

**Separase:  
Regulation, Funktion und neue Substrate**

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

vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
Dominik Boos

März 2007

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

München, den 1. März 2007

Mündliche Prüfung abgelegt am: 27.2.2007

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweite Gutachterin:

PD Dr. Daniele Zink

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juni 2002 und März 2007 unter Anleitung von Dr. Olaf Stemmann in der Abteilung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

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

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

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
2.1	Der Zellzyklus	7
2.2	Die Mitose	8
2.2.1	Regulation von Cdk1	11
2.2.2	Polo Kinasen	12
2.2.3	Der mitotische Ein- und Austritt	13
2.2.3.1	Der mitotische Eintritt	13
2.2.3.2	Der Austritt aus der Mitose	14
2.2.4	Schwesterchromatiden-Kohäsion und ihre Auflösung in der Mitose	16
2.2.4.1	Schwesterchromatiden-Kohäsion	17
2.2.4.2	Auflösung der Schwesterchromatiden-Kohäsion in der Mitose	18
2.2.4.3	Separase	21
2.2.4.4	Securin-abhängige und -unabhängige Separase-Regulation	21
2.2.5	Nicht-klassische Separase-Funktionen	24
2.2.5.1	Separase-Funktionen in <i>S. cerevisiae</i>	24
2.2.5.2	Separase-Funktionen in Metazoen	25
2.3	Die Besonderheiten der Meiose	26
2.4	Der <i>Xenopus</i> -Oozytenextrakt als Modellsystem für die Aufklärung mitotischer Vorgänge	28
2.5	Zielsetzung der Arbeit	29
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
3.1	Biochemische Identifizierung neuer Separase-Substrate	31
3.1.1	Identifizierung des Proteins GASP durch „ <i>In vitro</i> Expression Cloning“	31
3.1.2	Identifikation der Separase-Spaltstellen in GASP	34
3.2	Der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex	36
3.2.1	Phosphorylierung von Separase ist notwendig aber nicht hinreichend für deren Securin-unabhängige Inhibition	36
3.2.2	Cyclin B1-Cdk1 erfüllt die Voraussetzungen eines Separaseinhibitors	37
3.2.3	Der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex in lebenden Zellen	39
3.2.3.1	Zellzyklus-abhängige Wechselwirkung endogener Separase und Cyclin B1/Cdk1	40
3.2.3.2	Securin- und Cyclin B1/Cdk1-Bindung an Separase schließen sich gegenseitig aus	42
3.2.3.3	Die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Wechselwirkung ist auch <i>in vivo</i> von Separase-Phosphorylierung abhängig	43

3.2.4	Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Cyclin B1/Cdk1-Bindemotivs in Separase	45
3.2.5	Serin 1126-unabhängige, aber CLD-abhängige Bindung von Separasefragmenten an Cyclin B1/Cdk1	48
3.2.6	Phosphorylierung der Separase-CLD	51
3.2.7	Beteiligung der CLD-Phosphorylierung an der Inhibition von Vollängen-Separase	53
3.2.8	<i>In-vivo</i> -Funktion des endogenen Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes	56
3.2.8.1	Nur ein kleiner Anteil von Cyclin B1 liegt in mitotischen Zellen im Komplex mit Separase vor	56
3.2.8.2	Funktion des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes in der Meiose	58
3.2.9	Die Rolle von Serin 1126 bei der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex-Bildung	60
3.2.9.1	Wechselwirkung von Polo-PBD mit Separase	62
3.2.9.2	Wechselwirkung von Separase/Securin und Polo	64
3.2.9.3	Interaktion zwischen PBD und freier Separase	64
3.2.9.4	Phosphorylierung der CLD durch Polo-Kinase	66
3.2.9.5	Konstitutive CLD-Phosphorylierung rettet die Cyclin B1/Cdk1-Bindefähigkeit der Separase-PM1126 nicht	67
3.2.10	Beteiligung der Separase-Polo-Interaktion an der Cohesin-Spaltung	67
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex</b>	<b>70</b>
4.1.1	Die Rolle des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes bei der Anaphase-Induktion	71
4.1.2	Die Funktion von Separase als CKI in der Meiose	72
4.1.3	Der Mechanismus der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung	76
4.1.3.1	Funktionelle Homologie zwischen Separase-CLD und Cdc6	76
4.1.3.2	Die Rolle von Serin 1126-Phosphorylierung bei der Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung	78
4.1.4	Die Bedeutung der Entdeckung der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung	80
<b>4.2</b>	<b>Identifizierung neuer Separase-Substrate durch „<i>In Vitro</i> Expression Cloning“ (IVEC)</b>	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>84</b>
<b>5.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>84</b>
5.1.1	Hard- und Software	84
5.1.2	Molekularbiologische Materialien	84
5.1.2.1	Plasmide	84
5.1.2.2	<i>E. coli</i> -Stämme	85
5.1.2.3	Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge)	85
5.1.3	Kultivierung von Säugetier-Zellen	85
5.1.3.1	Zelltypen	85
5.1.3.2	Stabile Flp-In T-REx-293-Zelllinien	85
5.1.3.3	Puffer und Medien (alphabetische Reihenfolge)	85
5.1.4	Biochemische Materialien	85

5.1.4.1	Protein-Mutanten	85
5.1.4.2	Antikörper	86
5.1.4.3	Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge)	87
<b>5.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>87</b>
5.2.1	Klonierung	87
5.2.1.1	DNA-Fragmentierung durch Restriktionsenzyme	87
5.2.1.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	88
5.2.1.3	Agarosegelelektrophorese	88
5.2.1.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	88
5.2.1.5	Ligation	88
5.2.1.6	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterienzellen	88
5.2.1.7	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	88
5.2.1.8	Plasmid-Isolationen	89
5.2.1.9	Punktmutagenese mit der Gene-Editor-Methode	89
5.2.1.10	Deletion beliebiger DNA-Bereiche	89
5.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	90
5.2.1.12	Sequenzierung von DNA	90
<b>5.3</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>90</b>
5.3.1	Allgemeine Arbeiten mit Säugetier-Zellen	90
5.3.1.1	Kultivierung von 293T- und HeLaS3-Zellen	90
5.3.1.2	Einfrieren und Auftauen von 293T- und HeLaS3-Zellen	90
5.3.1.3	Kalziumphosphat-Transfektion von 293T-Zellen mit Separase, Securin, Plk1, Cyclin B1 und Cdk1	91
5.3.2	Arbeiten mit HeLaS3- und Flp-In T-REx-293-Zellen	91
5.3.2.1	Zellzyklus-Synchronisation von HeLaS3-Zellen	91
5.3.2.2	Kultivierung und Separase-Expressionsinduktion von Flp-In T-REx-293-Zellen	92
5.3.2.3	Bestimmung der Zellzyklusphase durch Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting)	92
<b>5.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>92</b>
5.4.1	Grundlegende Methoden	92
5.4.1.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	92
5.4.1.2	Nachweis von Proteinen durch Western-Blot	92
5.4.1.3	Coomassie-Blau-Färbung	93
5.4.1.4	Detektion von radioaktiv markierten Proteinen durch Autoradiographie	93
5.4.1.5	<i>In-vitro</i> -Translation zur Herstellung <sup>35</sup> S-markierter Proteine	93
5.4.2	Reinigung spezifischer Antikörper aus Kaninchen- oder Ziegen-Blutserum	94
5.4.3	Arbeiten mit GST-Epitop-markierten Proteinen	94
5.4.3.1	Reinigung von GST-Epitop-markierten Proteinen aus <i>E. coli</i> -Bakterien.	94
5.4.3.2	Cyclin B1/Cdk1-Bindungsstudien mit GST-Separase und GST-Cdc6	94
5.4.3.3	Reinigung Lambda-PPase-behandelter GST-Separase-1063-1440/1506-Cyclin B1/Cdk1 und GST-Cdc6-Cyclin B1/Cdk1	94

5.4.3.4	Plx1-Phosphorylierungs-Studien mit GST-Separasefragmenten	95
5.4.4	Aufreinigung verschiedener Separase-Komplexe	95
5.4.4.1	Reinigung des Separase/Securin-Komplexes aus transfizierten 293T-Zellen	95
5.4.4.2	Reinigung Securin-freier Separase aus transfizierten 293T-Zellen	95
5.4.4.3	Reinigung des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes aus transfizierten 293T-Zellen	96
5.4.4.4	Reinigung des Separase/Securin/Plk1-Komplexes aus transfizierten 293T-Zellen	96
5.4.5	Separase-Aktivitäts- und Inhibitions-Tests	96
5.4.5.1	Separase-Aktivitäts- und Inhibitions-Tests nach Rückisolation aus $\Delta 90$ -Extrakt	96
5.4.5.2	Separase-Inhibitionstest in $\Delta 90$ -Extrakt	97
5.4.5.3	Separase-Inhibition durch rekombinantes Cyclin B1/Cdk1	97
5.4.5.4	Separase-Aktivitätstests in Anwesenheit von Plx1	97
5.4.6	<i>In-vitro</i> -Separase-Bindungsstudien	98
5.4.6.1	Far-Western-Analyse mit GST-PBD	98
5.4.6.2	GST-PBD-Bindungsstudien mit Securin-freier Separase	98
5.4.7	<i>Xenopus</i> -Oozytenextrakt	98
5.4.7.1	Herstellung von <i>Xenopus</i> -Oozytenextrakt	98
5.4.8	Biochemische Analyse des endogenen Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes	99
5.4.8.1	IP endogener Separase durch anti-pSX38	99
5.4.9	<i>In-Vitro</i> -Expression-Cloning (IVEC)	99
5.4.9.1	Primäre Analyse der cDNA-Bibliothek	99
5.4.9.2	Ausschluss von Gruppen mit bekannten Separase-Substraten	100
5.4.9.3	Isolierung von neuen Substraten aus positiven cDNA-Gruppen durch "Sib-Selection"	100
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>111</b>

## 1 Zusammenfassung

Die Protease Separase trägt zur Regulation mitotischer und meiotischer Vorgänge entscheidend bei. Ihre klassische Funktion ist die Induktion der Schwesterchromosomentrennung durch Spaltung des Cohesin-Proteinkomplexes, der die Schwesterchromatiden von der S-Phase bis zur Mitose gepaart hält. Separase wird am Ende der Metaphase durch Ubiquitin-abhängigen Abbau ihres Inhibitors Securin aktiviert. Ein zweiter Separase-Inhibitionsmechanismus ist die Hemmung durch Cyclin B1/Cdk1 („Cyclin Dependent Kinase 1“). Dafür ist Separase-Phosphorylierung durch Cdk1 notwendig (Stemmann et al., 2001). In vielen Modellorganismen hat Separase Funktionen, die über die Anaphase-Induktion hinausgehen. So trägt sie in *S. cerevisiae* beispielsweise zur Cdk1-Inaktivierung beim Meiose I-Meiose II-Übergang bei. Diese Separase-Funktion benötigt die proteolytische Separase-Aktivität nicht, ist jedoch abhängig vom Securin-Abbau. Für andere Funktionen der Separase hingegen könnte die Separase-abhängige Spaltung noch nicht identifizierter Substrate notwendig sein.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb die Etablierung der IVEC-Methode („*In Vitro* Expression Cloning“) zur Identifizierung neuer Separase-Substrate vorgestellt. Mittels IVEC wurde - basierend auf der proteolytischen Separase-Aktivität - aus einer menschlichen cDNA-Bibliothek das *In-vitro*-Separase-Substrat GASP isoliert.

Des Weiteren wurde die Separase-Hemmung durch Cyclin B1/Cdk1 näher untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Separase durch Cyclin B1/Cdk1 für ihre Inhibition zwar notwendig, aber nicht hinreichend ist. Nach Phosphorylierung der Separase assoziiert die Kinase stabil mit der Protease, und erst diese Komplexbildung führt letztendlich zur Inhibition der proteolytischen Separase-Aktivität. Cyclin B1/Cdk1 ist also ein nicht-katalytisch wirkender Separase-Inhibitor.

Die zeitlich korrekte Separase-Aktivierung ist für die fehlerlose Chromosomentrennung essentiell. Da Zellen ohne Securin ihre Chromosomen jedoch akkurat und zum richtigen Zeitpunkt trennen, muss es alternative Separase-Inhibitionsmechanismen geben. Die Separase-Hemmung durch Cyclin B1/Cdk1-Bindung könnte dieser gesuchte Securin-unabhängige Mechanismus sein, da der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex in Zellen bereits vor der Anaphase nachgewiesen werden kann und Cyclin B1 - wie Securin - am Ende der Metaphase Ubiquitin-vermittelt abgebaut wird. Securin und Cyclin B1/Cdk1 können nicht gleichzeitig an Separase binden. Die beiden Inhibitoren sind also Komponenten parallel und nicht konvergent wirkender Regulationsmechanismen.

## Zusammenfassung

Die Phosphorylierung von Separase an Serin 1126 ist für ihre Cyclin B1/Cdk1-abhängige Inhibition essentiell (Stemmann et al., 2001). Daneben konnte in der hier vorgestellten Arbeit eine zweite Domäne in Separase identifiziert werden, die ebenfalls sowohl für die Inhibition der proteolytischen Separase-Aktivität als auch für die Komplexbildung mit Cyclin B1/Cdk1 nötig ist. Da diese zweite Cyclin B1/Cdk1-Bindungsdomäne Sequenzhomologie zu dem Cdc6-Protein aufweist, wurde sie CLD („Cdc6 Like Domain“) genannt. Cdc6 ist ein konserviertes Protein, das in *S. cerevisiae* Cdk1-Inhibitionsaktivität besitzt. Dazu bindet es abhängig von der Phosphorylierung seines Aminoterminus direkt an B-Typ-Cycline, die sich im Komplex mit ihren Cdks befinden (Mimura et al., 2004). Durch Phosphatase-behandlung und Mutationsanalyse konnte bewiesen werden, dass die Interaktion zwischen Separase und Cyclin B1/Cdk1 auch von Phosphorylierung der Protease innerhalb ihrer CLD abhängt. Dies legt nahe, dass die Separase-CLD wie der Cdc6-Aminoterminus direkte Kontakte mit der Cyclin-Untereinheit der Kinase ausbildet. Serin 1126-Phosphorylierung ist dagegen indirekt an der Kinase-Bindung beteiligt. Denn erstens wird sie nach der Etablierung des Komplexes für seinen Erhalt nicht mehr benötigt (Holland et al., 2006), und zweitens ist sie für die Wechselwirkung zwischen CLD-enthaltenden Separasefragmenten und der Kinase abkömmlich. Ein zunächst favorisiertes Bindungsmodell, bei dem die Polo-Kinase an phosphoryliertes Serin 1126 bindet, um danach die Bindung von Cyclin B1 durch Phosphorylierung der CLD zu vermitteln, konnte ausgeschlossen werden. Stattdessen bewirkt die Phosphorylierung von Serin 1126 wohl eine Konformationsänderung der CLD, die dadurch in die Lage versetzt wird, starke Wechselwirkungen mit der Cyclin B1-Untereinheit der Kinase einzugehen.

Überraschenderweise ist im Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex auch die Kinase inaktiv. Diese unerwartete Separase-Funktion als Cdk1-Inhibitor ist in Oozyten der Maus für den Übergang von der Meiose I in die Meiose II von entscheidender Bedeutung. Denn die Inhibition der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung durch Mikroinjektion entsprechender Antikörper in Maus-Oozyten verhindert den Ausstoß des ersten Polkörpers, d.h., die Eizellen können den Meiose I-Meiose II-Übergang nicht vollziehen. In diesen Oozyten sinkt die Cdk1-Aktivität am Ende der Meiose I nicht wie bei Kontroll-Oozyten ab. Diese persistente Cdk1-Aktivität ist der Grund für den verhinderten Übergang von Meiose I nach -II, da künstliche Cdk1-Inhibition in Anwesenheit des inhibitorischen Antikörpers den Polkörperausstoß wiederherstellt. In mitotischen Zellen steigt der unter endogenen Bedingungen mit Separase assoziierte Anteil von Cyclin B1/Cdk1 in der Anaphase - d.h. nach dem Abbau seines Bindungskompetitors Securin - an. Übertragen auf die Meiose bedeutet das, dass Securin-Abbau die Induktion der Anaphase mit der Separase-abhängigen Cdk1-Inaktivierung koppelt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Der Zellzyklus

Die Verdoppelung der Zellinhalte und ihre Verteilung auf zwei sich bildende Tochterzellen wird Zellzyklus genannt. Dieser stellt sicher, dass beide Tochterzellen die gesamte genetische Information der Mutterzelle erhalten. Dazu muss die genetische Information zunächst fehlerlos verdoppelt (Replikation) und anschließend gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden (Mitose).

Bei Eukaryoten wird die Phase der DNA-Verdoppelung als S-Phase und die Phase der DNA-Aufteilung als M-Phase bezeichnet. Dazwischen liegen die so genannten G-Phasen („Gap“),  $G_1$  vor der S-Phase und  $G_2$  vor der M-Phase, in denen die Zelle wächst und überprüft, ob sie für die nächste Zellzyklus-Phase gerüstet ist. In Vielzellern verlassen die meisten Zellen den Zellzyklus. In dieser  $G_0$  genannten Phase teilen sich die Zellen nicht. Sie verrichten vielmehr ihre spezielle Aufgabe im Körper. Manche in  $G_0$  befindlichen Körperzellen können bei hormoneller Stimulation auch wieder in den Zellzyklus eintreten.

Eine Zelle im Zellzyklus muss sicherstellen, dass die einzelnen Zellzyklusphasen genau aufeinander abgestimmt sind. Sie müssen zeitlich getrennt voneinander ablaufen. Dies erfordert eine exakte Regulation. Die vorherrschenden regulatorischen Mechanismen im Zellzyklus sind Proteinphosphorylierung und -degradation (Murray, 2004). Die wichtigsten Zellzyklus-Regulatoren stellen dabei die so genannten Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks). Diese werden durch Bindung an so genannte Cycline aktiv. Cycline schwanken in ihrer Konzentration typischerweise zellzyklusabhängig und regulieren so die Aktivität der mit ihnen assoziierten Cdks (Murray, 2004). In höheren Eukaryoten findet man mehrere Cycline und Cdks, die in verschiedenen Kombinationen aktive Paare mit unterschiedlicher Substratspezifität bilden können. Durch die Phosphorylierung ihrer Substrate stellen Cyclin/Cdks sicher, dass die für ihre Phase typischen Prozesse ablaufen können, während andere Vorgänge, die nicht stattfinden dürfen, gehemmt werden.

An so genannten Kontrollpunkten („Checkpoints“) während des Zellzyklus wird überprüft, ob die Zelle alle Voraussetzungen erfüllt, um die nächste Zellzyklus-Phase durchführen zu können. Ist ein wichtiger Vorgang noch nicht abgeschlossen oder sind Fehler geschehen, so verhindert die Zelle den Eintritt in die nächste Phase. Der wichtigste Schritt dabei ist die Modulation eines oder mehrerer Cyclin/Cdk-Paare, die den Übergang in die nächste Zellzyklus-Phase vorbereiten. Können wichtige Vorgänge nicht korrekt

beendet werden oder sind irreversible Fehler geschehen, zerstören sich Zellen vielzelliger Organismen selbst (Apoptose).

Somit können zwei Regulierungsprinzipien des Zellzyklus unterschieden werden: Die zeitliche Koordination durch Cdk's und die Kontrollmechanismen an den Kontrollpunkten.

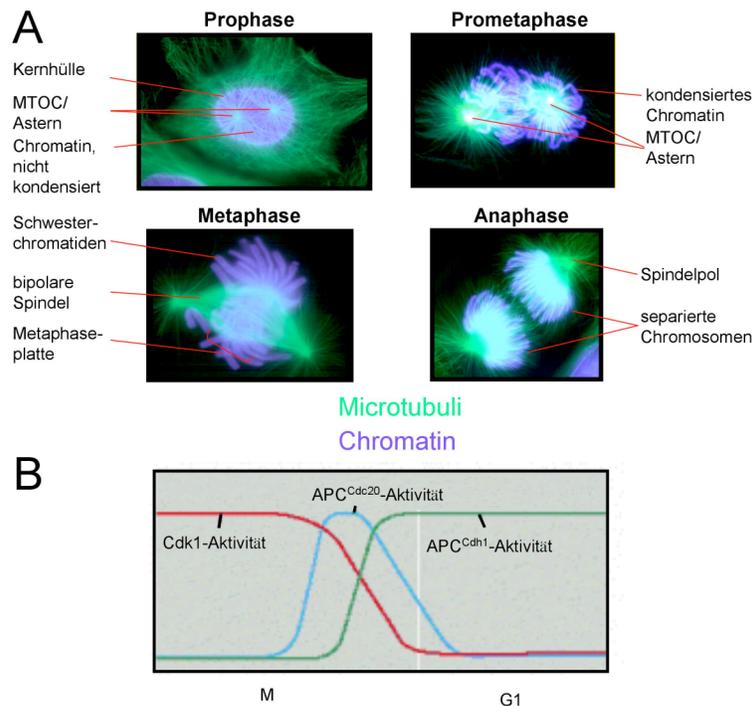
Im Folgenden werden die Vorgänge und die Regulation der Mitose genauer erklärt.

### 2.2 Die Mitose

In der Mitose wird je eine Kopie der gesamten genetischen Information auf die beiden Tochterzellen verteilt. Dies wird dadurch gewährleistet, dass die beiden Kopien jedes Chromosoms, die in der S-Phase durch Replikation entstanden sind, voneinander getrennt und zu den gegenüberliegenden Polen der Zelle transportiert werden. Die beiden Chromosomen-Kopien werden Schwesterchromatiden genannt. Sie bleiben nach der Replikation bis zu ihrer Trennung in der Mitose als Paar beieinander. Die exakte Verteilung der Chromosomen ist evolutionär für den Erhalt einer konstanten genetischen Information einer Spezies und physiologisch für die Ausübung der Zellfunktion essentiell. In vielzelligen Organismen sind Fehler bei der Weitergabe der genetischen Information eine wichtige Ursache für Krankheiten wie Krebs oder Trisomien.

Schon Walther Flemming (1843 - 1905) hat die Mitose in ihren Grundzügen mikroskopisch analysiert und beschrieben. Davon abgeleitet wird die Mitose in fünf mikroskopisch unterscheidbare Phasen eingeteilt (Lodish et al., 2003): In der **Prophase** kondensieren die Chromosomen und die so genannte mitotische Spindel wird gebildet (Abbildung 1). In der **Prometaphase** zerfällt die Kernmembran und die Chromosomen wandern in die Zellmitte, die Äquatorialebene oder Metaphasenplatte. Sind sie dort angekommen, befindet sich die Zelle in der **Metaphase**. In der nun folgenden **Anaphase** werden die Schwesterchromatiden physisch voneinander getrennt und bewegen sich zu den gegenüberliegenden Zellpolen. Danach depolymerisiert die mitotische Spindel in der **Telophase** und die Chromosomen dekontensieren, während sich die Kernmembran neu bildet. Mit der Zytokinese, der Teilung des Zytoplasmas, wird die Zellteilung abgeschlossen. Die wichtigsten Vorgänge der mitotischen Phase sollen nun noch etwas genauer erklärt werden.

Der Eintritt in die Prophase ist durch eine dramatische Umorganisation des so genannten Mikrotubuli-Zytoskeletts gekennzeichnet. Dabei wird die mitotische Spindel aufgebaut, eine bipolare Struktur aus Mikrotubuli (MT) (Lodish et al. 2003), die mit den kondensierten Chromosomen assoziiert und diese in der Anaphase trennt. MT entspringen dem MT-Organisationszentrum (MTOC), das auch Centrosom genannt wird,



**Abbildung 1: Die mitotischen Phasen und die Regulation der Cdk1-Aktivität**

(A) Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der mitotischen Phasen von Säugetierzellen. Prophase: Die MTOCs wandern zu gegenüberliegenden Zellpolen. Die Kernhülle ist noch intakt. Die Chromosomen beginnen zu kondensieren. Prometaphase: Das Chromatin ist vollständig kondensiert. Die Kernhülle ist mittlerweile aufgelöst. Die mitotische Spindel bildet sich und bindet die Kinetochoere. Metaphase: Die bipolare mitotische Spindel ist vollständig. Die Chromosomen haben die Metaphaseplatte erreicht. Anaphase: Die Schwesterchromatiden sind getrennt und wandern zu den Spindelpolen (Anaphase A). (B) Wechselspiel der Cdk1-, APC<sup>Cdc20</sup>- und APC<sup>Cdh1</sup>-Aktivitäten in der Mitose. Beim Eintritt der Zellen in die Mitose (M) ist die Cdk1-Aktivität hoch. Sind alle Chromosomen korrekt, d.h. bipolar, mit der mitotischen Spindel verbunden, wird durch Inaktivierung des SACs („Spindle Assembly Checkpoint“) der APC<sup>Cdc20</sup> aktiv und vermittelt den proteasomalen Abbau von Cyclin B1 und damit die teilweise Cdk1-Inaktivierung. Dadurch gewinnen Phosphatasen die Überhand und können Cdh1 dephosphorylieren. Dies bewirkt eine Steigerung der APC<sup>Cdh1</sup>-Aktivität im Verlauf der Anaphase, wodurch dieser den proteasomalen Abbau von Cyclin B1 und Cdc20 induzieren kann. Die APC<sup>Cdc20</sup>-Aktivität wird dadurch zeitlich begrenzt. Zusammen mit anderen Mechanismen hilft APC<sup>Cdh1</sup> die Cdk1-Aktivität so weit abzusenken, dass die Zelle die Mitose verlassen kann.

einem komplexen aus verschiedenen Proteinen aufgebauten Gebilde, dessen Kennzeichen in den meisten Organismen das so genannte Centriolenpaar darstellt. Das MTOC verdoppelt sich vor der Mitose, so dass eine mitotische Zelle zwei MTOCs besitzt, die sich in der Nähe der Kernmembran befinden (Mattison and Winey, 2006). Die MTOCs wandern in der Prophase zu den gegenüberliegenden Polen der Zelle und bilden so die Grundlage der bipolaren Organisation der mitotischen Spindel. Man unterscheidet drei von den MTOCs generierte MT-Spindel-Strukturen, die astralen MT, die polaren MT und

die Kinetochor-MT. Die astralen MT bilden eine sternförmige Struktur um die MTOCs an den Zellpolen (Astern), die zum Teil Kontakte mit dem Zellkortex ausbilden und so helfen, die Lage der Spindel zu stabilisieren. Die polaren MT verlaufen von beiden Zellpolen in die Mitte der Zelle, wo sie auf die polaren MT des gegenüberliegenden MTOCs treffen und antiparallele MT-Bündel ausbilden. Die Kinetochor-MT ziehen ebenfalls zur Zellmitte. Dort assoziieren sie mit den Chromosomen, die beim Übergang der Pro- in die Prometaphase durch den Zerfall der Kernmembran zugänglich werden und nun durch Kondensation die typische X-Form mitotischer Chromosomen besitzen. Die Anheftungsstelle der Kinetochor-MT ist das Kinetochor, das im Elektronenmikroskop als trilaminare Protein-Struktur dargestellt werden kann (Lodish et al., 2003). Die Kinetochore befinden sich an der heterochromatischen Centromer-Region der Chromosomen, die als Einschnürung der X-förmigen Metaphase-Chromosomen sichtbar werden. Da jedes mitotische Chromosom aus zwei Schwesterchromatiden besteht, besitzt es zwei Kinetochore, die sich gegenüberliegen. Im Verlauf der Prometaphase binden die Kinetochore MT (Kinetochor-MT) in einer Weise, dass jedes Kinetochor mit nur einem MTOC verbunden ist. Außerdem wird so gewährleistet, dass die beiden Kinetochore eines Chromosoms ausschließlich mit MT verbunden sind, die von gegenüberliegenden MTOCs stammen (bipolare Anheftung). Beim Übergang in die Metaphase übt die mitotische Spindel über ihre MT Kräfte auf die Chromosomen aus, so dass diese sich in der Äquatorialebene anordnen.

In der Anaphase werden die Schwesterchromatiden zu den Zellpolen transportiert. Dazu müssen sie physisch voneinander getrennt werden. Dies geschieht durch Auflösung der Protein-Verbindungen (Cohesin, Abschnitt 2.2.4.1), die die Schwesterchromatiden zusammenhalten. Die für die Chromosomenwanderung notwendigen Kräfte werden von der mitotischen Spindel in zwei voneinander unterscheidbaren Bewegungen zur Verfügung gestellt (Lodish et al., 2003): In der so genannten Anaphase A verkürzen sich die Kinetochor-MT, wodurch die Chromatiden zu den Zellpolen gezogen werden. Die Anaphase B hingegen ist durch eine Verlängerung der mitotischen Spindel gekennzeichnet, die unter anderem durch eine Gleitbewegung der antiparallelen polaren MT bewirkt wird und ebenfalls zur Chromosomentrennung beiträgt.

In der Telophase haben die Chromosomen durch eine vollendete Anaphase A die Zellpole erreicht und beginnen zu decondensieren. Die Kernmembran bildet sich erneut um die Chromosomen, und die mitotische Spindel depolymerisiert.

Die Zellteilung wird anschließend durch die Teilung des Zytoplasmas während der Zytokinese abgeschlossen. Dabei schnürt sich die Zellmembran in der Äquatorialebene

zunächst ähnlich einer Irisblende ein. Die Zellteilung wird durch Abschnürung der beiden Tochterzellen vollendet.

Mitotische Kinasen, allen voran Cdk1 und die Polo-Kinase, steuern die Vorgänge in der Mitose (Nigg, 2001). Ihre Substrate sind jedoch oftmals unbekannt. Die Wirkweise, Funktionen und wichtigsten Regulationsmechanismen dieser Kinasen werden im Folgenden genauer beschrieben.

### 2.2.1 Regulation von Cdk1

Die Mitose ist durch eine hohe Aktivität der Cdk1-Kinase gekennzeichnet. Sie assoziiert mit den mitotischen A- und B-Typ-Cyclinen und phosphoryliert Proteine bevorzugt an Serin-Prolin-Sequenzen.

In Analogie zur Cyclin A/Cdk2-Struktur, die durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde (Bourne et al., 1996), soll nun die Regulation der Cdk1-Kinase näher erklärt werden. Die Cdk1 ist maximal aktiv, wenn Folgendes zutrifft: Die Aminosäure Threonin 161 ist phosphoryliert, Threonin 14 sowie Tyrosin 15 sind nicht phosphoryliert, ein Molekül B- oder A-Typ-Cyclin ist gebunden und es ist kein Cdk-inhibitorisches Protein (CKI) mit der Kinase assoziiert. Die Aminosäuren Threonin 14 und Tyrosin 15 befinden sich in der Tertiärstruktur in der Nähe des aktiven Zentrums. Die Phosphorylierung dieser Reste interferiert mit der katalytischen Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf ein Substrat. Die Assoziation von Cyclin B1 bewirkt eine dramatische Umstrukturierung der Cdk1-Kinase. Dadurch wird unter anderem die Phosphorylierung von Threonin 161 möglich, die zusammen mit der Bindung des Cyclins die so genannte T-Schleife vom aktiven Zentrum wegbewegt, so dass dieses für das Substrat zugänglich wird und die für die Katalyse wichtigen Reste korrekt positioniert werden.

Cyclin B1/Cdk1 assoziiert noch mit einer dritten Untereinheit, dem Cks-Protein, Cks1 in der Mitose oder Cks2 in der Meiose (Bourne et al., 1996; Harper, 2001). Cks übernimmt ebenfalls eine Cdk1-regulatorische Funktion. Ohne dieses Protein kann ein *Xenopus*-Oozytenextrakt (Abschnitt 2.4) weder in die Mitose ein- noch aus dieser wieder austreten (Harper, 1997; Harper, 2001; Patra et al., 1999). Obwohl der genaue Wirkmechanismus *in vivo* nicht bekannt ist, geht man davon aus, dass die Cks-Untereinheit Cdk1-abhängige Phosphorylierung bestimmter Substrate fördert, ohne die intrinsische Kinase-Aktivität zu beeinflussen (Patra et al., 1999). Möglicherweise stimuliert Cks die Cdk1-Phosphorylierung durch Rekrutierung von Cyclin B1/Cdk1 an bereits phosphorylierte Substratproteine. Cks besitzt nämlich eine Anionenbindestelle, die fähig ist, phosphorylierte Proteine zu binden (Bourne et al., 2000).

Man unterscheidet zwei verschiedene Familien Cdk-inhibitorischer Proteine (CKIs). Die INK4-ähnlichen CKIs konkurrieren mit Cyclinen um die Bindung an die Kinase-Untereinheit und verhindern so die Cdk-Aktivierung. Die CKIs der Cip1/Kip1-Familie hingegen binden an intakte Cyclin/Cdk-Komplexe und inhibieren deren katalytische Aktivität (Harper, 1997). Dabei spielt die Wechselwirkung zwischen einem R-x-L-F-G Motiv (Ein-Buchstaben-Aminosäure-Code) der Cip1/Kip1-CKIs mit der M-R-A-I-L-Sequenz in Cyclinen eine Rolle. Während die Funktion von CKIs bei der Etablierung der G1-Phase und der Kontrolle der G1-S-Transition gut dokumentiert ist, konnten bisher keine Cdk1-CKIs identifiziert werden, die essentiell für die Mitose-Regulation sind.

### 2.2.2 Polo Kinasen

Es gibt in Säugetierzellen vier Polo-Kinasen (Plk1-4), während in *Xenopus laevis* drei (Plx1-3) und in *D. melanogaster* (Polo), *S. cerevisiae* (Cdc5) und *S. pombe* (Plo1) jeweils nur eine Polo-Kinase bekannt sind (van Vugt and Medema, 2005).

Menschliche Plk1-3 und die Polo-Kinasen anderer Organismen sind durch eine aminoternale Kinase-Domäne und zwei carboxyterminale Polo-Boxen, die zusammen die so genannte Polo-Box-Domäne (PBD) bilden, gekennzeichnet (Barr et al., 2004). Ausgehend von der Beobachtung, dass die PBD an phosphorylierte Serin-Phosphoserin/Phosphothreonin-Prolin-Sequenzen bindet, wurde folgender genereller Wirkmechanismus für Polo-Kinasen vorgeschlagen (Elia et al., 2003a; Elia et al., 2003b): Eine so genannte "Priming"-Kinase phosphoryliert eine Serin-Serin/Threonin-Prolin-Sequenz eines Proteins am zweiten Serin/Threonin-Rest. Daraufhin kann Polo über ihre PBD an diese phosphorylierte Sequenz binden. Diese Bindung, zusammen mit einer Phosphorylierung in der so genannten T-Schleife, aktivieren die Kinase-Aktivität, wodurch die Polo-Kinase jetzt in der Lage ist, das Protein, an das sie gebunden ist oder Proteine in der Nähe zu phosphorylieren. Plk1 phosphoryliert bevorzugt (E/D/Q)-x-(S/T)- $\phi$ -Sequenzen (Barr et al., 2004). Dabei steht x für eine beliebige und  $\phi$  für eine hydrophobe Aminosäure.

Dieser Mechanismus ermöglicht eine komplexe Regulierung der Polo-Kinasen. Zum einen wird ihre Aktivität zeitlich über die Aktivierung der Priming-Kinase, zum anderen räumlich über die Lokalisierung von Polo an bestimmten subzellulären Strukturen kontrolliert. Diese Art der Regulierung spielt *in vivo* eine entscheidende Rolle. Erstens zeigt Plk1 eine dynamische, komplexe zelluläre Lokalisierung an Centrosomen, Kinetochoren und Spindel (Nigg, 1998). Zweitens wurde in *Xenopus*-Oozyten bewiesen,

dass die PBD für meiotische Plx1-Funktionen (Polo-Kinasen in *Xenopus laevis*) benötigt wird (Liu et al., 2004).

Polo-Kinasen beeinflussen alle wesentlichen Vorgänge in der Mitose. So sind sie nicht nur für die Ausbildung einer bipolaren Spindel (Llamazares et al., 1991) (Lane et al., 1996; Sunkel and Glover, 1988), sondern auch für den mitotischen und meiotischen Eintritt (Abschnitt 2.2.3.1), für die Chromosomen-Segregation (Abschnitt 2.2.4.2; Abbildung 4) und für den mitotischen/meiotischen Austritt inklusive Zytokinese wichtig (Barr et al., 2004). Die mitotischen/meiotischen Funktionen in Vertebraten werden dabei vor allem durch Plk1 (Säugetiere) bzw. Plx1 (*Xenopus laevis*) übernommen (Barr et al., 2004). Es ist nicht immer der konkrete Wirkungsmechanismus, wohl aber die generelle Funktion von Polo zwischen höheren und niederen Eukaryoten konserviert. Auf die für diese Arbeit wichtigen Polo-Funktionen wird in den entsprechenden Kapiteln näher eingegangen.

### **2.2.3 Der mitotische Ein- und Austritt**

Die Cdk1-Aktivität muss steigen (Abbildung 1B), damit die Zelle in die Mitose eintreten kann. Durch Cdk1-abhängige Phosphorylierung werden mitotische Vorgänge induziert und Prozesse, die in der Mitose keinesfalls vor sich gehen dürfen, unterdrückt. Damit Phosphatasen die Gelegenheit bekommen, diese Vorgänge durch Dephosphorylierung von Cdk1-Substraten rückgängig zu machen und dadurch den Austritt der Zelle aus der Mitose zu gewährleisten, muss die Cdk1-Aktivität nach der Induktion der Chromosomentrennung wieder abnehmen (Abbildung 1B). Zu den in der Mitose unterdrückten Vorgängen gehört die Replikations-„Lizenzierung“. Dabei wird durch den Aufbau so genannter Prä-Replikationskomplexe die Grundlage für die nächste Replikation geschaffen. Die Hemmung der Replikations-„Lizenzierung“ durch aktive Cdk1s hilft, eine Überreplikation zu verhindern.

#### **2.2.3.1 Der mitotische Eintritt**

Vor der Mitose liegt Cdk1 als inaktive Kinase vor (Abschnitt 2.2.1). Das heißt, es ist kein Cyclin gebunden, Threonin 161 ist nicht phosphoryliert und Threonin 14 und Tyrosin 15 tragen wegen hoher Aktivitäten der Kinasen Wee1 und Myt1 Phosphatgruppen. Es wird angenommen, dass der Cyclin B1-Spiegel in der Zelle einen kritischen Wert überschreiten muss, damit genügend Cdk1-Aktivität für die Aktivierung einer positiven Rückkopplungsschleife zur Verfügung steht. An dieser ist die Cdc25-Phosphatase

beteiligt, die Threonin 14 und Tyrosin 15 dephosphorylieren kann. Cdc25 wird von Cyclin B1/Cdk1 phosphoryliert und dadurch aktiviert, wodurch die Rückkopplungsschleife geschlossen ist. Außerdem muss für die Aktivierung von Cyclin B1/Cdk1 die so genannte CAK-Kinase das Cdk1-Threonin 161 phosphorylieren. Man geht jedoch davon aus, dass die CAK-Aktivität nicht mit dem Zellzyklus schwankt, so dass deren Aktivität wohl keine Rolle bei der zeitlichen Regulation des mitotischen Eintritts spielt. Der genaue Mechanismus der Cdk1-Aktivierung beim Mitose-Eintritt ist von Zelltyp zu Zelltyp verschieden. Während die Akkumulation von Cyclin B1 in der frühen Embryogenese der limitierende Schritt zu sein scheint, ist das in somatischen Zellen die Dephosphorylierung von Threonin 14 und Tyrosin 15.

Polo-Kinasen spielen ebenfalls eine positive Rolle bei der Cdk1-Aktivierung, die zum Eintritt in die Mitose führt. Man geht davon aus, dass Polo am positiven Rückkopplungs-Mechanismus zwischen Cyclin B1/Cdk1 und Cdc25 teilnimmt (Abrieu et al., 1998; Qian et al., 1998). Polo-Kinasen können sowohl Cdc25 als auch Myt1 phosphorylieren. Das führt bei Cdc25 zu einer Aktivierung der Phosphatase-Aktivität, während die Kinase-Aktivität von Myt1 dadurch inhibiert wird (Liu and Maller, 2005). Zusammen fördert dies die Dephosphorylierung der inhibitorischen Cdk1-Phosphorylierungs-Stellen Threonin 14 und Tyrosin 15 und damit eine Aktivierung der Cyclin B1/Cdk1-Kinase. In Säugetierzellen scheint diese Regulation durch Plk1 nicht essentiell für den Mitose-Eintritt zu sein, da die meisten Zellen mit verminderter Plk1-Aktivität in der Prometaphase und nicht vor der Mitose arretieren (Lane et al., 1996). In anderen Systemen, wie dem Eintritt von *Xenopus*-Oozyten in die Meiose I, steht ohne Plx1-Aktivität keine genügend hohe Cyclin B1/Cdk1-Aktivität für den zeitlich korrekten Eintritt in die Meiose zur Verfügung (Qian et al., 1998). Der Beitrag von Polo-Kinasen zum mitotischen/meiotischen Eintritt variiert also mit dem Zelltyp, dem Organismus oder dem Entwicklungsstadium.

### **2.2.3.2 Der Austritt aus der Mitose**

In allen untersuchten Organismen ist die Cdk1-Inaktivierung durch den regulierten Abbau mitotischer Cycline in der Anaphase der wichtigste Mechanismus. Der Abbau von B-Typ-Cyclinen ist streng mit der erfolgreichen, d. h. bipolaren, Anheftung der Chromosomen an die mitotische Spindel und der damit verbundenen Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene gekoppelt. Denn erst danach kann gewährleistet werden, dass die Schwesterchromatiden fehlerfrei auf die beiden Tochterzellen verteilt werden können. Dieser Vorgang wird durch den so genannten "Spindle-Assembly-

Checkpoint" (SAC) überwacht (Gardner and Burke, 2000). Der Mechanismus und die Regulation des Cyclin B-Abbaus werden im Folgenden näher erläutert.

B-Typ-Cycline werden durch das Proteasom abgebaut, einem Komplex, der verschiedene Proteasen und regulatorische Proteine enthält (Glotzer et al., 1991). Das Proteasom erkennt, bindet und degradiert Proteine, die durch Anhängen einer Kette aus mehreren Ubiquitin-Einheiten (Polyubiquitinierung) für den Abbau markiert worden sind. Die Polyubiquitinierung, jedoch nicht der Abbau durch das Proteasom, ist bei der Degradation eines bestimmten Proteins der regulierte Schritt. Sie wird von einem Enzymkomplex bestehend aus den E1 (Ubiquitin-Aktivierungs-Enzym), E2 (Ubiquitin-Konjugations-Enzym) und E3 (Ubiquitin-Ligase) genannten Untereinheiten in einer sich wiederholenden Reaktion katalysiert (Peters, 2006). Das erste Ubiquitin wird an ein Lysin des abzubauenden Proteins gekoppelt. Bei jedem weiteren Reaktionszyklus wird ein einziges Ubiquitin-Molekül durch eine Isopeptid-Bindung mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des Vorgänger-Ubiquitins verknüpft. Es gibt in der Zelle nur ein E1-, wenige E2- und viele E3-Enzyme.

Im Fall der B-Typ-Cycline wird die Ubiquitinierung vom E3-Enzym APC/C („Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome“) vermittelt (Glotzer et al., 1991; Peters, 2002). Der APC/C wird am Ende der Metaphase aktiv, wenn alle Chromosomen in der Äquatorial-Ebene angeordnet sind (Abbildung 1B) (Clute and Pines, 1999). Dabei spielt das den APC/C aktivierende Protein Cdc20 eine entscheidende Rolle. Cdc20 assoziiert beim Übergang von der Meta- in die Anaphase mit dem APC/C ( $APC^{Cdc20}$ ) (Hagting et al., 2002). Es vermittelt die Übertragung von Ubiquitin in Abhängigkeit so genannter D-Box-Sequenzen im abzubauenden Protein, die für die Protein-Erkennung durch den APC/C notwendig sind. B-Typ-Cycline enthalten in ihrem N-Terminus eine D-Box und werden dementsprechend beim Metaphase-Anaphase-Übergang  $APC^{Cdc20}$ -abhängig abgebaut (Peters, 2002).

Die APC/C-Aktivierung wird durch den „Spindle Assembly Checkpoint“ (SAC) kontrolliert (Nasmyth, 2005). Der SAC ist aktiv, solange noch nicht alle Kinetochore in korrekter Weise mit Kinetochor-MT verbunden sind. Er reagiert auf Kinetochore, die nicht mit MT besetzt sind und womöglich auch auf nicht vorhandene Spannungskräfte an den Centromeren, die erst durch die mitotische Spindel nach bipolarer Anheftung an die Chromosomen entstehen. In seiner aktiven Form hält der SAC den  $APC^{Cdc20}$  über so genannte „Checkpoint“-Proteine, zu denen die Mad- und Bub-Proteine gehören, inaktiv. Dabei bildet Mad2 einen Komplex mit Cdc20 und hemmt so den  $APC^{Cdc20}$  (De Antoni et al., 2005; Peters, 2002). Erst wenn alle Chromosomen korrekt mit der mitotischen

Spindel verbunden sind, wird dieses Signal abgeschaltet und der APC<sup>Cdc20</sup> kann die Cyclin B-Degradation induzieren.

Ein weiterer APC/C-Aktivator ist das Cdh1-Protein, das wie Cdc20 die Degradation von D-Box enthaltenden Proteinen vermittelt, zusätzlich jedoch die Ubiquitinierung von Proteinen mit einer so genannten KEN-Box induzieren kann (Peters, 2002). APC<sup>Cdh1</sup> ist erst später als Cdc20 in der Mitose bis in die G1-Phase aktiv (Abbildung 1B) (Hagting et al., 2002). Er trägt zum mitotischen Austritt in *S. cerevisiae* bei, ist dafür aber nicht essentiell (Archambault et al., 2003).

Die Polo-Kinase ist durch die Phosphorylierung bestimmter APC/C-Untereinheiten an der APC/C-Aktivierung in der Mitose beteiligt (Barr et al., 2004). Dies scheint jedoch kein Mechanismus zur zeitlichen Regulation des Metaphase-Anaphase-Übergangs zu sein, sondern eine grundsätzliche mitotische Aktivierung des APC/C.

In *S. cerevisiae* spielt die Cdk1-Inaktivierung über den so genannten MEN-Signalweg („Mitotic Exit Network“) eine essentielle Rolle beim mitotischen Austritt (Jensen et al., 2004). MEN koppelt den Austritt aus der Mitose mit der korrekten Positionierung der mitotischen Spindel, indem er erst dann aktiv wird, wenn ein Spindelpol in die Anlage der Tochterzelle (Knospe) eingewandert ist. Der MEN-Signalweg induziert über die Cdc14-Phosphatase unter anderem durch die Aktivierung des CKIs Sic1 und des APC/C-Aktivators Cdh1 die Hemmung von Cdc28 (Cdk1 in *S. cerevisiae*). Dennoch sind Sic1 und Cdh1 nicht essentiell für den mitotischen Austritt. Erst die genetische Inaktivierung der drei Proteine Cdh1, Sic1 und Cdc6, ein Protein mit CKI-Aktivität, zusammen führt zu einer erheblichen Störung des Mitose-Austritts (Archambault et al., 2003). Da Cdc14 für den Austritt der Zelle aus der Mitose gebraucht wird, die Inaktivierung der Cdc14-Zielproteine Cdh1 und Sic1 aber nicht zu Wachstumsdefekten führt, muss Cdc14 noch weitere Effektorproteine für den Mitose-Austritt besitzen. Der MEN-Signalweg wird unter Abschnitt 2.2.5.1 noch etwas genauer erläutert.

Obwohl zu MEN-Komponenten homologe Proteine in Vertebraten gefunden wurden, konnte bisher jedoch kein Beweis erbracht werden, dass ein MEN-Netzwerk in höheren Eukaryoten existiert.

### **2.2.4 Schwesterchromatiden-Kohäsion und ihre Auflösung in der Mitose**

Die in der S-Phase durch Replikation entstandenen Schwesterchromatiden bleiben, vermittelt durch das so genannte Cohesin, von der S-Phase bis zur Metaphase gepaart (Schwesterchromatiden-Kohäsion) (Nasmyth et al., 2001). Diese Paarung verhindert, dass die Schwesterchromatiden in der Mitose neu identifiziert werden müssen.

Stattdessen werden sie als Einheit behandelt und durch Cohesin-Dissoziation von den Chromatiden in der Mitose voneinander gelöst. Sie können nun in der Anaphase zu den Zellpolen transportiert werden.

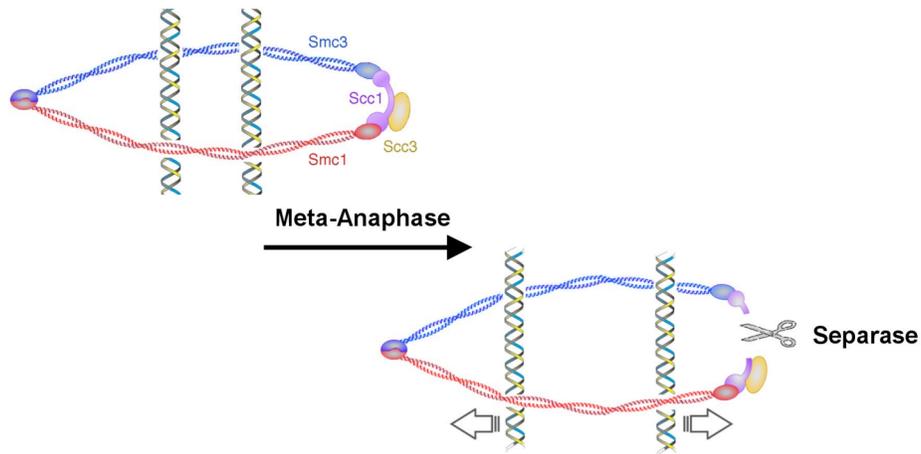
### 2.2.4.1 Schwesterchromatiden-Kohäsion

Schwesterchromatiden werden von einem Protein-Komplex mit dem Namen Cohesin zusammengehalten (Abbildung 2) (Nasmyth et al., 2001). Die Kohäsion wird während der Replikation in der S-Phase etabliert.

Cohesin ist ein Multiprotein-Komplex aus zwei Smc-Untereinheiten („Structural Maintenance of Minichromosomes“) Smc1 und -3, sowie den beiden Proteinen Scc1/Rad21 und Scc3 (Uhlmann, 2004). Es gibt zwei Versionen von Scc3, SA1 und SA2. Es kann jeweils nur eines der beiden Scc3-Proteine am Cohesin-Komplex teilhaben. Beide wurden jedoch in mitotischem Cohesin nachgewiesen. Vollständiges Cohesin hat die Struktur eines Rings, der vor allem von den beiden Smc-Untereinheiten gebildet wird. Im mittleren Bereich jedes Smc-Proteins befindet sich eine flexible Region, so dass sich das Protein zurückfalten und eine antiparallele ineinander verwundenen Struktur ausbilden kann („Coiled-Coil“), die den größten Teil des Smc-Proteins ausmacht (Haering et al., 2002). So kommen die N- und C-Termini nahe zusammen und können die Kopfregion, eine ATPase-Domäne, ausbilden. Das gegenüberliegende Ende dient zur Ausbildung einer starken Wechselwirkung zwischen Smc1 und -3. Ein Smc1/Smc3-Dimer bildet durch diese Wechselwirkung eine V-ähnliche Struktur aus. Zur Bildung einer stabilen Ringstruktur ist das Scc1-Protein notwendig, das mit den Kopf-Regionen beider Smc-Untereinheiten wechselwirkt (Abbildung 2) (Haering et al., 2002). Scc3 bindet Scc1 und hat regulatorische Funktion. Es ist noch eine eher lose mit dem Cohesin assoziierte Untereinheit bekannt, das Pds5-Protein. Es ist zwar essentiell für Kohäsion in *S. cerevisiae*, stellt aber wahrscheinlich keinen strukturellen Bestandteil des Cohesin-Komplexes dar (Uhlmann, 2004).

Die Ringstruktur hat zu einem topologischen Modell der Kohäsion geführt. Dabei schließt ein Cohesin-Ring beide Schwesterchromatiden in seiner Mitte ein und hält sie dadurch zusammen (Abbildung 2) (Gruber et al., 2003; Ivanov and Nasmyth, 2005).

Obwohl Cohesin ein entscheidender Faktor bei Kohäsion ist, wäre ein allein auf diesem Komplex beruhendes Kohäsions-Modell sicher vereinfacht. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Dekatenierung der DNA eine Voraussetzung für die Schwesterchromatiden-Trennung ist (Shamu and Murray, 1992). Im Umkehrschluss kann



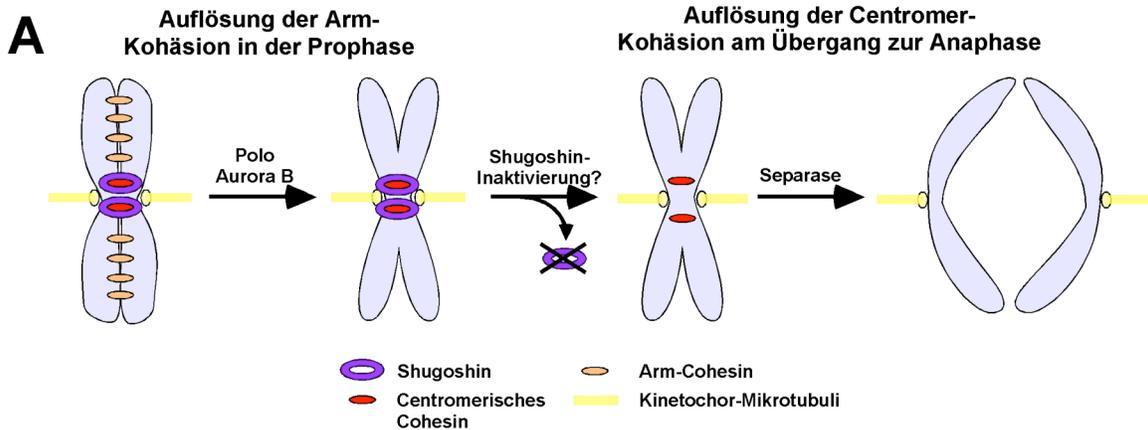
**Abbildung 2: Modell zur Schwesterchromatiden-Kohäsion und deren Auflösung.**

Smc1 und -3 bilden lange antiparallele „Coiled-Coil“-Bereiche. Ihre Kopf-Domänen, zusammengesetzte ATPasen, interagieren mit Scc1 und Scc3, während die dem Kopf gegenüberliegenden Enden miteinander wechselwirken und eine Gelenkregion ausbilden. Dadurch erhält Cohesin die Form eines Rings. Es hält die Schwesterchromatiden vermutlich dadurch zusammen, dass es die beiden Tochterstränge umschließt. Separase schneidet Scc1 beim Metaphase-Anaphase-Übergang und öffnet so den Ring, wodurch die Schwesterchromatiden voneinander gelöst werden.

man vermuten, dass eine Verwindung der DNA-Stränge der Schwesterchromatiden zur Kohäsion beiträgt.

#### 2.2.4.2 Auflösung der Schwesterchromatiden-Kohäsion in der Mitose

In *S. cerevisiae* sorgt die Protease Separase (Abschnitt 2.2.4.3) für die Auflösung der Schwesterchromatiden-Kohäsion. Die Kohäsion durch Einschluss der Schwesterchromatiden in einem Cohesin-Ring impliziert schon die Wirkungsweise der Separase. Separase-vermittelte Spaltung von Cohesin an der Scc1-Untereinheit führt zur Öffnung des Rings und damit zur Freisetzung der Schwesterchromatiden (Abbildung 2). Kim Nasmyth und Kollegen haben in mehreren Veröffentlichungen dieses Modell eindrucksvoll durch folgende Befunde erhärtet: 1) Sie haben gezeigt, dass die proteolytische Spaltung von genetisch verändertem Scc1 durch TEV-Protease ausreicht, um die Kohäsion aufzuheben (Uhlmann et al., 2000). 2) Unter endogenen Bedingungen übernimmt *S. cerevisiae*-Separase die Proteolyse der Cohesin-Untereinheit Scc1 (Uhlmann et al., 1999). 3) Separase kann Scc1 auch *in vitro* schneiden (Uhlmann et al., 1999). 4) Sowohl die Spaltung von Cohesin an der Scc1-Untereinheit an einer beliebigen Stelle des Rings als auch die Spaltung mit Cohesin assoziierter Plasmide reichen aus, um die Assoziation von Cohesin mit Chromatin aufzuheben (Gruber et al., 2003; Ivanov and



**Abbildung 3: Die Auflösung der Schwesterchromatiden-Kohäsion in der Mitose.**

Die Schwesterchromatiden werden durch Cohesin zusammengehalten. Es dissoziiert in der Mitose höherer Eukaryoten vom Chromatin in zwei Phasen: Die erste Phase geschieht in der Prophase und entfernt das Cohesin, vermittelt durch die mitotischen Kinasen Polo und Aurora B, von den Chromosomen-Armen (Prophase-Signalweg). Dies führt noch nicht zur Trennung der Schwesterchromatiden, da das centromerische Cohesin durch die Wirkung des Shugoshin-Proteins vor dem Prophase-Signalweg geschützt wird. Die Chromosomen-Trennung und damit die Anaphase werden erst durch Separase-vermittelte Spaltung des centromerischen Cohesins induziert. Es ist bisher nicht bekannt, ob Shugoshin inaktiviert werden muss, bevor Separase das Cohesin am Centromer spalten kann.

Nasmyth, 2005). Dies ist vereinbar mit einem Modell, bei dem Cohesin-beladene Plasmide und Cohesin wie die Ringe einer Kette ineinander verschränkt sind und die Öffnung eines Kettenglieds zum Auflösen der Struktur führt.

Dieses Modell zur Separase-abhängigen Cohesin-Spaltung trifft höchstwahrscheinlich im Wesentlichen auch auf Säugetierzellen zu: Die Expression nicht durch Separase spaltbaren Scc1 verursacht eine unvollständige Chromosomentrennung in HeLa-Zellen verbunden mit einer Akkumulation von Zellen mit einem Chromatingehalt von 4C ( $G_2/M$ -Zellen) (Hauf et al., 2001; Waizenegger et al., 2000).

Das Entfernen von Cohesin von den Chromosomen verläuft in Säugetieren im Unterschied zu *S. cerevisiae* jedoch in zwei Phasen (Abbildung 3): Die erste ist die Separase-unabhängige Entfernung von Cohesin von den Chromosomen-Armen in der Prophase ("Prophase-Pathway") (Waizenegger et al., 2000). Dabei wird Cohesin nicht gespalten. Stattdessen ist dafür die Phosphorylierung der SA2-Untereinheit in Abhängigkeit von der Polo-Kinase sowie der mitotischen Aurora B-Kinase notwendig (Gimenez-Abian et al., 2004; Hauf et al., 2005; Sumara et al., 2002). Dieser Signalweg belässt jedoch einen Rest Cohesin an den Centromeren der Chromosomen (Waizenegger et al., 2000). Dieses centromerische Cohesin wird dann in der zweiten Phase durch Separase von den Chromosomen entfernt und führt zur endgültigen Aufhebung der Kohäsion.

Centromerisches Cohesin darf durch den Prophase-Signalweg nicht von den Chromosomen entfernt werden, denn sonst würden die Schwesterchromatiden bereits in der Prophase vollständig voneinander gelöst. Um centromerisches Cohesin vor dem Prophase-Signalweg zu schützen, ist das Protein Shugoshin zusammen mit der Phosphatase 2A (PP2A) notwendig (Abbildung 3). Shugoshin-PP2A lokalisieren in der Mitose an den Centromeren (McGuinness et al., 2005). Der genaue Mechanismus des Schutzes centromerischen Cohesins durch Shugoshin-PP2A ist unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass PP2A die Phosphorylierung der SA2-Untereinheit spezifisch am Centromer rückgängig macht (McGuinness et al., 2005; Tang et al., 2004). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Shugoshin centromerisches Cohesin sterisch schützt.

Möglicherweise tragen auch Separase-unabhängige Mechanismen zu Anaphase-Induktion bei. Der SUMO-Signalweg könnte ein solcher Mechanismus sein. SUMO („Small Ubiquitin Like Modifier“) ist ein dem Ubiquitin ähnliches Protein, das wie dieses kovalent an Substratproteine gekoppelt wird. Die Störung des SUMO-konjugierenden Systems inhibiert die Trennung der Schwestercentromere und die Anaphase-Induktion. Mit Pds5, Condensin und Topoisomerase II wurden bereits für die Schwesterchromatidentrennung interessante SUMO-Substrate identifiziert. Pds5 ist sowohl in *S. cerevisiae* als auch in Vertebraten für die Aufrechterhaltung der Kohäsion und für deren Auflösung wichtig. In *S. cerevisiae* wird Pds5 Anaphase-spezifisch SUMOyliert (Stead et al., 2003). Wie dieser Vorgang zur Auflösung der Kohäsion beiträgt, ist jedoch unbekannt. Das Condensin von *S. cerevisiae* lokalisiert in der Anaphase an die repetitive ribosomale DNA (rDNA). Dies geht mit der SUMOylierung in Anaphase und einer Änderung der rDNA-Chromatinmorphologie einher. Genetische Unterdrückung dieser Vorgänge führt zu einer unvollständigen Trennung der rDNA (D'Amours et al., 2004; Strunnikov et al., 2001). Auch die SUMOylierung der *Xenopus*-Topoisomerase II korreliert mit der Anaphase (Azuma et al., 2003). Die Topoisomerase II-abhängige Dekatenierung wiederum ist eine Voraussetzung für die Trennung der Schwesterchromatiden (Shamu and Murray, 1992). Es ist jedoch bisher unbekannt, ob Topoisomerase II-SUMOylierung diesen von ihrer katalytischen Aktivität abhängigen Prozess oder andere Topoisomerase II-induzierte Vorgänge beeinflusst.

Obwohl der positive Effekt der SUMOylierung auf die Anaphase in seinen molekularen Details also noch nicht aufgeklärt werden konnte, sprechen die vorgestellten Befunde dafür, dass die SUMOylierung der drei Proteine Pds5, Condensin und Topoisomerase die Anaphase kontrolliert (Aguilar et al., 2005; Stemmann et al., 2005).

### 2.2.4.3 Separase

Separase ist der ultimative Initiator der Anaphase, indem sie den letzten Zusammenhalt der Schwesterchromatiden löst (Hauf et al., 2001; Uhlmann et al., 1999; Waizenegger et al., 2000).

Separasen sind in allen Eukaryoten bekannt. Ihre Primärstruktur ist mit Ausnahme der carboxyterminalen Protease-Domäne erstaunlich divergent. Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnten jedoch konservierte Muster in der Tertiärstruktur beschrieben werden. Separasen sind große Proteine (180-250 KD) mit superhelikalen ARM/HEAT-Wiederholungen im N-Terminus (Jäger *et al.*, 2004; Viadiu *et al.*, 2005). Die Protease-Domäne besitzt in ihrem katalytischen Zentrum eine katalytische Dyade aus den konservierten Aminosäuren Histidin und Cystein. Anhand dieser charakteristischen Protease-Domäne ordnet man die Separase zusammen mit den Caspasen in die Gruppe der CD-Klan-Proteasen ein (Nasmyth, 2002). Separase ist eine sequenzspezifische Protease, die Proteine nach dem Arginin der Konsensussequenz ExxR schneidet (Stemmann et al., 2001; Uhlmann et al., 1999). Da ExxR ein sehr einfaches Sequenzmotiv ist, das in fast allen Proteinen vorkommt, muss es jedoch noch andere Faktoren geben, die die Separase-vermittelte Spaltung eines bestimmten Proteins beeinflussen. Denn es sind bisher nur vier Separase-Substrate bekannt, mitotisches Cohesin (Scc1/Rad21), meiotisches Cohesin (Rec8) (Petronczki et al., 2003), Slk19 (Sullivan et al., 2001) und Separase (Zou et al., 2002) selbst. Die nur unzureichend charakterisierten Spaltungsdeterminanten haben es bisher schwer gemacht, neue Substrate durch bioinformatische Analysen zu identifizieren.

Aktive Vertebraten-Separase spaltet sich selbst (Stemmann et al., 2001; Zou et al., 2002). Es gibt in humaner Separase (2120 Aminosäuren) drei nahe beieinander liegende Selbstspaltstellen an den Positionen 1486, 1506 und 1535. Die Selbstspaltung lässt die Protease-Domäne intakt. Tatsächlich wird die proteolytische Aktivität durch die Selbstspaltung im Gegensatz zu Caspasen nicht detektierbar beeinflusst. Es gibt Hinweise darauf, dass bei selbstgespaltener humaner Separase die Spaltfragmente in einem Komplex zusammenbleiben (Zou et al., 2002).

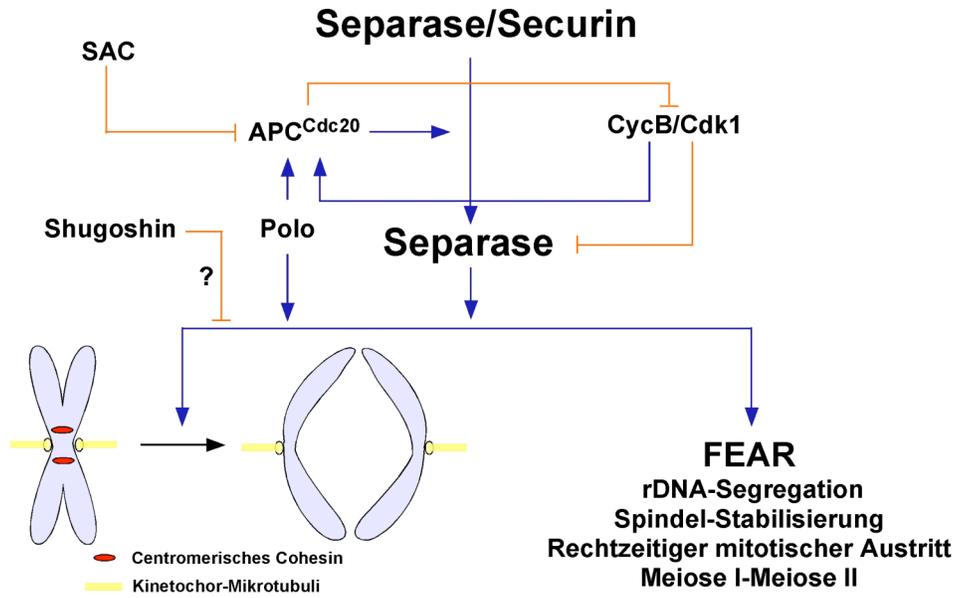
### 2.2.4.4 Securin-abhängige und -unabhängige Separase-Regulation

Die Separase-Aktivität muss sehr genau reguliert werden, damit die Anaphase zum richtigen Zeitpunkt induziert wird, denn eine frühzeitige oder unvollständige Chromosomentrennung würde unweigerlich zur ungleichen Verteilung der genetischen Information auf die Tochterzellen führen. In erster Linie wird die zeitlich richtige

Separase-Aktivierung über die kontrollierte Proteolyse des Separase-Inhibitors Securin erreicht (Abbildung 4) (Funabiki et al., 1996; Yamamoto et al., 1996; Zou et al., 1999). Securin hemmt Separase durch die Bildung eines Separase-Securin-Komplexes in der Interphase und der frühen Mitose. Der Securin-Abbau erfolgt wie der von Cyclin B durch APC<sup>Cdc20</sup>-vermittelte Degradation durch das Proteasom. Er steht also unter Kontrolle des SACs („Spindle Assembly Checkpoint“; Abschnitt 2.2.3.2). Das heißt, Securin wird erst nach Etablierung der Metaphase eingeleitet, wenn alle Chromosomen korrekt mit der mitotischen Spindel verbunden sind. Der SAC koppelt also die richtige Anheftung der Chromosomen mit der Induktion der Anaphase und dem mitotischen Austritt über Regulation des APC<sup>Cdc20</sup>-vermittelten Abbaus von Securin und B-Typ-Cyclinen (Abbildung 4).

Securin hat jedoch nicht nur inhibitorische, sondern auch eine aktivierende Wirkung auf Separase (Jensen et al., 2001; Pflieger et al., 2005). Das wird dadurch deutlich, dass bei genetischer Inaktivierung von Securin in *S. cerevisiae* die Schwesterchromatiden nicht etwa verfrüht, sondern ineffizient getrennt werden. Auch in Säugetierzellen ist Separase, die nie mit Securin im Komplex vorgelegen hat, nicht vollständig aktiv (Jallepalli et al., 2001; Pflieger et al., 2005). Wie Securin die Separase aktiviert, ist unklar. In *S. cerevisiae* ist Securin-freie Separase nicht korrekt lokalisiert (Jensen et al., 2001). In Säugetierzellen wirkt Securin möglicherweise als Chaperon und hilft der Separase bei der Proteinfaltung. Das könnte ein Schutzmechanismus der Zelle sein, der verhindern soll, dass neu synthetisierte Separase aktiv werden kann, bevor sie mit ihrem Inhibitor assoziiert.

In der Hefe *S. pombe* ist Securin essentiell. Säugetierzellen (Pflieger et al., 2005) und sogar Mäuse (Mei et al., 2001) können jedoch ohne Securin überleben. Securin (-/-)-Zellen leiden weder unter einer verfrühten, noch unter einer mangelhaften Chromosomentrennung. Da die Separase für die Chromosomentrennung nötig ist, heißt das zum einen, dass die reduzierte Separase-Aktivität ohne Securin dafür ausreichend ist und zum anderen, dass es eine Securin-unabhängige Separase-Inhibition vor der Anaphase geben muss. Tatsächlich haben Olaf Stemmann und Kollegen die Inhibition von Separase durch Cyclin B1/Cdk1-abhängige Separase-Phosphorylierung beschrieben (Stemmann et al., 2001) (Abbildung 4). Für diese Art der Separase-Inhibition wird die Separase an den Aminosäuren Serin 1126 und Threonin 1346 phosphoryliert. Da Cyclin B wie Securin APC<sup>Cdc20</sup>-abhängig abgebaut wird, könnte dieser Mechanismus die Securin-vermittelte Inhibition und die kontrollierte Separase-Aktivierung funktionell ersetzen.



**Abbildung 4: Regulation der Funktionen von Securin-freier Separase.**

Die schematische Darstellung kombiniert Erkenntnisse aus *S. cerevisiae* und Säugetieren. Separase wird sowohl direkt als auch indirekt reguliert. Die direkte Regulation umfasst neben der Inhibition durch Securin-Bindung und dessen APC<sup>Cdc20</sup> vermittelten Abbau noch die Inhibition durch Cyclin B1/Cdk1, die von Separase-Phosphorylierung durch diese Kinase abhängt. Die indirekte Separase-Regulation geschieht sowohl auf Substrat- als auch auf APC<sup>Cdc20</sup>-Ebene. So verbessert die Polo-Kinase die Eigenschaften von Cohesin als Separase-Substrat durch Cohesin-Phosphorylierung, während Shugoshin eventuell auch in der Mitose das Cohesin vor Separase-vermittelter Spaltung schützen kann (noch nicht vollständig geklärt). In der Meiose I ist diese Shugoshin-Aktivität gezeigt worden. Der APC<sup>Cdc20</sup> benötigt zur vollen Aktivierung die Phosphorylierung durch Polo und Cyclin B1/Cdk1. Ist er nach erfolgreichem bipolarem Anheften der Chromosomen an die Spindel und Inaktivierung des SACs einmal aktiv, so vermittelt er durch Abbau von Securin und Cyclin B1 die Aktivierung von Separase. Der SAC-APC<sup>Cdc20</sup>-Signalweg spielt also die Rolle des Separase-Initiators. Die phosphorylierungsvermittelte Verbesserung von Cohesin als Separase-Substrat und die APC/C-Aktivierung durch Polo und Cyclin B1/Cdk1 hingegen sind wohl eher Voraussetzungen für die effiziente Ausführung von Separase-Funktionen als zeitliche Induktoren. Neben der Initiation der Anaphase koordiniert Securin-freie Separase in *S. cerevisiae* Protease-unabhängig über die Initiation des so genannten FEAR-Signalwegs („Cdc14 Early Anaphase Release“; Abschnitt 2.2.5.1) zusätzlich wichtige Anaphase-Prozesse und den Meiose I-Meiose II-Übergang.

In der Tat konnte bewiesen werden, dass in Mäuse-Zellen, denen die Separase-Inhibitionsmechanismen durch Securin und Cdk1-Phosphorylierung fehlen, die Schwesterchromatiden-Kohäsion in einem Nocodazol-induzierten Prometaphase-Arrest nicht aufrechterhalten werden kann (Huang et al., 2005). Zudem führt die Überexpression von nicht phosphorylierbarer Separase-PM1126 (PM steht für Phosphomutante), die also nicht mehr durch Cyclin B1/Cdk1 phosphoryliert werden kann, in kultivierten Zellen zu einer verfrühten Schwesterchromatidentrennung (Holland and Taylor, 2006). Der Effekt ist tatsächlich auf mangelhafte Cyclin B1/Cdk1-abhängige Separase-Inhibition zurückzuführen, denn Zellen mit gleichermaßen erhöhter Konzentrationen von Separase-wt zeigen diesen Phänotyp nicht.

Die Separase-vermittelte Spaltung von Cohesin wird auch auf Substrat-Ebene reguliert (Abbildung 4). Sowohl mitotisches- (Scc1) als auch meiotisches Cohesin (Rec8) werden in *S. cerevisiae* (Alexandru et al., 2001) und im Menschen (Hauf et al., 2005; Hornig and Uhlmann, 2004) Polo-Kinase-abhängig in der Nähe der Separase-Spaltstellen phosphoryliert. Dies verbessert die Eigenschaften von Cohesin als Separase-Substrat *in vitro* um ein Vielfaches (Hauf et al., 2005). Die Expression nicht phosphorylierbarer Mutanten in menschlichen Zellen ergab jedoch keinen Einfluss der Scc1-Phosphorylierung auf das Überleben der Zellen in Zellkultur (Hauf et al., 2005). Zudem gibt es keinen Hinweis darauf, dass Scc1-Phosphorylierung zeitlich mit der Anaphase-Induktion zusammenfällt. Scc1-Phosphorylierung nimmt also wahrscheinlich nicht wesentlich an der zeitlichen Regulation der Anaphase-Induktion teil.

### 2.2.5 Nicht-klassische Separase-Funktionen

In *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster* und Vertebraten wurden Separase-Funktionen beschrieben, die über die Spaltung von Cohesin hinausgehen. Diese sind zum Teil unabhängig von der proteolytischen Separase-Aktivität. Teilweise jedoch basieren sie auf der Selbstspaltung der Separase oder der Einfluss der Protease-Aktivität ist noch ungeklärt. Möglicherweise existieren also noch nicht identifizierte Separase-Substrate.

#### 2.2.5.1 Separase-Funktionen in *S. cerevisiae*

Die meisten der bisher bekannten Separase-Funktionen in *S. cerevisiae*, die nicht die Cohesin-Spaltung betreffen, gehen auf das so genannte FEAR-Netzwerk („Cdc14 Early Anaphase Release Network“) zurück. Wie das MEN-Netzwerk (Abschnitt 2.2.3.2) führt FEAR zu einer Aktivierung der Phosphatase Cdc14. Dies geschieht jedoch nicht wie bei MEN in der späten Anaphase, sondern durch einen alternativen Signalweg transient in der frühen Anaphase (Stegmeier et al., 2002). An diesem Signalweg sind neben Separase unter anderem die Proteine Slk19, Spo12 und Cdc5 (Polo-Kinase in *S. cerevisiae*) beteiligt. FEAR wird durch Separase nach APC<sup>Cdc20</sup>-vermitteltem Securin-Abbau aktiviert (Sullivan and Uhlmann, 2003). Dabei scheint es sich um einen Protease-unabhängigen Separase-Effekt zu handeln (Sullivan and Uhlmann, 2003), der zur Dephosphorylierung des nukleolären Proteins Cfi1/Net1 durch die Phosphatase PP2A führt (Queralt et al., 2006) Die dephosphorylierte Form von Cfi1/Net1 kann die Cdc14-PPase nicht mehr binden. Cdc14 wird dadurch, induziert von Separase, aus dem Nukleolus freigesetzt.

Cdc14 hat mehrere Zielproteine. Es führt durch aktivierende Dephosphorylierung des Cdk1-Inhibitors Sic1 und des APC/C-Aktivators Cdh1 zu einer Erniedrigung der Cdk1-Kinase-Aktivität. So trägt Cdc14 zum zeitlich korrekt regulierten Austritt aus der Mitose bei (Stegmeier et al., 2002; Sullivan and Uhlmann, 2003). Während der Austritt aus der Mitose auch ohne das FEAR-Netzwerk durch die kompensatorische Wirkung des MEN-Netzwerks mit einer zeitlichen Verzögerung geschehen kann, ist FEAR für den Übergang von der Meiose I in die Meiose II essentiell (Buonomo et al., 2003; Marston et al., 2003). Diese meiotische Funktion wird in Abschnitt 2.3 näher erklärt.

Es sind noch weitere Funktionen des FEAR-Netzwerks bekannt. Studien mit *S. cerevisiae*-Mutanten, die kein funktionelles FEAR mehr besitzen, haben gezeigt, dass FEAR für die Stabilisierung der MT-Dynamik in der Anaphase (Higuchi and Uhlmann, 2005; Sullivan et al., 2001) und für die Segregation der repetitiven rDNA benötigt wird (Abschnitt 2.2.4.2) (D'Amours et al., 2004; Sullivan et al., 2004; Wang et al., 2004). Bereits vor der Entdeckung von FEAR wurde eine Spindel-stabilisierende Funktion von Separase beschrieben, die zum Teil von der Separase-vermittelte Spaltung der FEAR-Komponente Slk19 abhängt. Mitotische Hefe-Spindeln brechen leichter, wenn Slk19 durch eine nicht spaltbare Version ersetzt wird (Sullivan et al., 2001). Es ist jedoch unbekannt, ob andere FEAR-Komponenten für diese Protease-abhängige Separase-Funktion benötigt werden.

### **2.2.5.2 Separase-Funktionen in Metazoen**

In *D. melanogaster* und Säugetieren konnten Funktionen der Separase-Selbstspaltung nachgewiesen werden (Herzig et al., 2002; Papi et al., 2005). Somit gehen diese Funktionen zumindest indirekt auf die proteolytische Separase-Aktivität zurück. In *D. melanogaster* besteht Separase aus zwei Proteinen, dem katalytischen Sse- und dem Thr-Protein. Obwohl diese Zweiteilung der Separase eventuell eine konstitutive Form der Selbstspaltung humaner Separase repräsentiert, wird das Thr-Protein nach Separase-Aktivierung noch einmal gespalten. *D. melanogaster*-Embryonen, die eine nicht spaltbare Thr-Version enthalten, können die embryonale Entwicklung nicht korrekt abschließen. Sie leiden an einem Defekt der Zellularisierung nach der letzten syncyziellen Teilung des Embryos (Herzig et al., 2002). Dieser Phänotyp wird wahrscheinlich durch eine zu hohe Separase-Aktivität verursacht, denn er wird durch Herabsetzung der Separase-Aktivität durch genetische Inaktivierung eines Separase-Allels wieder aufgehoben. Thr-Spaltung durch Separase trägt also wahrscheinlich zur Herabregulierung der Protease-Aktivität bei. Obwohl es formal nicht auszuschließen ist, dass der Defekt bei der Zellularisierung auf

eine verfrühte Cohesin-Spaltung zurückgeht, scheint diese Möglichkeit wegen der nur schwach ausgeprägten mitotischen Defekte in Anwesenheit von nicht spaltbarem Thr unwahrscheinlich. Vielmehr ziehen die Autoren den Schluss, dass Separase, die sich nicht selbst spalten kann, überaktiv ist und vermehrt ein noch unbekanntes Substrat schneidet. Dies würde den Zellularisierungsprozess stören (Herzig et al., 2002).

In Säugetieren wurde Separase-Selbstspaltung mit einem effizienten Eintritt in die Mitose und mit einer korrekten Ausbildung der mitotischen Spindel in Verbindung gebracht. Zellen, deren Separase durch eine nicht spaltbare Mutante ersetzt worden ist, können diese Vorgänge nicht mehr richtig vollziehen (Papi et al., 2005). Die von Separase beeinflussten Mechanismen, die zu diesen Prozessen beitragen, sind nicht bekannt. Da auch selbstgespaltene Separase vor der Anaphase effizient durch Securin-Bindung gehemmt wird (O. Stemmann, persönliche Mitteilung), ist es unwahrscheinlich, dass diese Funktionen mit der Spaltung eines noch nicht identifizierten Substrats zusammenhängen. Vor kurzem wurde die Rolle von Separase bei der Trennung centrosomaler Centriolen in der Anaphase beschrieben (Tsou and Stearns, 2006). Die Centriolen-Trennung ist Voraussetzung für deren spätere Duplizierung und die Separierung der Centrosomen in der nächsten M-Phase. Der Mechanismus und damit auch der Beitrag der proteolytischen Separase-Aktivität sind jedoch noch unbekannt.

In *C. elegans* ist Separase wie in *D. melanogaster* für die Embryonalentwicklung wichtig. Die Ausbildung der anterior-posterior-Achse des Embryos ist in *C. elegans* mit einer asymmetrischen Lokalisierung der mitotischen Spindel während der ersten embryonalen Mitose verbunden. Diese spezielle Spindel-Ausrichtung kann ohne Separase-Aktivierung durch den APC/C nicht gewährleistet werden (Rappleye et al., 2002). Ähnlich wie in *S. cerevisiae* hat Separase also eine Funktion bei der Spindel-Funktion nach der Anaphase-Induktion. Der Mechanismus und damit potentiell involvierte neue Separase-Substrate sind bisher jedoch nicht bekannt.

### **2.3 Die Besonderheiten der Meiose**

Im Unterschied zur Mitose wird in der Meiose die genetische Information nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Stattdessen werden in der ersten meiotischen Teilung die homologen Chromosomen der beiden Elternteile getrennt. Die zweite meiotische Teilung ähnelt der Mitose insofern, als dass die Schwesterchromatiden voneinander separiert werden. Zwischen beiden meiotischen Teilungen findet keine S-Phase statt.

Damit die homologen Chromosomen voneinander getrennt werden können, werden sie zunächst zu Tetraden gepaart. In dieser Phase werden die so genannten Chiasmata durch

homologe Rekombination gebildet. Chiasmata sind Kreuzungspunkte, an denen die homologen Chromatiden über Kreuz kovalent miteinander verknüpft sind. Die Schwesterchromatiden-Kinetochore der Tetraden werden in der Meiose I als Einheit behandelt und bilden ein Kinetochorenpaar. Die beiden Kinetochorenpaare der homologen Chromosomen heften an die gegenüberliegenden Centrosomen der meiotischen Spindel an und vermitteln die Trennung der homologen Chromosomen.

Cohesin ist auch für die Meiose essentiell. In *S. cerevisiae* ist Scc1 in der Meiose durch Rec8 ersetzt. Meiotisches Cohesin an den Chromosomen-Armen distal der Chiasmata ist für die Kohäsion der homologen Chromosomen notwendig. Zur Induktion der Anaphase I wird das Cohesin durch Separase-vermittelte Spaltung von den Chromosomenarmen entfernt, während das centromerische Cohesin und damit die Schwesterchromatiden-Kohäsion bestehen bleibt (Kitajima et al., 2003). Der Schutz centromerischen Cohesins vor einer ersten Dissoziationswelle erinnert an den Schutz centromerischen Cohesins von dem Prophase-Signalweg in der Mitose (Abschnitt 2.2.4.2). Tatsächlich ist in *S. pombe* auch dafür das Shugoshin-Protein nötig. Im Gegensatz zum Schutz von Cohesin vor Dissoziation durch den Prophase-Signalweg schützt der Shugoshin-PP2A-Komplex Cohesin in der Meiose jedoch vor Spaltung des centromerischen Cohesins durch Separase (Kitajima et al., 2004; Riedel et al., 2006). Dies geschieht durch Separase-PP2A-abhängige Dephosphorylierung von Rec8. Anders als bei Scc1 ist Rec8-Phosphorylierung für seine Spaltung durch Separase essentiell. Dieser Mechanismus ist auf das Meiose-spezifische Rec8-Cohesin angewiesen, denn das mitotische Scc1 kann durch Shugoshin nicht vor Separase geschützt werden (Petronczki et al., 2003; Stemmann et al., 2005). Durch einen noch nicht vollständig bekannten Mechanismus wird Shugoshin nach der Anaphase I inaktiviert, so dass in der Meiose II dann das centromerische Cohesin von Separase geschnitten werden kann (Kitajima et al., 2004). In der Meiose II werden also ganz ähnlich wie in der Mitose die Schwesterchromatiden voneinander separiert.

Der Übergang von der Meiose I in die Meiose II bedarf einer besonderen Regulierung der Cdk1-Aktivität. Bei dieser Transition muss diese nämlich moderat sinken. Geht die Cdk1-Aktivität nicht stark genug zurück, so kann die meiotische Spindel nicht abgebaut werden und beide meiotischen Chromosomen-Teilungen finden an der Meiose I-Spindel statt (Marston et al., 2003). Dies führt zu einer fehlerhaften Trennung der homologen Chromosomen. Sinkt die Cdk1-Aktivität jedoch zu stark, so kommt es zu einer Induktion der Replikation in der Meiose (Iwabuchi et al., 2000). Für den Meiose I-Meiose II-Übergang ist also eine besondere Feinregulation, d.h. eine unvollständige Inhibierung der Cdk1-Aktivität nötig. In *S. cerevisiae* ist der FEAR-Signalweg (Abschnitt 2.2.5.1) und

damit die Aktivierung von Separase durch Securin-Abbau für diese Art der Cdk1-Regulierung essentiell, wie Experimente mit genetisch inaktiviertem FEAR-Signalweg gezeigt haben (Marston et al., 2003).

## **2.4 Der *Xenopus*-Oozytenextrakt als Modellsystem für die Aufklärung mitotischer Vorgänge**

Hoch konzentrierter zytosolischer Extrakt aus *Xenopus*-Oozyten hat sich als gutes Modellsystem für die Erforschung vieler zellulärer Vorgänge erwiesen. Dazu gehören beispielsweise die Replikationsinitiation und die Meiose II, die der Mitose ähnelt (Murray, 1991). Ein großer Vorteil dieses zellfreien Systems ist die biochemische Manipulierbarkeit des Extrakts. So können leicht Proteine durch Immundepletion mit spezifischen Antikörpern aus dem Extrakt entfernt oder durch Zugabe von Inhibitoren gehemmt werden. Die zu untersuchenden Prozesse lassen sich anschließend durch die Analyse von Markerproteinen, die Prozess-spezifischen Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Abbau oder Komplexbildung unterzogen sind, analysieren.

Der Extrakt wird aus Eiern des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* gewonnen, die nach der Injektion von humanem chorionischem Gonadotropin in den dorsalen Lymphsack des Frosches von ihm abgelegt werden (Murray, 1991). Die Oozyten befinden sich nach der Ablage in einem stabilen metaphase-ähnlichem Zustand der Meiose II, dem so genannten CSF-Arrest. Dieser Zustand wird auch nach Isolierung des Zytosols beibehalten. Durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ , die die Befruchtung des Eis nachahmt, wird der CSF-Arrest aufgehoben. Der Extrakt verlässt die Meiose II und kann - bei guten Extrakten - noch mehrere alternierende S- und M-Phasen durchschreiten.

Für die Mitose-Forschung ist der *Xenopus*-Oozytenextrakt besonders gut geeignet. Der mitotische Ein- und Austritt des Extrakts kann nach Zugabe von Spermien-DNA und Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Tubulin durch Chromatin-Kondensation und Dekondensation sowie Spindel-Auf- und -Abbau akkurat beobachtet werden. Auch die Schwesterchromatidentrennung lässt sich dadurch mikroskopisch verfolgen, denn die im Extrakt aufgebauten Spindeln sind funktional und transportieren die Chromatiden nach Auflösung der Kohäsion zu den Spindelpolen.

Für die Erforschung der Separase hat sich der Einsatz von so genanntem  $\Delta 90$ -Extrakt als vorteilhaft erwiesen. Durch Zugabe von Cyclin B1, dem die N-terminalen 90 Aminosäuren mit der D-Box fehlen, und das dadurch vor  $\text{APC}^{\text{Cdc}20}$ -abhängigem Abbau geschützt ist, bleibt der Extrakt nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe in einem stabilen Anaphase-Zustand mit hoher  $\text{APC}^{\text{Cdc}20}$ - und hoher Cdk1-Aktivität arretiert. Separase im Komplex mit

Securin wird durch Inkubation in  $\Delta 90$ -Extrakt durch den Abbau von Securin aktiviert und kann nach Rückisolierung durch Inkubation mit Cohesin auf ihre Aktivität hin untersucht werden (Stemmann et al., 2001).

### 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Vielfältigkeit der beschriebenen Separase-Funktionen in unterschiedlichen Modellorganismen über die Cohesin-Spaltung hinaus (Abschnitt 2.2.5) machten die Existenz noch nicht identifizierter Separase-Substrate wahrscheinlich. Da es aufgrund der mangelhaften Charakterisierung der Separase-Spaltungsdeterminanten schwierig ist, neue Substrate durch bioinformatische Analyse zu identifizieren, wurde mit IVEC („*In Vitro* Expression Cloning“) eine *In-vitro*-Methode gewählt, die auf der proteolytischen Separase-Aktivität beruht. Diese Methode wurde erfolgreich angewandt.

Des Weiteren sollte die bereits beschriebene Separase-Hemmung durch Cyclin B1/Cdk1-vermittelte Inhibition in anaphasischem *Xenopus*-Oozytenextrakt mit hoher Cyclin B1/Cdk1-Aktivität (Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt) näher untersucht werden. Diese Inhibition ist von Separase-Phosphorylierung an den Resten Serin 1126 und Threonin 1346 abhängig (Stemmann et al., 2001). Die Cyclin B1/Cdk1-vermittelte Separase-Inhibition ist deshalb interessant, weil es aufgrund der Lebensfähigkeit von Securin(-/-)-Mäusen wahrscheinlich ist, dass es parallele Mechanismen zur Securin-abhängigen Separase-Hemmung vor der Anaphase gibt (Abschnitt 2.2.4.4). Separase-Inhibition bis zur erfolgreichen Anheftung der Schwesterchromatiden an die mitotische Spindel wiederum ist für die korrekte Schwesterchromatidentrennung und damit für die Konstanz der genetischen Information essentiell.

Ziel war es, sowohl den molekularen Mechanismus, d.h. an der Inhibition beteiligte Proteine und deren Wirkweise genau zu definieren. Dazu wurde zunächst die Existenz eines Koinhibitors, der abhängig von den kritischen Separase-Phosphorylierungen an die Protease bindet, biochemisch bewiesen. Anschließend konnte die Bindung von Cyclin B1/Cdk1 an Separase mit Separase-Inhibition in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt korreliert werden. Die Existenz des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes wurde in mitotischen Zellen durch Koimmunpräzipitation nachgewiesen. Durch systematische Mutationsanalyse wurden daraufhin die Bindungsdeterminanten im Separase-Protein bis auf das Aminosäureniveau genau charakterisiert. Ausgehend davon konnten einerseits molekulare Werkzeuge zur Untersuchung der *In-vivo*-Funktionen des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes in der Meiose entwickelt werden. Andererseits wurde durch Cyclin B1/Cdk1-Bindungsstudien mit Separasemutanten *in vitro* und in Zellen der Bindungsmechanismus näher untersucht. Überraschenderweise konnte eine Funktion der

Cdk1-Hemmung durch Separase-Bindung in der Meiose gezeigt werden. Zusätzlich wurde ein Modell zum Cdc6-ähnlichen Mechanismus der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Bindung erstellt, der nahe legt, dass phosphorylierungsabhängige Bindung von Cyclin B1/Cdk1 ein genereller Mechanismus sein könnte, der sowohl die Cdk1-Aktivität reguliert, als auch spezielle Cyclin B1/Cdk1-Funktionen vermittelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Biochemische Identifizierung neuer Separase-Substrate

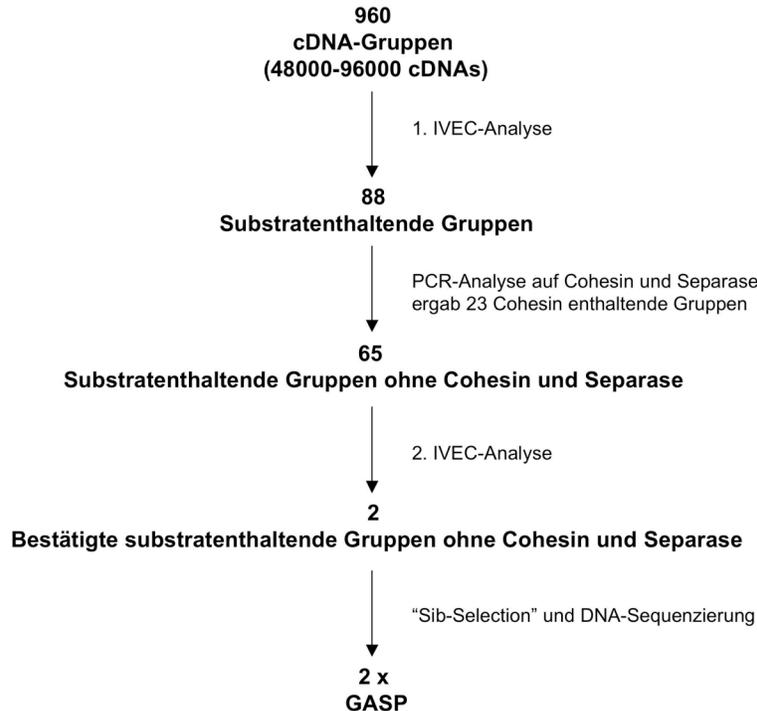
Da Separase in niederen und höheren Eukaryoten Funktionen besitzt, die über Cohesin-Spaltung hinausgehen, sollte nach neuen Substraten für Separase gesucht werden. Dazu wurde ein Ansatz gewählt, dem direkt die proteolytische Aktivität der Separase zugrunde liegt, die IVEC-Methode („*In Vitro* Expression Cloning“).

##### 3.1.1 Identifizierung des Proteins GASP durch „*In vitro* Expression Cloning“

Bei der IVEC-Methode wird eine cDNA-Bibliothek in Retikulozyten-Lysat in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* exprimiert. Das <sup>35</sup>S-Methionin wird in die Expressionsprodukte eingebaut und markiert diese so radioaktiv. Die *in vitro* exprimierten Proteine werden dann der entsprechenden Analyse unterzogen. Eine Besonderheit ist, dass die Expressionsbibliothek in Gruppen von 50-100 cDNAs formatiert ist, so dass sich ein übersichtliches Gemisch von Proteinen für jede Gruppe ergibt, die Anzahl der zu testenden Proben aber überschaubar bleibt.

Im Fall der Suche nach Separase-Substraten wurde die cDNA-Bibliothek mit aktiver oder proteolytisch inaktiver Kontroll-Separase inkubiert. Anschließend wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie nach Proteinbanden gesucht, die bei der Inkubation mit aktiver Separase zugunsten von kleineren Fragmenten verschwinden. Auf diese Weise wurden 960 cDNA-Gruppen, das entspricht etwa 48000 bis 96000 cDNAs, untersucht. Nach der Identifikation positiver cDNA-Gruppen wurde die Substrat-kodierende cDNA durch die so genannte „Sib-Selection“-Methode (Abschnitt 5.4.9.3) isoliert und durch Sequenzierung identifiziert.

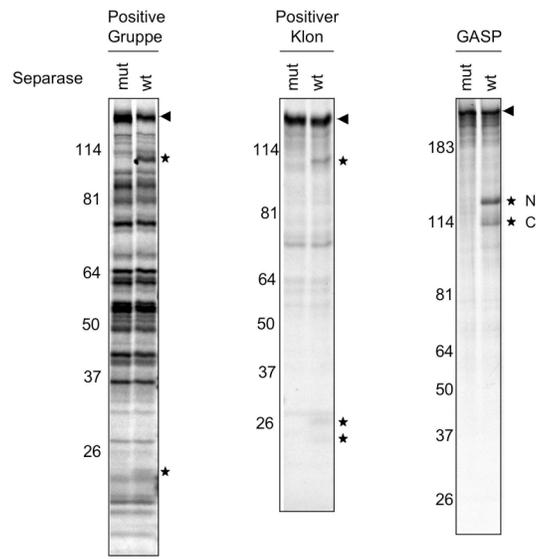
Insgesamt wurden 88 cDNA-Gruppen identifiziert, die einen Unterschied im Bandenmuster zwischen Inkubation mit aktiver und inaktiver Separase zeigten (Abbildung 5). Diese wurden zunächst durch PCR auf die Anwesenheit der bekannten Separase-Substrate Cohesin und Separase hin untersucht. Dabei wurden Oligonukleotidpaare gewählt, die die Spaltstellen der Proteine amplifizieren, da mindestens eine Spaltstelle in dem positiven Klon vorhanden sein muss. Auf diese Weise konnten 23 Gruppen, die Cohesin enthalten, ermittelt werden. Separase konnte jedoch in keiner Gruppe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die IVEC-Methode generell geeignet ist, um proteolytische Separase-Substrate zu identifizieren.



**Abbildung 5: Durch “*In vitro* Expression Cloning” wurden 2 cDNA-Gruppen mit dem Separase-Substrat GASP identifiziert. 23 cDNA-Gruppen enthalten Scc1.**

Die 960 cDNA-Gruppen der cDNA-Bibliothek des “Proteolink *In vitro* Expression Cloning Kits” aus dem Gehirn eines menschlichen Erwachsenen – insgesamt 48000 – 96000 cDNAs - wurden im mitgelieferten “Gold-TNT-SP6-Express” Retikulozytenlysate in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* exprimiert. Anschließend wurden die entstandenen Proteingruppen mit aktiver oder als Kontrolle proteolytisch inaktiver Separase inkubiert und dann durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Scc1 enthaltende cDNA-Gruppen wurden durch PCR mit drei Oligonukleotidpaaren, die jeweils eine der beiden Separase-Spaltstellen amplifizieren, identifiziert. Die verbleibenden potentiell Separase-Substrat enthaltenden Gruppen wurden ein zweites Mal durch Separase-vermittelte Spaltung überprüft. Zwei positive Gruppen konnten dabei bestätigt werden. Durch “Sib-Selection” wurde die Substrat-kodierende cDNA isoliert. Anschließende DNA-Sequenzierung identifizierte eine N-terminal verkürzte Version des Proteins GASP (Aminosäuren 640-1395) als neues *In-vitro*-Separase-Substrat

Die verbleibenden 65 positiven Gruppen wurden zunächst noch einmal durch Inkubation mit aktiver und inaktiver Separase auf die Anwesenheit eines Substrates getestet. Dabei ließen sich lediglich zwei Gruppen bestätigen. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür ist, dass im ersten Durchgang alle noch so kleinen Veränderungen im Bandenmuster als positiv gewertet wurden, um möglichst alle Separasesubstrate zu erfassen. Teilweise kamen diese Differenzen aber durch leicht unterschiedliches Laufverhalten der Proteine zwischen zwei benachbarten Gelspuren wegen kleiner Unregelmäßigkeiten im SDS-Gel zustande und nicht durch Separase vermittelte Spaltung.



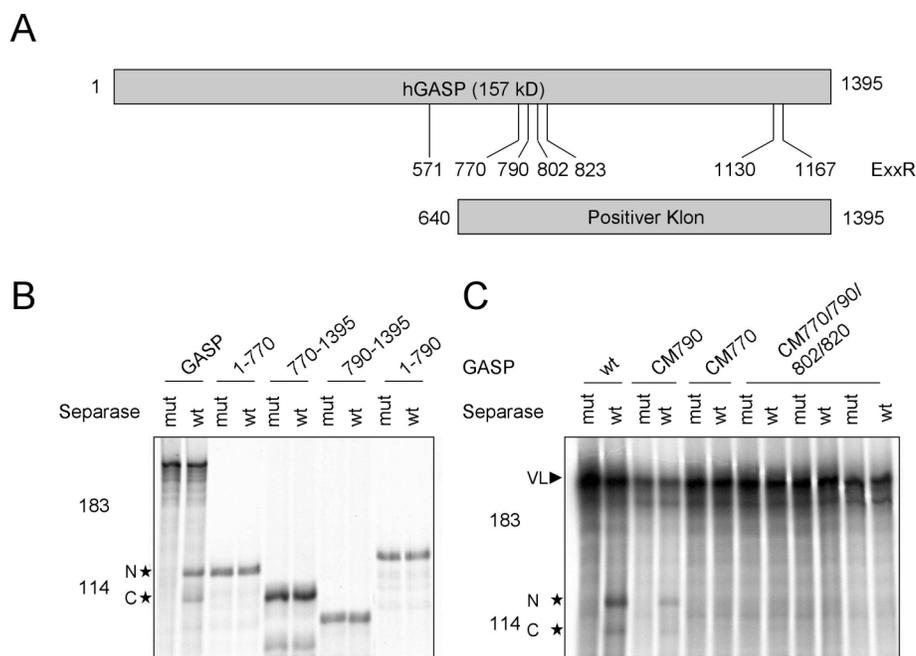
**Abbildung 6: Sowohl das durch IVEC identifizierte GASP-640-1395 als auch das Volllängen-Protein sind *In-vitro*-Separase-Substrate**

Die GASP-enhaltende positive Gruppe, die durch “Sib-Selection” isolierte GASP cDNA (GASP-640-1395) und Volllängen-GASP wurden in Anwesenheit von  $^{35}\text{S}$ -Methionin mit aktiver Separase-wt oder proteolytisch inaktiver Separase-mut inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Pfeilspitze: ungeschnittenes Protein; Stern: Separase-spezifische Schnittfragmente; N: N-terminales Schnittfragment; C: C-terminales Schnittfragment; 26-183: Molekulargewicht des Molekulargewicht-Standards [kD]

Die für die neuen Separase-Substrate kodierenden cDNAs der zwei verbliebenen Gruppen wurden durch “Sib-Selection” isoliert und durch Sequenzierung identifiziert. Beide enthielten die Sequenz für eine aminoterminal verkürzte Version des Proteins GASP (Aminosäuren 640-1395; KIAA0443), das als Protein beschrieben wurde, welches bei der Sortierung von intrazellulären Vesikeln eine Rolle spielt (Whistler et al., 2002). Exemplarisch ist eine der beiden Gruppen und das isolierte GASP-Fragment nach Inkubation mit inaktiver oder aktiver Separase in Abbildung 6 dargestellt. Durch Inkubation mit aktiver Separase sinkt die Signalstärke für das ungeschnittene Protein, während Schnittfragmente bei ca. 110 kD und zwei um 26 kD entstehen.

Da nicht das Volllängen-GASP in der cDNA-Bibliothek gefunden wurde, sollte nun getestet werden, ob auch das Volllängen-Protein ein Substrat für Separase ist. Dazu wurde der offene Leserahmen in einen für *In-vitro*-Expression geeigneten Vektor kloniert, in Anwesenheit von  $^{35}\text{S}$ -Methionin exprimiert und erneut mit inaktiver oder aktiver Separase inkubiert. In Abbildung 6 ist zu erkennen, das auch das Volllängen-



**Abbildung 7: GASP-ExxR770 ist die einzige *In-vitro*-Schnittstelle für Separase.**

(A) Schematische Darstellung GASPs und des durch IVEC identifizierte aminoterminal verkürzten Fragments (GASP-640-1395). Vollängen-GASP besitzt 7 Konsensussequenzen für Separase-vermittelte Spaltung (ExxR). Nur die Schnittstellen 770-1167 sind in GASP-640-1395 enthalten. (B) Durch Separase-Schnitt entstandene amino- bzw. carboxyterminale GASP-Fragmente komigrieren mit GASP-1-770 bzw. GASP-771-1395. Die theoretisch bei Schnitt mit Separase bei Stelle 770 oder 790 entstehenden amino- und carboxyterminalen GASP-Fragmente (Aminosäuren 1-770, 771-1395, 1-790 und 791-1395) wurden kloniert. Anschließend wurden sie wie GASP in Anwesenheit von  $^{35}\text{S}$ -Methionin *in-vitro*-translatiert und mit aktiver Separase-wt oder proteolytisch inaktiver Separase-mut inkubiert. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie. (C) GASP-CM770 ist resistent gegen Separase-vermittelte Spaltung. ExxR 770 (CM770) und -790 (CM790) wurden einzeln oder zusammen mit ExxR 802 und -820 (CM770/790/802/820) zu AxxA mutiert, als  $^{35}\text{S}$ -markierte Versionen durch *In-vitro*-Translation hergestellt und mit Separase-wt oder proteolytisch inaktiver Separase-mut inkubiert. Danach wurden die Reaktionen durch Autoradiographie auf Separase-vermittelte Spaltung hin untersucht.

VI: Volllängen-Protein; Stern: Separase-spezifische Schnittfragmente; N: aminoterminales Schnittfragment; C: carboxyterminales Schnittfragment; 114/183: Molekulargewicht des Molekulargewicht-Standards [kD]

GASP ein *In-vitro*-Substrat für Separase darstellt. Während das Volllängen-Protein ein Signal bei ungefähr 200 kD ergibt, laufen die durch Separase-vermittelte Spaltung entstehenden GASP-Fragmente im SDS-Gel bei ca. 110 kD und 120 kD. Das 110 kD-Fragment entspricht in seiner Größe dem N-terminal verkürzten GASP nach Separase-vermittelter Spaltung. Es muss sich daher um das C-terminale Spaltprodukt handeln.

### 3.1.2 Identifikation der Separase-Spaltstellen in GASP

Insgesamt gibt es sieben Sequenzen im GASP-Protein, die der Konsensussequenz für Separase-Spaltstellen entsprechen (ExxR) (Abbildung 7A). Aufgrund der Größe der

Schnittfragmente, die bei Schnitt von Vollängen-GASP und der aminoterminal verkürzten Variante entstehen, war es wahrscheinlich, dass GASP an den Aminosäurepositionen 770 oder 790 von Separase gespalten wird. Es wurden deshalb die Fragmente, die theoretisch bei GASP-Spaltung durch Separase an den Stellen 770 und 790 entstehen, kloniert, *in vitro* exprimiert und parallel zu Separase-geschnittenem GASP durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

In Abbildung 7B ist dargestellt, dass nur die Fragmente 1-770 und 770-1395 mit den beiden Schnittfragmenten von Vollängen-GASP komigrieren. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist also ExxR 770 die von Separase benutzte Schnittstelle. Wie bereits vermutet läuft dabei das C-terminale Fragment bei 110 kD. Aller Wahrscheinlichkeit nach schneidet Separase GASP also an der Position 770.

Um dies zu bestätigen und nach möglichen sekundären Schnittstellen zu suchen, wurden die ExxR-Motive an den Positionen 770 und 790 zu AxxA mutiert (GASP-CM770 bzw. -CM790). Diese Mutanten und GASP-wt wurden mit Separase behandelt und wie zuvor durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Abbildung 7C zeigt auf, dass GASP-CM770 im Gegensatz zu GASP-CM790 vollständig resistent gegen Spaltung durch Separase ist. Mutation der ExxR-Stellen an den Positionen 790, 802 und 820 zusätzlich zur Inaktivierung der Schnittstelle an Position 770 hat keinen zusätzlichen Effekt. *In vitro* wird GASP von Separase also ausschließlich nach dem ExxR-Motiv an Position 770 geschnitten.

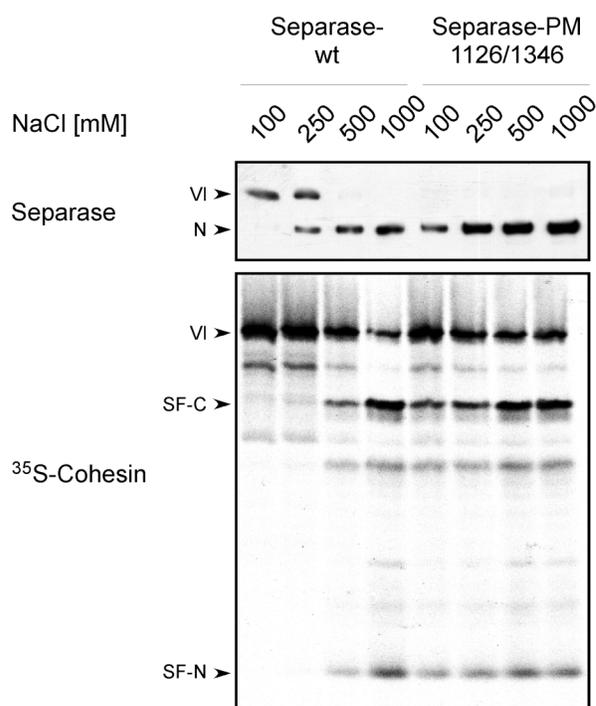
Wenn die Spaltung von GASP durch Separase eine wichtige zelluläre Funktion erfüllt, dann sollten diese Eigenschaft sowie die ermittelte Spaltstelle in nahe verwandten Organismen konserviert sein. Im GASP-Homolog der Ratte, dem PIPS-Protein, ist das ExxR-Motiv um 770 zu ExxK mutiert. Das Arginin ist aber in allen bisher bestätigten Separaseschnittstellen in Scc1, Rec8, Separase und Slk19 organismenüberspannend konserviert (Abschnitt 2.2.4.3). Um zu überprüfen, ob PIPS dennoch ein Separasesubstrat darstellt, wurde es *in vitro* in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin exprimiert und mit aktiver und inaktiver Separase behandelt. Hierbei zeigte sich, dass PIPS *in vitro* nicht durch Separase gespalten wird (nicht gezeigte Daten). Bezeichnenderweise weist GASP ähnlich wie Scc1 und Rec8 eine sehr hohe Dichte an negativ geladenen Aminosäuren auf. Es wird vermutet, dass GASP aufgrund dieser Eigenschaft von Separase gespalten wird, ohne dass dieser Spaltung eine physiologische Bedeutung zukommt. Dieses Projekt wurde daher nicht weiter bearbeitet. Stattdessen wurde die inzwischen entdeckte Interaktion zwischen Separase und der mitotischen Cyclin B1/Cdk1-Kinase näher untersucht.

## 3.2 Der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex

### 3.2.1 Phosphorylierung von Separase ist notwendig aber nicht hinreichend für deren Securin-unabhängige Inhibition

Inkubation von Separase-Securin-Komplexen in *Xenopus*-Oozytenextrakt, der mit nicht abbaubarem Cyclin B1 ( $\Delta 90$ ) niedriger Konzentration versetzt wurde (Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt), führt zur Aktivierung der proteolytischen Separaseaktivität durch Degradation von Securin. Inkubiert man den Komplex jedoch in Oozytenextrakt mit hoher  $\Delta 90$ -Konzentration (Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt), bleibt die Separase trotz Securinabbaus inaktiv (Stemmann et al., 2001). Es war bereits bekannt, dass die Phosphorylierung von Separase an Serin 1126 und Threonin 1346 für die Securin-unabhängige Separase-Inhibition in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt notwendig ist (Stemmann et al., 2001). Offen blieb jedoch, ob sie hierfür auch ausreicht, oder ob ein Koinhibitor mit phosphorylierter Separase im Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt assoziiert.

Zur Klärung dieses Umstands wurde folgendes Experiment durchgeführt: Inhibierte Separase wurde aus einem Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt rückisoliert und mit Waschpuffern steigender Ionenstärke gewaschen, um durch Konkurrenz mit ionischen Wechselwirkungen mögliche Bindepartner zu dissoziieren. Anschließend wurde die Proteaseaktivität untersucht, und zwar sowohl durch Bestimmung der Separase-Selbstspaltung mittels anti-Separase-Western-Blots, als auch durch autoradiographische Analyse der Spaltung  $^{35}\text{S}$ -markierten Cohesins (Scc1). Abbildung 8 zeigt, dass Wildtyp-Separase (Separase-wt) nach Inkubation in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt und Waschen mit Niedrigsalzpuffer (100 mM NaCl) Scc1 erwartungsgemäß nicht spalten kann, d.h. proteolytisch inaktiv ist. Interessanterweise wird Separase jedoch durch Waschen mit Puffern steigender Ionenstärke (250 mM bis 1000 mM NaCl) zunehmend aktiviert. Sie besitzt jetzt sowohl die Fähigkeit radioaktiv markiertes Scc1 als auch sich selbst zu spalten. Im Gegensatz zum Wildtyp ist mutierte Separase, bei der Serin 1126 und Threonin 1346 zu nicht phosphorylierbaren Alaninresten mutiert wurden (Separase-PM1126/1346), bereits nach Waschen mit 100 mM NaCl fast vollständig aktiv. Da ausgeschlossen werden kann, dass Waschen mit Hochsalzpuffern eine kovalente Phosphorylierung rückgängig macht, ist die Phosphorylierung von Separase zwar essentiell aber nicht ausreichend für die Inhibition der Protease in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt. Dieser Befund legt also in der Tat die Existenz eines bislang unbekanntem Inhibitors nahe, welcher an Separase in Abhängigkeit von deren Phosphorylierung an den Resten Serin 1126 und Threonin 1346 bindet und bei einer Behandlung mit Hochsalzpuffer dissoziiert.



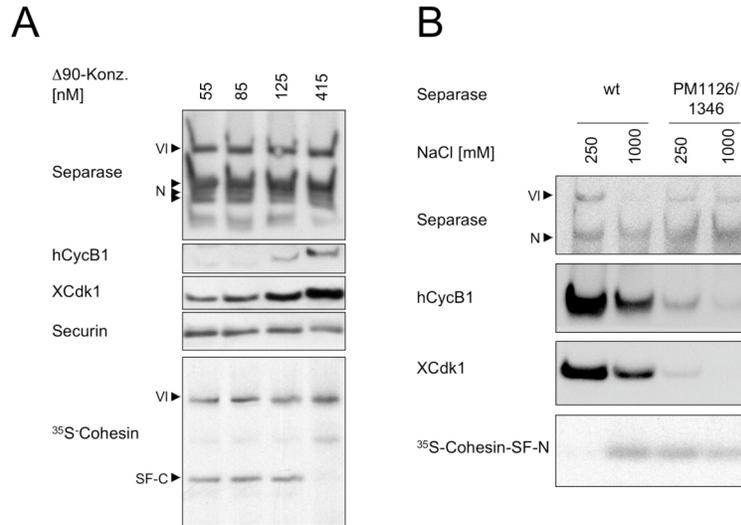
**Abbildung 8: In Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt inhibierte Separase-wt wird durch Waschen mit Hochsalz-Puffer reaktiviert**

ZZ-TEV<sub>4</sub>-Epitop-markierte Separase-wt oder -Separase-PM1126/1346 wurden im Komplex mit Securin isoliert. Nach Inkubation in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt wurden die Separasen dreimal mit Puffer der NaCl-Konzentration 100 mM, 250 mM, 500 mM oder 1000 mM gewaschen. Anschließend wurden die Separasen mit TEV-Protease eluiert. Es folgte ein Western-Blot gegen Separase mit anti-Separase-N, sowie eine autoradiographische Bestimmung der Separase-Aktivität nach Inkubation mit <sup>35</sup>S-markiertem Cohesin (Scc1).

VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminus; SF-N: Aminoterminales Schnittfragment; SF-C: Carboxyterminales Schnittfragment

### 3.2.2 Cyclin B1-Cdk1 erfüllt die Voraussetzungen eines Separaseinhibitors

In der Tat zeigt ein Vergleich der mit Separase assoziierten Proteine nach Rückisolierung aus Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt eine Assoziation der mitotischen Kinase Cyclin B1-Cdk1 mit wildtypischer Separase. Diese Interaktion findet in weit geringerem Maß mit der inhibitionsresistenten, nicht phosphorylierbaren Separase-PM1126/1346 statt (Gorr et al., 2005). Die inhibitorischen Phosphorylierungsstellen an den Positionen 1126 und 1346 entsprechen der Konsensussequenz für Substrate der Cyclin B1-Cdk1-Kinase (Serin/Threonin – Prolin). Tatsächlich kann Cyclin B1-Cdk1 Serin 1126 *in vitro* effektiv phosphorylieren (Stemmann et al., 2001). Cyclin B1-Cdk1 könnte durch Phosphorylierung von Separase also seine eigene Bindung ermöglichen.



**Abbildung 9: Cyclin B1/Cdk1-Assoziation mit Separase korreliert mit Separase-Inhibition in Hoch-Δ90-Extrakt**

(A) Zunehmende Cyclin B1-Δ90-Konzentrationen in *Xenopus*-Anaphase-Extrakt führen zu zunehmender Cyclin B1/Cdk1-Assoziation mit Separase und Separase-Inhibition. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Epitop-markierte Separase-wt/Securin wurde in Δ90-Extrakt mit steigenden Konzentrationen von Cyclin B1-Δ90 (55 nM, 85 nM, 125 nM oder 415 nM) inkubiert. Nach Rückisolation wurde die Separase mit Niedrigsalz-Puffer (100 mM NaCl) gewaschen, mit TEV-Protease eluiert und durch Inkubation mit <sup>35</sup>S-makiertem Scc1 auf ihre proteolytische Aktivität getestet, bzw. durch Western-Blot mit den Antikörpern anti-Separase-N, anti-hCyclin B1, anti-XCdk1 und anti-Securin analysiert. (B) Verminderte Cyclin B1/Cdk1-Assoziation durch Waschen mit hoher Salzkonzentration oder durch Mutation von Serin 1126 und Threonin 1346 korreliert mit Separase-Aktivität nach Rückisolation aus Hoch-Δ90-Extrakt. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Epitop-markierte Separase-wt und -Separase-PM1126/1346 wurden in Hoch-Δ90-Extrakt mit 550 nM hCyclin B1-Δ90 inkubiert und anschließend dreimal mit Niedrigsalz- (250 mM NaCl) oder Hochsalz-Puffer (1000 mM NaCl) gewaschen. Nach Elution durch TEV-Protease wurde die Separase-Aktivität durch Inkubation mit <sup>35</sup>S-markiertem Scc1 und anschließender Autoradiographie und die Mengen von Separase, hCyclin B1, XCdk1 durch Western-Blot-Analyse mit den in (A) genannten Antikörpern bestimmt.

VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminal; SF-N: Aminoterminales Schnittfragment; SF-C: Carboxyterminales Schnittfragment

Falls die stabile Assoziation von Separase mit Cyclin B1/Cdk1 tatsächlich der Vorgang ist, der zur Hemmung von Separase im Hoch-Δ90-Extrakt führt, so muss diese Wechselwirkung zwei Voraussetzungen erfüllen:

- Erstens muss der Anteil von Separase, der mit Cyclin B1-Cdk1 assoziiert vorliegt, mit steigender Cyclin B1-Δ90-Konzentration im Oozytenextrakt (oder sinkender Separaseaktivität) zunehmen.
- Zweitens muss dieser Anteil beim Waschen von inhibierter Separase aus Hoch-Δ90-Extrakt mit steigender Ionenstärke (oder steigender Separaseaktivität) abnehmen.

Um die erste Voraussage zu überprüfen, wurde Separase in Oozytenextrakten steigender Cyclin B1-Δ90-Konzentration inkubiert. Nach anschließender Rückisolierung und

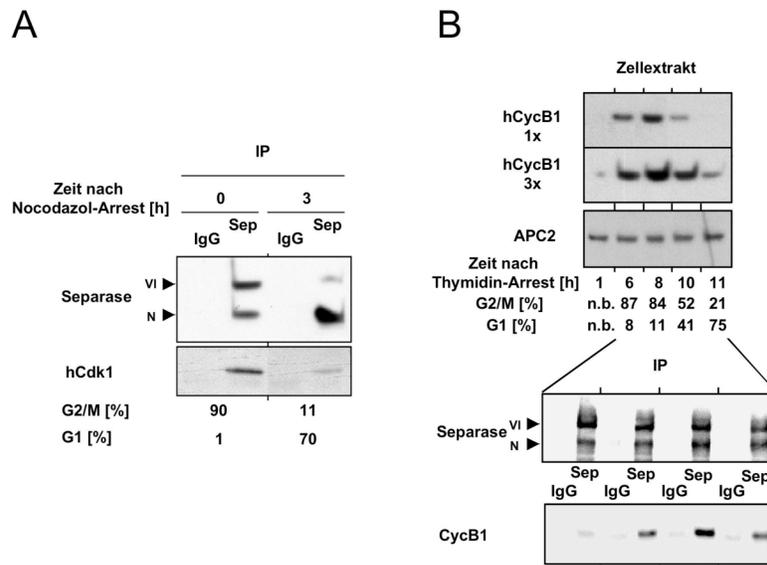
Waschen unter Niedrigsalzbedingungen wurde die Separase wie zuvor auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht. Die relative, mit Separase assoziierte Menge von Cyclin B1/Cdk1 wurde durch einen Western-Blot mit anschließender Detektion von Separase, Cyclin B1 und Cdk1 bestimmt. In Abbildung 9A ist zu sehen, dass die erste der oben genannten Voraussagen zutrifft: Separase assoziiert mit umso mehr Cyclin B1- $\Delta$ 90 und Cdk1, je mehr Cyclin B1- $\Delta$ 90 im Oozytenextrakt vorhanden ist. Gleichzeitig nimmt ihre proteolytische Aktivität ab. Die Restmenge des nach Extraktinkubation noch mit Separase assoziierten Securins ist bei allen  $\Delta$ 90-Konzentrationen gleich. Das bedeutet, dass die unterschiedliche Separaseaktivität nicht durch unterschiedlich effizienten Securinabbau bei verschiedenen Cyclin B1- $\Delta$ 90-Konzentrationen hervorgerufen wird.

Nun wurde getestet, ob Cyclin B1/Cdk1 durch Waschen mit Puffern hoher Ionenstärke von der Separase eluiert wird, die zweite der oben formulierten Voraussetzungen. Dazu wurden Separase-wt und nicht inhibierbare Separase-PM1126/1346 in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt inkubiert und anschließend mit Niedrig- bzw. Hochsalzpuffer gewaschen. Danach wurden sowohl die Menge der mit Separase assoziierten Kinase als auch die Separaseaktivität analysiert. Abbildung 9B stellt dar, dass die Menge der Separase-gebundenen Cyclin B1/Cdk1 nach Waschen mit Hochsalzpuffer geringer ist als bei Waschen mit Niedrigsalzpuffer. Im Gegenzug nimmt die proteolytische Separaseaktivität wie gefordert zu. Die Menge von Cyclin B1/Cdk1, die mit Separase-PM1126/1346 wechselwirkt, ist selbst unter Niedrigsalzbedingungen geringer als die, die mit Separase-wt unter Hochsalzbedingungen interagiert. Dies lässt darauf schließen, dass das Cyclin B1/Cdk1-Signal unter diesen Bedingungen überwiegend eine spezifische Wechselwirkung mit Separase wiedergibt und keine unspezifische Bindung an die mit Separase beladenen Sepharosepartikel. Somit ist also auch die zweite Voraussetzung erfüllt: Waschen unter Hochsalz-Bedingungen eluiert einen Großteil von Cyclin B1/Cdk1 von Separase und aktiviert die Separase-Protease-Aktivität. Cyclin B1/Cdk1 selbst könnte also der postulierte Separaseinhibitor sein.

### 3.2.3 Der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex in lebenden Zellen

Um die *In-vivo*-Relevanz der vorausgehenden *In-vitro*-Experimente zu überprüfen, wurden folgende Fragen experimentell erörtert:

- Existiert der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex auch in lebenden Zellen, wenn keine der Komponenten überexprimiert wird?
- In welcher Zellzyklusphase tritt der Komplex *in vivo* auf?
- Können Securin und Cyclin B1/Cdk1 gleichzeitig an Separase binden?



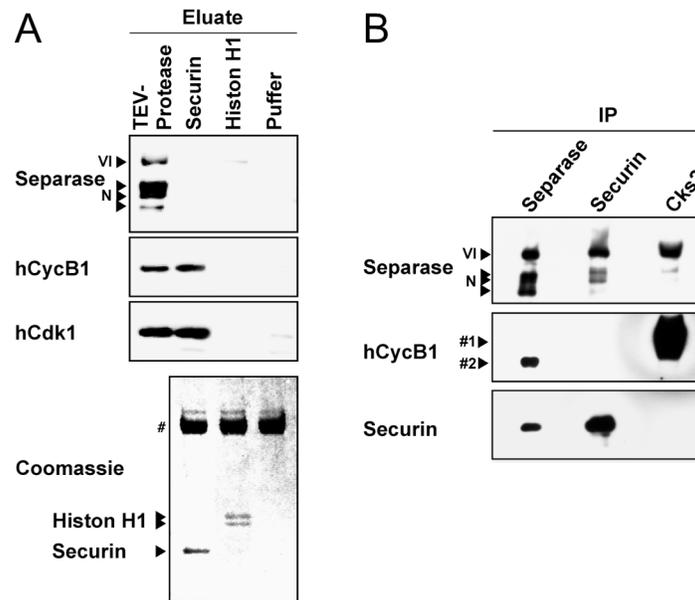
**Abbildung 10: Separase-Cyclin B1/Cdk1 existiert in mitotischen Zellen unter endogenen Bedingungen**

(A) Der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex existiert in Prometaphase-Zellen. HeLaS3-Zellen wurden durch Thymidin-, gefolgt von einer Nocodazol-Behandlung in der Mitose arretiert. Ein Teil der Zellen wurden aus dem Nocodazol-Block für 3 h entlassen und dadurch in der G<sub>1</sub>-Phase angereichert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren lysiert. Immobilisierter anti-pSX38-Antikörper in einer Konzentration von ca. 0,1 µg/1 x 10<sup>6</sup> Zellen oder gleiche Mengen Kontroll-IgG wurden anschließend für eine Immunpräzipitation (IP) aus diesen Lysaten verwendet. Die Immunpräzipitate wurden danach durch Western-Blot-Analyse mit den Antikörpern anti-Separase-N und anti-hCdk1 auf gebundene Separase und Cdk1 hin untersucht. Das Zellzyklus-Stadium der verwendeten Zellen wurde durch Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse eines Teils der synchronisierten Zellen bestimmt. (B) Der Komplex existiert in Zellen mit ungestörter Mitose. HeLaS3-Zellen wurden durch zweifache Thymidin-Behandlung in der S-Phase angereichert und anschließend durch Wegwaschen des Thymidins aus diesem Block für 1 h, 6 h, 8 h, 10 h oder 11 h entlassen. Danach wurden die Zellen wie unter (A) beschrieben analysiert. Zusätzlich zur FACS-Analyse wurde das Zellzyklusstadium durch Western-Blot-Analyse hinsichtlich Cyclin B1-Akkumulation bei Eintritt und Cyclin B1-Abbau bei Austritt aus der Mitose bestimmt. Als Kontrolle für gleichmäßige Proteinladung wurde ein Western-Blot gegen APC2 angefertigt. VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminus; n.b.: nicht bestimmt;

- Sind die inhibitorischen Phosphorylierungen von Separase-Serin 1126 und Threonin 1346 auch *in vivo* für die Komplexbildung erforderlich?

### 3.2.3.1 Zellzyklus-abhängige Wechselwirkung endogener Separase und Cyclin B1/Cdk1

Um möglichst wenig in die Physiologie der Zelle einzugreifen, wurde endogene Separase aus synchronisierten HeLaS3-Zellen immunpräzipitiert und auf Assoziation mit Cyclin B1 oder Cdk1 hin analysiert. Dazu wurde ein Antikörper gegen humane Separase verwendet (anti-pSX38), während unspezifisches IgG als Negativkontrolle diente.



**Abbildung 11: Securin- und Cyclin B1/Cdk1 können nicht gleichzeitig an Separase binden**

(A) Securin verdrängt spezifisch Cyclin B1/Cdk1 aus dem Komplex mit Separase. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase-Cyclin B1/Cdk1 wurde in Hoch-Δ90-Extrakt gebildet und anschließend mit 30 μg rekombinantem Securin, Histon H1 oder als Kontrollen Puffer bzw. TEV-Protease in Anwesenheit von 1 μg/μl BSA inkubiert. Die Eluate wurden danach sowohl durch Western-Blot mit anti-Separase-N, anti-hCyclin B1 und anti-XCdk1 als auch durch Coomassie-Blau-Färbung analysiert. (B) Securin- und Cyclin B1/Cdk1-Interaktion mit Separase schließen sich auch in Zellen aus. Myc<sub>6</sub>-Tev<sub>2</sub>-Separase, Securin-(His<sub>6</sub>-Flag)<sub>2</sub>, RGS-2xHis<sub>6</sub>-Tev<sub>2</sub>-Cyclin B1-Δ90, hCdk1 und HA<sub>3</sub>-Cks2 wurden in 293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden anschließend durch Nocodazol in der Mitose arretiert und dann lysiert. Aus den Lysaten wurden danach entweder Separase, Securin oder Cyclin B1/Cdk1/Cks2 durch Immunpräzipitation gegen Myc, Flag oder HA isoliert und durch Western-Blot mit anti-Separase-N, anti-Securin und anti-hCyclin B1 auf assoziierte Proteine hin untersucht.

VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminus; #: BSA; #1: His<sub>6</sub>-TEV<sub>2</sub>-Cyclin B1; #2: Cyclin B1

In der Tat konnte so eine spezifische Interaktion von Cdk1 mit Separase in Nocodazol-arretierten Zellen nachgewiesen werden, die beim Entlassen der Kultur in die G1-Phase verloren geht (Abbildung 10A). Da Securin in Gegenwart von Nocodazol stabil ist, weist dieses Ergebnis auf die Koexistenz von Separase-Cyclin B1-Cdk1- und Separase-Securin-Komplexen oder auf die Anwesenheit eines Separase-Cyclin B1/Cdk1-Securin-Komplexes in der Prometaphase hin.

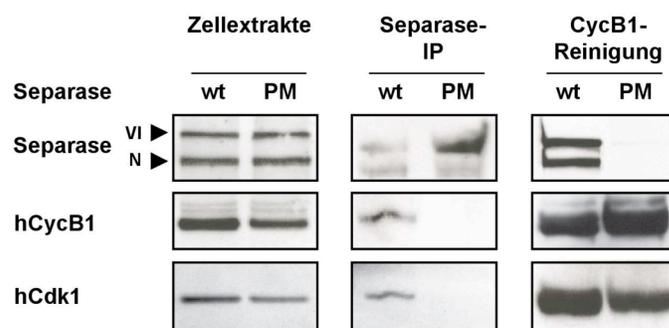
Nocodazol-Behandlung ermöglicht zwar die Analyse einer sehr homogenen mitotischen Zellpopulation, gibt aber nicht den Zustand einer ungestörten Mitose wider. In einem zweiten Experiment wurden daher Zellen untersucht, die ausgehend von einem Thymidin-induzierten S-Phase-Arrest eine synchrone Mitose durchlaufen. Wie in Abbildung 10B gezeigt, lässt sich Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex auch unter diesen Bedingungen in mitotischen Zellen nachweisen, während in Zellen vor und nach der Mitose (6h bzw. 11h) deutlich weniger Separase mit der Kinase assoziiert vorliegt.

Interessanterweise ist die Komplexbildung 10 Stunden nach Entlassen aus Thymidin maximal, obwohl zu diesem Zeitpunkt die meisten Zellen die Anaphase schon eingeleitet haben. Zum einen ist das an dem schon sinkenden Cyclin B1-Spiegel, zum anderen an dem zunehmenden Grad der Separase-Selbstspaltung zu erkennen. Da Securin, das früher in der Mitose Separase praktisch quantitativ komplexiert, gleichzeitig mit Cyclin B1 APC/C-vermittelt abgebaut wird, ist es zu diesem Zeitpunkt schon teilweise abgebaut. Es könnte daher sein, dass Cyclin B1/Cdk1 möglicherweise nur an Securin-freie Separase binden kann.

### **3.2.3.2 Securin- und Cyclin B1/Cdk1-Bindung an Separase schließen sich gegenseitig aus**

Zunächst wurde in einem genau definierten *In-vitro*-System überprüft, ob Securin Cyclin B1/Cdk1 aus einem Komplex mit Separase verdrängen kann. Dazu wurde der immobilisierte Komplex aus Separase und Cyclin B1/Cdk1 entweder mit rekombinantem Securin, dem Cyclin B1/Cdk1-Modellsubstrat Histon H1 als Kontroll-Protein oder Kontroll-Puffer inkubiert. Als Vergleichsprobe wurde der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex durch TEV-Protease-Behandlung eluiert. Alle Eluate wurden danach per Western-Blot gegen Separase, Cyclin B1 und Cdk1 analysiert. Es zeigte sich, dass zwar bei Konkurrenz mit Securin, nicht jedoch mit Histon H1 und Puffer die Kinase-Komponenten im Eluat nachweisbar sind, während Separase nur im TEV-Eluat zu sehen ist (Abbildung 11A). Im gereinigten System verdrängt Securin also Cyclin B1/Cdk1 aus dem Komplex mit Separase. Das heißt, Securin und Cyclin B1/Cdk1 binden nicht gleichzeitig an Separase. Nebenbei legt dieses Experiment nahe, dass es sich bei der Wechselwirkung der Separase mit der Kinase nicht um eine Kinase-Substrat-Beziehung handelt, da Histon H1 als sehr gutes Cyclin B1/Cdk1-Substrat die Interaktion mit Separase nicht zu stören vermag.

Der Befund, dass Separase nicht gleichzeitig Cyclin B1/Cdk1 und Securin binden kann, wurde nun in Zellen überprüft. Dazu wurden alle beteiligten Komponenten mit unterschiedlichen Epitop-Markierungen versehen und nach Expression in 293T Zellen aus den Zelllysaten über ihre Epitop-Markierungen gereinigt. Wie erwartet kopräzipitieren sowohl Cyclin B1, das hier stellvertretend für Cyclin B1/Cdk1/Cks2 betrachtet wurde, als auch Securin mit Separase aus mitotischen Zellextrakten (Abbildung 11B). Wird jedoch Securin affinitätsgereinigt, so ist zwar Separase nachweisbar, nicht aber Cyclin B1. Umgekehrt lässt sich zwar Separase aber kein Securin über Cks2 anreichern. Die Bindung von Securin und Cyclin B1/Cdk1/Cks2 schließt sich



**Abbildung 12: Der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex bildet sich in Zellen abhängig von Separase-Serin 1126 und -Threonin-1346.**

293T-Zellen wurden mit ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase-wt oder -PM1126/1346 (PM) zusammen mit His<sub>6</sub>-hCyclin B1, hCdk1 und Cks2 transient transfiziert, danach mit Nocodazol in der Prometaphase arretiert und anschließend in Anwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren lysiert. Es folgten Affinitätsreinigungen von entweder Separase durch IgG-Sepharose oder Cyclin B1 durch NTA-Agarose aus diesen Lysaten. Die Lysate und die Immunpräzipitationen wurden durch Western-Blot mit anti-Separase-N, anti-hCyclin B1 und anti-hCdk1 analysiert.

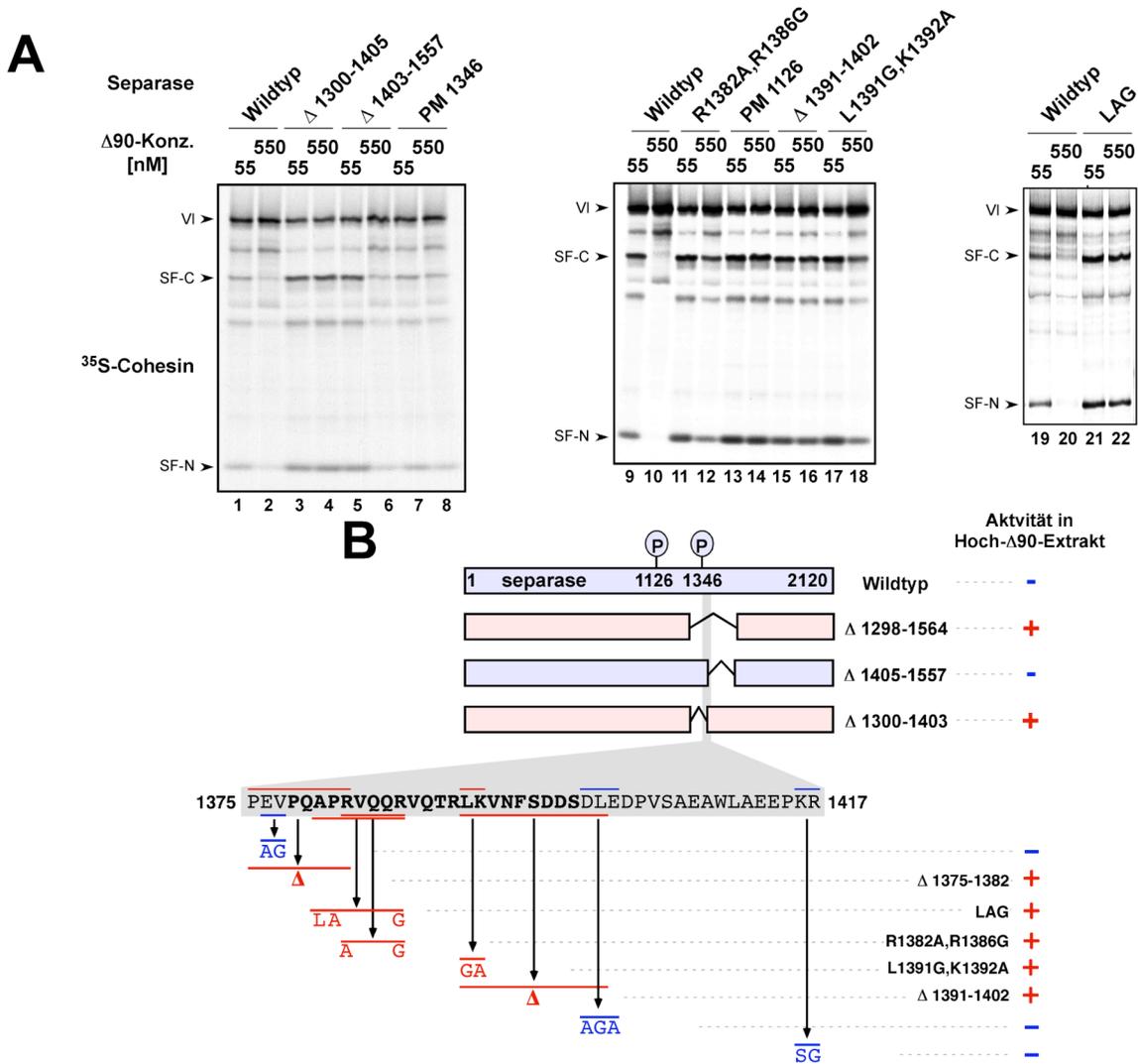
VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminus

also hinsichtlich ihrer Assoziation mit Separase gegenseitig aus, und zwar sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

### 3.2.3.3 Die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Wechselwirkung ist auch *in vivo* von Separase-Phosphorylierung abhängig

Als nächstes wurde überprüft, ob die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung auch *in vivo* von den Cdk1-Phosphorylierungsstellen Serin 1126 und Threonin 1346 abhängt. Dazu wurde die Interaktion von Separase-wt oder -PM1126/1346 mit Cyclin B1/Cdk1 analysiert, indem die Epitop-markierten, überexprimierten Proteine aus mitotisch arretierten 293T-Zellen affinitätsgereinigt wurden. Anschließende Analyse mittels Western-Blots ergab, dass Cyclin B1/Cdk1 nur mit Separase-wt, nicht aber mit Separase-PM1126/1346 interagiert, obwohl beide Separasen gleich gut exprimiert wurden (Abbildung 12). Dieser Befund ist unabhängig davon, ob die Reinigung über Separase oder Cyclin B1 erfolgt.

Die Ausbildung des Komplexes in lebenden Zellen folgt also den gleichen Regeln wie im Oozytenextrakt, das heißt sie hängt von Separase-Phosphorylierung durch Cdk1 ab.



**Abbildung 13: Identifizierung und Charakterisierung der “Cdc6-like-Domäne” (CLD)**

(A) Verschiedene Deletionen und Punktmutationen im Separasebereich der Aminosäuren 1300 und 1405 vermitteln Separase-Resistenz gegen Inhibition in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Epitop-markierte Separase-Deletions- oder Punktmutanten wurden im Komplex mit Securin isoliert und anschließend in Niedrig- (55 nM hCyclin B1- $\Delta$ 90) oder Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt (550 nM hCyclin B1- $\Delta$ 90) inkubiert. Nach Waschen mit Niedrigsalzpuffer (100 mM NaCl) wurden die Separasen TEV-eluiert. Die Separase-Aktivität wurde durch Autoradiographie nach Inkubation mit <sup>35</sup>S-markiertem Sec1 bestimmt. Durch Western-Blot gegen Separase wurde bestätigt, dass gleiche Mengen Separase für deren Aktivitätsbestimmung benutzt wurden. (B) Graphische Zusammenfassung und Erweiterung der in (A) beschriebenen Experimente. Deletion der Bereiche 1298-1564, 1300-1403, 1375-1382 und 1391-1402 sowie die Punktmutationen R1382A/R1386G, L1391G/K1392A und A1380L/P1381A/R1386G (Separase-LAG) vermitteln Separase-Resistenz gegenüber Hemmung in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt, während die Deletion der Aminosäuren 1405-1557 und die Punktmutationen E1376A/V1377G, D1401A/L1402G/E1403A und K1416S/R1417G keinen Einfluss auf die Separase-Sensitivität hinsichtlich Hemmung in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt haben.

VI: Volllängen-Protein; SF-N: Aminoterminales Schnittfragment; SF-C: Carboxyterminales Schnittfragment

### 3.2.4 Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Cyclin B1/Cdk1-Bindemotivs in Separase

Die Punktmutation von Serin 1126 zu Alanin reicht allein aus, um Separase praktisch vollständig resistent gegen Cyclin B1-Cdk1-vermittelter Inhibition in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt zu machen (Abbildung 13A, Spuren 13 und 14) (Stemmann et al., 2001). Darüber hinaus ergaben sich Hinweise auf die Existenz eines zweiten, für die Cyclin B1-Cdk1-Bindung wichtigen Bereichs in Separase: Deletion der Aminosäuren 1298-1564 vermittelt nämlich ebenfalls vollständige Resistenz gegen Hemmung im Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt, obwohl der deletierte Sequenzabschnitt in der Primärstruktur weit von Serin 1126 entfernt liegt (Abbildung 13B und nicht gezeigte Daten). Welcher kleinere Bereich innerhalb dieser großen Deletion für die Bildung des Separase-Cyclin B1-Cdk1-Komplexes wichtig sein könnte, ergab sich aus der Beobachtung, dass Veränderung von lediglich einer Aminosäure, Threonin 1346, zu Alanin bereits eine teilweise Resistenz der Protease gegenüber Inhibition durch die Kinase bewirkt (Abbildung 13A, vergleiche Spuren 1 und 2 mit 7 und 8). Wie oben erwähnt, handelt es sich bei dieser Aminosäure um die zweite, weniger wichtige inhibitorische Phosphorylierungsstelle (Stemmann et al., 2001).

In Übereinstimmung hiermit wird Separase- $\Delta$ 1300-1405 nicht durch Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt gehemmt, während sich Separase- $\Delta$ 1403-1557 wie der Wildtyp inhibieren lässt (Abbildung 13A, vergleiche Spuren 3 und 4 mit 5 und 6). Ein für Cyclin B1/Cdk1-Bindung wichtiger Teil befindet sich also zwischen den Aminosäuren 1300 und 1403. Bioinformatische Analyse dieses Separasebereichs zeigte eine schwache Homologie zu Cdc6 aus *S. cerevisiae* (

Abbildung 14). Interessanterweise wird *S. cerevisiae*-Cdc6 bekanntermaßen durch Assoziation mit Clb2/Cdc28, dem Hefehomolog von humanem Cyclin B1/Cdk1, in seiner Eigenschaft als Lizenzierungsfaktor der DNA-Replikation gehemmt (Mimura et al., 2004). Die Aminosäuren 1342-1404 von humaner Separase weisen eine Identität von 24 % und eine Ähnlichkeit von 41 % (bei 33 % Lücken) mit dem Aminoterminus von *S. cerevisiae*-Cdc6 auf. Und eben dieser ist notwendig und hinreichend für die Bindung von Cdc6 an Clb2/Cdc28 (Mimura et al., 2004).

Zum Test, ob die zwischen Separase und Cdc6 konservierten Reste für die Bildung von Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex notwendig sind, wurden verschiedene kurze Deletionen und Punktmutationen gesetzt. Die Analyse auf Inhibierbarkeit in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt zeigte, dass die Mutation konservierter Aminosäuren im Sequenzabschnitt 1380-1392 (R1382A,R1386G, L1391G,K1392A, A1380L,P1381A,R1386G (Separase-LAG)), sowie die Deletion der Bereiche 1375-1381 und 1391-1402 zu vollständig oder teilweise

```

hSeparase  1342 GLPCTPKPPDRIRQAGPHVFFTVFEEVCPTESKPEVPQ APRVQQRVQTRLKVNFSDDSDLEDF 1404
              ::|  ||      |||:      :|::      || : | | |::|:| : |
S. cerev. Cdc6  3 AIPITP--TKRIRR-----NLFDD-----APATPPRPLKRRKKLQFTDVTPESSP 44
    
```

**Abbildung 14: Der Separasebereich 1342-1404 hat schwache Homologie zum Aminoterminus von Cdc6.**

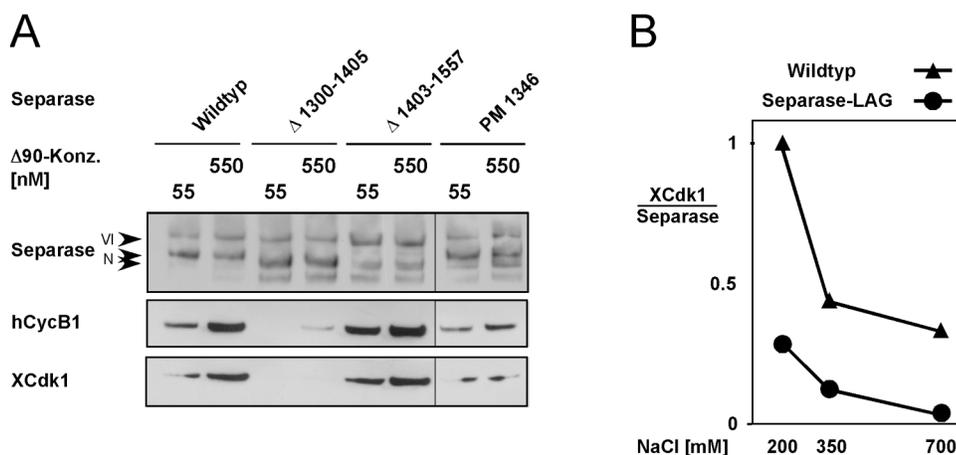
Striche geben gleiche Aminosäuren an, Doppelpunkte solche mit ähnlichen chemischen Eigenschaften. Der homologe Cdc6-Bereich bindet *in vitro* direkt das Hefe-Homolog zu hCyclin B1, Clb2 (Mimura et al., 2004). Die Homologie wurde durch Sequenzvergleich von Separase mit einer linearen Fusion aller bekannten CKIs identifiziert (Gorr et al., 2005). Insgesamt umfasst die homologe Region 24 % gleiche und 41 % ähnliche Aminosäuren bei 33 % Lücken. Grau unterlegt sind für Komplexbildung mit Cyclin B1/Cdk1 wichtige Bereiche.

inhibitionsresistenter Separase führen (Abbildung 13A und B). Dabei hat die 11 Reste umfassende Deletion des Bereichs 1391-1402 den stärksten Effekt, d.h. Separase- $\Delta$ 1391-1402 kann gar nicht mehr in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt inhibiert werden (Abbildung 13A Spuren 15 und 16).

Um zu demonstrieren, dass eine verminderte Inhibierbarkeit von Separasemutanten mit verminderter Cyclin B1/Cdk1-Bindung korreliert, wurden einzelne Mutanten auch auf die Menge assoziierter Kinase hin untersucht. Erwartungsgemäß waren inhibitionsresistente Separasemutanten ( $\Delta$ 1300-1405 und PM1346) nach Rückisolierung aus Niedrig- oder Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt auch mit weniger Cyclin B1/Cdk1 assoziiert als der Wildtyp (Abbildung 15A). Die inhibierbare Separase- $\Delta$ 1403-1557 bindet Cyclin B1/Cdk1 hingegen ebenso gut wie Separase-wt.

Für die nicht hemmbare dreifach punktmutierte Separase-A1380L,1381A,R1386G (Separase-LAG) wurde dies auch semiquantitativ untersucht. Dazu wurden aus Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt rückisolierte Separase-wt und Separase-LAG mit Niedrig- bzw. Hochsalzpuffern gewaschen. Die Signalstärke für Cdk1 im anschließenden Western-Blot wurde auf die Signalstärke für Separase normiert und dann graphisch gegen die verschiedenen Salzkonzentrationen im Waschpuffer aufgetragen. Schon bei 200 mM NaCl in der Waschlösung bindet Separase-LAG weniger Cdk1 als Separase-wt (Abbildung 15B). Waschen mit 700 mM NaCl entfernt dann Cdk1 komplett von der Mutante, während noch ca. 35 % der ursprünglichen Menge von Cdk1 mit dem Wildtyp assoziiert bleiben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle der getesteten, zwischen Separase und Cdc6 konservierten Aminosäuren wichtig für die Ausbildung des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes sind, wenngleich diese auch nicht als Einzel-Punktmutationen überprüft worden sind. Aufgrund dieser Analyse wurde der Separasebereich zwischen den Aminosäuren 1340 und 1403 "Cdc6-Like-Domain" (CLD) benannt.

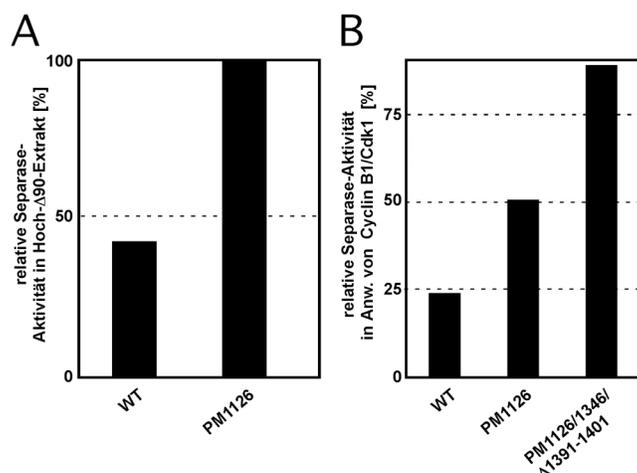


**Abbildung 15: Separase-Resistenz gegen Inhibition in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt korreliert mit verminderter Cyclin B1/Cdk1-Bindung**

(A) Die inhibitionsresistenten Separasemutanten Separase- $\Delta 1300-1405$  und -PM1346 binden Cyclin B1/Cdk1 schlechter als Separase-wt oder die sensitive Separase- $\Delta 1403-1557$ . Der Grad der Resistenz spiegelt sich umgekehrt in der Cyclin B1/Cdk1-Bindefähigkeit wider. Separasen von Abbildung 13A wurden für eine Western-Blot-Analyse verwendet. Zur Detektion dienten die Antikörper anti-Separase-N, anti-hCyclin B1 und anti-XCdk1. (B) Separase-LAG bindet schlechter XCdk1 als Separase-wt. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase-wt und -LAG (A1380L/P1381A/R1386G) wurden in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt inkubiert, mit Puffern der NaCl-Konzentrationen 200 mM, 350 mM oder 700 mM gewaschen und anschließend durch Western-Blot-Analyse auf die Menge von Separase und XCdk1 hin untersucht. Zur Quantifizierung der an Separase gebundenen Menge von Cdk1 wurde die Signalstärke für XCdk1 auf die Signalstärke für Separase bezogen, um die relative XCdk1-Bindung zu erhalten. Die relative XCdk1-Bindung für Separase-wt bei 200 mM NaCl wurde auf den Wert 1 gesetzt und alle weiteren Werte wurden darauf normiert.

VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminus

Nun wurde der Einfluss von Serin 1126-Phosphorylierung und der CLD auf die Separase-Inhibition miteinander verglichen. Bei den in Oozytenextrakten und *in vivo* herrschenden Konzentrationen an Cyclin B1/Cdk1 reicht die Mutation von Serin 1126 allein aus, um Separase vollständig resistent gegen Securin-unabhängige Inhibition zu machen (Abbildung 16A und Stemmann et al., 2001). Bei Separase-Hemmung im gereinigten System mit rekombinanter Cyclin B1/Cdk1-Kinase kann die proteolytische Aktivität der Separase-PM1126 durch hohe Konzentrationen an rekombinanter Cdk1 aber noch zu 50 % inhibiert werden (Abbildung 16B). Da Separase-PM1126 also im gereinigten System noch teilweise sensitiv für Hemmung durch B1/Cdk1 ist, konnte in diesem System getestet werden, ob Inaktivierung der CLD Separase-PM1126 zusätzliche Resistenz gegen Cyclin B1/Cdk1 verleiht. In der Tat resultiert die Inaktivierung der CLD zusätzlich zur Serin-1126-Alanin-Mutation (Separase-PM1126/1346/ $\Delta 1391-1402$ ) in einer Separase, die nur noch zu 11 % inhibierbar ist (89 % Restaktivität; Abbildung 16B). Dies bestätigt, dass beide, Serin 1126 und die CLD, zur Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung beitragen. Darüber hinaus legen diese Ergebnisse nahe, dass die CLD



**Abbildung 16: Mutation von Separase-Serin 1126 zu Alanin reicht in  $\Delta$ 90-Extrakt, aber nicht im rekombinanten System aus für vollständige Cyclin B1/Cdk1-Bindungs-Resistenz**

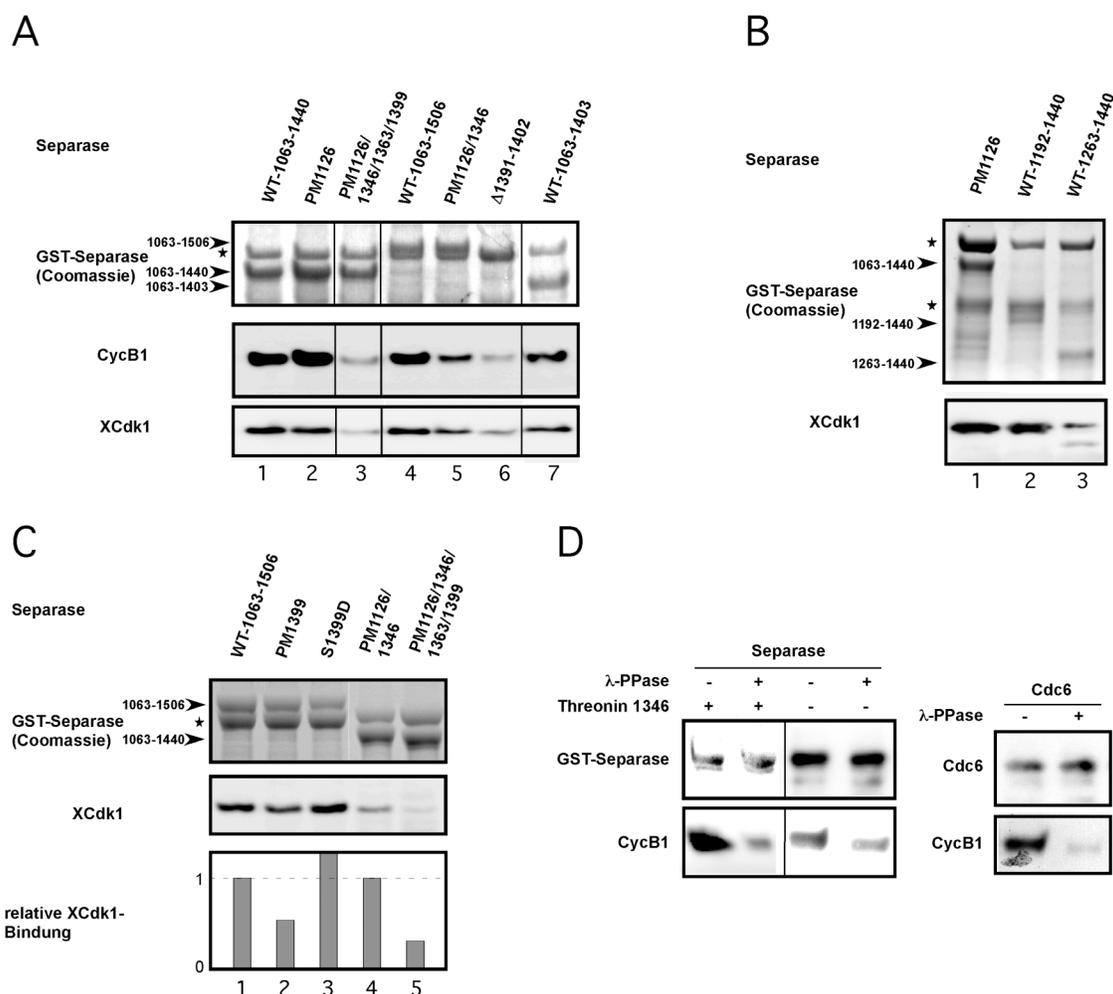
(A) Separase-PM1126 ist vollständig resistent gegen Inhibition in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase-wt oder -PM1126 im Komplex mit Securin wurden in Niedrig- (55 nM Cyclin B1- $\Delta$ 90) oder Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt (550 nM Cyclin B1- $\Delta$ 90) in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin-markiertem Scc1 inkubiert. Alle Ansätze wurden dreifach ausgeführt und beide Separasen zeigten eine ähnlich hohe Aktivität in Niedrig- $\Delta$ 90-Extrakt. Die Separase-abhängige Scc1-Spaltung wurde durch semiquantitative Autoradiographie bestimmt. Dazu wurden die Mittelwerte der Signalstärken des aminoterminalen Cohesin-Schnittfragments in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt gebildet und auf die Aktivität in Niedrig- $\Delta$ 90-Extrakt normiert (relative Aktivität).

(B) Separase ist gegen Inhibition durch rekombinante Cyclin B1/Cdk1 nur dann maximal resistent, wenn Serin 1126 und die CLD mutiert sind. Aus Niedrig- $\Delta$ 90-Extrakt rückisolierte Separase-wt, -PM1126, und -PM1126/1346/ $\Delta$ 1391-1402 wurden mit TEV-Protease von der Sepharose eluiert. Die Separasen wurden daraufhin mit Cyclin B1/Cdk1-Puffer oder Cyclin B1/Cdk1 15 min vorinkubiert. Dann wurde <sup>35</sup>S-markiertes Scc1 zugefügt, um anschließend die Separase-Aktivität durch semiquantitative Autoradiographie zu untersuchen. Alle Ansätze wurden dreifach ausgeführt und alle Separasen zeigten eine ähnlich hohe Aktivität in Puffer. Die semiquantitative Auswertung erfolgte wie in (A) mit der Ausnahme, dass die Inhibition durch Normierung der Signalstärken der Ansätze mit rekombinanter Kinase auf die mit Kinase-Puffer erfolgte.

prinzipiell auch ohne phosphoryliertes Serin 1126 als Cyclin B1/Cdk1-bindendes Element fungieren kann.

### 3.2.5 Serin 1126-unabhängige, aber CLD-abhängige Bindung von Separasefragmenten an Cyclin B1/Cdk1

Die Identifizierung kurzer Cdk1-Bindungsdeterminanten in Separase ließ es möglich erscheinen, dass sich die genaue Anatomie des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes auch mithilfe von leicht herzustellenden Separasefragmenten untersuchen lassen. Es wurde daher getestet, ob:



**Abbildung 17: Die Assoziation von Separasefragmenten mit Cyclin B1/Cdk1 geschieht in Abhängigkeit von CLD-Phosphorylierung, aber unabhängig von Serin 1126**

(A) Separase-1063-1440/1506 assoziiert mit Cyclin B1/Cdk1 in Abhängigkeit von Bindungs determinanten in der CLD (Threonin 1346 und Aminosäuren 1391-1402), aber unabhängig von Serin 1126 und dem Bereich 1404-1440. GST-Separase-1063-1440-wt, -PM1126, -PM1126/1346/1363/1399, GST-Separase-1063-1506-wt, -PM1126/1346, -Δ1391-1402 und GST-Separase-1063-1403 wurden in Bakterien exprimiert und aus den Lysaten affinitäts gereinigt. Die immobilisierten GST-Separasen wurden in Hoch-Δ90-Extrakt inkubiert, unter Nidrigsalz-Bedingungen (100 mM NaCl) gewaschen und anschließend mit Glutathion eluiert. Die Analyse auf gebundene Cyclin B1/Cdk1-Kinase erfolgte durch Western-Blot mit den Antikörpern anti-hCyclin B1 und anti-XCdk1. Die Menge der GST-Separase wurde durch Färbung des oberen Teils des SDS-Gels mit Coomassie-Blau bestimmt. (B) Die Aminosäuren 1192-1263, nicht jedoch die Aminosäuren 1063-1192, sind wichtig für die Etablierung des GST-Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes. GST-Separase-PM1126-1063-1440, -1192-1440 und -1263-1440 wurden wie in (A) beschrieben auf Bindung von Cyclin B1/Cdk1 in Hoch-Δ90-Extrakt hin untersucht. (C) Serin 1399-Phosphorylierung trägt zur GST-Separase-Bindung an Cyclin B1/Cdk1 bei. GST-Separase-1063-1506-wt, -PM1399 und -S1399D sowie GST-Separase-1063-1440-PM1126/1346 und -PM1126/1346/1363/1399 wurden wie in (A) beschrieben auf Bindung von Cyclin B1/Cdk1 in Hoch-Δ90-Extrakt hin untersucht. Für die semiquantitative Darstellung der Cyclin B1/Cdk1-Bindeeffizienz wurde die Signalstärke für XCdk1 auf die Separase-Menge im Coomassie-gefärbten Gel normiert, um die relative XCdk1-Bindung zu erhalten. Die relativen XCdk1-Bindungen von GST-Separase-1063-1506-wt bzw. GST-Separase-1063-1440-PM1126/1346 wurden auf den Wert 1 gesetzt. Die relativen XCdk1-Bindungen der GST-Separasemutanten wurden auf die Werte ihrer entsprechenden Kontroll-Separase bezogen. (D) Separasefragmente binden wie der Cdc6-N-Terminus phosphorylierungsabhängig an Cyclin B1/Cdk1. Dabei sind Phosphorylierungen

zusätzlich zu Separase-Phosphothreonin 1346 beteiligt. Immobilisierte GST-Separase-1063-1440-wt – PM1126 und PM1126/1346 bzw. N-terminale Cdc6-Fragmente (Aminosäuren 1-48) im Komplex mit Cyclin B1/Cdk1 wurden mit  $\lambda$ -Phosphatase oder -Puffer behandelt, mit Bindungspuffer gewaschen und durch Glutathion eluiert. Das Eluat wurde durch Western-Blot-Analyse mit anti-hCyclin B1-Antikörper auf assoziiertes Cyclin B1 getestet. Als Ladekontrolle diente Ponceau-Färbung der Western-Blot-Membran (GST-Separase-1063-1440-PM1126) oder Western-Blot mit anti-GST-Antikörper (GST-Separase-1063-1440-PM1126/1346, GST-Cdc6-N-Terminus).

1063-1440, 1063-1506, 1063-1403, 1192-1440, 1263-1440: GST-Separasefragmente der angegebenen Längen; Stern: "unspezifische" im Extrakt assoziierte Proteine

- Cyclin B1/Cdk1 spezifisch an kurze Separasefragmente bindet
- die Komplexbildung auch in diesem Fall von Serin-1126-Phosphorylierung und der Anwesenheit der CLD abhängig ist.

Dazu wurde die Wechselwirkung zwischen bakteriell exprimierten GST-Separasefragmenten (Aminosäuren 1063-1506 bzw. 1063-1440) und Cyclin B1/Cdk1 in Oozytenextrakt untersucht. Die Fragmente wurden nach Reinigung des GST-Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes aus Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt per Western-Blot auf die mit der Separase assoziierte Menge von Cyclin B1/Cdk1 hin untersucht.

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass GST-Separase-PM1126 überraschenderweise gleich gut Cyclin B1/Cdk1 bindet wie Separase-wt. Separase- $\Delta$ 1391-1402 hingegen assoziiert erwartungsgemäß mit deutlich weniger Cyclin B1/Cdk1, obwohl die eingesetzten GST-Separase-Mengen vergleichbar sind (Abbildung 17A, vergleiche Spuren 1 und 2 bzw. 4 und 6). Letzteres verdeutlicht, dass die Wechselwirkung zwischen Cyclin B1/Cdk1 und den Separasefragmenten spezifisch ist und nicht eine unspezifische Bindung an die mit Separase beladene Sepharose wiedergibt. Diese Ergebnisse zeigen weiter, dass die Interaktion zwischen Cyclin B1/Cdk1 und den GST-Separase-1063-1140/1506-Fragmenten, anders als bei Vollängen-Separase, unabhängig von Phosphorylierung an Serin 1126 ist. Die CLD hingegen wird für die Interaktion mit der Kinase benötigt. Es handelt sich also um ein einfaches System, das zur Untersuchung der Wirkungsweise der CLD ohne Einfluss von Serin 1126 geeignet ist.

Um einen minimalen Bindebereich für effiziente Cyclin B1/Cdk1-Wechselwirkung zu identifizieren, wurden nun verkürzte Versionen der GST-Separasefragmente getestet. Verkürzt man die Separasefragmente C-terminal durch Deletion der Aminosäuren 1404-1440 (Separase-1063-1403), so verliert man die Cyclin B1/Cdk1-Bindfähigkeit nicht (Abbildung 17A, vergleiche Spuren 1 und 7). Das gleiche ist der Fall, wenn man ein N-terminal verkürztes GST-Separase-Fragment benutzt, dem die Aminosäuren 1063-1192 (Separase-1192-1440) fehlen. Deletiert man hingegen weitere 73 Aminosäuren (Separase-1263-1440), so zerstört man einen großen Teil der Cyclin B1/Cdk1-Bindfähigkeit (Abbildung 17B). Der für Cyclin B1/Cdk1-Bindung maßgebliche

Separasebereich muss aufgrund dieser Ergebnisse also von der CLD aus in Richtung Aminoterminus erweitert werden, und zwar bis hin zu einer nicht weiter eingegrenzten Position zwischen den Aminosäuren 1192 und 1263. Davor und danach scheinen keine essentiellen Cyclin B1/Cdk1-Bindestellen zu existieren.

### 3.2.6 Phosphorylierung der Separase-CLD

Die direkte Interaktion zwischen dem Aminoterminus von Cdc6 und dem Cyclin B1-Homolog Clb2 hängt von der Phosphorylierung des Cdc6-N-Terminus ab. Die Homologie zwischen der CLD und dem Cdc6-Aminoterminus lässt vermuten, dass dies für die Wechselwirkung zwischen der CLD und Cyclin B1/Cdk1 ebenfalls zutrifft. In der Tat war bereits bekannt, dass Phosphorylierung von Threonin 1346 innerhalb der CLD einen Beitrag zur Komplexbildung leistet.

Im Folgenden wurde daher untersucht, ob

- weitere Reste innerhalb der CLD phosphoryliert sind und
- diese Phosphorylierungen für die Komplexbildung mit der Cdk1-Kinase wichtig sind.

Um die Bedeutung der CLD-Phosphorylierung mutationsunabhängig zu überprüfen, wurde nun untersucht, ob Dephosphorylierung von GST-Separase-Cyclin B1/Cdk1 den Komplex zerstört. Dazu wurde GST-Separase-Cyclin B1/Cdk1 mit unspezifischer  $\lambda$ -Phosphatase oder Referenzpuffer behandelt und dann durch Western-Blot auf die Menge noch assoziierter Kinase analysiert.

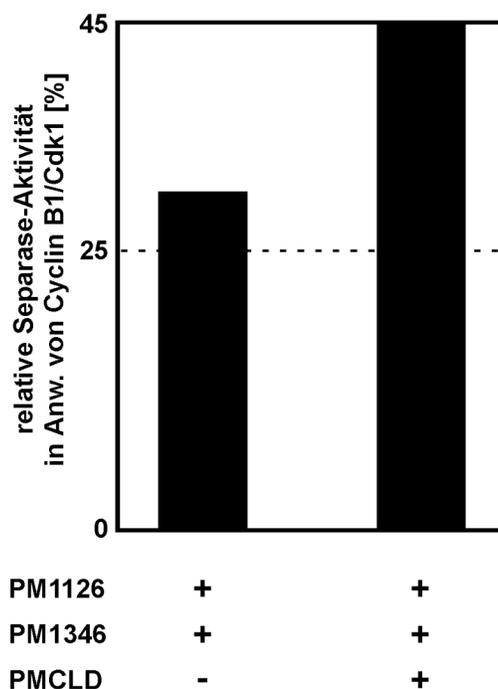
Abbildung 17D zeigt, dass  $\lambda$ -Phosphatase-Behandlung den Komplex zwischen GST-Separase-1063-1506 und Cyclin B1/Cdk1 zu einem großen Teil zerstört. Auch die Assoziation von Cyclin B1/Cdk1 mit einer Separase-Version, bei der Threonin 1346 zu Alanin mutiert worden war, wird durch Dephosphorylierung negativ beeinflusst (Abbildung 17D). Dies spricht stark dafür, dass die Phosphorylierung eines oder mehrerer Reste über Threonin 1346 hinaus an der Komplexbildung beteiligt sind. Die Dissoziation von GST-Separase und Cyclin B1/Cdk1 ist nicht auf Dephosphorylierung einer der Kinaseuntereinheiten zurückzuführen, da unter gleichen Bedingungen behandelte Komplex aus Vollängen-Separase und Cyclin B1/Cdk1 stabil bleibt (nicht gezeigt) (Holland and Taylor, 2006), obwohl die Wirksamkeit der  $\lambda$ -Phosphatase im gleichen Experiment durch beschleunigtes Cyclin B1-Laufverhalten deutlich wurde.

Führt man das gleiche Experiment mit dem Aminoterminus von Cdc6 durch, kann man ebenfalls eine Cyclin B1-Elution durch  $\lambda$ -Phosphatase beobachten (Abbildung 17D). Dies untermauert die postulierte funktionelle Homologie der CLD und des Aminoterminus von Cdc6 in Bezug auf die Cyclin B1/Cdk1-Bindung.

Motiviert durch diese Beobachtungen wurde nun nach CLD-Phosphorylierung endogener Separase gesucht. Dazu wurde Separase aus mitotisch arretierten HeLaS3-Zellen durch Immunpräzipitation isoliert. Die isolierte Separase wurde in Kooperation mit Dr. Roman Körner durch massenspektrometrische Analyse auf Phosphorylierungen hin untersucht (nicht gezeigt). Dabei wurde die bereits bekannte Phosphorylierung von Serin 1126 bestätigt. Dies zeigt, dass mitotische Phosphorylierungen grundsätzlich durch dieses Experiment identifiziert werden können. Zusätzlich wurde Phosphorylierung der Reste, Threonin 1363, Serin 1399, Serin 1528 und Serin 1545 nachgewiesen (nicht gezeigt). Serin 1399 und Threonin 1363 liegen innerhalb der CLD, was sie zu guten Kandidaten für Phosphorylierungen macht, die relevant für den Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex sein könnten.

Aufbauend auf der nachgewiesenen Bedeutung der CLD-Phosphorylierung für die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung wurde nun untersucht, ob die Interaktion zwischen Cyclin B1/Cdk1 und der CLD abhängig von den in endogener Separase phosphorylierten CLD-Resten Threonin 1346, Threonin 1363 und Serin 1399 erfolgt. Zunächst wurden die Separase-Phosphomutanten Separase-PM1126/1346 und -PM1399 getestet. Um ausschließlich mit Wechselwirkung über die CLD zu arbeiten, wurden erneut GST-Separase-1063-1440/1506-Fragmente benutzt. Tatsächlich bindet Separase-PM1399 schlechter Cyclin B1/Cdk1 als Separase-wt. Ein Austausch von Serin 1399 gegen Aspartat (Separase-S1399D) hingegen, der durch die Einführung von negativen Ladungen die Serin 1399-Phosphorylierung nachahmen soll, verbessert die Bindung im Vergleich zu Separase-PM1399 (Abbildung 17C, vergleiche Spuren 1, 2 und 3). Separase-S1399D bindet Cyclin B1/Cdk1 sogar besser als Separase-wt. Dies lässt darauf schließen, dass die Mutation von Serin 1399 zu Aspartat eine quantitative Phosphorylierung an diesem Rest nachahmt, während Separase-wt im Extrakt nur unvollständig phosphoryliert wird.

Auch das PM1126/1346-Separase-Fragment assoziiert schlechter mit Cyclin B1/Cdk1 als Separase-wt (Abbildung 17A, vergleiche Spuren 4 und 5). Vor dem Hintergrund, dass die Mutation von Serin 1126 keinen Effekt auf die Kinase-Bindung hat (Abschnitt 3.2.5), bestätigt dies, dass Threonin 1346 eine für die Kinase-Bindung wichtige Aminosäure ist. Eine Mutation der Reste Serin 1399 und Threonin 1363 zu Alanin zusätzlich zu Serin 1126 und Threonin 1346 verschlechtert die Bindung an Cyclin B1/Cdk1 noch einmal deutlich (Abbildung 17C, vergleiche Spuren 4 und 5). Dieser Befund bestätigt erneut,



**Abbildung 18: Phosphorylierbare CLD-Aminosäuren tragen zur Komplexbildung von Vollängen-Separase mit Cyclin B1/Cdk1 bei**

Mutation von fünf phosphorylierbaren CLD-Resten zusätzlich zu Serin 1126 und Threonin 1346 vermitteln Separase-Resistenz gegen Inhibition durch rekombinante Cyclin B1/Cdk1-Kinase. Separase-PM1126/1346 und -PM1126/1346/1363/1389/1396/1399/1406 (Separase-PM1126/1346/PMCLD) wurden wie in Abbildung 16B beschrieben auf Hemmung durch rekombinante Cyclin B1/Cdk1-Kinase getestet.

dass Serin 1399 und/oder Threonin 1363 für die Komplexbildung wichtig sind. Da die Einzelmutteration Threonin 1363 zu Alanin keinen Einfluss auf die Kinase-Bindung hat (nicht gezeigt), ist wahrscheinlich Serin 1399 der entscheidende Rest.

Die CLD-Cyclin B1/Cdk1-Wechselwirkung beruht also zu einem großen Teil auf der Phosphorylierung der CLD. Mit Threonin 1346 (Stemmann et al., 2001) und diese Studie) und Serin 1399 (diese Studie) wurden zwei Aminosäuren in der CLD identifiziert, die entscheidend zu dieser Phosphorylierungsabhängigkeit beitragen.

### 3.2.7 Beteiligung der CLD-Phosphorylierung an der Inhibition von Vollängen-Separase

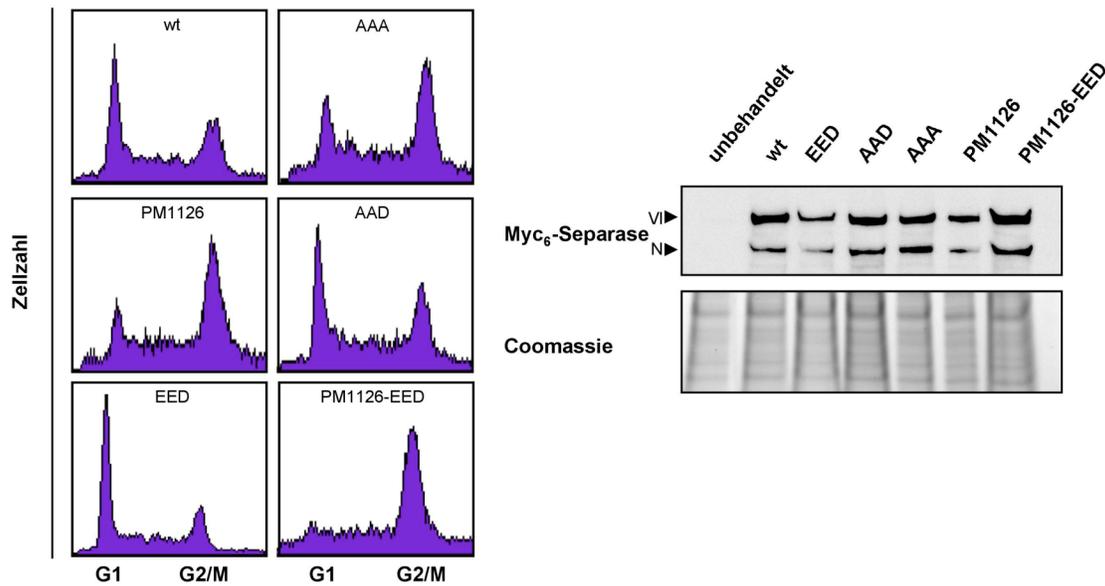
Nun wurde getestet, ob die CLD-Phosphorylierung auch zur Inhibition von Vollängen-Separase, die als Kennzeichen für die Komplexbildung mit der Kinase dient, benötigt wird. Dazu wurden aktive Separasemutanten wie in Abbildung 16 beschrieben mit rekombinantem Cyclin B1/Cdk1 inhibiert. Tatsächlich zeigt Separase-PM1126/1346 nach Vorinkubation mit Cyclin B1/Cdk1 nur ca. 29 % Restaktivität, während Separase-PM1126/1346, bei der zusätzlich fünf phosphorylierbare Reste innerhalb der CLD zu

Alanin mutiert waren (T1363, T1389, S1396, S1399 und S1406; Separase-PM1126/1346/PMCLD), deutlich resistenter gegen Cyclin B1/Cdk1-vermittelte Inhibition ist (ca. 45 % Restaktivität; Abbildung 18).

Um den Einfluss der CLD-Phosphorylierung in einem physiologischeren Kontext zu überprüfen, wurde die Kinase-Bindung verschiedener Separase-CLD-Mutanten nun in Zellen überprüft. Stephen Taylor und Kollegen haben gezeigt, dass die Überexpression von Separase, die Cyclin B1/Cdk1 nicht binden kann, im Gegensatz zu Separase-wt zu einer Akkumulation der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase führt. Grund dafür ist, dass wegen limitierender Securin-Mengen bei stark erhöhten Separase-Konzentrationen die kompensatorische Cyclin B1/Cdk1-Bindung benötigt wird, um Separase vor der Metaphase und damit APC/C-Aktivierung zu inhibieren. Hohe Konzentrationen von Cdk1-Bindemutanten führen deshalb zu verfrühter Chromosomentrennung, die wiederum SAC-Aktivierung und einen mitotischen Arrest der Zellen nach sich zieht (Holland and Taylor, 2006). In diesem System ist also das Ausmaß des G<sub>2</sub>/M-Arrests ein direktes Maß für die Cyclin B1/Cdk1-Bindungsresistenz von Separasemutanten.

Separase wurde mit Hilfe von Flp-Rekombinase-vermittelter Rekombination stabil in das Genom von Flp-In T-REx-293-Zellen integriert. Diese Zellen vermitteln die Expression eines Transgens unter Kontrolle eines Doxycyclin-induzierbaren Promotors. Die Integration durch Flp-Rekombinase erfolgt in einen einzigen Locus im Genom der Zellen, so dass klonale Effekte durch unterschiedliche Integrationsstellen in diesem System keine Rolle spielen.

Das Zellzyklusprofil nach Induktion der Separase-Expression wurde per Chromatin-Färbung mittels Propidiumjodid und folgender FACS-Analyse bestimmt. Im Vergleich zum Wildtyp lässt die Überexpression von Separase-PM1126 den Anteil von G<sub>2</sub>/M-Zellen deutlich steigen (Abbildung 19). Das gleiche gilt für Separase-PM1346/1363/1399 (Separase-AAA), bei der also drei wichtige phosphorylierte CLD-Reste zu Alanin mutiert worden sind. Separase-PM1126 und Separase-AAA sind also *in vivo* zumindest teilweise Cyclin B1/Cdk1-bindedefizient. Tauscht man die wichtigen CLD-Aminosäuren gegen die sauren Reste Glutamat bzw. Aspartat aus (Separase-EED), so verhält sich Separase wieder wie der Wildtyp. Sogar Separase-AAD, bei der nur Serin 1399 zu Aspartat mutiert worden ist, der wichtige Rest Threonin 1346 aber nicht-phosphorylierbar bleibt, bindet Cyclin B1/Cdk1 besser als Separase-AAA.



**Abbildung 19: In Zellen trägt die Phosphorylierung der CLD zur Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung bei.**

Flp-In T-REx-293-Zellen, die Myc<sub>6</sub>-Separase-wt, -PM1126, -PM1346/1363/1399 (Separase-AAA), -PM1346/1363/S1399D (Separase-AAD), -T1346E/T1363E/S1399D (Separase-EED) oder -PM1126/T1346E/T1363E/S1399D (Separase-PM1126/EED) unter Kontrolle eines Doxycyclin-induzierbaren CMV-Promotors tragen, wurden für 24 h mit 2 µg/ml Doxycyclin induziert. Danach wurden sowohl die von der Zellkultur-Schale abgelösten als auch die adhärennten Zellen geerntet und durch Propidiumjodid-Färbung des Chromatins für FACS-gestützte Zellzyklus-Analyse vorbereitet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert. Die Lysate wurden durch Western-Blot gegen Myc<sub>6</sub>-Separase mit anti-Myc-Antikörper auf die Konzentration der transgenen Separase hin untersucht. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Färbung der Lysatproteine durch Coomassie-Blau. Davon ist der Bereich der um 30 kD laufenden Proteine gezeigt. Der Effekt der Überexpression der Separase-PM1126-EED wird im Abschnitt 3.2.9.5 erläutert.

VI: Volllängen-Separase; N: Separase-N-Terminus

Weil der Austausch gegen saure Aminosäuren häufig Phosphorylierung an dem betreffenden Rest nachahmt, weisen die Glutamat/Aspartat-Mutanten stark darauf hin, dass die Phosphorylierungen von Separase an Threonin 1346, Threonin 1363 und Serin 1399 die Cyclin B1/Cdk1-Bindung verbessern. Um Effekte unterschiedlich hoher Separase-Konzentrationen in den Zellen auszuschließen, wurde die Separase-Induktion durch Doxycyclin mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Bezieht man die leicht unterschiedliche Menge der geladenen Lysate mit ein, so unterscheiden sich die Konzentrationen der induzierten Separasen nur minimal (Abbildung 19). Die beschriebenen Zellzyklus-Phänotypen sind also auf die Cyclin B1/Cdk1-Bindefähigkeiten der verschiedenen Separase-Versionen und nicht auf unterschiedlich hohe Separase-Überexpression zurückzuführen.

Bei der Inhibition von Separase durch rekombinantes Cyclin B1/Cdk1 und bei der Komplexbildung in Zellen tragen phosphorylierte CLD-Aminosäuren also zur Interaktion von Vollängen-Separase mit Cyclin B1/Cdk1 bei. Serin 1399, aber auch mindestens einer der beiden Reste Threonin 1346 und Threonin 1363, sind dabei entscheidend.

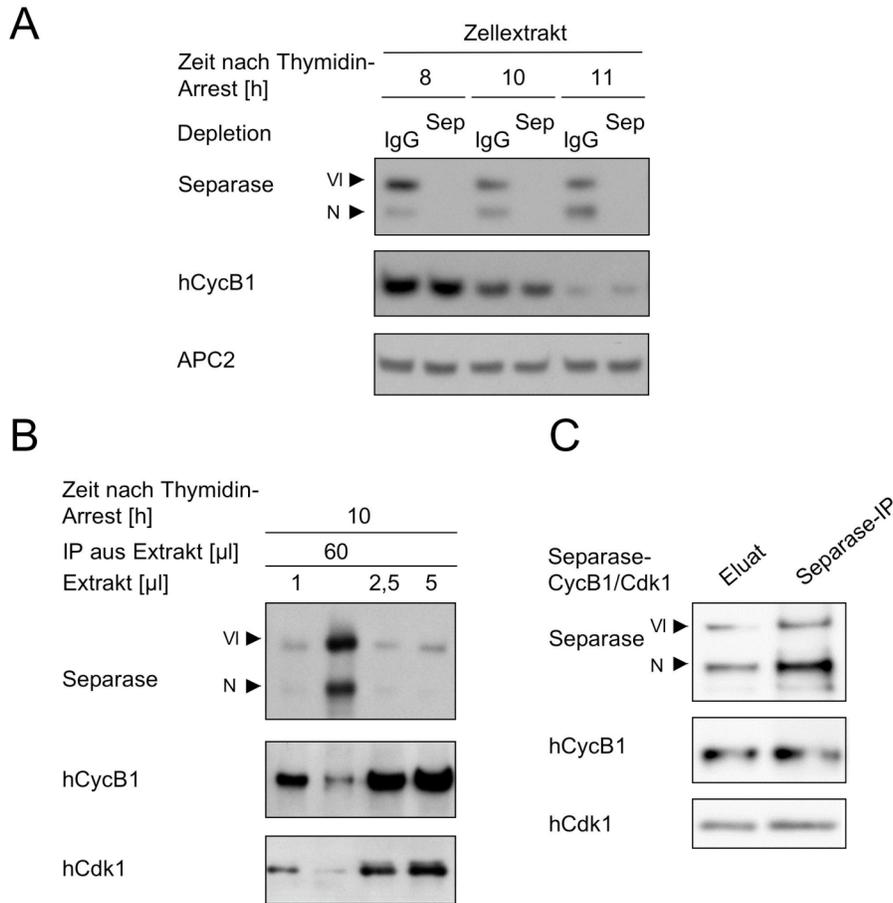
### **3.2.8 *In-vivo*-Funktion des endogenen Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes**

#### **3.2.8.1 Nur ein kleiner Anteil von Cyclin B1 liegt in mitotischen Zellen im Komplex mit Separase vor**

Separase und Cyclin B1/Cdk1 gehen also eine Wechselwirkung ein, die auf der Seite der Separase phosphoryliertes Serin 1126 und eine phosphorylierte CLD benötigen. Dieser Komplex existiert auch in lebenden Zellen und folgt den gleichen Bindungsregeln wie in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt. Die Komplexbildung zwischen Separase und Cyclin B1/Cdk1 führt einerseits zur Inhibition von Separase, andererseits aber auch zu einer Hemmung der Kinase (Gorr et al., 2005). Daraus ergibt sich die interessante Frage, ob Separase in Zellen eine Funktion als CKI zukommt.

Deshalb sollte nun die Frage erörtert werden, ob ein entscheidender Anteil der Cyclin B1/Cdk1-Kinase in mitotischen Zellen mit Separase komplexiert vorliegt. Ist dies der Fall, so könnte Separase als CKI zu einem effizienten Austritt der Zelle aus der Mitose beitragen. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass Separase nur in Securin-freiem Zustand die Kinase binden kann (Abbildung 11). Freie Separase wiederum tritt in Zellen nur dann auf, wenn die Zelle die Anaphase bereits eingeleitet hat, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Cdk1-Aktivität sinken muss.

Deshalb wurde nun überprüft, welcher Anteil des gesamten Cyclin B1/Cdk1 einer Zelle mit Separase assoziiert vorliegt. Dazu wurde Separase quantitativ aus Zelllysaten immundepletiert. Anschließend wurde überprüft, ob eine detektierbare Fraktion von Cyclin B1 dadurch ebenfalls aus dem Lysat entfernt wird (Abbildung 20A). Die verwendeten Zellen durchliefen nach Entlassen aus einem Thymidin-Arrest eine synchrone Mitose. An der Abnahme der Cyclin B1-Menge in Rohextrakten kann man erkennen, dass die Zellen zwischen 8 h und 11 h nach dem Thymidin-Arrest die Mitose wieder verlassen. 10 h nach Verlassen des Thymidin-Blocks interagieren maximale Mengen von Cyclin B1/Cdk1 mit Separase (Abbildung 10B). Zu keinem Zeitpunkt wurde das Cyclin B1/Cdk1-Signal jedoch durch quantitatives Entfernen der Separase aus den Lysaten merklich geschwächt (Abbildung 20A).



**Abbildung 20: Ein sehr kleiner Anteil von Cyclin B1/Cdk1 liegt in mitotischen Zellen im Komplex mit Separase vor**

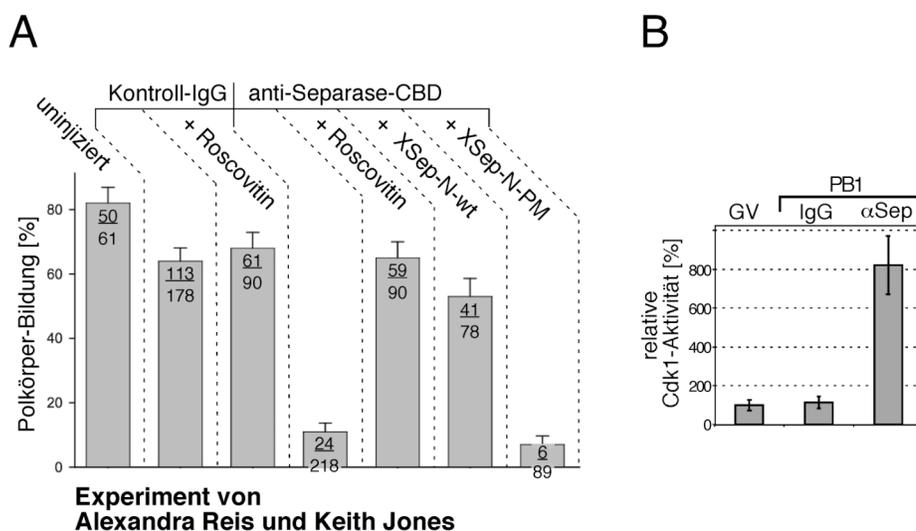
(A) Keine detektierbare Fraktion von Cyclin B1 wird durch quantitative Separase-Depletion aus Zelllysaten entfernt. Zelllysate der HeLaS3-Zellen, die auch für Abbildung 10B benutzt wurden, wurden wie in Abbildung 10B behandelt und dadurch durch Separase-IP mit anti-pSX38 vollständig von Separase befreit. Die Zelllysate wurden anschließend durch Western-Blot mit den Antikörpern anti-Separase-N, anti-hCyclin B1 und anti-hCdk1 auf Kodepletion von Cyclin B1/Cdk1 mit Separase untersucht. Gleichmäßige Proteinladung wurde durch Western-Blot gegen APC2 überprüft (B) Weniger als 1/60 des gesamten Cyclin B1 eines Zelllysats findet sich in einer Separase-IP wieder. Die Separase-IP aus Abbildung 20A wurde direkt neben 1  $\mu$ l, 2,5  $\mu$ l und 5  $\mu$ l des Ausgangszelllysats auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die aufgetragene Separase-IP-Menge entspricht Separase aus 60  $\mu$ l Zelllysate. Das SDS-Gel wurde anschließend durch Western-Blot mit den Antikörpern anti-Separase-N, anti-hCyclin B1 und anti-hCdk1 auf die Mengen der entsprechenden Proteine hin untersucht. (C) Der für Separase-IP benutzte Antikörper anti-pSX38 verdrängt keine nennenswerte Cyclin B1/Cdk1-Fraktion von Separase. Separase-Cyclin B1/Cdk1 wurde durch Inkubation von ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase/Securin in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt hergestellt und anschließend durch TEV-Protease in Anwesenheit von 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA eluiert. Separase wurde aus diesem Eluat mit anti-pSX38-Antikörper vollständig immunpräzipitiert und neben einer Probe des TEV-Eluats durch Western-Blot mit anti-Separase-N, anti-hCyclin B1 und anti-hCdk1 analysiert. Die Spezifität der Immunpräzipitation wurde durch parallele Kontroll-IgG-IP bestätigt (nicht gezeigt).

Nun wurde die Menge der mit Separase koimmunpräzipitierten Cyclin B1/Cdk1-Kinase relativ zur gesamten Kinase-Menge im Zelllysate bestimmt. Dazu wurde immunpräzipitierte Separase, die der Menge von 60  $\mu\text{l}$  Zelllysate entspricht, direkt neben 1  $\mu\text{l}$ , 2,5  $\mu\text{l}$  und 5  $\mu\text{l}$  Zelllysate durch Western-Blot auf die Mengen von Separase, Cyclin B1 und Cdk1 hin untersucht. Abbildung 20B zeigt, dass mit der Separase viel weniger Cyclin B1 und Cdk1 assoziiert ist als in 1  $\mu\text{l}$  Zelllysate vorhanden sind. Das heißt, dass um ein Vielfaches weniger als 1,7 % der Cyclin B1/Cdk1-Kinase mit Separase im Komplex vorliegt. Dieser Wert gilt unter den Voraussetzungen, dass kein signifikanter Anteil des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes durch die Lyse der Zellen dissoziiert, und dass der für die Immunpräzipitation benutzte Antikörper die Assoziation des Komplexes nicht beeinflusst. Ersteres scheint unwahrscheinlich, da der Komplex biochemisch sehr stabil ist. Die Verdrängung der Kinase von Separase durch den für die Immunpräzipitation benutzten Antikörper wurde überprüft. Dazu wurde der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex aus Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt über eine Epitop-Markierung an Separase gereinigt. Nach Elution der Separase wurde diese durch Immunpräzipitation mit dem zu untersuchenden Antikörper ein zweites Mal isoliert. Da laut Western-Blot-Analyse das Verhältnis von Separase zu Kinase vor und nach dieser zweiten Immunpräzipitation gleich ist (Abbildung 20C), kann man schlussfolgern, dass der verwendete Antikörper keinen nennenswerten Anteil der Kinase von der Separase verdrängt.

Man kann zusammenfassen, dass in mitotischen Zellen nur ein sehr kleiner Teil von Cyclin B1/Cdk1 mit Separase komplexiert. Es scheint deshalb unwahrscheinlich, dass während des Verlassens der Mitose Separase entscheidend zur Erniedrigung der Cyclin B1/Cdk1-Kinase-Aktivität beiträgt. Man kann zwar nicht mit Sicherheit ausschließen, dass die Assoziation von Separase mit Cdk1 in einem so engen Zeitfenster vonstatten geht, dass die Genauigkeit der Zellsynchronisation nicht zu deren quantitativen Erfassung ausreicht. Die Tatsache, dass Separase keinen nennenswerten Einfluss auf den Austritt eines völlig synchronen Oozytenextraktes aus Meiose II hat (I. Gorr, persönliche Mitteilung), spricht jedoch gegen diese Möglichkeit und für die Relevanz obiger Ergebnisse.

### **3.2.8.2 Funktion des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes in der Meiose**

Wie beim mitotischen Austritt muss die Aktivität von Cyclin B1/Cdk1 beim Übergang einer Zelle von der Meiose I in die Meiose II sinken. Der Unterschied zum Austritt aus der Mitose ist, dass die Aktivität nicht auf Null sinken darf, da die zweite meiotische Teil-



**Abbildung 21: Die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung ist für die Verminderung der Cyclin B1/Cdk1-Aktivität beim Meiose I-Meiose II-Übergang notwendig.**

(A) Die Polkörper-Bildung findet ohne die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung nicht statt. In Maus-Oozyten in der Metaphase I (GV-Stadium) wurden Kontroll-IgG oder anti-Separase-CBD-Antikörper injiziert und die Oozyten dann zur Reifung stimuliert. Wenn angegeben, wurde die Cyclin B1/Cdk1-Aktivität durch Roscovitin inhibiert oder es wurde der N-Terminus von *Xenopus*-Separase als mRNA koinjiziert (XSep-N-wt: XSeparase-1-1552; XSep-N-PM: XSeparase-1-1552-PM1138/1139). (B) Die Inhibition der Polkörper-Bildung durch anti-Separase-CBD korreliert mit einer höheren Cyclin B1/Cdk1-Kinase-Aktivität. Wie in (A) behandelte Oozyten oder Oozyten in der Metaphase I-Phase (GV) wurden auf Cdk1-Aktivität hin untersucht. Dazu wurden 6 Gruppen von je 5 Oozyten zum Zeitpunkt, an dem Kontroll-Oozyten gerade den ersten Polkörper (PB1) ausgestoßen hatten, lysiert. Ihre Cdk1-Aktivität wurde anschließend durch Inkubation des Lysats mit dem Cdk1-Modellsubstrat Histon H1 in Anwesenheit von  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP und semiquantitative Autoradiographie bestimmt. Der Wert für GV-Oozyten wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Aktivitäten wurden darauf normiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Cdk1-Aktivitäten der 6 Oozytengruppen an.

ung folgt und die Zelle deshalb eine vorzeitige Einleitung der Replikation verhindern muss (Abschnitt 2.3). Dieser Balanceakt benötigt eine besondere Feinregulation der Cyclin B1/Cdk1-Kinaseaktivität, wozu die Separase als Cdk1-Inhibitor entscheidend beitragen könnte.

Um dies zu testen, wurde in Kollaboration mit A. Reis und Keith Jones folgendes Experiment durchgeführt. Mit Hilfe eines gegen die Cyclin B1/Cdk1-Bindestellen von Maus-Separase gerichteten Antikörpers (anti-Separase-CBD) wurde die Bildung des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes in Maus-Oozyten, die in der Meiose I arretiert waren, unterdrückt. Der Antikörper inhibiert nachweislich die Assoziation zwischen humaner Separase, die der Maus-Separase ähnlich ist, und Cyclin B1/Cdk1, ohne die proteolytische Aktivität von Separase zu beeinflussen (Gorr et al., 2006). Anschließend wurde die Bildung des ersten Polkörpers nach Induktion des Meiose I-Meiose II-Übergangs analysiert. Der Polkörper-Ausstoß dient als Kennzeichen dafür, dass Oozyten diesen Übergang vollzogen haben. Tatsächlich ist bei Oozyten mit gehemmter Bildung

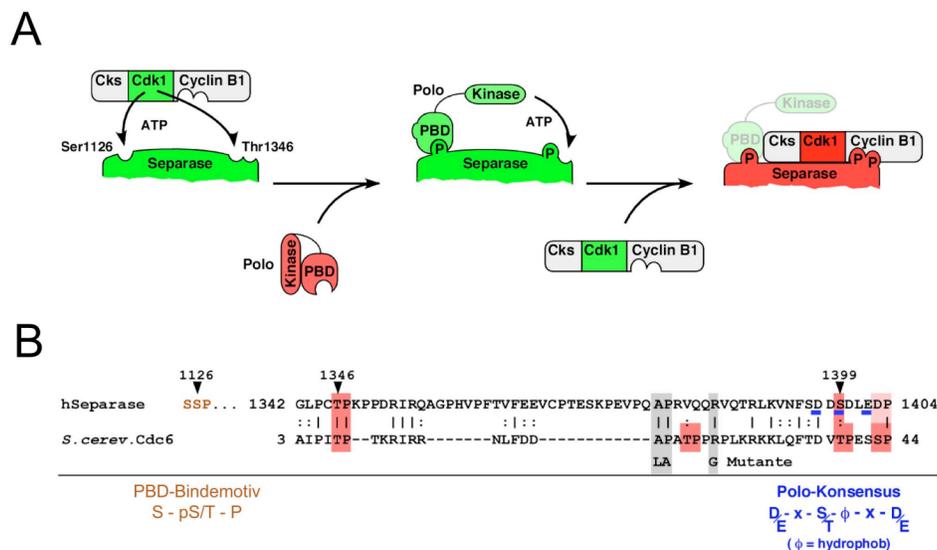
des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes der Ausstoß des Polkörpers stark gehemmt (Abbildung 21A). Dieser Effekt ist spezifisch, da erstens die Injektion von Kontroll-IgG keinen Effekt zeigt. Zweitens führt die Expression von Cyclin B1/Cdk1-bindendem *Xenopus*-Separase-Fragment, nicht jedoch die Zugabe einer *Xenopus*-Separase-Phosphomutante, die die Kinase nicht mehr binden kann, zu einer Wiederherstellung der Polkörper-Bildung (Abbildung 21A). Drittens stellt eine künstliche Erniedrigung der Cyclin B1/Cdk1-Aktivität durch eine Behandlung der Oozyten mit dem Cdk1-Inhibitor Roscovitin die Polkörper-Bildung in Anwesenheit von anti-Separase-CBD wieder her. Weil weder die Trennung der homologen Chromosomen noch der Schwesterchromatiden gestört zu sein scheint (Gorr et al., 2006), ist der Defekt beim Polkörperausstoß nicht auf eine mangelhafte Auflösung der Kohäsion nach Antikörperzugabe zurückzuführen.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Cyclin B1/Cdk1-Aktivität bei Injektion des anti-Separase-CBD Antikörpers zu einem Zeitpunkt, an dem Kontroll-Oozyten den Polkörper ausstoßen, unphysiologisch hoch ist (Abbildung 21B). Der Grund für den ineffizienten Meiose I-Meiose II-Übergang in Anwesenheit von anti-Separase-CBD ist also mit hoher Wahrscheinlichkeit eine fehlende Cyclin B1/Cdk1-Inhibition durch Separase.

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass Separase während des Meiose I-Meiose II-Übergangs von Maus-Oozyten zur Erniedrigung der Cyclin B1/Cdk1-Aktivität beiträgt. Dies erfordert die Komplexbildung zwischen Separase und der Kinase über die bekannten Bindungs-Determinanten Serin 1126 und CLD.

### **3.2.9 Die Rolle von Serin 1126 bei der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex-Bildung**

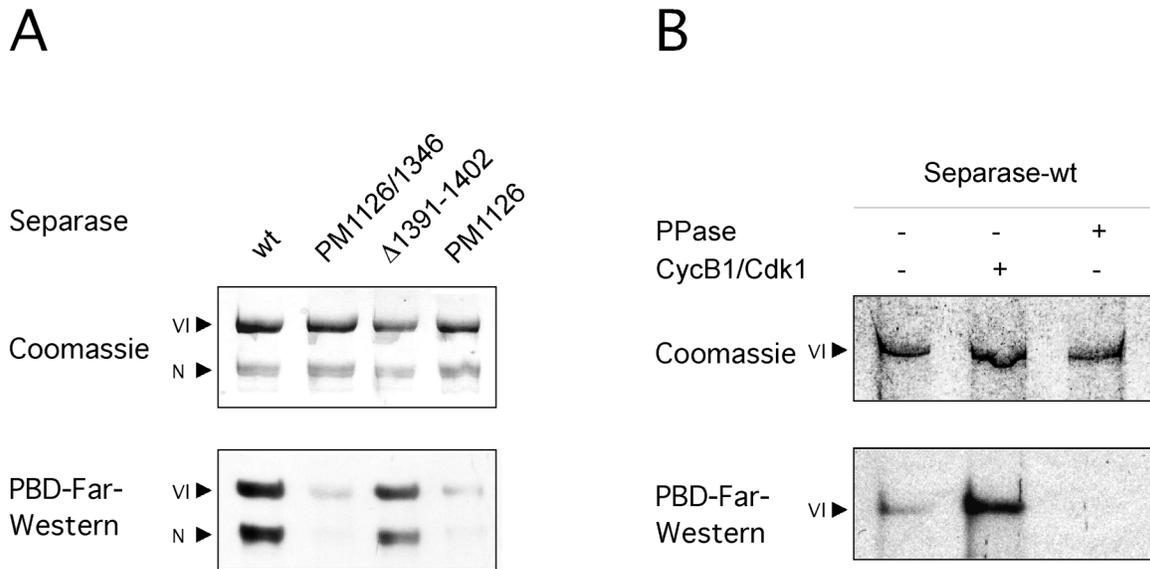
Welche Rolle spielen phosphoryliertes Serin 1126 und die CLD bei der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung? Wie der Aminoterminus von Cdc6 kann die Separase-CLD abhängig von der Phosphorylierung der Reste Threonin 1346 und Serin 1399 als eigenständiges Cyclin B1/Cdk1-Bindemodul angesehen werden (Abbildung 16 und Abbildung 17). Für beide gibt es entsprechende phosphorylierbare Aminosäuren im Cdc6-N-Terminus (Abbildung 22B), was eine homologe Wirkweise der beiden Protein-Bereiche, das heißt direkte Kontaktbildung mit Cyclin B1, nahe legt. Eine zu Serin 1126 ähnliche Region existiert jedoch nicht in Cdc6. Trotzdem ist Serin 1126 für Separase-Hemmung in Oozytenextrakt enorm wichtig (Abbildung 16A und (Stemmann et al., 2001)).



**Abbildung 22: Ein Modell zur Polo-vermittelten Wirkweise von Serin 1126**

(A) Serin 1126 könnte zur Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung beitragen, indem es über Polo-Rekrutierung die CLD-Phosphorylierung vermittelt. Die Kinase-Aktivität von Polo wird durch Bindung an phosphoryliertes Serin 1126 über ihre PBD aktiviert und kann die CLD daraufhin phosphorylieren. Die CLD kann nun Cyclin B1/Cdk1 über die Cyclin B1-Untereinheit binden. Dieser Mechanismus entspricht der klassischen Polo-Wirkweise (Abschnitt 3.2.9). (B) Cyclin B1/Cdk1-Bindeterminanten in Separase und Cdc6. Der zu Cdc6 homologe Separase-CLD-Bereich besitzt mindestens zwei phosphorylierte Reste, die zur Komplexbildung mit Cyclin B1/Cdk1 beitragen, Threonin 1346 und Serin 1399. Serin 1399 entspricht teilweise der Plk1-Phosphorylierungs-Sequenz. Beide haben entsprechende phosphorylierte Aminosäuren in Cdc6 (rot unterlegt). Serin 1399 liegt in der Primärsequenz in dem Bereich, der zur Cyclin B1/Cdk1-Bindung absolut notwendig ist, wie die Separasemutanten Separase-LAG (grau unterlegt) und Separase-Δ1391-1402 (Abbildung 13) zeigen. In Cdc6 sind noch zwei weitere phosphorylierbare Aminosäuren bekannt, die zur Cyclin B1-Bindung beitragen (rot unterlegt). Mit Serin 1126 besitzt Separase eine Cyclin B1/Cdk1-Bindeterminante, für die es in Cdc6 keine Entsprechung gibt. Ist Serin 1126 phosphoryliert, so wird sie Teil einer PBD-Bindesequenz (Serin – Phosphoserin – Prolin).

Das wirft die Frage auf, auf welche Art und Weise phosphoryliertes Serin 1126 an der Wechselwirkung mit der Cyclin B1/Cdk1-Kinase beteiligt ist. Eine nahe liegende Möglichkeit ist, dass Phosphorylierung von Serin 1126 eine Phosphorylierung der CLD nach sich zieht, welche dadurch erst für Cdk1-Bindung kompetent wird. Dieses Modell beruht auf der Feststellung, dass phosphoryliertes Serin 1126 und Umgebung eine perfekte Konsensus-Bindestelle für die so genannte "Polo Box Domain" (PBD) der mitotische Polo-Kinase (Serin-Phosphoserin/-Threonin-Prolin) darstellen (Abbildung 22B). Durch Binden der PBD an vorphosphorylierte Proteine wird die Polo-Kinase bekanntermaßen konformativ aktiviert und kann dann ihrerseits benachbarte Stellen im gebundenen Protein, in diesem Fall die CLD, phosphorylieren (Abbildung 22A). Auch die Tatsache, dass die Sequenzumgebung von Serin 1399 recht gut mit der Konsensussequenz für Polo-Phosphorylierung übereinstimmt (Abbildung 22B), spricht



**Abbildung 23: PBD assoziiert in der Far-Western-Analyse mit phosphoryliertem Serin 1126**

(A) PBD bindet Separase abhängig von Serin 1126, aber unabhängig von einer intakten CLD. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase-wt, -PM1126/1346, -Δ1391-1402 und -PM1126 wurden im Komplex mit Securin aus mitotischen transfizierten 293T-Zellen gereinigt, auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend durch Far-Western-Analyse mit GST-PBD auf PBD-Bindung analysiert. GST-PBD wurde mit dem Antikörper anti-GST detektiert. Als Ladekontrolle diente mit Coomassie-Blau gefärbte Separase. (B) PBD-Separase-Interaktion hängt von Separase-Phosphorylierung ab. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase-wt wurde wie für (A) isoliert, anschließend jedoch mit Puffer, λ-Phosphatase oder Cyclin B1/Cdk1 behandelt und dann wie bei (A) durch Far-Western-Blot analysiert.

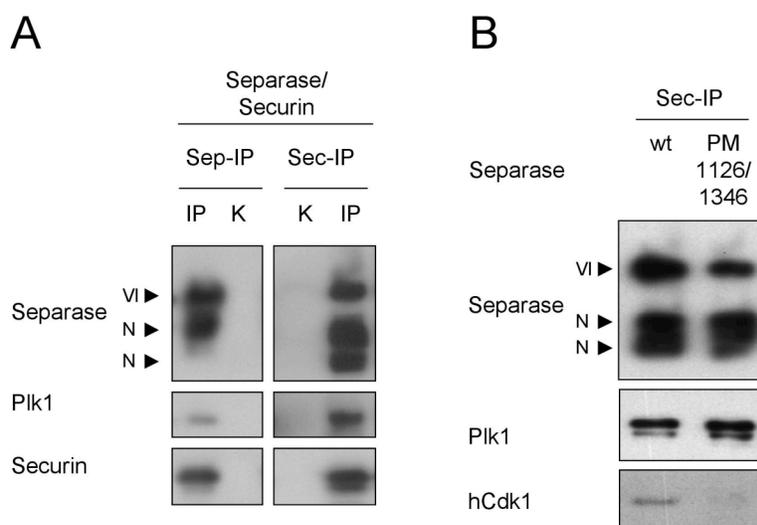
VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminus

für diese Hypothese. Stimmt das “Polo-Modell”, so müssen zwei Voraussetzungen gelten:

- Polo bindet an phosphoryliertes Serin 1126.
- Polo phosphoryliert die CLD.
- Eine konstitutiv phosphorylierte CLD rettet eine an Serin 1126 nicht phosphorylierbare Separase hinsichtlich Cyclin B1/Cdk1-Bindung.

### 3.2.9.1 Wechselwirkung von Polo-PBD mit Separase

Zunächst wurde die Interaktion von Plk1 mit Phosphoserin 1126 per Far-Western-Analyse untersucht, ein Ansatz, der bereits erfolgreich für die Identifikation von Plk1-Bindepartnern herangezogen wurde. Dazu wurde aus transfizierten mitotischen 293T-Zellen Separase-wt, -PM1126, -PM1126/1346 und -Δ1391-1402 im Komplex mit Securin isoliert. Danach wurden die Komplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und dann mit GST-PBD, der Phosphoserin/-threonin-Bindedomäne



**Abbildung 24: Die Assoziation von Plk1 mit Separase/Securin geschieht unabhängig von Serin 1126**

(A) Plk1 assoziiert mit Separase/Securin in Zellen. Separase wurde zusammen mit Securin und Plk1 in 293T-Zellen transfiziert. Für die Separase-IP wurde ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase, Myc<sub>6</sub>-Plk1 und Securin benutzt, für die Securin-IP Securin-(His<sub>6</sub>-Flag)<sub>2</sub>, Myc<sub>6</sub>-Plk1 und HA<sub>3</sub>-Separase. Als Kontrolle dienten für die Separase-IP unbeladene Sepharose, die durch Anwesenheit von TEV-Protease im Zelllysate während der IP hergestellt wurde. Als Kontrolle zur Securin-IP wurde ein Zelllysate mit nicht-Epitop-markiertem Securin benutzt. Nach der Immunpräzipitation wurde die Sepharose mit Bindungspuffer gewaschen und anschließend durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf gebundene Separase, Plk1 und Securin getestet. Zur Detektion dienten die Antikörper anti-Separase-N, anti-Plk1-linker und anti-Securin. K: Kontroll-IP; IP: Separase/Securin-IP (B) Die Assoziation von Plk1 mit Separase/Securin in Zellen geschieht unabhängig von Serin 1126. HA<sub>3</sub>-Separase-wt und -PM1126/1346 wurden wie in (A) beschrieben behandelt. Die Reinigung von Separase/Securin/Plk1 erfolgte durch Securin-IP. Spezifisch mit Separase-wt assoziierte hCdk1 wurde durch anti-hCdk1-Antikörper detektiert.

VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminus

von Plk1, inkubiert. Die PBD wurde danach mit einem gegen GST gerichteten Antikörper wie bei einem Western-Blot detektiert.

PBD wechselwirkt um ein Vielfaches stärker mit Separase-wt als mit Separase-PM1126 (Abbildung 23A). Eine zusätzliche Mutation von Threonin 1346 zu Alanin (Separase-PM1126/1346) schwächt dieses Signal nicht weiter. Auch die teilweise Deletion der CLD (Separase-Δ1391-1402) beeinflusst die Bindung nicht, woraus folgt, dass keine Phosphoepitope in diesem Bereich erkannt werden.

Diese Interaktion zwischen der PBD und Separase im Far-Western ist abhängig von Phosphorylierung, da Vorbehandlung der Separase mit unspezifischer Phosphatase die Wechselwirkung unterbindet, während Phosphorylierung der Separase durch Cyclin B1/Cdk1 die Bindung verstärkt (Abbildung 23B). PBD bindet also im Far-Western-Ansatz an phosphoryliertes Serin 1126 von humaner Separase.

### 3.2.9.2 Wechselwirkung von Separase/Securin und Polo

Als nächstes wurde die Wechselwirkung zwischen Separase und Plk1 in humanen Zellen untersucht. Dazu wurden Epitop-markierte Versionen von Separase, Securin und Plk1 (humane Polo-Kinase) in 293T-Zellen exprimiert. Danach wurden entweder Separase oder Securin durch Antikörper gegen die Epitop-Markierung aus den Zelllysaten immunpräzipitiert. Nach dieser Affinitätsreinigung wurde die immobilisierte Separase/Securin durch Western-Blot auf die Bindung von Plk1 hin analysiert.

Abbildung 24A stellt dar, dass sich Plk1 mit Separase/Securin sowohl nach Immunpräzipitation von Separase als auch von Securin spezifisch anreichern lässt. Um zu testen, ob die Komplexbildung in Zellen von phosphoryliertem Serin 1126 abhängt, wurde nun die Bindung von Plk1 an Separase-PM1126/1346 mit der an Separase-wt verglichen. Beide Separasen sind wider Erwarten zur Komplexbildung mit Plk1 im gleichen Maß befähigt, während Cdk1-Bindung erwartungsgemäß nur an Separase-wt bindet (Abbildung 24B).

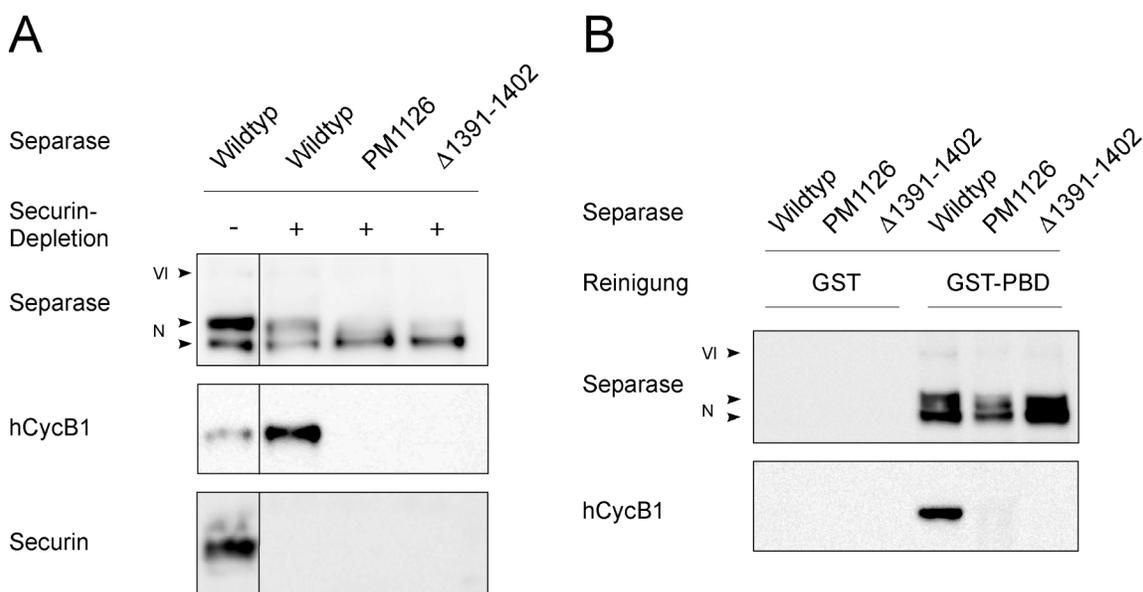
Ähnliche Ergebnisse lieferten *In-vitro*-Bindungsstudien mit gereinigtem Separase-Securin und *in-vitro*-translatierter Plk1 oder PBD (nicht gezeigt). Wie in Zellen konnte eine spezifische Wechselwirkung nachgewiesen werden, die jedoch nicht abhängig von Serin 1126 ist.

Eine Assoziation zwischen Separase und Plk1 über phosphoryliertes Serin 1126 ist also nicht gegeben, wenn Separase mit Securin im Komplex vorliegt.

### 3.2.9.3 Interaktion zwischen PBD und freier Separase

Möglicherweise schließt die Anwesenheit von Securin die Bindung von Plk1 an Separase über phosphoryliertes Serin 1126 aus. Um diese Limitierung zu umgehen, wurde nun mit gereinigten Proteinen getestet, ob die Interaktion von PBD mit Securin-freier Separase in Abhängigkeit von Serin 1126 erfolgt. Dazu wurde aktive Separase durch Inkubation in Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt hergestellt. Da nicht alles Securin im  $\Delta 90$ -Extrakt abgebaut wird, musste das verbleibende Securin aus der Separase-Präparation durch Immunpräzipitation entfernt werden. Nach dieser Immundepletion verbleibt ein gut detektierbarer Anteil der Separase im Überstand, während Securin nicht mehr nachweisbar ist (Abbildung 25A).

Um nun die Abhängigkeit der Separase-PBD-Interaktion von phosphoryliertem Serin 1126 zu testen, wurden aktive Securin-freie Separase-wt, -PM1126 und - $\Delta 1391$ -1402 mit immobilisierter GST-PBD bzw. GST inkubiert und anschließend durch Western-Blot auf Separase-Assoziation überprüft.



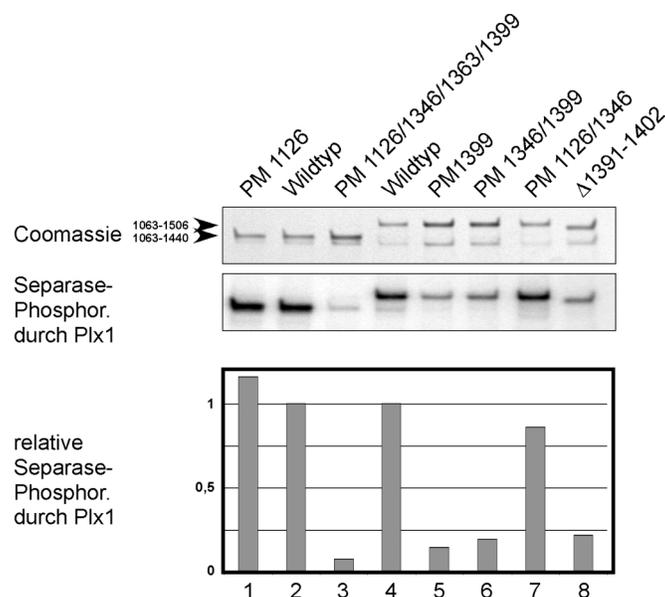
**Abbildung 25: PBD assoziiert mit Securin-freier Separase in Abhängigkeit von Serin 1126**

(A) Reinigung detektierbarer Mengen Securin-freier Separase. ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase-wt, -PM1126 oder - $\Delta$ 1391-1402 wurden im Komplex mit Securin aus transfizierten mitotischen Zellen durch IgG-IP isoliert und anschließend in Niedrig- $\Delta$ 90-Extrakt inkubiert. Nach Waschen mit Waschpuffer (500 mM NaCl) wurde die Separase durch TEV-Protease von der Sepharose eluiert. 1/7 des Eluats wurden separiert. Mit dem Rest wurde eine Immundepletion des verbleibenden Separase/Securins durch anti-Securin-Antikörper durchgeführt (ca. 0,5  $\mu$ g Antikörper pro  $1 \times 10^6$  transfizierte Zellen). Nach der Depletion wurde diesmal 1/5 des Durchflusses abgenommen, um den Verdünnungseffekt durch die Immundepletion auszugleichen. Jeweils die Hälfte der Proben vor und nach Depletion wurden durch Western-Blot mit anschließender Detektion durch die Antikörper anti-Separase-N, anti-hCyclin B1 und anti-Securin analysiert. Der nicht für diese Analyse benutzte Anteil der freien Separase wurde für (B) verwendet. (B) GST-PBD assoziiert mit Separase in Abhängigkeit von Serin 1126. Die in (A) isolierte Securin-freie Separase-wt, -PM1126 und  $\Delta$ 1391-1402 wurde mit gleichen Mengen immobilisierter GST-PBD oder als Kontrolle mit GST inkubiert und danach mit Bindungspuffer gewaschen. Die Menge gebundener Separase und Cyclin B1 wurde anschließend durch Western-Blot mit anti-Separase-N und anti-hCyclin B1 überprüft.

VI: Volllängen-Protein; N: Aminoterminus

Abbildung 25B zeigt, dass mehr Separase-wt spezifisch an PBD bindet als Separase-PM1126. Da jedoch Cyclin B1 in der Präparation der Separase-wt, nicht jedoch bei Separase-PM1126 vorhanden ist, könnte die Interaktion auch über PBD-Cyclin B1/Cdk1-Wechselwirkung verlaufen. Das jedoch wird dadurch ausgeschlossen, dass die ebenfalls Cyclin B1/Cdk1-bindungsdefiziente Separase- $\Delta$ 1391-1402, die jedoch Serin 1126 besitzt, PBD ebenfalls besser bindet als Separase-PM1126.

Die Wechselwirkung von Separase mit PBD erfolgt also dann über phosphoryliertes Serin 1126, wenn die Separase frei vorliegt, nicht aber, wenn sie sich im Komplex mit Securin befindet.



**Abbildung 26: Serin 1399 ist ein *In-vitro*-Substrat für Plx1**

GST-Separase-1063-1440- oder 1063-1506-wt, -PM1126, -PM1126/1346, -PM1399, -PM1346/1399, -PM1126/1346/1363/1399 und -Δ1391-1402 wurden mit Plx1-Kinase in Anwesenheit von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Anschließend wurde die GST-Separase-Menge durch SDS-PAGE und semiquantitative Analyse der Coomassie-Blau-Färbung überprüft. Das SDS-Gel wurde dann getrocknet, um durch semiquantitative Autoradiographie den Einbau von radioaktivem Phosphat zu messen. Die Signalstärke für Phosphat-Einbau wurde auf die Stärke des Coomassie-Blau-Signals normiert, um die relative Separase-Phosphorylierung durch Plx1 zu erhalten. Der relativen Separase-wt-Phosphorylierung wurde der Wert 1 zugeordnet.

### 3.2.9.4 Phosphorylierung der CLD durch Polo-Kinase

Nun wurde die zweite Forderung untersucht, die sich aus dem "Polo-Modell" ergibt, nämlich, ob Polo-Kinase die Separase-CLD grundsätzlich phosphorylieren kann. Bakteriell exprimierte und gereinigte GST-Separasefragmente wurden dazu mit Plx1 (Polo-Kinase von *Xenopus laevis*) und  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Wie vom Modell gefordert, werden Separase-PM1399 und Separase-Δ1391-1402 durch Plx1 etwa 5–10-mal schlechter phosphoryliert als Separase-wt (Abbildung 26, Spuren 4, 5 und 8). Das gilt ebenso für alle Mehrfach-Mutanten, die Serin 1399 nicht besitzen (Separase-PM1346/1399 und -PM1126/1346/1363/1399, Spuren 6 und 3). Mutation der Aminosäure Serin 1126 allein (Spur 1) oder in Kombination mit Threonin 1346 (Spur 7), sowie Einzelpunktmutation von Threonin 1363 und Serin 1406 (nicht gezeigte Daten) haben hingegen keinen Einfluss auf die Separasephosphorylierung.

In Separasefragmenten phosphoryliert Plx1 also fast ausschließlich Serin 1399. Da diese Phosphorylierung für die CLD-Cyclin B1/Cdk1-Interaktion entscheidend ist, könnte Polo-Kinase die Assoziation von Separase und Cdk1 tatsächlich begünstigen.

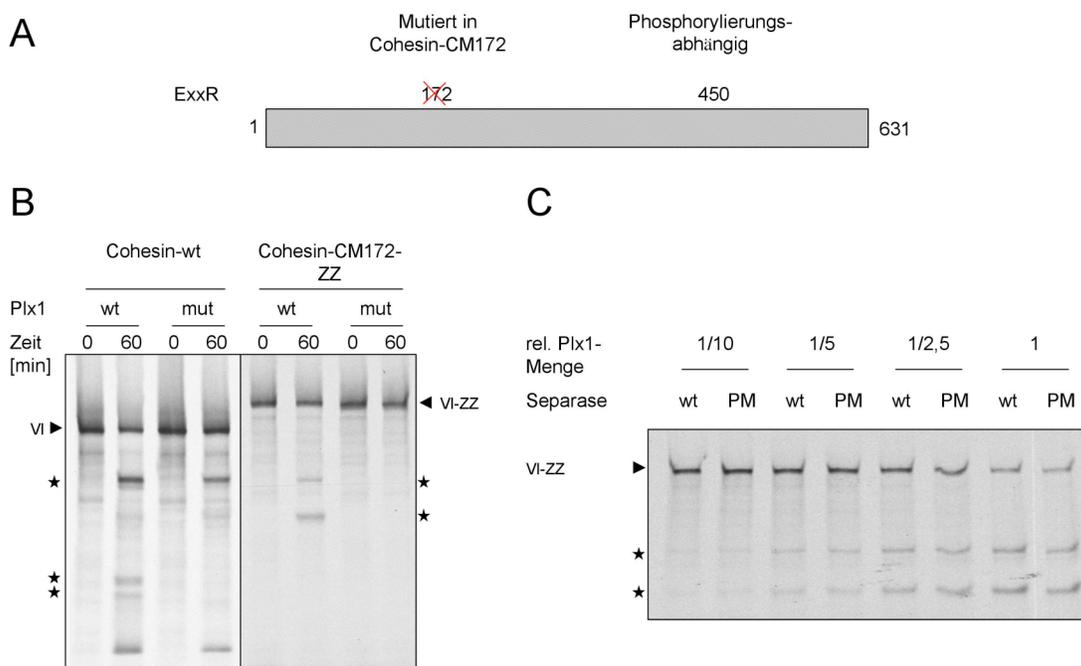
### **3.2.9.5 Konstitutive CLD-Phosphorylierung rettet die Cyclin B1/Cdk1-Bindefähigkeit der Separase-PM1126 nicht**

Das Polo-Modell (Abbildung 22) fordert, dass konstitutive Phosphorylierung der CLD die Serin 1126-Phosphorylierung unnötig für die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung macht (Abschnitt 3.2.9). Denn es besagt, dass die Assoziation von Polo mit phosphoryliertem Serin 1126 die CLD-Phosphorylierung ermöglicht. Dies wiederum würde die Cyclin B1/Cdk1-Bindung an Separase vermitteln.

In Separase-überexprimierenden Zellen kann die Mutation von Threonin 1346, Threonin 1363 und Serin 1399 zu Glutamat bzw. Aspartat (Separase-EED) die Phosphorylierung dieser Reste nachahmen, denn diese Aminosäureaustausche reichen aus, um die Kinase-Bindefähigkeit der Separase-AAA wieder herzustellen. Das wird durch den niedrigeren Anteil von G<sub>2</sub>/M-Zellen bei Überexpression der Separase-EED im Vergleich zu Separase-AAA deutlich (Abbildung 19). Deshalb wurde nun im gleichen experimentellen Ansatz getestet, ob Separase-PM1126-EED Cyclin B1/Cdk1 besser bindet als Separase-PM1126. Abbildung 19 zeigt jedoch, dass die Überexpressionen von Separase-PM1126-EED und Separase-PM1126 wider Erwarten zu einer ähnlich stark ausgeprägten Erhöhung der G<sub>2</sub>/M-Population führt. Das heißt, dass konstitutive Phosphorylierung der entscheidenden CLD-Reste im PM1126-Hintergrund keine verbesserte Kinase-Bindung bewirkt. Die Rolle von phosphoryliertem Serin 1126 besteht also nicht allein darin, die CLD-Phosphorylierung zu dirigieren. Das Polo-Modell kann deshalb nicht zutreffen.

### **3.2.10 Beteiligung der Separase-Polo-Interaktion an der Cohesin-Spaltung**

Der Assoziation von Polo-Kinase mit phosphoryliertem Serin 1126 könnte theoretisch eine zweite wichtige Funktion bei der Cohesin-Spaltung zukommen. Cohesin besitzt nämlich zwei Separase-Spaltstellen (ExxR 169-172 bzw. -447-450). Die Spaltung von Cohesin nach Aminosäure 450 ist abhängig von Phosphorylierung an der Plk1-Phosphorylierungsstelle Serin 454 (Abbildung 27A; Abschnitt 2.2.4.4) während die andere Spaltstelle auch Polo-unabhängig geschnitten werden kann. Separase könnte also ihre aktivierende Kinase zum Cohesin führen und dadurch eine effiziente Cohesin-spaltung vermitteln.



**Abbildung 27: Serin 1126 zu Alanin-Mutation verschlechtert nicht die Plx1-abhängige Cohesin-Spaltung**

(A) Schematische Darstellung von hScc1. hScc1 besitzt zwei Separase-Spaltstellen (ExxR). Die zweite bei Aminosäure 450 wird nur gespalten, wenn Serin 454 phosphoryliert vorliegt. Die erste Stelle bei Aminosäure 172 wird auch phosphorylierungsunabhängig durch Separase geschnitten. ExxR 172 ist in dem in (B) und (C) benutzten Cohesin-CM172 zu RxxE mutiert und wird deshalb von Separase als Substrat nicht mehr akzeptiert. Cohesin-CM172 wird nur noch in Anwesenheit von Plx1 von Separase gespalten.

(B) Plx1-abhängige Cohesin-Spaltung durch Separase kann *in vitro* nachgeahmt werden. <sup>35</sup>S-markiertes Cohesin-wt oder -CM172-ZZ-Myc-His<sub>6</sub> (Cohesin-CM172-ZZ) wurden mit Separase in Anwesenheit von Plx1-wt oder -mut (kinase-inaktiv) mit aktiver Separase inkubiert. Nach 0 min und 60 min wurden Proben davon entnommen und die Cohesin-Spaltung durch Autoradiographie detektiert. (C) Serin 1126 wird nicht für Plx1-vermittelte Verbesserung der Cohesin-Spaltung benötigt. Aktive Separase-wt und PM1126/1346 wurden mit steigenden Konzentrationen Plx1 und gleich bleibenden Konzentrationen von Cohesin-CM172-ZZ-Myc-His<sub>6</sub> inkubiert. Danach wurde das Ausmaß der Cohesin-Spaltung durch Autoradiographie bestimmt.

Stern: Plx1-abhängige Cohesin-Spaltfragmente; VI: Volllängenprotein; VI-ZZ: Volllängenprotein, ZZ-Myc-His<sub>6</sub>-Epitop-markiert

Zunächst wurde getestet, ob eine Polo-abhängige Spaltung von Cohesin *in vitro* nachgeahmt werden kann. Dazu wurde zunächst eine Scc1-Mutante erzeugt, die aufgrund einer Mutation in der Polo-unabhängigen Schnittstelle, potentiell nur in Anwesenheit aktiver Polo-Kinase von Separase gespalten werden kann (Cohesin-CM172). Cohesin-wt oder Cohesin-CM172 wurden dann in Anwesenheit von aktiver oder inaktiver Plx1 mit aktiver Separase inkubiert. In Abbildung 27B ist dargestellt, dass mit beiden Substraten Scc1-Fragmente, die auf Spaltung nach Arginin 450 zurückzuführen sind, nur in Gegenwart aktiver Plx1 nachweisbar sind (mit einem Stern markiert). Eine Plx1-abhängige Spaltung von Cohesin lässt sich also in diesem System rekonstituieren.

Um zu testen, ob die Assoziation von Plx1 mit Separase-Serin 1126 die Phosphorylierung von Cohesin-Serin 454 und damit die Spaltung nach Cohesin-Arginin 450 verbessert, wurden nun Separase-wt oder Separase, bei der Serin 1126 zu Alanin mutiert ist, mit Cohesin-CM172 in Anwesenheit steigenden Konzentrationen von Plx1 inkubiert. Spielt die Assoziation von Plx1 mit Separase-Serin 1126 eine positive Rolle beim Schneiden an der Stelle 450, so erwartet man eine bessere Spaltung mit Separase-wt. Abbildung 27C zeigt jedoch, dass bei beiden Separase-Versionen eine zunehmende Cohesinspaltung mit steigenden Plx1-Konzentrationen zu beobachten ist. Anwesenheit von Serin 1126 verstärkt diesen Effekt nicht.

Eine Beteiligung von Plx1-Assoziation mit Serin 1126 bei der Cohesin-Spaltung kann also mit diesem Ansatz nicht nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex

Während Separase-Inkubation in Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt zu ihrer Aktivierung durch Securin-Abbau führt, wird sie in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt trotz Securin-Abbaus nicht aktiv (Stemmann et al., 2001). Auch die endogene *Xenopus*-Separase wird durch hohe Cyclin B1-Konzentrationen inaktiv gehalten, wie durch Abwesenheit von Schwesterchromatidentrennung in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt gezeigt werden konnte. Diese Separase-Hemmung bedarf ihrer Phosphorylierung an den Resten Serin 1126 und Threonin 1346 (Stemmann et al., 2001). Aus Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt rückisolierte Separase kann jedoch durch Behandlung mit Hochsalzpuffer wieder aktiviert werden (Abbildung 8). Da Hochsalzbehandlung kovalent gebundene Phosphatgruppen nicht von Proteinen entfernen kann, ist Separase-Phosphorylierung also notwendig, aber nicht hinreichend für ihre Hemmung in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt. Stattdessen schien es wahrscheinlich, dass Separase abhängig von ihrer Phosphorylierung an den Resten Serin 1126 und Threonin 1346 in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt mit einem Separase-Inhibitor assoziiert, der durch Hochsalzbehandlung wieder von der Protease dissoziiert. Cyclin B1/Cdk1 wurde daraufhin als Separase-Bindepartner identifiziert, der mit Separase-wt, nicht jedoch mit Separase-PM1126/1346 assoziiert (Gorr et al., 2005). Tatsächlich besitzt Cyclin B1/Cdk1 die Eigenschaften, die für den postulierten Separase-Inhibitor gelten müssen: 1) Die Kinase bindet an inhierte Separase-wt in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt. Sie assoziiert jedoch nicht mit aktiver Separase-wt in Extrakt mit niedriger Cyclin B1-Konzentration. 2) Separase-Aktivierung durch Hochsalzbehandlung oder Mutation der kritischen Phosphorylierungsstellen Serin 1126 und Threonin 1346 zu Alanin geht mit deutlich geringerer Cyclin B1/Cdk1-Bindung einher (Abbildung 9). Cyclin B1/Cdk1 ist also der gesuchte Inhibitor der Separase. Dies konnte endgültig dadurch bewiesen werden, dass rekombinantes Cyclin B1/Cdk1 im gereinigten System ausreicht, um aktive Separase zu inhibieren (Gorr et al., 2005 und Abbildung 16). Die Separase-Inhibition durch Cyclin B1/Cdk1 ist ein Mechanismus, der parallel zur Hemmung durch Securin wirken kann. Dies wird dadurch deutlich, dass die beiden Separase-Inhibitoren nicht gleichzeitig an Separase binden können (Abbildung 11).

Mindestens zwei Bindungsdeterminanten im Separase-Protein sind für die Assoziation mit Cyclin B1/Cdk1 essentiell, phosphorylierbares Serin 1126 und die neu identifizierte dem *S. cerevisiae*-Protein Cdc6 ähnliche CLD („Cdc6 Like Domain“; Abbildung 13). Die

CLD kann die Wechselwirkung zwischen Separase und der Kinase nur dann effizient vermitteln, wenn die CLD-Reste Threonin 1346 (Stemmann et al., 2001) (Abbildung 13) und Serin 1399 (Abbildung 17 und Abbildung 18) phosphoryliert vorliegen.

#### **4.1.1 Die Rolle des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes bei der Anaphase-Induktion**

Die Existenz des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes konnte in Zellen unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden. Er kommt in Prometaphase-Zellen in Anwesenheit von Securin vor. Seine Konzentration steigt jedoch kurzzeitig an, wenn Zellen, die nach einem Thymidin-Arrest eine synchrone Mitose durchlaufen, die Anaphase eingeleitet und Securin schon zum Teil abgebaut haben (Abbildung 10). Diese Beobachtung legte bereits nahe, dass Cyclin B1/Cdk1 und Securin nicht gleichzeitig an Separase binden können. Das konnte *in vitro* im gereinigten System und *in vivo* mit überexprimierten Proteinen bestätigt werden (Abbildung 11). Der in Zellen nachgewiesene Komplex bildet sich - genau wie in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt - in Abhängigkeit von Separase-Phosphorylierung an den Resten Serin 1126 und Threonin 1346 (Abbildung 12). Dies bestätigt, dass es sich auch *in vivo* um den Komplex handelt, der zur gegenseitigen Inhibierung von Separase und Cyclin B1/Cdk1 führt.

Sowohl die Inhibition der Separase als auch die von Cdk1 durch Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung könnten zelluläre Funktionen erfüllen. Nahe liegend ist eine Rolle der Kinase als Securin-ähnlicher Separase-Inhibitor vor der Anaphase-Induktion, denn beide Separase-Inhibitoren werden APC<sup>Cdc20</sup>-vermittelt nach der Inaktivierung des mitotischen Kontrollpunktes (SAC; „Spindle Assembly Checkpoint“) degradiert. Sie besitzen also die Eigenschaften, die für eine zeitlich korrekt regulierte Separase-Aktivierung notwendig sind. Zwar fehlt bis jetzt der Beweis, dass Cyclin B1 aus dem Komplex mit Separase heraus abgebaut werden kann, es existieren jedoch starke Hinweise darauf, dass Securin durch Cyclin B1/Cdk1 hinsichtlich Separase-Hemmung in lebenden Zellen ersetzt werden kann. Zum einen trägt Cyclin B1/Cdk1-abhängige Separase-Inhibition in Zellen zur Hemmung stark überexprimierter Separase bei. Die Überexpression von Separase-PM1126, nicht jedoch die von Separase-wt, führt nämlich zu einer Chromosomentrennung vor der Metaphase und dadurch zu einem SAC-vermittelten Prometaphase-Arrest. Grund dafür ist, dass bei hohen Separase-Konzentrationen Securin limitierend wird. Cyclin B1/Cdk1 kann die überschüssige Separase-wt, nicht aber die Cyclin B1/Cdk1 bindungsdefiziente Separase-PM1126 hemmen (Holland and Taylor, 2006) (Abbildung 19). Zum anderen zeigen Zellen - und sogar Mäuse - ohne Securin quasi keinen Phänotyp (Mei et al., 2001). Zellen hingegen,

denen beide Separase-Inhibitionsmechanismen, Securin- und Cyclin B1/Cdk1-Bindung, fehlen, verlieren die Schwesterchromatidenkohäsion in einem Prometaphase-Arrest schneller als Securin-(-/-)-Kontrollzellen (Huang et al., 2005). Insgesamt zeigen diese Experimente, dass unter Securin-limitierten Bedingungen Cyclin B1/Cdk1 als Regulator für die zeitlich korrekte Separase-Aktivierung wirken kann, und zwar auch bei physiologischen Separase-Konzentrationen. Ein interessanter Aspekt ergibt sich aus dem unerwartet milden Phänotyp der Securin-(-/-)-Zellen in Anwesenheit von Kinasebindungsdefizienter Separase. Da diese Zellen nur in einer künstlich durch Nocodazol verlängerten Prometaphase die Kohäsion verfrüht verlieren, sich ansonsten jedoch relativ normal vermehren, muss es noch mindestens einen weiteren Mechanismus zur Regulation Separase-abhängiger Cohesin-Spaltung geben. Ein Faktor könnte das Shugoshin-Protein sein. Shugoshin schützt centromerisches Cohesin sowohl in *S. pombe* vor Separase-vermittelter Spaltung in der Meiose I (Abschnitt 2.3) als auch in Säugetierzellen vor Cohesin-Entfernung durch den Prophase-Signalweg in der Mitose (Abschnitt 2.2.4.2). Möglicherweise ist es auch in der Lage, mitotisches Cohesin an den Centromeren vor Separase-vermittelter Spaltung zu bewahren. Shugoshin könnte dann über einen noch nicht bekannten Mechanismus nach der Inaktivierung des SACs ausgeschaltet werden, wodurch Separase erst nach korrekter Chromosomen-Anheftung an die mitotische Spindel die Auflösung der Kohäsion bewirken könnte.

#### **4.1.2 Die Funktion von Separase als CKI in der Meiose**

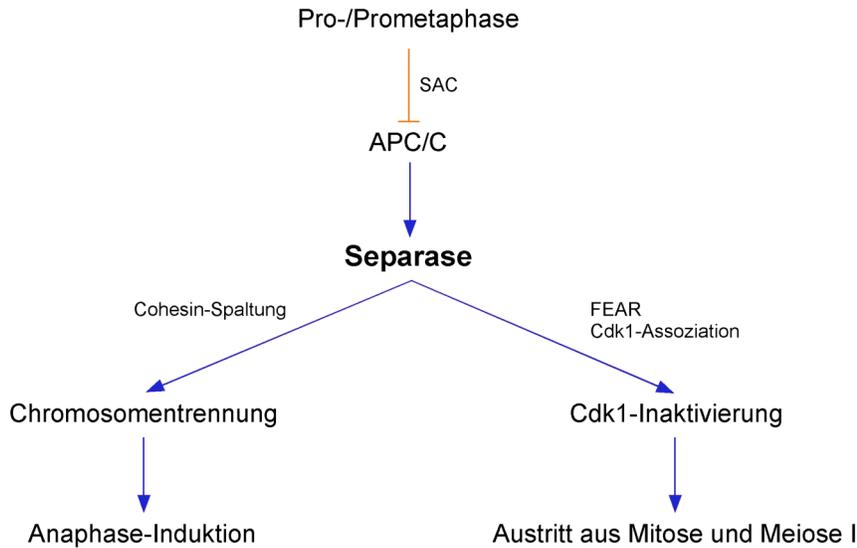
Die *In-vitro*-Aktivität von Separase als CKI (Gorr et al., 2005) hat zu der interessanten Hypothese geführt, dass Separase als erster Cdk1-CKI in Säugetierzellen eine Funktion bei der Hemmung der Cdk1-Kinaseaktivität während des mitotischen Austritts spielen könnte. Tatsächlich bewirken hohe Konzentrationen von Separase-wt, nicht aber die Cdk1-Bindemutante Separase-PM1126/1346, den Austritt eines *Xenopus*-Oozytenextraktes aus einem Anaphase-Arrest, der durch Zugabe von nicht abbaubarem Cyclin B1- $\Delta$ 90 induziert wurde (Gorr et al., 2005). Wenn Cyclin B1/Cdk1-Inhibition durch Separase zur Cdk1-Inaktivierung beim Austritt aus der Meiose II beiträgt, dann sollte die Verhinderung der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung durch Anwesenheit überschüssigen Securins diesen Vorgang verlangsamen. Große Mengen nicht abbaubaren Securins beeinflussen den Meiose II-Austritt jedoch nicht detektierbar (I. Gorr, persönlich Mitteilung). Auch in Zellkultur wurde bisher kein Einfluss der Separase auf die zeitliche Regulation des mitotischen Austritts beobachtet. Es konnte jedoch ein Einfluss der Cyclin B1/Cdk1-Hemmung durch Separase-Komplexierung beim

Übergang von Maus-Oozyten von der Meiose I in die Meiose II bewiesen werden (Abbildung 21) (Gorr et al., 2006). Dazu wurde ein Antikörper gegen Separase hergestellt, der zwar die Cyclin B1/Cdk1-Assoziation stört, nicht aber die proteolytische Separase-Aktivität hemmt (anti-Separase-CBD). Nach Injektion dieses Antikörpers in unreife Maus-Oozyten konnte nach Induktion der Oozytenreifung ein Defekt bei der Polkörperbildung, die ein Kennzeichen für den Meiose I-Meiose II-Übergang ist, gezeigt werden (Abbildung 21). Die Antikörper-behandelten Oozyten besitzen getrennte Chromosomen, was bedeutet, dass der Defekt nicht als sekundäre Folge mangelhafter Chromosomen-Dissoziation auftritt (Gorr et al., 2006). Die Verhinderung der Polkörperbildung ist auf eine ungenügende Cdk1-Hemmung zurückzuführen, denn der Phänotyp kann durch künstliche Inhibition der Cdk1-Aktivität gerettet werden. Außerdem geht die anti-Separase-CBD-Injektion mit einer 7-fach höheren Kinase-Aktivität zum Zeitpunkt der Polkörperbildung bei IgG-injizierten Eizellen im Vergleich zu diesen Kontroll-Oozyten einher (Abbildung 21). Diese starke Erhöhung der Kinase-Aktivität steht im offensichtlichen Widerspruch zu dem in mitotischen Zellen beobachteten niedrigen Anteil von Cyclin B1 im Komplex mit Separase. Nur weniger als 1,7 % des gesamten Cyclin B1 sind zum Zeitpunkt der maximalen Assoziation an Separase gebunden (Abbildung 20). Dies legt nahe, dass entweder der Anteil von Cyclin B1, der sich im Komplex mit Separase befindet, in der Meiose I höher ist als in mitotischen Zellen, oder dass eine transiente Interaktion zwischen Separase und Cyclin B1/Cdk1 ausreicht, um die Cdk1-Aktivität stark zu senken. Es wurde nicht untersucht, ob ein hoher Anteil von Cyclin B1 in der Meiose mit Separase assoziiert. Ist dies der Fall, so müsste man die speziellen meiotischen Bedingungen dafür verantwortlich machen. So könnte beispielsweise ein Meiose I-spezifischer Faktor die Komplexbildung verbessern. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre ein höheres meiotisches Separase-Cyclin B1/Cdk1-Verhältnis im Vergleich zur Mitose. Dadurch würde das Bindungsgleichgewicht in Richtung Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplex verschoben. Es ist jedoch unbekannt, ob Separase speziell in meiotischen Oozyten in besonders großen Mengen vorkommt. Alternativ könnte Cyclin B1/Cdk1 nach Separase-Bindung durch einen katalytischen Mechanismus inhibiert werden. Dann wäre die Bildung des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes nur ein erster transienter Schritt, dem ein zweiter katalytischer Prozess der Cdk1-Hemmung folgt. Nach Dissoziation des Komplexes stünde Separase danach wieder für einen weiteren Zyklus der Cyclin B1/Cdk1-Hemmung zur Verfügung. Damit müsste zu keinem Zeitpunkt ein hoher Anteil von Cyclin B1 im Komplex mit Separase vorliegen. Eine attraktive Möglichkeit für einen katalytischen Schritt ist die APC/C-abhängige Cyclin B1-Degradation. Separase-Assoziation könnte

den Cyclin B1-Abbau beschleunigen. In der Tat scheint der Antikörper, der die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung verhindert, den Abbau von GFP-markiertem Cyclin B1 in Maus-Oozyten zu verlangsamen (A. Reis und K. Jones; persönliche Mitteilung). Offen bleibt, wodurch die Meiose I-Spezifität dieses Mechanismus bedingt werden könnte.

Unabhängig vom genauen Mechanismus eignet sich freie Separase sehr gut für die Anaphase-spezifische Herabregulierung der Cdk1-Aktivität, denn freie Separase kommt erst nach der Inaktivierung des SACs und der damit verbundenen APC/C-Aktivierung und Chromosomentrennung in der Zelle vor. Das ist genau der Zeitpunkt, an dem die Cdk1-Aktivität sinken muss, damit die Meiose I-Spindel abgebaut werden kann. Separase zeigt also zum richtigen Zeitpunkt die richtigen Aktivitäten, um die Anaphase I-Induktion mit dem Meiose I-Meiose II-Übergang zu koppeln. Da die Assoziation zwischen Separase und Cyclin B1/Cdk1 durch Cdk1 selbst über Serin 1126- und Threonin 1346-Phosphorylierung reguliert wird, ergibt sich eine interessante Konstellation: Separase könnte als Sensor für Cdk1-Aktivität über den Phosphorylierungszustand von Serin 1126/Threonin 1346 dienen. Ist die Cdk1-Aktivität vor dem Meiose I-Meiose II-Übergang noch zu hoch, veranlasst Cdk1 über Separase-Phosphorylierung ihre eigene Inaktivierung, bis ihre Aktivität soweit gesunken ist, dass Separase durch Phosphatasen effizient genug dephosphoryliert werden kann und die Cdk1-Inaktivierung so gestoppt wird. So könnte die meiotische Zelle den Balanceakt meistern, die Cdk1-Kinaseaktivität stark genug zu senken, um die Meiose I-Spindel abzubauen zu können. Gleichzeitig könnte sie dadurch sicherstellen, dass die Cdk1-Aktivität nicht unter einen kritischen Wert sinkt, um eine Induktion der Replikation zwischen den beiden meiotischen Teilungen zu verhindern. In der Tat konnte in mitotischen Zellen nachgewiesen werden, dass die Serin 1126-Phosphorylierung nach Anaphase-Induktion sinkt (Stemmann et al., 2001). Das bedeutet, dass eine sinkende Cyclin B1-Konzentration auch unmittelbar zu einem niedrigeren Serin 1126-Phosphorylierungsstatus führt.

Dass Separase-abhängige Cdk1-Regulierung am Ende der Meiose I grundsätzlich funktionieren kann, zeigen Erkenntnisse in *S. cerevisiae*. In diesem Organismus ist nämlich die Rolle von aktiver Separase bei der Cdk1-Inaktivierung bereits recht detailliert geklärt. Dort wirkt Separase als Induktor des FEAR-Netzwerks, das letztendlich über die Cdc14-Phosphatase zur Cdc28-Hemmung (*S. cerevisiae*-Homolog der Cdk1) führt und essentiell für den Meiose I-Meiose II-Übergang ist (Abschnitt 2.2.5.1). Hefe-Zellen ohne funktionierendes FEAR-Netzwerk bauen zwischen den beiden



**Abbildung 28: Erweitertes Modell der Separase-Funktionen und ihrer Regulation**

Nach der korrekten Anheftung der Chromosomen an die Spindel in der Metaphase wird der SAC gehemmt und der APC/C dadurch aktiv. Separase wird dann vom APC/C aktiviert und reguliert daraufhin gleichzeitig die Chromosomentrennung und die Cdk1-Inaktivierung. Dieser Signalweg trennt einerseits die Metaphase zeitlich von der Anaphase und dem Mitose/Meiose I-Austritt und koppelt andererseits die Ausführung der Anaphase mit dem Mitose/Meiose I-Austritt (Abschnitt 4.1.2). In der Hefe ist für die Cdk1-Inaktivierung das Separase-induzierte FEAR-Netzwerk, in Säugetierzellen die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung, verantwortlich. Für beide Mechanismen ist die Separase-Aktivierung durch Securin-Abbau notwendig.

meiotischen Teilungen die Meiose I-Spindel nicht ab, vermutlich, weil sie Cdk1 nicht inaktivieren können. Das hat zur Folge, dass beide meiotischen Teilungen an derselben Spindel vonstatten gehen und deshalb die Schwesterchromatiden nicht korrekt verteilt werden können (Marston et al., 2003). Die Separase-abhängige Cdk1-Inaktivierung beim Meiose I-Meiose II-Übergang ist also funktionell zwischen *S. cerevisiae* und Säugetieren konserviert, wenn die Mechanismen sich auch unterscheiden. Dies kann in einem erweiterten Modell zur Separase-Funktion, zusammengefasst werden, bei dem die Koppelung der Anaphase-Induktion mit dem Meiose I-Meiose II-Übergang über Separase deutlich wird (Abbildung 28).

Das FEAR-Netzwerk hat außer beim Meiose I-Meiose II-Übergang noch Funktionen bei der Regulation der Spindel-Dynamik (Higuchi and Uhlmann, 2005), der rDNA-Segregation (D'Amours et al., 2004; Sullivan et al., 2004; Wang et al., 2004) und der zeitlichen Regulation des mitotischen Austritts (Stegmeier et al., 2002). Es bleibt noch zu klären, ob Separase auch in Säugetieren zur Regulierung dieser Prozesse beiträgt. Da ein FEAR-Netzwerk in höheren Eukaryoten anscheinend nicht existiert, können wie in der

Meiose nur die generellen Funktionen und nicht die genauen Mechanismen konserviert sein.

#### **4.1.3 Der Mechanismus der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung**

Die Phosphorylierung von Serin 1126 und in einem geringeren Maß auch Threonin 1346 sind für die Inhibition von Separase in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt notwendig (Stemmann et al., 2001). Diese beiden Reste können *in vitro* von Cyclin B1/Cdk1 phosphoryliert werden und sind auch für die Separase-Bindung der Kinase notwendig (Gorr et al., 2005) (Abbildung 13). Trotzdem handelt es sich bei der stabilen Wechselwirkung zwischen Separase und Cyclin B1/Cdk1, die zur Separase-Hemmung führt, nicht um eine einfache Kinase-Substrat-Beziehung, da das sehr gute Cdk1-Substrat Histon H1 diese Interaktion nicht zu unterdrücken vermag, während Securin dazu fähig ist (Abbildung 11).

Zwar schließen sich die Bindungen von Cyclin B1/Cdk1 und Securin an die Separase *in vitro* und *in vivo* gegenseitig aus (Abbildung 11), sie konkurrieren jedoch nicht miteinander um die gleichen Bindungsstellen in der Protease. Denn im Gegensatz zur Kinase bindet Securin gleich gut an Separase-wt wie an Separase-PM1126 und Separase-CLD-Mutanten (nicht gezeigt).

##### **4.1.3.1 Funktionelle Homologie zwischen Separase-CLD und Cdc6**

Die Tatsache, dass Threonin 1346 in der Primärstruktur weit weg von Serin 1126 im Separase-Protein liegt, hat zu der Idee einer - neben Serin 1126 - zweiten Bindedeterminante für die Wechselwirkung mit der Cyclin B1/Cdk1-Kinase geführt. In der Tat konnte diese zweite Bindestelle durch bioinformatisch gestützte systematische Deletions- und Mutations-Analyse auf nicht in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt hemmbare Separase-Versionen identifiziert werden (Abbildung 13). Die entsprechende Region umfasst den 62 Aminosäuren großen Bereich zwischen Glycin 1342 und Prolin 1404. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie zum *S. cerevisiae*-Protein Cdc6 wurde diese Region CLD („Cdc6 Like Domain“) genannt. Bindungsexperimente mit Separasefragmenten haben daraufhin gezeigt, dass ein minimales Separase-Fragment von den Aminosäuren 1192 bis 1404 für eine effiziente Assoziation mit der Kinase ausreicht (Abbildung 17).

Die Frage, ob die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung nach einem ähnlichen Mechanismus wie die Cdc6-Clb2/Cdc28-Wechselwirkung funktioniert, ist für die generelle Bedeutung der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Wechselwirkung hinsichtlich der Cyclin B1/Cdk1-Biologie ein entscheidender Aspekt. Wenn es sich dabei nämlich um einen konservierten Mechanismus handelt, dann könnte die phosphorylierungsabhängige

Wechselwirkung von Cyclin B1/Cdk1 ein Prinzip sein, das auch für die Komplexbildung mit bisher noch nicht identifizierten Bindepartnern zutrifft. Mehrere Experimente sprechen für eine homologe Wirkweise von Separase-CLD und Cdc6: 1) Die Homologie des Cdc6-Aminoterminus und der Separase-CLD (

Abbildung 14) ist ausgeprägt genug, um die CLD als Cyclin B1/Cdk1-bindende Domäne zu identifizieren (Abbildung 13). 2) Die CLD kann, genau wie der Cdc6 N-Terminus als eigenständiges Cyclin B1/Cdk1-Bindemodul fungieren (Abbildung 16 und Abbildung 17). 3) Die Separase-CLD- und die Cdc6-Interaktion (Mimura et al., 2004) mit der Kinase sind beide abhängig von CLD- bzw. Cdc6-Phosphorylierung (Abbildung 17 und Abbildung 18). Zwei der vier für die Kinase-Bindung von Cdc6 wichtigen phosphorylierten Aminosäuren sind in der Separase-CLD konserviert und entsprechen den Separase-Resten Threonin 1346 und Serin 1399 (Abbildung 22). In der Tat verschlechtert die Verhinderung der CLD-Phosphorylierung durch den Austausch kritischer Reste gegen Alanin die Separase-Cyclin B1/Cdk1-Assoziation in Zellen deutlich, während die Nachahmung konstitutiver Phosphorylierung durch Mutation der gleichen Aminosäuren gegen Glutamat/Aspartat diesen Phänotyp rettet (Abbildung 19). Ein weiteres Serin in Cdc6 ist natürlicherweise in der CLD gegen Aspartat ausgetauscht (Aspartat 1403, Abbildung 22B). Dies könnte auch an dieser Stelle eine Phosphorylierung an der betreffenden Stelle nachahmen.

Für Cdc6 wurde gezeigt, dass es direkt mit B-Typ-Cyclinen interagiert. Die beschriebene Homologie zur Separase-CLD legt nahe, dass die CLD ebenfalls direkte Kontakte mit der Cyclin B1-Untereinheit der Kinase ausbildet. Wie bereits erwähnt, konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass die CLD ohne Einfluss von Serin 1126 für die Kinase-Bindung ausreicht. Kurze Separasefragmente binden die Kinase in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt sogar ausschließlich über die CLD (Abbildung 17). Aber auch die Hemmung von Vollängen-Separase kommt, wenn auch ineffizienter, ohne phosphorylierbares Serin 1126 aus, während zusätzliche Inaktivierung der CLD die Separase nahezu vollständig resistent gegen Inhibition durch rekombinante Cyclin B1/Cdk1-Kinase macht (Abbildung 16).

Die direkte Wechselwirkung von Cyclin B1 mit der CLD konnte bisher nicht bewiesen werden, vor allem wegen experimenteller Schwierigkeiten beim biochemischen Arbeiten mit den im gereinigten System klebrigen Separase- und Cyclin B1-Proteinen. Um dennoch eine direkte Kontaktbildung zwischen der CLD und Cyclin B1 nachweisen zu können, wurde bereits ein Ansatz etabliert, bei dem eine künstlich an spezifischen Positionen in Separasefragmente eingebaute Aminosäure durch UV-Bestrahlung mit Separase-Bindepartnern kovalent vernetzt werden kann (Wang and Schultz, 2004). Mit

dieser Methode konnte bereits ein mit der Region um Serin 1126 reagierender Antikörper kovalent an Separase gebunden werden (C. Kuffer, persönliche Mitteilung). Dieser experimentelle Ansatz sollte nicht nur klären, ob Cyclin B1 an die CLD bindet, sondern auch, ob Cdk1 direkte Wechselwirkungen mit der CLD eingehen. Zudem ist dieses System dazu geeignet, um nach der kovalenten Kopplung die Region in Cyclin B1, die Kontakte mit Separase ausbildet, durch Massenspektrometrie zu identifizieren. Ausgehend davon können dann Cyclin B1-Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr phosphorylierungsabhängig mit Separase interagieren. Diese Mutanten können anschließend als Negativkontrolle verwendet werden, um neue Cyclin B1-Bindepartner, die in der CLD/Cdc6-ähnlichen Weise an Cyclin B1 binden, biochemisch aus mitotischen Zellextrakten zu reinigen.

#### **4.1.3.2 Die Rolle von Serin 1126-Phosphorylierung bei der Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung**

Auf welche Art und Weise fördert die Phosphorylierung von Separase-Serin 1126 die Bindung an Cyclin B1/Cdk1? Es gibt starke Hinweise darauf, dass Serin 1126-Phosphorylierung keine permanenten direkten Kontakte mit der Kinase ausbildet: 1) Serin 1126-Phosphorylierung ist zwar essentiell für die Bindung von Separase an Cyclin B1/Cdk1-Komplexes in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt. Ist der Komplex bereits gebildet, so kann die Phosphatgruppe jedoch effizient entfernt werden, ohne ihn zu dissoziieren (Holland and Taylor, 2006) (nicht gezeigte Daten). Phosphoryliertes Serin 1126 nimmt an der Wechselwirkung nach der Komplexbildung also nicht mehr entscheidend Teil. 2) In Cdc6 existiert keine zu Serin 1126 homologe Aminosäure. Eine Cdc6/CLD-ähnliche Wechselwirkung mit B-Typ-Cyclinen ist also prinzipiell nicht auf einen zu Serin 1126 homologen Rest angewiesen. 3) Die CLD kann als eigenständige Cyclin B1/Cdk1-Bindedomäne fungieren (Abschnitt 4.1.3.1).

Es scheint also, dass die Phosphorylierung von Separase-Serin 1126 ein zusätzliches regulatorisches Element darstellt, das bei Cdc6-Interaktion mit Cyclin B1 keine Rolle spielt.

Das „Polo-Modell“ (Abbildung 22) schien eine attraktive Möglichkeit, den Mechanismus der Serin 1126-Beteiligung an der Komplexbildung zu erklären. Sowohl die Bindung der PBD, der Phosphoprotein-Bindedomäne der Polo-Kinase, an phosphoryliertes Serin 1126 freier Separase (Abbildung 23 und Abbildung 25) als auch die Phosphorylierung des CLD-Rests Serin 1399 durch Polo (Abbildung 26) bilden die Grundlage dieses Modells: In einem ersten Schritt phosphoryliert Cyclin B1/Cdk1 Serin 1126 und Threonin 1346, ohne jedoch stabil an Separase zu binden. Phosphoryliertes Serin 1126 rekrutiert dann

Plk1 an Separase. Auf diese Weise konformativ aktiviert, phosphoryliert Plk1 nun Serin 1399 innerhalb der CLD. In einem letzten Schritt bindet dann die Cdk1-Kinase über Cyclin B1 stabil an die phosphorylierte CLD. Trotz viel versprechender stützender Ergebnisse (Abschnitte 3.2.9.1, 3.2.9.3 und 3.2.9.4), konnte das Polo-Modell jedoch nicht endgültig bestätigt werden. Einige Befunde sprechen sogar eindeutig gegen eine Beteiligung von Polo bei der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung: 1) Dass Serin 1126 für eine Bindung von Separasefragmenten an die Kinase abkömmlich ist, weist zwar auf seine indirekte Rolle hin, spricht aber gleichzeitig auch gegen eine Phosphorylierung der CLD in Abhängigkeit von phosphoryliertem Serin 1126. 2) Eine deutliche Verminderung der Plx1-Aktivität durch Zugabe eines inhibitorischen Antikörpers, die für die Unterdrückung Polo-abhängiger Prozesse in *Xenopus*-Oozytenextrakt ausreicht, stört die Bindung von Separase an Cyclin B1/Cdk1 in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt wider Erwarten nicht (nicht gezeigte Daten). 3) Durch Immunpräzipitation von endogenen Proteinen aus HeLaS3-Zellen oder *Xenopus*-Oozytenextrakten konnte nie ein Separase-Polo-Komplex isoliert werden. Stattdessen erforderte dieser Nachweis stets die Überexpression der beteiligten Proteine (Abbildung 24). 4) Ein Vergleich von Separase-wt und Separase-PM1126 durch semiquantitative Massenspektrometrie ergab, dass der Phosphorylierungsstatus von Serin 1399 in transfizierten Zellen nicht von der Serin 1126-Phosphorylierung abhängt (nicht gezeigte Experimente in Kollaboration mit Dr. Roman Körner). 5) Mutation der Reste Threonin 1346, Threonin 1363 und Serin 1399 zu Glutamat/Aspartat (Separase-EED) kann die Bindung von Separase-AAA, bei der die gleichen Reste gegen Alanin ausgetauscht sind, an Cyclin B1/Cdk1 retten. Die Glutamat/Aspartat-Mutationen repräsentieren also eine phosphorylierte CLD. Separase, bei der zusätzlich zur EED-Mutation noch Serin 1126 zu Alanin ausgetauscht ist (Separase-PM1126-EED), kann Cyclin B1/Cdk1 jedoch nicht besser binden als Separase-PM1126 (Abbildung 19). CLD-Phosphorylierung kann also den Wegfall der Serin 1126-Phosphorylierung nicht kompensieren. Der Beitrag von phosphoryliertem Serin 1126 beschränkt sich also nicht auf die Vermittlung der CLD-Phosphorylierung.

Vor dem Hintergrund dieser starken Argumente gegen das Polo-Modell erscheint ein alternatives Modell fast wahrscheinlicher (Abbildung 29): Die Separase-CLD liegt demnach in einer Konformation vor, die eine feste Bindung von Cyclin B1 an die CLD nicht erlaubt. Die Phosphorylierung von Serin 1126 zusammen mit einer initialen schwachen Wechselwirkung von Cyclin B1 mit der CLD ermöglichen eine Konformationsänderung der CLD, die dann zur starken Wechselwirkung mit Cyclin B1 und gegenseitigen Hemmung von Separase und Cdk1 führt. Serin 1126-Phosphorylierung könnte dabei intramolekulare Wechselwirkungen aufheben, die den Übergang der CLD

in die Konformation, die starke Interaktion mit der Kinase erlaubt, inhibieren, die jedoch den Zugang der von Cyclin B1 zur CLD nicht verhindern.

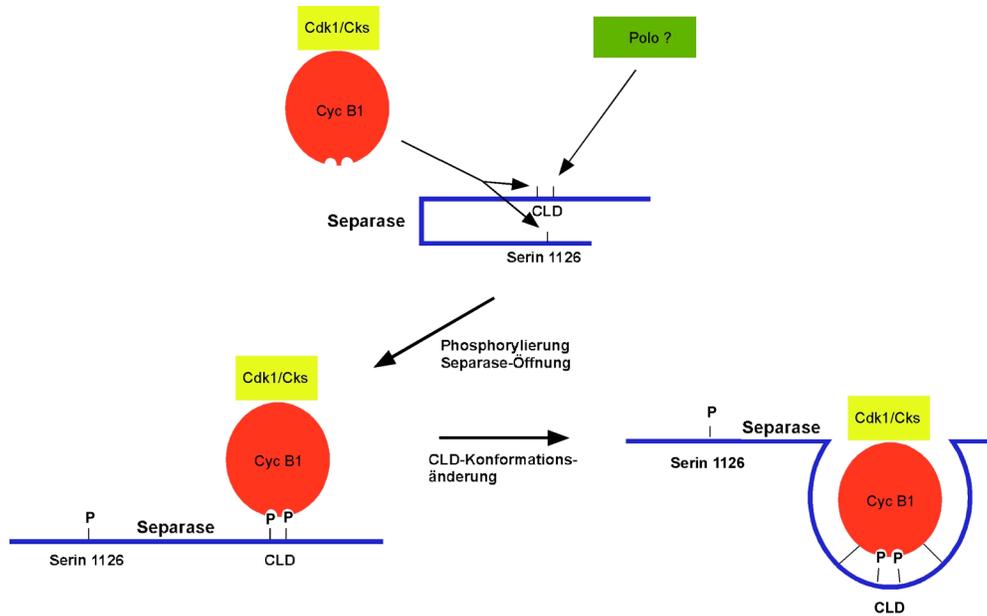
Dieses Modell integriert die indirekte Beteiligung von Serin 1126 an der Kinase-Bindung mit der direkten Wechselwirkung der CLD mit Cyclin B1. Die Bindung der Kinase an Separasefragmente ohne Einfluss von Serin 1126-Phosphorylierung (Abbildung 17) stützt dieses Modell. Denn die CLD ist diesem Experiment zufolge für die – wenn auch vielleicht ineffiziente - Kinase-Bindung ausreichend. Das Modell erklärt auch den scheinbaren Widerspruch, dass die Bindung von Cyclin B1/Cdk1 im gereinigten System mit rekombinanter Kinase weniger abhängig von Serin 1126-Phosphorylierung ist als in Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt (Abbildung 16), weil die CLD in dem Modell auch ohne Serin 1126-Phosphorylierung zugänglich ist. Bei Separase-Inhibition mit rekombinanter Cyclin B1/Cdk1 erzwingt man durch besonders hohe Kinase-Konzentrationen den Übertritt der CLD in die Konformation, die starke Kinase-Bindung erlaubt. Das geschieht ohne Phosphorylierung von Serin 1126 allein durch die initiale schwache Wechselwirkung von Cyclin B1 mit der CLD.

In das vorgestellte Modell zur Komplexbildung ließen sich auch zwanglos sowohl eine Beteiligung der Polo-Kinase an der CLD-Phosphorylierung vielleicht durch eine vorübergehende Interaktion mit Serin 1126, als auch eine Kontaktbildung zwischen Separase und der Cdk1-Untereinheiten integrieren. Eine Beteiligung von Cks bei der Komplexbildung konnte hingegen ausgeschlossen werden. Cyclin B1/Cdk1, das Cks aufgrund von Punktmutationen im Cdk1-Protein nicht mehr binden kann, interagiert nämlich genauso gut mit Separase wie Cyclin B1/Cdk1-wt (O. Stemmann, persönlich Mitteilung).

#### **4.1.4 Die Bedeutung der Entdeckung der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung**

In der Mitose und in der Meiose müssen die Chromosomen mit höchst möglicher Genauigkeit auf die Tochterzellen verteilt werden. Geschieht dies nicht, so sind Krankheiten mit genetisch bedingter Komponente unausweichlich. Dazu gehören sowohl Krebserkrankungen als auch Trisomien. Die hier vorgestellten Ergebnisse zur Regulation der Anaphase und meiotischer Prozesse könnten also zum besseren Verständnis dieser Vorgänge und damit indirekt zur Entwicklung adäquater Therapien beitragen.

Die Entdeckung der Separase-Cyclin B1/Cdk1-Interaktion ist für die Mitose/Meiose-Forschung aus mehreren Gründen sehr interessant. Erstens ist Separase der erste beschriebene Cdk1-Inhibitor (CKI) in Säugetieren, der für die meiotischen Inaktivierung der Cdk1-Kinase benötigt wird. In niederen Eukaryoten übernimmt die CKI-vermittelte



**Abbildung 29: Modell zur Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexbildung**

Separase wird an Serin 1126 und in der CLD phosphoryliert. Dies geschieht zum Teil durch Cdk1 selbst (Serin 1126 und Threonin 1346). Die CLD-Phosphorylierung (an Serin 1399 und/oder Threonin 1363) wird durch eine andere Kinase, vielleicht von Polo, durchgeführt. Eine durch CLD-Phosphorylierung ermöglichte schwache Wechselwirkung mit Cyclin B1 zusammen mit der Phosphorylierung von Serin 1126 verursachen den Übergang der CLD in eine Konformation, die eine starke Interaktion möglicherweise durch die Ausbildung zusätzlicher Kontaktstellen mit Cyclin B1 bewirkt. Die Serin 1126-Phosphorylierung könnte dazu dadurch beitragen, indem sie die Separase-Struktur „öffnet“, so dass eine intramolekulare Wechselwirkung, die den CLD-Konformationsübergang verhindert, aufgehoben wird.

Cdk1-Hemmung auch bei der mitotischen Cdk1-Inaktivierung wichtige Rollen (Abschnitt 2.2.3.2). Außerdem trägt das Prinzip der CKI-abhängigen Cdk-Hemmung auch in Säugetieren zur zeitlichen sowie zur Kontrollpunkt-Regulation nicht mitotischer/meiotischer Zellzyklus-Phasen bei. Die Entdeckung der Separase-abhängigen Cdk1-Inhibition könnte also ein Ansatzpunkt sein, neue Mechanismen der mitotischen und meiotischen Regulation zu erforschen. Zweitens scheint es sich bei der phosphorylierungsabhängigen Wechselwirkung zwischen Cyclin B1/Cdk1 und seinen CKI um ein Prinzip zu handeln. Dies wird durch die homologe Art und Weise, in der Separase und Cdc6 B-Typ-Cycline binden, nahe gelegt (Mimura et al., 2004). Da bei der Clb28-Cdc6-Interaktion funktionell die Hemmung von Cdc6 im Vordergrund zu stehen scheint (Mimura et al., 2004), könnte diese Art der Wechselwirkung eine neue Wirkweise darstellen, wie Cyclin B1/Cdk1 seine zellulären Funktionen erfüllt. Drittens scheint klar, dass zusätzlich zur Securin-abhängigen Separase-Regulation die Cyclin B1/Cdk1-abhängige Separase-Inhibition zur zeitlichen Kontrolle der proteolytischen Separase-Aktivität beiträgt (Abschnitt 4.1.1), ein wichtiger Aspekt für die Erforschung der Mechanismen, die die Anaphase regulieren.

## 4.2 Identifizierung neuer Separase-Substrate durch „*In Vitro* Expression Cloning“ (IVEC)

Durch IVEC mit einer cDNA-Bibliothek aus dem Gehirn eines erwachsenen Menschen (Abschnitte 3.1) konnten 25 cDNA-Gruppen, die ein Separase-Substrat enthalten, aus insgesamt 960 Gruppen identifiziert werden. 23 der positiven Gruppen enthalten *Sccl1*, zwei das GASP-Protein und keine Gruppe Separase, die sich bekanntlich selbst spaltet (Abschnitt 2.2.4.3). Im Fall von *Sccl1* ist die Bibliothek offensichtlich hoch redundant, während Separase nicht vorkommt (Separase kann gut *in-vitro*-translatiert werden). Diese Ergebnisse zeigen zwar, dass IVEC dazu geeignet ist, neue Separase-Substrate zu identifizieren. Auf der anderen Seite wird aber auch deutlich, dass die Qualität der cDNA-Bibliothek ein entscheidender Punkt bei der Anwendung dieser Methode ist. Von den laut Hersteller 50-100 Klonen in jeder cDNA-Gruppe konnten pro Gruppe durch SDS-PAGE und Autoradiographie nur ca. 5-15 als Proteine detektiert werden, wie durch *In-vitro*-Translation kleinerer cDNA-Gruppen bei der „Sib-Selection“ deutlich wurde. Zwar waren 20-40 Proteinbanden pro Gruppe zu sehen. Aufgrund von Translations-Abbrüchen, ein bekanntes Phänomen bei *In-vitro*-Translationen, stammten jedoch mehrere Banden von ein und derselben cDNA ab. Selbst ohne Einberechnung der Redundanz konnten also im günstigsten Fall ca. 15000 cDNAs durch die IVEC-Methode erfasst werden. Das entspricht ungefähr der Hälfte des menschlichen Genoms. Die Qualität der cDNA-Bibliothek ist allerdings nicht die einzige Ursache für die niedrige Zahl detektierter cDNAs. Weitere Limitierungen sind die begrenzte Auflösung der SDS-Polyacrylamid-Gele sowie die mangelhafte *In-vitro*-Translatierbarkeit mancher Proteine. Die Methodik könnte deshalb folgendermaßen verbessert werden: 1) Da Redundanz in konventionellen cDNA-Bibliotheken nicht vollständig zu vermeiden ist, müsste eine cDNA-Bibliothek durchsucht werden, bei der nachweislich jede cDNA genau einmal vorhanden ist. Solche Bibliotheken sind kommerziell erhältlich. 2) Um schlechte Translatierbarkeit individueller cDNAs teilweise auszugleichen, sollten die Gruppen-Größe und damit die durchschnittliche Konzentration der einzelnen cDNAs in der *In-vitro*-Translationsreaktion optimiert werden. 3) Da Separase-Substrate zum Teil durch Phosphorylierung in ihrer Eigenschaft als Substrat verbessert werden (Abschnitt 2.2.4.2), könnten mitotische posttranslationale Protein-Modifikationen durch Inkubation der Translationsreaktionen mit mitotischem *Xenopus*-Oozytenextrakt oder mit rekombinanter Polo-Kinase vor der Separase-Spaltreaktion erreicht werden.

Diese Modifikationen der Methodik würden die systematische Suche nach Separase-Substraten durch IVEC zwar deutlich aufwendiger machen. Die Tatsache, dass die Methode funktioniert, sowie die relativ hohe Wahrscheinlichkeit, dass noch weitere

Separase-Substrate existieren (Abschnitt 2.2.5), machen die IVEC-Methode dennoch für diesen Zweck attraktiv. Zudem sind die Determinanten, die die Separase-Spezifität entscheiden, nur unzureichend bekannt (Abschnitt 2.2.4.3). Deshalb ist es sehr schwer, durch bioinformatische Analyse neue Separase-Substrate zu identifizieren. Zu biochemischen Ansätzen der Separase-Substrat-Identifikation gibt es derzeit also keine Alternative.

Das GASP-Protein („G-Protein Coupled Receptor Associated Sorting Protein“; 1395 Aminosäuren) wurde zweimal als N-terminal verkürzte Version (Aminosäuren 640-1395) durch IVEC identifiziert (Abbildung 5). Auch das Volllängen-GASP ist ein *In-vitro*-Separase-Substrat (Abbildung 6). Separase schneidet GASP ausschließlich nach der Konsensusstelle ExxR 770, obwohl noch sechs weitere ExxR-Stellen im Protein vorhanden sind (Abbildung 7).

GASP ist ein Faktor, der für den Transport der so genannten Sieben-Transmembran-Rezeptoren DOR (Whistler et al., 2002) und D2 (Bartlett et al., 2005) zu Lysosomen gebraucht wird. DOR und D2 sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Während DOR ein Opioid-Rezeptor ist, ist D2 für die Signaltransduktion von Dopamin verantwortlich (Bartlett et al., 2005). GASP interagiert mit den C-Termini der genannten, aber auch mit einer Subpopulation anderer GPCR (Heydorn et al., 2004). Nach künstlicher GASP-Inaktivierung wird der DOR-Rezeptor, nachdem er seinen Liganden gebunden hat und internalisiert worden ist, vermehrt zurück zur Plasmamembran transportiert, anstatt in Lysosomen degradiert zu werden (Whistler et al., 2002). Man vermutet, dass der Abbau von GPCR für die Desensibilisierung neuronaler Zellen nach Einwirkung des Liganden sorgt. Somit ist GASP an klinisch relevanten Prozessen wie der steigenden Toleranz von Patienten gegenüber niedrigen Medikamenten-Dosen beteiligt. Interessanterweise wirkt die Überexpression eines C-terminalen GASP-Fragments dominant negativ auf die GASP-Funktion (Whistler et al., 2002). Somit kann man spekulieren, dass ein durch Separase-vermittelte Spaltung entstandenes GASP-771-1395 durch vermehrte GPCR Exponierung auf der Plasmamembran die Sensibilität von Zellen für hormonelle Stimulation erhöht.

Da das Ratten-Homolog von GASP, das PIPS-Protein, nicht von Separase gespalten werden kann (nicht gezeigt), ist GASP jedoch wahrscheinlich kein *in vivo* relevantes Substrat von Separase, weshalb die Arbeit an diesem Protein eingestellt wurde.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Hard- und Software

Die vorliegende Arbeit wurde auf einem „Apple PowerBook G4“ mit der Software Microsoft Word 2001 (Microsoft) angefertigt. Western-Blots wurden entweder durch die mit dem CCD-Kamera-System LAS 3000 mitgelieferte AIDA-Software oder durch Digitalisierung der entwickelten Filme mit einem ScanMaker i900 von Microtek bearbeitet. Belichtete Phosphoimager-Platten wurden mit der BAS-2500- Phospho-Imaging-Software (Fuji) ausgelesen. Die Weiterverarbeitung aller Graphiken erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems), die endgültige Darstellung durch die Programme Canvas 9.0 (Deneba Software) oder Power-Point (Microsoft). Für die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA Star) benutzt. Literatur- und Datenbankrecherchen wurden mit Hilfe des Internetservices des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt.

#### 5.1.2 Molekularbiologische Materialien

##### 5.1.2.1 Plasmide

Plasmide zur Expression in Säugetierzellen:

Für Expression in Säugetierzellkultur nach transienter Transfektion wurden pCS2-Vektoren benutzt, deren Multiple-Klonierungstelle durch Schnittstellen für die Restriktionsenzyme FseI, gefolgt von einer für AscI ersetzt worden ist. In 5'-Richtung der FseI-Stelle sind unter Berücksichtigung des offenen Leserahmens die Sequenzen für eine der folgende Epitop-Markierungen enthalten: HA<sub>3</sub> (pCS2-HA<sub>3</sub>-F/A), ZZ-TEV<sub>4</sub> (pCS2-ZZ-TEV<sub>4</sub>-F/A), Myc<sub>6</sub> (pCS2-Myc<sub>6</sub>-F/A), Myc<sub>6</sub>-TEV<sub>2</sub> (pCS2-Myc<sub>6</sub>-TEV<sub>2</sub>F/A). Für Epitop-Markierung am 3'-Ende war nach der AscI-Schnittstelle die Sequenz für ((His)<sub>6</sub>-Flag)<sub>2</sub> (pCS2-F/A((His)<sub>6</sub>-Flag)<sub>2</sub>) oder ZZ-Myc-His<sub>6</sub> (pCS2-ZZ-Myc-His<sub>6</sub>-C-F/A) enthalten.

Für die Expression von Myc<sub>6</sub>-Epitop-markierter Separase in Flp-In T-REx-293-Zellen wurde der Vektor pcDNA5-FRT-F/A-TO verwendet. Durch Flp-Rekombinase-vermittelte Rekombination wurde Separase in das Genom der Zellen eingebaut.

Plasmide zur Expression in *E. coli*-Bakterien:

Für Expression in *E. coli*-Bakterien wurde der Vektor pGEX4T1 benutzt, dessen multiple Klonierungstelle durch Schnittstellen für die Restriktionsenzyme FseI, gefolgt von einer für AscI ersetzt worden ist.

Plasmide zur *In-vitro*-Translation:

Für *In-vitro*-Translation wurde pCS2-F/A-Versionen oder pCMV6-XL6 („*In Vitro* Expression Cloning“, Abschnitt 5.4.9) verwendet.

### 5.1.2.2 *E. coli*-Stämme

XL1-Blue (Stratagene): Zur Vermehrung von Plasmid-DNA mit anschließender Reinigung derselben.

Rosetta 2 (Novagen): Zur Expression rekombinanter Proteine.

### 5.1.2.3 Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge)

**DNA-Ladepuffer (5x)** 0,25% Orange G, 25% Glycerin, 25 mM EDTA, pH 8,0; **LB-Agar**: LB-Medium mit 1,5% Agar; **LB-Medium**: 1% Trypton (Difco), 0,5% Hefeextrakt (Difco), 1% NaCl; **Taq-Polymerase-Puffer**: 500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,6, 15 mM MgCl<sub>2</sub>; **TBE-Puffer**: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

## 5.1.3 Kultivierung von Säugetier-Zellen

### 5.1.3.1 Zelltypen

**293T**: humane embryonale Nierenzellen, mit „large T antigen“ transformiertes Derivat der 293-Zelllinie; **HeLaS3**: Humane Zervix-Adenokarzinomzellen, Subklon S3; **Flp-In T-REx-293-Zellen (Invitrogen)**: Derivat der 293-Zelllinie mit stabil integriertem pFRT/lacZeo-Plasmid, das die FRT-Erkennungsstelle für die Transgen-Integration durch die Flp-Rekombinase zur Verfügung stellt. Zusätzlich enthalten die Zellen stabil integriertes pcDNA6/TR-Plasmid, das die konstitutive Expression des Tet-Repressors bewirkt.

### 5.1.3.2 Stabile Flp-In T-REx-293-Zelllinien

Flp-In T-REx-293-Zellen (Invitrogen) mit stabil integrierter Myc<sub>6</sub>-Epitop-markierter Separase wurden unter Verwendung des Vektors pcDNA5-FRT-F/A-TO, der Separase-wt, Separase-PM1126, Separase-AAA, Separase-AAD, Separase-EED oder Separase-PM1126-EED enthielt, nach Angaben des Herstellers generiert und freundlicherweise von C. Kuffer zur Verfügung gestellt.

### 5.1.3.3 Puffer und Medien (alphabetische Reihenfolge)

**FCS**: Fötale Kälberserum, (Biochrom, Lot: 0486G); **2xHBS**: 50 mM HEPES: 10 mM KCl, 2 mM Dextrose, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH: 7,0; ; **PBS**: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH: 7,4; **Penicillin/Streptomycin (100x)**: 10000 U/ml Penicillin G Natrium, 10000 µg/ml Streptomycin-Sulfat, in 0,85 % Saline (Gibco-BRL); **Trypsin/ EDTA, 1x**: 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA, in gepufferter Saline (Gibco-BRL); **Zellkulturmedium**: DMEM, mit 4,5 g/l Glucose (Gibco-BRL), 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycinsulfat;

## 5.1.4 Biochemische Materialien

### 5.1.4.1 Protein-Mutanten

Nomenklatur:

PMX: PhosphomutanteX: Die durch die Zahl X angegebene Aminosäure wurde durch Alanin ausgetauscht. Mehrfach-Mutationen sind durch einen Schrägstrich getrennt.

$\Delta$ X-Y: Deletion des Bereichs zwischen den durch die Zahlen X und Y angegebenen Aminosäuren, inklusive X und Y

Punktmutationen: Eine Punktmutation ist durch die Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code, gefolgt von der Position der Aminosäure und der Austausch-Aminosäure angegeben. Mehrfach-Mutationen sind durch einen Schrägstrich getrennt.

CMX („Cleavage“-MutanteX): Die Separase-Spaltstelle (ExxR) an der Position X ist zu AxxA (außer Cohesin-CM172: E169R/R172E) mutiert. Mehrfach-Mutationen sind durch einen Schrägstrich getrennt.

Separase:

Alle Separasemutanten sind zu jedem Experiment nach der oben genannten Nomenklatur in der jeweiligen Abbildungs-Legende angegeben. Einige Mutanten haben der Einfachheit wegen besondere Namen: Separase-A1380L/P1381A/R1386G: **Separase-LAG**; Separase-PM1346/1363/1399: **Separase-AAA**; Separase-PM1126/1346/1363/1399: **Separase-PM1126-AAA**; Separase-PM1346/1363/S1399D: **Separase-AAD**; Separase-T1346E/T1363E/S1399A: **Separase-EED**; Separase-PM1126/T1346E/T1363E/S1399D: **Separase-PM1126-EED**; Separase-PM1126/1346/1363/1389/1396/1399/1406: **Separase-PM1126/1346/PMCLD**

Verschiedene Proteine

**GST-PBD-mut**: GST-Plk1-PBD-H538A/K540A; **hCdk1-kinase-inaktiv**: hCdk1-K33R; **Cohesin-CM1**: hScc1-E169R/R172E; **GASP**: Alle GASP-Mutanten sind zu jedem Experiment nach der oben genannten Nomenklatur in der jeweiligen Abbildungslegende angegeben.

#### 5.1.4.2 Antikörper

Kommerziell erwerbliche Antikörper:

Maus-anti-hCdk1 (Santa Cruz-54), Maus-anti-hCyclin B1 (Upstate 05-373), Maus-anti-Flag-M2-Agarose (Sigma A2220), Maus-anti-HA-Agarose (Roche 1815016); Mensch-IgG-Sepharose (4 Fast Flow, Amersham 17-0969-01); Kaninchen-anti-XCdk1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Walter), Kaninchen-anti-Myc (Santa Cruz-789), HRP-Ziege-anti-Maus-IgG (Dianova); HRP-Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Dianova)

Nicht kommerziell erwerbliche Antikörper

Kaninchen-anti-hSecurin (Stemmann et al); Kaninchen-anti-hSeparase-N: (Stemmann et al., 2001); Kaninchen-anti-pSX38 (HIS<sub>6</sub>-hSeparase-1305-1573); Kaninchen-anti-Phosphoserin 1126 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Taylor); Ziege-anti-Plx1-linker (GST-XeLaPlx1-321-389); Kaninchen-anti-hPlk1-linker (GST-hPlk1-330-395); Kaninchen-anti-GST (GST-hPlk1-330-395); anti-XCdk1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Walter)

### 5.1.4.3 Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge)

**Cyclin B1/Cdk1-Puffer:** 30 mM HEPES/KOH, pH 7,7, 30% Glycerin, 80 mM KCl, 1 mM DTT; **CSF-XB:** 100 mM KCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES/KOH, pH 7,7, 50 mM Saccharose, 5 mM EGTA/KOH pH 8,0, pH 7,7 mit KOH; **Cysteinlösung:** 2 % (w/v) Cystein (freie Base), 1x XB-Salz; **DAPI/Fix:** 48% Glycerin, 11% Formaldehyd, 1x MMR (siehe oben), 1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma B-2261); **Lambda-PPase-Reaktionspuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 50 mM NaCl, 0,01 Triton-X100, 2 mM MnCl<sub>2</sub>; **MMR (25x):** 2,5 M NaCl, 50 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,5 mM EDTA/NaOH, pH 8,0, 125 mM HEPES/NaOH pH 7,8, pH 7,8 mit NaOH; **Plx1-Puffer:** 30 mM HEPES/KOH pH 7,7, 30% Glycerin, 80 mM KCl, 1 mM DTT; **TBS-w:** 25 mM Tris, pH 7,5, 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 0,1 % Tween-20 (w/v); **PBS:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4; **TEV-Spaltpuffer:** 10 mM HEPES/KOH pH 7,7, 50 mM NaCl, 25 mM NaF, 1 mM EGTA, 20% Glycerin; **SDS-PAGE: 7x Bis-Tris/HCl:** 2,5 M Bis-Tris, 1,5 M HCl, pH 6,5, **Gellösung (6 %):** 42,2 ml H<sub>2</sub>O, 13 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 9,3 ml 7x Bis-Tris/HCl, 163 µl 20% SDS (w/v), 54,2 µl TEMED, 325 µl 10% APS (w/v), **Gellösung (15%):** 16,5 ml H<sub>2</sub>O, 4,6 ml 2,5 M Saccharose, 30 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 8,6 ml 7x Bis-Tris/HCl, 150 µl 20% SDS, 25 µl TEMED, 300 µl 10% APS; **MOPS-Laufpuffer:** 50 mM MOPS, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 50 mM Tris-Base; **Protein-Ladepuffer (4x):** 62 mM HCl, 2 mM EDTA, 1,2 M β-Mercaptoethanol, 50% Glycerin, 564 mM Tris-Base; 554 mM SDS; 1 winziges bisschen Coomassie G250; **Separase-Spaltpuffer:** 30 mM HEPES/KOH, pH 7,7, 30% Glycerin, 25 mM NaF, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM ATP, 1 mM EGTA; **Spermien-Verdünnungspuffer:** 5 mM HEPES/KOH, pH 7,7, 100 mM KCl, 150 mM Saccharose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>; **Western-Blotpuffer:** 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01% SDS; **XB:** 100 mM KCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES/KOH, pH 7,7, 50 mM Saccharose, pH 7,7 mit KOH; **XB-Salz (20x):** 2 M KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>; **Zellysepuffer:** 20 mM Tris/HCl pH 7,7, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 20 mM β-Glycerophosphat, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X100, 5% Glycerin, 1 mM EGTA, Complete Protease Inhibitor Mix (Roche)

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Klonierung

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren, die sich zur Vermehrung in *E. coli*-Bakterien eignen, wurde durch Restriktions-Verdauung der DNA und anschließende Ligation der kohäsiven Enden durchgeführt.

#### 5.2.1.1 DNA-Fragmentierung durch Restriktionsenzyme

0,5-3 µg der zu verdauenden DNA noch 3-10 U eines Restriktionsenzym und 1/10 Volumen des entsprechenden vom Hersteller angegebenen Enzympuffers zum Ansatz zugeben. Der Verdauungsansatz wurde bei den vom Hersteller angegebenen enzymespezifischen Temperatur durchgeführt.

#### **5.2.1.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um bei Klonierungen eine Religation des geschnittenen Vektors zu vermeiden, wurden die 5'-Enden des Plasmids dephosphoryliert. Dazu wurde zum der Ansatz Restriktionsverdauung des Vektors 1 U Phosphatase (Roche, „Shrimp Alkaline Phosphatase“, SAP) zugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Der für die Reaktion notwendige alkalische pH-Wert wurde durch Zugabe von 0,1  $\mu$ l Tris Base zu einem 30  $\mu$ l Ansatz gewährleistet.

#### **5.2.1.3 Agarosegelelektrophorese**

Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 und 2,0 % in 1xTBE benutzt. Die mit DNA-Ladepuffer versetzte DNA wurde in einem elektrischen Feld mit der Spannung 10 V/cm aufgetrennt. Die DNA wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid in der Konzentration 1  $\mu$ g/ml zur Agarose-Lösung gefärbt. Durch Beleuchten des Gels mit UV-Licht wurde die DNA sichtbar.

#### **5.2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Das “QiaExII Gel Extraction Kit” (QIAGEN) diente zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Beleuchtung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers daraus isoliert.

#### **5.2.1.5 Ligation**

Aus Agarosegelen isolierte lineare DNA-Fragmente wurden durch Ligation mit T4-DNA-Ligase (NEB) verknüpft. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l mit 1/10 Volumen T4-DNA-Ligase-Puffer, 400 U Ligase und einem molaren Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3-1:6 durchgeführt. Der Vektor war an seinen 5'-Enden durch Behandlung mit alkalischer PPase dephosphoryliert. Seine eingesetzte Menge betrug zwischen 25 ng und 150 ng. Die Reaktion wurde für mindestens 3 h bei 16°C inkubiert.

#### **5.2.1.6 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterienzellen**

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden chemisch-kompetente XL1-blue-, zur Expression rekombinanter Proteine Rosetta 2-Bakterien transformiert. 3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden in 500 ml LB-Medium verdünnt. Bei einer optischen Dichte (OD 600) von 0,3 wurden sie eine Stunde lang auf Eis gekühlt. Alle folgenden Schritte erfolgten unter Verwendung vorgekühlter, steriler Gefäße und Lösungen. Nach Zentrifugation bei 4 °C wurde das Zellsediment in 20 ml einer 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen, wieder 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und in 40 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Die Bakterien wurden 20 min auf Eis inkubiert und anschließend nach erneuter Zentrifugation in 4 ml einer Lösung aus 0,1 M CaCl<sub>2</sub> und 15% Glycerin resuspendiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **5.2.1.7 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien**

5  $\mu$ l eines Ligationsansatzes oder wenige Nanogramm eines reinen Plasmids wurden zu 50  $\mu$ l kompetenter Bakterien gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die

Bakterien einem 45 s langen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach weiteren 2 min Inkubation auf Eis wurden dem Transformations-Ansatz 500 µl SOC-Medium beigemengt. Die Bakterien wurden anschließend für 30 min bei 37°C zur Expression der Ampicillinresistenz inkubiert. Danach wurden 1/10 bzw. 9/10 des Transformations-Ansatzes auf LB-Platten mit einer Ampicillin-Konzentration von 100 µg/ml ausplattiert.

#### **5.2.1.8 Plasmid-Isolationen**

##### **5.2.1.8.1 Plasmidpräparation im Mikrogramm-Bereich ("Minipräparation")**

1 ml einer über Nacht in flüssigem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gewachsenen Bakteriensuspension wurde mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Bei dieser Methode wird Plasmid-DNA aus lysierten Bakterien durch Bindung und Waschen an einer Silica-Membran mit anschließender Elution gereinigt. In dieser Weise präparierte DNA wurde für analytische Restriktionsanalyse, Sequenzierung oder zur Transformation in Rosetta 2-Bakterien für die Expression rekombinanter Proteine benutzt.

##### **5.2.1.8.2 Plasmidisolierung im Milligramm-Bereich (QIAGEN Plasmid Maxi Kit)**

Die Isolation von Plasmiden für Transfektionen in eukaryotische Zellen wurde mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit aus 250 ml XL1-blue-Bakterien-Kultur nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei dieser Methode wird Plasmid-DNA durch Bindung und Waschen an einer Anionen-Austausch-Matrix mit einem zusätzlichen Reinigungsschritt durch Fällung der DNA mit Isopropanol gereinigt.

#### **5.2.1.9 Punktmutagenese mit der Gene-Editor-Methode**

Es wurde das "GeneEditor *In Vitro* Site-Directed Mutagenesis"-Systems der Firma Promega benutzt. Die Mutagenese wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt mit der Ausnahme, dass Pfu-Polymerase, statt Pwo-Polymerase benutzt wurde. Das Prinzip dieser Methode ist das folgende: Das zu mutagenisierende Plasmid wird durch die Pfu-Polymerase ein einziges Mal abgeschrieben. Als Primer dienen zum einen das Mutagenese-Oligonukleotid, das die Mutation trägt und zum anderen das so genannte Selektions-Oligonukleotid, das eine Mutation in das Ampicillin-Resistenzgen ( $\beta$ -Lactamase) des Plasmids einführt. Die Mutation durch das Selektion-Oligonukleotid führt dazu, dass die  $\beta$ -Lactamase nun Resistenz gegen das mitgelieferte Gene-Editor-Antibiotikum vermittelt. Nach Transformation in Bakterien erhält man durch Selektion auf Gene-Editor-Resistenz nur die Bakterien, die mutiertes Plasmid erhalten haben. Die Mutagenese durch Sequenzierung überprüft. Mit dieser Methode können auch mehrere Mutationen auf einmal in ein Gen eingeführt werden.

#### **5.2.1.10 Deletion beliebiger DNA-Bereiche**

Dazu wurden die Bereiche zu beiden Seiten der zu deletierenden Region getrennt durch eine PCR mit Pfu-Polymerase amplifiziert. Mindestens eines der Oligonukleotide, die an den zu entfernenden Bereich angrenzen, besaß eine 3'-Verlängerung, die zu der Region auf der anderen Seite der Deletion komplementär war. Nach Reinigung der beiden PCR

über ein Agarose-Gel folgte eine zweite PCR mit den äußeren 5'- bzw. 3'-Oligonukleotiden und den beiden ersten PCR als Ausgangs-Material. Durch Restriktions-Verdauung wurde der gewünschte Teil aus dem amplifizierten Fragment ausgeschnitten und in das Wildtyp-Gen kloniert.

#### **5.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Diese Methode wurde entweder analytisch zum Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz in einer DNA-Lösung oder präparativ zur Vervielfältigung einer DNA zur anschließenden Klonierung dieser DNA in ein Plasmid verwendet. Analytische PCRs wurden mit Taq-Polymerase, präparative mit der Pfu-Polymerase (Stratagene) durchgeführt. Typische präparative Ansätze wurden in 50  $\mu$ l Gesamtvolumen mit 1  $\mu$ M Primer, 40  $\mu$ M jedes dNTPs, 1  $\mu$ g Ausgangs-DNA und 2,5 U Pfu-Polymerase im vom Hersteller mitgelieferten Puffer durchgeführt. Es wurden 15 Amplifikations-Zyklen. Analytische PCRs mit Taq-Polymerase erfolgten ebenso mit den Ausnahmen, dass Taq-Puffer, 10 – 100 ng DNA, 2  $\mu$ M Primer und eine Zyklenzahl von 30 benutzt wurden.

#### **5.2.1.12 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierungs-PCR und die anschließende Probenaufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem "DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit" der Firma Amersham-Pharmacia. Der Ansatz enthielt 2  $\mu$ g der zu sequenzierenden DNA (Plasmid-DNA) und 20 pmol Sequenzier-Primer. Die fertigen Proben wurden mit einem AbiPrism 377 DNA-Sequenzierer der Firma Perkin Elmer sequenziert.

### **5.3 Zellkultur**

#### **5.3.1 Allgemeine Arbeiten mit Säugetier-Zellen**

##### **5.3.1.1 Kultivierung von 293T- und HeLaS3-Zellen**

Beide Zelltypen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 92 % relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturmedium. Zur Standard-Kultivierung wurden die Zellen zwei bis dreimal pro Woche passagiert und dabei je nach Zelldichte um den Faktor 6-10 verdünnt. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) von der Zellkultur-Schale abgelöst. Nach höchstens 5 min wurde dieser Vorgang durch die Zugabe von Zellkulturmedium beendet und die gewünschte Zellzahl auf eine neue Zellkultur-Platte ausgebracht.

##### **5.3.1.2 Einfrieren und Auftauen von 293T- und HeLaS3-Zellen**

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in FCS mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben durch Trypsinbehandlung von der Kulturplatte abgelöst, vereinzelt und anschließend bei 150 x g für 6 min abzentrifugiert. Mehr als 10<sup>6</sup> Zellen wurden in 1 ml FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und eingefroren. Dies geschah zunächst für einen Tag bei -80°C in einem

mit Isopropanol gefüllten und bei 4 °C vorgekühlten Einfrierbehälter (Nalgene). Danach wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurde 1 ml dieser Zellen in einem Einfrierröhrchen kurz in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und anschließend mit ebenfalls 37 °C warmen Kulturmedium aus dem Röhrchen ausgespült. 20 ml Kulturmedium wurden zugegeben, die Zellen abzentrifugiert, anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer Kulturschale weiterkultiviert.

### **5.3.1.3 Kalziumphosphat-Transfektion von 293T-Zellen mit Separase, Securin, Plk1, Cyclin B1 und Cdk1**

24 h vor der Transfektion wurden  $1 \times 10^7$  Zellen auf einer 15 cm-Zellkultur-Schale ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt des Transfektionsbeginns zu 60-80% konfluent wuchsen. Direkt vor der Transfektion wurde zum Zellkulturmedium Chloroquin (Sigma) in einer Endkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  gegeben. Ein Transfektionsansatz wurde vorbereitet. Dieser bestand aus 125 mM  $\text{CaCl}_2$  und 40  $\mu\text{g}$  des zu transfizierenden Plasmids in 1 x HEB-Puffer. Der HEB-Puffer wurde als letzte Komponente in Form von 2 x HEB schnell zum Ansatz zugegeben. Nach 5 – 10 minütiger Inkubation bei RT wurden 4 ml dieses Transfektionsansatzes tropfenweise gleichmäßig über die Kulturplatte verteilt. Die Zellen wurden anschließend für 8 – 16 h bei normalen Kulturbedingungen inkubiert. Die Transfektion wurde durch Austauschen des Transfektionsmediums durch frisches Kulturmedium beendet.

Zur Transfektion von Zellen mit Separase und Securin wurden 30  $\mu\text{g}$  Separase- und 10  $\mu\text{g}$  Securin-Plasmid verwendet. Für Transfektion mit Separase, Securin und Plk1 wurden die gleiche Menge Separase-, aber jeweils 5  $\mu\text{g}$  Securin- und Plk1-Plasmid benutzt. Wurde Separase zusammen mit Cyclin B1/Cdk1 transfiziert, wurde Securin und Plk1 durch hCyclin B1 und hCdk1 ersetzt.

## **5.3.2 Arbeiten mit HeLaS3- und Flp-In T-REx-293-Zellen**

### **5.3.2.1 Zellzyklus-Synchronisation von HeLaS3-Zellen**

Zu HeLaS3-Zellen wurde Thymidin in  $\text{H}_2\text{O}$  in einer Endkonzentration von 4 mM zum Medium gegeben. Die Zellen wurden sodann für 20 h unter Standardbedingungen kultiviert und dann durch Waschen mit PBS und Zugabe von Zellkulturmedium aus dem Thymidin-Arrest entlassen. Um Zellen am Beginn der nächsten S-Phase anzuhalten, wurde 8 h später erneut die gleiche Menge Thymidin zu den Zellen gegeben, die dann wieder 20 h lang inkubiert wurden. Für Zell-Arrest in der Prometaphase wurden die Zellen 4 h nach Entlassen aus dem ersten Thymidin-Block in 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Nocadazol in DMSO für 12 h inkubiert. Zum Entlassen der Zellen aus Thymidin- bzw. Nocodazol-Arrest wurden die Zellen wie oben mit PBS gewaschen und in Medium für eine variable Zeitspanne weiter wachsen lassen

### **5.3.2.2 Kultivierung und Separase-Expressionsinduktion von Flp-In T-REx-293-Zellen**

Flp-In T-REx-293-Zellen mit transgener Myc<sub>6</sub>-Separase wurden wie in Abschnitt 5.3.1.1 beschrieben kultiviert mit der Ausnahme, dass 15 µg/ml Blasticidin und 150 µg/ml Hygromycin im Zellkulturmedium vorhanden waren. Zur Expressionsinduktion der transgenen Separase wurde 2 µg/ml Doxycyclin in Ethanol oder die gleiche Menge Ethanol für Kontroll-Induktionen zum Zellkulturmedium gegeben. 24 h nach Induktion wurden die Zellen mithilfe von Trypsin geerntet und für Western-Blot-Analyse (5.4.1.2) und Zellzyklus-Analyse verwendet (5.3.2.3).

### **5.3.2.3 Bestimmung der Zellzyklusphase durch Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting)**

Das Chromatin synchronisierter HeLaS3-Zellen wurde mit Propidiumjodid gefärbt und dessen Menge pro Zelle im FACS-Gerät bestimmt. Für die Färbung mit Propidiumjodid wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen zunächst in 70 % -20 °C kaltem Ethanol aufgenommen und über Nacht bei 4 °C fixiert. Die Zellen wurden sodann zweimal in PBS mit 0,1 % (w/v) BSA gewaschen und anschließend in 69 µM Propidiumjodid in 38 mM tri-Natriumcitrat und 0,1 mg/ml RNaseA 30 min lang bei 37 °C inkubiert und dann zur FACS-Analyse verwendet. Das FACS-Profil wurde im FL-3H-Kanal des FACS-Gerätes "FACSCalibur" der Firma Beckton Dickinson erstellt. Zellaggregate wurden durch Ausschluss von Zellen mit erhöhter Signalstärke im FL-3W-Kanal aus der Messung eliminiert.

## **5.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **5.4.1 Grundlegende Methoden**

#### **5.4.1.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für SDS-PAGE wurde das "NuPAGE"-System gewählt. Die Gele waren entweder selbst gegossen oder von der Firma Invitrogen gekauft und wurden nach den Angaben des Herstellers benutzt. Es handelte sich um Gele mit einem kontinuierlichen Gradienten von 4-12 % (kommerziell) oder 6-15 % (selbst gegossen) Polyacrylamid und den ungefähren Ausmaßen von 9 x 9 x 0,1 cm.

Zu untersuchende Protein-Lösungen wurden in Protein-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend in einem SDS-Gel bei konstanten 45 mA Stromstärke aufgetrennt.

#### **5.4.1.2 Nachweis von Proteinen durch Western-Blot**

Es wurde eine Apparatur für halbtrockenen Transfer benutzt (Biorad), um die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Millipore) nach Angaben des Herstellers zu transferieren. Es wurde eine konstante Spannung von 15 V angelegt, der 45

min lang dauerte. Die PVDF-Membran wurde dann zur Detektion transferierter Proteine durch spezifische Antikörper benutzt. Dazu wurde die Membran für mindestens 15 – 20 min in 1 % BSA in TBSw geblockt. Darauf folgte eine Inkubation für mindestens 2 h im entsprechenden Antikörper in der für ihn typischen Verdünnung in 1 % BSA in TBSw mit 0,05 % Azid. Nach dreimaligem Waschen für 10 min wurde die 1h dauernde Inkubation mit dem gegen den Primär-Antikörper gerichteten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundäntikörper in einer 1/7500-Verdünnung in TBSw durchgeführt. Nach drei Waschschritten für 10 min in TBSw wurde der Zweitantikörper durch Chemilumineszenz detektiert. Dazu wurde eine 1:40-Mischung aus Lösung A und Lösung B “ECL-Plus”-Detektions-Systems (Amersham Bioscience) gleichmäßig auf der Membran verteilt und nach kurzer Inkubation durch Auflegen und Entwickeln eines Films (Hyperfilm ECL/Amersham Bioscience) oder durch das CCD-Kamerasystem LAS 3000 (Fuji) dokumentiert. Für quantitative Analyse wurden ausschließlich mit der CCD-Kamera aufgenommene Western-Blots gearbeitet und mit der mitgelieferte AIDA-Software ausgewertet.

### **5.4.1.3 Coomassie-Blau-Färbung**

Eine weitere Methode zur quantitativen Färbung der Proteinbanden im SDS-Gel ist die Coomassie-Blau-Färbung. Dazu wurde ein fertiges SDS-Gel in einer Coomassie-Blau-Lösung (0,4% Coomassie Brilliant Blue R250, 0,4% Coomassie Brilliant Blue G250, 40% MeOH und 10% HAc) für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel in die Entfärbelösung (30% MeOH, 7% HAc) transferiert und darin bis zum gewünschten Grad der Entfärbung inkubiert.

Die Coomassie-gefärbten Gele wurden zur Langzeitaufbewahrung unter Vakuum auf Whatman-Papier getrocknet. Semiquantitative Bestimmung der Bandenstärke wurde vor der Gel-Trocknung mit dem CCD-Kamerasystem LAS 3000 (Fuji) und der mitgelieferte AIDA-Software durchgeführt.

### **5.4.1.4 Detektion von radioaktiv markierten Proteinen durch Autoradiographie**

Nach einer SDS-PAGE wurden die Proteine im Gel in Coomassie-Entfärbeflüssigkeit für 20 min fixiert. Danach wurde es auf ein Whatman-Papier unter Vakuum bei 80 °C getrocknet. Die Detektion erfolgte entweder durch Auflegen eines Biomax-MR-Films der Firma Kodak oder durch Auswertung einer belichteten Phospho-Imager-Platte am BAS-2500-Phospho-Imaging-System (Fuji). Letzteres wurde zur semiquantitativen Erfassung radioaktiv markierter Proteine verwendet.

### **5.4.1.5 *In-vitro*-Translation zur Herstellung <sup>35</sup>S-markierter Proteine**

Für die Herstellung <sup>35</sup>S-markierter Proteine wurde eine *In-vitro*-Translation in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin (Amersham Bioscience) durchgeführt. Dazu wurde das “SP6-Quick-Kit” der Firma Promega nach den Angaben des Herstellers benutzt.

#### **5.4.2 Reinigung spezifischer Antikörper aus Kaninchen- oder Ziegen-Blutserum**

Für die Herstellung spezifischer Antikörper wurde ein Kaninchen oder eine Ziege dreimal mit ca. 1 mg des Antigens in "Titer Max Gold"-Adjuvanz (Sigma) nach Angaben des Adjuvanz-Herstellers immunisiert. Danach wurden gegen das Antigen gerichtete IgG aus dem gewonnenen Serum affinitätsgereinigt. Dazu wurde das Antigen an eine "HI-TRAP-NHS"-Säule (Amersham Bioscience) nach den Angaben des Herstellers gekoppelt und mit dem Serum beladen. Nach Waschen in 20 Säulen-Volumen PBS und 5 mM Tris-HCl pH 6,6 wurden die Antikörper durch 100 mM Glycin-HCl pH 2,5 mit 100 mM NaCl von der Säule eluiert. Die Antikörper-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und nach Dialyse in PBS mit 10 % Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Antikörper-Lösungen wurden danach bei -80 °C gelagert.

#### **5.4.3 Arbeiten mit GST-Epitop-markierten Proteinen**

##### **5.4.3.1 Reinigung von GST-Epitop-markierten Proteinen aus *E. coli*-Bakterien.**

GST-Separase, GST-Cdc6 und GST-PBD wurde im Vektor pGEX4T1 in den *E. coli*-Stamm Rosetta2 transformiert. Die Expression wurde bei einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,5-1,0$  mit 1 mM IPTG induziert und danach 3 h bei 37 °C wachsen lassen. Nach Ernten der Zellen durch Zentrifugation wurden 1-5 g der Zellen in mindestens 30 - 50 ml PBS mit 400 mM NaCl durch Anlegen von Scherkräften im Zelllysator EmulsiFlex-C5 Homogenisator (Avestin) aufgeschlossen. Je nach exprimierter Proteinmenge, die durch SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Blau-Färbung abgeschätzt wurde, wurde eine geeignete Menge Glutathion-Sepharose (Amersham/Pharmacia) zugegeben und für mindestens 3 h darin inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem 10-fachen des Sepharose-Volumens PBS mit 400 mM NaCl wurden die immobilisierten Proteine in PBS mit 50 % Glycerin umgepuffert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

##### **5.4.3.2 Cyclin B1/Cdk1-Bindungsstudien mit GST-Separase und GST-Cdc6**

15-30  $\mu$ g GST-Epitop-markierte Proteine wurden wie in Abschnitt 5.4.3.1 beschrieben aus *E. coli*-Zellen gereinigt und dann für 1 h bei 18 °C im 10-fachen Sepharose-Volumen (50-100  $\mu$ l) Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt (550 nM hCyclin B1- $\Delta$ 90) inkubiert und danach viermal mit XB mit 0,1 % (v/v) TritonX100 gewaschen. Die so hergestellten Komplexe wurden sodann für Western-Blot-Analyse sofort mit 50 mM Glutathion in XB mit 1 mM DTT eluiert oder für Lambda-PPase-Behandlung mit anschließender Western-Blot-Analyse (Abschnitt 5.4.1.2) verwendet.

##### **5.4.3.3 Reinigung Lambda-PPase-behandelter GST-Separase-1063-1440/1506-Cyclin B1/Cdk1 und GST-Cdc6-Cyclin B1/Cdk1**

Die Reinigung von GST-Separase-1063-1440/1506- Cyclin B1/Cdk1 und GST-Cdc6-Cyclin B1/Cdk1 in Abschnitt 5.4.3.2 dargestellt. Immobilisierte und mit XB mit 0,01 % (v/v) TritonX100 gewaschene Versionen dieser Komplexe wurden in 20  $\mu$ l Lambda-PPase-Reaktionspuffer umgepuffert. Danach wurden 1200 U Lambda-PPase zugefügt und bei 18 °C für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in XB mit 0,01 % (v/v)

TritonX100 wurden die GST-Separase- und GST-Cdc6-Fragmente durch 50 mM Glutathion in XB mit 1 mM DTT eluiert.

#### **5.4.3.4 Plx1-Phosphorylierungs-Studien mit GST-Separasefragmenten**

Ca. 1,5  $\mu\text{g}$  GST-Separasefragmente in 2,5  $\mu\text{l}$  XB wurden mit 0,5  $\mu\text{l}$  Plx1-wt, deren Kinase-Aktivität zuvor durch Vergleich mit kinase-inaktiver Plx1-mut mit dem Modell-Substrat Dephosphocasein überprüft worden war, versetzt. Plx-wt wurde zusammen mit 10  $\mu\text{M}$  ATP, 1  $\mu\text{M}$  Microcystin-LR, 20 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,2  $\mu\text{l}$   $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) in XB in einem Volumen von 2,5  $\mu\text{l}$  zugegeben. Die Reaktion wurde 30 min lang bei RT inkubiert und dann mit Protein-Ladepuffer gestoppt. Ca. 50 % des Ansatzes wurden sodann durch eine SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung mit anschließender Autoradiographie desselben Gels analysiert. Beides wurde semiquantitativ ausgewertet und graphisch dargestellt. Dafür wurde die Signalstärke für Plx1-Phosphorylierung jeder Probe auf ihre Signalstärke in der Coomassie-Färbung normiert.

#### **5.4.4 Aufreinigung verschiedener Separase-Komplexe**

##### **5.4.4.1 Reinigung des Separase/Securin-Komplexes aus transfizierten 293T-Zellen**

293T-Zellen wurden wie in Abschnitt 5.3.1.3 beschrieben mit ZZ-TEV<sub>4</sub>- oder Myc<sub>6</sub>-TEV<sub>2</sub>-Separase und Securin transfiziert. 24 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von Nocodazol in der Endkonzentration von 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 12-16 h langer Inkubation in der Mitose arretiert. Danach wurden sie durch Abkratzen von der Zellkultur-Schale gelöst und durch Zentrifugation bei 150 x g geerntet. Die Zellen wurden daraufhin entweder nach Schock-Gefrierung bei -80 °C gelagert oder gleich verwendet. Die Lyse erfolgte durch Resuspendierung in Zellysepuffer mit 1  $\mu\text{M}$  Microcystin-LR und anschließendem Anlegen von Scherkräften in einem Dounce-Homogenisator. Zellschrott wurde daraufhin durch eine Untrazentrifugation entfernt. Danach wurden 30  $\mu\text{l}$  IgG-Sepharose pro 15 cm Zellkulturschale für ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase oder anti-Myc-Agarose für Myc<sub>6</sub>-TEV<sub>2</sub>-Separase zum Lysat gegeben und über Nacht bei 4 °C unter Drehen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Zellysepuffer wurde der immobilisierte Separase/Securin-Komplex daraufhin in XB umgepuffert und für Separase-Aktivitäts- und Inhibitions-Tests nach Rückisolation aus  $\Delta 90$ -Extrakt (Abschnitt 5.4.5.1), für Separase-Inhibitionstests in  $\Delta 90$ -Extrakt (Abschnitt 5.4.5.2) oder für die Reinigung Securin-freier Separase (Abschnitt 5.4.4.2) verwendet.

##### **5.4.4.2 Reinigung Securin-freier Separase aus transfizierten 293T-Zellen**

2,5-5  $\mu\text{g}$  ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase/Securin wurde wie in Abschnitt 5.4.4.1 beschrieben gereinigt und anschließend wie in unter 5.4.5.1 erklärt in Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt inkubiert. Dann wurde die Sepharose dreimal mit XB mit 0,01 % (v/v) TritonX100 und 500 mM NaCl gewaschen, durch zweimaliges Waschen in XB mit 0,01 % TritonX100 vom überschüssigen Salz befreit und daraufhin in 20  $\mu\text{l}$  0,1 % (w/v) BSA in XB umgepuffert. Durch Zugabe von ca. 25U GST- oder His-TEV-Protease und 30 min Inkubation bei 18 °C mit anschließender Elution in 50  $\mu\text{l}$  0,1 % (w/v) BSA in XB wurde die Separase mobilisiert. Es folgte eine Immundepletion des verbleibenden Separase/Securins mit 5  $\mu\text{g}$

an ProteinG-Sepharose (Amersham Bioscience) gekoppeltem anti-Securin-Antikörper. Die Depletion wurde für 1 h bei 18 °C unter Drehen durchgeführt. Securin-freie Separase wurde für Bindungsstudien an GST-PBD (Abschnitt 5.4.6.2) benutzt.

#### **5.4.4.3 Reinigung des Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes aus transfizierten 293T-Zellen**

5-10  $\mu\text{g}$  ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase/Securin wurde wie in Abschnitt 5.4.4.1 beschrieben gereinigt und anschließend wie in unter 5.4.5.1 erklärt in Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt inkubiert. Dann wurde die Sepharose dreimal mit XB mit 0,01 % (v/v) TritonX100 gewaschen.

#### **5.4.4.4 Reinigung des Separase/Securin/Plk1-Komplexes aus transfizierten 293T-Zellen**

Eine 15 cm-Schale 293T-Zellen wurden entweder mit ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase, Myc<sub>6</sub>-Plk1 und Securin oder mit HA<sub>3</sub>-Separase, Myc<sub>6</sub>-Plk1 und Securin-((HIS)<sub>6</sub>-Flag)<sub>2</sub> wie in 5.3.1.3 beschrieben transfiziert und mit Nocodazol in der Mitose angehalten. Die geernteten Zellen wurden dann in Zelllysepuffer durch Anlegen von Scherkräften im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und mit ca. 15  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Affinitäts-Matrix versetzt. Für die IP ZZ-TEV<sub>4</sub>-Epitop-markierter Separase wurde IgG-Sepharose, für IP von Securin-((HIS)<sub>6</sub>-Flag)<sub>2</sub> anti-Flag-Sepharose benutzt. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C unter Drehen über Nacht, bevor die Sepharose dreimal mit Zelllysepuffer gewaschen und gebundene Proteine durch Zugabe von Protein-Ladepuffer von der Affinitäts-Matrix abgelöst wurden. Danach wurde zur Detektion assoziierter Proteine ein Western-Blot mit den Antikörpern anti-Separase-N, anti-Plk1-linker und anti-Securin durchgeführt.

### **5.4.5 Separase-Aktivitäts- und Inhibitions-Tests**

#### **5.4.5.1 Separase-Aktivitäts- und Inhibitions-Tests nach Rückisolation aus $\Delta$ 90-Extrakt**

5-10  $\mu\text{g}$  an 10  $\mu\text{l}$  Sepharose immobilisierte ZZ-TEV<sub>4</sub>- oder Myc<sub>6</sub>-TEV<sub>2</sub>-Separase im Komplex mit Securin wurde in 10-20-fachem Sepharose-Volumen Niedrig- oder Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt mit 55 nM bzw. 550 nM hCyclin B1- $\Delta$ 90 für 1 h bei 18°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in XB mit 0,01% TritonX100 wurde die Sepharose in TEV-Spaltpuffer umgepuffert und mit ca. 25U GST- oder His-TEV-Protease versetzt. Nach weiteren 30 min Inkubation bei 18°C wurde die Separase mit dem einfachen Sepharose-Volumen Separase-Spaltpuffer eluiert. Für Reaktivierung nach Rückisolation aus Hoch- $\Delta$ 90-Extrakt wurde die Sepharose vor TEV-Elution dreimal 5 min lang in XB-Puffer mit erhöhter NaCl-Konzentration (250 mM-1000 mM) inkubiert und dann durch dreifaches Waschen in XB-Puffer mit 0,01% TritonX100 wieder vom überschüssigen Salz befreit. Eluierte Separase konnte schockgefroren und bei -80°C gelagert oder sofort für eine Cohesin-Spalt-Reaktion benutzt werden. Zur Cohesin-Spaltung wurde 1  $\mu\text{l}$  Separase (ca. 10-50 ng/ $\mu\text{l}$ ) mit 1  $\mu\text{l}$  <sup>35</sup>S-markiertem Scc1 vereinigt und für 30 min bei RT inkubiert. Die

Reaktion wurde durch Zugabe von Protein-Ladepuffer gestoppt und anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht.

#### **5.4.5.2 Separase-Inhibitionstest in $\Delta 90$ -Extrakt**

5-10  $\mu\text{g}$  ZZ-TEV<sub>4</sub>- oder Myc<sub>6</sub>-TEV<sub>2</sub>-Separase wurde im Komplex mit Securin aus transfizierten 293T-Zellen wie in Abschnitt 5.4.4.1 beschrieben gereinigt. Die immobilisierte Separase wurde einmal mit Lysepuffer, dann dreimal mit XB mit 0,01% Triton-X100 gewaschen. Daraufhin wurde Separase/Securin wie unter 5.4.5.1 beschrieben mit TEV-Protease eluiert. Als Elutionspuffer wurde XB, statt Separase-Spaltpuffer verwendet.

Eluierte Separase/Securin konnte Schock-gefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder sofort für Separase-Inhibitionstest in  $\Delta 90$ -Extrakt benutzt werden. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  Niedrig- oder Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt mit 55 nM bzw. 550 nM hCyclin B1- $\Delta 90$ , 1  $\mu\text{l}$  Volumen Separase/Securin und 1  $\mu\text{l}$  <sup>35</sup>S-markiertem Scc1 versetzt und für 45 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein-Ladepuffer gestoppt. 1/20 der Reaktion wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Für semiquantitative Vergleiche der Inhibition verschiedener Separasemutanten wurde deren Aktivität in Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt durch Zugabe von Elutionspuffer angeglichen. Alle Separase-Spaltreaktionen wurden daraufhin wie oben beschrieben in Triplikaten durchgeführt. Durch autoradiographische Auswertung mit dem "BAS-2500-Phospho-Imaging"-System (Fuji) wurde die Signalstärke für die durch Separase-Schnitt entstandenen Scc1-Fragmente ermittelt. Für die semiquantitative Darstellung wurden die Mittelwerte der Signalstärken des aminoterminalen Cohesin-Schnittfragments gebildet und auf die Aktivität in Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt normiert. Der Aktivität in Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt wurde der Wert 1 zugeordnet.

#### **5.4.5.3 Separase-Inhibition durch rekombinantes Cyclin B1/Cdk1**

Separase wurde wie unter 5.4.5.1 beschrieben aus Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt rückisoliert und eluiert. Die Separase-Aktivität aller zu testender Mutanten wurde durch einen Separase-Aktivitäts-Test ermittelt und durch Zugabe von Elutionspuffer angeglichen. Alle Separasen zeigten anschließend die gleiche spezifische Aktivität. 0,5  $\mu\text{l}$  dieser Separasen (5-25 ng/ $\mu\text{l}$ ) wurden mit 0,5  $\mu\text{l}$  BSA in Spermien-Verdünnungs-Puffer in der Konzentration 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  vereinigt, dann jeweils mit 1  $\mu\text{l}$  kinase-inaktiver Cyclin B1/Cdk1-Kinase der ungefähren Konzentrationen 5 ng/ $\mu\text{l}$  bzw. 25 ng/ $\mu\text{l}$  versetzt und 15 min bei RT vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  radioaktivem Scc1 gestartet und nach 30 min bei RT durch Zugabe von Protein-Ladepuffer gestoppt. Alle Reaktionen wurden in Triplikaten angesetzt. Die semiquantitative Auswertung im Wesentlichen wie in Abschnitt 5.4.5.2 beschrieben: Die Aktivitäten der Separase in Anwesenheit von Cyclin B1/Cdk1 wurden auf die Aktivität in Cyclin B1/Cdk1-Puffer normiert. Der Aktivität in Puffer wurde der Wert 1 zugeordnet.

#### **5.4.5.4 Separase-Aktivitätstests in Anwesenheit von Plx1**

1  $\mu\text{l}$  aktive Separase-wt oder -PM1126/1346 wurden mit 0,5  $\mu\text{l}$  Plx1-wt und 1  $\mu\text{l}$  5 mM ATP und 5 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt. Plx1 wurde entweder unverdünnt oder in einer

Verdünnung von 1/10, 1/5 oder 1/2,5 in Plx1-Puffer benutzt. Nach 15 min Vorinkubation bei RT wurde 1  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -markiertes Cohesin-wt oder –CM172 zugefügt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein-Ladepuffer gestoppt und durch Autoradiographie analysiert.

#### **5.4.6 *In-vitro*-Separase-Bindungsstudien**

##### **5.4.6.1 Far-Western-Analyse mit GST-PBD**

5-10  $\mu\text{g}$  ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase/Securin wurde wie beschrieben aus mitotischen Zellen isoliert (Abschnitt 5.4.4.1) und anschließend nicht behandelt, mit Lambda-PPase (Abschnitt 5.4.3.3) oder 25 ng Cyclin B1/Cdk1 und 10  $\mu\text{M}$  ATP inkubiert. Danach wurden ca. 0,5  $\mu\text{g}$  Separase auf eine PVDF-Membran transferiert (Abschnitt 5.4.1.2). Die Membran wurde darauf in TBSw mit 1 % (w/v) BSA für mehrere Stunden geblockt und anschließend mit GST-PBD in einer Konzentration von ca. 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für ca. 3 h bei RT inkubiert. Dann wurde die nicht gebundene GST-PBD durch dreimaliges Waschen in TBSw entfernt und durch anti-GST-Antikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper wie unter Abschnitt 5.4.1.2 beschrieben nachgewiesen.

##### **5.4.6.2 GST-PBD-Bindungsstudien mit Securin-freier Separase**

Securin-freie Separase wurde wie unter 5.4.4.2 beschrieben aufgereinigt. Danach wurde je die Hälfte des Eluats mit ca. 15  $\mu\text{g}$  immobilisierter GST-PBD oder als Kontrolle GST versetzt, 2 h bei 18 °C unter Drehen inkubiert und anschließend nach Waschen mit Bindungspuffer durch Zugabe von Protein-Ladepuffer eluiert. Ca. 50 % davon wurden anschließend durch Western-Blot-Analyse auf gebundene Separase und Cyclin B1 untersucht.

#### **5.4.7 *Xenopus*-Oozytenextrakt**

##### **5.4.7.1 Herstellung von *Xenopus*-Oozytenextrakt**

CSF-arretierte *Xenopus*-Eiextrakte, CSF-XB Puffer und Spermienkerne wurden wie beschrieben präpariert (Murray, 1991). Vor der Extraktpräparation wurden alle Gefäße mit reinem H<sub>2</sub>O ausgewaschen um eine Kontamination mit Kalzium zu vermeiden. Alle Arbeiten mit den Fröschen und den Oozyten wurden bei 18°C durchgeführt. Zur Schonung der Extrakte wurden sie nur mit abgeschnittenen Spitzen pipettiert. Am Tag vor der Extraktpräparation wurden weiblichen Fröschen je 1 ml humanem chorionischem Gonadotropin (Sigma, 1000 U/ml H<sub>2</sub>O) in den dorsalen Lymphsack injiziert. Einige Stunden später wurden die Frösche in 1x MMR-Puffer umgesetzt. Die Frösche legten 20-24 Stunden nach der Injektion reife Oozyten für bis zu 2 ml Extrakt pro Frosch. Die Gallerthülle der Eier wurde durch Inkubation für maximal 10 min in einer 2 % (w/v) Cysteinlösung in 1 x XB-Salze (pH 7,8) entfernt. Die Eier wurden daraufhin intensiv mit CSF-XB gewaschen und beschädigte oder aktivierte Eier wurden aussortiert. Danach wurden die Eier in ein Zentrifugenröhrchen überführt, in das 1 ml CSF-XB und 10  $\mu\text{l}$  einer Cytochalasin B-Lösung (10 mg/ml in DMSO) vorgelegt wurden. Durch Zentrifugation für 1 min bei 200 g und 1 min bei 600 g im JS 13.1 Ausschwingrotor

(Beckman) wurden die Oozyten dicht gepackt und der überstehende Puffer wurde abgenommen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 g für 10 min sorgte für die Lyse der Eier. Die hellbraun gefärbte Zytoplasmafraktion wurde durch Punktieren des Röhrchens in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Verhinderung der Aktinpolymerisation wurde dem Extrakt Cytochalasin B in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  beigemischt. Die weitere Lagerung des Extraktes erfolgte auf Eis. Der CSF-Arrest aller Extrakte wurde durch Inkubation mit Spermienkernen bei 28°C für 35 min überprüft, die Fähigkeit des Extraktes zum Verlassen des CSF-Arrests durch gleiche Behandlung in Anwesenheit von 0,6 mM  $\text{CaCl}_2$ . Nach der Inkubation wurden 2  $\mu\text{l}$  dieses Extraktes mit 4  $\mu\text{l}$  DAPI/Fix vermischt und unter dem Mikroskop auf dekondensiertes Chromatin hin überprüft. Um Niedrig- oder Hoch- $\Delta 90$ -Extrakte herzustellen, wurden den CSF-Extrakten hCyclinB1 $\Delta 90$  in Konzentrationen von 55 nM oder 550 nM zugesetzt. Nach 15 min bei 18 °C wurde  $\text{CaCl}_2$  in einer Endkonzentration von 0,6 mM zugegeben und der Extrakt weitere 15 min inkubiert. Der  $\Delta 90$ -Extrakt konnte gleich verwendet oder nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C für Monate gelagert werden.

#### **5.4.8 Biochemische Analyse des endogenen Separase-Cyclin B1/Cdk1-Komplexes**

##### **5.4.8.1 IP endogener Separase durch anti-pSX38**

Ca.  $2 \times 10^7$  HeLaS3-Zellen wurden geerntet und wie unter 5.4.4.1 beschrieben in Zelllysepuffer mit Complete-Protease-Inhibitoren (Roche) und 1  $\mu\text{M}$  Microcystin-LR (Alexa) lysiert. Separase wurde daraufhin mit ca. 0,1  $\mu\text{g}$  anti-pSX38-Antikörper pro  $1 \times 10^6$  Zellen aus dem Zelllysat entfernt. Kontroll-IPs wurden mit der gleichen Konzentration unspezifischer Kontroll-IgG durchgeführt. Die Antikörper waren an Protein G-Sepharose (Amersham Bioscience) gekoppelt und wurde über Nacht bei 4 °C unter Drehen im Lysat inkubiert. Dadurch gelang es, die Separase bis unter die Detektionsgrenze durch Western-Blot mit anti-Separase-N-Antikörper aus dem Lysat zu depletieren. An der Protein G-Sepharose immobilisierte Separase und gebundene Proteine wurden sodann durch Zugabe von Protein-Ladepuffer eluiert. Ca. 1/4 des Eluats wurde danach für Western-Blot-Detektion von Separase, hCyclin B1 und hCdk1 verwendet.

Um Mitose-spezifische Separase-Phosphorylierung durch Massenspektrometrie zu messen, wurde die gleiche Herangehensweise gewählt. Allerdings wurde mit ca.  $4 \times 10^8$  Zellen gearbeitet.

#### **5.4.9 In-Vitro-Expression-Cloning (IVEC)**

##### **5.4.9.1 Primäre Analyse der cDNA-Bibliothek**

Diese Methode diente zur biochemischen Identifikation neuer Separase-Substrate basierend auf der proteolytischen Separase-Aktivität. Dazu wurde das "Proteolink-*In-Vitro*-Expression-Cloning"-System der Firma Promega (Kat.# L6500) benutzt. Im System enthalten sind neben einer cDNA-Bibliothek aus Gehirn eines erwachsenen Menschen das "Gold-TNT-SP6"-Express-System zur Expression  $^{35}\text{S}$ -markierter cDNA-Gruppen. Die cDNA-Bibliothek liegt in insgesamt 960 Gruppen von 50-100 cDNAs in

96-Loch-Mikrotiterplatten im pCMV6-XL6-Vektor vor, der einen SP6-Promotor für *In-vitro*-Transkription der cDNAs durch SP6-Polymerase trägt. Das “Gold-TNT-SP6-Express“-System ist ein auf hohe Transkriptions-/Translations-Effizienz getestetes Retikulozyten-Lysat, das bereits die SP6-Polymerase zur Transkription der cDNAs enthält. Die *In-vitro*-Expression wurde wie vom Hersteller vorgeschlagen in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin (Amersham Pharmacia Kat.# AG1094) durchgeführt mit der Ausnahme, dass die Reaktion nicht in 25 µl, sondern in nur 12,5 µl Gesamtvolumen mit 250 µg cDNA stattfand. Je 4 µl der Protein-Gruppen wurden anschließend mit 2 µl aktiver Separase-PM1126/1346 oder zur Kontrolle proteolytisch inaktiver Separase-PM1126/1346-mut für 1 h bei 30 °C inkubiert, bevor die Reaktion mit Protein-Ladepuffer gestoppt wurde. Die Separasen wurde wie unter 5.4.5.1 beschrieben durch Reinigung von ZZ-TEV<sub>4</sub>-Separase/Securin aus transfizierten 293T-Zellen mit anschließender Aktivierung der Separase in Niedrig-Δ90-Extrakt und TEV-Elution hergestellt. Ihre Aktivität wurde durch Spaltung *in-vitro*-translatierten <sup>35</sup>S-markierten Cohesins überprüft. Nach der Spalt-Reaktion mit den exprimierten cDNA-Gruppen wurden diese direkt neben der Kontroll-Spaltung durch inaktive Separase durch SDS-PAGE und Autoradiographie wie in 5.4.1.4 beschrieben analysiert. Die Detektion erfolgte durch Belichtung eines BioMax-MR-Röntgen-Films (Kodak). Um eine größere Trennungsstrecke als mit den unter 5.4.1.1 beschriebenen SDS-Gelen zu erhalten, wurden große, selbst gegossene NuPAGE-Gele mit den Ausmaßen 20 x 20 x 0,1 cm und einem kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradienten von 6 – 15 % verwendet. Die Identifikation zwischen Kontroll- und Separase-Spalt-Ansatz unterschiedlicher Banden erfolgte durch visuelle Auswertung der Filme.

#### **5.4.9.2 Ausschluss von Gruppen mit bekannten Separase-Substraten**

Um Gruppen, die eines der bekannten Separase-Substrate Cohesin und Separase enthalten, auszusortieren, wurden alle positiven Gruppen durch analytische PCR auf Anwesenheit von Cohesin und Separase getestet. Dazu wurde folgende Primer-Paare gewählt: hSccl: CCATGAGAGAAGAAGTTGGG / GATCTTCATATTCTAAATGG, ACAACATAGATGAGTCAGC / TCTCCTTCTCTTTTCTGGC und CAACACTTG TTCCAAATGAG / GGTCTTCTGGTACAAGCGG; hSeparase: AACACTCAGGGAG TCACAGA / CCTGAGCCTCAATAATACCT. Die PCR-Primer vermitteln die Amplifikation der Bereiche, die die Separase-Spaltstellen enthalten, da diese im cDNA-Klon vorhanden sein müssen. Die Spezifität der entstandenen Banden wurde durch Vergleich mit Kontroll-PCRs mit Cohesin und Separase und einer negativen cDNA-Gruppe bestätigt.

#### **5.4.9.3 Isolierung von neuen Substraten aus positiven cDNA-Gruppen durch “Sib-Selection”**

Um die cDNA für das neue Separase-Substrat aus einer positiven Gruppe zu isolieren, wurde die “Sib-Selection“-Methode angewandt. Dazu wurden 10 ng der cDNA der positiven Gruppe in XL1-Blue-Zellen transformiert, die anschließend auf ampicillin-haltigen Platten ausplattiert wurden. Die DNA von Einzelkolonien, die in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gewachsen waren, wurde daraufhin isoliert und zu neuen Untergruppen zusammengefasst. Dazu wurden die DNA sowohl der Reihen als auch der Spalten der 96-

Loch-Titerplatte vereinigt und als Gruppen von je 12 bzw. 8 DNA-Klonen wie oben beschrieben durch Separase-vermittelte Spaltung auf Anwesenheit eines Separase-Substrats getestet. Es wurde jeweils eine positive Reihe und Spalte identifiziert. Der Kreuzungspunkt enthielt die cDNA für das neue Separase-Substrat.

## 6 Literatur

Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J. C., and Doree, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* *111* ( Pt 12), 1751-1757.

Aguiar, C., Davidson, C., Dix, M., Stead, K., Zheng, K., Hartman, T., and Guacci, V. (2005). Topoisomerase II suppresses the temperature sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* pds5 mutants, but not the defect in sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* *4*, 1294-1304.

Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupart, M. A., and Nasmyth, K. (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* *105*, 459-472.

Archambault, V., Li, C. X., Tackett, A. J., Wasch, R., Chait, B. T., Rout, M. P., and Cross, F. R. (2003). Genetic and biochemical evaluation of the importance of Cdc6 in regulating mitotic exit. *Mol Biol Cell* *14*, 4592-4604.

Azuma, Y., Arnaoutov, A., and Dasso, M. (2003). SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol* *163*, 477-487.

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.

Bartlett, S. E., Enquist, J., Hopf, F. W., Lee, J. H., Gladher, F., Kharazia, V., Waldhoer, M., Mailliard, W. S., Armstrong, R., Bonci, A., and Whistler, J. L. (2005). Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 11521-11526.

Bourne, Y., Watson, M. H., Arvai, A. S., Bernstein, S. L., Reed, S. I., and Tainer, J. A. (2000). Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions. *Structure* *8*, 841-850.

Bourne, Y., Watson, M. H., Hickey, M. J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S. I., and Tainer, J. A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* *84*, 863-874.

Buonomo, S. B., Rabitsch, K. P., Fuchs, J., Gruber, S., Sullivan, M., Uhlmann, F., Petronczki, M., Toth, A., and Nasmyth, K. (2003). Division of the nucleolus and its release of CDC14 during anaphase of meiosis I depends on separase, SPO12, and SLK19. *Dev Cell* *4*, 727-739.

Clute, P., and Pines, J. (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* *1*, 82-87.

D'Amours, D., Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* *117*, 455-469.

De Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E. D., and Musacchio, A. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* *15*, 214-225.

Elia, A. E., Cantley, L. C., and Yaffe, M. B. (2003a). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* *299*, 1228-1231.

- 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. (2003b). The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* *115*, 83-95.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* *381*, 438-441.
- Gardner, R. D., and Burke, D. J. (2000). The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol* *10*, 154-158.
- Gimenez-Abian, J. F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J. M. (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol* *14*, 1187-1193.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *349*, 132-138.
- Gorr, I. H., Boos, D., and Stemmann, O. (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell* *19*, 135-141.
- Gorr, I. H., Reis, A., Boos, D., Wuhr, M., Madgwick, S., Jones, K. T., and Stemmann, O. (2006). Essential CDK1-inhibitory role for separase during meiosis I in vertebrate oocytes. *Nat Cell Biol* *8*, 1035-1037.
- Gruber, S., Haering, C. H., and Nasmyth, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* *112*, 765-777.
- Haering, C. H., Lowe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* *9*, 773-788.
- Hagting, A., Den Elzen, N., Vodermaier, H. C., Waizenegger, I. C., Peters, J. M., and Pines, J. (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* *157*, 1125-1137.
- Harper, J. W. (1997). Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* *29*, 91-107.
- Harper, J. W. (2001). Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Curr Biol* *11*, R431-435.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C. M., Mechtler, K., and Peters, J. M. (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol* *3*, e69.
- Hauf, S., Waizenegger, I. C., and Peters, J. M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* *293*, 1320-1323.
- Herzig, A., Lehner, C. F., and Heidmann, S. (2002). Proteolytic cleavage of the THR subunit during anaphase limits *Drosophila* separase function. *Genes Dev* *16*, 2443-2454.
- Heydorn, A., Sondergaard, B. P., Ersboll, B., Holst, B., Nielsen, F. C., Haft, C. R., Whistler, J., and Schwartz, T. W. (2004). A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem* *279*, 54291-54303.
- Higuchi, T., and Uhlmann, F. (2005). Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. *Nature* *433*, 171-176.

- Holland, A. J., and Taylor, S. S. (2006). Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction. *J Cell Sci* 119, 3325-3336.
- Hornig, N. C., and Uhlmann, F. (2004). Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by Polo-like kinase. *Embo J* 23, 3144-3153.
- Huang, X., Hatcher, R., York, J. P., and Zhang, P. (2005). Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in Mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16, 4725-4732.
- Ivanov, D., and Nasmyth, K. (2005). A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* 122, 849-860.
- Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T. M., Sawada, W., and Kishimoto, T. (2000). Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *Embo J* 19, 4513-4523.
- Jäger, H., Herzig, B., Herzig, A., Sticht, H., Lehner, C. F., and Heidmann, S. (2004). Structure predictions and interaction studies indicate homology of separase N-terminal regulatory domains and *Drosophila* THR. *Cell Cycle* 3, 182-188.
- Jallepalli, P. V., Waizenegger, I. C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M. R., Peters, J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* 105, 445-457.
- Jensen, S., Johnson, A. L., Johnston, L. H., and Segal, M. (2004). Temporal coupling of spindle disassembly and cytokinesis is disrupted by deletion of LTE1 in budding yeast. *Cell Cycle* 3, 817-822.
- Jensen, S., Segal, M., Clarke, D. J., and Reed, S. I. (2001). A novel role of the budding yeast separin Esp1 in anaphase spindle elongation: evidence that proper spindle association of Esp1 is regulated by Pds1. *J Cell Biol* 152, 27-40.
- Kitajima, T. S., Kawashima, S. A., and Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427, 510-517.
- Kitajima, T. S., Miyazaki, Y., Yamamoto, M., and Watanabe, Y. (2003). Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *Embo J* 22, 5643-5653.
- Kudo, N. R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K. G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., McKay, M., Maro, B., *et al.* (2006). Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* 126, 135-146.
- Lane, H. A., Nigg, E. A., Barr, F. A., and Sillje, H. H. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes
- Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *J Cell Biol* 135, 1701-1713.
- 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.
- Liu, J., and Maller, J. L. (2005). *Xenopus* Polo-like kinase Plx1: a multifunctional mitotic kinase. *Oncogene* 24, 238-247.
- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B. A., Gonzalez, C., Karess, R. E., Glover, D. M., and Sunkel, C. E. (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 5, 2153-2165.

- Marston, A. L., Lee, B. H., and Amon, A. (2003). The Cdc14 phosphatase and the FEAR network control meiotic spindle disassembly and chromosome segregation. *Dev Cell* 4, 711-726.
- Mattison, C. P., and Winey, M. (2006). The centrosome cycle. *Results Probl Cell Differ* 42, 111-146.
- McGuinness, B. E., Hirota, T., Kudo, N. R., Peters, J. M., and Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol* 3, e86.
- Mei, J., Huang, X., and Zhang, P. (2001). Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Biol* 11, 1197-1201.
- Mimura, S., Seki, T., Tanaka, S., and Diffley, J. F. (2004). Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature* 431, 1118-1123.
- Murray, A. W. (1991). Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol* 36, 581-605.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297, 559-565.
- Nasmyth, K. (2005). How do so few control so many? *Cell* 120, 739-746.
- Nasmyth, K., Peters, J. M., and Uhlmann, F. (2001). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Novartis Found Symp* 237, 113-133.
- Nigg, E. A. (1998). Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* 10, 776-783.
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.
- Papi, M., Berdugo, E., Randall, C. L., Ganguly, S., and Jallepalli, P. V. (2005). Multiple roles for separase auto-cleavage during the G2/M transition. *Nat Cell Biol* 7, 1029-1035.
- Patra, D., Wang, S. X., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1999). The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem* 274, 36839-36842.
- Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 9, 931-943.
- Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 644-656.
- Petronczki, M., Siomos, M. F., and Nasmyth, K. (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423-440.
- Pfleghaar, K., Heubes, S., Cox, J., Stemmann, O., and Speicher, M. R. (2005). Securin is not required for chromosomal stability in human cells. *PLoS Biol* 3, e416.
- Qian, Y. W., Erikson, E., Li, C., and Maller, J. L. (1998). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 18, 4262-4271.
- Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., and Uhlmann, F. (2006). Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* 125, 719-732.

- Rappleye, C. A., Tagawa, A., Lyczak, R., Bowerman, B., and Aroian, R. V. (2002). The anaphase-promoting complex and separin are required for embryonic anterior-posterior axis formation. *Dev Cell* 2, 195-206.
- Riedel, C. G., Katis, V. L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., *et al.* (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441, 53-61.
- Shamu, C. E., and Murray, A. W. (1992). Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J Cell Biol* 117, 921-934.
- Stead, K., Aguilar, C., Hartman, T., Drexel, M., Meluh, P., and Guacci, V. (2003). Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J Cell Biol* 163, 729-741.
- Stegmeier, F., Visintin, R., and Amon, A. (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* 108, 207-220.
- Stemmann, O., Boos, D., and Gorr, I. H. (2005). Rephrasing anaphase: separase FEARs shugoshin. *Chromosoma* 113, 409-417.
- 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.
- Strunnikov, A. V., Aravind, L., and Koonin, E. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics* 158, 95-107.
- Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V. L., and Uhlmann, F. (2004). Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell* 117, 471-482.
- Sullivan, M., Lehane, C., and Uhlmann, F. (2001). Orchestrating anaphase and mitotic exit: separase cleavage and localization of Slk19. *Nat Cell Biol* 3, 771-777.
- Sullivan, M., and Uhlmann, F. (2003). A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. *Nat Cell Biol* 5, 249-254.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A., and Peters, J. M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 9, 515-525.
- Sunkel, C. E., and Glover, D. M. (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* 89 ( Pt 1), 25-38.
- Tang, Z., Sun, Y., Harley, S. E., Zou, H., and Yu, H. (2004). Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18012-18017.
- Tsou, M. F., and Stearns, T. (2006). Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* 442, 947-951.
- Uhlmann, F. (2004). The mechanism of sister chromatid cohesion. *Exp Cell Res* 296, 80-85.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37-42.

Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* *103*, 375-386.

van Vugt, M. A., and Medema, R. H. (2005). Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene* *24*, 2844-2859.

Viadiu, H., Stemmann, O., Kirschner, M. W., and Walz, T. (2005). Domain structure of separase and its binding to securin as determined by EM. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 552-553.

Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* *103*, 399-410.

Wang, B. D., Yong-Gonzalez, V., and Strunnikov, A. V. (2004). Cdc14p/FEAR Pathway Controls Segregation of Nucleolus in *S. cerevisiae* by Facilitating Condensin Targeting to rDNA Chromatin in Anaphase. *Cell Cycle* *3*, 960-967.

Wang, L., and Schultz, P. G. (2004). Expanding the genetic code. *Angew Chem Int Ed Engl* *44*, 34-66.

Whistler, J. L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S. R., and Von Zastrow, M. (2002). Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* *297*, 615-620.

Yamamoto, A., Guacci, V., and Koshland, D. (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *133*, 85-97.

Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T., and Kirschner, M. W. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* *285*, 418-422.

Zou, H., Stemman, O., Anderson, J., Mann, M., and Kirschner, M. (2002). Anaphase specific auto-cleavage of separase. *FEBS Lett* *528*, 246.

## 7 Abkürzungen

$\Delta 90$	nicht durch APC/C ubiquitinierbare und dadurch stabile Form von Cyclin B1
$\Delta 90$ -Extrakt	Durch $\Delta 90$ in der Anaphase arretierter Xenopus-Oozytenextrakt
Ac	Acetat
Anw.	Anwesenheit
AS	Aminosäuren
APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosome (E3-Ubiquitinligase)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARM	armadillo
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cdk1	cyclin dependent kinase 1
CKI	Cdk-Inhibitor
CLD	Cdc6 like domain
CM	“cleavage mutante”, nicht durch Separase spaltbare Proteinmutante
CSF	Zytostatischer Faktor
CSF-Extrakt	Durch CSF-Aktivität in der Metaphase arretierter Xenopus-Oozytenextrakt
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-Aktivierungsenzym
E2	Ubiquitin-Konjugationsenzym
E3	Ubiquitin-Proteinligase
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/sec <sup>2</sup> oder Gramm
GST	Glutathion S-Transferase
h	human
HA	Hämagglutinin
HAc	Essigsäure
HEAT	Huntingtin, elongation factor 3, Proteinphosphatase 2A, target of rapamycin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Hoch- $\Delta 90$ -Extrakt	anaphasischer Xenopus-Oozytenextrakt mit 55 nM $\Delta 90$
IgG	Immunglobuline
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid

IVT	<i>In-vitro</i> -Translation
kb	Kilobasen
KD	katalytisch inaktive Kinase
kD	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
LB	Luria-Bertani ( <i>E. coli</i> -Medium)
m	Maus
MMR	Marc's modifizierter Ringer
MOPS	Morpholinoethansulfonsäure
NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
Niedrig- $\Delta 90$ -Extrakt:	anaphasischer <i>Xenopus</i> -Oozytenextrakt mit 55 nM $\Delta 90$
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBD	Polo-Box-Domäne, Phosphoprotein-Bindedomäne der Polo-Kinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PM	Phosphomutante von Separase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.c.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Securin
Sep	Separase
TBS	Tris gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEV	Protease des Tobacco Etch Virus
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp
X	<i>Xenopus</i>
ZZ	IgG-Bindedomäne von Protein A

## 8 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Dr. Olaf Stemmann dafür bedanken, dass er mir Vertrauen entgegengebracht und mich in seine Gruppe aufgenommen hat. Mit großem Enthusiasmus und meistens mit Geduld hat er mich immer wissenschaftlich unterstützt.

Ich möchte mich auch besonders bei Prof. Dr. Stefan Jentsch für die Übernahme des Erstgutachtens und für die exzellenten Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung bedanken. Er hat mit seiner freundlichen diskussionsbereiten Art für eine kollegiale und wissenschaftlich stimulierende Stimmung gesorgt. Ich hatte den Eindruck, immer mit seiner Unterstützung rechnen zu können.

Bei Dr. Roman Körner bedanke ich mich herzlich für die Zusammenarbeit bei der Massenspektrometrie.

Bei Ingo Gorr möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit beim Cyclin B-Projekt bedanken. Ohne seine Kinasen und sein Know-How wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz besonderer Dank gilt Alex Strasser für seine erstklassige Hilfe bei der Laborarbeit. Ohne seine Hilfe und seine gute Laune wäre ich verloren gewesen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Simone Heubes, Bernd Mayer, Michael Orth und Chris Kuffer für die gute Stimmung im Labor, für wissenschaftlich Diskussion und für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Ohne euch wäre das alles nicht so angenehm gewesen. Chris Kuffer möchte ich für einen erstklassigen Job bei seiner Diplomarbeit danken, die schließlich auch zum Gelingen meines Projekts beigetragen hat.

Christian Schubert danke ich herzlich für das Korrekturlesen meines Ergebnisteils und für seine konstruktive Kritik.

An alle Mitglieder der Arbeitsgruppen Buchberger, Müller und Jentsch richtet sich mein Dank für die großartige Atmosphäre. Der Fußballgruppe danke ich für den Gewinn von (mindestens drei) MPI-Cups, Traumpässe, geniale Tore und irrwitzige Torverhinderungsmaßnahmen.

Der Arbeitsgruppe Thomas Mayer danke ich für die gute Zusammenarbeit und Großzügigkeit beim Teilen von Reagenzien. Danke besonders an Stefan Hümmer fürs gemeinsame Rauchen und ständige Diskussionsbereitschaft. Besonderen Dank auch an Andreas Schmidt für gute Ratschläge und so.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Jenny und bei meiner Mutter bedanken. Ihr wart immer für mich da.

## 9 Lebenslauf

Name: Dominik Boos  
Adresse: Ridlerstraße 21, 80339 München  
Geburtsdatum: 22.12.1975  
Geburtsort: Landau in der Pfalz

### Schulbildung

1986-1995 Eduard-Spranger Gymnasium Landau in der Pfalz  
Abschluss mit Abitur im Juni 1995

### Zivildienst

1995-1996 Zivildienst als Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz

### Studium

1996-2002 Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
2001-2002 Diplomarbeit an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bei Prof. Dr. Alfred Nordheim, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Molekularbiologie  
Thema: „Retrovirale Infektion und *In-vitro*-Hämatopoese von Wildtyp- und Srf (-/-)-embryonalen Stammzellen der Maus“  
Abschluss mit Diplom im März 2002

### Doktorarbeit

seit 2002 Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried,  
AG Chromosomensegregation und Mitose (Dr. Olaf Stemmann)  
Thema: “Separase: Regulation, Funktion und neue Substrate”