC/C nicht mehr aktiv ist, kann der APC/C Cyclin B und Securin abbauen und die Meiose II beendet werden. In einer im Januar 2006 erschienenen Veröffentlichung wurde diese Regulation des Abbaus von XErp1 durch CaMKII und *Polo-like*-Kinase ebenfalls angenommen (Hansen et al. 2006).

3.1.2 Die zentrosomale Lokalisation von Erp1

XErp1

Bei dem *Xenopus*-Protein ist eine zytoplasmatische und zentrosomale Lokalisation nachzuweisen. Sowohl mit dem Antikörper als auch bei der Überexpression des Proteins, ist ein zentrosomales Signal in A6-Zellen zu erkennen (Abbildung 2-1 und Abbildung 2-2). Ein für die Lokalisation ausreichender Bereich ließ sich eingrenzen. Er liegt zwischen den Aminosäuren 488 und 651. Diese enthalten die IBR-Domäne, jedoch nicht die F-Box. Die IBR-Domäne wird für die Funktion des Proteins als APC/C-Inhibitor benötigt (Schmidt et al., 2005). Durch eine entsprechende Mutation in dieser Domäne kann das Protein kein Zink komplexieren, die Mutation könnte nicht nur zu einer funktionslosen Domäne, sondern auch zu einem fehlerhaft gefalteten Protein führen. Man sollte nun eine IBR-Mutante dieses Proteins bezüglich ihrer zentrosomalen Lokalisation untersuchen. Außerdem kann man versuchen, durch *fishing*-Experimente mögliche Interaktoren herauszufinden. Wichtige Kandidaten wären hier verschiedene Untereinheiten des APC/C. So konnte 1995 die Arbeitsgruppe um Peter Hieter mit Antikörpern gegen Cdc16 und Cdc25, Untereinheiten des APC/C, in Säugetierzellen am Zentrosom nachweisen (Tugendreich et al. 1995). Dies könnte Aufschlüsse darüber geben, wie XErp1 den APC/C inhibiert. So dient Cdc16 als Proteingerüst für den APC/C-Komplex (Passmore et al., 2004). XErp1 könnte mit Cdc16 am Zentrosom interagieren und somit die Zusammensetzung eines funktionsfähigen APC/C verhindern. In somatischen Zellen erfolgt der Abbau von Cyclin B zuerst an den Spindelpolen und Chromosomen (Clute et al. 1999). Falls XErp1 die Zusammensetzung eines aktiven APC/C-Komplexes an den Spindelpolen verhindert, könnte der Abbau von XErp1 zu einer Aktivierung des APC/C-Komplexes an den Spindelpolen führen und somit die Ubiquitylierung von Cyclin B initiieren.

hErp1

Für das humane Protein gestaltet sich die Aussage ob das Protein am Zentrosom lokalisiert, schwieriger. Es ist zwar möglich gewesen, mit zwei der insgesamt vier hergestellten Antikörpern ein zentrosomales Signal nachzuweisen (Abbildung 2-23), aber der Beweis, dass diese Antikörper tatsächlich hErp1 erkennen, bleibt aus. Bei einer Depletion des Proteins durch siRNA wurde das Signal der Antikörper sowohl im Immunoblot als in der Immunfluoreszenz nicht schwächer. Auch die Expression von GFP-, bzw. Myc-Fusionsprotein lässt keine eindeutige Aussage zu. So war GFP-hErp1 am Zentrosom und im Zytoplasma lokalisiert, während Myc-hErp1 diffus im ganzen Zytoplasma vorkam (Abbildung 2-19). GFP oder Myc alleine lokalisierten nicht am Zentrosom. Da bei GFP-Fusionsproteinen kein Antikörper zum Detektieren benötigt wird, sollte man versuchen, Myc mit dem C-terminalen Ende von hErp1 zu fusionieren,

eventuell ist das Epitop für den α -MYC-Antikörper am N-Terminus des Proteins nicht zugänglich und von daher keine zentrosomale Lokalisation nachzuweisen. Durch weitere Experimente, wie das Testen verschiedenster Bedingungen für Immunpräzipitationen oder das Verwenden von anderen Oligos für die siRNA, müssen technische Gründe ausgeschlossen werden. Dann wäre die Frage, ob es sich um ein zentrosomales Protein handelt, auch eindeutig zu beantworten, wenn das Signal z. B. nach siRNA verschwindet. Als Kontrolle sollte man auch hEmi1-depletierte Zellen untersuchen, da sich auch hier, wie XErp1 und *Xenopus* Emi1, der C-Terminus von hErp1 zu 38% mit hEmi1 gleicht und es nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Antikörper auch hEmi1 erkennen.

3.1.3 hErp1 als APC/C-Inhibitor

Bei der Überexpression von hErp1 in 293T-Zellen kommt es zu einem Anstieg der G2/M-Population. Dieses Ergebnis ist dem Phänotyp der Überexpression von Emi1 ähnlich (Hsu et al., 2002). Dort konnte man durch Western Blot Analysen nachweisen, dass Cyclin A nicht abgebaut wird und die Zellen nicht in die Mitose gehen. Man konnte einen durch Cdh1-Überexpression induzierten G1-Arrest durch Überexpression von Emi1 aufheben. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Funktion von Emi1 als APC/C-Inhibitor. Man sollte dieses Experiment mit der Überexpression von hErp1 und Cdh1 ebenfalls durchführen, um zu sehen, ob der durch die Überexpression von hErp1 verursachten Anstieg in der G2/M-Population ebenfalls darauf zurückzuführen ist, dass der APC/C daran gehindert wird, Cyclin A zu ubiquitylieren. Zusätzlich sollte man in direkten APC/C-Ubiquitylierungsreaktionen untersuchen, ob hErp1 diesen, wie XErp1 (Schmidt et al., 2005) inhibieren kann. Dies wären weitere Hinweise darauf, dass sich hErp1 und XErp1 auch in ihrer Funktion als APC/C-Inhibitor gleichen.

3.1.4 Regulation von hErp1

Auch hErp1 wird, wie XErp1, calcium-abhängig in *Xenopus*-Extrakt abgebaut. Vergleicht man die Sequenzen der beiden Proteine, ist die CaMKII-Phosphorylierungsstelle die den Abbau von XErp1 reguliert, nur teilweise im humanen Protein konserviert, anstelle von RxxT liegt KxxT vor, vgl. auch Abbildung 2-26a. Wie Songyang et al. zeigen konnten, wird auch ein Lysin an dieser Stelle von der CaMKII bevorzugt. Die Alanin-Mutante hErp1^{T234A} führt zu einer Stabilisierung des Proteins in CSF-Extrakt nach Calcium-Zugabe (Abbildung 2-26b). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der calcium-abhängige Abbau der Proteine in gleicher Weise reguliert wird. Zeigt sich, dass das humane Protein auch ein Substrat der CaMKII ist und der Abbau durch Zugabe von konstitutiv aktiver CaMKII induziert werden kann, kann man davon

ausgehen, dass der Calcium-abhängige Abbau von den Proteinen auf gleicher Weise reguliert wird.

Die klassischen Experimente von Masui und Markert zeigten, dass die CSF-Aktivität nach der Befruchtung nicht wieder erscheint, im Gegensatz zu der MPF-Aktivität. Wichtig ist nun zu untersuchen, ob Erp1 in somatischen Zellen eine Rolle im Zellzyklus hat und ob die Funktion eine andere ist als in der Meiose. Falls es nur in der Meiose vorkommt, ist das eine mögliche Erklärung für die schwierige Antikörperproduktion gegen das humane Protein, da nur somatische Zellen zum Testen zur Verfügung standen. Allerdings konnte Dr. Thomas Mayer erfolgreich mittels PCR-Analysen von cDNS das Gen in verschiedenen Zelllinien, so auch die zur Analyse des Antikörpers verwendeten HeLa-Zellen, nachweisen (Thomas Mayer, persönliche Mitteilung). Allerdings könnte es durchaus sein, dass die m-RNA zwar vorhanden ist, aber das Protein wird nicht in somatischen Zellen translatiert, dies ist aber eher unwahrscheinlich. Das Protein selbst könnte auch eine sehr kurze Halbwertszeit besitzen, oder in der Zelle in einer sehr geringen Menge vorkommen. Die weitere Analyse der Antikörper wird klären können, ob das Protein eine Rolle in somatischen Zellzyklen besitzt, oder ob es nur in der Meiose vorkommt.

3.1.5 Emi1 und Erp1/Emi2

Im C-terminalen Bereich ist XErp1 zu 39% identisch mit *Xenopus* Emi1, welches 2002 als zytostatischer Faktor, der für den Metaphase II Arrest in der Meiose benötigt wird, beschrieben wurde (Reimann et al., 2002). Im Laufe der Zeit erschienen aber immer mehr Veröffentlichungen, die diese Rolle Emi 1 aberkennen und eine Aktivität von Erp1 als CSF bestätigen. Im Folgenden soll dies näher erörtert werden.

1) Nachweis von Emi1 in reifen *Xenopus* Oozyten.

Die Gruppe um P. Jackson wies Emi1 in reifen *Xenopus* Oozyten nach (Reimann et al. 2001b). Dies konnte die Gruppe um T. Kishimoto mit eigenen Antikörpern nicht bestätigen. So vermochten sie weder Emi1 im Immunoblot in Lysaten von reifen Oozyten nachzuweisen, noch aus reifen Oozyten zu immunpräzipitieren, obwohl der von Ihnen hergestellte Antikörper selbst 1 nM an exogen zugegebenen Protein in Ei-Extrakt erkennen konnte (Ohsumi et al. 2004). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass Emi in reifen Oozyten instabil ist. Dazu injizierten sie mRNA von *Xenopus* Emi1 in unreife Oozyten und untersuchten die translatierte Proteinmenge im Verlauf der weiteren Reifung der Oozyten. In unreifen Oozyten war das translatierte Protein stabil, nach der Zugabe von Progesteron und dem GVBD war das Protein im Immunoblot nicht mehr nachzuweisen. Daraufhin schlug die Gruppe um Peter Jackson einen stabilisierenden Faktor für das endogene Protein vor, dessen Natur nicht weiter

beschrieben wurde (Tung et al, 2005). Bei Vorhandensein dieses stabilisierenden Faktors, sollte in den Experimenten von Oshumi et al. das durch injizierte mRNA in Oozyten neu translatierte Emi1 auch stabilisiert werden. Diese Ergebnisse stehen somit weiterhin im Widerspruch und führen zu dem Paradoxon, dass Emi1 zu einem Zeitpunkt an dem es aktiv sein soll nicht vorhanden ist. Betrachtet man die Experimente der beiden Arbeitsgruppen im Detail, so erscheinen die Ergebnisse von der Gruppe um T. Kishimoto überzeugender.

2) Notwendigkeit von Emi1 für das Aufrechterhalten des CSF-Arrests.

Reimann et al. konnten zeigen, dass exogen zugegebenes *Xenopus* Emi1 eine Calcium-induzierte Aufhebung des Metaphase-Arrests verhindert, dies würde jedoch jeder APC/C-Inhibitor können (Reimann et al. 2002). In dieser Veröffentlichung wurde die Notwendigkeit von *Xenopus* Emi1 für die Aufrechterhaltung des Arrests gezeigt. Durch Zugabe von Antikörpern gegen Emi1, konnte eine calcium-unabhängige Aufhebung des Arrests induziert werden. 2005 allerdings erschien eine Veröffentlichung von P. Jackson und seiner Arbeitsgruppe in der sie selbst zeigten, dass der Antikörper der gegen *Xenopus* Emi1 gerichtet war, auch natives XErp1 erkannte. Somit könnte die Aufhebung des Arrests auch durch die Depletion von XErp1 verursacht worden sein. Die Notwendigkeit von Emi1 ist somit nicht eindeutig gezeigt.

3) Die Inaktivierung von Emi1 bei der Befruchtung.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Calcium-Signal bei der Befruchtung zum Abbau des APC/C-Inhibitors XErp1 führt. Damit wird ein wichtiges Kriterium als möglicher CSF-Faktor von XErp1 erfüllt: die Inaktivierung durch die Befruchtung. Die Inaktivierung von Emi1 durch die Befruchtung ist nicht eindeutig belegt. Reimann et al. können *Xenopus* Emi1 noch nach der Befruchtung in *Xenopus*-Embryonen nachweisen (Reimann et al. 2001). Die Möglichkeit der Regulation durch Degradation ist somit nicht gegeben. Nach Reimann et al. resultiert die Inaktivierung von *Xenopus* Emi1 aus der, durch das Calcium-Signal ausgelösten, Dissoziation des Proteins von Cdc20 (Reimann et al. 2002). In *Xenopus*-Extrakt konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass endogenes Cdc20 und IVT-Cdc20 nach Aufhebung des CSF-Arrest nicht mehr mit *Xenopus* Emi1 co-immunpräzipitiert (Reimann et al., 2002). Hier bedarf es allerdings noch die genaue Aufklärung des molekularen Mechanismus, welcher dazu führt, dass *Xenopus* Emi1 nicht mehr an Cdc20 bindet. Da der verwendete Antikörper gegen *Xenopus* Emi1 auch XErp1 erkennt (Tung et al. 2005), kann auch hier das Resultat nicht nur auf *Xenopus* Emi1 zurückzuführen sein, sondern auf XErp1 und in diesem Experiment wurde nicht gezeigt welches Protein mit Cdc20 immunpräzipitiert wurde. Zwar war eine direkte Interaktion zwischen XErp1 und Cdc20 noch nicht nachzuweisen (Schmidt et al. 2005), ist aber damit noch nicht auszuschließen. Die Co-

Immunpräzipitation von *Xenopus* Emi1 und Cdc20 aus CSF-Extrakt, bzw. die Dissoziation der beiden Proteine nach Calcium-Zugabe, kann sich daher ebenfalls aus co-immunpräzipitiertem XErp1 ergeben. Oshumi et al. stellen ebenfalls die Inaktivierung von *Xenopus* Emi1 durch Calcium in Frage (Oshumi et al. 2004). Da exogen zu M-Phase-Extrakt gegebenes Emi1 nicht stabil war, verwendeten sie eine stabile Variante des Proteins um einen Metaphase-Arrest in *Xenopus*-Extrakt zu etablieren. Nach Zugabe von Calcium zu Extrakt der durch die Zugabe von der Phosphodegrom-Mutante in der Metaphase arretiert war, erfolgte keine Abnahme der Cdc2-Aktivität. D.h. dieser durch *Xenopus* Emi verursachter Arrest war nicht Calciumsensitiv. Als Kontrolle diente Mos-Protein, dieses konnte ebenfalls einen M-Phase-Arrest mit hoher Cdc2-Aktivität verursachen, dieser war aber, im Gegensatz zu dem von *Xenopus* Emi1 induzierten M-Phase-Arrest, Calciumsensitiv. Die Arbeitsgruppe um T. Kishimoto folgerte daraus, dass es unwahrscheinlich ist, dass *Xenopus* Emi1 eine wichtige Komponente des CSF-Faktors sei, da das Kriterium der Inaktivierung durch Befruchtung nicht erfüllt ist. Bei XErp1 hingegen konnte die Inaktivierung durch das Calcium-Signal, welches bei der Befruchtung entsteht, eindeutig durch die in dieser Doktorarbeit beschriebenen Experimente belegt werden, im Gegensatz zu *Xenopus* Emi1.

Betrachtet man nun die oben aufgelisteten Ergebnisse, ist eine Rolle für Emi1 im Metaphase II-Arrest von Oozyten von Vertebraten anzuzweifeln und die Rolle des CSF-Faktor XErp1 zuzuteilen. XErp1 ist in reifen Oozyten nachzuweisen, der Antikörper erkennt nicht *Xenopus* Emi1, XErp1 ist für die Aufrechterhaltung des Arrests nötig und der Mechanismus der Calcium-induzierten Inaktivierung konnte im Detail aufgeklärt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Proteinbiochemische Methoden

4.1.1 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

4.1.1.1 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen

Für die Expression von His-Fusionsproteinen wurde der pQE80-F/A-Vektor und BL21 RIL verwendet.

Native Aufreinigung (his-hErp1³²⁸⁻⁴⁷⁵):

Es wurde eine 50 ml Übernachtskultur mit Ampicillin und Chloramphenicol angezogen. Am nächsten Tag wurde ein Liter mit 10 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600nm} = 0,6$ angezogen. Je nach Stabilität des gewünschten Proteins erfolgt die weitere Kultivierung bei 30°C oder 37°C. Die Expression des Fusionsproteins wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Bakterien wurden 3h nach Induktion geerntet (4500rpm, 30 min, 4°C).

Erfolgte die Aufreinigung nicht mehr am gleichen Tag wurde das Sediment in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Ansonsten wurden die Bakterien in 20 ml Zellaufschluss-Puffer pro Liter Kultur mit Hilfe einer French-Press aufgeschlossen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm für 30 min in einem SS34-Rotor. Der Überstand wurde auf bereits mit IMAC20 gewaschener NTA-Agarose gegeben, pro Liter Kultur wurde 0,25 ml Agarose verwendet. Nach 2 h wurde die Matrix zweimal mit IMAC20TA gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Matrix in eine Säule überführt. Das Protein wurde in 8-10 Fraktionen zu je 1ml mit IMAC200 eluiert. Anschließend erfolgt eine Dialyse des Proteins gegen den gewünschten Puffer. Bei Aufreinigung eines Antigens für eine Affinitätsaufreinigung von Antikörpern tauscht man die Puffersubstanz Tris gegen PBS.

Verwendete Puffer:

<u>Zellaufschluss-Puffer</u>		<u>IMAC20</u>	
20 mM	Tris pH 8,0	20 mM	Tris pH 8,0
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
5 mM	Imidazol	20 mM	Imidazol
+ <i>complete Protease Inhibitor</i> Cocktail		0,1 % Tx100	

IMAC20TA

IMAC200

IMAC 20 +		20 mM	Tris pH 8,0
1 mM	NaATP	300 mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂	200 mM	Imidazol

Dialyse-Puffer:

25 mM	Tris pH 7,4
10 mM	β-Mercaptoethanol
300 mM	NaCl
10 %	Glycerol

PBS pH 7,4:

1,4 mM	KH ₂ PO ₄
8 mM	Na ₂ HPO ₄
2,7 mM	KCl
137 mM	NaCl

Denaturierende Aufreinigung (His-hErp¹⁻⁵²⁷):

Für eine denaturierende Aufreinigung wurden die BL21-Zellen genauso kultiviert, wie die Zellen für eine native Aufreinigung. Erst ab dem Zellaufschluss wurde mit anderen Puffern gearbeitet. Die Bakterien wurden hier ebenfalls in 20 ml Zellaufschluss-Puffer pro Liter Kultur aufgeschlossen. Allerdings erfolgte der Aufschluss nicht durch eine French-Press, sondern durch Ultraschall (Einstellungen: 40 %, 8x 30 s). Das Homogenat wurde für 40 min bei 32000 rpm bei 4°C in einem SS34-Rotor zentrifugiert und der Überstand zu, mit Zellaufschluss-Puffer gewaschenen, Ni-NTA-Agarose (0,5 ml pro Liter Kultur) gegeben. Nach fünf Stunden wurde die Matrix bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf Ni-NTA-Agarose gegeben und die Mischung über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad in einem Falcon-Röhrchen rotiert. Nach einmaligem Waschen mit Zellaufschluss-Puffer wurde eine Säule gegossen und das Protein mit Elutions-Puffer in sechs Fraktionen (1/5 des Säulenvolumens) eluiert. Anschließend wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt, eine präparative SDS-PAGE, durchgeführt (4.1.4).

Verwendete Puffer:

Zellaufschluss-Puffer

PBS (s.o.) +
8 M Harnstoff

Elutions-Puffer

PBS (s.o.) +
8 M Harnstoff
200 mM Imidazol

4.1.1.2 Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen (MBP-XErp1, wt + Mutanten)

Für die Expression von MBP-Fusionsproteinen wurde der pFastBac-MAL-Tev2-F/A-Vektor und BL21 RIL verwendet.

Die Vorkultur erfolgte über Nacht bei 37°C und 180 rpm in 50 ml, mit dem Zusatz von Ampicillin und Chloramphenicol. Zusätzlich wurden 0,2 % Glucose zum Medium

gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Hauptkultur. Zum Medium wurde neben den Zusätzen der Vorkultur noch 0.3 M Saccharose gegeben. Die Hauptkultur wurde mit einem Hundertstel der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 180 rpm angezogen. Die Kultur wurde bei einer $OD_{600nm} = 0,5$ mit 0,3 mM IPTG induziert und nach zwei Stunden bei 4°C und 3500 rpm geerntet. Das Sediment wurde in 40 ml Zellaufschluss-Puffer pro Liter Kultur resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym wurden die Bakterien mit Hilfe einer French-Press aufgeschlossen. Das Homogenat wurde in einem SS34-Rotor für 30 min bei 4°C bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zu, mit Säulenpuffer gewaschenem, Amylose-Granulat (7 ml pro Liter Kultur) gegeben und für zwei Stunden bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Das Granulat wurde bei 1500 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und zweimal mit Säulenpuffer gewaschen. Anschließend wurde eine Säule gegossen und das Protein mit Maltose-Puffer in 10 Fraktionen zu 1,5 ml pro 10 ml Säulenvolumen eluiert.

Verwendete Puffer:

<u>Zellaufschluss-Puffer</u>		<u>Säulen-Puffer</u>	
20 mM	Hepes pH 7,4	20 mM	Hepes pH 7,4
200 mM	NaCl	200 mM	NaCl
10 mM	β -Mercaptoethanol	10 mM	β -Mercaptoethanol
0,5 mg/ml	Lysozym		
+ <i>complete</i> Protease Inhibitoren			

<u>Elutions-Puffer</u>		<u>Dialyse-Puffer</u>	
Säulen-Puffer +		20 mM	Hepes pH 7,4
10 mM	Maltose	50 mM	KCl
		40 %	Glycerin

4.1.1.3 Tap-tag-Proteinaufreinigung

Tap-tag-Fusionsproteine sind Proteine die am N-Terminus eine MBP-Fusion besitzen und am C-Terminus eine his-Fusion. Hier wurde der Vektor pFastBac-MAL-Tev2-F/A-his-Vektor verwendet. Auch hier erfolgt die Expression in BL21 RIL.

Hier erfolgte die Kultur und Induzierung der Bakterien wie im Kapitel 4.1.1.2 angegeben. Nach der Induktion wurde die Kultur bei 37°C angezogen und nach 3 Stunden geerntet. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte in 25 ml Zellaufschluss-Puffer pro Liter Hauptkultur mittels einer French-Press. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach dem Protokoll einer MBP-Aufreinigung. Die Elution erfolgte unter Anwesenheit von *complete* Protease Inhibitoren, statt der Dialyse über Nacht erfolgte am nächsten Tag noch eine Aufreinigung nach dem Protokoll einer his-Fusionsprotein-

Aufreinigung. Anschließend kann das Protein gegen den gewünschten Puffer dialysiert werden.

4.1.1.4 Sonstige Proteinaufreinigungen

Das Antigen von Antikörper wurde zusätzlich über eine HiTrap-MonoQ-Säule mit Hilfe von Dr. Francis Barr und Dr. Christian Preisinger aufgereinigt. Die Elution erfolgt hier gegen einen NaCl-Gradienten.

Verwendete Puffer:

<u>Puffer A</u>	<u>Puffer B</u>
50 mM Tris pH 8,2	50 mM Tris pH 8,2
	500 mM NaCl

4.1.2 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen und Nukleotiden

4.1.2.1 Bradford-Assay

Es wurde eine Bradford-Lösung von Biorad verwendet. Diese wurde 1:5 mit Wasser verdünnt und 600µl dieser Lösung zu der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben. Als Standard diente eine BSA-Lösung, deren Konzentration bekannt war (1-10µg Protein). Die Messung der Absorption erfolgte bei 595nm.

4.1.2.2 Biorad D_c-Protein Assay

Dieser Ansatz für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde immer dann verwendet, wenn in der Lösung Detergenzien vorhanden waren. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers, die dort angeführten Mengen wurden auf die Verwendung von einer 1ml Küvette umgerechnet.

4.1.3 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Herstellung und das Laufen von SDS-Gelen wurde ein System von Biorad genutzt. Es wurden Gele mit einer Dicke von 0.75 mm verwendet.

Verwendete Puffer:

<u>Trenngelpuffer</u>	<u>Sammelgelpuffer</u>
1,5 M Tris pH 8,8	1 M Tris pH 6,8

Lösungen für das Gießen von Gelen:

Trenngel (ausreichend für drei Gele) :

	7 %	10 %	12 %	15 %
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	2,3 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
H ₂ O	4,99 ml	3,99 ml	3,29 ml	2,29 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Sammelgellösung:

Sammelgelpuffer	625 µl
Acrylamid/Bisacrylamid	670 µl
H ₂ O	3,58 ml
10 % SDS	50 µl
TEMED	5 µl
10 % APS	70 µl

4.1.4 Präparative SDS-PAGE

Für ein 10%iges Gel wurden folgenden Mengen verwendet. Das Gel wurde zwischen zwei großen Glasplatten gegossen und mit 1%iger Agarose-Lösung abgedichtet:

<u>Trenngel</u>		<u>Sammelgel</u>	
Trenngelpuffer	7,5 ml	Sammelgelpuffer	3,75 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	10 ml	Acrylamid/Bisacrylamid	1,95 ml
H ₂ O	12,5 ml	H ₂ O	9,3 ml
10 % SDS	300 µl	10 % SDS	200 ml
10 % APS	300 µl	10 % APS	300 µl
TEMED	30 µl	TEMED	7,2 µl

Das zu reinigenden Protein wird mit SDS-Puffer versetzt und aufgetragen. Es sollte auch Marker in einer kleinen Tasche aufgetragen werden. Der Lauf des Gels erfolgt über Nacht (1000V/ gewünschter Stundenzahl). Am nächsten Tag wird das Protein ausgeschnitten und mittels Elektrophorese bei 100 V über vier Stunden bei 4°C aus dem Gelstück eluiert.

4.1.5 Far Western – Analysen

Es wurden 500 ng Protein pro Spur geladen und ein SDS-Gel gefahren. Dieses Gel wurde auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und nach dem Transfer mit einer Milchlösung für eine Stunde bei 4°C gesättigt. Über Nacht wurde die Membran mit einer 2µg/ml his-Plx1-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit Milchlösung gewaschen und gebundenes Protein mit einem Antikörper gegen Plx1 detektiert.

Milchlösung	10 x TBS	
TBS + 0,1 % Tween-20 +	0,1 M	Tris pH 7,5
5% Magermilchpulver	1,5 M	NaCl

4.1.6 CaMKII-Kinase-Assay

CaMKII und die Reagenzien für den Kinase-Assay wurden von *New England Biolabs* bezogen. Die CaMKII wurde nach Angaben des Herstellers aktiviert. Die Phosphorylierungsreaktion wurde bei 30°C in Kinase-Reaktionspuffer, der 45 U aktivierter CaMKII, 0,1 – 1 mM ATP, 4 mCi [γ -³²P]ATP und 200 ng an gereinigtem MBP-XErp1 enthielt, durchgeführt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Alle Kulturen wurden bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Die Kultur erfolgte in LB-Medium. Für die Gewinnung plasmidischer DNS wurden TG1-Zellen verwendet. Für die Überexpression von Proteinen BL21 RIL.

4.2.2 Hitze-kompetente *E.coli*-Zellen

Eine 50 ml Vorkultur wurde mit 50 µl einer Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C angezogen. Je nach verwendetem Bakterienstamm erfolgte die Zugabe von Antibiotika, z.B. zu BL21 RIL Chloramphenicol. Mit 2 ml der Vorkultur wurden 200 ml Hauptkultur angeimpft. Diese wurde bei 37°C bis zu einer OD600nm von 0,5 (Null-Wert =LB-Medium) angezogen. Die Bakterienkultur wurde anschließend für 15 min auf Eis inkubiert und danach für 10 min bei 3000g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 80 ml TfbI aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 3000g. Das Sediment wurde in 8 ml TfbII aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

TfbI

TfbII

30 mM	Kaliumacetat pH 5,8 (C ₄ H ₄ O ₂)	10 mM	MOPS pH 6,5 (NaOH)
100 mM	RbCl	10 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂	75 mM	CaCl ₂
50 mM	MgCl ₂	15 % v/v	Glycerin
15 % v/v	Glycerin		

4.2.3 *E. coli*-Dauerkulturen

Für die Lagerung von *E. coli* – Stämmen wurden zu 4 ml Übernachtskultur 1ml steriles Glycerin gegeben. Die Dauerkultur wurde in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.4 Transformation Hitze-kompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Ligationsansatz wurde zu 50 µl Hitze-kompetenten Zellen gegeben und durchmischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Lösung für 45 s im Wasserbad auf 42°C erhitzt. Die Zellen wurden kurz (1-2 min) auf Eis abgekühlt und anschließend auf Platte ausplattiert (TG1, DH5a) oder direkt in Flüssigkultur gegeben (Retransformation von Plasmiden). BL21 RIL – Zellen werden nach einer Transformation noch für eine Stunde bei 37°C in antibiotikafreiem LB-Medium angezogen, bevor sie ausplattiert werden.

4.2.5 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolierung plasmidischer DNS aus *E. coli* wurde der „QIAfilter Plasmid Mini/Maxi Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Bestimmung der DNS-Konzentration einer Lösung wurde spektrometrisch ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS und 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit einer DNS-Lösung dient der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Für reine DNS sollte er 1,8 betragen.

4.2.7 Agarose-Gele

Zur Auftrennung von DNS wurden analytische und präparative Agarosegele verwendet. Vorrangig wurden 1%ige Gele benutzt.

TBE-Puffer

90 mM	Tris pH 8,0
90 mM	Borsäure
2,5 mM	EDTA

Laufpuffer

400 ml	TBE-Puffer
4 g	Agarose
40 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Die Lösung wurde bis zur klaren Auflösung der Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 60°C konnten die Gele gegossen werden. Für die Auftragung der DNS wurde ein 15 % Ficoll2400-haltiger-Puffer verwendet. Die Gele wurden bei einer Spannung von 80 – 90 Volt gefahren.

4.2.8 Gelextraktion

Für die präparative DNS-Gewinnung aus Agarose-Gelen wurde der „QIA quick Extraction Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.2.9 Amplifikation von DNS mittels PCR

Als Standard für die Klonierung von Fragmenten wurde folgendes Programm verwendet:

<u>PCR-Reaktion</u>		<u>PCR-Programm</u>	
1 µg	DNS	94°C	1 min
5 µl	5'Primer	94°C	30 s
5 µl	3' Primer	54°C	1 min
5 µl	dNtps	72°C	2 min pro 1kb
1 µl	Pfu-Polymerase	16 Zyklen	
ad 50 µl	H ₂ O	72°C	10 min

Als Standard für die ortsgerichtete Mutagenese wurde folgendes Programm verwendet:

<u>PCR-Reaktion</u>		<u>PCR-Programm</u>	
50 ng	DNS	95°C	30s
5 µl	Pfu	95°C	30s
2,27 µl	5'Primer	55°C	1min
2,27 µl	3'Primer	68°C	2min pro kb
5 µl	Pfu-Polymerase	18 Zyklen	
Ad 50 µl	H ₂ O		

4.2.10 Restriktionsverdau von Plasmiden

Es wurde das FseI/AscI-System (F/A-System) verwendet, d. h. es wurden immer die gleichen Schnittstellen in der *Multiple Cloning site* in den Vektoren verwendet. Dies erleichtert die Umklonierung einzelner Fragmente in unterschiedliche Vektoren. Für die erste Klonierung in das F/A-System wurden Primer verwendet, die am 5'-Ende die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym FseI enthalten und am 3'-Ende für das Restriktionssystem AscI.

4.2.11 Ligation von DNS

Es wurde die T4-DNS-Ligase von Roche verwendet. Die Reaktion erfolgte in 15 μ l, es wurden folgende Mengen pipettiert:

5 μ l	Insert
2 μ l	Vektor
1,5 μ l	10x Puffer
1 μ l	T4-DNS-Ligase
5,5 μ l	dd H ₂ O

Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur erfolgte die Transformation.

4.2.12 Zielgerichtete Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese von Aminosäuren wurde nach der QuickChange-Methode von Stratagene durchgeführt. Bei dieser Methode wurde das gesamte Plasmid mittels PCR amplifiziert und die Mutation über ein Paar komplementärer Primer eingeführt. Bei einer Mutation von zwei oder mehr Aminosäuren wurden mehrere Primer verwendet, wenn die Nukleotide nicht innerhalb eines Bereiches lagen. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Primer aufgelistet. Nach der PCR (siehe auch 4.2.9) erfolgte ein einstündiger Verdau mit DpnI. Anschließend wurde eine Transformation von hitzekompetenten DH5 α -Zellen mit 5 μ l des verdauten PCR-

Ansatzes durchgeführt.

Name (TUM)	Mutation	Gen	Sequenz 5'Primer/ 3'Primer
403, 404	S43A	XErp1	CTCTAAAGGGATTGcCCCAGACTCTCATAAAAG CTTTTATGAGAGTCTGGGgcGAATCCCTTTAGAG
210, 211	S63A	XErp1	GAAGGGTATGAAAATgCAGAAAATATAGATCCC GGGATCTATATTTTCTGcATTTTCATACCCTTC
153, 154	S33N, S36N	XErp1	GAATCCCTTTAGAGAGTCAfTG TAGCCAfTGTCTGCGA CACTGAAGTATCTTGG ACTTCAGTGTGCGCAGGACAaTGGCTACAGTaACTCTCTA AAGGGATTCAGCCC
47, 48	S33N, S38N	XErp1	CAGTGGCTACAGTGACaaTCTAAAGGGATTGAGCC GGCTGAATCCCTTTAGAttGTCACTGTAGCCACTG
149, 150	G59A, E61A	XErp1	CCGTGACAGAAGcGTATGcAAATTCAGAAAATATAGAT CCC GGGATCTATATTTTCTGAATTTgCATAcGCTTCTGTAC GG
234, 235	R262A	XErp1	CCTTGCAGCAAATTTTgcATTTAATTTATGCACTCC GGAGTGCATAAAATTAATgcAAAATTTGCTGCAAGG
236, 237	R529A	XErp1	CAGACTAAATATTTTAAAGTgcATCAGCTCTAAGATCTG CAGATCTTAGAGCTGATgcACTTAAAATATTTAGTCTG
413, 414	T336A	XErp1	GGTGTAGGAGACTATCCgCCCTTCGAGAGCGTGG TCCACGCTCTCGAAGGGcGGATAGTCTCCTACACC
362, 363	T195A	XErp1	CTTTTGCTCAGCAGAGGAGTTCCgCCTTGGATGATTCTA AAAG CTTTTAGAATCATCCAAGGcGGAACCTCTGCTGAGC AAAAG
360, 361	S194A	XErp1	CTTTTGCTCAGCAGAGGAGTgCCACCTTGGATGATTCT AAAAG CTTTTAGAATCATCCAAGGTGGcACTCCTCTGCTGAGC AAAAG
384, 385	L196P	XErp1	AGCAGAGGAGTTCCACCccGGATGATTCTAAA TTTAGAATCATCCggGGTGGAACCTCTGCT
386, 387	L196P D198K	XErp1	AGTTCCACCccGGATaAgTCTAAAAGTGACAGTA TACTGTCACTTTTAGAcTtATCCggGGTGGAACCT
40, 41	S334A, S338A	H_Erp1	GGCAGTATTTCAACGCCTGAGGACgcTGGTTTTAACgCA CTTAGCTTGGAGAAATCAG CTGATTTCTCCAAGCTAAGTgcGTTAAAACCAgcGTCC CAGGCGTTGAAATACTGCC
402, 403	T234A	H_Erp1	CAAAAGACTTCCgCAATTGATGATT AATCATCAATTGcGGAAGTCTTTTG
225, 226	W408F	Plx1	TTCTGGATCAGCAAATtcGTGGATTACTCGGAC GTCCGAGTAATCCACgaATTTGCTGATCCAGAA
317, 318	H532A K534H	Plx1	CTTCTCCAGGATgCACCgcGATAATCCTGTGCC GGCACAGGATTATCgcGGTGgcATCCTGGAAGAAG

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung von Zellen

A6-Zellen (Nierenepithel, *Xenopus laevis*):

Temperatur : 24°

<u>Kulturmedium (1 Liter)</u>		<u>Waschpuffer</u>	
610 ml	Leibovitz L-15 Medium	88 mM	NaCl
280 ml	ddH ₂ O	1 mM	KCl
100 ml	FCS	2,4 mM	NaHCO ₃
10 ml	Penicillin/Streptomycin-Lsg.	7,5 mM	Tris pH 7.6

HeLaS3 (Gebärmutterhalskarzinom, human); U2OS-Zellen (Osteosarkom, human); HEK293T-Zellen (Nierenepithel, human):

Temperatur: 37°C

CO₂: 5 %

<u>Kulturmedium</u>	<u>Waschpuffer</u>
DMEM-Medium +	PBS
10 % FCS	
1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg.	

4.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vier konfluent bewachsene 10 cm-Platten wurden trypsiniert und die Zellen anschließend gesammelt und zentrifugiert. Das Sediment wurde mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieses Sediment wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und zu je 200 µl in Cryoröhrchen gegeben und in einem Cryo-Einfriergerät bei -80°C über Nacht langsam eingefroren. Die Einlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff sollte am darauf folgenden Tag erfolgen.

Einfriermedium: 90 % FCS + 10 % DMSO (steril)

Das Auftauen von Zellen sollte schnell erfolgen. Dazu wurden die Zellen direkt aus flüssigem Stickstoff auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Wenn nur noch ein kleiner Eisklumpen im Röhrchen erkennbar war, erfolgte der Transfer der Zellen in bereits vorgewärmtes Medium, welches unter der Sterilbank in einer 10 cm-Platte vorgelegt wurde.

4.3.3 Transfektion von Zellen

Transiente Transfektionen wurden mit dem nicht liposomalen Transfektionsreagenz *FuGENETM6* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde ausschließlich der pCS2-F/A-Vektor als Vehikel genutzt.

4.3.4 siRNA

Um das humane Erp1 in HeLa-Zellen zu depletieren wurden folgende Oligonukleotide von Dharmacon verwendet:

Name	Gen	Zielsequenz
Oligo I	hErp1	
Oligo II	hErp1	aaggacauuuacagaaaua

Tabelle 5: verwendete siRNA-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurde in „Annealing-Puffer“ aufgenommen und die Lösung in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Das „Annealen“ der Oligonukleotide erfolgte für eine Stunde bei 37°C, zuvor wurde die Lösung für eine Minute bei 90°C erhitzt. Für die Transfektion der Zellen wurde als Carrier Oligofectamine (Invitrogene) verwendet. Standardprotokoll für eine Kammer einer 6-well-plate: Zu 5 µl der 20 µM siRNA Duplex-Lösung wurden 180 µl Opti-MEM gegeben. Für den Transfektionsmix einer Reaktion wurden 3 µl Oligofectamine mit 12 µl Opti-MEM vermischt. Diese Lösungen wurden für 10 Minuten inkubiert, zusammengemischt und nochmals für 20–25 Minuten inkubiert, bevor sie zu den Zellen gegeben wurden. Als Kontrolle diente ein GL2 Duplex (Elbashir et al., 2001), welches gegen das Luciferase Gen gerichtet ist.

4.3.5 Zellzyklusanalyse mittels FACS

Hier wurde eine Propidiumiodid-Färbung der Zellen durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsiniert und mit PBS gewaschen. Es erfolgt ein weiterer Waschriff mit PBS + 0,1% Glukose. Der Überstand wird bis auf 150 µl abgenommen und die Zellen wieder resuspendiert. Die eigentliche Fixierung erfolgt mit 70%igem Ethanol (vorgekühlt auf -20°C) auf Eis. An dem Tag an dem die FACS-Analyse stattfindet, sollte auch die Propidiumiodid-Färbung gemacht werden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen werden in Färbelösung resuspendiert. Dann gibt man 1 µl einer RNase A-Lösung (9,5 mg/ml) hinzu und inkubiert die Zellen für eine halbe Stunde bei 37°C. Danach kann die FACS-Analyse erfolgen.

Färbelösung

38 mM Natriumcitrat +

1/100 6,9 mM Propidiumiodid (Lösung kann bei 4°C gelagert werden)

4.3.6 Herstellung von Antikörpern

4.3.6.1 Immunisierung von Hasen

Die Immunisierung erfolgte sowohl nach einem Standardschema, als auch über die Hersteller der Peptidantikörper gegen hErp1. Die erste Injizierung erfolgt mit 500 µg des Antigens, die folgenden *boosts* (bis zu viermal) mit 250 µg erfolgten im Abstand von zwei Wochen. Das Antigen wurde bei der ersten Injektion mit TiterMax-Gold vermischt, bei den *boosts* mit Freudschem Adjuvans.

4.3.6.2 Aufreinigung von Antikörpern

Das jeweilige Antigen (1 mg) wurde an HiTrap-NHS-aktivierter Sepharose (Amersham-Pharmacia), bzw. bei Peptiden an Sulfolink (Pierce), gekoppelt. Die Kopplung der Antigene an die Matrix erfolgte nach Angaben der jeweiligen Hersteller. In beiden Fällen erfolgte eine Elution des Antikörpers unter Verwendung eines sauren Puffers.

4.3.7 Arbeiten mit *Xenopus laevis*

4.3.7.1 Gewinnung von reifen Oozyten und Herstellung von CSF-Extrakt

Für ungefähr 1 ml CSF-Extrakt benötigt man die Oozyten eines Frosches. Am Tag vor der Extrakt-Präparation injizierte man die gewünscht Anzahl weiblicher Frösche mit je 0,8 ml einer humanen Gonadotropin-Lösung (1000 IU/ml). Die Weibchen wurden bei 18°C gehalten. Ca. 5 h nach der Injektion setzte man die Frösche in Container um, die MMR enthalten. 20 h nach der Injektion sollten die Frösche reife Oozyten gelegt haben, mit einer abgeschnittenen Kunststoffpipette sortierte man die morphologisch nicht einwandfrei erscheinenden Oozyten aus. Um grobe Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Eier mit MMR gewaschen. Anschließend entfernte man den sog. „jelly coat“ durch eine ca. 10 minütige Inkubation in einer Cystein-XB-Lösung. Danach wurden die Eier mit CSF-XB gewaschen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt, in dem 1 ml CSF-XB und 10 µl einer Cytochalasin B-Lösung vorgelegt wurden. Anschließend wurden die Eier für 1min bei 900 rpm in einem HB6-Rotor zentrifugiert, danach für eine weitere Minute bei 1900 rpm. Die Flüssigkeit über den Oozyten wurde abgesaugt und danach erfolgte die Lyse der Eier bei 10000 rpm in einem HB6-Rotor. Die Zytoplasma-Fraktion (gelb) wurde mit Hilfe einer Nadel entnommen. Dem Extrakt wurden noch Ubiquitin (1/250), Energie-Mix (1/50), Phosphokreatinkinase (1/1000) und Cytochalasin B (1/1000) zugegeben und mit einer abgeschnittenen 1000µl Pipettenspitze gemischt. Falls die Translation im Extrakt inhibiert werden soll, kann man 1/100 Cycloheximid zum Extrakt geben. Die weitere Lagerung des Extrakts erfolgte auf Eis.

Verwendete Lösungen:

25x MMR

2.5 M	NaCl
50 mM	KCl
25 mM	MgCl ₂
50 mM	CaCl ₂
2,5 mM	EDTA pH 8.0
125 mM	HEPES pH 7.8

CSF-XB

1x XB-Lösung +

2 mM	MgCl ₂ (1M Stock)
10 mM	Hepes pH 7,7 (1M Stock)
50 mM	Saccharose (2,5 M Stock)
5 mM	EGTA pH 8.0

Phosphokreatinkinase

40 mg/ml in 0,9 CSF-XB/ 0,25 M Saccharose

Cycloheximid10 mg/ml in H₂O20x XB-Lösung

2 M	KCl
2 mM	CaCl ₂
20 mM	MgCl ₂
Cystein-XB-Lösung	
1x XB-Lösung	
+ 2 % Cystein	pH 7.8 (KOH)

Cytochalasin B

10 mg/ml in DMSO

Energie-Mix

375 mM	Kreatinphosphat (1M Stock)
50 mM	ATP (neutral pH)
50 mM	MgCl ₂

Ubiquitin

10 mg/ml in 0,9 CSF-XB/ 0,25 M Saccharose

Vor den eigentlichen Experimenten sollte überprüft werden, ob sich der Extrakt tatsächlich im Metaphase-Arrest befindet. Dazu wurden 1000 Spermien (ohne Membran) zu 1 µl Extrakt gegeben. Danach wurde der Extrakt in zwei Aliquots aufgeteilt und zu einem Teil 1 mM CaCl₂ zugegeben. Der Extrakt wurde daraufhin für 45 min bei 20°C inkubiert. Danach wurde die DNS-Morphologie mikroskopisch untersucht. Dazu gab man 1 µl des Extrakts auf 3 µl einer Fixierungslösung, die man vorher auf einen Objektträger gegeben hat. Anschließend deckte man die Lösung mit einem Deckgläschen ab und fixierte das Gläschen mit Nagellack auf dem Objektträger. Der Extrakt dem Calcium zugegeben wurde, sollte Kerne gebildet haben und der Extrakt ohne Calcium sollte noch kondensierte DNS besitzen. Falls Protein zu Extrakt gegeben wurde, wurde die vor der Verwendung eine halbe Stunde bei 30000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Fixierungslösung

48 %	Glycerin
11 %	Formaldehyd
1x	MMR
1 µg/ml	Hoechst 33342

4.3.8 Mikroskopische Arbeiten

4.3.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die zu untersuchenden Zellen ließ man auf Deckgläschen wachsen. Zum gewünschten Zeitpunkt erfolgte eine Methanol-Fixierung (Zugabe von einer 100%, wasserfreien Methanol-Lösung) bei -20°C., für ca. eine halbe Stunde. Anschließend wurden die Deckgläschen mit TBS+0,1% Tx100 gewaschen und daraufhin mit einer 0,2% BSA/TBS/+0,1% Tx100-Lösung für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten wiederum drei Waschriffe mit TBS+0,1% Tx100. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten in einer Feuchtkammer. Die Deckgläschen wurden eine Stunde mit dem primären Antikörper in TBS+ 0,1% Tx100 bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS+ 0,1% Tx100 erfolgte eine weitere einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper und Hoechst 33342 in TBS+ 0,1% Tx100. Nachdem die Deckgläschen daraufhin dreimal mit TBS/T gewaschen wurden, wurden sie mit 3 µl Fixierlösung auf einen Objektträger fixiert und mit Nagellack abgedichtet.

Verwendete Lösungen:

<u>10xTBS/T</u>		<u>Fixierlösung</u>	
0,1 M	Tris pH 7.5	20 mM	Tris pH 8.8
1,5 M	NaCl	90 %	Glycerin
		0,5 %	p-Phenylendiamin

4.4 Materialien

4.4.1 Verwendete primäre Antikörper

Name	Antigen	Verdünnung bzw. Konzentration	Herkunft	Spezies
Sc 789	c-Myc	IF: 1:500	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen
	GFP	W: 1:1000	Dr. Francis Barr	Ziege
TUM 26	hErp1; As 1 – 487 (his-Fusionsp.)	Serum: 1:500	Diese Arbeit	Kaninchen
TUM 27	hErp1; As 1-487 (MBP/his-Fusionsp.)	Serum: 1:500	Diese Arbeit	Kaninchen
TUM 28	hErp1; As 1-487 (MBP/his-Fusionsp.)	Serum: 1:500 Aufg. : 1µg/ml	Diese Arbeit	Kaninchen
TUM 19	hErp1; As 328 - 475	Serum: 1:500	Diese Arbeit	Kaninchen
TUM 20	hErp1; As 328 - 475	Serum: 1:500 Aufg. : 1µg/ml	Diese Arbeit	Kaninchen
TUM 29	hErp1; As 695 - 723	Serum: 1:500 Aufg. : 1µg/ml	Diese Arbeit	Kaninchen
TUM 30	hErp1; As 695 - 723	Serum: 1:500 Aufg. : 1µg/ml	Diese Arbeit	Kaninchen
TUM 3	Plx1 wt,fl	W: 1µg/ml	Mayer-Lab.	Kaninchen
Affi 1	XErp1; As 105-374	IF: 1µg/ml	Dr. Peter Duncan	Kaninchen
DM 1A	α-Tubulin	IF: 1:1000	Sigma-Aldrich	Maus
GTU-88	γ-Tubulin	IF: 1:1000	Sigma-Aldrich	Maus

4.4.2 Chemikalien für die Färbung von DNS

Chemikalie	Konzentration	Hersteller
Propidiumiodid	69 µM	NeoLab
Hoechst 33342	1 µg/ml	Sigma-Aldrich

4.4.3 Verwendete sekundäre Antikörper

Konjugat	Antigen	Verdünnung bzw. Konzentration	Herkunft	Spezies
HRP	Kaninchen IgG	W:1:3000	Amersham	Ziege
HRP	Maus IgG	W:1:3000	Amersham	Ziege
AlexaFluor [®] 488	Maus IgG	IF: 1:1000	Molecular Probes	Ziege
Alexa Fluor red	Kaninchen IgG	IF: 1:1000	Molecular Probes	Ziege

4.4.4 Verwendete Bakterienstämme

Name	Verwendung
TG1	Klonierungen
BL21-RIL	Proteinexpression
DH5 α	Site directed mutagenesis

4.4.5 Verwendete Plasmide

Name (TUM)	Fusionsprotein	Gen	Insert	Organismus	Vektor
36°	-	Erp1	Wt; V1	Human	pCRTopo II
114	-	Erp1	Wt; V1	Human	pCS2-F/A
53	Gal4 AD	Erp1	Wt; V1	Human	pACT2-F/A
40	MYC	Erp1	Wt; V1	Human	pCS2-MYC-F/A
38	GFP	Erp1	Wt; V1	Human	pCS2-GFP-F/A
87	GFP	Erp1	Mut; V1; S334A, S338A	Human	pCS2-GFP-F/A
100	-	Erp1	Mut; V1; S334A, S338A	Human	pCS2-F/A
585	-	Erp1	Mut; V1; T234A	Human	pCS2-F/A
419°	His	Plx1	Wt; V1	<i>Xenopus</i>	pFastBac-His-Tev2-F/A
398*	MBP	Plx1	Wt; PBD-Domäne	<i>Xenopus</i>	pMAL-Tev2-F/A

589°	MBP	Plx1	Mut; PBD-Domäne W408F, H532A, K534H	<i>Xenopus</i>	pMAL-Tev2- F/A
035 ⁺	Gal4 BD	Skp1	Wt; V1	Human	pGBD□-C1
084°	MYC	β-TrCP	Wt; V1	Maus	pCS2-MYC-F/A
325	-	XErp1	Wt; V1	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
299	-	XErp1	Wt; As 1-150	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
317	-	XErp1	Wt; As 38-651	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
318	-	XErp1	Wt; As 63-651	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
476	MYC	XErp1	Wt;V1	<i>Xenopus</i>	pCS2-MYC-F/A
316	MYC	XErp1	Wt; As 1-300	<i>Xenopus</i>	pCS2-MYC-F/A
326	MYC	XErp1	Wt; As 1-424	<i>Xenopus</i>	pCS2-MYC-F/A
319	MYC	XErp1	Wt; As 488-651	<i>Xenopus</i>	pCS2-MYC-F/A
324°	-	XErp1	Mut; V; S43A, S63A	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
146°	-	XErp1	Mut; V1; S33N, S36N	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
501 [#]	-	XErp1	Mut; V1; S33N, S38N	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
175	-	XErp1	Mut; V1; G59A, E61A	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
349	-	XErp1	Mut; V1; R262A	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
350	-	XErp1	Mut; V1; R529A	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
587	-	XErp1	Mut; V1; T336A	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
588	-	XErp1	Mut; V1; T195A	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
574	-	XErp1	Mut; V1; S194A	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
593	-	XErp1	Mut; V1; L196P, D198K	<i>Xenopus</i>	pCS2-F/A
578 [#]	MBP	XErp1	Wt; V1	<i>Xenopus</i>	pMAL-Tev2- F/A
582	MBP	XErp1	Mut; V1; S194A	<i>Xenopus</i>	pMAL-Tev2- F/A
583	MBP	XErp1	Mut; V1; T195A	<i>Xenopus</i>	pMAL-Tev2- F/A
542°	MBP	XErp1	Mut; V1; S33N, S38N	<i>Xenopus</i>	pMAL-Tev2- F/A

° Dr. T. U. Mayer, * J. Bormann, # A. Schmidt, + Dr. A. Buchberger

4.4.6 Verwendete Peptide

Sequenz	Protein	Verwendung	Herkunft
H-KKERLLDDRHDSGLFDSMKDEE-OH	Hu_ IκB	Bindungs- studien	In house Peptide Service
H-KKERLLDDRHDS(PO ₃ H ₂)GLD S(PO ₃ H ₂)MKDEE-OH	Hu_ IκB	Bindungs- studien	In house Peptide Service
H-EVRGSISTPEDSGFNLSLEKS-OH	hErp1	Bindungs- studien	In house Peptide Service
H-EVRGSISTPEDS(PO ₃ H ₂)GFN S(PO ₃ H ₂)LSLEKS-OH	hErp1	Bindungs- studien	In house Peptide Service
CSRGAAKPRNRKDALPGSAQSKRNLKRL	hErp1	Peptidanti- körper	Peptide Specialty Laboratories GmbH

4.4.7 Verwendete Geräte

Typ	Hersteller/Name
Elektrophoresekammern	Werkstatt MPI
FACS	
Filmentwicklung	Fujifilm Intelligent Dark Box II
Fotometer	Pharmacia Ultraspec 3000pro
Heizblock	Eppendorf <i>Thermomix compact</i>
Inkubatoren	Heraeus Cell
Kühlbare Tischzentrifuge	Eppendorf <i>centrifuge 5417R</i>
Mikroskop	Zeiss Axioplan
Neubauer Zählkammer	Merck
PCR Maschine	Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400
Schüttler	Infors AG Multitron
SS34 Rotor	Beckmann
Sterilwerkbank	Heraeus
Ultrazentrifuge	Beckmann-Optima LE-80K
Vortex	Scientific Instr., Hawthorne
Wasserbad	Haake DC10
Westernblot-Apparatur	Hoefler SemiPhor
Zentrifuge Sorvall RC5B	DuPont

5 Literatur

- Barr, F. A., H. H. Sillje, et al. (2004). "Polo-like kinases and the orchestration of cell division." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(6): 429-40.
- Baumeister, W., J. Walz, et al. (1998). "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." *Cell* **92**(3): 367-80.
- Berridge, M. J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." *Nature* **361**(6410): 315-25.
- Cardozo, T. and M. Pagano (2004). "The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(9): 739-51.
- Castro, A., C. Bernis, et al. (2005). "The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle." *Oncogene* **24**(3): 314-25.
- Castro, A. and T. Lorca (2005). "Exploring meiotic division in *Cargese*. Meeting on meiotic divisions and checkpoints." *EMBO Rep* **6**(9): 821-5.
- Castro, A., S. Vigneron, et al. (2003). "Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box-independent pathway." *Mol Cell Biol* **23**(12): 4126-38.
- Castro, A., S. Vigneron, et al. (2002). "The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A." *EMBO Rep* **3**(12): 1209-14.
- Ciosk, R., W. Zachariae, et al. (1998). "An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast." *Cell* **93**(6): 1067-76.
- Clute, P. and J. Pines (1999). "Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase." *Nat Cell Biol* **1**(2): 82-7.
- Descombes, P. and E. A. Nigg (1998). "The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts." *Embo J* **17**(5): 1328-35.
- Deshpande, A., P. Sicinski, et al. (2005). "Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective." *Oncogene* **24**(17): 2909-15.
- Dunphy, W. G., L. Brizuela, et al. (1988). "The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis." *Cell* **54**(3): 423-31.
- Elia, A. E., L. C. Cantley, et al. (2003a). "Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates." *Science* **299**(5610): 1228-31.
- Elia, A. E., P. Rellos, et al. (2003). "The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain." *Cell* **115**(1): 83-95.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, et al. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." *Cell* **33**(2): 389-96.
- Ferrell, J. E., Jr. (1999). "Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg." *Bioessays* **21**(10): 833-42.
- Gautier, J., J. Minshull, et al. (1990). "Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*." *Cell* **60**(3): 487-94.

- Gautier, J., C. Norbury, et al. (1988). "Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*." Cell **54**(3): 433-9.
- Glotzer, M., A. W. Murray, et al. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**(6305): 132-8.
- Guardavaccaro, D., Y. Kudo, et al. (2003). "Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo." Dev Cell **4**(6): 799-812.
- Hansen, D. V., A. V. Loktev, et al. (2004). "Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1." Mol Biol Cell **15**(12): 5623-34.
- Hansen, D. V., J. J. Tung, et al. (2006). "CaMKII and Polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 608-13.
- Hart, M., J. P. Concordet, et al. (1999). "The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell." Curr Biol **9**(4): 207-10.
- Hartwell, L. H., J. Culotti, et al. (1970). "Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(2): 352-9.
- Hsu, J. Y., J. D. Reimann, et al. (2002). "E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1)." Nat Cell Biol **4**(5): 358-66.
- Lee, M. G. and P. Nurse (1987). "Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*." Nature **327**(6117): 31-5.
- Littlepage, L. E. and J. V. Ruderman (2002). "Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit." Genes Dev **16**(17): 2274-85.
- Liu, J., A. L. Lewellyn, et al. (2004). "The polo box is required for multiple functions of Plx1 in mitosis." J Biol Chem **279**(20): 21367-73.
- Liu, J. and J. L. Maller (2005). "Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytostatic factor." Curr Biol **15**(16): 1458-68.
- Lohka, M. J., M. K. Hayes, et al. (1988). "Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(9): 3009-13.
- Lorca, T., F. H. Cruzalegui, et al. (1993). "Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs." Nature **366**(6452): 270-3.
- Margottin-Goguet, F., J. Y. Hsu, et al. (2003). "Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase." Dev Cell **4**(6): 813-26.
- Marston, A. L. and A. Amon (2004). "Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(12): 983-97.
- Masui, Y. (1967). "Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*." J Exp Zool **166**(3): 365-75.

- Masui, Y. (2001). "From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF)." *Differentiation* **69**(1): 1-17.
- Masui, Y. and C. L. Markert (1971). "Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes." *J Exp Zool* **177**(2): 129-45.
- Megy, S., G. Bertho, et al. (2005). "STD and TRNOESY NMR studies on the conformation of the oncogenic protein beta-catenin containing the phosphorylated motif DpSGXXpS bound to the beta-TrCP protein." *J Biol Chem* **280**(32): 29107-16.
- Moshe, Y., J. Boulaire, et al. (2004). "Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(21): 7937-42.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* **116**(2): 221-34.
- Ohsumi, K., A. Koyanagi, et al. (2004). "Emi1-mediated M-phase arrest in *Xenopus* eggs is distinct from cytostatic factor arrest." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12531-6.
- Paronetto, M. P., E. Giorda, et al. (2004). "Functional interaction between p90Rsk2 and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes." *Embo J* **23**(23): 4649-59.
- Passmore, L. A. and D. Barford (2004). "Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation." *Biochem J* **379**(Pt 3): 513-25.
- Pfleger, C. M. and M. W. Kirschner (2000). "The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1." *Genes Dev* **14**(6): 655-65.
- Pines, J. and C. L. Rieder (2001). "Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression." *Nat Cell Biol* **3**(1): E3-6.
- Prinz, S., E. S. Hwang, et al. (1998). "The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis." *Curr Biol* **8**(13): 750-60.
- Reimann, J. D., E. Freed, et al. (2001). "Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex." *Cell* **105**(5): 645-55.
- Reimann, J. D., E. Freed, et al. (2001b). "Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex." *Cell* **105**(5): 645-55.
- Reimann, J. D. and P. K. Jackson (2002). "Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs." *Nature* **416**(6883): 850-4.
- Sagata, N., M. Oskarsson, et al. (1988). "Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes." *Nature* **335**(6190): 519-25.
- Sagata, N., N. Watanabe, et al. (1989). "The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs." *Nature* **342**(6249): 512-8.
- Schmidt, A., P. I. Duncan, et al. (2005). "Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity." *Genes Dev* **19**(4): 502-13.
- Songyang, Z., K. P. Lu, et al. (1996). "A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II,

- NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1." *Mol Cell Biol* **16**(11): 6486-93.
- Tugendreich, S., J. Tomkiel, et al. (1995). "CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition." *Cell* **81**(2): 261-8.
- Tung, J. J., D. V. Hansen, et al. (2005). "A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytosstatic factor arrest of *Xenopus* eggs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12): 4318-23.
- Tung, J. J. and P. K. Jackson (2005). "Emi1 class of proteins regulate entry into meiosis and the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes." *Cell Cycle* **4**(3): 478-82.
- Tunquist, B. J., P. A. Eysers, et al. (2003). "Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytosstatic factor-mediated metaphase arrest." *J Cell Biol* **163**(6): 1231-42.
- Tunquist, B. J. and J. L. Maller (2003). "Under arrest: cytosstatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs." *Genes Dev* **17**(6): 683-710.
- Vodermaier, H. C. (2004). "APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle." *Curr Biol* **14**(18): R787-96.
- Wasserman, W. J. and Y. Masui (1976). "A cytoplasmic factor promoting oocyte maturation: its extraction and preliminary characterization." *Science* **191**(4233): 1266-8.
- Wasserman, W. J. and L. D. Smith (1978). "The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown." *J Cell Biol* **78**(1): R15-22.
- Watanabe, N., T. Hunt, et al. (1991). "Independent inactivation of MPF and cytosstatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs." *Nature* **352**(6332): 247-8.
- Winston, J. T., P. Strack, et al. (1999). "The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro." *Genes Dev* **13**(3): 270-83.
- Yaron, A., A. Hatzubai, et al. (1998). "Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase." *Nature* **396**(6711): 590-4.
- Yew, N., M. L. Mellini, et al. (1992). "Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*." *Nature* **355**(6361): 649-52.

6 Lebenslauf

Nadine R. Rauh
Diplom-Biochemikerin
Ellmershausstr. 28
96317 Kronach

Geburtsdatum : 10. April 1976
Geburtsort: Kronach
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Promotion

Juli 2002 –April 2006 Doktorandin in der Gruppe *Chemical Genetics* von
Dr. T. U. Mayer am Max-Planck-Institut für
Biochemie, Martinsried.
Thema der Arbeit: Regulation des APC/C-Inhibitors
Erp1

Akademische Ausbildung

Oktober 1996 – September 2001 Martin-Luther-Universität, Halle/Saale, Deutschland
Studium der Biochemie. Diplom Biochemie

November 2000 – September
2001 Diplomarbeit „Charakterisierung des Thermosoms
aus *Thermoplasma acidophilum*.“ MPI für
Biochemie, Martinsried, Abteilung für
Strukturbiologie.

1989 - 1996 Frankenwald-Gymnasium Kronach, Abitur

Publikationsliste

Rauh, N.R.^{*}, Schmidt, A.^{*}, Bormann, J., Nigg, E. A. and Mayer T.U. CaMKII triggers exit from meiosis II by targeting the APC-inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* online doi: 10.138/nature04093

*Co-Authors

Schmidt, A., Duncan, P.I., Rauh, N.R., Sauer, G., Fry, A.M., Nigg, E.A. and Mayer, T.U... *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes and Development* 19: 502-513

Gutsche, I., Holzinger, J., Rauh, N. Baumeister, W., and May, R. P.. ATP-induced structural change of the thermosome is temperature-dependent. *Journal of Structural Biology* **135** (2) (2001) 139-146

Poster

Rauh, N.R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E. A. and Mayer T.U. Plx1 and CaMKII cooperate to target the APC/C inhibitor XErp1 for degradation.

ELSO Treffen 2005, Dresden.

A. Schmidt, P. Duncan, N. R. Rauh, G. Sauer, E.A. Nigg, T.U. Mayer. *Xenopus* Pololike Kinase Plx1 Regulates Xerp1, a Novel Inhibitor of APC/C Activity.

ASCB Treffen 2004, Washington DC, USA.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Leuten danken, ohne die diese Arbeit nie das Licht der Welt erblickt hätte.

Bedanken möchte ich mich bei Professor Erich A. Nigg für die Möglichkeit der Fortführung eines interessanten Forschungsprojekts, sein Interesse an der Arbeit und Vorschläge für das Fortkommen der Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Thomas U. Mayer, dessen Betreuung während meiner praktischen und schriftlichen Ausfertigung meiner Dissertation eine der wesentlichsten Voraussetzungen für das Gelingen dieser Arbeit war. Er hat mir das wissenschaftliche Argumentieren und Darstellen gelehrt. Danken möchte ich ihm auch, für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Dank sagen möchte ich meinem Laborkollegen Andreas Schmidt, dem interessierten Mit-Xerpler, für die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen und seiner Hilfsbereitschaft.

Für die gute Stimmung im Labor gilt mein Dank auch den übrigen Kollegen des „Mayer-Labs“: Jenny Bormann, Stefan Hümmer, Monika Mayr, Tamara Grüner und Mario Catarinella.

Für das Erledigen der Bürokratie danke ich Alison Dalfovo.

Der gesamten Abteilung „Zellbiologie“ und der Arbeitsgruppe um Dr. Francis Barr möchte ich für die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre danken.

Danken möchte ich für das Korrekturlesen Dr. Thomas U. Mayer, Andreas Schmidt und Dr. Dagmar Hackel.

Ein herzlicher und großer Dank für die grenzenlose Unterstützung gebührt meinen Eltern und meinem Freund Matthias. Wenn man sie braucht, sind sie einfach immer da.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die einzelnen Phasen des Zellzyklus.	13
Abbildung 1-2: Die einzelnen Phasen der Mitose (Pines et al. 2001).	14
Abbildung 1-3: Ziel der Meiose ist es die Menge an Erbinformation zu reduzieren.	15
Abbildung 1-4: Unreife (a) und reife Oozyten (b) aus <i>Xenopus laevis</i> (Ferrell 1999).	16
Abbildung 1-5: Schematische Darstellung von Eiwachstum, Eireifung und Start der embryonalen Entwicklung von <i>Xenopus laevis</i>.	17
Abbildung 1-6: Die Entdeckung der Aktivitäten von MPF und CSF in reifen Oozyten.	18
Abbildung 1-7: Erkennung des Zellzyklusstadiums von <i>Xenopus</i>- Ei- Extrakt anhand der DNS-Morphologie.	19
Abbildung 1-8: Mit CSF injizierter <i>Rana pipiens</i> Embryo (Masui 2001) .	20
Abbildung 1-9: Schema bereits bekannter CSF-Komponenten (Castro et al. 2005).	22
Abbildung 1-10: Die Aktivierung des APC/C ist notwendig für den Eintritt in die Anaphase.	25
Abbildung 1-11: Struktur der CaMKIIα (modifiziert nach Cruzalegui et al., 1992).	26
Abbildung 1-12: Modell wie Plx1 auf den Austritt aus der M-Phase wirken könnte (Descombes et al. 1998).	27
Abbildung 1-13 : Struktur der humanen Plk1.	28
Abbildung 1-14: Röntgenstruktur der humanen Polo-Box-Domäne (Elia et al., 2003), Lokalisierung von Plk1 durch Bindung an phosphorylierte Proteine (Barr et al. 2004) .	28
Abbildung 1-15: β-Trecp $-/-$ MEF zeigen multipolare Spindeln und falsch angeordnete Chromosomen (Guardavaccaro et al. 2003).	32
Abbildung 1-16: Plx1 bestimmt den Abbau des APC/C-Inhibitors XErp1 und damit die Aufhebung des CSF-Arrests (Schmidt et al., 2005).	35
Abbildung 2-1: Subzelluläre Lokalisation von XErp1.	37
Abbildung 2-2: Die Aminosäuren 488 bis 651 reichen für die zentrosomale Lokalisierung von XErp1 aus.	38
Abbildung 2-3: Während des Experiments wurde der Zellzyklusstatus anhand von Fluoreszenzaufnahmen überprüft.	39
Abbildung 2-4: XErp1 erfährt während des Zellzyklus unterschiedliche Modifikationen und wird calcium-abhängig abgebaut.	39
Abbildung 2-5: XErp1 wird im CSF-Extrakt phosphoryliert.	40

Abbildung 2-6: XErp1 S43 und S63 werden in CSF-Extrakt phosphoryliert.	41
Abbildung 2-7: Mögliche Abbausignale in XErp1.	42
Abbildung 2-8: Ein DSG-Motiv im N-Terminus ist notwendig für den Calcium-abhängigen Abbau von XErp1.	43
Abbildung 2-9: Nach Calcium-Zugabe wird XErp1 phosphoryliert.	45
Abbildung 2-10: XErp1 ist ein Substrat von CaMKII.	46
Abbildung 2-11: Mögliche CaMKII-Phosphorylierungsstellen von XErp1.	46
Abbildung 2-12: Die Mutation von T195 zu Alanin führt zu einer Stabilisierung von XErp1.	47
Abbildung 2-13: S194 ist notwendig für den Abbau von XErp1.	47
Abbildung 2-14: CaMKII schafft für Plx1 eine Bindestelle an XErp1.	48
Abbildung 2-15: Die Phosphorylierung von Threonin 195 ist essentiell für den Abbau von XErp1.	49
Abbildung 2-16: Die Aktivität von Plx1 wird auch für den Abbau der Cdk1-Mutante benötigt.	50
Abbildung 2-17: Schematischer Aufbau von hErp1.	51
Abbildung 2-18: Die F-Box ist für die Bindung von hErp1 an hSkp1 essentiell.	51
Abbildung 2-19: Überexpression von hErp1^{wt} in HeLa-Zellen.	52
Abbildung 2-20 : Darstellung der Bereiche von hErp1, die für die polyklonale Antikörpergewinnung genutzt wurden.	53
Abbildung 2-21: Immunoblot-Analysen der gegen hErp1 affinitätsaufgereinigten Antikörper.	54
Abbildung 2-22: Immunoblotanalysen mit Zellysaten aus RNAi-behandelten Zellen.	55
Abbildung 2-23: Immunfluoreszenzanalysen an Methanol-fixierten U2OS-Zellen	56
Abbildung 2-24: Die Überexpression von hErp1 führt zu einem Anstieg der G2/M-Population.	57
Abbildung 2-25: Das DS³³⁴G-Motiv bestimmt nicht den Abbau von hErp1.	59
Abbildung 2-26: T234 ist für den Calcium-abhängigen Abbau von hErp1 notwendig.	60
Abbildung 3-1: CaMKII und Plx1 kooperieren, um eine Aufhebung des Meiose II-Arrests durch Initiierung des Abbaus von XErp1 zu ermöglichen.	64

9 ANHANG: Veröffentlichungen

Schmidt, A., Duncan, P.I., Rauh, N.R., Sauer, G., Fry, A.M., Nigg, E.A., and Mayer, T.U. (2005). *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev.*, **15**, 502-513.

Rauh, N.R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E. A. and Mayer T.U. (2005). CaMKII triggers exit from meiosis II by targeting the APC-inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* **437**, 1048-1052.

Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity

Andreas Schmidt,¹ Peter I. Duncan,^{2,4} Nadine R. Rauh,¹ Guido Sauer,² Andrew M. Fry,³
Erich A. Nigg,² and Thomas U. Mayer^{1,5}

¹Chemical Biology, Independent Research Group, and ²Department of Cell Biology, Max-Planck-Institute of Biochemistry, 82152 Martinsried, Germany; ³Department of Biochemistry, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, UK

Metaphase-to-anaphase transition is a fundamental step in cell cycle progression where duplicated sister-chromatids segregate to the future daughter cells. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is a highly regulated ubiquitin-ligase that triggers anaphase onset and mitotic exit by targeting securin and mitotic cyclins for destruction. It was previously shown that the *Xenopus* polo-like kinase Plx1 is essential to activate APC/C upon release from cytostatic factor (CSF) arrest in *Xenopus* egg extract. Although the mechanism by which Plx1 regulates APC/C activation remained unclear, the existence of a putative APC/C inhibitor was postulated whose activity would be neutralized by Plx1 upon CSF release. Here we identify XErp1, a novel Plx1-regulated inhibitor of APC/C activity, and we demonstrate that XErp1 is required to prevent anaphase onset in CSF-arrested *Xenopus* egg extract. Inactivation of XErp1 leads to premature APC/C activation. Conversely, addition of excess XErp1 to *Xenopus* egg extract prevents APC/C activation. Plx1 phosphorylates XErp1 in vitro at a site that targets XErp1 for degradation upon CSF release. Thus, our data lead to a model of APC/C activation in *Xenopus* egg extract in which Plx1 targets the APC/C inhibitor XErp1 for degradation.

[*Keywords:* Cell cycle; anaphase-promoting complex/cyclosome; *Xenopus*; polo-like kinase; cytostatic factor; mitotic exit]

Received August 9, 2004; revised version accepted December 16, 2004.

Before fertilization, vertebrate eggs are arrested in metaphase of meiosis II by a biochemical activity that was named cytostatic factor (CSF) in a seminal publication over 30 years ago (Masui and Markert 1971). CSF was defined as an activity present in the cytoplasm of frog eggs arrested in metaphase of meiosis II that when injected into one cell of a two-cell embryo produced a cleavage arrest in the injected cell. Since then, numerous attempts have been made to identify the molecular nature of CSF in vertebrate eggs and to dissect the mechanism underlying the meiotic metaphase arrest. Fertilization of the egg causes a transient rise in free intracellular calcium mediating CSF release and thus anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) activation. Active APC/C mediates the degradation of securin and cyclin B and thereby promotes anaphase onset (Lorca et al. 1993; Murray 2004). Extract from CSF-arrested *Xenopus* eggs faithfully recapitulates many morphological and biochemical events associated with release from CSF arrest upon addition of calcium ions.

Data from various research groups have firmly established a role for the germ-cell specific c-Mos kinase in establishing CSF activity (Sagata et al. 1989; Tunquist and Maller 2003). c-Mos mediates its effect by activating a mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade (Kosako et al. 1994) leading to the phosphorylation and thereby activation of the protein kinase p90^{Rsk} (Sturgill et al. 1988). Components of the spindle assembly checkpoint seem to be the downstream targets of the c-Mos/MAPK/p90^{Rsk} pathway, because the checkpoint proteins Mad1, Mad2, and Bub1 are required to mediate the c-Mos-initiated CSF arrest in *Xenopus* egg extract (Schwab et al. 2001; Tunquist et al. 2002, 2003). However, the c-Mos/MAPK/p90^{Rsk} pathway is not the only activity contributing to CSF arrest. For instance, it has been shown that cyclin-dependent kinase 2/cyclin E (Cdk2/cyclin E) could mediate CSF arrest in the absence of c-Mos kinase (Tunquist et al. 2002), suggesting that Cdk2/cyclin E and c-Mos/MAPK/p90^{Rsk} represent independent pathways both needed for effective APC/C inhibition. Furthermore, recent work identified a putative vertebrate homolog of the *Drosophila* regulator of cyclin A1 (Dong et al. 1997), Emi1 (early mitotic inhibitor 1), as an additional independent element contributing to CSF activity in *Xenopus* eggs (Reimann et al. 2001a; Reimann and Jackson 2002). Emi1, a conserved F-box protein with a putative zinc-binding region (ZBR) has been shown to

⁴Present address: Nestlé Research Center, Vers-chez-les-Blanc, PO Box 44, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland.

⁵Corresponding author.

E-MAIL mayer@biochem.mpg.de; FAX 49-89-8578-3138.

Article and publication are at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.320705>.

bind to the APC/C activator CDC20 (Reimann et al. 2001a) thereby preventing APC/C activation.

Polo-like kinases (Plks) play a pivotal role in regulating progression through M phase in all eukaryotic cells (Barr et al. 2004). Evidence from different model organisms suggests that Plk1 activity is required for the timely activation of the APC/C at anaphase onset (Descombes and Nigg 1998; Shirayama et al. 1998; Donaldson et al. 2001). These data are supported by studies showing that Plk1, like Cdk1, can phosphorylate specific APC/C subunits in vitro (Kotani et al. 1998; Golan et al. 2002). However, it is still an open question whether the phosphorylation of APC/C by Plk1 is a prerequisite for APC/C's ubiquitin ligase activity. For example, whereas Golan et al. (2002) reported that both Cdk1 and Plk1 can stimulate APC/C ubiquitin ligase activity, recent data suggest that the phosphorylation of APC/C by Cdk1 but not by Plk1 increases the activity of APC/C in vitro (Kraft et al. 2003). Although the biological relevance of APC/C phosphorylation by Plk1 remains to be determined, experiments in *Xenopus* egg extract have clearly established a role of Plx1 in activating the APC/C in response to calcium (Descombes and Nigg 1998) and in maintaining the APC/C in its active form (Brassac et al. 2000). *Xenopus* egg extract depleted of endogenous Plx1 or supplemented with catalytically inactive Plx1^{N172A} could not activate the APC/C upon calcium addition and therefore did not enter interphase (Descombes and Nigg 1998). Although that study did not address the mechanism by which Plx1 allows the destruction of APC/C targets upon CSF release, the existence of a putative Plx1-regulated APC/C inhibitor was proposed (Descombes and Nigg 1998). Such an inhibitor would be expected to be active in CSF extract but would be inactivated by Plx1 upon fertilization.

We have identified XErp1 as a novel Plx1-interacting protein. XErp1 is a conserved F-box protein with a putative ZBR at its C terminus. XErp1 is required to maintain CSF-mediated metaphase arrest in *Xenopus* egg extract. Excess XErp1 can prevent calcium-induced CSF release in *Xenopus* egg extract. In vitro, XErp1 can directly inhibit the ubiquitin ligase activity of APC/C^{CDC20}. Plx1 phosphorylates XErp1 at a site in vitro that targets XErp1 for degradation at anaphase onset in *Xenopus* egg extract. The activity of XErp1 is required to mediate the dominant-negative effect of the Plx1 polo-box domain (PBD) on CSF release. Our data lead to a model in which Plx1-mediated degradation of XErp1 is a prerequisite for APC/C activation upon CSF release in *Xenopus* egg extract.

Results

Identification of XErp1, a novel interactor of Plx1

To identify the hypothetical Plx1-regulated APC/C inhibitor proposed by Descombes and Nigg (1998) we performed a yeast-two hybrid screen. To this end we fused full-length catalytically inactive Plx1 (Plx1^{N172A}) to the DNA-binding domain of Gal4 and used this bait to

screen a *Xenopus* oocyte cDNA library. DNA sequence analysis of the 25 interactors identified revealed that two independent clones were derived from the same gene. The full-length cDNA of these two clones encoded an F-box protein of 651 amino acids which we named XErp1, for *Xenopus* Emi1-related protein 1 (formerly referred to as Pxp17, acc. no. AAN76807). Protein sequence analyses revealed that XErp1 contains a putative ZBR at its C terminus (Fig. 1A,B).

The cDNA sequence of XErp1 is 97% identical to the cDNA sequence of Fbx26, which was previously identified as a novel *Xenopus* F-box containing protein (Regan-Reimann et al. 1999). However, unlike XErp1 the protein predicted by the *Fbx26* cDNA sequence does not contain a putative ZBR. To resolve the discrepancy between the two predicted protein sequences, we performed microsequence analyses of endogenous XErp1 protein immunopurified from *Xenopus* egg extract. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses identified several peptide sequences that match the protein sequence predicted by the *XErp1* ORF but not by the *Fbx26* ORF (Fig. 1B). Most of the discrepancies between the identified peptide sequences and the *Fbx26* ORF arise from frame shifts within the *Fbx26* cDNA sequence, suggesting that the reported *Fbx26* sequence is incorrect. In light of these data we conclude that the *XErp1* and *Fbx26* cDNAs encode identical proteins and that the XErp1 ORF reported here provides the correct sequence. The N terminus of XErp1 displays no significant sequence homology to known proteins, whereas the C terminus of XErp1 shows significant sequence similarity to Emi1 (Fig. 1A), a known APC/C inhibitor.

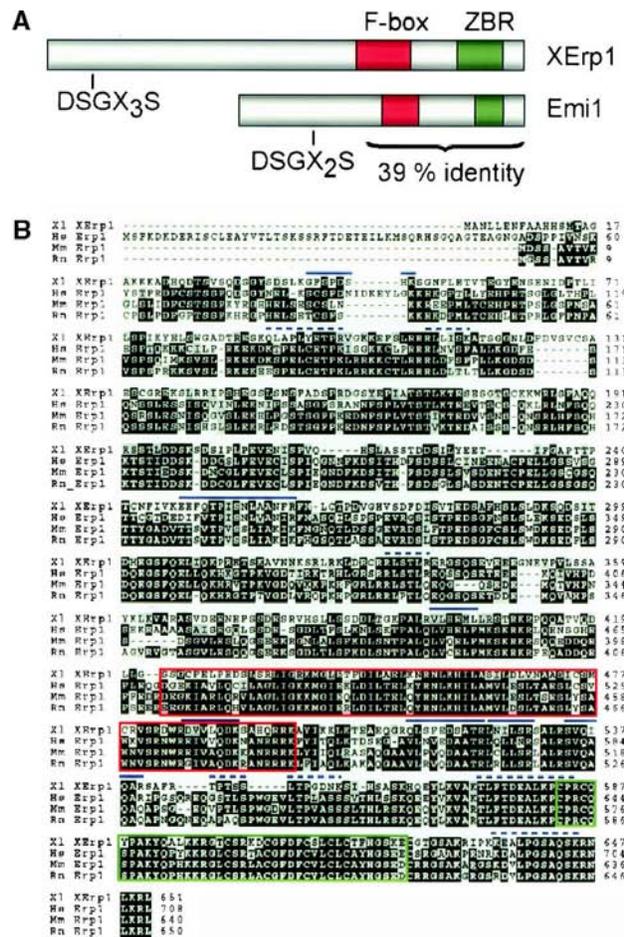
Affinity-purified antibodies raised against an N-terminal moiety of XErp1 fused to a six-histidine tag (His₆-XErp1¹⁰⁵⁻³⁷⁴) reacted with a polypeptide of an apparent molecular mass of ~90 kDa in immunoblots of extract from CSF-arrested *Xenopus* eggs (Fig. 1C, left panel). To confirm that the detected polypeptide is XErp1, we used the affinity-purified antibody to probe immunoblots of in vitro translated (IVT), ³⁵S-labeled XErp1, Emi1, and unprogrammed wheat-germ extract (WGE). As shown in the left panel of Figure 1C, the antibodies recognized IVT XErp1 but failed to detect IVT Emi1 or any protein to a substantial degree in the unprogrammed WGE. The reason for the observed difference in the electrophoretic mobility between the endogenous XErp1 present in CSF extract and IVT XErp1 will be addressed below. Autoradiographic analysis of the immunoblots confirmed that both ³⁵S-labeled IVT products, XErp1 and Emi1, were expressed at similar levels in the WGE (Fig. 1C, middle panel). Antibodies preincubated with the antigen His₆-XErp1¹⁰⁵⁻³⁷⁴ completely failed to detect XErp1 in CSF extract and IVT XErp1 (Fig. 1C, right panel). Taken together, these data demonstrate that our antibody specifically recognizes XErp1.

XErp1 is degraded upon CSF release

If XErp1 represents the postulated APC/C inhibitor, then XErp1 should be active in CSF extract and should be

inactivated upon CSF release. Immunoblot analysis showed that XErp1 is present in CSF extract but rapidly degraded upon calcium addition (Fig. 2A). Microscopic examination of the extract revealed that the chromatin decondensed upon calcium addition, confirming that the extract had entered interphase (Fig. 2A). When CSF ex-

tract was incubated with the proteasome inhibitor MG-132 before calcium addition, ³⁵S-labeled IVT XErp1 was stabilized (data not shown), suggesting that the calcium-induced degradation of endogenous XErp1 is mediated by the ubiquitin–proteasome pathway. Once the released extract had entered interphase (40–60 min), XErp1 reappeared in a higher-mobility form (Fig. 2A, left panel), suggesting that XErp1 is phosphorylated in CSF but not in interphase extract. To test this we immunopurified ³⁵S-labeled IVT XErp1 from CSF and interphase extract and treated the CSF form with phosphatase. Autoradiographic analysis revealed that phosphatase treatment converted the slower-migrating form of XErp1 into the higher-mobility form (Fig. 2B). These data indicate that the mobility difference between the interphase and M phase forms of XErp1 reflects meiosis-specific phosphorylation of XErp1. In extract treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide, XErp1 was also degraded upon CSF release, but it did not reappear (Fig. 2A, right panel). Taken together, these data indicate that XErp1 is inactivated upon CSF release by proteasomal degradation and resynthesized in interphase extract.



XErp1 accumulates during oocyte maturation

Next, we wanted to know whether XErp1 accumulates during oocyte maturation. Oocyte maturation was induced by progesterone treatment of stage VI oocytes. At the indicated time points, equal numbers of oocytes were collected from a synchronous population and processed for immunoblot analysis (Fig. 2C). Immunoblot analyses for phosphorylated MAPK (Erk1/2), which is the active form of Erk1/2, and cyclin B levels (Fig. 2C) confirmed that the progesterone treatment induced oocyte maturation in our experiment. XErp1 was found to be expressed in stage VI oocytes, and its protein level increased significantly 4 h after progesterone treatment (Fig. 2C). Interestingly, XErp1 showed a shift in electrophoretic mobility ~2.5 h after progesterone treatment, which remained until the oocytes entered meiosis II (Fig.

Figure 1. Domain structure of XErp1 and characterization of the XErp1 antibody. (A) The N terminus of XErp1 contains the putative SCF^β-TRCP recognition sequence DSGX₃S. In addition, XErp1 protein contains a putative C-terminal F-box and a zinc-binding region (ZBR). The C terminus of XErp1 shares 39% sequence identity with *Xenopus* Emi1. (B) ClustalW alignment of XErp1 protein sequences from different vertebrate species shows the evolutionary conservation of the XErp1 proteins. The amino acid sequences of XErp1 peptides that were identified by LC-MS/MS analysis of XErp1 are indicated (solid blue lines, peptide sequences in agreement with both XErp1 and Fbx26 ORF; dashed blue lines, peptide sequences in agreement only with XErp1 ORF). (C) Characterization of XErp1 antibodies. CSF extract or in vitro translated (IVT) XErp1, IVT xEmi1, or unprogrammed wheat germ extract were immunoblotted with affinity purified anti-XErp1 antibodies (left) or with affinity-purified anti-XErp1 antibodies blocked with XErp1 antigen (right). (Middle) The expression level of the ³⁵S-labeled IVT proteins was examined by autoradiographic analysis.

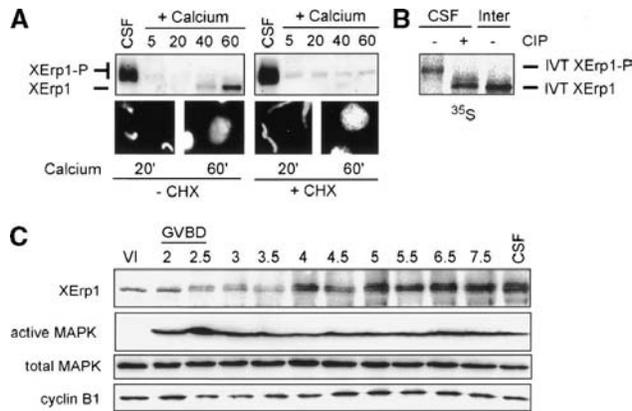


Figure 2. XErp1 accumulates during oocyte maturation and is destroyed upon CSF release. (A) CSF-arrested *Xenopus* egg extract was incubated at 20°C and treated with calcium to induce CSF release in the presence or absence of the translation inhibitor cycloheximide (CHX). At the indicated time points (minutes), samples were taken and immunoblotted for XErp1 protein. In addition, DNA morphology was observed to follow exit from CSF arrest. (B) ³⁵S-labeled IVT XErp1 was immunoprecipitated from CSF-arrested or interphase extract and treated with calf intestinal phosphatase [CIP]. (C) Analysis of XErp1 protein levels during oocyte maturation. Stage VI oocytes were isolated and the maturation process induced by addition of progesterone. Oocytes were sampled at the indicated time points (minutes) after progesterone treatment and processed for immunoblot analysis of XErp1 and markers of the maturation process.

2C). The appearance of the upshifted XErp1 form coincided with a transient decrease in the level of cyclin B (Fig. 2C), which is characteristic for exit from meiosis I. Since we have shown that the differences in electrophoretic mobility between the M-phase and interphasic forms of XErp1 are due to phosphorylation (Fig. 2B), it is likely that the observed upshift of XErp1 upon exit from meiosis I also reflects phosphorylation.

XErp1 is essential for CSF arrest

Since XErp1 is present in CSF extract, we asked whether XErp1 is required to keep APC/C inactive in CSF extract. To test this, we added anti-XErp1 antibody immobilized on protein-G beads to CSF extract. Microscopic examination of the extract revealed that the chromatin decondensed even in the absence of calcium (Fig. 3A, panel 2), indicating that extract incubated with immobilized anti-XErp1 antibodies prematurely entered interphase. In contrast, extract treated with immobilized control antibodies or anti-XErp1 antibodies preblocked with antigen maintained the CSF state, as indicated by condensed chromatin (Fig. 3A, panels 1,3). To confirm these results we next determined the cell cycle state of the differently treated extracts by measuring the activity of Cdk1. Cdk1 activity is high in CSF extract and decreases upon the degradation of cyclin B at anaphase onset. At the indicated time points, extract samples were taken and the activity of Cdk1 was analyzed using exogenous histone

H1 as substrate (Fig. 3A, right panel). Autoradiographic analysis revealed that Cdk1 activity remained high in extract treated with immobilized anti-XErp1 antibodies preblocked with antigen or control antibodies (Fig. 3A, right panel, lanes 1,3). In contrast, Cdk1 activity dropped in extract incubated with immobilized anti-XErp1 antibodies in the absence of calcium (Fig. 3A, right panel, lane 2), confirming that the addition of anti-XErp1 antibodies to CSF extract induces premature entry into interphase.

Next, we wanted to know whether the premature CSF release observed upon addition of immobilized anti-XErp1 is specific to the inactivation of XErp1. Thus, we tested whether exogenous XErp1 could rescue the phenotype caused by XErp1 inactivation. Using an antibody raised against the N terminus of XErp1, we immunode-

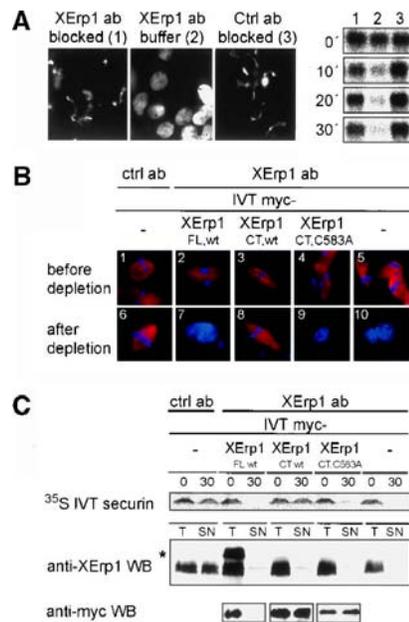


Figure 3. XErp1 is required for CSF activity. (A) On ice, CSF extracts were treated with immobilized XErp1 antibody preincubated with a 10-fold molar excess of antigen (panel 1), buffer (panel 2), or control antibody preincubated with a 10-fold molar excess of antigen (panel 3). DNA morphology was examined 65 min after warming the extracts to 20°C. Cdk1 activity was determined using an H1 kinase assay from samples withdrawn on ice (0 min) and 10, 20, and 30 min after warming the extracts to 20°C. (B) CSF extracts were incubated for 20 min at 20°C with myc-tagged IVT XErp1 proteins and subsequently incubated with XErp1- or control-antibody beads on ice. Morphology of sperm nuclei and tubulin was examined before depletion and 55 min after warming the XErp1- and mock-depleted samples to 20°C. (C) Total *Xenopus* extract (T) and the supernatant of depleted extract (SN) were immunoblotted for endogenous XErp1 (middle panel) and for myc-tagged IVT XErp1 proteins (lower panel). The asterisk (*) indicates myc-tagged IVT XErp1^{FL,wt} on the anti-XErp1 immunoblot. ³⁵S-labeled IVT securin was detected by autoradiography. Samples were withdrawn before antibody addition (0) and 30 min after warming the extracts to 20°C (30).

pleted XErp1 from CSF extract supplemented with either mock IVT or different myc-tagged IVT XErp1 proteins. Since the inactivation of XErp1 triggers the irreversible release of the extract from CSF arrest (Fig. 3A), the IVTs used for the rescue experiments had to be added to the extract before the immunodepletion of XErp1 was initiated. Immunoblot analysis confirmed that endogenous XErp1 was quantitatively removed from XErp1-depleted extracts but not from the extract treated with control antibodies (Fig. 3C, middle panel). As expected, IVT full-length XErp1 was recognized by the anti-XErp1 antibody and therefore depleted from the extract along with the endogenous protein, but the two C-terminal fragments were not removed (Fig. 3C, lower panel). Microscopic examination revealed that control-depleted extract maintained the CSF state as indicated by condensed chromatin and bipolar spindle structures (Fig. 3B, panels 1,6). Consistently, IVT securin, a substrate of the APC/C, remained stable in control-depleted extract (Fig. 3C, upper panel). As expected, XErp1-depleted extract supplemented with mock IVT could not maintain the CSF state but entered interphase prematurely, as indicated by decondensed chromatin and degraded IVT securin (Fig. 3B [panels 5,10], C [upper panel]). XErp1-depleted extract supplemented with full-length IVT XErp1 (XErp1^{FL,wt}) also could not maintain the CSF state (Fig. 3B, panels 2,7) because the exogenous IVT XErp1, like the endogenous protein, was efficiently depleted from the extract (Fig. 3C, lower panel). In contrast, in extract supplemented with IVT XErp1 C terminus (XErp1^{CT,wt}), the chromatin stayed condensed, bipolar spindle structures remained, and IVT securin was not degraded (Fig. 3B [panels 3,8], C [upper panel]), demonstrating that IVT XErp1^{CT,wt} could rescue the premature CSF release induced by depleting endogenous XErp1. However, a C-terminal fragment of XErp1 carrying a mutation in the ZBR (XErp1^{CT,C583A}) could not rescue the premature CSF release induced by depleting endogenous XErp1 (Fig. 3B [panels 4,9], C [upper panel]). Comparison of the signal intensities derived from endogenous XErp1 and IVT XErp1^{FL,wt} (marked with an asterisk in Fig. 3C, anti-XErp1 immunoblot) confirmed that the IVT product was present in the extract at a concentration similar to that of endogenous XErp1. The same applied to the different C-terminal XErp1 IVT products as judged from the anti-myc immunoblot (Fig. 3C, lower panel). Taken together these data demonstrate that XErp1 is essential to keep the APC/C inactive in CSF extract, and that XErp1 requires a functional ZBR for its inhibitory effect on APC/C activity.

Excess XErp1 can prevent APC/C activation in CSF extract

Given that the inactivation of XErp1 results in the premature activation of APC/C in *Xenopus* egg extract, we next asked whether excess XErp1 protein is sufficient to prevent CSF release. To test this we induced CSF release by adding calcium to *Xenopus* egg extract incubated with purified maltose-binding protein (MBP)-tagged

XErp1^{FL,wt}. Examination of DNA morphology revealed that the incubation of extract with 500 nM MBP-XErp1^{FL,wt} prevented chromatin decondensation for >60 min (Fig. 4A), suggesting that the calcium-induced release of CSF extract had not taken place. Consistently, immunoblot analysis revealed that CDC27, a core APC/C subunit that shows a prominent upshift upon mitotic phosphorylation (Kotani et al. 1998), remained upshifted after calcium addition (Fig. 4C, upper panel). Moreover, the radiolabeled APC/C substrates IVT N-terminal fragment of cyclin B1 (cycB^{NT}) and securin were not degraded upon calcium addition in extract supplemented with MBP-XErp1^{FL,wt} protein (Fig. 4C, middle and lower panels), indicating that the APC/C had not been activated. However, when CSF extract was supplemented with 500 nM full-length XErp1 protein carrying a mutation in its ZBR (MBP-XErp1^{FL,C583A}), the chromatin decondensed (Fig. 4A), CDC27 lost its M phase-specific upshift (Fig. 4C, upper panel), and the APC/C substrates IVT cycB^{NT} and securin were degraded (Fig. 4C, middle and lower panels). These data suggest that excess XErp1 can prevent calcium-induced APC/C activation and that XErp1 requires a functional ZBR for its inhibitory effect on CSF release. This is in line with our previous observation that IVT XErp1^{CT,wt} but not IVT XErp1^{CT,C583A} could rescue the premature CSF release induced by depletion of endogenous XErp1 (Fig. 3B,C). Notably, when we added a C-terminal fragment of XErp1 (MBP-XErp1^{CT,wt}) at concentrations as low as 100 nM, the extract did not enter interphase for >60 min after calcium addition, as judged from DNA morphology (Fig. 4B), whereas equimolar concentrations of the N terminus of XErp1 (MBP-XErp1^{NT,wt}) or of MBP-XErp1^{FL,wt} had no effect on CSF release (Fig. 4B). These data confirm that the C terminus of XErp1 is sufficient to prevent CSF release. In addition, the observation that the C terminus of XErp1 is more potent in preventing CSF release than the full-length protein indicates that the N terminus of XErp1 exerts a negative regulatory influence on the activity of XErp1.

MAPK pathway inhibition by UO126 does not prevent XErp1 action

Next, we asked whether XErp1 is dependent on the Mos/MAPK pathway. If this were the case, then the activity of the MAPK pathway should be essential for XErp1's inhibitory effect on CSF release. To test this we induced CSF release by adding calcium to *Xenopus* egg extract supplemented with MBP-XErp1^{FL,wt} in the presence of the MAPK kinase inhibitor UO126 or DMSO as a solvent control. To confirm that the MAPK pathway was inactivated upon UO126 addition, we performed immunoblot analyses for the active form of MAPK (Erk1/2). As shown in Figure 4E, active MAPK was present in *Xenopus* extract treated with DMSO but barely detectably in UO126-treated extract. Autoradiographic analyses revealed that ³⁵S-labeled IVT securin remained stable upon calcium addition in the presence of MBP-XErp1^{FL,wt} and UO126 (Fig. 4E), indicating that, under the conditions of

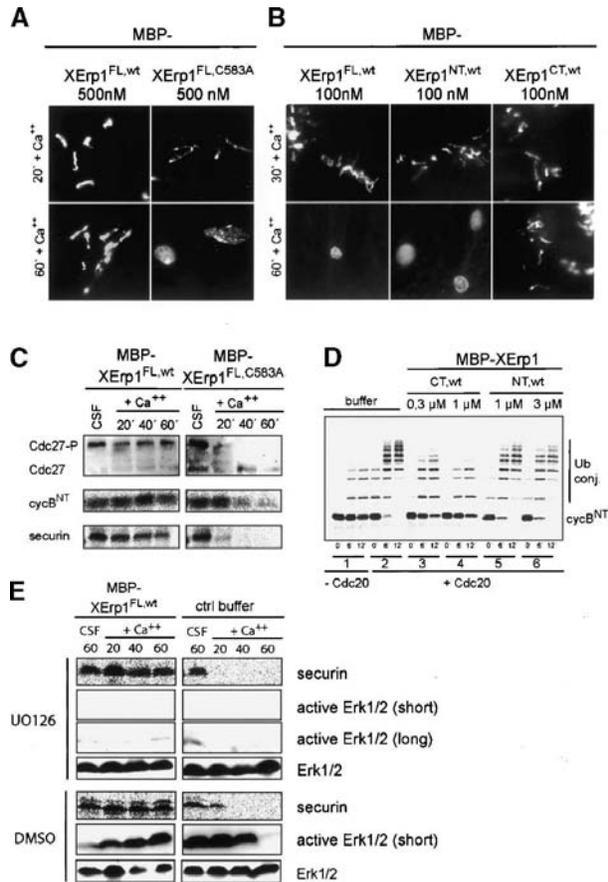


Figure 4. Excess XErp1 protein blocks calcium-dependent CSF release independently of Mos/MAPK signaling. (A) Purified MBP-tagged XErp1^{FL,wt} or XErp1^{FL,C583A} was added to *Xenopus* egg extract at 500 nM final concentration. Chromatin morphology was examined 20 and 60 min after calcium addition. (B) Purified MBP-tagged XErp1^{FL,wt}, XErp1^{NT,wt}, or XErp1^{CT,wt} were separately added to *Xenopus* egg extract at 100 nM final concentration. Chromatin morphology was examined 30 min and 60 min after calcium addition. (C) *Xenopus* extract was treated as in A, and samples were taken at the indicated time points after calcium addition and immunoblotted for CDC27. Samples of extract supplemented with ³⁵S-labeled IVT securin or N-terminal fragment of cyclin B1 (cycB^{NT}) were taken at the indicated time points before (CSF) and after calcium addition and analyzed by autoradiography. (D) His-tagged Cdc20 was incubated with buffer (group 2), MBP-XErp1^{CT,wt} (group 3, 300 nM; group 4, 1 μM), or MBP-XErp1^{NT,wt} (group 5, 1 μM; group 6, 3 μM). APC/C immunopurified from mitotic *Xenopus* extract was then mixed with buffer (group 1) or CDC20 incubated with buffer (group 2) or the indicated MBP-XErp1 fragments (groups 3–6) and assayed for its ability to ubiquitylate ³⁵S-labeled IVT cycB^{NT} at 20°C. At the indicated time points, samples were taken and analyzed by autoradiography. (E) Purified MBP-tagged XErp1^{FL,wt} or control buffer was added to CSF-arrested *Xenopus* egg extract in the presence or absence of the MAPK kinase inhibitor UO126. Inactivation of the MAPK pathway was confirmed by immunoblotting for active Erk1/2. The cell cycle state of the extract was monitored by the stability of exogenously added ³⁵S-labeled IVT securin.

the experiment, XErp1 does not depend on active MAPK for its ability to block CSF release. In extract supplemented with control buffer, ³⁵S-labeled IVT securin was more rapidly degraded upon calcium addition in the presence of UO126 than in DMSO-treated extract, suggesting that the inactivation of the MAPK pathway can accelerate exit from meiosis II. Taken together, these data suggest that the ability of XErp1 to block CSF release does not strictly depend on the Mos/MAPK pathway.

XErp1 can inhibit APC/C^{CDC20} directly

Given the sequence similarity between XErp1's C terminus and Emil (Fig. 1A), we asked whether the C terminus of XErp1, similar to Emil, could directly inhibit APC/C activity. To test this possibility we performed an in vitro ubiquitylation reaction using purified components, namely the ubiquitin-activating enzyme E1, the ubiquitin-conjugating enzyme UbcX as an E2, the APC/C activator CDC20, APC/C immunopurified from mitotic *Xenopus* egg extract, and radiolabeled IVT cycB^{NT} as a substrate. In line with previous reports (Kramer et al. 1998), autoradiographic analyses revealed that the addition of CDC20 greatly enhanced APC/C's ubiquitin ligase activity towards its substrate cycB^{NT} (Fig. 4D, groups 1,2). The addition of 300 nM MBP-XErp1^{CT,wt} strongly inhibited the APC/C^{CDC20}-mediated ubiquitylation of IVT cycB^{NT}, whereas the addition of 1 μM of MBP-XErp1^{CT,wt} almost completely abolished the CDC20-dependent ubiquitylation reaction (Fig. 4D, groups 3,4). In contrast, addition of 1 μM or 3 μM of MBP-XErp1^{NT,wt} had no significant effect on the Cdc20-dependent ubiquitylation of IVT cyclin B1 N terminus (Fig. 4D, groups 5,6). These data strongly support our model that XErp1 is an APC/C inhibitor and that the C terminus of XErp1 accounts for the inhibitory effect of XErp1 on CSF release by directly inhibiting APC/C^{CDC20}. So far, we have not been able to convincingly demonstrate a direct interaction between XErp1 and Cdc20, although such an interaction has been reported for Emil and Cdc20 (Reimann et al. 2001b; Reimann and Jackson 2002). Thus the precise mechanism of the inhibition of APC/C^{Cdc20} is presently unknown.

Plx1 phosphorylates XErp1 in vitro

Because XErp1 was initially identified as a Plx1-interacting protein, we next sought to explore the functional relationship between XErp1 and Plx1 in the regulation of CSF arrest and APC/C activity upon M-phase exit in *Xenopus* egg extract. First, we tested whether XErp1 is a substrate of Plx1 in vitro. Using MBP-fusion proteins we could show that recombinant Plx1 efficiently phosphorylates full-length XErp1 and an N-terminal fragment of XErp1 in vitro (Fig. 5A). In contrast, XErp1^{CT,wt} containing the C-terminal F-box and the ZBR was not detectably phosphorylated (Fig. 5A). The fact that Plx1 efficiently phosphorylated XErp1^{FL,wt} and XErp1^{NT,wt} but not equimolar concentrations of XErp1^{CT,wt} (Fig. 5A)

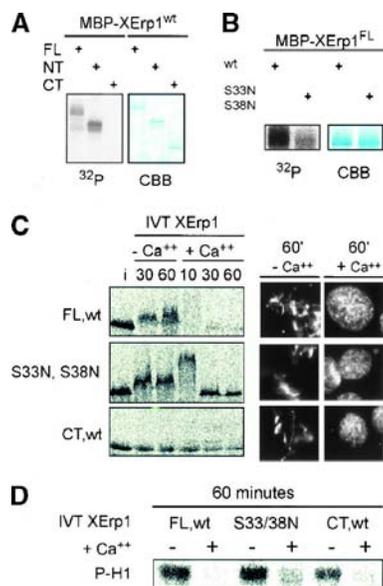


Figure 5. Plx1-dependent destabilization of XErp1 is required for CSF release. (A) MBP-tagged XErp1^{FL,wt}, XErp1^{NT,wt}, and XErp1^{CT,wt} were each incubated in an in vitro phosphorylation reaction with His-tagged Plx1. Incorporation of ³²P was analyzed by PAGE and autoradiography. (B) In vitro Plx1 kinase assay as in A using MBP-tagged wild-type XErp1^{FL,wt} or XErp1^{FL,S33N,S38N}. (C) ³⁵S-labeled IVT XErp1^{FL,wt}, XErp1^{CT,wt}, or a mutant form of XErp1 (XErp1^{FL,S33N,S38N}) were incubated in CSF extract (i, input) in the presence or absence of calcium. At the indicated time points, samples were withdrawn and analyzed by autoradiography. (D) Cdk1 activity of all samples shown in C withdrawn after 60 min was measured using an H1 kinase assay.

indicates that the conditions of the in vitro assay did not promote unspecific protein phosphorylation by Plx1. These data support our hypothesis that the activity of XErp1 is regulated by Plx1-dependent phosphorylation of XErp1's N terminus. In line with these results, we observed that Plx1 showed a yeast-two-hybrid interaction with the N terminus but not the C terminus of XErp1 (data not shown).

XErp1 is targeted for degradation via its DSGX₃S motif

The N terminus of XErp1 contains a DSGX₃S motif (Fig. 1A,B). It has been shown previously that the phosphorylation of the two serine residues of a DSGX_{2/3}S motif targets substrates for degradation by the SCF (Skp1–Cullin F-box) ubiquitin ligase complex that contains the F-box protein β-TRCP (SCF^{β-TRCP}) (Fuchs et al. 2004). We thus asked whether the degradation of XErp1 upon CSF release is mediated by its DSGX₃S motif. To test this possibility we added ³⁵S-labeled IVT XErp1 to *Xenopus* egg extract and studied the stability of IVT XErp1 upon calcium addition. For these experiments the different IVT XErp1 proteins were added to the CSF extract at a concentration low enough (one-fourth of the amount used for the add-back experiment, Fig. 3C) to assure that

the exogenous XErp1 did not block CSF release. IVT XErp1^{FL,wt}, like the endogenous protein, was stable in CSF extract but was rapidly degraded upon calcium addition (Fig. 5C). In contrast, neither an IVT C-terminal XErp1 fragment (amino acids 374–651) lacking the DSGX₃S motif nor IVT full-length XErp1 protein mutated at Ser 33 and Ser 38 of the DSGX₃S motif (XErp1^{S33N,S38N}) were degraded upon calcium addition (Fig. 5C). Examination of DNA morphology (Fig. 5C, right panel) and of Cdk1 kinase activity (Fig. 5D) confirmed that extracts incubated with the different IVT XErp1 products entered interphase upon calcium addition. Intriguingly, IVT full-length XErp1 mutated in its DSGX₃S motif showed a transient hypershift upon calcium addition (Fig. 5C, 10 min after calcium [or Ca⁺⁺] addition). This hypershift seems to be caused by phosphorylation, because the slower-migrating form observed 10 min after calcium addition remained upshifted when the extract was diluted into buffer containing the phosphatase inhibitor okadaic acid but not when the extract was diluted into buffer only (data not shown). The question of whether Plx1 contributes to this calcium-dependent hypershift will be addressed below. These data show that the DSGX₃S sequence targets XErp1 for degradation in a cell cycle-dependent manner.

Next we wanted to know whether Plx1 could contribute to the degradation of XErp1 by directly phosphorylating the serine residues of the DSGX₃S motif. We thus performed additional in vitro Plx1 kinase assays using MBP-tagged XErp1^{FL,wt} and XErp1^{S33N,S38N} as substrates. As shown in Figure 5B, the phosphorylation of XErp1^{S33N,S38N} was significantly reduced compared to the wild-type protein, indicating that serine residues 33 and/or 38 of XErp1 are major Plx1 phosphorylation sites in vitro. Again, the fact that XErp1 carrying two point mutations was a very poor Plx1 substrate compared to equimolar concentrations of the wild-type protein supports the specificity of the observed phosphorylation. Taken together, these data suggest that Plx1 phosphorylates XErp1 at its DSGX₃S motif, which then serves as a “phospho-degron” (Fuchs et al. 2004) to target XErp1 for degradation upon CSF release. These data are consistent with recent reports showing that Plx1 can phosphorylate the DSGX₂S motif of Emi1, thereby promoting its in vitro ubiquitylation (Hansen et al. 2004; Moshe et al. 2004). Thus, polo-like kinases are involved in the regulated degradation of both Emi1 and XErp1.

Dominant-negative polo-box domain of Plx1 (PBD^{wt}) stabilizes XErp1

Previously, it has been shown that the addition of kinase-dead Plx1 (Plx1^{N172A}) to *Xenopus* egg extract prevents APC/C activation and CSF release (Descombes and Nigg 1998). A plausible model for the inhibitory effect of Plx1^{N172A} on CSF release is that the APC/C inhibitor XErp1 is stabilized through sequestration by excess catalytically inactive Plx1^{N172A}. If Plx1^{N172A} sequesters potential substrates via its polo-box domain (PBD), then the addition of PBD alone should be sufficient to exert a

dominant-negative effect on CSF release. Indeed, addition of recombinant MBP-tagged wild-type polo-box domain of Plx1 (PBD^{wt}) inhibited DNA decondensation, spindle disassembly, and the degradation of IVT securin upon calcium treatment (Fig. 6A). In contrast, the addition of equimolar amounts of mutant PBD (Elia et al. 2003) (MBP-PBD^{mut}) had no effect on CSF release, as judged by the appearance of nuclei and the degradation of IVT securin upon calcium addition (Fig. 6A). In line with these results, it was recently reported that a point mutation in the PBD of kinase-dead Plx1 (Plx1^{N172A,W408F}) neutralizes the inhibitory effect of Plx1^{N172A} on APC/C activation (Liu et al. 2004).

Next, we tested whether ³⁵S-labeled IVT XErp1 is degraded upon calcium addition when CSF extract was preincubated with MBP-PBD^{wt}. As shown in Figure 6B, IVT XErp1^{FL,wt} remained stable upon calcium addition in the presence of MBP-PBD^{wt} (compare 60-min time point before and after calcium addition). Since ³⁵S-labeled IVT XErp1^{FL,wt} became at least partially upshifted in CSF extract supplemented with MBP-PBD^{wt} (Fig. 6B, cf. input [i] and the 30-min time point in the absence of calcium), it seems likely that the meiosis-specific phosphorylation of XErp1 does not completely depend on active Plx1. The identity of other kinases acting upon XErp1 is not presently known, but Cdk1 is a likely candidate. In contrast to the situation where the extract was supplemented with dominant-negative MBP-PBD, IVT XErp1^{FL,wt} was rapidly degraded after calcium addition in the buffer control (Fig. 6B). As expected, IVT XErp1^{S33N,S38N} remained stable upon calcium addition in the presence of MBP-PBD^{wt} or in the buffer control (Fig. 6B). Interestingly, the previously observed calcium-induced hypershift (see Fig.

5C) could only be observed in the buffer control, but not in extract supplemented with MBP-PBD^{wt} (Fig. 6B). This hypershift seems to be caused by phosphorylation (see above), suggesting that Plx1 activity is required—directly or indirectly—for the phosphorylation of endogenous XErp1 upon calcium addition at a site different from the DSGX₃S motif. Perhaps this additional calcium-induced phosphorylation event negatively regulates the activity of XErp1 before XErp1 is targeted for degradation by the phosphorylation of its DSGX₃S. Taken together, these data suggest that that active Plx1 is required for the degradation of XErp1 via phosphorylation of its DSGX₃S motif at anaphase onset, and that degradation of XErp1 is a prerequisite for CSF release.

XErp1 is required for the PBD^{wt}-induced block of CSF release

Thus far our data have shown that XErp1 is essential for CSF arrest and that the activity of Plx1 is required to mediate the degradation of XErp1 upon CSF release. If XErp1 is the critical downstream effector of Plx1 in regulating the APC/C, one would predict that the activity of XErp1 is crucial for the dominant-negative effect of the PBD^{wt} on CSF release. To test this we examined whether PBD^{wt} can still block CSF release under conditions where XErp1 is kept inactive by the addition of immobilized anti-XErp1 antibodies. Since the inactivation of XErp1 induces a premature calcium-independent CSF release (Fig. 3), it was important to add the antibodies to extract already incubated with PBD^{wt}. When we added immobilized anti-XErp1 antibodies to extract supplemented with MBP-PBD^{wt}, the chromatin was decon-

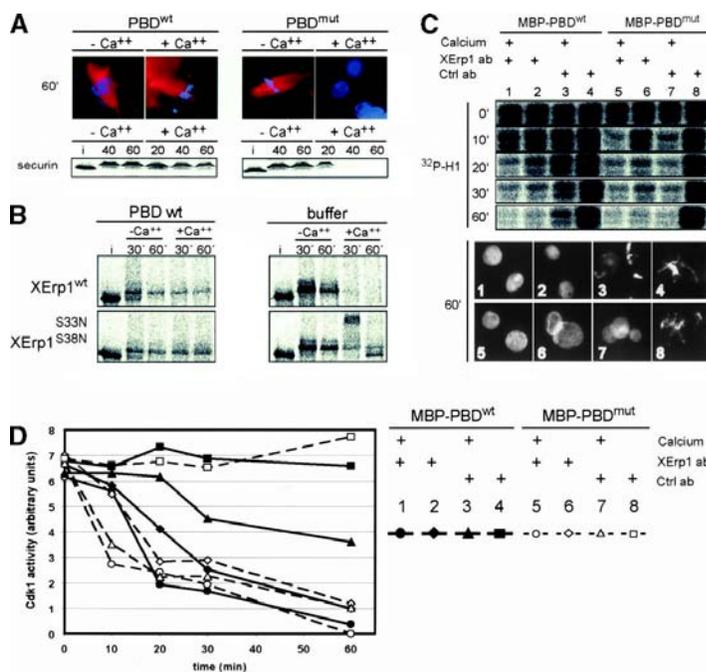


Figure 6. XErp1 is required for effects of dominant-negative PBD on CSF release (A) CSF extracts were incubated with equimolar amounts of MBP-tagged either wild-type (PBD^{wt}) or mutant PBD (PBD^{mut}) of Plx1. Morphology of DNA and tubulin was examined after extracts had been warmed to 20°C for 60 min in the presence or absence of calcium. In addition, the stability of exogenously added ³⁵S-labeled IVT securin was monitored by autoradiography. (B) ³⁵S-labeled IVT XErp1^{FL,wt} or XErp1^{FL,S33N,S38N} were incubated in CSF extract containing PBD^{wt} or control buffer. Extracts were warmed to 20°C, and samples were taken and examined by autoradiography at the indicated time points before and after addition of calcium. (C) Immobilized anti-XErp1 antibodies (lanes 1,2,5,6) or immobilized control antibodies (lanes 3,4,7,8) were added to CSF extract containing PBD^{wt} (lanes 1–4) or PBD^{mut} (lanes 5–8) in the presence (lanes 1,3,5,7) or absence (lanes 2,4,6,8) of calcium. Samples were taken at the indicated time points after calcium and/or antibody addition and assayed for Cdk1 activity. In addition, samples of the reactions (panels 1–8) were withdrawn and chromatin morphology was examined 65 min after warming the extracts to 20°C. (D) Resulting bands of the H1 kinase assay were quantified by densitometry. Band intensities were corrected for background and then plotted against time. Solid lines show reactions with PBD^{wt}; dashed lines show reactions with PBD^{mut}.

densed 60 min after calcium addition (Fig. 6C, panel 1) and Cdk1 activity rapidly dropped to interphase levels (Fig. 6C [lane 1], D). In contrast, the chromatin remained condensed when calcium was added to extract supplemented with MBP-PBD^{wt} and immobilized control antibodies (Fig. 6C, panel 3). Under these conditions Cdk1 activity decreased by only ~40%, consistent with a block in CSF release (Fig. 6C [lane 3], D). These data confirm our model that PBD^{wt} requires XErp1 to mediate its inhibitory effect on CSF release.

Xenopus egg extract incubated with MBP-PBD^{wt} and immobilized anti-XErp1 antibodies had low Cdk1 activity levels and decondensed chromatin even in the absence of calcium (Fig. 6C [lane 2], D [panel 2]), indicating that PBD^{wt} cannot prevent the premature CSF release induced by inactivation of XErp1. As expected, *Xenopus* extract supplemented with MBP-PBD^{mut} entered interphase only in the presence of calcium or upon addition of anti-XErp1 antibodies, as indicated by low Cdk1 activity and decondensed chromatin (Fig. 6C [lanes 5–7], D [panels 5–7]). Taken together these observations show that XErp1 is required for the dominant-negative effect of PBD^{wt} on CSF release and suggest that XErp1 acts downstream of Plx1. They are also consistent with our hypothesis that XErp1 is a direct substrate of Plx1, implicated in the regulation of the APC/C ubiquitin ligase.

Discussion

Multiple independent pathways contribute to CSF activity in *Xenopus* eggs (Fig. 7). Here, we characterize XErp1, a novel evolutionarily conserved protein essential for CSF arrest in *Xenopus* egg extract. Excess XErp1 can prevent calcium-induced CSF release, and the C terminus of XErp1 containing the ZBR is necessary and sufficient to prevent CSF release. Consistently, the C terminus of XErp1 inhibits the ubiquitin ligase activity of APC/C^{CDC20} directly. In addition to the ZBR, XErp1 contains an F-box at its C terminus. Yeast two-hybrid analyses revealed that the F-box of XErp1 is required for its interaction with the F-box-binding protein Skp1 (P.I. Duncan and E.A. Nigg, unpubl.), making XErp1 a bona fide F-box protein. However, the F-box does not seem to contribute to XErp1's inhibitory effect on APC/C activation, because IVT full-length XErp1 mutated in its F-box XErp1^{L450A} was equally potent as IVT XErp1^{WT} in blocking calcium-induced CSF release (A. Schmidt, N.R. Rauh, and T.U. Mayer, unpubl.). Similarly, the F-box of Emi1 also seems to be dispensable for Emi1's ability to inhibit APC/C (Reimann et al. 2001a). Therefore, the elucidation of the functional role of the F-Box of XErp1 and Emi1 will require further research.

The question arises of why Emi1 and XErp1, both of which are able to inhibit APC/C activity directly, seem to be essential to maintain the CSF arrest in *Xenopus* egg extract. Our data and previous reports have shown that extract depleted of one of these proteins cannot maintain the CSF arrest, although the remaining APC/C inhibiting protein should still be present in the extract. One could imagine that the premature CSF release observed

here is actually due to Emi1 depletion or Emi1 codepletion with XErp1. However, three independent lines of evidence argue against this idea. First, the antibody used for immunodepletion did not detect IVT Emi1 in immunoblot analyses (Fig. 1C). Second, we have observed no indication of an interaction between XErp1 and Emi1, since mass spectrometry analyses of proteins associated with endogenous XErp1 did not identify Emi1 (G. Sauer and T.U. Mayer, unpubl.). Third and most importantly, decondensation of the sperm DNA, disassembly of the spindles, and degradation of securin upon XErp1-depletion could be rescued by the addition of IVT XErp1^{CT,wt} at a concentration matching that of endogenous XErp1. These data clearly demonstrate that the observed premature APC/C activation results from the loss of XErp1 protein.

It is possible that XErp1 and Emi1 are part of parallel pathways that cooperate to regulate APC/C activity in *Xenopus* egg extract. If so, depleting one of these two proteins could lower the APC/C inhibitory activity in the extract below a critical concentration, resulting in premature APC/C activation. Similarly, the depletion of Cdk2 protein by an antisense approach abolishes CSF arrest in *Xenopus* eggs despite the presence of an active c-Mos/MAPK/p90^{Rsk} pathway, Emi1, and XErp1 (Gabrielli et al. 1993). These data suggest that the combined activities of the c-Mos/MAPK/p90^{Rsk} pathway, Cdk2/cyclin E, Emi1, and XErp1 are required to assure complete APC/C inhibition during CSF arrest. Consistently, the APC/C substrate cyclin B is completely stabilized during CSF arrest but degraded to ~50% of the metaphase level during the meiosis I-to-II transition (Tunquist and Maller 2003), a time when Cdk2/cyclin E is absent. Interestingly, XErp1 is present upon exit from meiosis I, suggesting that the β -TRCP-mediated degradation of XErp1 is not operating at this early stage of meiotic progression. However, XErp1 apparently does

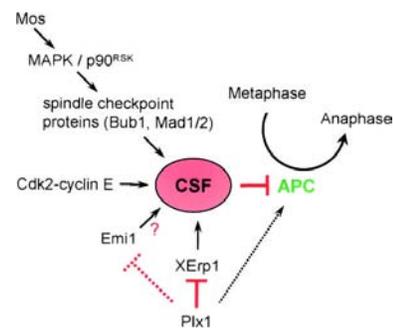


Figure 7. Model of different pathways regulating CSF activity. The c-Mos/MAPK/p90^{Rsk} pathway seems to exert its inhibitory effect on APC/C by activating components of the spindle assembly checkpoint. The underlying mechanism by which Cdk2/cyclin E inhibits APC/C activity has not been identified. XErp1 and Emi1 mediate CSF activity by inhibiting APC/C directly. XErp1 targets Emi1 for degradation, thereby allowing APC/C activation. Additionally, Plx1 might activate APC/C directly by phosphorylating specific APC/C subunits.

not block APC/C during meiosis I. Whether this is due to insufficient XErp1 levels or its functional inactivation (e.g., by the post-translational modification shown in Fig. 2C) remains to be explored.

In a recent publication, the role of Emi1 during CSF arrest in *Xenopus* egg extracts was challenged (Ohsumi et al. 2004). In particular, Kishimoto and coworkers (Ohsumi et al. 2004) reported that wild-type Emi1 is rapidly degraded during oocyte maturation and highly unstable in CSF extracts, raising the question of whether this protein could be present at sufficient levels in CSF-arrested extracts to perform its alleged role as an APC/C inhibitor (Reimann et al. 2001b; Reimann and Jackson 2002). Moreover, contradictory data exist concerning the fate of Emi1 upon calcium-induced CSF release. Whereas Emi1 was originally reported to be stable upon CSF release until the first mitotic division (Reimann et al. 2001b; Reimann and Jackson 2002), a more recent study from the same laboratory proposes that Plx1 triggers Emi1 destruction (Hansen et al. 2004), similar to the results reported here for XErp1. Clearly, further studies will be required to clarify the precise role of Emi1 during CSF arrest and release.

Irrespective of the controversy around the role of Emi1 in regulating CSF release, our present data strengthen the conclusion that the activity of Plx1 is required to activate APC/C upon CSF release (Descombes and Nigg 1998) and to maintain APC/C in its active form (Brassac et al. 2000). Since polo-like kinases can phosphorylate specific APC/C subunits in vitro, the model emerged that polo-like kinases can activate the APC/C directly. However, it is still controversial whether APC/C phosphorylation by polo-like kinases is sufficient (Kotani et al. 1998), required (Golan et al. 2002), or even dispensable for the activation of the APC/C (Kraft et al. 2003). Our present data lead to a model in which Plx1 controls APC/C activity at anaphase onset by targeting XErp1, an inhibitor of APC/C, for degradation. According to this model, the inhibition of CSF release observed upon addition of catalytically inactive Plx1^{N172A} to *Xenopus* egg extract is mediated by the sequestration of XErp1 by the polo-box domain of Plx1^{N172A}. Consistently, our data confirm that the polo-box domain of Plx1 requires XErp1 to exert its inhibitory effect on CSF release in *Xenopus* egg extract. The phosphorylation of XErp1, like that of other F-box proteins, seems to be a prerequisite for its degradation by the ubiquitin–proteasome pathway. Our data show that Plx1 can phosphorylate a DSGX₃S motif located within the N terminus of XErp1, and that the DSGX₃S motif is essential for the degradation of XErp1 upon CSF release. Previously, it has been shown for other proteins that the phosphorylation of both serine residues of a DSGX_{2/3}S motif creates a “phospho-degron” recognized by the SCF^{β-TRCP} ubiquitin ligase complex (Fuchs et al. 2004). Therefore, it appears plausible that SCF^{β-TRCP} also mediates the degradation of phosphorylated XErp1 upon CSF release.

The role of fertilization and the resulting calcium signal in controlling the functional interaction between Plx1, XErp1, Emi1, and APC/C remain to be determined

in future studies. The regulation of XErp1 function and stability is undoubtedly complex. As indicated by the several distinct electrophoretic mobilities associated with XErp1, this protein undergoes multiple post-translational modifications, including phosphorylation not only within the DSGX₃S degron, but also on other sites. The available evidence indicates that XErp1 is stable and active as an APC/C inhibitor in CSF extracts, although Plx1 can be recovered from such extracts in an active form. Thus, the Plx1-dependent inactivation of XErp1 clearly depends on a calcium signal. It is possible that calcium sensitizes XErp1 to additional phosphorylation by Plx1 (e.g., through the action of a calcium-activated kinase). Alternatively, it would seem premature to rigorously exclude that the β-TRCP system could be regulated by calcium. Regardless of these open questions, our present data clearly indicate that APC/C activation by polo-like kinase in *Xenopus* egg extract involves not only direct phosphorylation of APC/C subunits but also the derepression of APC/C by inactivation of inhibitory proteins.

Materials and methods

Yeast two-hybrid screen

A yeast two-hybrid screen was performed as described previously (Gietz and Woods 2002). Bait plasmid pGBDU/Plx1^{N172A} was transformed into yeast strain PJ69-4A and selected by uracil auxotrophy. A *Xenopus laevis* oocyte matchmaker cDNA library in pACT2 (Clontech) was subsequently transformed into yeast strain PJ69-4A carrying the bait plasmid pGBDU/Plx1^{N172A}. Transformants were selected for growth on plates lacking uracil, leucine, and adenine. pACT2 plasmids were rescued by transforming HB101 bacteria with yeast DNA preparations, followed by selection for leucine auxotrophy. Plasmid DNA from positive clones was retransformed, and the cDNA inserts of positive clones were resequenced to identify putative Plx1-interacting proteins.

Cloning and protein expression

Full-length XErp1 (XErp1^{FL-wt}) was initially subcloned from the identified two-hybrid plasmid into a modified pCS2 vector introducing restriction sites for the FseI and AscI restriction enzymes. Primers with the sequences 5'-ATTATGGCCGGC CAGAGATGCGCAAATCTCTTAGAG-3' and 5'-ATTATGGC GCGCCGAAGACTAGCTTCAAAGTCTC-3' were used to amplify the coding sequence (start and stop codons are underlined). Site-directed mutagenesis to yield the C583A mutation in the ZBR was carried out using the QuikChange kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The N-terminal and C-terminal fragments of XErp1 comprise the amino acids 1–424 and 374–651, respectively. Wild-type or mutant fragments were subcloned from plasmids containing the desired full-length XErp1 as a template following the strategy described above. The polo-box domain construct (PBD^{wt}) comprising amino acids 358–598 of Plx1 was subcloned from full-length Plx1 in a pCS2-Myc plasmid using primers 5'-ATTATGGCC GCGCCGAGTTCACG GAGCCTGC-3' and 5'-ATTATGGC GCGCCCTATGCCGAGGCCTTTAC-3'. A W408F, H532A, K534A mutation in polo box 1 (PBD^{mut}) was introduced as described previously (Liu et al. 2004). Wild-type, mutant, and frag-

ments of XErp1 protein as well as the polo-box domain of Plx1 were expressed from a modified pMal-vector (New England Biolabs) as an N-terminal MBP-fusion. The purifications were performed according to the manufacturer's instructions. Purification of his-tagged Plx1 from Sf9 cells was performed as described (Descombes and Nigg 1998).

Antibody production

6xHis-tagged N-terminal fragment of XErp1 (amino acids 105–374) was expressed from a pQE31 plasmid in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3)pLysS, purified under denaturing conditions with Ni²⁺-NTA resins as recommended by the manufacturer (QIAGEN), and subsequently gel-purified after SDS-PAGE. Purified protein was used to immunize New Zealand white rabbits (Elevage Scientifique des Dombes). Antibodies were affinity-purified following standard procedures.

CSF extracts

Xenopus CSF egg extracts were prepared essentially as described previously (Murray 1991). CSF release was induced by adding 600 μ M CaCl₂ to the extract. DNA and spindle morphology were examined as described previously (Desai et al. 1999). All experiments were carried out with freshly prepared extracts.

Mass spectrometry

Coomassie-stained protein bands were in-gel digested by trypsin, desalted, and concentrated using C18 extraction tips as reported (Shevchenko et al. 1996; Rappsilber et al. 2003). The peptide mixture was eluted from a pulled fused silica capillary with an internal diameter of 75 μ m and a tip opening of 8 μ m (New Objective) filled with ReproSil-Pur C18-AQ (Dr. Maisch, GmbH, Ammerbuch, Germany) 3-mm reverse-phase material directly into a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-ToF Ultima, Micromass) with a 60-min linear gradient of 0%–100% buffer B (80% acetonitrile, 0.5% acetic acid) from a CAPLC HPLC system (Waters) at a flow rate of ~170 nL/min. Combined peak lists were searched in the MSDB database using Mascot (<http://www.matrixscience.com>) allowing ± 0.15 Da tolerance for both peptide and MS/MS fragment ion mass values.

Immunodepletion and antibody addition

Immunodepletion experiments were performed as described (Funabiki and Murray 2000). Briefly, anti-XErp1 or rabbit IgG antibodies were immobilized on Protein G beads (Dynal) in PBS buffer containing 0.1% Triton X-100 at 4°C. Washed beads were mixed with the extract and incubated on ice with occasional mixing. Beads were retrieved on a magnet twice before the extract was warmed to 20°C for analysis of DNA and spindle morphology, and H1 kinase activity.

For antibody addition experiments, antibody was coupled to Protein G beads (Dynal) and incubated with a 10-fold molar excess of antigenic protein or buffer. Beads were washed extensively before mixing with extracts on ice. Extracts were then incubated at 20°C.

Immunoblotting

Western blots were performed according to standard procedures. Briefly, for immunodetection of XErp1, samples were wet-blotted on PVDF membrane after PAGE. The membrane was blocked extensively and then incubated with 200 ng affinity-purified XErp1 rabbit antibody. For Western blots against *Xeno-*

pus, CDC27 and the Myc epitope-tag samples were blotted semi-dry on nitrocellulose membrane. The Myc epitope was detected with 9E10 hybridoma supernatant. As secondary antibodies, horseradish-peroxidase (HRP)-coupled anti-rabbit or anti-mouse antibodies were typically used at a concentration of 1 μ g/mL. Detection was carried out with Amersham ECL reagents or Pierce SuperSignal femto substrate.

Kinase assays

For analyses of Cdk1/cyclin B activity, H1 kinase assays were performed. The assay was started by mixing 1.62 μ L *Xenopus* extract with 18.6 μ L of kinase assay mix containing 8 μ g histone H1, 14 μ M ATP, and 6.5 μ Ci γ -³²P-ATP in H1 buffer (20 mM β -glycerophosphate, 3 mM MgCl₂, 4 mM EGTA, 0.025% NP40). Reactions were carried out at room temperature and stopped by boiling samples in SDS-sample buffer. In vitro kinase assays using recombinant his-tagged Plx1 were performed as described (Descombes and Nigg 1998).

In vitro ubiquitylation assays

Yeast E1 enzyme was purchased from Boston Biochem Inc. E2 enzyme UbcX was expressed and purified from *E. coli*. Active APC/C was immunoprecipitated from “ Δ 90 extract” (Stemmann et al. 2001) using monoclonal anti-CDC27 antibodies (Sigma-Aldrich) immobilized on Protein G beads (Dynal). To obtain Δ 90 extract, CSF extract was released from CSF arrest as described above and subsequently incubated with nondestructible cyclin B Δ 90 to a final concentration of 5 μ g/mL. Assays were done as described (Kramer et al. 1998) except that 12 μ g/ μ L UbcX was used and the buffer was CSF-XB. Briefly, his-tagged Cdc20 and MBP-tagged XErp1 proteins were preincubated with the immunoprecipitated APC/C in buffer QA (10 mM Tris-HCl at pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM DTT) for 30 min. The beads were washed once in QA and twice in CSF-XB, then the reaction was started by mixing the washed beads with a mix containing E1, E2, Ubiquitin, an energy regeneration system, and radiolabeled, in vitro translated cycB^{NT}. Samples were withdrawn after 0, 6, and 12 min and boiled in sample buffer.

Acknowledgments

We thank Francis Barr, Stefan Jentsch, Edgar Kramer, Ingmar Schön, and Olaf Stemmann for generously sharing reagents and for critical reading of the manuscript. We are grateful to Thierry Lorca, Yong Wan, and Stephan Geley for reagents, and Jenny Bormann and Samantha Wattam for excellent technical assistance. Research in the lab of T.U.M. is supported by Emmy Noether grant MA 1559/4-2 from the Deutschen Forschungsgemeinschaft.

References

- Barr, F.A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 429–440.
- Brassac, T., Castro, A., Lorca, T., Le Peuch, C., Doree, M., Labbe, J.C., and Galas, S. 2000. The polo-like kinase Plx1 prevents premature inactivation of the APC(Fizzy)-dependent pathway in the early *Xenopus* cell cycle. *Oncogene* 19: 3782–3790.
- Desai, A., Murray, A., Mitchison, T.J., and Walczak, C.E. 1999. The use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle

- assembly and function in vitro. *Methods Cell Biol.* **61**: 385–412.
- Descombes, P. and Nigg, E.A. 1998. The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J.* **17**: 1328–1335.
- Donaldson, M.M., Tavares, A.A., Ohkura, H., Deak, P., and Glover, D.M. 2001. Metaphase arrest with centromere separation in polo mutants of *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **153**: 663–676.
- Dong, X., Zavitz, K.H., Thomas, B.J., Lin, M., Campbell, S., and Zipursky, S.L. 1997. Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: rca1 regulates Cyclin A. *Genes & Dev.* **11**: 94–105.
- Elia, A.E., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., and Yaffe, M.B. 2003. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115**: 83–95.
- Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S., and Kumar, K.G. 2004. The many faces of β -TrCP E3 ubiquitin ligases: Reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* **23**: 2028–2036.
- Funabiki, H. and Murray, A.W. 2000. The *Xenopus* chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell* **102**: 411–424.
- Gabrielli, B.G., Roy, L.M., and Maller, J.L. 1993. Requirement for Cdk2 in cytotostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science* **259**: 1766–1769.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**: 87–96.
- Golan, A., Yudkovsky, Y., and Hershko, A. 2002. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J. Biol. Chem.* **277**: 15552–15557.
- Hansen, D.V., Loktev, A.V., Ban, K.H., and Jackson, P.K. 2004. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCF β TrCP-dependent destruction of the APC inhibitor Emil. *Mol. Biol. Cell* **15**: 5623–5634.
- Kosako, H., Gotoh, Y., and Nishida, E. 1994. Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *J. Biol. Chem.* **269**: 28354–28358.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P., and Todokoro, K. 1998. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol. Cell* **1**: 371–380.
- Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., and Peters, J.M. 2003. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* **22**: 6598–6609.
- Kramer, E.R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M., and Peters, J.M. 1998. Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr. Biol.* **8**: 1207–1210.
- Liu, J., Lewellyn, A.L., Chen, L.G., and Maller, J.L. 2004. The polo box is required for multiple functions of plx1 in mitosis. *J. Biol. Chem.* **279**: 21367–21373.
- Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Mery, J., Means, A., and Doree, M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **366**: 270–273.
- Masui, Y. and Markert, C.L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**: 129–145.
- Moshe, Y., Boulaire, J., Pagano, M., and Hershko, A. 2004. Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 7937–7942.
- Murray, A.W. 1991. Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* **36**.
- . 2004. Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* **116**: 221–234.
- Ohsumi, K., Koyanagi, A., Yamamoto, T.M., Gotoh, T., and Kishimoto, T. 2004. Emil-mediated M-phase arrest in *Xenopus* eggs is distinct from cytotostatic factor arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 12531–12536.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. 2003. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* **75**: 663–670.
- Regan-Reimann, J.D., Duong, Q.V., and Jackson, P.K. 1999. Identification of novel F-box proteins in *Xenopus laevis*. *Curr. Biol.* **9**: R762–R763.
- Reimann, J.D. and Jackson, P.K. 2002. Emil is required for cytotostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature* **416**: 850–854.
- Reimann, J.D., Freed, E., Hsu, J.Y., Kramer, E.R., Peters, J.M., and Jackson, P.K. 2001a. Emil is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**: 645–655.
- Reimann, J.D., Gardner, B.E., Margottin-Goguet, F., and Jackson, P.K. 2001b. Emil regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes & Dev.* **15**: 3278–3285.
- Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G.F., and Ikawa, Y. 1989. The c-mos proto-oncogene product is a cytotostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* **342**: 512–518.
- Schwab, M.S., Roberts, B.T., Gross, S.D., Tunquist, B.J., Taieb, F.E., Lewellyn, A.L., and Maller, J.L. 2001. Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during *Xenopus* oocyte maturation. *Curr. Biol.* **11**: 141–150.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**: 850–858.
- Shirayama, M., Zachariae, W., Ciosk, R., and Nasmyth, K. 1998. The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 1336–1349.
- Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S.A., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. 2001. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**: 715–726.
- Sturgill, T.W., Ray, L.B., Erikson, E., and Maller, J.L. 1988. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**: 715–718.
- Tunquist, B.J. and Maller, J.L. 2003. Under arrest: Cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Dev.* **17**: 683–710.
- Tunquist, B.J., Schwab, M.S., Chen, L.G., and Maller, J.L. 2002. The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin e/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytotostatic factor. *Curr. Biol.* **12**: 1027–1033.
- Tunquist, B.J., Evers, P.A., Chen, L.G., Lewellyn, A.L., and Maller, J.L. 2003. Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytotostatic factor-mediated metaphase arrest. *J. Cell Biol.* **163**: 1231–1242.

LETTERS

Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation

Nadine R. Rauh^{1*}, Andreas Schmidt^{1*}, Jenny Bormann¹, Erich A. Nigg² & Thomas U. Mayer¹

Vertebrate eggs awaiting fertilization are arrested at metaphase of meiosis II by a biochemical activity termed cytosstatic factor (CSF)^{1,2}. This activity inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), a ubiquitin ligase that triggers anaphase onset and mitotic/meiotic exit by targeting securin and M-phase cyclins for destruction^{3,4,5}. On fertilization a transient rise in free intracellular calcium⁶ causes release from CSF arrest and thus APC/C activation. Although it has previously been shown that calcium induces the release of APC/C from CSF inhibition through calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)^{7,8}, the relevant substrates of this kinase have not been identified. Recently, we characterized XErp1 (Emi2), an inhibitor of the APC/C and key component of CSF activity in *Xenopus* egg extract⁹. Here we show that calcium-activated CaMKII triggers exit from meiosis II by sensitizing the APC/C inhibitor XErp1 for polo-like kinase 1 (Plx1)-dependent degradation. Phosphorylation of XErp1 by CaMKII leads to the recruitment of Plx1 that in turn triggers the destruction of XErp1 by phosphorylating a site known to serve as a phosphorylation-dependent degradation signal. These results provide a molecular explanation for how the fertilization-induced calcium increase triggers exit from meiosis II.

Although it is well established that CaMKII is the essential target of the calcium signal^{7,8} on fertilization, the relevant substrates of this kinase have not been identified, and the mechanism(s) leading to APC/C activation have long remained obscure. Recently, we have identified XErp1, a novel component of CSF activity that is both necessary and sufficient to keep the APC/C inactive in CSF-arrested *Xenopus* egg extracts⁹ (CSF extracts). In response to calcium, XErp1 is rapidly degraded via a Plx1-dependent mechanism, leading to CSF release and APC/C activation. We have further shown that XErp1 destruction depends on phosphorylation of two critical serine residues within a motif (DSGX₃S) known to serve as a 'phosphodegron' for the ubiquitin ligase complex Skp1-Cullin-F-box^{β-TRCP} (SCF^{β-TRCP}; ref. 10). Although the identification of XErp1 as a critical substrate of Plx1 provided an attractive explanation for the essential function of Plx1 in APC/C activation¹¹, the role of the calcium signal remained unclear. In particular, it remained to be explained why XErp1 is not targeted for degradation in CSF extracts, despite the presence of active Plx1 and SCF^{β-TRCP}. Here we have explored the hypothesis that a calcium-dependent mechanism could sensitize XErp1 for phosphorylation by Plx1.

We first asked whether XErp1 could be a substrate of CaMKII.

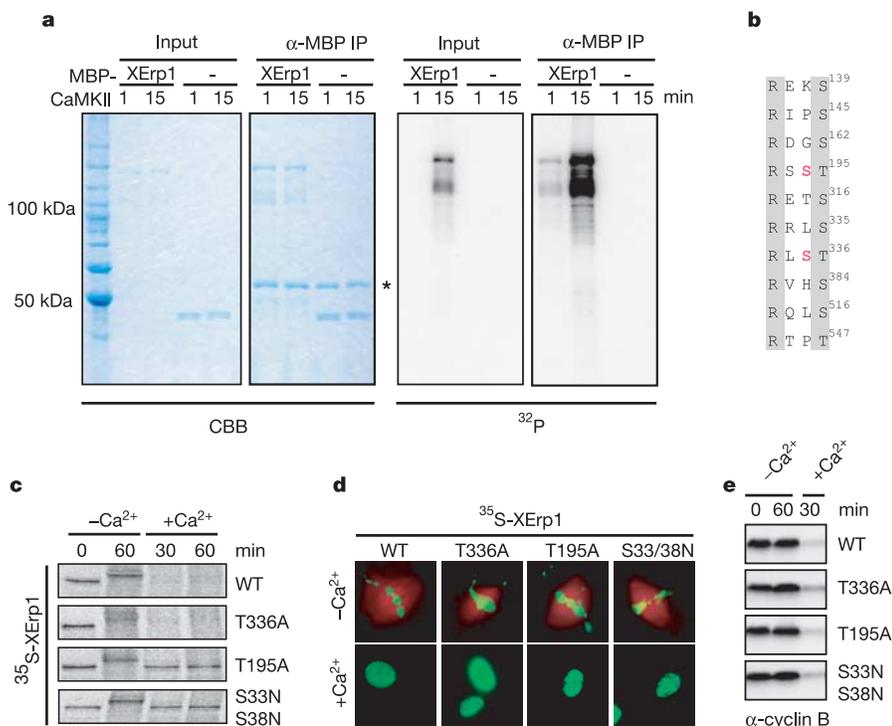


Figure 1 | XErp1 is a substrate of CaMKII in vitro.

a, MBP-tagged XErp1^{WT} or MBP alone were subjected to CaMKII phosphorylation reactions for the indicated times and immunopurified using anti-MBP antibodies (asterisk marks heavy chains). CBB indicates Coomassie Brilliant Blue. The incorporation of ³²P was analysed by autoradiography. **b**, Amino acid sequence of all putative CaMKII phosphorylation sites (RXXS/T) present in XErp1. **c–e**, Both DSGX₃S³⁸ and RXST¹⁹⁵ motifs are essential for the degradation of XErp1 on calcium-stimulation. ³⁵S-labelled IVT XErp1 proteins were incubated in CSF extract in the presence or absence of calcium. At the indicated time points samples were withdrawn for analysis by autoradiography (**c**), microscopic examination of chromatin and spindle structures (**d**) and immunoblotting for cyclin B (**e**).

¹Chemical Biology, Independent Research Group, ²Department of Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.

*These authors contributed equally to this work.

Autoradiographic analyses revealed that CaMKII efficiently phosphorylated purified maltose-binding protein (MBP)-tagged wild-type XErp1 but not MBP itself *in vitro* (Fig. 1a). Together with our previous results that XErp1 degradation depends on its prior phosphorylation by Plx1 (ref. 9), this result raised the question of how CaMKII and Plx1 cooperate in response to a calcium signal to target XErp1 for destruction. One attractive model was suggested by recent findings implicating the noncatalytic carboxy terminus of Plks, the so-called polo-box domain (PBD), in both Plk activation and the targeting of these kinases to serine- or threonine-phosphorylated substrates¹². Based on this concept it was tempting to speculate that CaMKII sensitizes XErp1 for degradation by creating a binding site for Plx1. To explore this hypothesis, we examined the XErp1 sequence for sites that could potentially serve as CaMKII-regulated PBD binding sites (RXST/S; ref. 13). Of the ten putative CaMKII phosphorylation sites (RXXS/T) (Fig. 1b) only two sites (RXST¹⁹⁵ and RXST³³⁶) match this optimal consensus. To identify the CaMKII site(s) relevant for calcium-regulated degradation of XErp1 we examined the stability of *in vitro* translated (IVT), ³⁵S-labelled XErp1 mutated at Thr 195 (XErp1^{T195A}) or Thr 336 (XErp1^{T336A}) in calcium-supplemented CSF extract. As shown previously⁹ IVT wild-type XErp1^{WT} was rapidly degraded on anaphase onset whereas XErp1 mutated at its DSGX₃S motif (XErp1^{S33N,S38N}) was not targeted for calcium-induced degradation (Fig. 1c). Notably, IVT XErp1^{T195A}, but not XErp1^{T336A}, remained stable on calcium addition (Fig. 1c), indicating that Thr 195, but not Thr 336, is essential for the cell-cycle-regulated degradation of XErp1. As shown by microscopic analyses and by immunoblotting for cyclin B, all extracts had entered interphase on calcium addition (Fig. 1d, e), confirming that the trace amounts of IVT products added did not block calcium-induced CSF release. Consistent with our previous observations⁹ higher concentrations of XErp1^{WT} and XErp1^{T195A} were capable of blocking calcium-induced CSF release (see Supplementary Fig. S1). Taken together, these data are consistent with the model that CaMKII and Plx1 cooperate to target XErp1 for degradation on a calcium stimulus and that Thr 195 and the DSGX₃S motif are both required for the cell-cycle-regulated destruction of XErp1.

Previous studies have shown that phosphopeptide binding to the Plk-PBD is favoured by a serine residue in position -1 (SpT/pS; ref. 13). The above model thus predicted that Ser 194 might contribute to sensitizing XErp1 for Plx1-dependent degradation. Indeed, ³⁵S-labelled IVT XErp1^{S194A} remained stable in calcium-supplemented CSF extract (Fig. 2a, b), similar to XErp1^{T195A} and XErp1^{S33N,S38N}. To prove that Plx1-binding to XErp1 depends on both Ser 194 and Thr 195, MBP-tagged wild-type protein and appropriate mutants were subjected to far-western experiments. Indeed, phosphorylation of XErp1^{WT} by CaMKII strongly enhanced the interaction between XErp1 and purified full-length Plx1. As expected, wild-type PBD (PBD^{WT}) but not a mutant form of PBD (PBD^{mut}) was capable of binding to phosphorylated XErp1^{WT} (Fig. 2c). In contrast, both the S194A and T195A mutants of XErp1 treated with CaMKII failed to interact significantly with full-length Plx1 or PBD^{WT} (Fig. 2c), indicating that RXST¹⁹⁵ constitutes a CaMKII-regulated Plx1 binding site. Mutation of the DSGX₃S motif did not interfere with the ability of XErp1 to bind to Plx1 or the PBD^{WT} on phosphorylation by CaMKII (Fig. 2c), in line with the expected order of events. Taken together, these data strongly suggest that CaMKII phosphorylation of XErp1 on Thr 195 creates a binding site for Plx1, consistent with the idea that CaMKII sensitizes XErp1 for Plx1-dependent degradation on anaphase onset.

An additional corollary of the proposed model is that PBD docking to XErp1 stimulates the kinase activity of Plx1 towards its substrate XErp1. To test this prediction, we used MBP-XErp1 with or without prior phosphorylation (with unlabelled ATP) by CaMKII to carry out Plx1 kinase assays in the presence of ³²P-labelled ATP. Compared to untreated XErp1^{WT}, XErp1^{WT} pre-phosphorylated by

CaMKII represented a much better *in vitro* substrate for Plx1 (Fig. 2d) consistent with enhanced Plx1 recruitment after CaMKII phosphorylation. To rule out a contribution of CaMKII to the incorporation of ³²P into XErp1, parallel phosphorylation experiments were performed in the absence of Plx1. As shown in Fig. 2d, no labelling of XErp1 with ³²P was observed under these conditions. Notably, pre-treatment of MBP-XErp1^{S194A} or -XErp1^{T195A} did not result in increased phosphorylation by Plx1 (Fig. 2d), confirming the inability of these mutants to provide a docking site for Plx1. Taken together, these data demonstrate that calcium-activated CaMKII converts XErp1 into an efficient Plx1 substrate.

We next wanted to confirm that the activity of CaMKII is essential for the degradation of XErp1 on anaphase onset. However, as the inhibition of CaMKII prevents CSF release, and thus XErp1 degradation, we analysed the stability of IVT XErp1 in extract that was arrested at anaphase by the presence of non-degradable cyclin B (refs 14, 15). These extracts, called 'Δ90 extracts' (refs 14, 15), retain

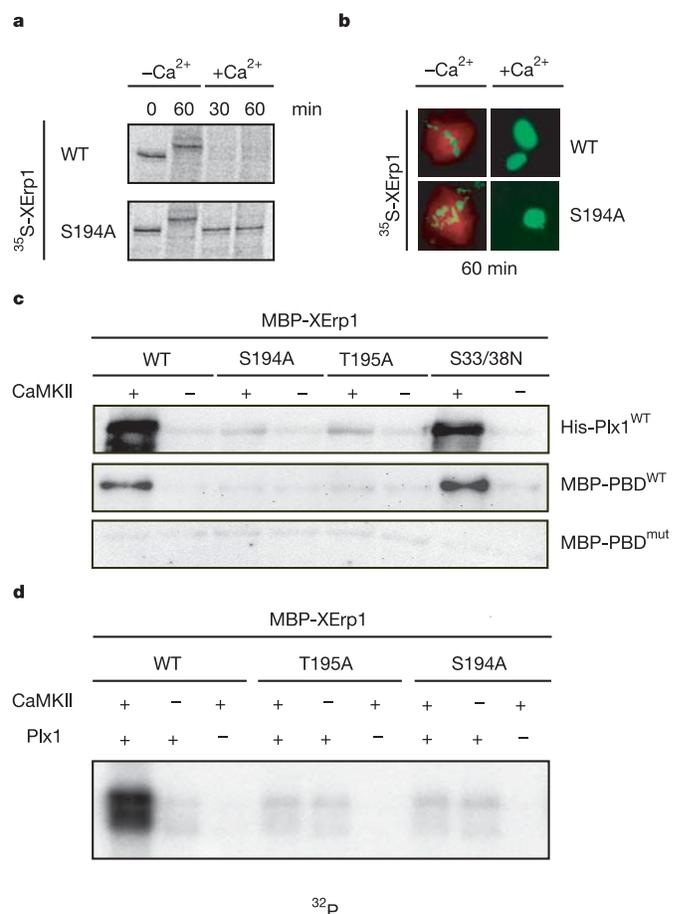


Figure 2 | CaMKII converts XErp1 into an efficient Plx1 substrate.

a, b, Ser 194 is critical for the calcium-induced degradation of XErp1. IVT ³⁵S-XErp1^{WT} or -XErp1^{S194A} was incubated in CSF extract in the presence or absence of calcium and samples were analysed by autoradiography (**a**) and microscopic examination of spindle and DNA morphology (**b**).

c, Phosphorylation of XErp1 by CaMKII strongly enhances binding of Plx1 to XErp1. The binding of His-Plx1, MBP-PBD^{WT} and MBP-PBD^{mut} to MBP-XErp1 was analysed by far-western ligand blots. MBP-XErp1 proteins were subjected to CaMKII phosphorylation reactions or mock treatments and resolved by SDS-PAGE. Bound Plx1 and PBD were detected using purified anti-Plx1 antibodies. **d**, MBP-XErp1 was subjected to *in vitro* phosphorylation reactions using recombinant Plx1. The incorporation of ³²P was analysed by autoradiography. As indicated, MBP-XErp1 was pre-incubated with activated CaMKII (or subjected to a mock kinase reaction) and unlabelled ATP. To control for incorporation of ³²P by CaMKII, parallel reactions were performed in the absence of Plx1.

CaMKII activity (see Supplementary Fig. S2) which can be modulated without affecting cell cycle progression. As expected, IVT XErp1^{WT} was rapidly degraded in $\Delta 90$ extracts (see Supplementary Fig. S2). As most available specific CaMKII inhibitors are not able to inhibit activated CaMKII but only to prevent CaMKII activation we first suppressed CaMKII activity in $\Delta 90$ extracts by the addition of EGTA (see Supplementary Fig. S2), allowing us to study the effect of a specific CaMKII inhibitor on the stability of XErp1. Consistently, in the absence of an additional calcium stimulus IVT XErp1^{WT} remained stable in EGTA-treated $\Delta 90$ extracts, whereas it was rapidly degraded on calcium addition in a Thr 195-dependent manner (Fig. 3a). Notably, the calcium-induced degradation of XErp1^{WT} could be significantly suppressed by the addition of 300 μ M CaMKII²⁸¹⁻³⁰⁹ (Fig. 3a), a peptide known to specifically inhibit the calcium-induced activation of CaMKII (ref. 16). CaMKII activity assays demonstrated that CaMKII²⁸¹⁻³⁰⁹ prevented the calcium-induced reactivation of CaMKII (Fig. 3c). The rapid degradation of IVT securin (Fig. 3a) under all conditions confirmed that the different treatments did not interfere with anaphase arrest. Furthermore, addition of a constitutively active form of CaMKII (CaMKII¹⁻²⁹⁰) induced the rapid degradation of IVT XErp1^{WT} but not of XErp1^{T195A} (Fig. 3b) confirming that CaMKII is the kinase triggering XErp1 degradation on calcium stimulus. In view of an

ongoing debate about a possible contribution of Emi1 to CSF activity¹⁷, we also used the above system to examine the fate of this XErp1-related protein. We found that CaMKII activity is not essential for the degradation of Emi1, as indicated by the fact that IVT Emi1 was efficiently degraded in EGTA-treated $\Delta 90$ extracts even without calcium addition (Fig. 3a), or when the calcium-induced activation of CaMKII was suppressed by the addition of CaMKII²⁸¹⁻³⁰⁹ (Fig. 3a). Taken together, these data suggest that XErp1, but not Emi1, is the critical target of calcium-activated CaMKII. This conclusion is in line with results showing that Emi1 is highly unstable in CSF-arrested extract^{18,19}, from which CaMKII activity is naturally absent. The observation that Emi1 stability does not seem to be regulated by CaMKII, together with results showing that Emi1 protein is unstable in CSF-arrested egg extract^{18,19}, argues against a critical contribution of Emi1 to CSF activity in *Xenopus* eggs.

The above data suggested that the lack of CaMKII activity accounts for the stability of XErp1 in CSF-arrested *Xenopus* egg extract. Consequently, we reasoned that a mutant XErp1 capable of serving as an efficient Plx1 substrate independently of CaMKII should be targeted for degradation in CSF extract even in the absence of a calcium signal. To test this idea, we converted the CaMKII site (RXST¹⁹⁵LXD) into a consensus site for cyclin dependent kinase 1 (Cdk1; RXST¹⁹⁵PXX) and examined the stability of the ³⁵S-labelled

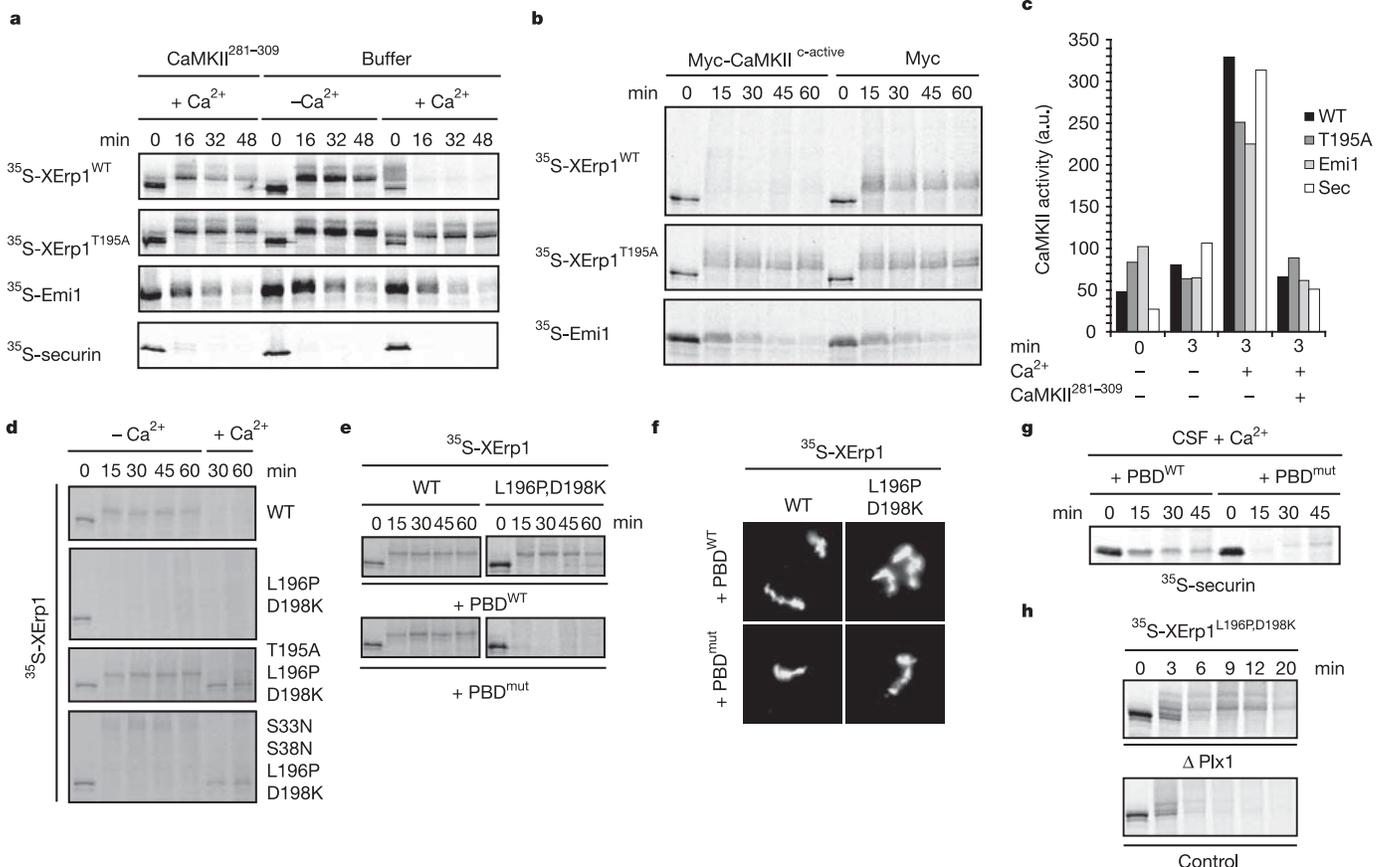


Figure 3 | CaMKII activity is essential for the degradation of XErp1 in *Xenopus* egg extract. **a**, IVT ³⁵S-XErp1^{WT}, -XErp1^{T195A}, -Emi1 or -securin was incubated in $\Delta 90$ extract supplemented with buffer, or calcium in the presence or absence of 300 μ M of the CaMKII inhibitory peptide CaMKII²⁸¹⁻³⁰⁹. Samples were analysed by autoradiography. **b**, IVT ³⁵S-XErp1^{WT}, -XErp1^{T195A} or -Emi1 was incubated in $\Delta 90$ extract supplemented with immunopurified IVT constitutively active CaMKII^{c-active} or immunopurified mock IVT and analysed as in **a**. **c**, Samples from extracts shown in **a** were analysed for CaMKII activity. **d**, Cdk1 can take on CaMKII's function in sensitizing XErp1 for Plx1-dependent degradation. IVT

³⁵S-XErp1^{WT}, -XErp1^{L196P,D198K}, -XErp1^{T195A,L196P,D198K} or -XErp1^{S33N,S38N,L196P,D198K} was incubated in CSF extract and samples were analysed by autoradiography. **e-h** Plx1 activity is required for the degradation of XErp1^{L196P,D198K} in CSF extract. **e**, **f**, Samples of CSF extracts supplemented with MBP-PBD^{WT} or MBP-PBD^{mut} were analysed (**e**) as in **d**, and assayed for DNA morphology (**f**). CSF extracts treated as in **e** were supplemented with calcium and assayed for the stability of IVT securin (**g**). Plx1-depleted (Δ Plx1) or mock depleted (control) CSF extract were treated as in **d** (**h**).

IVT product in CSF extracts. As Cdk1 is active in CSF extract and able to create docking sites for Plx1-PBDs (ref. 13), the prediction was that Cdk1-mediated phosphorylation of this mutant XErp1 would result in the docking of Plx1, the phosphorylation of the amino-terminal phospho-degron and the destruction of the protein. Indeed, whereas IVT XErp1^{WT} remained stable in CSF extract, XErp1^{L196P,D198K} was rapidly degraded even in the absence of calcium (Fig. 3d), indicating that Cdk1 or any other proline-directed kinase active in CSF extract could substitute for CaMKII and sensitize this XErp1 mutant for Plx1-dependent degradation. As predicted by our model, the degradation of these XErp1 forms in CSF extract could be prevented by mutating either critical residues within the CDK1 consensus site (XErp1^{T195A,L196P,D198K}) or the DSGX₃S³⁸ motif (XErp1^{S33N,S38N,L196P,D198K}) (Fig. 3d). To demonstrate that the activity of Plx1 was essential for the degradation of XErp1^{L196P,D198K}, we examined the stability of IVT XErp1^{L196P,D198K} in CSF extract supplemented with an excess of MBP-PBD^{WT}, which we have shown to exert a dominant-negative effect on Plx1 function⁹. As expected, the addition of MBP-PBD^{WT} resulted in a significant stabilization of IVT XErp1^{L196P,D198K} in CSF extract, as compared to a control-treated extract (Fig. 3e) but had no effect on the stability of IVT XErp1^{WT} (Fig. 3e). Analyses of the chromatin structures revealed that the extracts remained CSF-arrested under all conditions (Fig. 3f). The dominant-negative effect of MBP-PBD on Plx1 function was confirmed in parallel experiments in which we examined the stability of IVT securin on calcium addition. PBD^{WT}-supplemented CSF extract, but not PBD^{mut}-treated extract, failed to exit meiosis on calcium treatment, as indicated by stable IVT securin (Fig. 3g). Consistently, MBP-PBD^{WT} but not PBD^{mut} prevented the calcium-induced degradation of endogenous XErp1 (see Supplementary Fig. S3). Finally, a similar stabilization of IVT XErp1^{L196P,D198K} was observed in CSF extract immunodepleted of Plx1 but not in mock-depleted extract (Fig. 3h). Taken together, these data demonstrate that the creation of a Plx1-PBD docking site on XErp1, an event normally brought about by calcium-activated CaMKII, defines the timing of Plx1-dependent degradation of XErp1.

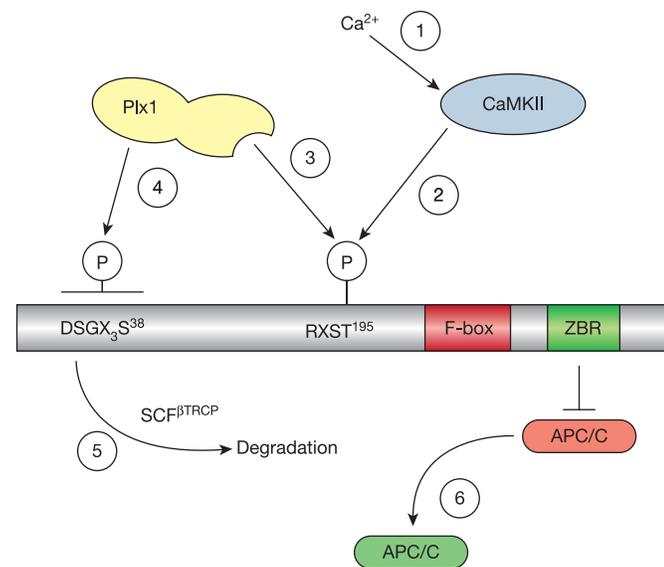


Figure 4 | Model of how calcium triggers release from CSF arrest. (1) A transient rise in free calcium activates CaMKII. (2) Activated CaMKII phosphorylates XErp1 at Thr 195, thereby creating a docking site for Plx1. (3) Plx1 binds to XErp1 via its PBD. (4) On binding to its substrate, Plx1 becomes activated and phosphorylates XErp1 at Ser 33/38 of the DSGX₃S³⁸ motif. (5) Phosphorylated DSGX₃S³⁸ is recognized by SCF^{βTRCP} leading to the destruction of XErp1. (6) XErp1 degradation leads to APC/C activation.

In conclusion, our study identifies the critical substrate of the calcium-activated CaMKII that triggers exit from meiosis II in response to fertilization. Specifically, our data demonstrate that CaMKII phosphorylates the APC/C inhibitor XErp1, thereby acting as a novel priming kinase for the recruitment of Plx1 (Fig. 4). The bound Plx1, previously shown to be essential for causing release from CSF arrest¹¹, then triggers the degradation of XErp1 by phosphorylation of a DSGX₃S degron. Our findings thus explain how a calcium signal prompts the exit from meiosis through the spatiotemporal integration of the action of two key kinases, CaMKII and Plx1, both converging onto XErp1, a critical inhibitor of APC/C.

METHODS

Plasmids, proteins and antibodies. XErp1, Emi1 and securin constructs were as described⁹. Site-directed mutagenesis was performed using the QuikChange kit (Stratagene). MBP-tagged proteins were purified following published protocols⁹. Purification of His-tagged Plx1 from SF9 cells was performed as described¹¹. *In-vitro* translation experiments using ³⁵S-labelled methionine were performed according to manufacturer's protocol (Promega). Full-length Plx1 purified from SF-9 cells was used to generate rabbit antibodies to Plx1. MBP-PBD^{WT} and MBP-PBD^{mut} (W408F, H532A and K534A) were used as described previously⁹.

In vitro kinase assays. CaMKII was purchased from New England Biolabs. *In vitro* CaMKII assays were performed at 30 °C in kinase reaction buffer containing 45 U of activated CaMKII, 0.1–1 mM ATP, 4 μCi [γ -³²P]ATP and 200 ng of purified MBP-tagged XErp1 protein. Samples were taken at the indicated time points. CaMKII activity assays were performed based on published protocols⁸ using Autocamtide-2 (New England Biolabs) as substrate. Plx1 kinase assays were performed for 5 min at 30 °C using kinase reaction buffer supplemented with 4 μCi [γ -³²P]ATP and MBP-tagged XErp1 proteins which had previously been incubated with CaMKII or buffer (control) in the presence of 1 mM ATP. **Far-western ligand blots.** Far-western ligand blots were performed in TBS supplemented with 0.1% Tween-20 and 5% wt/vol skim milk powder. For each assay 500 ng MBP-XErp1, treated with CaMKII or buffer (control), was subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to membranes. These were then incubated overnight at 4 °C with 2 μg ml⁻¹ of MBP-tagged PBD⁹ or His-Plx1. Bound protein was detected using affinity-purified rabbit antibodies to Plx1.

Xenopus extracts. *Xenopus* CSF egg extracts were prepared as described previously²⁰. CSF release was induced by adding 1 mM CaCl₂ to the extract. DNA and spindle morphology were examined as described previously²¹. CSF-released extract was arrested at anaphase by the addition of non-degradable cyclin B (Δ 90 extract) as described^{14,15}. The Δ 90 extract was treated with 300 μM EGTA and CaMKII was re-activated by the addition of 600 μM calcium. Where indicated, MBP-PBD^{WT} or MBP-PBD^{mut} was added to the extract to a final concentration of 400 μg ml⁻¹. For some experiments extract was treated with cycloheximide. The immunodepletion of Plx1 was performed as described²².

Received 19 May; accepted 5 August 2005.

Published online 28 August 2005.

1. Tunquist, B. J. & Maller, J. L. Under arrest: cytotostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* 17, 683–710 (2003).
2. Masui, Y. & Markert, C. L. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177, 129–145 (1971).
3. King, R. W. *et al.* A 20S complex containing CDC27 and CDC15 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81, 279–288 (1995).
4. Sudakin, V. *et al.* The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* 6, 185–197 (1995).
5. Salah, S. M. & Nasmyth, K. Destruction of the securin Pds1p occurs at the onset of anaphase during both meiotic divisions in yeast. *Chromosoma* 109, 27–34 (2000).
6. Busa, W. B. & Nuccitelli, R. An elevated free cytosolic Ca²⁺ wave follows fertilization in eggs of the frog, *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* 100, 1325–1329 (1985).
7. Lorca, T. *et al.* Degradation of the proto-oncogene product p39mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a Ca(2+)-calmodulin dependent event. *EMBO J.* 10, 2087–2093 (1991).
8. Lorca, T. *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 366, 270–273 (1993).
9. Schmidt, A. *et al.* *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev.* 19, 502–513 (2005).
10. Fuchs, S. Y., Spiegelman, V. S. & Kumar, K. G. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* 23, 2028–2036 (2004).

11. Descombes, P. & Nigg, E. A. The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J.* **17**, 1328–1335 (1998).
12. Elia, A. E., Cantley, L. C. & Yaffe, M. B. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* **299**, 1228–1231 (2003).
13. Elia, A. E. *et al.* The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115**, 83–95 (2003).
14. Holloway, S. L., Glotzer, M., King, R. W. & Murray, A. W. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* **73**, 13393–13402 (1993).
15. Stemann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P. & Kirschner, M. W. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**, 715–726 (2001).
16. Colbran, R. J., Fong, Y. L., Schworer, C. M. & Soderling, T. R. Regulatory interactions of the calmodulin-binding, inhibitory, and autophosphorylation domains of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* **263**, 18145–18151 (1988).
17. Zachariae, W. Emi1 and Erp1: who can stop these eggs? *Dev. Cell* **8**, 301–303 (2005).
18. Ohsumi, K., Koyanagi, A., Yamamoto, T. M., Gotoh, T. & Kishimoto, T. Emi1-mediated M-phase arrest in *Xenopus* eggs is distinct from cytostatic factor arrest. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 12531–12536 (2004).
19. Tung, J. J. *et al.* A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 4318–4323 (2005).
20. Murray, A. W. Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* **36**, 581–605 (1991).
21. Desai, A., Murray, A., Mitchison, T. J. & Walczak, C. E. The use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle assembly and function *in vitro*. *Methods Cell Biol.* **61**, 385–412 (1999).
22. Funabiki, H. & Murray, A. W. The *Xenopus* chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell* **102**, 411–424 (2000).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank O. Stemann and F. Barr for reagents and discussions during this work. We are grateful to I. Gorr and D. Boos for advice on $\Delta 90$ experiments, S. Hümmer for continuous support and R. Neef for assistance with the far-western analyses.

Author Information Reprints and permissions information is available at npg.nature.com/reprintsandpermissions. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.U.M. (mayer@biochem.mpg.de).