

Die Funktion der Separase bei der Schwesterchromatiden-Trennung in *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Hubert Jäger
aus Meßkirch

2002

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften genehmigten Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Erstgutachter: Prof. Dr. C. F. Lehner
Zweitgutachter: Prof. Dr. M. Sprinzi

Promotionsgesuch eingereicht am: 07.11.2002
Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2003

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl Genetik der Universität Bayreuth in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Stefan Heidmann angefertigt.

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Lehner und ganz besonders bei Dr. Stefan Heidmann für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit bedanken. Dr. Stefan Heidmann hat entscheidend zu meiner wissenschaftlichen Ausbildung beigetragen.

Zusätzlich möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die ausgesprochen positive Arbeitsatmosphäre danken.

Teile dieser vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht

Jäger, H., A. Herzig, C.F. Lehner und S. Heidmann. 2001

Drosophila Separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR

Genes Dev **15**: 2572-2584

Inhaltsverzeichnis	1
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	2
3. EINLEITUNG	3
3.1 Die Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden	4
3.2 Die Ausbildung der Kohäsion	6
3.3 Die Kondensation der mitotischen Chromosomen	6
3.4 Die Zentromerregion und der Kinetochoraufbau	7
3.5 Der mitotische Spindelapparat	8
3.6 Die mitotische Schwesterchromatidentrennung	9
3.7 Die Proteinfamilie der Separasen	12
3.8 Die Regulation der Separaseaktivität	13
3.9 Die Schwesterchromatidentrennung in <i>D. melanogaster</i>	15
3.10 Zielsetzung der Arbeit	16
4. MATERIALIEN UND METHODEN	17
4.1 Standardmethoden	17
4.2 Oligonukleotide	17
4.3 Methoden im Umgang mit <i>Drosophila</i>	19
4.3.1 Fliegenhaltung	19
4.3.2 Fliegenstämme	20
4.3.3 Balancier-Chromosomen	20
4.3.4 Transgene Linien und deren Herstellung	21
4.3.5 Das GAL4/UAS-System	22
4.3.6 Herstellung neuer Defizienzen	23
4.3.7 Molekulare Charakterisierung des <i>Sse^{13m}</i> -Allels	25
4.3.8 Phänotypische Untersuchungen larvaler Gehirne	26
4.4 Methoden zur Charakterisierung des SSE-Proteins	28

4.4.1	Proteinexpression eines bakteriellen SSE-Fragments	28
4.4.2	Affinitätsreinigung der anti-SSE-Antikörper	28
4.4.3	Proteingele und Immunoblots	28
4.4.4	Charakterisierung der anti-SSE-Antikörper	29
4.4.5	Stabilität des SSE-Proteins während der Embryonalentwicklung	30
4.4.6	Koimmunopräzipitation	30
4.5	Identifikation von <i>pim</i>-, <i>thr</i>- und <i>Sse</i>-orthologen Genen	30
4.5.1	<i>pim</i> -Orthologe	31
4.5.2	<i>Sse</i> -Orthologe aus <i>D. willistoni</i> und <i>D. virilis</i>	32
4.5.3	<i>thr</i> -Orthologe von <i>D. pseudoobscura</i> und <i>D. virilis</i>	34
4.6	RNA-Aufreinigung aus verschiedenen <i>Drosophiliden</i>	34
4.6.1	Northern-Blot-Experiment	34
4.6.2	Herstellung von Erststrang-cDNA-Bibliotheken	35
4.7	Two-Hybrid-Interaktionsstudien	35
4.7.1	Matchmaker Hefe-Two-Hybrid-System	35
4.7.2	SSE-Fragment im pGBKT7	36
4.7.3	<i>D. virilis</i> SSE-Fragment im pGBKT7	36
4.7.4	<i>D. willistoni</i> SSE-Fragment im pGBKT7	36
4.7.5	Two-Hybrid-Konstrukte aus <i>D. virilis</i> THR	36
4.7.6	Two-Hybrid-hSeparase-Konstrukte	37
4.7.7	Two-Hybrid-hPTTG-Konstrukte	37
4.7.8	Bereits vorhandene Two-Hybrid-Konstrukte	37
4.8	Sequenzanalysen	38
5.	ERGEBNISSE	39
5.1	<i>Drosophila</i> SSE unterscheidet sich von den restlichen Separasen	39
5.2	SSE ist essentiell für die Separation der Schwesterchromatiden	44
5.2.1	Mutante Allele des <i>Sse</i> -Gens	44
5.2.2	<i>Sse</i> ist ein essentielles Gen	46
5.2.3	Bei <i>Sse</i> -Nullmutanten ist die Separation der Schwesterchromatiden inhibiert	48
5.2.4	Ektopische <i>Sse</i> -Expression komplementiert <i>Sse</i> ⁻ -Phänotyp	50
5.2.5	Die proteolytische Aktivität von SSE ist essentiell	50
5.3	Separase im Komplex mit PIM und THR	51
5.3.1	SSE interagiert im Two-Hybrid-Experiment mit PIM und THR	51

Inhaltsverzeichnis	III
5.3.2 Anti-SSE-Antikörper erkennen endogenes SSE	52
5.3.3 SSE interagiert <i>in vivo</i> mit PIM und THR	53
5.4 Separase-Komplexe aus <i>D. melanogaster</i>	56
5.5 SSE-, THR- und PIM-Orthologe aus weiteren <i>Drosophiliden</i>	57
5.5.1 SSE-Orthologe aus entfernt verwandten <i>Drosophiliden</i>	57
5.5.2 THR-Orthologe aus entfernt verwandten <i>Drosophiliden</i>	61
5.5.3 PIM-Orthologe aus nahe Verwandten von <i>D. melanogaster</i>	64
5.6 Die THR/SSE- und THR/PIM-Interaktion sind konserviert	66
5.7 Der humane Separase-Komplex zeigt Parallelen zum <i>Drosophila</i> Separase-Komplex	68
5.8 THR entspricht dem N-terminalen Teil der Separasen aus anderen Eukaryoten	70
6. DISKUSSION	73
6.1 SSE divergiert im Vergleich zu den weiteren Separasen	73
6.2 SSE ist notwendig für die Separation der Schwesterchromatiden	74
6.3 Modell der verschiedenen <i>Drosophila</i> Separase-Komplexe	78
6.4 THR entspricht funktionell dem N-Terminus der „großen“ Separasen	79
6.5 Orthologe Proteine von SSE, THR und PIM	81
6.6 Die Architektur der Separase-Komplexe ist konserviert	83
6.7 Die Aufspaltung der „großen“ Separase in <i>D. melanogaster</i> bietet zusätzliche Regulationsmöglichkeiten	86
7. LITERATURVERZEICHNIS	88
8. ANHANG	95
8.1 Sequenzen der <i>Sse</i> -orthologen Gene aus <i>D. virilis</i> sowie <i>D. willistoni</i>	95
8.2 Sequenzen der <i>thr</i> -orthologen Gene aus <i>D. pseudoobscura</i> und <i>D. virilis</i>	99
8.3 Sequenzen der <i>pim</i> -orthologen Gene aus <i>D. erecta</i> und <i>D. orena</i>	105
8.4 Sequenzvergleich der SSE-Orthologen mit SSE aus <i>A. gambiae</i>	107

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AD	GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne
ADE	Adenin
AS	Aminosäuren
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
BD	GAL4-Bindungsdomäne
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Df</i>	<i>Defizienz</i>
ECL	enhanced-chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazine-Ethansulfonsäure
HIS	Histidin
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
/	Letalmutation
LEU	Leucin
min	Minute
Mio.	Million
mRNA	Boten-RNA
Nonidet NP40	Nonylphenyl-Polyethylene-Glycol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen je Minute
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
ts	temperatur-sensitiv

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolaethoxyethanol
TRP	Tryptophan
<i>UAS</i>	upstream activating sequence

Die Bedeutung genetischer *Drosophila*-Symbole wird entweder im Text eingeführt oder ist zu finden in Lindsley und Zimm (1992).

1. Zusammenfassung

Grundvoraussetzung für den Erhalt der genetischen Stabilität während der Zellteilung ist die akkurate Verteilung der Schwesterchromatiden auf die entstehenden Tochterzellen. Diese Verteilung erfordert die gleichzeitige Trennung aller Schwesterchromatiden am Metaphasen/Anaphasen-Übergang.

Die *Drosophila* Proteine PIM und THR, die *in vivo* in einem Komplex vorliegen sind essentiell für die Trennung der Schwesterchromatiden im Verlauf der Mitose. Keines dieser Proteine zeigt signifikante Sequenzübereinstimmungen zu bekannten Proteinen. PIM weist jedoch funktionelle Gemeinsamkeiten zur Klasse der Securine auf. Es wird wie andere Securine am Metaphasen/Anaphasen-Übergang proteolytisch abgebaut, wodurch die Trennung der Schwesterchromatiden ermöglicht wird. Die Securine sind die inhibitorischen Untereinheiten der Separasen, einer konservierten Familie von Cystein-Endoproteasen. Der Abbau der Securine führt zur Aktivierung der Separasen, die über die Spaltung einer konservierten Kohäsin-Untereinheit die Trennung der Schwesterchromatiden einleiten. Um zu untersuchen, inwiefern PIM ebenfalls für die Regulation der Separase-Aktivität verantwortlich ist, wurde in dieser Arbeit das *Drosophila* Separase-Homolog (SSE) charakterisiert. SSE weist etwa nur die Hälfte bis ein Drittel der Größe von weiteren Separasen auf, und auch die Endoproteasedomäne ist divergent, weshalb SSE ein entferntes Mitglied der Separase-Familie darstellt. Dennoch zeigen die zytologischen Studien an *Sse*-Mutanten, dass SSE eine essentielle Funktion im Verlauf der mitotischen Separation der Schwesterchromatiden wahrnimmt. Zusätzlich interagiert SSE direkt mit dem Securin PIM aber auch mit dem Securin-assoziierten THR. Insofern unterscheidet sich der ternäre *Drosophila* Separase-Komplex klar von den binären Separase-Komplexen aus Organismen mit einer „großen“ Separase. Two-Hybrid-Experimente in der Hefe legen jedoch nahe, dass THR funktionell dem N-terminalen Bereich der „großen“ Separasen gleichzusetzen ist. Diese Interaktionsstudien lassen somit Parallelen im Aufbau des humanen und des *Drosophila* Separase-Komplexes erkennen. Diese Resultate lassen auch vermuten, dass in *D. melanogaster* eine Aufspaltung einer ursprünglich „großen“ Separase in die beiden Proteine SSE und THR erfolgt ist. Die Identifikation von *Sse*- und *thr*-Orthologen aus entfernt verwandten *Drosophiliden* legt den Schluss nahe, dass die zugrundeliegende Genspaltung vor mindestens 40-60 Millionen Jahren stattgefunden hat.

2. Summary

The presupposition for genetic stability during cell divisions is the accurate distribution of the sister chromatids onto daughter cells. This distribution needs a simultaneous separation of all sister chromatids at the metaphase-to-anaphase transition.

The *Drosophila* proteins PIM and THR, which associate *in vivo*, are required for sister chromatid separation in mitosis. Neither of these two proteins shares significant sequence similarity with known proteins. However, PIM has functional similarities with securin proteins. Like other securins, PIM is degraded at the metaphase-to-anaphase transition and this degradation is required for sister chromatid separation. Securins are the inhibitory subunits of the separases, a conserved family of cysteine endoproteases. Proteolysis of securins at the metaphase-to-anaphase transition activates the separases, which in turn degrade a conserved cohesin subunit, thereby triggering sister chromatid separation. To address whether PIM regulates separase activity, the *Drosophila* separase homologue (SSE) was characterized. SSE is only about one-third to one-half of the size of other separases and has a diverged endoprotease domain. Therefore, SSE is an unusual member of the separase family. However, genetic analysis shows that SSE does have an essential function during the process of sister chromatid separation. Moreover, SSE associates with the securin PIM and also with the securin-associated THR. Therefore, the ternary *Drosophila* separase complex is clearly different from the binary separase complexes found in organisms with a large separase. Two-hybrid experiments in yeast suggest that THR corresponds to the N-terminal part of other large separases. These interaction studies therefore indicate parallels in the topology of the human and *Drosophila* separase complexes. The results also suggest, that in *D. melanogaster* an originally large separase has been split into the two proteins SSE and THR. The identification of *Sse* and *thr* orthologue genes from distantly related *Drosophila* species suggest that the gene split took place 40-60 million years ago.

3. Einleitung

Einer der beeindruckendsten biologischen Prozesse ist die korrekte Verteilung des Erbguts von einer Mutterzelle auf die beiden Tochterzellen. Dieser Vorgang muss bei jeder neuen Teilungsrunde, auch als Zellzyklus bezeichnet, mit der größt möglichen Genauigkeit erfolgen. Dies ist die Grundvoraussetzung dafür, dass sich aus einer Zygote komplexe Organismen entwickeln können. In Eukaryoten ist das Erbgut, die DNA, auf unterschiedliche Chromosomen aufgeteilt. Im Verlauf des Zellzyklus wird die chromosomale DNA der Mutterzelle verdoppelt und dann auf die neu entstehenden Tochterzellen akkurat verteilt. Die zeitliche Entkopplung der Duplikation der DNA (Replikation) von der Trennung der replizierten DNA führte in Eukaryoten zur Einteilung des Zellzyklus. In der Interphase, die sich weiter in die G1- (gap), S- (synthesis) und G2-Phase unterteilt, erfolgt das Zellwachstum sowie die Replikation der chromosomalen DNA. Die aus der Replikation entstandenen Schwesterchromatiden werden dann im Verlauf der sich anschließenden Mitose auf die neu entstehenden Tochterzellen aufgeteilt. Die Schwesterchromatiden sind vom Zeitpunkt ihrer Entstehung in der S-Phase bis zu ihrer Trennung im späten Verlauf der Mitose miteinander verbunden. Diese, auch als Kohäsion bezeichnete Verbindung, bleibt auch während der frühen mitotischen Vorgänge, in denen die strukturelle Umwandlung der chromosomalen DNA zu Metaphasechromosomen erfolgt, aufrechterhalten. Jedes Metaphasechromosom besteht aus einem Paar von kondensierten Schwesterchromatiden. Zu Beginn der Anaphase gibt die proliferierende Zelle ein Signal, welches dazu führt, dass die Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden aufgehoben wird und die Chromatiden zu den entgegengesetzten Polen der Zelle gezogen werden (Abb. 3-2).

Die Separation der Schwesterchromatiden erfordert ein zeitlich streng reguliertes Zusammenspiel von vielen unterschiedlichen Komponenten. Diese Komponenten sind am Kohäsionsprozess der Schwesterchromatiden, am Kondensationsprozess der chromosomalen DNA, an der Etablierung eines funktionellen Kinetochors und der Ausbildung und Anheftung des Spindelapparates an das Kinetochor beteiligt. Erst wenn alle Mitspieler ihre korrekte Position eingenommen haben, darf die Zelle das Signal zur Trennung der Schwesterchromatiden geben.

3.1 Die Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden

Mitverantwortlich für die Kohäsion der Schwesterchromatiden ist der Kohäsion-Proteinkomplex (Guacci et al. 1997; Michaelis et al. 1997; Losada et al. 1998; Toth et al. 1999). Proliferierende mitotische Zellen aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzen nur einen Kohäsion-Typ, der aus den vier Untereinheiten Smc1 (structural maintenance of chromosomes), Smc3, Scc1 (sister chromatid cohesion)/Mcd1 (mitotic chromosome determinant) und Scc3 besteht. In der Folge wird die Scc1/Mcd1-Kohäsionuntereinheit als Scc1 bezeichnet. In somatischen Zellen der Vertebraten kommen zwei verschiedene Kohäsion-Isoformen vor, bestehend aus den Proteinen SMC1, SMC3, SCC1 und einem der beiden SCC3-Orthologen SA1 oder SA2 (Losada et al. 2000; Sumara et al. 2000).

Die SMC-Proteinfamilie ist praktisch in allen Organismen, einschließlich der Eubakterien und Archaeobakterien, identifizierbar (Soppa 2001). Die Mitglieder der SMC-Familie liegen in dimerer Form vor. Sie bilden entweder Homodimere mit sich selbst, wie im Falle der prokaryotischen SMC-Proteine, oder Heterodimere zwischen unterschiedlichen aber verwandten SMC-Proteinen (als Übersichtsartikel siehe Cobbe und Heck 2000; Hirano 2002). Alle SMC-Proteine zeigen einen konservierten molekularen Aufbau. Die globuläre aminoterminalen (N-terminalen) und carboxy-terminalen (C-terminalen) Domäne sind über zwei „coiled-coil“ Strukturen und eine zentral lokalisierte globuläre „Scharnier“-Domäne miteinander verbunden (Abb. 3-1). Elektronenmikroskopische Analysen eines bakteriellen SMC-Homodimers sowie des Hefe Smc1/Smc3-Heterodimers zeigen, dass die beiden Untereinheiten in einer antiparallelen Anordnung eine symmetrische, zweiarmige, V-förmige Struktur ausbilden (Melby et al. 1998; Haering et al. 2002). Da SMC-Dimere eine DNA-Bindungsaktivität aufweisen, ist aufgrund der V-förmigen Struktur denkbar, dass die Dimere eine Klammer um das Chromatin ausbilden können (Haering et al. 2002). Die beiden Untereinheiten werden hierbei über die Scharnier-Domänen, die die intramolekular angeordneten coiled-coil Strukturen miteinander verbinden, zusammengehalten (Abb. 3-1; Haering et al. 2002). Für die Scc1-Untereinheit des Kohäsion-Komplexes konnte über Immunopräzipitations-Experimente gezeigt werden, dass sie sowohl mit den Kopfreionen der SMC-Untereinheiten Smc1 und Smc3 als auch mit Scc3 interagieren kann (Haering et al. 2002). Eine direkte Wechselwirkung zwischen Scc3 und den SMC-Proteinen war nicht feststellbar (Haering et al. 2002).

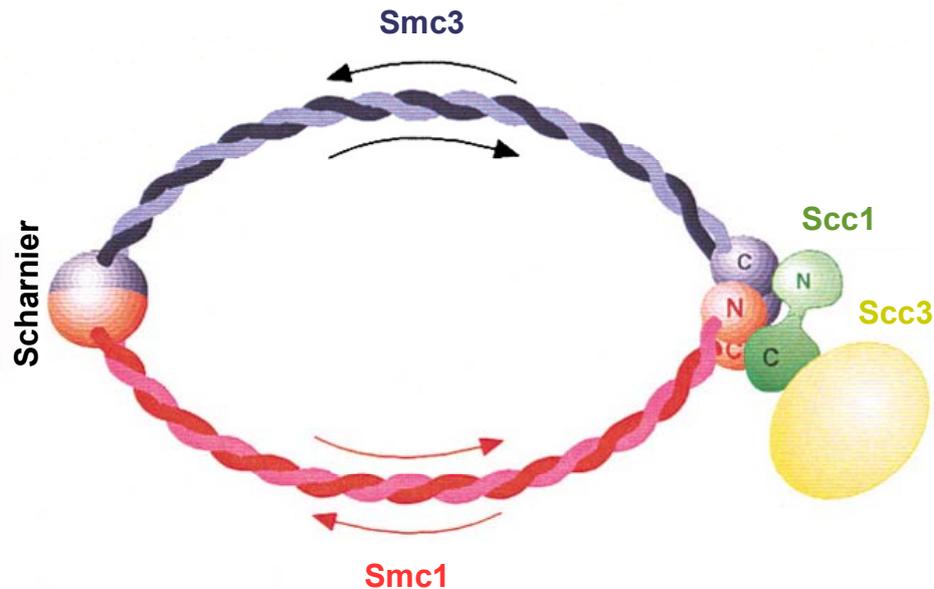


Abbildung 3-1: Modell des geschlossenen Kohäsins-Komplexes aus *S. cerevisiae*.

Der Kohäsins-Komplex besteht aus den Untereinheiten Smc1 (rot), Smc3 (violett), Scc1 (grün) und Scc3 (gelb). Die SMC-Proteine lassen sich untergliedern in die globulären N- und C-terminalen Bereiche, die durch eine lange coiled-coil Struktur voneinander getrennt sind. In der Mitte der langen coiled-coil Struktur befindet sich die globuläre Scharnier-Domäne, die die Interaktion der beiden Smc-Untereinheiten vermittelt. Die Scc1-Kohäsinsuntereinheit interagiert sowohl mit dem Smc1/Smc3-Heterodimer als auch mit Scc3. Da Scc3 keine direkte Wechselwirkung zum SMC-Heterodimer aufweist, ist nur über die Anbindung von Scc1 die Ausbildung des kompletten Kohäsins-Komplexes möglich. Wenn das Smc1/Smc3-Heterodimer eine Klammer um das Chromatin ausbildet, könnte die Anbindung von Scc1 dazu führen, dass diese Klammer geschlossen wird. Die Pfeile zeigen die antiparallele intramolekulare Anordnung der Smc coiled-coil Struktur. (Abbildung modifiziert nach Haering et al. 2002)

Das aus diesen Daten postulierte „Umarmungsmodell“ besagt, dass das SMC-Heterodimer die Chromosomen wie eine Art Klammer umgibt. Die Scc1-Kohäsinsuntereinheit kann diese Klammer schließen und gleichzeitig die Scc3-Untereinheit an den Komplex anbinden (Abb. 3-1, Haering et al. 2002).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von humanen und *Xenopus laevis* Kohäsins-Komplexen gehen konform mit der Beobachtung, dass die nicht-SMC-Proteine mit der Kopfreion des heterodimeren SMC1/SMC3-Komplexes interagieren (Anderson et al. 2002). Die Autoren dieser Publikation bevorzugen jedoch ein abweichendes Kohäsionsmodell, bei dem die beiden Schwesterchromatiden durch zwei SMC-Heterodimere zusammengehalten werden, die über Scc1/Scc3 miteinander verknüpft sind (Anderson et al. 2002). Inwiefern die Modelle der *in vivo*-Situation nahe kommen, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden.

3.2 Die Ausbildung der Kohäsion

Die Kohäsion-Komplexe können während des gesamten Zellzyklus mit dem Chromatin interagieren (Losada et al. 1998; Uhlmann und Nasmyth 1998). Eine stabile Kohäsion der Schwesterchromatiden ist jedoch nur dann feststellbar, wenn der Kohäsion-Komplex während der S-Phase auf das Chromatin geladen wird (Uhlmann und Nasmyth 1998). An diesem Beladungsvorgang ist in *S. cerevisiae* vermutlich auch der Scc2/Scc4-Proteinkomplex beteiligt. Inaktivierung von Scc2 oder Scc4 reduziert den Anteil von Chromatin assoziiertem Kohäsion deutlich (Ciosk et al. 2000). Für die Etablierung der Kohäsion im Verlauf der S-Phase ist in *S. cerevisiae* zusätzlich das Protein Eco1 (establishment of cohesion)/Ctf7 (chromosome transmission fidelity) essentiell (Skibbens et al. 1999; Toth et al. 1999). Die Zellvitalität und Kohäsion der Schwesterchromatiden gehen verloren, wenn eine temperatursensitive *ctf7* Mutante im Verlauf der S-Phase der restriktiven Temperatur ausgesetzt wird. Erfolgt während der Mitose die Inkubation der Mutanten bei restriktiver Temperatur, so hat dies auf die Vitalität und die Kohäsion der Schwesterchromatiden keine Auswirkung (Skibbens et al. 1999). Dieses Ergebnis zeigt, dass Eco1/Ctf7 bei der Aufrechterhaltung der Kohäsion keine essentielle Rolle spielt. Eine genaue funktionelle Charakterisierung steht jedoch sowohl für das Protein Eco1/Ctf7 als auch für den Scc2/Scc4-Proteinkomplex noch aus.

3.3 Die Kondensation der mitotischen Chromosomen

Im Verlauf der Prophase beziehungsweise Prometaphase erfolgt eine globale Umstrukturierung der chromosomalen DNA. Die Chromosomen werden durch die Kondensation in eine sehr kompakte Transportform umgewandelt, bevor am Metaphasen/Anaphasen-Übergang die Schwesterchromatiden mittels des Spindelapparates akkurat getrennt werden. An diesem Kondensationsprozess ist der Kondensin-Komplex mitbeteiligt. Dieser aus fünf Untereinheiten aufgebaute Komplex wird im Verlauf der Pro- beziehungsweise Prometaphase auf das Chromatin geladen. Zu diesem Zeitpunkt dissoziiert in höheren Eukaryoten ein Großteil des Kohäsion-Komplexes von den chromosomalen Armen ab. Die Kohäsion bedingte Kohäsion in der Zentromerregion bleibt in Vielzellern jedoch aufrechterhalten (Sumara et al. 2000; Waizenegger et al. 2000; Warren et al. 2000). Die beiden Vorgänge der Kondensin-Beladung und die Abdissoziation der Kohäsion in der Armregion sind unabhängig voneinander. Im Unterschied zu den höheren Eukaryoten bleibt in *S. cerevisiae* der Kohäsion-Komplex vom Zeitpunkt seiner Anbindung bis zur Trennung der Schwesterchromatiden auch an der Armregion mit dem Chromosom assoziiert.

Da in *S. cerevisiae* während der Mitose kaum Kondensation zu beobachten ist, kann der Unterschied zu den Vielzellern eventuell dadurch erklärt werden, dass der Verlust der Kohäsion in der Armregion der Chromosomen für die Einleitung der Kondensin vermittelten Kondensation notwendig ist. Basierend auf dieser Idee kann vermutet werden, dass die Gestalt der Metaphasechromosomen durch ein präzises Gleichgewicht zwischen der Kohäsions- und Kondensationsmaschinerie zustande kommt (Losada und Hirano 2001). Da in höheren Eukaryoten die großen Genome auf relativ wenige Chromosomen aufgeteilt sind, muss die Kohäsion entlang der chromosomalen Arme gelöst werden, um eine effiziente Kondensation zu ermöglichen.

3.4 Die Zentromerregion und der Kinetochoraufbau

In höheren Eukaryoten bleiben die Schwesterchromatiden bis zu ihrer Trennung in der Anaphase in der Zentromerregion der DNA über den Kohäsion-Komplex miteinander verbunden. Diese spezifische DNA-Region, das Zentromer, spielt für den Prozess der Chromosomenseparation eine sehr wichtige Rolle. Beim Zentromer handelt es sich um den DNA-Bereich, an welchem sich das Kinetochor ausbildet. Das Kinetochor wiederum ist ein Multiproteinkomplex, der die Verbindung zwischen dem Spindelapparat und den zu trennenden Schwesterchromatiden herstellt. Ausgehend vom Präkinetochor-Komplex etabliert sich ein funktionelles Kinetochor im Verlauf der Pro- beziehungsweise Prometaphase.

Das Kinetochor von höheren Eukaryoten untergliedert sich elektronenmikroskopisch in eine innere Platte, eine äußere Platte und eine Interzone, die beide Platten voneinander trennt (Als Übersichtsartikel siehe Maney et al. 2000). Die innere Platte steht im direkten Kontakt zur zentromeren DNA, wohingegen an der äußeren Platte im Verlauf der Metaphase die Spindelmikrotubuli binden.

Bei den am Kinetochoraufbau beteiligten Proteinen wird zwischen konstitutiven und fakultativ assoziierten Proteinen unterschieden. Die konstitutiven Kinetochorkomponenten spielen beim Aufbau eines funktionellen Kinetochors eine essentielle Rolle. Sie sind während der Interphase am Präkinetochor und im Verlauf der Mitose an der inneren Kinetochorplatte identifizierbar. Fakultative Kinetochorproteine, die eine Funktion am Spindelkontrollpunkt, bei der Mikrotubuli-Anbindung und der Chromosomen-Bewegung haben, binden im Verlauf der Mitose an das Präkinetochor. Dies führt über die Ausbildung der äußeren Platte zur Etablierung eines funktionellen Kinetochors.

Beim Spindelkontrollpunkt handelt es sich um einen Kontrollmechanismus, der sicherstellt, dass alle zu trennenden Chromosomen mit dem Spindelapparat verbunden sind. Als

wichtige Komponenten dieses Kontrollapparates sind Mad2 (mitotic arrest deficient) und BubR1 (budding uninhibited by benzimidazoles related) zu nennen (als Übersichtsartikel siehe Shah und Cleveland 2000; Hoyt 2001). Sowohl Mad2 als auch BubR1 fungieren als inhibitorische Untereinheit einer spezifischen Ubiquitinligase, dem APC (anaphase-promoting-complex)/C (Cyclosom)-Komplex (Irniger et al. 1995; King et al. 1995; Sudakin et al. 1995). Der APC/C-Komplex ist verantwortlich für die Polyubiquitinylierung von mitotischen Zielproteinen, wie mitotischen Cyclinen oder dem Anaphasen-Inhibitor (Securin). Diese Polyubiquitinylierung dient als Markierung für die Degradation durch das Proteasom. Sind alle Chromosomen korrekt mit dem Spindelapparat verbunden, so wird der APC im Verlauf der Mitose aktiviert und sorgt über die Polyubiquitinylierung der Zielproteine für das weitere Voranschreiten der Mitose. Die genetische oder biochemische Inaktivierung des APC/C-Komplexes stoppt in der Mitose, noch bevor die Schwesterchromatiden in der Anaphase getrennt wurden (Holloway et al. 1993, Irniger et al. 1995, Tugendreich et al. 1995): Dies zeigt, dass der APC zur Einleitung der Anaphase notwendig ist.

3.5 Der mitotische Spindelapparat

Im Verlauf der Prometaphase/Metaphase kommt es zur Anheftung des Spindelapparats an die bipolar ausgerichteten Kinetochore. Erst wenn alle Chromosomen korrekt mit dem Spindelapparat verbunden sind, gibt der Spindel-Kontrollpunkt das Signal zur Trennung der Schwesterchromatiden. Für diesen Trennungsprozess sind die Spindelpole sowie der mitotische Spindelapparat von essentieller Bedeutung (als Übersichtsartikel siehe Karsenti und Vernos 2001; Wittmann et al. 2001). Das Organisationszentrum der mitotischen Spindel wird in tierischen Zellen als Zentrosom oder allgemein als Spindelpol bezeichnet. Zum Zeitpunkt der DNA-Replikation erfolgt auch die Duplikation des Zentrosoms. Diese verdoppelten Multiproteinkomplexe wandern im Verlauf der Prophase um den Kern und positionieren sich auf gegenüberliegenden Seiten. Ausgehend vom Zentrosom bilden sich dann Mikrotubulifasern, die asymmetrisch auf die Chromosomen zuwachsen. Am Ende dieses Prozesses steht der fertig ausgebildete mitotische Spindelapparat, der alle zu trennenden Schwesterchromatiden mit dem Spindelpol verbunden hat (Abb. 3-2).

3.6 Die mitotische Schwesterchromatidentrennung

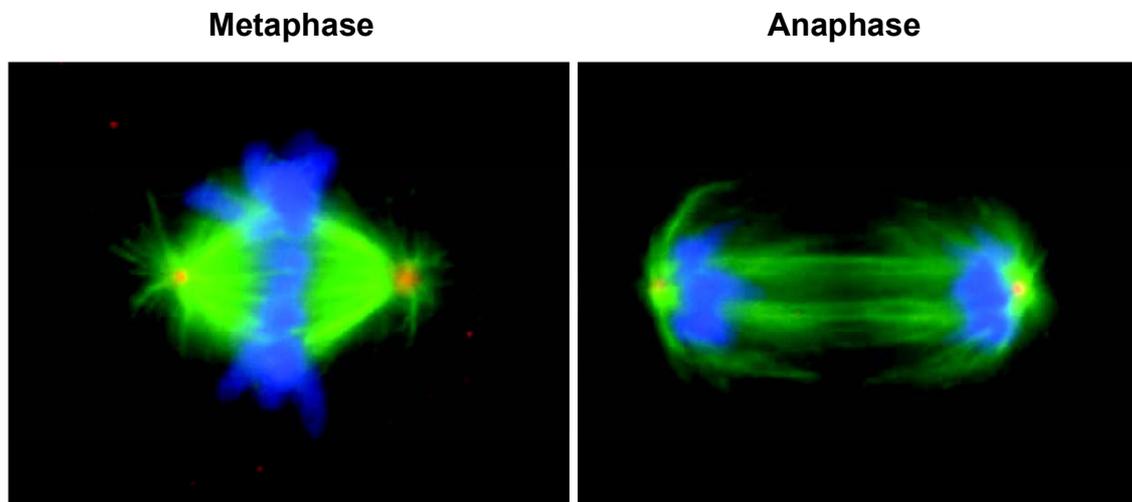


Abbildung 3-2: Darstellung einer Metaphase und Anaphase in Zellkulturzellen.

In der Metaphase sind die Chromosomen (blau) in der Äquatorialebene angeordnet. Die mitotische Spindel (grün), die sich ausgehend vom Zentrosom (rot) in der Prometaphase/Metaphase bildet, bindet an den aktiven Zentromer/Kinetochor-Komplex der Chromosomen. Wenn alle Chromosomen korrekt mit dem Spindelapparat verbunden sind, wird die Anaphase eingeleitet. Hierbei werden die getrennten Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten Spindelpolen gezogen (Abbildung aus Nasmyth, 2002).

Die Separation der Schwesterchromatiden erfolgt in Vielzellern in zwei Schritten. Beim ersten Schritt wird während der Pro-/Prometaphase der Großteil der Armkohäsion der Schwesterchromatiden gelöst. Beim zweiten und entscheidenden Schritt werden am Metaphasen/Anaphasen-Übergang die noch verbliebenen Verbindungen zwischen den Schwesterchromatiden gelöst, was deren sofortige Trennung zur Folge hat (Abb. 3-2; als Übersichtsartikel siehe Nasmyth et al. 2000, Nasmyth 2001).

Schon seit langer Zeit ist klar, dass die Dekatenierung durch die Topoisomerase II, das heißt die Auflösung der mechanischen Verwindungen, die im Verlauf der Replikation zwischen den Schwesterchromatiden entstanden sind, einen Beitrag zur Trennung der Schwesterchromatiden leistet. Die Topoisomerase II ist hierbei sowohl bei der Lösung der Armkohäsion im Verlauf der Prophase, als auch beim Separationsprozess während der Anaphase wichtig (Gimenez-Abian et al. 2000, Downes et al. 1991; Dinardo et al. 1984). Neben der Dekatenierung durch die Topoisomerase II spielt aber auch die Proteindegradation eine essentielle Rolle für die Separation der Schwesterchromatiden. Dies ist zum einen der APC/C-vermittelte Abbau des Securins und zum anderen die Spaltung der Kohäsionseinheit Scc1.

Das bislang detaillierteste, molekular charakterisierte Modell der Separation der Schwesterchromatiden stammt aus Untersuchungen an *S. cerevisiae*. Hier konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass der Trennung der Schwesterchromatiden die Spaltung des Kohäsionsbestandteils Scc1 am Metaphasen/Anaphasen-Übergang vorausgeht (Uhlmann et al. 1999). Verantwortlich für diese Spaltung ist die Protease Esp1 (extra spindle pole bodies). Sowohl *in vitro*-, als auch *in vivo*-Experimente ergaben, dass Scc1 ein direktes Substrat dieser Protease ist (Uhlmann et al. 1999; 2000). Esp1 kann Scc1 an zwei Positionen, die auf Aminosäureebene sehr ähnlich sind, spalten (Uhlmann et al. 1999). Die Expression von nicht spaltbarem Scc1, bei dem beide Spaltstellen mutiert wurden, verhinderte die Trennung der Schwesterchromatiden (Uhlmann et al. 2000). Um in der Folge zu beweisen, dass die Spaltung von Scc1 eine notwendige Bedingung für den Trennungsprozess ist, wurde eine Scc1-Variante hergestellt, in der eine Esp1-Spaltstelle durch eine Spaltstelle für die Protease des Tabak-Etch-Virus (TEV) ersetzt wurde. Erfolgte in Metaphase-arretierten Zellen mit dieser Scc1-Variante eine Koexpression der TEV-Protease, so war dies zur Einleitung der Anaphase ausreichend (Uhlmann et al. 2000). Durch diesen Ansatz konnte somit gezeigt werden, dass die Spaltung von Scc1 in *S. cerevisiae* sowohl notwendig, als auch ausreichend für die Separation der Schwesterchromatiden ist.

Untersuchungen in weiteren Organismen deuten darauf hin, dass es sich beim Prozess der Trennung der Schwesterchromatiden um einen evolutionär konservierten Vorgang handelt. In *Schizosaccharomyces pombe* konnte gezeigt werden, dass der Separationsprozess nur dann erfolgt, wenn Cut1 (cell untimely torn), ein zu Esp1 homologes Protein, das Scc1-Ortholog Rad21 spaltet (Tomonaga et al. 2000). Auch in den Vertebraten erfolgt die Spaltung von Scc1. Das humane Scc1 wird am Metaphasen/Anaphasen-Übergang gespalten (Waizenegger et al. 2000). Diese Spaltung scheint essentiell für den Separationsprozess zu sein, da in humanen Zellen, die nicht spaltbares SCC1 exprimieren die Anaphase inhibiert ist (Hauf et al. 2001).

Ein entscheidender Unterschied zwischen *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten besteht, wie bereits zuvor angesprochen, im Kohäsionsprozess. Sowohl in *D. melanogaster* als auch in humaner Zellkultur konnte gezeigt werden, dass an Metaphasechromosomen nur noch ein sehr geringer Anteil der ursprünglich mit dem Chromosom assoziierten Kohäsionskomplexe vorhanden ist. Dieser verbleibende Anteil ist auf den Bereich des Zentromers begrenzt (Waizenegger et al. 2000; Warren et al. 2000). Experimente an *X. laevis* und humaner Zellkultur ergaben, dass es im Verlauf der Prophase zur Abdissoziation des Hauptanteils der Kohäsions-Komplexe vom Chromosom kommt (Losada et al. 1998; Sumara et al. 2000). Im Gegensatz zu den Vorgängen am Metaphasen/Anaphasen-Übergang ist dieser Vorgang jedoch Separase-unabhängig. Entscheidend hierfür ist vielmehr eine Kinase-abhängige Phosphorylierung der Kohäsions-Komplexe (Sumara et al. 2002). Sie verursacht eine

verminderte Affinität der Kohäsion-Komplexe zur DNA, worauf diese vom Chromatin abdissoziieren (Sumara et al. 2002).

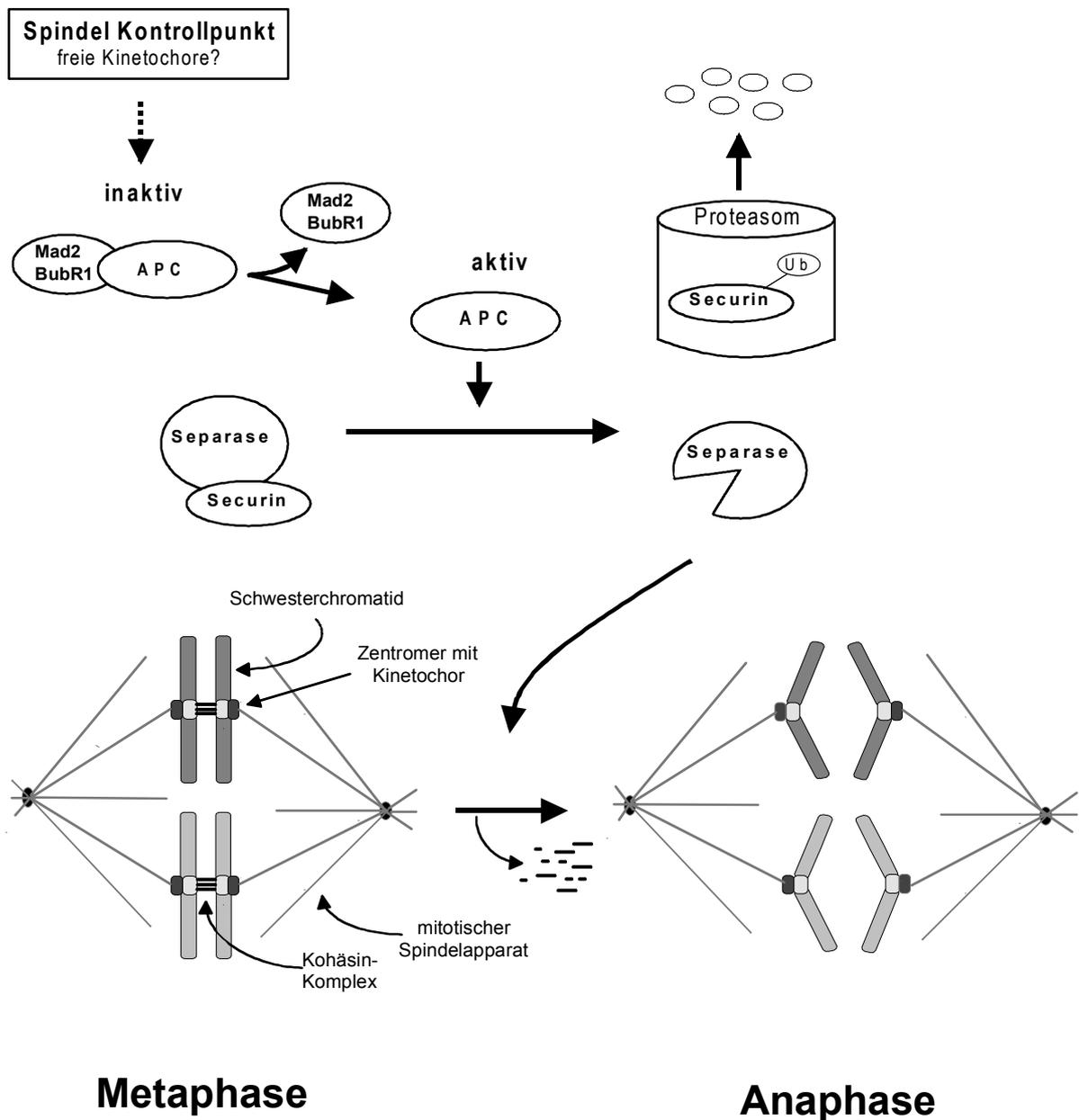


Abbildung 3-3: Modell der Schwesterchromatidentrennung in höheren Eukaryoten.

Die Schwesterchromatiden der Metaphasechromosomen sind über den Kohäsion-Komplex miteinander verbunden. Die Kohäsion der Metaphasechromosomen ist auf die zentromere Region begrenzt. Sind alle Kinetochore der Chromosomen bipolar mit dem mitotischen Spindelapparat verbunden, so wird der Spindelkontrollpunkt aufgehoben. Die Kontrollpunkt-Komponente Mad2 beziehungsweise BubR1 gibt den APC/C-Komplex frei, der dann in der aktivierten Form das Securin polyubiquitinyliert. Der Proteasom-vermittelte Abbau des ubiquitinylierten Securins hat die Aktivierung der Separase zur Folge. Diese aktive Separase spaltet die SCC1-Kohäsionseinheit der am Zentromer verbliebenen Kohäsion-Komplexe und leitet somit die Anaphase ein. Im Verlauf der Anaphase werden die Schwesterchromatiden durch den mitotischen Spindelapparat zu den entgegengesetzten Spindelpolen gezogen.

3.7 Die Proteinfamilie der Separasen

In allen bisher sequenzierten eukaryotischen Genomen konnten Gene identifiziert werden, deren abgeleitete Proteinsequenzen Ähnlichkeit zu Esp1 aus *S. cerevisiae* aufweisen. Diese Tatsache und der Nachweis der proteolytischen Aktivität von Esp1 führten dazu, dass die Esp1-Orthologen zur Familie der Separasen zusammengefasst wurden. Die Mitglieder der Separase-Familie sind 150-230 kDa groß und besitzen als charakteristisches Merkmal die C-terminal lokalisierte, konservierte Proteasedomäne. In dieser Domäne sind neben den katalytischen Resten Histidin und Cystein vor allem die hieran direkt angrenzenden kleinen Glycin- und Serinreste sehr konserviert. Die Sekundärstrukturvorhersagen für die jeweils N-terminal an die Glycin- beziehungsweise Serinreste angrenzenden Aminosäuresequenzen ergeben hydrophobe β -Faltblattstrukturen (Abb. 3-4). Diese Anordnung der Sekundärstrukturelemente ist charakteristisch für Cystein-Endoproteasen der CD-Familie, wozu folglich auch die Separasen zu rechnen sind. Weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie sind die bakteriellen Proteasen Legumain und Gingipain und die Gruppe der Caspasen (Uhlmann et al. 2000).

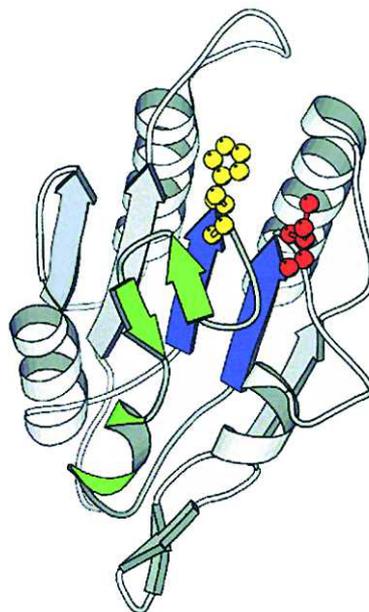


Abbildung 3-4: Struktur der katalytischen Domäne von Gingipain.

Die Abbildung zeigt die katalytische Region von Gingipain (Eichinger et al. 1999). Sie dient als Model für Mitglieder der Separasen. Die katalytischen Reste Histidin und Cystein sind in gelb beziehungsweise rot dargestellt. Die hydrophoben parallelen β -Faltblattstränge auf der N-terminalen Seite der katalytischen Reste sind in blau dargestellt. Die Polypeptidkette zwischen diesen beiden Strängen ist grün markiert. (Abbildung aus Uhlmann et al. 2000)

Als Zielproteine der Separasen konnten neben dem schon erwähnten Scc1 in *S. cerevisiae* noch weitere Substrate identifiziert werden. Die Separase-Schnittstellen in diesen Zielproteinen sind weitestgehend konserviert. Der proteolytische Schnitt erfolgt nach einem konservierten Arginin (im Konsensus als Position 1=P1 bezeichnet). Der abgeleitete Konsensus für eine Separase-Schnittstelle weist neben dem Arginin an P1, an P4 ein Glutamat oder aber in seltenen Fällen ein Aspartat und an P6 oftmals ein Serin auf (Nasmyth 2001).

3.8 Die Regulation der Separaseaktivität

Aufgrund der Erkenntnisse aus *S. cerevisiae* ist klar, dass der Separase eine Schlüsselrolle im Prozess der Separation der Schwesterchromatiden zukommt. Sie darf erst dann aktiviert werden, wenn alle Chromatiden korrekt mit dem Spindelapparat verbunden sind. Die ersten Untersuchungen über die Regulation der Separase stammen wiederum aus der Hefe. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Separase (Esp1) bis zum Metaphasen/Anaphasen-Übergang in einem Komplex mit dem Protein Pds1 (preocious dissociation of sister chromatids) vorliegt (Ciosk et al. 1998). Hierbei handelt es sich um die inhibitorische Untereinheit der Separase. Auch in anderen Organismen wie *S. pombe* und *H. sapiens* konnten die inhibitorischen Untereinheiten der Separase identifiziert werden, die zur Proteinklasse der Securine zusammengefasst wurden.

Wird das Securin (Pds1) am Metaphasen/Anaphasen-Übergang proteolytisch abgebaut, so resultiert daraus die aktive Separase (Uhlmann et al. 2000). Diese aktivierte Separase spaltet die Kohäsion-Untereinheit Scc1 wodurch die Schwesterchromatiden voneinander getrennt werden (Uhlmann et al. 2000). Der Zeitpunkt des Abbaus von Pds1 wird durch eine Ubiquitinligase, den APC/C-Komplex reguliert (Cohen-Fix et al. 1996). Dieser Komplex polyubiquitinyliert seine Zielproteine und markiert sie damit für den Proteasom-vermittelten Abbau (Irniger et al. 1995; King et al. 1995; Sudakin et al. 1995). Als Erkennungsmerkmal für die Ubiquitinligase dient zum einen die D-Box (destruction-box) und zum anderen das sogenannte KEN-Motiv (Glutzer et al. 1991; Pfleger und Kirschner 2000). Diese beiden Motive werden von zwei unterschiedlichen aktivierenden Untereinheiten des APC/C-Komplexes erkannt (Als Übersichtsartikel siehe Peters 2002). Es handelt sich hierbei um Cdc20 (cell division cycle)/Fizzy sowie Cdh1 (Cdc20 homolog)/Fizzy related. Die aktivierende Untereinheit Cdc20/Fizzy ist für die mitotische Aktivität des APC/C-Komplexes verantwortlich und somit auch für die Securin-Degradation am Metaphasen/Anaphasen-Übergang. Während des Austritts aus der Mitose wird Cdc20/Fizzy durch Cdh1/Fizzy related

ersetzt. Dies sorgt dafür, dass der APC/C-Komplex bis zum G1/S-Übergang weiterhin aktiv bleibt.

Die Securin-Degradation aus *S. cerevisiae* lässt sich auch auf weitere Modellorganismen übertragen. Die Securine aus *S. pombe* (Cut2) und *H. sapiens* (Pttg, pituitary tumor transforming gene) werden am Metaphasen/Anaphasen-Übergang über den APC/C-Komplex polyubiquitinyliert und damit über das Proteasom abgebaut (Funabiki et al. 1996b; Zou et al. 1999). Der molekulare Aufbau der bisher identifizierten Securine in den unterschiedlichen Spezies zeigt zusätzliche Gemeinsamkeiten. Die Securine sind mit einem Molekulargewicht von 23-42 kDa recht klein und bestehen aus einer basischen N-terminalen und einer sauren C-terminalen Hälfte. Auf der Ebene der Primärstrukturen können jedoch mit Ausnahme der APC/C-Erkennungsmerkmale keine weiteren Sequenzübereinstimmungen festgestellt werden.

Überraschenderweise führt die Deletion der Securin-kodierenden Gene weder in *S. cerevisiae* noch in humaner Zellkultur zur Letalität (Yamamoto et al. 1996; Jallepalli et al. 2001). Dies deutet darauf hin, dass es zumindest in diesen, wenn nicht allen eukaryotischen Organismen, weitere Kontrollmechanismen der Separase-vermittelten Scc1-Spaltung geben muss. Für *X. laevis* konnte kürzlich gezeigt werden, dass der CDK1 (Cyclin-dependent kinase)/Cyclin B Komplex über die Phosphorylierung der Separase zu deren Inaktivierung beiträgt (Stemmann et al. 2001). Dieses Resultat erklärt die Beobachtung, dass in Oocyten-Extrakten aus *X. laevis* mit nicht degradierbarem Cyclin B die Trennung der Schwesterchromatiden unterbleibt (Stemmann et al. 2001). Ein weiterer potentieller Regulationsmechanismus betrifft die Spaltung der Separase. Beobachtungen an humaner Zellkultur zeigen, dass die Separase etwa zu Beginn der Anaphase in zwei Fragmente gespalten wird (Waizenegger et al. 2000; Stemmann et al. 2001). Eine Regulation auf Substratebene konnte in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Hierbei wird Scc1 mitotisch phosphoryliert, was dafür sorgt, dass die Separase-induzierte Scc1-Spaltung mit erhöhter Effizienz erfolgt (Alexandru et al. 2001).

3.9 Die Schwesterchromatidentrennung in *D. melanogaster*

In *D. melanogaster* sind in zwei Genen Mutationen beschrieben, bei denen die mitotische Trennung der Schwesterchromatiden unterbleibt (D'Andrea et al. 1993; Philp et al. 1993; Stratmann und Lehner 1996). Es handelt sich hierbei um *pimples* (*pim*) und *three rows* (*thr*). Mutante Allele der beiden Gene wurden ursprünglich in einem EMS-Mutagenese-Screen nach rezessiven, zygotisch letalen Mutanten mit einem kutikulären Phänotyp identifiziert (Nüsslein-Volhard et al. 1984). Der Phänotyp von *pim*- sowie *thr*-mutanten Embryonen ist bereits früh in der Embryonalentwicklung nachweisbar. Als deutliches Charakteristikum lassen sich in mitotischen Zellen bei beiden Mutanten Diplo- und Quadrupelchromosomen identifizieren, das heißt Chromosomen, die die doppelte oder vierfache Anzahl an Chromatiden aufweisen (Stratmann und Lehner 1996). Diese artifiziellen Metaphasechromosomen werden an der zentromeren DNA-Region zusammengehalten.

Da aus anderen Spezies bekannt ist, dass die Securine und die Separasen entscheidende Komponenten bei der Separation der Schwesterchromatiden sind, kann vermutet werden, dass PIM und THR die entsprechenden Vertreter in *D. melanogaster* darstellen. Das PIM-Protein ist mit 199 Aminosäuren (AS) relativ klein. Es zeigt einen bipolaren Aufbau mit einer basischen N-terminalen und einer sauren C-terminalen Hälfte. Aus Immunfluoreszenz- sowie Western-Blot-Daten geht hervor, dass am Übergang der Metaphase zur Anaphase PIM proteolytisch abgebaut wird (Stratmann und Lehner 1996; Leismann et al. 2000; Herzig et al. 2002). Dieser Abbau ist für die Separation der Schwesterchromatiden essentiell, da die ektopische Expression einer stabilen PIM-Variante, bei der kein mitotischer Abbau mehr erfolgen sollte, zur Hemmung des Separationsprozesses führt (Leismann et al. 2000). *In vivo*-Interaktionsstudien haben gezeigt, dass PIM des Weiteren auch mit THR assoziiert (Leismann et al. 2000). Diese Daten zeigen, dass PIM deutliche Parallelen zur Proteinfamilie der Securine aufweist. Bei THR handelt es sich um ein mit 1379 AS recht großes Protein. Die *in vivo*-Interaktion zu PIM lässt vermuten, dass THR die Funktion der Separase übernimmt. Jedoch konnten mit Datenbankanalysen weder Sequenzübereinstimmungen zu bekannten Separasen noch zu weiteren Proteinen in anderen Spezies identifiziert werden.

3.10 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit stand die Identifizierung und die molekulare Charakterisierung der Separase aus *D. melanogaster* im Mittelpunkt. Da in *S. cerevisiae* bereits gezeigt werden konnte, dass die Separase essentiell an der Trennung der Schwesterchromatiden beteiligt ist, stellte sich die Frage, ob dies auch auf den Modellorganismus *Drosophila* übertragbar ist. Hierzu wurden zytologische Analysen mit mutanten Allelen durchgeführt.

Auch die Interaktionen zwischen der *Drosophila* Separase mit den Proteinen PIM, dem *Drosophila* Securin, und THR waren von besonderem Interesse. Wie bereits beschrieben, ist die Interaktion zwischen der Separase und dem Securin ein entscheidender Aspekt der Separase-Regulation. Da THR bisher nur in *Drosophila* identifiziert wurde, blieb weiterhin die Frage zu beantworten, welche zusätzliche Funktion THR im Prozess der Separation der Schwesterchromatiden wahrnimmt.

Über Interaktionsstudien war es möglich ein Modell der Separase-Komplexe zu entwerfen, das die Grundlage für den zweiten Teil dieser Arbeit darstellte. Der inaktive Separase-Komplex aus *S. cerevisiae* besteht aus dem binären Komplex der Separase mit dem Securin. Aus dem Abbau des Securins resultiert eine aktive Separase. Da in *D. melanogaster* neben der hier charakterisierten Separase und PIM auch noch THR in den Separase-Komplex eingebunden ist, unterscheidet sich der Aufbau der Separase-Komplexe zwischen *S. cerevisiae* und *D. melanogaster*. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die Grundlagen für die ternäre Struktur des *D. melanogaster* Separase-Komplexes, also die drei getrennten Gene *pim*, *thr* und *Sse*, auch in anderen *Drosophiliden* identifizierbar sind. Darüber hinaus sollte über Two-Hybrid-Interaktionsstudien in der Hefe abgeklärt werden, ob sich zwischen *Drosophila* und Mensch Parallelen in den Wechselwirkungen zwischen den Partnern im Separase-Komplex auffinden lassen.

4. Materialien und Methoden

4.1 Standardmethoden

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die molekularbiologischen Methoden den Angaben in Sambrook et al. (1989), Ausubel et al. (1998) sowie Harlow und Lane (1988) folgend durchgeführt. Die, für die Klonierungen verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie die weiteren Standardenzyme (T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, Klenow-Fragment und Mung-Bean-Nuklease) stammten von Roche beziehungsweise New England Biolabs (NEB). Die Enzyme wurden entsprechend den Angaben der Hersteller verwendet.

Die PCR-Reaktionen erfolgten entweder mit der Taq-Polymerase (Roche), der Pfu-Polymerase (Promega) oder mit dem Expand-Long-Template-PCR-System (Roche). Die Präparation von Plasmid DNA wurde entweder im kleinen Maßstab mit dem QIApräp-Miniprep-Kit (Qiagen) oder für größere Mengen mit dem QIAfilter-Plasmid-Mid-Kits (Qiagen) durchgeführt. Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen diente der Qiaex-II Gelelutionskit (Qiagen) Die Transformation der Plasmid-Konstrukte erfolgte entweder über die Elektroporation in *Escherichia coli* DH10B mit dem Genepulser (Biorad, Bedingungen: Genepulser 25 μ F; 2,5 kV; 200 Ω) oder über Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue. Die Sequenzierungen der hergestellten Konstrukte beziehungsweise PCR-Amplifikate wurden entweder bei der Firma, Medigenomix oder bei MWG-Biotech durchgeführt.

4.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden von der Firma MWG-Biotech hergestellt.

DmEsp1	5'-GCCAAGATCTATGCTGGAAACCGGTGACGA-3'
DmEsp2	5'-CGCTCGAGTCACTATAAAGGCAGCTTTTC-3'
DmEsp3	5'-GGATTCATATGCTGGAAACCGGTGAC-3'
DmEsp6	5'-TGCACCGGTTCTGCTGCTAGATACCCATAC-3'
DmEsp7	5'-TGCACCGGTTTCCAGCATGCTAGAAGCGTAATCTG-3'
DmEsp16	5'-CATGCGTGTAGAATCGGAGCCGAATAGAAAAAC-3'

DmEsp18 5'-GTTTTTCTATTCGGCTCCGATTCTACACGCATG-3'

MalRec12 5'-CATGCCATGGATATAAACCTCGTGGGAC-3'

Die DmEsp Oligonukleotide und MalRec12 dienen zur PCR-Amplifikation von *D. melanogaster* Sse-Fragmenten.

JK39 5'-ATGCGCTCCATCCTTATTGATTGG-3'

CL82 5'-CTCTGGGGGATAGATTTCTCGTAT-3'

Die Oligonukleotidkombination JK39/CL82 diene als interne PCR-Kontrolle zur Amplifikation eines *Cyclin A*-Fragments.

SH26 5'-CGCAGGTCACGGTTCTGGGC-3'

SH27 5'-CGTGTAGAATCGCAGCCGAATAG-3'

Die Oligonukleotide SH26 und SH27 dienen nach Markierung mit P³² zur Identifikation von Sse-cDNA-Klonen aus einer *D. melanogaster* cDNA-Bibliothek.

DvSse2 5'-CCGGAATTCGACAACGCCCTTGATGCGAT-3'

DvSse3 5'-TGCTCTAGATTGGCTGCGATTGACGCG-3'

DvSse14 5'-CCGGAATTCATGTTTGACGCCGAAGCAAC-3'

DvSse15 5'-CGCGGATTCCTACTAAAAGGGCAGCTGCTGCAC-3'

DvSse17 5'-CGCGGATCCTCACTTCAAGAACTCTTCAAAGGC-3'

Die DvSse-Oligonukleotide dienen zur PCR-Amplifikation des zu Sse-orthologen Genbereichs aus *Drosophila virilis* und zur Amplifikation von DvSse cDNA-Amplifikaten.

DvThr7 5'-CCGGAATTCATGTCACTGGGAGATGTGAA-3'

DvThr8 5'-TGCGGTGCGACTCATCAGTTCCTGTGGCGACG-3'

DvThr13 5'-TGCGGTGCGACTCAGCGCACCATGTCACCCAG-3'

Die DvThr-Oligonukleotide dienen zur PCR-Amplifikation von *Dvthr* cDNA-Amplifikaten.

DwSse2 5'-CCGGAATTCCTATGCCCTCAACGCGACA-3'

DwSse3 5'-TGCTCTAGACAGGCTTGCATAGTGCCCT-3'

DwSse10 5'-GGATTCCATATGATGGAATAATGGACAGTCTT-3'

DwSse11 5'-TGCGGTGCGACTCACTAAAAGGCATTTTCTGG-3'

DwSse13 5'-TGCGGTGCGACTCAAGCACTTTACCAAACCTC-3'

Die DwSse-Oligonukleotide dienen zur PCR-Amplifikation des zu Sse-orthologen Genbereichs aus *Drosophila willistoni* und zur Amplifikation von DwSse cDNA-Amplifikaten.

HsSse1 5'-GGATTCCATATGGAGGCACCATCACCCCA-3'

HsSse2 5'-TGCGGTCTGACTCATTACCGCAGAGAGACAGG-3'
 HsSse3 5'-TGCGGTCTGACTCATTGGGCACAGAGCTGCTC-3'
 HsSse4 5'-GGATTCCATATGGGCTGGCAGACACCTGAG-3'
 HsSse5 5'-TGCGGTCTGACTCATGAGGCTGAGTCTTCCCC-3'
 HsSse7 5'-TGCGGTCTGACTCAATACAAATCATGCTTTGTCAGG-3'
 HsSse8 5'-GGATTCCATATGAGGAGCTTCAAAAGAGTCAAC-3'
 HsSse9 5'-TGCGGTCTGACTCAACTCTTGCTCAGGACAGCTG-3'

Die Oligonukleotide HsSse1-HsSse9 dienen zur PCR-Amplifikation von humanen *Separase*-Deletionsvarianten.

HsPttg1 5'-GGATTCCATATGGCTACTCTGATCTATGTT-3'
 HsPttg2 5'-ACCGCTCGAGTCATTAAATATCTATGTCACAGCAAAC-3'
 HsPttg3 5'-ACCGCTCGAGTCAAACAGAGCTTTTTGCTTTAAC-3'
 HsPttg4 5'-GGATTCCATATGCCTGCCTCAGATGATGCC-3'

Die Oligonukleotide HsPttg1-HsPttg4 dienen zur PCR-Amplifikation humaner *Pttg*-Konstrukte.

HuJ1 5'-CGCGGATCCACIATG(CT)TIGA(AG)TT(CT)CA(AG)GA-3'
 HuJ2 5'-CCGCTCGAGATCCA(AG)TCIA(AG)IGCCAT-3'

Die degenerierten Oligonukleotide HuJ1/HuJ2 dienen zur PCR-Amplifikation des zu *CG13139*-orthologen Genbereichs aus *D. virilis*. Sie wurden über den Sequenzvergleich der von *CG13139* und dem humanen Ortholog kodierten Proteinen abgeleitet.

Sep3 5'-CCGCATCGATGGICA(CT)GGITCIGGI(CT)TICA(AG)TA-3'
 Sep5 5'-CTAGCTCGAGA(AG)IGTICCIAC(AGT)ATIGAIGG(AG)CA-3'
 Sep11 5'-CTAGCTCGAGGCICC(AG)TG(AG)TA(AG)TA(AG)TC(AG)TG-3'

Die degenerierten Oligonukleotide Sep3, Sep5 und Sep11 dienen zur PCR-Amplifikation der zu *Sse*-orthologen Genabschnitte aus *D. virilis* und *D. willistoni*. Sie wurden über den Protein-Sequenzvergleich zwischen SSE und weiteren bekannten Separasen abgeleitet.

4.3 Methoden im Umgang mit *Drosophila*

4.3.1 Fliegenhaltung

Die Fliegenhaltung folgte entsprechend den Angaben in Ashburner (1989), Roberts (1986) und Grenspan (1997).

4.3.2 Fliegenstämme

Für die Expression der UAS-Transgene wurden *da-GAL4 G32* (Wodarz et al. 1995), *prd-GAL4* (Brand und Perrimon 1993) und *arm-GAL4* (Sanson et al. 1996) verwendet. *UAS-Cdk1-myc*, bei dem die Expression unter Kontrolle der *arm-GAL4*-Treiberlinien verlief und *gpim-myc* beziehungsweise *gthr-myc*, bei denen die Expression der myc-epitopmarkierten Produkte durch die normale genomische regulatorische Region gesteuert wird, sind bereits beschrieben (Stratmann and Lehner 1996; Leismann et al. 2000). Alle verwendeten myc-epitopmarkierten Produkte können Nullmutationen in den entsprechenden Genen komplementieren.

Die EMS-induzierte rezessive Letalmutation *l(3)13m-281*, die hier als *Sse^{13m}* bezeichnet wird, wurde von M. Gatti (University La Sapienza, Rom) zur Verfügung gestellt. Die ursprüngliche Kartierung von *l(3)13m-281* über meiotische Rekombination ergab einen Insertionsort bei 3-26.6 (Gatti und Baker 1989). Dies entspricht zytologisch der Position 67 auf dem linken Arm des dritten Chromosoms. Genetische Komplementationstests mit Defizienzen, die den *Sse*-Genbereich bei Position 64E deletieren, ergaben, dass *Sse^{13m}* weder durch die Defizienz *Df(3L)SseA* noch durch *Df(3L)ZN47* komplementiert werden konnte. Bei der Defizienz *Df(3L)SseA* handelt es sich um eine, über einen männlichen Rekombinationsansatz, neu hergestellte Defizienz (siehe 4.3.6). Wurden für die Komplementationstests mit *l(3)13m-281* die Defizienzen *Df(3L)h-i22* oder *Df(3L)Scf-R6* herangezogen, so erfolgte hier eine Komplementation, obwohl diese den ursprünglich kartierten Insertionsort der Letalmutation deletieren. Sowohl die *Df(3L)ZN47* als auch die beiden weiteren Defizienzen *Df(3L)h-i22* und *Df(3L)Scf-R6* stammten vom Bloomington Fliegenstamm-Zentrum.

Für die Herstellung von Defizienzen über die Transposon-induzierte, P-Element-abhängige männliche Rekombination wurden die Fliegenstämme (1) *EP(3)0915* (Szeged, *Drosophila* Fliegenstamm-Zentrum), (2) *ve, st, e* (Umea, *Drosophila* Fliegenstamm-Zentrum) und (3) *Bc EIp/CyO, HoP1(w⁺)^d* (O'Kane, 1998) verwendet.

Zur phänotypischen Untersuchung der *Sse*-Funktion dienten weiterhin die transgenen Fliegenstämme *gSse III.1 und III.2*, *UAS-HASse I.1* sowie *UAS-HASse^{C497S} II.1 und II.2*. Die *UAS-Sse* transgene Linie *III.2* wurde für die Charakterisierung der anti-SSE-Antikörper verwendet.

4.3.3 Balancier-Chromosomen

Balancier sind Chromosomen, die zahlreiche Inversionen aufweisen und deshalb nicht mit homologen Chromosomen rekombinieren können. Daneben tragen diese Chromosomen dominante Markermutationen, über die sie identifizierbar sind. Da Balancier-Chromosomen

in den meisten Fällen homozygot letal sind, sind Defizienzen oder homozygot letale Mutationen über ihnen stabil. Als Balancier-Chromosomen zur Etablierung letaler Stämme und Defizienzen diente *CyO*, wenn die Insertion oder Deletion auf dem zweiten Chromosom und *TM3*, wenn sie auf dem dritten Chromosom lokalisiert ist. Diese Balancier-Chromosomen sind beschrieben in Lindsley und Zimm (1992). In dieser Arbeit wurde vor allem das Balancier-Chromosom *TM3, Ser, ActGFP* (Reichhart und Ferrandon, 1998) verwendet. Hierbei ist auf dem Balancier-Chromosom das ActGFP Transgen inseriert. Anhand der vom Actin-Promotor gesteuerten Expression von GFP ist es möglich ab etwa 14 h nach Eiablage Embryonen, oder später Larven zu identifizieren, die GFP positiv sind und somit das Balancier-Chromosom tragen.

4.3.4 Transgene Linien und deren Herstellung

Die P-Element vermittelte Keimbahn-Transformation von *D. melanogaster* Embryonen erfolgte entsprechend den Angaben nach Spradling (1986). Als Transformationsvektoren kam das pP(w^{+mc} , 3xP3-EYFPaf)-Plasmid (Horn und Wimmer 2000) zum Einsatz, das auf dem Vektor pCaSpeR 4 (Pirrota 1988) basiert. Hier erfolgt die Expression des Transgens unter Kontrolle des endogenen Promotors. Die Identifikation von transgenen Individuen kann bei Verwendung von pP(w^{+mc} , 3xP3-EYFPaf) auf zwei Arten erfolgen, über EYFP und über w^{+} . Als weitere Vektoren für die über die *GAL4*-Treiber-Linien gesteuerte Expression wurden pUASP (Rorth 1998) und pUAST (Brand und Perrimon 1993) verwendet.

genomisches Sse-Konstrukt

Zur Klonierung des genomischen *Sse*-Konstruktes wurde ein 5,4 kb *NcoI/EcoRV*-Fragment des 5'-genomischen *Sse*-Bereiches zusammen mit einem 5 kb *EcoRV/HindIII*-Fragment, das den kodierenden Bereich sowie 2,4 kb des 3'-genomischen *Sse*-Bereichs umfasst, in einen *NcoI/HindIII* geöffneten pSLfa1180 (Horn und Wimmer 2000)-Kloniervektor eingesetzt. Das 5'-genomische *Sse*-Fragment wurde über PCR-Amplifikation aus genomischer w^1 *Drosophila* DNA als Matrize und der Kombination der Oligonukleotide MalRec12/DmEsp1 erhalten, und danach mit den Restriktionsenzymen *NcoI/EcoRV* hydrolysiert. Das 5 kb *EcoRV/HindIII*-Fragment, das sowohl den *Sse*-kodierenden Bereich als auch den angrenzenden 3'-genomischen Bereich umfasst, stammt aus einem 5 kb *HindIII*-Fragment. Dieses 5 kb *HindIII*-Fragment wurde aus der DNA eines Phagen, der zuvor aus einer *D. melanogaster* λ -DASH-Bibliothek vereinzelt wurde und den *Sse*-genomischen Bereich umfasst, isoliert. Als Sonde zur Identifizierung des Phagen sowie des Fragments diente ein 465 bp *BamHI/ClaI*-Fragment aus einem zuvor identifizierten kompletten *Sse*-cDNA-Klon.

Zur Klonierung in einen Transformationsvektor wurde der komplette genomische *Sse*-Bereich als 10,4 kb *Ascl*/*FseI*-Fragment in den analog geöffneten pP(w^{+mc}, 3xP3-EYFPaf) eingesetzt.

pUASP-HASse

Zur Herstellung des pUASP-HASse-Konstruktes wurde zuerst das 6xHA-Epitop über PCR mittels der Oligonukleotidkombination DmEsp6/DmEsp7 und der Matrize pWZV90 (Knop et al. 1999) amplifiziert. Das *Age* I hydrolysierte PCR-Amplifikat wurde in einen analog geöffneten *Sse*-cDNA-Klon eingesetzt (Abb. 5-2). Dieser konnte aus einer embryonalen *Drosophila* cDNA-Bibliothek (Brown und Kafatos 1988) mittels der radioaktiv markierten Oligonukleotide SH26 und SH27 isoliert werden. Bei dem Genbankscreen der cDNA-Bibliothek konnten insgesamt sieben unabhängige cDNA-Klone identifiziert werden, von denen zumindest zwei vollständige cDNA-Klone sind. Über *EcoRV*/*NotI* wurde schließlich das *HASse*-Fragment in den *KpnI*/Mung-Bean-Nuklease und weiter über *NotI* geöffneten pUASP-Transformationsvektor eingesetzt. Durch die Mung-Bean-Nuklease Behandlung wurde der *KpnI* Überhang im geöffneten pUASP-Vektor entfernt.

pUASP-HASse^{C497S}

Ausgehend von der Matrize pUASP-HASse wurde über PCR mit dem "Quik-change-site-directed-mutagenesis-kit" (Stratagene) und der Oligokombination DmEsp16/DmEsp18 eine Punktmutation eingeführt. Für die mutagene PCR, die insgesamt 16 Zyklen umfasste, wurden 10 ng pUASP-HASse als Matrize eingesetzt. Die PCR-Amplifikation hatte einen Aminosäureaustausch des katalytisch relevanten Cysteins 497 zum Serin zur Folge. Um den über PCR amplifizierten Anteil im pUASP-HASse^{C497S}-Konstrukt relativ klein zu halten, wurde ein 1,2 kb *KpnI*/*NotI*-Fragment, das den modifizierten Bereich umfasst, im pUASP-HASse Ausgangskonstrukt ausgetauscht.

pUAST-Sse

Zur Klonierung des pUAST-Sse-Konstruktes wurde ein 2,2 kb Fragment, das den kompletten *Sse*-cDNA-Bereich umfasst, über *EcoRV*/*NotI* in den *KpnI*/Mung-Bean-Nuklease behandelten und weiter über *NotI* geöffneten pUAST-Transformationsvektor eingesetzt. Das kodierende 2,2 kb *Sse*-Fragment stammt aus einem vollständigen *Sse*-cDNA-Klon.

4.3.5 Das GAL4/UAS-System

Zur ektoptischen Expression der UAS-Linien wurde das GAL4/UAS-System verwendet (Brand und Perrimon 1993). Diese ektoptische Expression erfolgte in transgenen Linien der

SSE-Varianten, die mit den Vektoren pUASP-HASse, pUASP-HASse^{C497S} und pUAST-Sse erzeugt wurden, sowie in weiteren UAS-Transgenen. Beim GAL4/UAS-System handelt es sich um ein aus zwei Komponenten bestehendes System, bei dem eine *cis*-regulatorische Region und das ektopisch zu exprimierende Gen in unterschiedlichen Stämmen integriert sind. Erst wenn beide Stämme verkreuzt werden, setzt die in *trans* vermittelte Expression des UAS-Transgens ein. Die Funktion des GAL4/UAS-Systems basiert hierbei auf der gewebsspezifischen Expression des GAL4-Transkriptionsfaktors aus Hefe (Treiber). In Gegenwart eines *UAS*-Transgens bindet GAL4 an *UAS* (upstream activating sequence) und aktiviert die Expression des unter *UAS*-Kontrolle stehenden Gens.

4.3.6 Herstellung neuer Defizienzen

männliche Rekombination

Zur Herstellung neuer Defizienzen die den *Sse*-Genbereich deletieren, wurde entsprechend Preston und Engels (1996) beziehungsweise Preston et al. (1996) ein Transposon-induzierter Ansatz gewählt. Hierbei kommt es, über die Mobilisierung eines P-Elements, in männlichen Keimbahnvorläuferzellen zur Induktion eines Rekombinationsereignisses, das in etwa in 1% der Fälle zu beobachten sein sollte. Bei einem Drittel dieser Rekombinationsereignisse sollten Deletionen variabler Größe auftreten, die unmittelbar an das P-Element angrenzen (Preston et al. 1996). Für diese Arbeit waren diejenigen Defizienzen von Interesse, bei denen der *Sse*-Bereich deletiert war. Wenn eine Rekombination induziert wurde, konnte das anhand zweier, das P-Element flankierender, rezessiver Marker identifiziert werden. In diesem Falle wurden die beiden rezessiven Marker *veinlet* (*ve*) und *ebony* (*e*) ausgewählt, deren homozygote Phänotypen sehr gut zu erkennen sind. Werden diese rezessiven Marker homozygot, beeinflussen sie im Falle von *ve* die Flügelvenen und im Falle von *e* die Körperfarbe. Die Kreuzungen waren so angesetzt, dass ein Rekombinationsereignis anhand des Verlusts einer der beiden Marker identifiziert wurde. Bei dem für den Ansatz verwendeten P-Element handelte es sich um *EP(3)0915*, das 5 kb stromaufwärts vom Startkodon von *Sse*, innerhalb des vorhergesagten *CG17334* Genbereichs lokalisiert ist (Abb. 5-1). *CG17334* kodiert für ein potentielles Kälteschock-Protein mit Ähnlichkeit zum heterochronischen *lin-28*-Genprodukt aus *C. elegans*. Da homozygote *EP(3)0915*-Fruchtfliegen sowohl vital als auch fertil sind, kann es sich beim *CG17334*-Genprodukt um kein essentielles Gen handeln. Für den männlichen Rekombinationsansatz wurden zunächst homozygote *EP(3)0915 Drosophila* Jungfrauen mit Männchen des Genotyps *+/CyO, HoP1(w⁺)^d; ve, st, e/TM3, Ser* gekreuzt. *HoP1(w⁺)^d* ist eine Hobo-Transposon-Insertion, die ein Gen für eine P-Element-Transposase enthält, jedoch selber nicht mobilisierbar ist. Von den Nachkommen der Kreuzung wurden 250 männliche

Individuen des Genotyps $+/CyO, HoP1(w^+)^d; EP(3)0915/ve, st, e$ mit 500 Jungfrauen des Markerstammes ve, st, e verkreuzt. Das Rekombinationsereignis sollte in den Keimbahnvorläuferzellen dieser verwendeten Männchen erfolgen, und über die Kreuzung mit den Jungfrauen des Markerstammes ve, st, e war es möglich in der nächsten Generation diese Rekombinanten einfach zu identifizieren.

Insgesamt konnten 233 Rekombinanten unter 40000 Nachkommen identifiziert werden. 71 dieser rekombinanten Individuen waren ve^+, e , was ein Rekombinationsereignis am proximalen Ende von $EP(3)0915$ anzeigt (Preston et al. 1996). Die Rekombinationsereignisse fanden hier also auf der Seite von $EP(3)0915$ statt, auf der auch Sse liegt (Abb. 5-1). Bei der Etablierung stellte sich heraus, dass sechs der 71 ve^+, e -Rekombinanten nicht homozygot wurden und weitere 10 homozygot steril waren. Die Letalität der sechs homozygot letalen ve^+, e -Stämme konnte auch nicht durch die Kreuzung gegen Individuen der Defizienz $Df(3L)ZN47$ komplementiert werden. $Df(3L)ZN47$ deletiert den zytologischen Bereich von 64C bis 65C und somit auch den bei 64E lokalisierten Sse -Genbereich. Die molekulare Bestimmung der Bruchpunkte der letalen ve^+, e -Rekombinanten erfolgte über einen „Plasmid-rescue“-Ansatz. Es stellte sich heraus, dass vier von fünf überprüften Stämmen eine Deletion aufwiesen, die mehr als 100 kb umfasst. Bei der fünften Defizienz ($Df(3L)SseA$) lag eine Deletion von 34 kb vor. Diese deletiert Teile des $CG17334$ Genbereichs, das komplette Sse -Gen und einen Teil des *still life* (*sif*)-Gens (Abb. 5-1). Über *sif* ist bekannt, dass homozygote Individuen einer *sif*-Nullmutation vital sind (Sone et al. 2000). Somit ist die Letalität von $Df(3L)SseA$ sehr wahrscheinlich auf das Fehlen des Sse -Genbereichs zurückzuführen.

Plasmid-rescue

Zur molekularen Charakterisierung der letalen ve^+, e -Rekombinanten wurde ein Plasmid-rescue-Experiment, wie in Pirotta (1986) beschrieben, durchgeführt. Mit diesem Ansatz ist es möglich Sequenzinformationen über die ein P-Element flankierenden genomischen Regionen zu erhalten. Diese Information ermöglicht dann im Vergleich mit der publizierten *Drosophila* Genomsequenz eine genaue Lokalisierung des Bruchpunktes der Defizienzen. Das Plasmid-rescue-Experiment macht sich zu Nutze, dass das ins Genom inserierte P-Element einen bakteriellen Replikationsursprung (OriC-Sequenz) sowie ein Kanamycinresistenzgen besitzt. Da beim Vorgang der Transposon-induzierten männlichen Rekombination das EP-Element intakt bleiben sollte, können Restriktionsfragmente aus genomischer DNA isoliert werden, die sowohl den OriC und die Kanamycinresistenz, als auch flankierende genomische Sequenzen enthalten. Nach Zirkularisierung können diese Fragmente als Plasmide in *E. coli* transformiert werden.

Für den Ansatz wurden 2 µg genomische DNA aus den etablierten, letalen ve^+, e rekombinanten Stämmen mit dem Restriktionsenzym *XhoI* hydrolysiert und nach

Hitzedenaturierung in einem Volumen von 1 ml mit der T4-DNA-Ligase (NEB) ligiert. Nach Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung wurden die Ligationsansätze in *E. coli* DH10B transformiert und auf kanamycinhaltige Agarplatten ausplattiert.

Verifikation, dass der Sse-Bereich in Df(3L)SseA deletiert ist

Die Etablierung von *Df(3L)SseA* über dem Balancier-Chromosom *TM3*, *Ser*, *ActGFP* ermöglichte es, homozygot mutante Larven anhand ihrer fehlenden GFP-Fluoreszenz zu identifizieren. Die aus diesen homozygot defizienten Larven präparierte genomische DNA diente als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotidkombinationen SH26/DmEsp1 und CL82/JK39. Mit diesem Ansatz sollte gezeigt werden, dass der *Sse*-Genbereich in *Df(3L)SseA* vollständig deletiert ist. Das 260 bp große genomische Cyclin A-Amplifikationsprodukt mit der Oligonukleotidkombination CL82/JK39 diente als interne Kontrolle, wohingegen das 580 bp große PCR-Produkt mit der Kombination SH26/DmEsp1 ein 5'-terminales Fragment von *Sse* abdeckte. Zur Präparation der DNA wurden fünf homozygot mutante Larven in 100 µl Lysispuffer (0,1 M EDTA; 1% SDS und 0,1 M Tris/HCl pH 9) homogenisiert und 20 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 14 µl 8 M Kaliumacetat wurde das Gemisch für weitere 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert. Nach Isopropanolfällung des Überstandes und Waschen der pelletierten DNA mit 70%-igem Ethanol wurde die DNA in 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,5; 1 mM EDTA) resuspendiert. Als Matrize für den PCR-Ansatz dienten 2 µl der präparierten genomischen DNA.

4.3.7 Molekulare Charakterisierung des *Sse*^{13m}-Allels

Die molekulare Analyse des *Sse*^{13m}-Allels erfolgte über PCR-Amplifikation mit genomischer DNA aus *Sse*^{13m} homozygot mutanten Larven als Matrize sowie der Oligonukleotidkombination DmEsp1/DmEsp2. Die DNA-Präparation erfolgte entsprechend der Angaben des vorherigen Abschnitts. Da das letale *Sse*^{13m}-Allel über dem Balancier-Chromosom *TM3*, *Ser*, *ActGFP* etabliert wurde, konnten die mutanten Larven wiederum anhand ihrer fehlenden GFP-Fluoreszenz identifiziert werden. Die Sequenzierung klonierter Produkte aus drei unabhängigen Amplifikationsreaktionen ergab in allen drei Fällen eine Deletion von vier bp. Diese Deletion ist sieben bp stromabwärts vom Triplet, das für den essentiellen Histidin Rest der katalytischen Duade kodiert, lokalisiert. Die Deletion bewirkt einen Rasterschub, der zu einem vorzeitigen Abbruch des durch *Sse*^{13m}-kodierte Proteins führt. Die entsprechende C-terminale Sequenz innerhalb von *SSE*^{13m} lautet, beim essentiellen Histidinrest beginnend, HGSGSTTSMVA.

4.3.8 Phänotypische Untersuchungen larvaler Gehirne

Anhand der Bestimmung der Schlüpfraten von Larven des Stammes *Df(3L)SseA/TM3, Ser, ActGFP* ging hervor, dass homozygot mutante Individuen das Larvenstadium erreichen, wobei eine Verpuppung nicht beobachtet werden konnte. Die homozygot mutanten *Df(3L)SseA*-Individuen konnten anhand der fehlenden GFP-Fluoreszenz identifiziert werden. Die Letalität setzt somit im Verlauf der Larvalentwicklung ein.

Aufbau und zeitliche Proliferation innerhalb des larvalen zentralen Nervensystems

Die phänotypischen Analysen von *Sse*-Mutanten erfolgten an Präparationen larvaler *Drosophila* Gehirne. Die Entwicklung zur adulten Fliege verläuft über die Embryogenese, die Larval- und schließlich die Pupalentwicklung. Die Larvalentwicklung untergliedert sich weiter in drei Larvenstadien. Während der Larvalentwicklung findet vor allem innerhalb des zentralen Nervensystems mitotische Proliferation statt, die je nach Larvenstadium und Region des zentralen Nervensystems unterschiedlich stark ausfällt (Abb. 4-1). Zur phänotypischen Untersuchung wurden Gehirne des frühen zweiten sowie des späten dritten Larvenstadiums untersucht. Dies entspricht dem Zeitfenster von 30-38 h für das zweite und 80-92 h für das dritte Larvenstadium (Abb. 4-1).

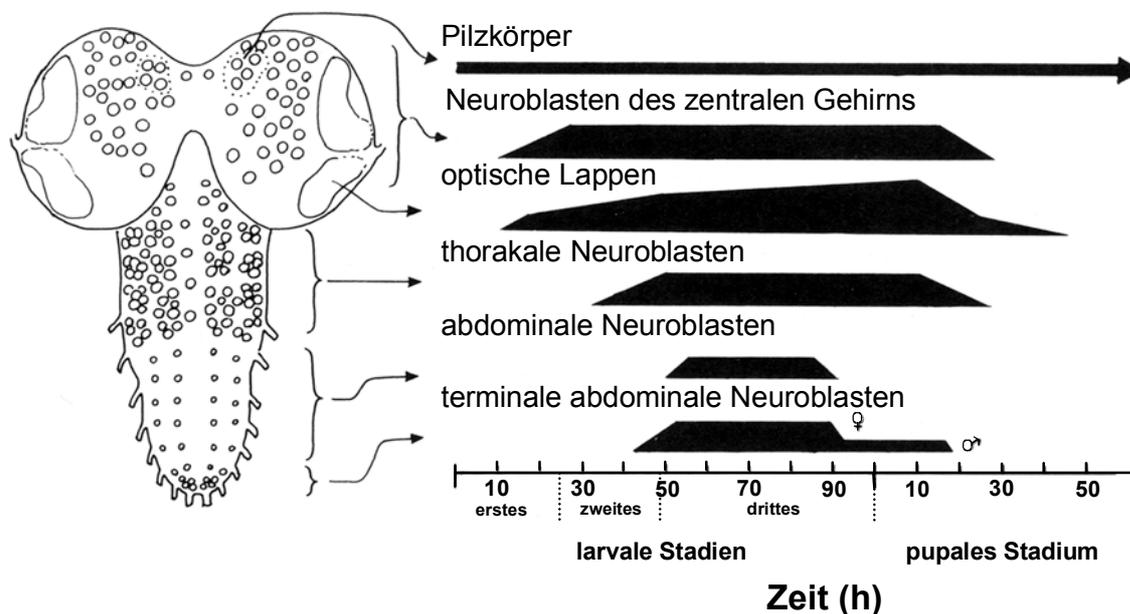


Abbildung 4-1: Proliferation in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems von *Drosophila*.

Im linken Teil der Abbildung ist schematisch das zentrale Nervensystem einer *Drosophila* Larve in dorsaler Ansicht dargestellt. Die Kreise symbolisieren die Neuroblasten. Die schwarzen Balken zeigen die Zeitpunkte und das Ausmaß an Zellteilungen innerhalb verschiedener Regionen des zentralen Nervensystems. Dargestellt sind die Regionen der Pilzkörper, der zentralen Gehirnneuroblasten, der optischen Lappen, der thorakalen Neuroblasten, der abdominalen Neuroblasten und der terminalen abdominalen Neuroblasten. Die Pilzkörper proliferieren vom Zeitpunkt des Schlüpfens der Larve bis zum Ende der Pupalentwicklung. Die terminalen Neuroblasten zeigen ein geschlechtsspezifisches Muster an Zellteilung. Der Zeitpunkt 0 der Zeitskala entspricht dem Schlüpfen der Larve beziehungsweise dem Zeitpunkt der Verpuppung. (Abbildung modifiziert nach Truman et al. 1993).

Untersuchungen der larvalen Gehirne

Zur Untersuchung des zytologischen mutanten Phänotyps wurden Gehirne von Larven des zweiten (30-38 h) sowie des späten dritten Larvenstadiums (80-92 h) präpariert. Die Überprüfung der larvalen Gehirne liegt darin begründet, dass hier mitotische Proliferation stattfindet und der zu erwartende Phänotyp sich vorwiegend auf mitotische Zellen auswirken sollte. Hierbei wurden die Phänotypen von Individuen mit den Genotypen Sse^{13m}/Sse^{13m} und $Df(3L)SseA/Sse^{13m}$ analysiert sowie diejenigen der Mutanten mit dem revertierten Sse^- -Phänotyp $UAS-HASse\ 1.1/+; daGAL4, Df(3L)SseA/Sse^{13m}$. Da alle hier verwendeten Sse -mutanten Stämme über dem $TM3, Ser, ActGFP$ Balancier gehalten wurden, war es möglich die entsprechenden Genotypen anhand der fehlenden GFP-Fluoreszenz zu identifizieren. Nach der Präparation der Gehirne wurden diese wie in Gonzalez und Glover (1993) beschrieben fixiert und für die Immunfluoreszenz gefärbt. Es erfolgte eine Doppelfärbung mit einem anti-Phospho-Histon-H3 Antikörper (Upstate Biotechnology), der in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt wurde sowie mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 zur Färbung der DNA. Der anti-Phospho-Histon-H3 Antikörper ist ein sehr guter Marker für mitotische Zellen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-konjugierter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet (Dianova), der in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt wurde.

Zur Identifikation einzelner Chromosomen wurden Gehirne von Larven der Genotypen $Df(3L)SseA/Sse^{13m}$ und $Df(3L)SseA/TM3, Ser, Act-GFP$ oder $Sse^{13m}/TM3, Ser, Act-GFP$ präpariert und über Quetschpräparationen untersucht. Zunächst wurden die präparierten Gehirne einem hypotonischen Schock ausgesetzt (Pimpinelli et al. 2000). Die anschließende Fixierung sowie die Quetschprozedur und die Anfärbung der DNA mit Hoechst 33258 wurde entsprechend den Angaben von Gonzales und Glover (1993) durchgeführt.

Die Analysen der präparierten und immunfluoreszenzgefärbten Gehirne und der Quetschpräparate erfolgten mit dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss) und die finale Bildbearbeitung mit dem Adobe Photoshop.

4.4 Methoden zur Charakterisierung des SSE-Proteins

4.4.1 Proteinexpression eines bakteriellen SSE-Fragments

Als Immunogen zur Herstellung von anti-SSE-Antikörpern wurde ein in *E. coli* exprimiertes SSE-Fragment verwendet, das N-terminal an das 6xHis-Epitop des Expressionsvektors pQE30 (Qiagen) fusioniert wurde. Das DNA-Fragment, das die abgeleitete SSE-Region AS 1-281 umfasst, wurde über PCR mit der Kombination der Oligonukleotide DmEsp1/DmEsp2 und dem vollständigen *Sse*-cDNA-Klon als Matrize amplifiziert. Durch Restriktionshydrolyse des vollständigen *Sse*-cDNA-Amplifikationsproduktes mit *BglII/KpnI* entstand ein 894 bp großes 5'-terminales Fragment. Dieses *BglII/KpnI* DNA-Fragment wurde in den *BamHI/KpnI* geöffneten pQE30-Expressionsvektor eingesetzt. Da die Sequenz des 894 bp großen Fragments an Position 845 einen Nukleotidaustausch zeigte, der zu einem vorzeitigen Stop führte, entstand hierdurch ein *Sse*-Expressionsvektor, der den N-terminalen SSE-Bereich von AS 1-281 abdeckte. Nach Expression des Fusionsproteins in *E. coli* XL1-blue und anschließendem Ultraschallaufschluß, wurde das in der unlöslichen Fraktion lokalisierte Protein in einem denaturierenden Puffer (6 M Guanidiniumchlorid, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0) solubilisiert. Im nächsten Schritt wurde das Fusionsprotein über eine Ni²⁺-Affinitätssäule (Qiagen) gereinigt und danach gegen 1xPBS dialysiert. Diese Proteinfraction wurde schließlich zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet.

4.4.2 Affinitätsreinigung der anti-SSE-Antikörper

Für die Affinitätsreinigung der anti-SSE-Antikörper aus den finalen Seren der beiden immunisierten Kaninchen wurde das über die Ni²⁺-Affinitätssäule gereinigte N-terminale SSE-Fragment (AS 1-281) verwendet. Jedoch erfolgte zuvor eine neuerliche Aufreinigung über eine Talon-Säule (Clontech). Die Kopplung sowie die Affinitätsreinigung erfolgte weitestgehend wie in Engels (2000) beschrieben. Abweichend hiervon erfolgte die Kopplung von 2 mg des gereinigten Proteins an die BrCN-aktivierte Sepharose-4B (Merck) unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff, 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl).

4.4.3 Proteingele und Immunoblots

SDS-PAGE und Immunoblots wurden im wesentlichen durchgeführt wie in Harlow und Lane (1988) dargestellt. Die Antikörper gegen das humane c-myc-Epitop (monoklonaler Antikörper

9E10, Evan et al. 1985), *Drosophila* Cyclin B (Knoblich und Lehner 1993), PIM (Leismann et al. 2000) und THR (Leismann et al. 2000) wurden bereits früher beschrieben. Zusätzlich wurde auch ein anti-Tubulin-Antikörper (Amersham Biosciences) verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-Maus-IgGs beziehungsweise anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus der Ziege eingesetzt (Jackson Immunoeseach). Der Nachweis der sondierten Immunoblot-Signale erfolgte über ECL-Detektion (Amersham Biosciences).

4.4.4 Charakterisierung der anti-SSE-Antikörper

Die Charakterisierung der affinitätsgereinigten anti-SSE-Antikörper erfolgte sowohl über Immunoblot als auch über Immunofluoreszenz Untersuchungen.

Die Überprüfung, ob die anti-SSE-Antikörper das endogene SSE im Immunoblot erkennen erfolgte mit Extrakten aus 2-4 h alten w^1 -Embryonen und einem Extrakt aus Embryonen gleichen Alters, bei denen *da-GAL4*-getrieben SSE exprimiert wurde (*da>SSE*). Die Alterung der Embryonen wurde erreicht, indem die Weibchen des w^1 -Stammes und der *da>Sse*-Kreuzung ihre Eier bei 25°C für 2 h auf Apfelagarplatten ablegten. Diese Eiablagen wurden dann für weitere 2 h bei 25°C gealtert. Nach dreiminütiger Dechorionisierung der Embryonen in einer 50%-igen Klorix Lösung wurden sie in 4 Volumen Lysispuffer (50 mM HEPES pH 7.5, 60 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,2% Triton X-100, 0,2% Nonidet NP-40, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 2 mM Pefabloc, 2 mM Benzamidin, 10 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Pepstatin A und 10 µg/ml Leupeptin) homogenisiert. Die homogenisierten Proteinextrakte wurden dann mit weiteren Extrakten auf ein Polyacrylamidgel auftragen, gelelektrophoretisch getrennt und anschließend geblottet. Der resultierende Immunoblot diente der Charakterisierung der anti-SSE-Antikörper. Neben den embryonalen Extrakten wurden zur Charakterisierung des Weiteren SSE und THR *in vitro*-Translatate verwendet, die freundlicherweise von Alf Herzig zur Verfügung gestellt wurden. Als Kontrolle wurde ein Mischextrakt aus dem w^1 -Extrakt und dem SSE *in vitro*-Translatat im Verhältnis 1:3 hergestellt. Zusätzlich wurde noch ein bakterieller Extrakt, der aus einer *E.coli* XL1-Blue Kultur, die das N-terminale SSE-Fragment AS 1-281 exprimiert, verwendet. Die Sondierung der Immunoblots erfolgte mit einer 1:3000 Verdünnung des affinitätsgereinigten anti-SSE-Antikörpers 1 (anti-SSE-aff. 1) und mit einer 1:5000 Verdünnung des affinitätsgereinigten anti-SSE-Antikörpers 2 (anti-SSE-aff. 2).

Die Überprüfung der anti-SSE-Antikörper in der Immunofluoreszenz ergab, dass endogenes SSE weder in 4-8 h alten noch in 10-14 h alten w^1 -Embryonen nachgewiesen werden konnte. Wurden im Unterschied dazu jedoch Embryonen untersucht, in denen ektopisch über *prd-GAL4* UAS-SSE exprimiert wurde, so war es mit beiden affinitätsgereinigten anti-SSE-

Antikörpern in einer Verdünnung von 1:300 möglich, ein Signal im *prd*-Streifenmuster zu erkennen. Eine gezielte subzelluläre Lokalisation des überexprimierten SSE-Proteins war nicht feststellbar (Daten nicht gezeigt).

4.4.5 Stabilität des SSE-Proteins während der Embryonalentwicklung

Zur Bestimmung der Proteinstabilität von SSE, PIM und THR wurden embryonale Extrakte aus *w*¹-Embryonen des Alters 0-2 h, 2-4 h, 4-8 h, 8-16 h und 16-24 h hergestellt. Nach Dechorionisierung und Homogenisierung wurden die embryonalen Extrakte mittels Immunoblot untersucht. Die Sondierungen erfolgten mit anti-SSE-aff. 1, anti-PIM, anti-THR und anti-Tubulin.

4.4.6 Koimmunopräzipitation

Für die Koimmunopräzipitation wurden 3-6 h alte Embryonen von (1) *w*¹, (2) *UAS-Cdk1-myc* II.2/*CyO*; *arm-GAL4*, (3) *gpim-myc* 3A oder (4) *gthr-myc* III.1 verwendet. Nach der Dechorionisierung und Homogenisierung wurden die Extrakte dieser Embryonen durch Zentrifugation geklärt. Diese geklärten Extrakte wurden dann für die Immunopräzipitation mit dem Antikörper gegen das myc-Epitop, mit dem anti-SSE-aff. 2-Antikörper oder mit IgGs aus nicht-immunisierten Kaninchen verwendet. Der für die Präzipitation eingesetzte Antikörper gegen das myc-Epitop wurde kovalent an ProteinA-CL4B-Sepharose-Kügelchen (Sigma) gekoppelt. Die Immunopräzipitation mit dem anti-SSE-aff. 2-Antikörper und den IgGs aus nicht-immunisierten Kaninchen erfolgte mit nicht kovalent gekoppelten Protein-A-Sepharose-6MB Kügelchen (Amersham Biosciences). Die Präzipitation und Elution entsprach der Vorgehensweise wie in Herzig (1999) beschrieben. Die Analyse der Immunopräzipitation wurde über Immunoblot durchgeführt. Die Sondierungen des Immunoblots erfolgten mit einem Antikörper gegen das myc-Epitop, mit anti-Cyclin B und mit anti-SSE-aff. 2.

4.5 Identifikation von *pim*-, *thr*- und *Sse*-orthologen Genen

Die Identifikation der orthologen Gene erfolge entweder über das „Screening“ von genomischen Bibliotheken oder über die direkte Identifizierung aus zuvor präparierter genomischer DNA. Als genomische Bibliotheken standen eine Bibliothek aus *D. virilis* (erhalten von Blackman, R., University of Illinois), kloniert in den Lambda-Vektor EMBL3 , aus *Drosophila pseudoobscura* kloniert in den Lambda-Vektor EMBL4 und aus *D. willistoni*

kloniert in den Lambda-Vektor λ -DASH (beide erhalten von Maier D., Universität Hohenheim) zur Verfügung.

Die Identifikation von positiven Phagen, die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten und die Präparation von genomischer *Drosophila* DNA erfolgte wie in Jäger (1999) beschrieben. Die Isolierung von Lambda-Phagen DNA wurde mit dem Qiagen-Midi Lambda-Kit (Qiagen) durchgeführt.

4.5.1 *pim*-Orthologe

pim-orthologe Genbereiche aus Drosophila erecta und Drosophila oreana

Die *pim*-orthologen Gene aus *D. erecta* und *D. oreana* wurden direkt aus genomischer DNA der beiden *Drosophiliden* kloniert. Hierfür folgte vorab eine Southern-Blot-Analyse. Die mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen hydrolysierte genomische DNA wurde über Gelelektrophorese aufgetrennt und dann auf eine Hybond-N-Membran (Amersham Biosciences) transferiert. Die Sondierung des DNA-Blots mit einem Gemisch aus ^{32}P -markierten DNA-Fragmenten von *pim* aus *D. melanogaster* und *Drosophila yakuba* zeigte bei *D. erecta* und *D. oreana* ein hybridisierendes *EcoRI*-Fragment, das jeweils eine Größe von etwa 4 kb aufwies. Zur Klonierung der entsprechenden Fragmente wurden die genomischen DNA-Präparationen mit *EcoRI* hydrolysiert, der 3-5 kb umfassende Bereich nach gelelektrophoretischer Trennung aus einem präparativen Agarosegel eluiert und in den pBSSK⁺-Vektor (Stratagene) ligiert. Die Identifikation der Klone, die ein DNA-Fragment enthielten, das mit der *Pim*-Sonde ein Signal ergab, erfolgte über Koloniehybridisierung. Die isolierten genomischen DNA-Fragmente aus *D. erecta* und *D. oreana* umfassen die kompletten kodierenden Bereiche der *pim*-Orthologen (Abb. 8-5, 8-6).

pim-orthologe Gene von D. pseudoobscura und D. virilis

Es wurden insgesamt drei Versuche unternommen die *pim*-orthologen Gene aus *D. pseudoobscura* und *D. virilis* zu identifizieren. Beim ersten direkten Ansatz wurden mit einem markierten DNA-Fragment von *pim* die genomischen Bibliotheken von *D. virilis* und *D. pseudoobscura* durchsucht. Es konnte in keinem Falle ein hybridisierender Phage identifiziert werden und dies, obwohl die Stringenzbedingungen der Hybridisierung sehr niedrig gehalten wurden. Im zweiten direkten Versuch wurde getestet, ob es über PCR mit degenerierten Oligonukleotiden möglich ist ein Fragment zu amplifizieren, das Sequenzähnlichkeiten zu PIM aufweist. Für diesen Ansatz wurden insgesamt zehn degenerierte Oligonukleotide abgeleitet, die in den verschiedenen Kombinationen über PCR mit genomischer DNA als Matrize eingesetzt wurden. Auch in diesem Falle konnten weder

für *D. pseudoobscura* noch für *D. virilis* entsprechende PCR-Amplifikate erhalten werden, die Sequenzübereinstimmung zu den korrespondierenden Bereichen des PIM-Proteins aufwiesen.

Beim dritten Synthänie-Ansatz handelte es sich um einen indirekten Ansatz, bei dem versucht wurde mittels der zu *pim* benachbarten konservierten Gene *CG13139* und *DmTIP120* das *pim*-Ortholog aus *D. virilis* zu isolieren (Abb. 4-2).

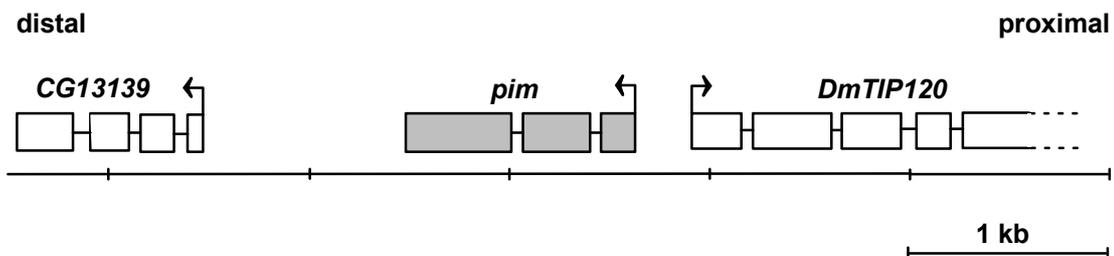


Abbildung 4-2: Flankierende Gene von *pim* in *D. melanogaster*.

Das *pim*-Gen aus *D. melanogaster* ist zytologisch an Position 31D auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms lokalisiert. Es wird distal vom vorhergesagten Gen *CG13139* und proximal von einem zu *TIP120*-orthologen Gen (*DmTIP120*) flankiert. Die Pfeile markieren die Transkriptionsrichtung und die putativen Transkriptionsstartpunkte.

Für den Synthänie-Ansatz mit *DmTIP120* konnte in *D. virilis* bereits gezeigt werden, dass distal zu *DvTIP120* nicht das *pim*-orthologe Gen lokalisiert ist, sondern ein zu *Sps2*, einer Selenophosphat-Synthetase, orthologes Gen (Jäger, 1999). Für den Ansatz mit dem zu *pim* in *D. melanogaster* distal gelegenen konservierten Gen *CG13139* wurden die degenerierten Oligonukleotide HuJ1/HuJ2 abgeleitet. Diese basierten auf dem Sequenzvergleich der abgeleiteten orthologen Proteinen von *D. melanogaster* und *H. sapiens* die von den *CG13139*-Genen kodiert werden. Mit der Kombination der Oligonukleotide HuJ1/HuJ2 wurde aus genomischer *D. virilis* DNA als Matrize das zu *CG13139* korrespondierende PCR-Amplifikat aus *D. virilis* amplifiziert. Es wurde in der Folge als markierte Sonde verwendet, um direkt aus hydrolysierten genomischer *D. virilis* DNA ein 3,5 kb *Bam*HI-Fragment zu isolieren, das mit der Sonde hybridisierte. Die Sequenzierung des über Koloniehybridisierung identifizierten Fragments zeigte, dass in *D. virilis* proximal zum *DvCG13139* Gen nicht *dvpim* sondern das zu *RpS27A* (*Ribosomal protein S27A*)-orthologe Gen aus *D. virilis* lokalisiert ist.

4.5.2 Sse-Orthologe aus *D. willistoni* und *D. virilis*

Sse-orthologes Gen aus *D. willistoni*

Basierend auf einem multiplen Sequenzvergleich zwischen *D. melanogaster* SSE und Separase-Homologen aus anderen Eukaryoten (Abb. 5-3B) wurden die beiden degenerierten Oligonukleotide Sep3 und Sep5 abgeleitet. In einer PCR-Reaktion, mit dieser

Oligonukleotidkombination und genomischer *D. willistoni* DNA als Matrize, konnte ein 150 bp großes Amplifikationsprodukt identifiziert werden, das kloniert und sequenziert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte deutliche Sequenzübereinstimmung zum entsprechenden Bereich von *D. melanogaster* SSE. Um mehr Sequenzinformation über *D. willistoni* SSE zu bekommen wurde über inverse PCR mit der Oligonukleotidkombination DwSse2/DwSse3 ein 850 bp Fragment amplifiziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Amplifikationsproduktes zeigte ebenfalls Sequenzübereinstimmung zum entsprechenden SSE-Bereich aus *D. melanogaster*. Als Matrize für die inverse PCR diente *MspI* hydrolysierte und anschließend ligierte *D. willistoni* genomische DNA. Mit diesem 850 bp Fragment als Sonde konnte bei einem Screen einer genomischen *D. willistoni* λ -DASH Bibliothek ein hybridisierender Phage identifiziert werden. Aus der DNA dieses rekombinanten Phagen wurde ein 5 kb *HindIII*-Fragment isoliert, das den kompletten kodierenden Bereich des *D. willistoni* Sse-Gens umfasst (Abb. 8-2).

Sse-orthologes Gen aus *D. virilis*

Die Vorgehensweise zur Identifikation von *D. virilis* Sse war derjenigen sehr ähnlich, die zur Isolierung des *D. willistoni* Sse-Gens führte. Mit den degenerierten Oligonukleotiden Sep3 und Sep11 wurde über PCR mit genomischer *D. virilis* DNA als Matrize ein 130 bp großes Fragment amplifiziert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz deutliche Sequenzübereinstimmung zum entsprechenden Bereich von *D. melanogaster* SSE aufwies. Bei der sich anschließenden inversen PCR wurde ein 300 bp Fragment amplifiziert. Die Sequenz dieses 300 bp großen Amplifikats lieferte flankierende genomische Sequenzen, die wiederum Sequenzübereinstimmung zu SSE aus *D. melanogaster* aufwiesen. Die PCR Reaktion erfolgte mit *HaeIII* hydrolysierten und anschließend ligierter genomischer *D. virilis* DNA als Matrize und der Kombination der Oligonukleotide DvSse2/DvSse3.

Beim Screen einer genomischen *D. virilis* EMBL3-Genbank mit einem Gemisch der zuvor erwähnten PCR-Amplifikationsprodukte als Sonde konnte ein hybridisierender Phage identifiziert werden. Ein 10 kb *HindIII*-Fragment aus diesem Phagen wurde in den pBSSK⁺-Vektor subkloniert. Da dieses Fragment jedoch nur 1,2 kb des C-terminalen Bereichs von *D. virilis* Sse abdeckte, und die restliche Sequenz auf den EMBL3-Vektor zurückzuführen war, wurde in einem neuerlichen Ansatz direkt aus restriktionshydrolysierte genomischer *D. virilis* DNA ein hybridisierendes Fragment kloniert. Aus einem Southern-Blot mit hydrolysierte genomischer *D. virilis* DNA ging hervor, dass ein 5 kb *HindIII*-Fragment mit dem Sondengemisch hybridisierte. Zur Klonierung dieses Fragments wurde der 4-6 kb umfassende Bereich von *HindIII* hydrolysierte genomischer *D. virilis* DNA geluliert und in den pBSSK⁺-Vektor subkloniert. Über Koloniehybridisierung konnte in der Folge ein positiver Klon identifiziert und isoliert werden, der ein genomisches 5 kb *HindIII*-Fragment mit der kompletten *D. virilis* Sse-kodierenden Region enthält (Abb. 8-1).

4.5.3 *thr*-Orthologe von *D. pseudoobscura* und *D. virilis*

thr-orthologes Gen aus D. pseudoobscura

Das *thr*-orthologe Gen aus *D. pseudoobscura* konnte bei einem Screen einer genomischen EMBL4-Genbank aus *D. pseudoobscura* identifiziert werden (Jäger, 1999, Abb. 8-3).

thr-orthologes Gen aus D. virilis

Mit degenerierten Oligonukleotiden, die aus dem Proteinsequenzvergleich zwischen THR aus *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* abgeleitet wurden, gelang es ein 1,7 kb PCR-Amplifikat zu erhalten, das spezifisch für *thr* aus *D. virilis* war (Jäger 1999).

Mit diesem 1,7 kb Fragment als Sonde konnten bei einem Screen einer genomischen *D. virilis* EMBL3-Bibliothek hybridisierende Phagen identifiziert werden. Über Hybridisierung wurden als Fragmente der Phagen DNA ein 3 kb *Xho*I sowie ein weiteres 3 kb *Cla*I-Fragment isoliert und in den pBSSK⁺-Vektor subkloniert. Diese beiden überlappenden Fragmente umfassten den C-terminalen Bereich von *D. virilis thr*. Zur vollständigen Identifizierung des *thr*-Orthologen aus *D. virilis* wurden aus dem isolierten Phagen des Weiteren ein zentrales 1,5 kb *Xho*I sowie ein weiteres N-terminal lokalisiertes 5 kb *Kpn*I-Fragment in den pBSSK⁺-Vektor kloniert. Die zusammengesetzten Sequenzen dieser Fragmente lieferten die komplette kodierende Region des *thr*-Gens aus *D. virilis* (Abb. 8-4).

4.6 RNA-Aufreinigung aus verschiedenen *Drosophiliden*

4.6.1 Northern-Blot-Experiment

Die Präparation von mRNA erfolgte mit dem Poly(A)Pure-Kit (Ambion). Es wurden aus *D. melanogaster*, *D. virilis* und *D. willistoni* von jeweils etwa 10000 Embryonen des Alters 0-10 h die RNAs präpariert. Für das Northern-Blot-Experiment wurden jeweils 10 µg mRNA auf ein 1,2%-iges Agarose/6% Formaldehyd-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS Puffer (20 mM MOPS, 5 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 7,0). Nach Gelelektrophorese und Blotting auf eine Hybond-XL-Membran (Amersham Biosciences) wurde der Blot zerschnitten (nach entsprechender Spezies) und getrennt hybridisiert. Der *D. melanogaster* Northern-Blot wurde zuerst mit einer DNA-Sonde gegen *Sse* und dann mit einer DNA-Sonde gegen *thr* hybridisiert. Die Hybridisierung des *D. virilis* Northern-Blots erfolgte zuerst mit einer *DvSse* und dann mit einer *Dvthr* DNA-Sonde. Die Hybridisierung des *D. willistoni* Northern-Blots erfolgte ausschließlich mit einer *DwSse*-DNA-Sonde.

4.6.2 Herstellung von Erststrang-cDNA-Bibliotheken

Ausgehend von den mRNA-Präparationen von *D. virilis* und *D. willistoni* wurden über reverse Transkription mit Oligo-dT als Oligonukleotid Erststrang-cDNA-Bibliotheken hergestellt. Die reverse Transkription erfolgte mittels der reversen Transkriptase Superscript II (Gibco) und wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die so hergestellten Erststrang-cDNA-Bibliotheken dienten als Matrizen zur PCR-Amplifikation der cDNAs von *DvSse*, *Dvthr* und *DwSse*.

4.7 Two-Hybrid-Interaktionsstudien

4.7.1 Matchmaker Hefe-Two-Hybrid-System

Protein/Protein-Interaktionen wurden mit dem Matchmaker Hefe-Two-Hybrid-System und dem Hefestamm AH109 (Clontech) aus *S. cerevisiae* untersucht. Dieser Hefestamm ist auxotroph für die Biosynthese von TRP-, LEU-, ADE- und HIS. Die beiden für den Two-Hybrid-Interaktionstest verwendeten Vektoren sind pGBKT7 und pGADT7. Der Vektor pGBKT7 trägt neben der Sequenz des *TRP1*-Gens auch die Sequenzen für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne, während der Vektor pGADT7 über die Sequenz der GAL4-Aktivierungsdomäne und das *LEU2* Gen verfügt. Die Expression der beiden Gene *TRP1* und *LEU2* ermöglicht die Komplementation der TRP und LEU Auxotrophie von *S. cerevisiae* AH109. Die N-terminale Fusion der GAL4-Domänen an die zu testenden Konstrukte erfolgte so, dass das zu klonierende Fragment im Leserahmen der GAL4-Domäne weitergeführt wurde. Die Reportergene *HIS3* und *ADE2* stehen unter Kontrolle des GAL4 Transkriptionsfaktors. Kommt es infolge einer Wechselwirkung der beiden zu überprüfenden Fusionsproteine zur Aktivierung der GAL4 regulierten *HIS3* oder *ADE2* Gene, so kann die HIS beziehungsweise ADE Auxotrophie von *S. cerevisiae* AH109 komplementiert werden. Hierdurch wird das Wachstum auf den entsprechenden Selektionsmedien ermöglicht. Um die Interaktionen, die zur Aktivierung des *HIS3*-Gens führen unter erhöhter Stringenz zu untersuchen, wurden den Selektivplatten ohne Histidin verschiedene Konzentrationen von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) zugesetzt. Da 3-AT ein kompetitiver Inhibitor des *HIS3*-Proteins ist, kann nur dann Wachstum auf den HIS-Selektivplatten erfolgen, wenn die gelieferte Menge an *HIS3* die Konzentration von 3-AT übersteigt. Als Selektivmedium dienten SD-Leu-Trp, SD-Leu-Trp-His und SD-Leu-Trp-Ade. Prinzipiell signalisiert das Wachstum auf SD-Leu-Trp-Ade eine stärkere Wechselwirkung als das Wachstum auf SD-Leu-Trp-His.

4.7.2 SSE-Fragment im pGBKT7

In den *NdeI/SalI* geöffneten pGBKT7 wurde die über PCR amplifizierte und über die Restriktionsenzyme *NdeI/SalI* hydrolysierte komplette kodierende Sse-cDNA eingesetzt. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit einem vollständigen Sse-cDNA-Klon als Matrize und der Kombination der Oligonukleotide DmEsp2/DmEsp3.

4.7.3 *D. virilis* SSE-Fragment im pGBKT7

Die kodierenden Bereiche für sowohl das vollständige *D. virilis* SSE-Fragment (AS 1-640) als auch das N-terminale DvSSE-Fragment (AS 1-245) wurden über PCR aus einer Erststrang *D. virilis*-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Als Oligonukleotidkombination für das komplette DvSSE-Amplifikat (AS 1-640) diente DvSse14/DvSse15, und zur Amplifikation des kodierenden Bereichs des N-terminalen DvSSE-Fragments (AS1-245) die Kombination DvSse14/DvSse17. Die PCR-Produkte wurden nach Restriktionshydrolyse über *NdeI/ SalI* in pGBKT7 eingesetzt.

4.7.4 *D. willistoni* SSE-Fragment im pGBKT7

Die Vorgehensweise zur Klonierung der beiden *D. willistoni* DwSSE pGBKT7-Konstrukte erfolgte wie zuvor bei *D. virilis* beschrieben. Als Oligonukleotidkombination zur PCR-Amplifikation des vollständigen DwSSE-Konstruktes (AS1-635) diente DwSse10/DwSse11 und zur Amplifikation des kodierenden Bereichs des N-terminalen Fragments (AS 1-248) DwSse10/DwSse13. Die Klonierung in den pGBKT7-Vektor erfolgte ebenfalls über die *NdeI/ SalI* Restriktionsschnittstellen.

4.7.5 Two-Hybrid-Konstrukte aus *D. virilis* THR

Über PCR aus einer Erststrang-cDNA-Bibliothek von *D. virilis* wurde mit der Oligonukleotidkombination DvThr7/DvThr8 der komplette DvTHR-cDNA-Bereich (AS 1-1411) amplifiziert. Die Klonierung des kompletten Fragments in den pGBKT7-Vektor erfolgte über *EcoRI/ SalI*. Dieses komplette DvTHR/pGBKT7 Konstrukt (AS 1-1411) diente seinerseits wiederum als Matrize für eine PCR zur Amplifikation des kodierenden Bereichs des N-terminalen *D. virilis* THR-Fragments von AS 1-933. Das Amplifikationsprodukt der PCR mit der Oligonukleotidkombination DvThr7/DvThr13 wurde nach enzymatischer Hydrolyse mit *EcoRI/SalI* zum einen in den *EcoRI/SalI* geöffneten pGBKT7-Vektor und zum anderen in den *EcoRI/XhoI* geöffneten pGADT7-Vektor eingesetzt.

4.7.6 Two-Hybrid-hSeparase-Konstrukte

Die nachfolgenden pGBKT7 hSeparase-Deletionsvarianten wurden alle über PCR mit einem kompletten *hSeparase*-cDNA-Klon (erhalten von J.M. Peters, Research Institute of Molecular Pathology; Wien) als Matrize amplifiziert und nach Restriktionshydrolyse über *NdeI/SalI* in pGBKT7 kloniert.

Als Kombination der Oligonukleotide für die Amplifikation des hSeparase-Fragments AS 1-325 dienten HsSse8/HsSse9, für hSeparase 1-931 die Oligonukleotidkombination HsSse8/HsSse3 und für hSeparase 326-931 die Oligonukleotide HsSse1/HsSse3. Des Weiteren diente zur Amplifikation des Fragments hSeparase 932-1515 die Oligonukleotidkombination HsSse4/HsSse5, für das Fragment hSeparase 1516-2121 die Oligonukleotidkombination HsSse4/HsSse2, für hSeparase 932-1999 die Oligonukleotide HsSse4/HsSse7 und für hSeparase 932-2121 die Kombination HsSse4 /HsSse2.

Die pGADT7-Konstrukte hSeparase 1516-2121, hSeparase 932-2121 und hSeparase 932-1999 wurden hergestellt, indem die entsprechenden Fragmente aus den pGBKT7-Konstrukten über *NdeI/SalI* herausgeschnitten und in den *NdeI/XhoI* geöffneten pGADT7 Two-Hybrid-Vektor kloniert wurden.

4.7.7 Two-Hybrid-hPTTG-Konstrukte

Bei den pGADT7 hPTTG-Konstrukten wurden die DNA-Fragmente ebenfalls über PCR-Amplifikation hergestellt. Als Matrize wurde ein vollständiger *hPttg*-cDNA-Klon (erhalten von J.M. Peters, Research Institute of Molecular Pathology; Wien) verwendet. Die *hPttg*-PCR-Amplifikate wurden nach Restriktionshydrolyse mit *NdeI/XhoI* in den analog geöffneten pGADT7-Vektor eingesetzt. Als Oligonukleotidpaar zur Amplifikation des kompletten hPTTG-Konstruktes (AS 1-202) diente HsPttg1/HsPttg2. Die Kombination der Oligonukleotide HsPttg1/HsPttg3 diente zur PCR-Amplifikation des kodierenden Bereichs des N-terminalen hPTTG-Fragments (AS 1-104). Der kodierende Bereich des C-terminalen hPTTG-Fragments (AS 105-202) wurde über Amplifikation mit den Oligonukleotiden HsPttg4/HsPttg2 erhalten.

4.7.8 Bereits vorhandene Two-Hybrid-Konstrukte

Die pGADT7 Two-Hybrid-Konstrukte PIM 1-199, PIM 1-114, PIM 115-199, THR 1-933 sowie die pGBKT7 Two-Hybrid-Konstrukte THR 1-933 und SSE 1-247 wurden von Alf Herzig hergestellt. Das Two-Hybrid-Konstrukt pGADT7 PIM Δ 110-114 wurde von Stefan Heidmann generiert.

4.8 Sequenzanalysen

Die Identifizierung des Sse-Genbereichs erfolgte über BLAST-Analysen. Die nr und htgs Datenbanken von Genbank sowie bei BDGP wurden über TBLASTN durchsucht (Altschul et al. 1997). Bei BDGP sind die spezifischen *Drosophila* Einträge zugänglich. Die multiplen Protein-Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm CLUSTALW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellt. Hierbei wurden die vorgegebenen Parameter beibehalten. Die schattierte Darstellung des Sequenzvergleichs der C-terminalen Regionen der unterschiedlichen Separase-Orthologen erfolgte unter Verwendung von Boxshade, Version 3.21. Zur Darstellung des phylogenetischen Stammbaums diente das PILEUP-Programm, welches Bestandteil des GCG Softwarepakets ist. Die Darstellung der DNA-Sequenzen mit den daraus abgeleiteten offenen Leserahmen erfolgte mit dem MAP-Programm und die Berechnung der K_a -Werte zwischen DmPIM und DyaPIM erfolgte mit dem DIVERGE-Programm. Beide Programme sind ebenfalls Bestandteile des GCG Softwarepakets.

Die GenBank Zugangsnummern der verschiedenen Separasen, die in Abb. 5-3 verglichen werden, sind: *C. elegans* (T27859), *Trypanosoma brucei* (CAB95528), *Leishmania major* (translatierter Bereich von AL499620 Position 1003853-1007689), *S. cerevisiae* Esp1 (S64403), *S. pombe* Cut1 (A35694), *Emericella nidulans* BimB (P33144) und *Homo sapiens* (BAA11482). Die Teilsequenzen der *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* und *X. laevis* Separasen sind vorhergesagte Translationen der beim Institute of Genomic Research (TIGR; <http://www.tigr.org/tdb/tgi.sh-tml>) zusammengesetzten cDNAs und haben die Identifikationsnummern TC120478, TC143396 und TC5660.

5. Ergebnisse

5.1 *Drosophila* SSE unterscheidet sich von den restlichen Separasen

Aufgrund der funktionellen Analysen der Separase aus *S. cerevisiae* muss angenommen werden, dass die Mitglieder der Separase-Familie eine wichtige Funktion bei der Separation der Schwesterchromatiden wahrnehmen. Diese Proteinfamilie scheint in Eukaryoten evolutionär konserviert zu sein. Die Separasen besitzen eine konservierte C-terminal lokalisierte Separase-Domäne und haben eine Größe, die zwischen 1159 und 2121 AS liegt (Abb. 5-3A).

Zu Beginn dieser Arbeit war in *Drosophila* noch kein Vertreter der Separase-Familie bekannt. In früheren Arbeiten konnte jedoch für die beiden *Drosophila* Proteine PIM und THR gezeigt werden, dass sie eine essentielle Funktion bei der Trennung der Schwesterchromatiden wahrnehmen (D'Andrea et al. 1993; Philp et al. 1993; Stratmann und Lehner 1996; Leismann et al. 2000). Während PIM ein Mitglied der Familie der Securine ist, sind für THR bisher keine orthologen Gene aus anderen Spezies bekannt.

Die Grundlage für die Identifikation der Separase aus *D. melanogaster*, war die Sequenzierung des *Drosophila* Genoms (Adams et al. 2000). Über Datenbankanalysen wurde das vorhergesagte *D. melanogaster* Gen *CG10583* als ein potentieller Vertreter der Separase-Familie identifiziert. Als Suchsequenz wurde hierzu die Sequenz eines C-terminalen humanen Separase-Fragments verwendet. Aus der Gensequenz von *CG10583* wurden Oligonukleotide abgeleitet, mit denen als markierte Sonde in einer cDNA-Bibliothek sieben unabhängige cDNA-Klone identifiziert werden konnten. Die genomische Organisation von *CG10583* ergab sich aus dem Vergleich der zwei längsten cDNA-Klone mit der genomischen DNA-Sequenz (Abb. 5-1, 5-2).

Das aus der cDNA-Sequenz von *CG10583* abgeleitete Protein (in der Folge als SSE bezeichnet), besitzt eine Größe von 634 AS und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 73 kDa (Abb. 5-2). Der *Sse*-Genbereich ist auf dem linken Arm des dritten Chromosoms an zytologischer Position 64E lokalisiert. *Sse* wird distal von *CG17334* und proximal vom Gen *still life (sif)* begrenzt (Abb. 5-1).

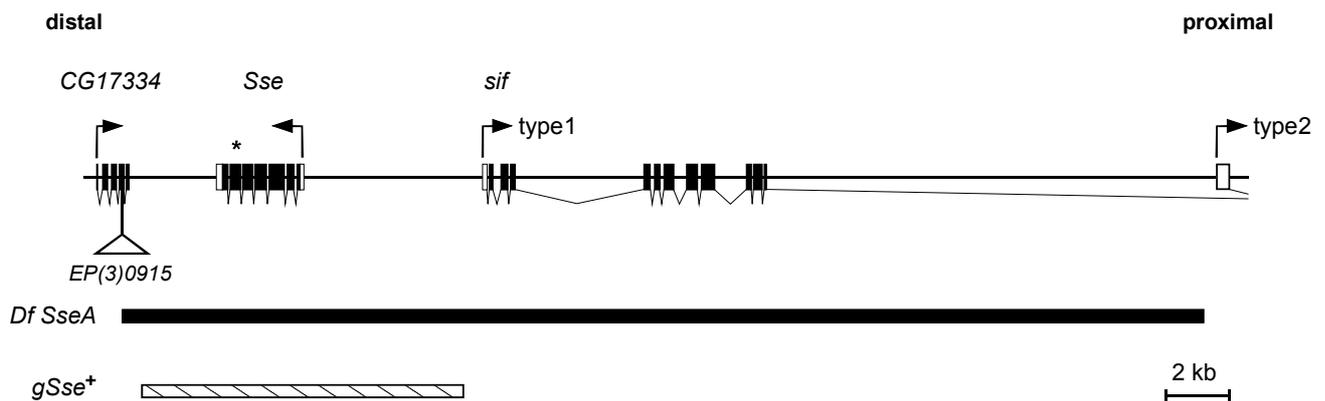


Abbildung 5-1: Genomische Organisation des *Drosophila* Separase-Homologs.

Der *Drosophila* *Sse*-Locus ist auf dem linken Arm des dritten Chromosoms an zytologischer Position 64E lokalisiert. Das *Sse*-Gen, das distal von *CG17334* und proximal von *still life* (*sif*) flankiert wird, ist aus 7 Exons aufgebaut. Pfeile deuten die Transkriptionsrichtung der Gene an. Der Stern markiert die Position der Mutation innerhalb des letalen *Sse*-Allels *Sse*^{13m}. Das Dreieck innerhalb von *CG17334* markiert den Insertionsort des P-Elements *EP(3)0915*, das für die Herstellung neuer Defizienzen über männliche Rekombination verwendet wurde. Der als durchgezogener schwarzer Balken dargestellte Bereich illustriert den in der neu hergestellten Defizienz *Df(3L)SseA* deletierten genomischen Bereich. Der schraffierte Balken zeigt den Bereich, der für das genomische *Sse*-Konstrukt genutzt wurde.

Vergleicht man SSE mit anderen bisher bekannten Mitgliedern der Separase-Familie, so fällt auf, dass sie mit 73 kDa deutlich kleiner ist als die zwischen 150 und 230 kDa großen SSE-Orthologen (Abb. 5-3A). Dass SSE tatsächlich nicht größer ist, wird dadurch gestützt, dass der Bereich stromaufwärts von *Sse* keine erkennbare kodierende Region besitzt. Auch die Tatsache, dass die zwei längsten unabhängigen cDNA-Klone im SSE-Leserahmen kurz vor dem Translationsinitiationskodon drei Stop-Kodons besitzen, spricht dafür, dass SSE mit 634 AS das vollständige Protein darstellt (Abb. 5-2). Die Größe der cDNA-Klone mit etwa 2,1 kb wird auch durch Northern-Blot-Analysen bestätigt. Das einzig nachweisbare *Sse*-Transkript zeigt eine Größe von etwa 2,2 kb (Abb. 5-13). Dass über den Northern-Blot auch größere Transkripte nachweisbar sind, wurde über den Nachweis des *thr*-Transkripts, das eine Größe von 4,2 kb aufweist erbracht (Abb. 5-13). Somit kann angenommen werden, dass die identifizierten *Sse*-cDNA-Klone vollständig sind. Wird ein unter UAS-Kontrolle stehendes *HASse*-Transgen, das auf einer kompletten cDNA basiert, ektopisch über daGAL4 vermittelt exprimiert, so komplementiert das resultierende N-terminal HA-epitopmarkierte SSE-Protein den transheterozygot mutanten (*Df(3L)SseA/Sse*^{13m}) *Sse*⁻-Phänotyp (Abb. 5-5B). Auch dieser Befund und die weitere Beobachtung, dass Antikörper gegen SSE im Immunoblot ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa (Abb. 5-7) erkennen sprechen eindeutig dafür, dass das SSE-Protein mit 634 AS ein vollständiges *Drosophila* Separase-Protein darstellt.

```

-238 aagccttacgaatttgactaatattaagtacaatgcttttcacaataataaccgcaaatcaaaaaagtagactagaaaat
-158 accacaaaatgagctagtttctatcgcacatcgcccatcgatagctcagtggttgtaaggctacaaggcatctatcga

                                     #1 #2 #3 Start
-78  tatcgtccgaagaggaggaagcaatttgcgactcgagtttgaataaagcaattaagtaataataaaataggaaAT
                                     M 1

      Age I
3    GCTGGAAACCGGTGACGAGGCTGAGATGCTGGCCGGTTTCACCAGTTCAGATGTTGGCCCCGAGGCGAAGGgtaactata
    L E T G D E A E M L A G F T S S D V G P E A K E----- 25

83  taagcagaccagaaaacttcgaattcccaactgcatcttcgcaataatgttaatgttcatgtttcttctgcagAATAT
    -----Intron----- Y 26

163 AATTTACTGCGCGCCGATGAGGAATACCGCAATGGCAATGTGGAGCACTCAATTTACTACCAGGTTAAAGCCGAGTTCCA
    N L L R A D E E Y R N G N V E H S I Y Y Q V K A Q F Q 53

243 GTCCACCGATCTGCGTTACCTTACCGAATCGGCGGAATGGAAAATCAGCGTCCACCGCAGAGGAGCTGATCAAATCAG
    S T D L R Y L T E S A E L E N Q R P T A E E L I K S A 80

323 CCACTAAACTGGAGAAAAGGACTACAAAAGgtgatataaactaactaaactcttttaaaactcaacaaacattacc
    T K L E K K D Y K S -----Intron----- 90

403 aacattattcttagCAAAAAATTTCTGCAGAACATCATCAAGTACCTCCAGCAAATGGAGCAGGAGAAAACAGCCAAAGAA
    ----- K K F L Q N I I K Y L Q Q M E Q E K Q P K K 112

483 GCCAATCAACGAAATACCAGAGTATCTAGACTTCCTGGATGATGTCCAGGATCCTACAGAGGTCTAACTCGCATTTTCCAG
    P I N E I P E Y L D F L D D V Q D P T E G L T R I S E 139

563 AGAAATGCAATAGTCTGCCCCAAGAATGGTGTGCTCCAGCTCTGCAAGAGCTTTAATCCCGCCACCACCTACTCCGTT
    K C N S L P Q E W C V L Q L C K S F N P A T T Y S V 165

643 TTCAATGAGATCATTGCCAGGATGGAGCAATATATCTCACTCTGCTCCGACACTGTAGAAGTCCCAACTGGGACCGAT
    F N E I I A S D G A I Y L T L L R H C R S S Q L G P I 192

723 TTGCCTGAAAATTTCCAACGAAAATACGGCAAATCTCTTTTCGAGAGTATAGCACTCTGGTGGAAAGATTTAGCGAGTGG
    C L K I S N E N T A N L F R E Y S T L V E R F R R V V 219

803 TAACCGTGGATCCACTCAACATGAAAGGTAAGAGGCTAAGCAGAAGTATTGGGAGGAGCTGAATGGTTTGTACACTTTT
    T V D P L N M K G K E A K Q K Y W E E L N G F D T F 245

883 CTGCAAgtaagtactacacattaatatcaatgtatcttattagcattactttacctcttctagAAACTACTTGCCGACTT
    L Q -----Intron-----K L L A D F 253

963 TCGGGACATAATATCTCCATATTCCTTTCTGTTCTTTGGCAAAGATATGACTGCACTGTTGTTCAAAAACAAATCAAAG
    R D I I S P Y S F L F F G K R Y D C T V V Q K Q I K A 280

1043 CCACCTATACTCGTGTGACGATTTCTGTCTGCTTAATCAATGGGGTACCCACCAACGTGTTTTACTTTCCCAAGCGGCC
    T Y T R V D D F C L L N Q W G T H Q R V L L S Q A A 306

1123 TCGCATGCCAATCGACTGGAATCGCAGATCTCAAATCATCTGCTATGAGCTGTCGAGCAACGAAAATGAGATCCAGTC
    S H A N R L E I A D L K L I C Y E L S S N E N E I Q S 333

1203 GGCATACGAATTGCTTAAGGGTTTGGCCAGGACTGGGCGGAAGTGGAGGAGCGTCAGCCCCTGGCGAGCAGAAGATTC
    A Y E L L K G L A S D W A E V E E R Q P L A S R R F P 360

1283 CCATCATCTCTGGTAGTCGATGAGgtagttcatctgaatttctatactataatacactactatattattatgtagCGT
    I I L V V D E -----Intron-----R 368

1363 CTAGACCACCTCCATTGGGAACAACACTAGTCACCGTGCAGGAATCTCCCGCTCAAATCACTGCATTGCCTATGGCGCTT
    L D H L H W E Q L V T V Q E F S R V K S L H C L W R L 395

1443 GTTCCAGAATCACAAATCAACATAAAGCATGGCTACTACACAACAATATTAACGTTGGCATGTGTGTAATAAACCCAG
    F Q N H K S N I K H G Y Y T T N I K R G M C V I N P D 422

1523 ATGCGGATTTGGTCAACTCCGCGCCGAGGCTGCGTAGCTTTTTTGTAGTACTGGCTCTCCAGTGGCAGCATCTTTTTGAA
    A D L V N S G R R L R S F F E Y W L S Q W Q H L F E 448

1603 ACCGTGCCCAATGAGGAGGTGATGGTGAACAGGCGCTACAGGCGGATTGCTTTGTgtaagatatgattgcaaggaaca
    T V P N E E V M V K Q A L Q A D C F V ----- 467

1683 atggcattctaactctttgcttaaattttagATACGCAGGTCACGGTCTGGGCTGCAGTACGTCAATGGTCGCATAA
    -----Intron----- Y A G H G S G L Q Y V N G R I I 483
                                     ↑

1763 TTTGCGGGCTCGGGTACGCAGCGTTGTTTTCTATTTCGGCTGCGATTCTACACGCATGTTGGGCACGGGCTGTACAGC
    C R A R V R S V V F L F G C D S T R M L G T G L Y S 509
                                     ↑
    
```

```

1843 GCATTGTATGGAGCCCATGATTATTACCATTGGAGCTCTGTGCTCTCGATAGTTGGTACTCTCATGCCCGCCTTGGATGG      536
    A L Y G A H D Y Y H G A L C P S I V G T L M P A L D G

1923 TAATATGGATACTGTTTCGGTGACAATATTGAGTCGTTGGTTGGCCCCGGGGGATAACAAAGTGATTCCGTTGGACACATA      563
    N M D T V S V T I L S R W L A P G D N K V I P W T H I

2003 TTGATCGGGTGCCTTGGCTCAAAAATGGCATTATAAAAGgtaatgtctttatattattaagttacatatttaaggaa      576
    D R V P W L K N G I I K G-----Intron-----

2083 ttcttttaaatntagGAAAAGATGAAACCACGCCACCATTGAACGATCAACCCAACCTACCATCTGGGCAGCCTGTGCTCT      597
    ----- K D E T T P T M N D Q P N Y H L G S L C S

2163 ATCCTATCTCTCGTACAGCAAGGAAAAGTGGAGCCGAATATCTACAACCTGCTGCATTTACGTGTGCCGGGACTTCCCGC      624
    I L S L V Q Q G K V E P N I Y N C C I Y V C R G L P A

                                Stop
2243 ATGGAATTTGGCCGTGGAAAAGCTGCCTTTATAGctcatttcgctgctggagtcgatctccctaagcaaaagttttgcgtat      634
    W N L A V E K L P L *

2323 ggaactgtgtacaataatatttaattgaactacttcattcaagtggaaagtggctcaagtttgcatataaacgct
2403 aaatgtaacactcagaatagtaaaaaataaactaaacatttatatttaggaagaaattccaaggcacttaccttttctta
2483 gtttatttggagattgagtgatgtttccttatggatttagcactttaactgaagtgccttgatttcggttaagttttt
2563 agttttaagtagaagttttaaacatgttttagactttgtacattgtgtgttggaaactttaaccggttgagaactattta
2643 gattaattgatttaggttagagttttcgttttccttagttggaatcatgccagatacagagtacagattcattcattacat
2723 ttgcctgtgcaagagtagggagtgaaaaacattaatcgagtacaaatcgcaatgtgggtgaggtaaagtaaaaaagtga

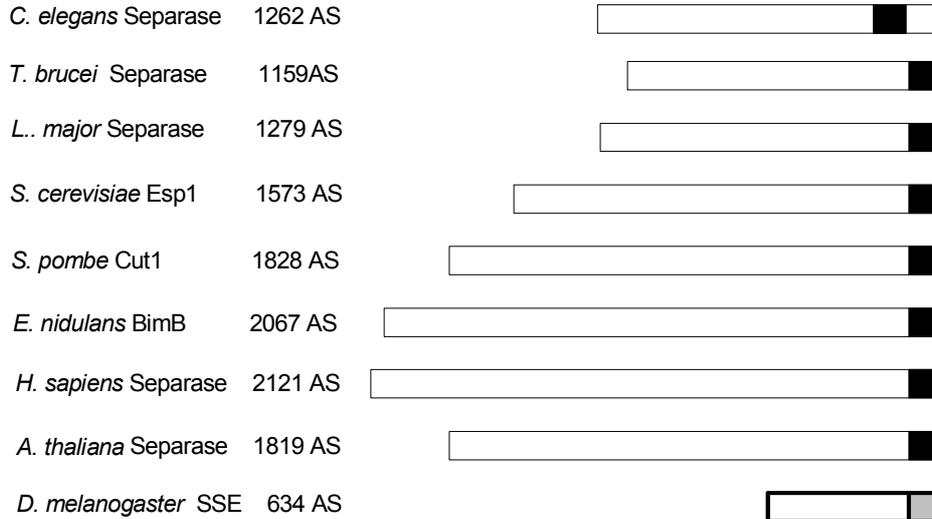
```

Abbildung 5-2: Das *Sse*-Gen aus *D. melanogaster* und die abgeleitete Aminosäuresequenz.

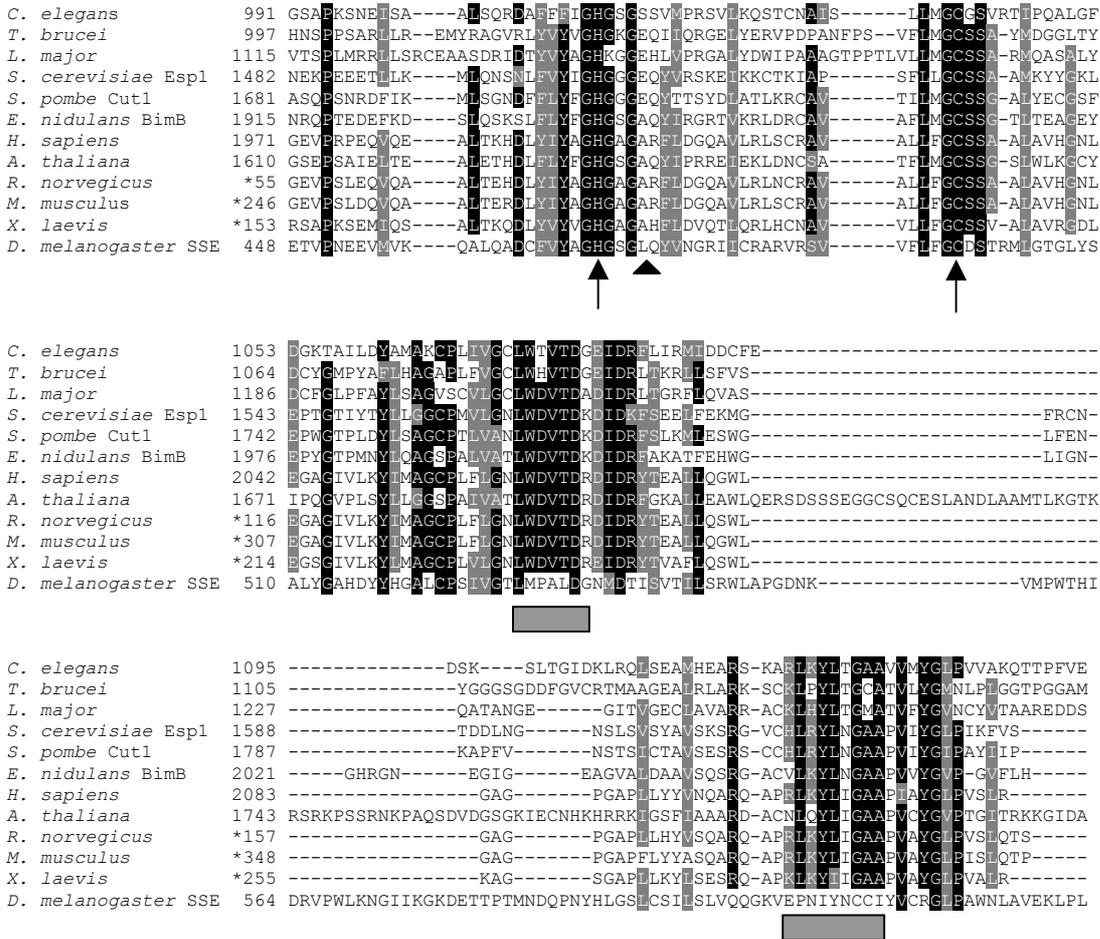
Die Zahlenangaben links bezeichnen die Nukleotidpositionen, die Zahlen rechts die Positionen der Aminosäuren. Die Nukleotidnumerierung startet beim Adenylat des ATG-Startkodons. Der genomische Genbereich kodiert für ein Protein mit 634 AS. Die Proteinsequenz ist unter der Nukleotidsequenz im Einbuchstabenkode dargestellt. Die in die Sequenz eingezeichneten Introns (blau markiert) wurden über den Vergleich einer kompletten cDNA zur genomischen Region abgeleitet. Das potentielle ATG-Startkodon sowie das TAG-Stopkodon sind rot markiert. Kodierende Bereiche sind in Großbuchstaben und nicht kodierende in Kleinbuchstaben dargestellt. Die beiden Pfeile markieren die Positionen der katalytischen Histidin- und Cysteinreste. Der schwarz unterlegte Bereich zeigt die Position der vier bp Deletion innerhalb von *Sse*^{13m}. Die grün markierten Bereiche kennzeichnen zum einen die Positionen der Stopkodons kurz vor dem Translationsstart (#1-#3) und zum anderen die *Age* I Restriktionsschnittstelle, über die das HA-epitopmarkierte UAS-HASse Konstrukt kloniert wurde.

Bereiche mit einer hohen Sequenzidentität sind innerhalb der Separasen auf den C-terminalen Abschnitt beschränkt, der auch die Proteasedomäne umfasst. Innerhalb dieser Proteasedomäne der Separasen zeigen die Bereiche um die katalytischen Reste Histidin und Cystein Sequenzübereinstimmung (Abb. 5-2 und 5-3B durch Pfeile hervorgehoben). Eine Konservierung der beiden, für die Proteaseaktivität essentiellen Bereiche um die katalytischen Reste, ist auch in SSE aus *D. melanogaster* zu finden. Im Gegensatz dazu sind jedoch die beiden weiter C-terminal lokalisierten konservierten Blöcke in SSE divergent (Abb. 5-3B). Dies hat zur Folge, dass SSE im Separase-Stammbaum das entfernteste Mitglied darstellt. (Abb. 5-3C).

A



B



C

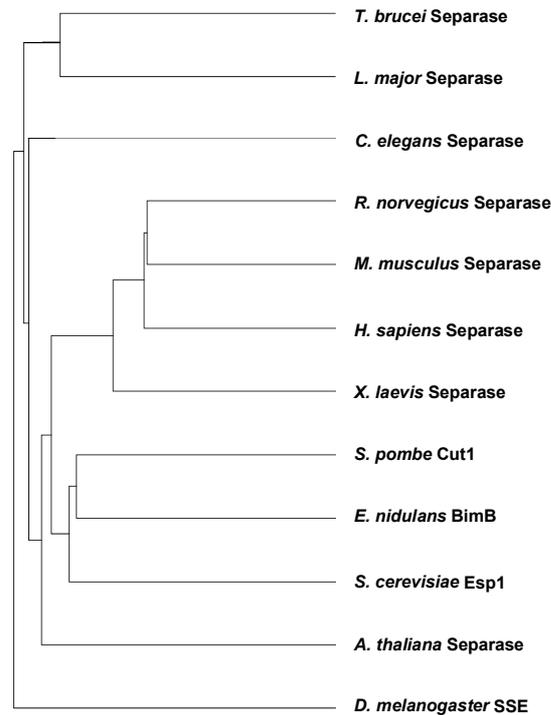


Abbildung 5-3: Vergleich der Separasen aus verschiedenen Organismen.

(A) Schematische Darstellung der Proteingrößen von bekannten Separasen aus unterschiedlichen Spezies. Die schwarz markierten C-terminalen Separase-Bereiche dienten für den in B näher dargestellten Sequenzvergleich. (B) Protein-Sequenzvergleich der carboxyterminalen Regionen von verschiedenen Separase-Orthologen. Die *C. elegans* Separase ist insgesamt 1262 AS groß und verlängert sich somit C-terminal um weitere 116 AS. Die Pfeile markieren die hochkonservierten Reste Histidin und Cystein, die die katalytische Duade der Separase bilden. Die grau markierten Rechtecke markieren Bereiche, die in *Drosophila* SSE im Unterschied zu den Separasen aus anderen Spezies weniger konserviert sind. Das Dreieck markiert die Position der 4 bp Deletion innerhalb des *Sse*^{13m}-Allels. Die Sterne markieren Fälle, in denen nur Teilsequenzen zugänglich sind. (C) Verwandtschaftsverhältnisse der Separase-Proteinfamilie basierend auf dem in B gezeigten Protein-Sequenzvergleich.

5.2 SSE ist essentiell für die Separation der Schwesterchromatiden

5.2.1 Mutante Allele des Sse-Gens

Da zu Beginn der Charakterisierung der Sse-Funktion keine geeigneten Allele zur Verfügung standen, wurden über einen Rekombinationsansatz, der Transposase-vermittelt erfolgt, Rekombinanten hergestellt. Ein Drittel dieser Rekombinanten sollten Deletionen variabler Größe aufweisen. Bei dem Rekombinationsansatz konnten sechs letale Rekombinanten isoliert werden, bei denen ein Deletionsereignis in Richtung Sse vermutet werden konnte.

Die über „Plasmid-rescue“ (siehe 4.3.6) erfolgte Charakterisierung von fünf dieser letalen Rekombinanten zeigte, dass vier Rekombinanten Deletionen von mehr als 100 kb aufwiesen. Eine weitere Rekombinante, die in der Folge als *Df(3L)SseA* bezeichnet wird, zeigte im Unterschied dazu ein kleinere Deletion von 34 kb. Dieser in *Df(3L)SseA* deletierte Bereich umfasst den kompletten *Sse*-Genabschnitt, sowie zusätzlich noch Teile der beiden benachbarten Gene *CG17334* und *sif* (Abb. 5-1). Da die Deletion des *Sse*-Genbereichs für die weiteren phänotypischen Untersuchungen von essentieller Bedeutung war, wurde das Fehlen des *Sse*-kodierenden Bereiches in der Defizienz *Df(3L)SseA* über ein PCR-Experiment mit DNA aus homozygoten *Df(3L)SseA*-Larven als Matrize verifiziert (Abb. 5-4).

Es konnten somit über den Rekombinationsansatz Defizienzen isoliert werden, bei denen mehr als nur der erwünschte *Sse*-Genbereich deletiert war. Da weder *CG17334* noch *sif* in *D. melanogaster* essentiell sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Letalität von *Df(3L)SseA* auf die Deletion des *Sse* Genbereichs zurückzuführen ist. Diese Defizienz war zur Untersuchung des *Sse*-mutanten Phänotyps und zur Identifizierung eines weiteren *Sse*-Allels sehr wichtig.

Von Gatti und Baker (1989) war eine letale Mutation (*l(3)13m-281*) beschrieben, deren zytologischer Phänotyp mit dem Phänotyp, den man für eine mutantes *Sse*-Allel erwarten würde, übereinstimmt. Wurde die Defizienz *Df(3L)SseA* mit der letalen Mutation *l(3)13m-281* gekreuzt, so konnte keine Komplementation festgestellt werden. Dieses Ergebnis war überraschend, da die Kartierung des letalen EMS-Allels über meiotische Rekombination eine Lokalisierung auf dem linken Arm des dritten Chromosoms bei 3-26.6 ergab, was zytologisch der Position 67 entspricht (Gatti und Baker 1989). Da der *Sse*-Genbereich zytologisch jedoch an Position 64E1 lokalisiert ist und die Defizienz *Df(3L)SseA* nur den zytologischen Bereich von 64E1-E2 deletiert, mussten die ursprünglichen Kartierungen fehlerhaft sein. Um in der Folge zu überprüfen, ob *l(3)13m-281* ein letales *Sse*-Allel darstellt, wurde über PCR der genomische *Sse*-Bereich des *l(3)13m-281* Chromosoms amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Sequenz ergab, dass innerhalb des kodierenden *Sse*-Bereichs eine vier bp Deletion vorliegt. Lokalisiert ist diese Deletion zwischen den Triplets, die für die beiden essentiellen Aminosäurereste Histidin 470 und Cystein 497 kodieren. Der Verlust der vier bp hat eine Rasterschubmutation zur Folge, wodurch es zwischen den beiden katalytischen Resten zu einem vorzeitigen Translationsstop kommt (Abb. 5-2 und 5-3B). Die Folge daraus ist, dass dem *SSE*-Protein, das von *l(3)13m-281* kodiert wird (in der Folge als *Sse*^{13m} bezeichnet) ein Teil der konservierten proteolytisch aktiven Separase-Domäne fehlt. Somit ist *Sse*^{13m} ein nicht funktionelles *Sse*-Allel.

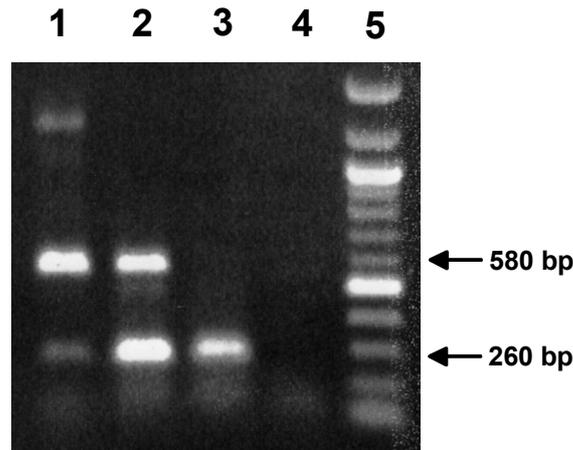


Abbildung 5-4: Die Defizienz *Df(3L)SseA* deletiert den *Sse*-Genbereich.

Gelelektrophoretische Analyse eines PCR-Ansatzes mit den Matrizen (1) w^1 , (2) *Df(3L)SseA/TM3, Ser, ActGFP* und (3) *Df(3L)SseA/Df(3L)SseA*. Das Amplifikat bei 580 bp (Pfeil) ist ein für den 5'-terminalen *Sse*-Bereich spezifisches PCR-Produkt, während ein Amplifikat eines Teils des *Cyclin A*-Gens bei 260 bp (Pfeil) als interne Kontrolle dient. Aus Spur 3 geht hervor, dass mit der DNA aus homozygot defizienten Larven kein *Sse*-Produkt amplifiziert wird, während die interne Kontrolle nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu sind bei beiden Kontrollansätzen in Spur 1 mit w^1 und in Spur 2 mit *Df(3L)SseA/TM3, Ser, ActGFP* als Matrizen beide Amplifikationsprodukte identifizierbar. Der Ansatz in Spur 4 stellt einen PCR-Ansatz ohne Matrize dar. In Spur 5 ist ein 100 bp DNA-Längenstandard aufgetragen.

5.2.2 *Sse* ist ein essentielles Gen

Embryonen des Genotyps *Df(3L)SseA/Sse^{13m}* durchlaufen eine normale Entwicklung und schlüpfen als Larven mit der nach Mendel erwarteten Frequenz. Da eine Verpuppung unterbleibt, etabliert sich die Letalität im Verlauf der Larvalentwicklung. Im Gegensatz dazu sind *pim*- und *thr*-Nullmutationen embryonal letal. Die Überprüfung der Proteinstabilität von SSE, PIM sowie THR zeigt, dass SSE im Vergleich zu PIM und THR während der Embryonalentwicklung stabil bleibt (Abb. 5-9). Vermutlich reicht im Falle von *Sse* die maternale Kontribution, das heißt der Anteil den die Mutter in Form von Protein und mRNA im Ei deponiert hat, aus, um die komplette Embryogenese und Abschnitte der Larvalentwicklung zu durchlaufen.

Wenn *Drosophila* SSE eine Funktion bei der Separation der Schwesterchromatiden hat, würde man erwarten, dass in proliferierenden Geweben von *Sse*-Nullmutanten mitotische Defekte auftreten. Da in späten *Drosophila* Embryonen des Genotyps *Df(3L)SseA/Sse^{13m}* solche Defekte nicht beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt), erfolgte die Charakterisierung des mutanten *Sse*⁻-Phänotyps an larvalen Gehirnen. Die Gehirne wurden ausgewählt, da während der Larvalentwicklung innerhalb des zentralen Nervensystems Proliferation von Neuroblasten stattfindet und die Neuroblasten aufgrund ihrer Größe gut zu untersuchen sind. Die phänotypischen Untersuchungen erfolgten an Gehirnen aus

transheterozygot *Sse*-mutanten Larven (*Df(3L)SseA/Sse^{13m}*) sowie aus Gehirnen von Kontrolllarven (*Df(3L)Sse/TM3, Ser, ActGFP* oder *Sse^{13m}/TM3, Ser, ActGFP*). Zum Nachweis von mitotischen Zellen wurde eine anti-Phospho-Histon-H3 (PH3) Färbung verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Marker, mit dem die mitotischen Stadien bis zur späten Anaphase sehr gut und einfach nachweisbar sind.

Die transheterozygot mutanten larvalen Gehirne des frühen zweiten Larvenstadiums sind im Vergleich zu den Kontrollgehirnen kleiner. Ein weiteres Merkmal der mutanten Larven war, dass die Imaginalscheiben soweit reduziert sind, dass diese nicht identifiziert werden konnten. Bei der, anhand der PH3-Färbung, durchgeführten quantitativen Auswertung der mitotischen Zellen der Gehirne, konnte zwischen den *Sse*-Mutanten und den Kontrollen ein signifikanter Unterschied identifiziert werden. In den Gehirnen des frühen zweiten Larvenstadiums von transheterozygot mutanten *Sse*-Larven ist die Anzahl der mitotischen Zellen auf 40% der mitotischen Zellen der Kontrollgehirne reduziert (234 mitotische Zellen in sieben *Sse*-Gehirnen und 238 mitotische Zellen in drei Kontrollgehirnen). Während der Anteil an Pro- und Metaphasenfiguren in den Gehirnen der Mutanten und den Kontrollgehirnen vergleichbar ist, unterscheidet sich die Anzahl an Anaphasen deutlich (eine Anaphase in 234 PH3 positiven Zellen der *Sse*-Gehirne und 20 Anaphasen von 238 PH3 positiven Zellen der Kontrollgehirne). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die maternale Kontribution zu Beginn des zweiten Larvenstadiums ausläuft, was in den Gehirnen der mutanten Larven ausbleibende Anaphasen zur Folge hat.

Im späten dritten Larvenstadium fällt der Unterschied zwischen den mutanten Gehirnen und den Kontrollen noch deutlicher aus. Die mutanten Gehirne sind in ihrer Größe deutlich reduziert und die wenigen PH3 positiven Zellen (<5% als die Anzahl der PH3 positiven Zellen der Kontrollgehirne) sind abnormal groß und haben einen erhöhten DNA-Gehalt (Abb. 5-5A, C, D). In den älteren transheterozygot mutanten Gehirnen war es nicht möglich normale Anaphasen oder Telophasen zu beobachten. Der voranschreitende Verlust von mitotischen Zellen mit zunehmendem Alter lässt vermuten, dass die meisten mitotisch proliferierenden Neuroblasten absterben. Der erhöhte DNA-Gehalt in den noch wenigen nachweisbaren PH3 positiven Neuroblasten lässt vermuten, dass sich chromosomale Instabilitäten etablieren, die eine Hyper- beziehungsweise Aneuploidie zur Folge haben und dies das Absterben der Zellen verursacht.

5.2.3 Bei Sse-Nullmutanten ist die Separation der Schwesterchromatiden inhibiert

Für die beiden *Drosophila* Gene *pim* und *thr* konnte bereits gezeigt werden, dass ihnen eine essentielle Funktion bei der Trennung der Schwesterchromatiden zukommt (D'Andrea et al. 1993; Philp et al. 1993; Stratmann und Lehner 1996). Um die Funktion von Sse bei der Separation der Schwesterchromatiden zu untersuchen, wurden aus Gehirnen transheterozygot mutanter Sse-Larven Quetschpräparate hergestellt. Wenn die Separation der Schwesterchromatiden in Sse-Mutanten inhibiert ist, sind gehäuft Chromosomen mit der doppelten Anzahl an Chromatiden (Diplochromosomen) zu erwarten. Diese artifiziellen Metaphasechromosomen konnten für *thr*- und *pim*-Mutanten bereits gezeigt werden (Stratmann und Lehner 1996). Sie kommen zustande, indem nicht getrennte Schwesterchromatiden im darauffolgenden Zellzyklus repliziert und im anschließenden Verlauf der Mitose kondensiert werden. Diplochromosomen entstehen nur, wenn neben dem inhibierten Separationsprozess die weiteren Vorgänge des Zellzyklus unbeeinträchtigt weiterverlaufen.

Die Analyse der Quetschpräparate von mutanten larvalen Gehirnen des zweiten Larvenstadiums zeigte in Analogie zu den mutanten Phänotypen von *pim* und *thr* Diplochromosomen. Insgesamt waren 95% der in den Mutanten identifizierbaren Metaphasechromosomen entweder Diplochromosomen (Abb. 5-5K) oder Chromosomen mit einem noch höheren Endoreduplikationsgrad (Abb. 5-5L). Im Gegensatz hierzu waren in den Kontrollpräparaten (Abb. 5-5M) keine endoreduplizierenden Chromosomen nachweisbar. Des Weiteren fiel auf, dass in den mutanten Präparaten die meisten identifizierten mitotischen Zellen eine vom normalen Chromosomensatz abweichende Anzahl an Chromosomen (Aneuploidien) aufwiesen. Hierbei waren jedoch keine mitotischen Zellen mit polyploiden Chromosomensätzen, das heißt mit mehreren Sätzen von Metaphasechromosomen mit normaler Morphologie, zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt, dass Sse-Mutanten keinen primären Defekt im Verlauf der Cytokinese aufweisen.

Diese phänotypischen Analysen werden gestützt durch frühere Experimente mit dem *l(3)13m-281* Allel (Gatti und Baker 1989). Hier konnte gezeigt werden, dass homozygot mutante Larven im Verlauf der Larvalentwicklung starben. Die Imaginalscheiben aus homozygot mutanten Larven des dritten Larvenstadiums waren sehr stark reduziert, und die Gehirne zeigten eine deutlich reduzierte Anzahl an mitotischen Zellen. Die wenigen in Quetschpräparaten beobachtbaren Metaphasechromosomen waren endoredupliziert (Gatti und Baker 1989).

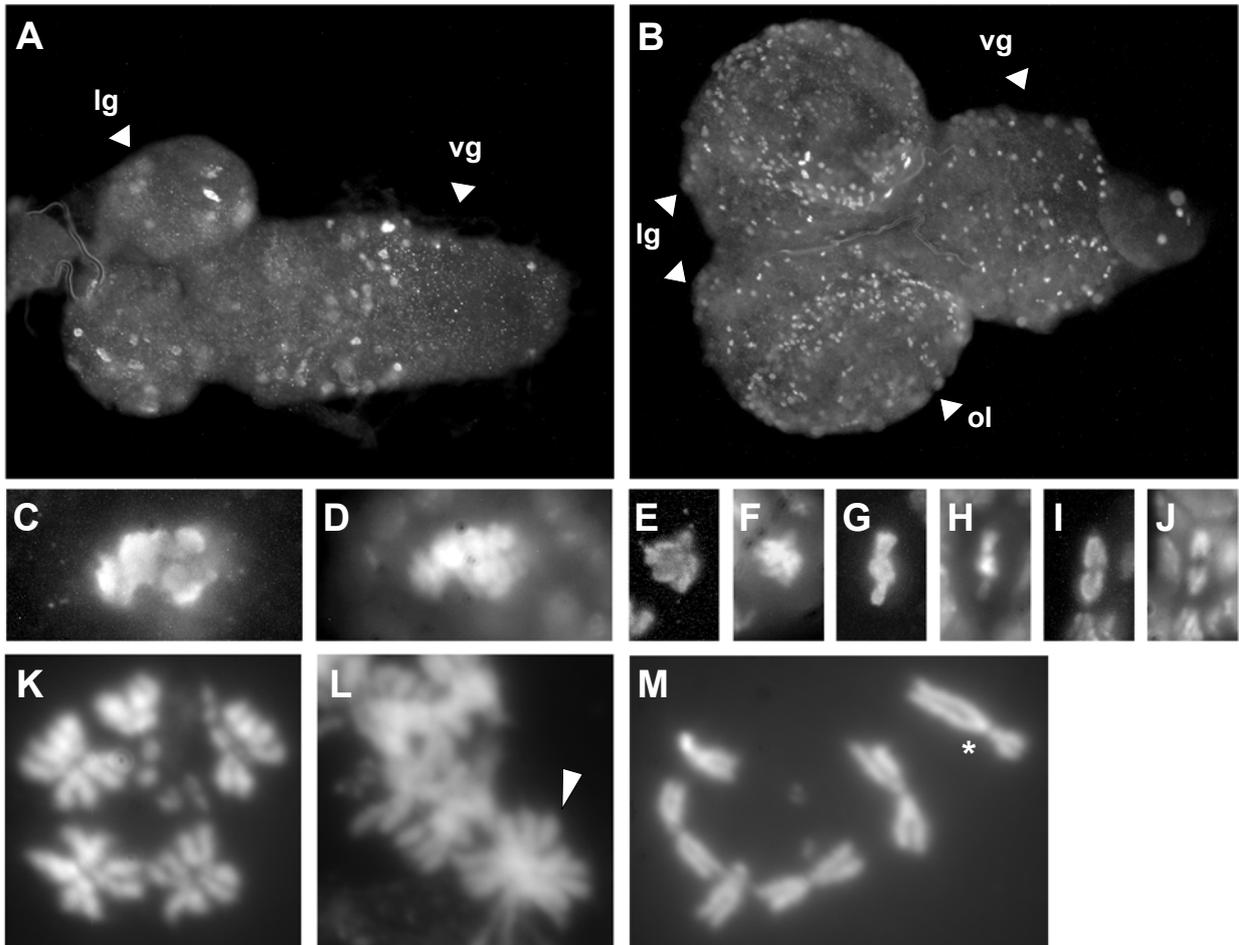


Abbildung 5-5: Mutationen in Sse beeinflussen mitotische Zellen.

Gehirne von Larven des späten dritten Larvenstadiums mit den Genotypen *Sse^{13m}/Df(3L)SseA* (A) oder *UAS-HASse 1.1/+ ; Sse^{13m}/Df(3L)SseA, da-GAL4* (B) wurden mit Hoechst 33258 zum Nachweis der DNA (D;F;H;J) sowie anti-PH3 (A-C,E,G;I) Immunofluoreszenz gefärbt. Die PH3 positiven Zellen in den mutanten Gehirnen zeigen große Mengen an kondensierter DNA (C,D). Des Weiteren können in diesen Gehirnen keine Anaphase-Figuren identifiziert werden. In den Gehirnen der durch das *HASse*-Transgen geretteten Larven sind mitotische Zellen mit normalen Prophasen (E,F), Metaphasen (G,H) und Anaphasen (I;J) zu sehen. Quetschpräparate von Gehirnen aus Larven des zweiten Larvenstadiums mit dem Genotyp *Sse^{13m}/Df(3L)SseA* (K,L) oder aus Gehirnen von Kontrollen (*Df(3L)Sse/TM3, Ser, ActGFP* oder *Sse^{13m}/TM3, Ser, ActGFP*) (M) wurden zur Markierung der DNA mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Quetschpräparate von den *Sse*-mutanten Gehirnen zeigen sowohl Diplochrosomen (K) als auch Quadrupelchromosomen (mit Pfeilspitze in L gekennzeichnet). Die Quetschpräparate der Kontrollen (M) zeigten keine endoreduplizierte Metaphasechromosomen. Der Stern in (M) markiert das Balancier-Chromosom *TM3, Ser, ActGFP* des Kontrollgenotyps. (lg) larvales Gehirn; (vg) ventrales Ganglion; und (ol) optischer Lappen

5.2.4 Ektopische Sse-Expression komplementiert Sse⁻-Phänotyp

Anhand von Komplementationsanalysen sollte in der Folge gezeigt werden, dass die endoreduplizierten, nicht getrennten Chromosomen in *Df(3L)SseA/Sse^{13m}*-Larven eine Folge des Verlustes der endogenen Sse-Funktion sind. Eine Kopie des genomischen *gSse*-Transgens komplementiert den transheterozygoten *Df(3L)SseA/Sse^{13m}*-Phänotyp und den homozygoten *Sse^{13m}*-Phänotyp vollständig. Die geretteten adulten Fliegen sind vital und fertil. Das hierbei zugrundeliegende 10 kb DNA-Fragment umfasst als einzigen Genbereich den Sse-kodierenden Bereich (Abb. 5-1). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Phänotyp der ausbleibenden Separation der Schwesterchromatiden allein auf den Verlust der Sse-Funktion zurückzuführen ist.

Weitere Untersuchungen wurden auch mit einem *UAS-HASse*-Transgen durchgeführt. Bei diesem Konstrukt erfolgte die Fusion eines 6xHA-Epitops an den N-terminalen Bereich von SSE. Die Experimente zeigten, dass auch die ektopische Expression des HASSE-Proteins, vermittelt durch die *da-GAL4* Treiberlinie, zur Komplementation des transheterozygoten Sse⁻-Phänotyps führt (Abb. 5-5B, E-J).

5.2.5 Die proteolytische Aktivität von SSE ist essentiell

Die Experimente in *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass die Separase durch Proteolyse die Anaphase einleitet (Uhlmann et al. 2000). Um zu überprüfen, ob die proteolytische Aktivität auch für die Funktion von *D. melanogaster* SSE essentiell ist, wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem innerhalb von *UAS-HASse* das hochkonservierte Cystein 497 des katalytischen Zentrums durch ein Serin ausgetauscht wurde. Diese Mutation im *UAS-HASse^{C497S}*-Konstrukt sollte zu einem Verlust der proteolytischen Aktivität der N-terminal HA-epitopmarkierten Separase führen.

In der Folge wurde getestet ob das *UAS-HASse^{C497S}*-Transgen zur Komplementation des zytologischen Sse⁻-Phänotyps im Stande ist. Hierzu wurden wiederum aus Larven des späten dritten Larvenstadiums Gehirne des transheterozygoten Sse⁻-Genotyps präpariert, in denen *da-GAL4* gesteuert *UAS-HASse^{C497S}* exprimiert wurde. Die präparierten Gehirne zeigten keine Komplementation des Sse⁻-Phänotyps (Daten nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass das Ausbleiben der Komplementation auf einer fehlenden Expression oder Fehlfaltung des ektopisch exprimierten HASSE^{C497S}-Proteins basiert, wurden Immunopräzipitations-Experimente durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das HASSE^{C497S}-Protein in vergleichbarem Maße wie HASSE gebildet wird und mit PIM und

THR interagiert (Alf Herzig persönliche Mitteilung). Da HASSE^{C497S} somit dieselben Interaktionen zeigt wie endogenes SSE (Abb. 5-6, 5-8) muss angenommen werden, dass der proteolytischen Aktivität der Separase eine essentielle Bedeutung zukommt.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass die Separase auch in höheren Eukaryoten wie *D. melanogaster* eine essentielle Funktion beim Prozess der Separation der Schwesterchromatiden übernimmt und dass diese Funktion essentiell mit der proteolytischen Aktivität der Separase zusammenhängt.

5.3 Separase im Komplex mit PIM und THR

5.3.1 SSE interagiert im Two-Hybrid-Experiment mit PIM und THR

Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* ist die Separase in einem Komplex mit einer inhibitorischen Untereinheit, dem Securin, zu finden (Funabiki et al. 1996a; Ciosk et al. 1998). Um zu überprüfen, ob auch *Drosophila* SSE mit dem Securin PIM interagiert, wurden Two-Hybrid-Versuche und Koimmunopräzipitations-Experimente durchgeführt.

Die Two-Hybrid-Experimente zeigten eine starke Interaktion zwischen SSE und PIM (Abb. 5-6). Interessanterweise ist diese Wechselwirkung nicht mehr feststellbar, wenn anstelle von PIM das PIM²-Protein zusammen mit SSE exprimiert wurde (Abb. 5-6). Bei *pim*² handelt es sich um ein amorphes *pim*-Allel, das für ein Protein mit einer internen Deletion der Aminosäurereste 110-114 kodiert (Stratmann und Lehner 1996). Auch für THR ist bereits beschrieben, dass es *in vivo* mit PIM interagiert (Leismann et al. 2000). Wurde für den Two-Hybrid-Interaktionstest ein N-terminales THR-Fragment (AS1-933) herangezogen, so war eine direkte Interaktion mit PIM² feststellbar, die sich von der Wechselwirkung zu PIM kaum unterscheidet (Abb. 5-6). Diese Interaktion zwischen THR 1-933 und PIM² zeigt, dass die interne Deletion der Reste 110-114 zum spezifischen Verlust der Wechselwirkung mit SSE führt, und dass dieser Verlust nicht auf eine Destabilisierung oder Fehlfaltung des PIM²-Proteins zurückzuführen ist. Weitere Two-Hybrid-Experimente zeigten, dass SSE mit der N-terminalen Hälfte von PIM (AS 1-114) interagiert, während das N-terminale THR-Fragment (AS1-933) mit der C-terminalen Hälfte von PIM (AS 115-199) wechselwirkt (Abb. 5-6). Die Interaktionsdomäne innerhalb von SSE, die für die Interaktion zu PIM ausreicht, liegt ebenfalls N-terminal (AS1-247). Neben der Wechselwirkung von SSE mit dem Securin PIM, kann SSE auch direkt mit THR interagieren (Abb. 5-6). Diese Interaktion kann mit dem vollständigen SSE-Konstrukt und mit dem N-terminalen Fragment von SSE (AS 1-247) (Abb. 5-6) nachgewiesen werden. Zusammenfassend geht aus den Two-Hybrid-Experimenten

hervor, dass die drei Proteine PIM, THR und SSE direkte Wechselwirkungen untereinander eingehen.

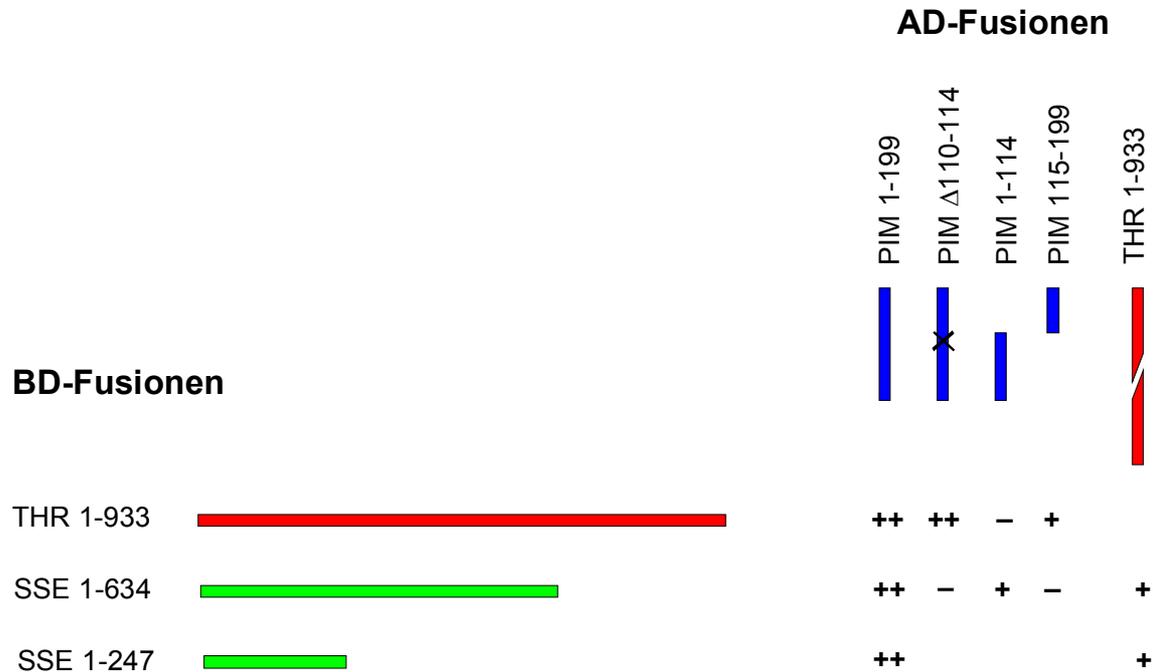


Abbildung 5-6: Interaktionen von PIM, THR und SSE im Hefe Two-Hybrid-Experiment.

Verschiedene Deletionskonstrukte von PIM (blaue Balken), THR (rote Balken) und SSE (grüne Balken) wurden als Translationsfusionen mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD-Fusionen) oder mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD-Fusionen) konstruiert. Wenn eine Interaktion feststellbar ist, führt dies zur Aktivierung der Reportergene *HIS3* beziehungsweise *ADE2*, die das Wachstum auf den entsprechenden Selektivmedien SD-Leu-Trp-Ade und SD-Leu-Trp-His ermöglicht. Als ++ wurde gekennzeichnet wenn beide GAL4-Reportergene aktiviert wurden, bei + erfolgte nur die Aktivierung eines Reportergens und – zeigt an, dass keines der Reportergene aktiviert wurde. Bei dem in blau dargestellten PIM Δ 110-114-Konstrukt handelt es sich um PIM², bei dem die Aminosäurereste 110-114 deletiert sind (durch das Kreuz innerhalb des Balkens dargestellt). In dieser Abbildung sind auch Daten enthalten, die auf Experimenten von Alf Herzig basieren.

5.3.2 Anti-SSE-Antikörper erkennen endogenes SSE

Der Nachweis von SSE im Immunoblot erfolgte durch zwei affinitätsgereinigte anti-SSE-Antikörper aus Kaninchen. Beide Antikörper erkennen eine Bande bei 75 kDa, die dasselbe Laufverhalten zeigt wie *in vitro* translatiertes SSE (Abb. 5-7). Die durch den *da-GAL4*-Treiber vermittelte ektopische Expression von UAS-SSE führte ebenfalls zu einer deutlichen Verstärkung dieser Bande, so dass diese Proteinbande dem endogenen SSE zuzuordnen ist (Abb. 5-7). Die Affinität des anti-SSE-aff. 1 Antikörpers gegenüber dem bakteriell exprimierten SSE-Fragment 1-281 ist etwa um das vierfache höher als die von anti-SSE-aff. 2 (Daten nicht gezeigt).

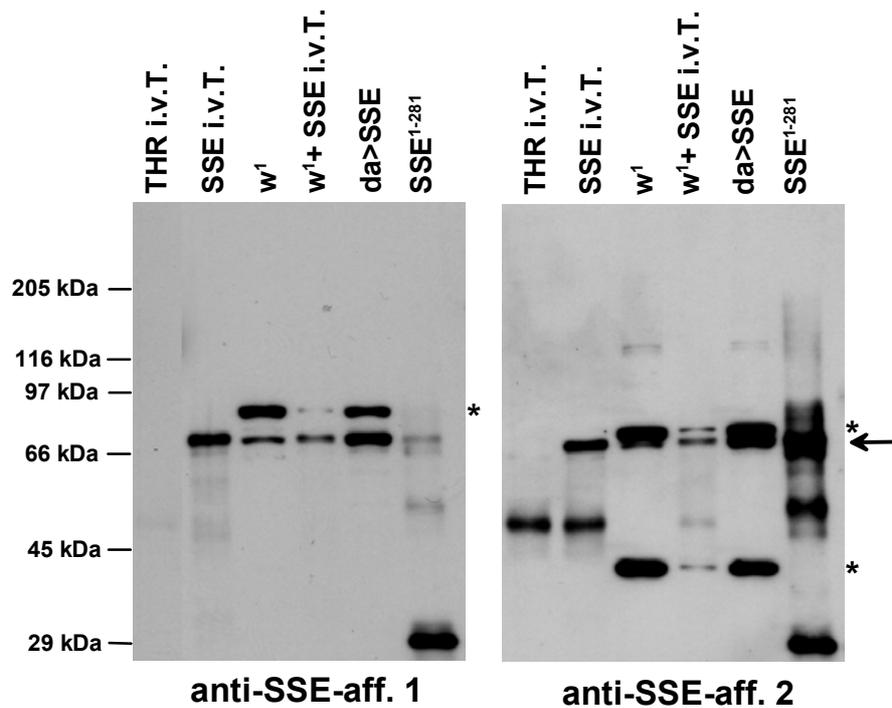


Abbildung 5-7: Charakterisierung der affinitätsgereinigten SSE-Antikörper.

Zur Prüfung, ob die beiden affinitätsgereinigten SSE-Antikörper endogenes SSE erkennen, wurde *in vitro* translatiertes SSE (SSE i.v.T.) zusammen mit einem Extrakt aus 2-4h alten *Drosophila w¹*-Embryonen durch einen Immunoblot analysiert. Als Kontrolle der Spezifität der anti-SSE-Antikörper diente *in vitro* translatiertes THR (THR i.v.T.). Des Weiteren aufgetragen ist ein Extrakt aus 4-8h alten Embryonen, bei denen *da-GAL4* vermittelte UAS-SSE-Expression erfolgte (*da>SSE*), sowie ein Extrakt einer Bakterienkultur, die das N-terminale SSE-Fragment (AS1-281) exprimierte (SSE¹⁻²⁸¹). Die gereinigte Fraktion dieses bakteriellen Protein-Extraktes diente zur Immunisierung der beiden Kaninchen. Zusätzlich wurde das SSE-*in vitro*-Translatat mit dem *w¹*-Extrakt gemischt. Der Pfeil markiert die von beiden anti-SSE-Antikörpern erkannte SSE-Bande und die mit Stern markierten Banden sind auf Kreuzreaktionen der Antikörper zurückzuführen.

5.3.3 SSE interagiert *in vivo* mit PIM und THR

Um zu überprüfen, ob die Two-Hybrid-Ergebnisse (Abschnitt 5.3.1) auch *in vivo* bestätigt werden können, wurden Koimmunopräzipitations-Experimente durchgeführt. Als Ausgangsextrakte für die Koimmunopräzipitationen dienten Homogenisate der 3-6 h alten Embryonen von *w¹*, *UAS-Cdk1-myc*, das ektopisch über *arm-GAL4* exprimiert wurde, *gpim-myc* oder *gthr-myc*. Die Immunopräzipitationen erfolgten mit einem Antikörper gegen das myc-Epitop, mit dem anti-SSE-aff. 2 Antikörper und mit IgGs von nicht immunisierten Kaninchen.

Der Immunoblot der Präzipitation mit dem Antikörper gegen das myc-Epitop zeigte, dass SSE mit THR-myc und PIM-myc *in vivo* wechselwirkt (Abb. 5-8A). Diese Interaktionen sind spezifisch, da mit CDK1-myc zwar der bekannte Interaktionspartner Cyclin B (CYCB) präzipitiert werden konnte, nicht jedoch SSE (Abb. 5-8A). Der Immunoblot der Präzipitation mit dem anti-SSE-aff. 2 Antikörper bestätigte die Spezifität der Interaktion zwischen SSE und PIM-myc beziehungsweise THR-myc (Abb. 5-8B). Zusammenfassend wurde dadurch klar gezeigt, dass SSE *in vivo* mit PIM und THR interagiert.

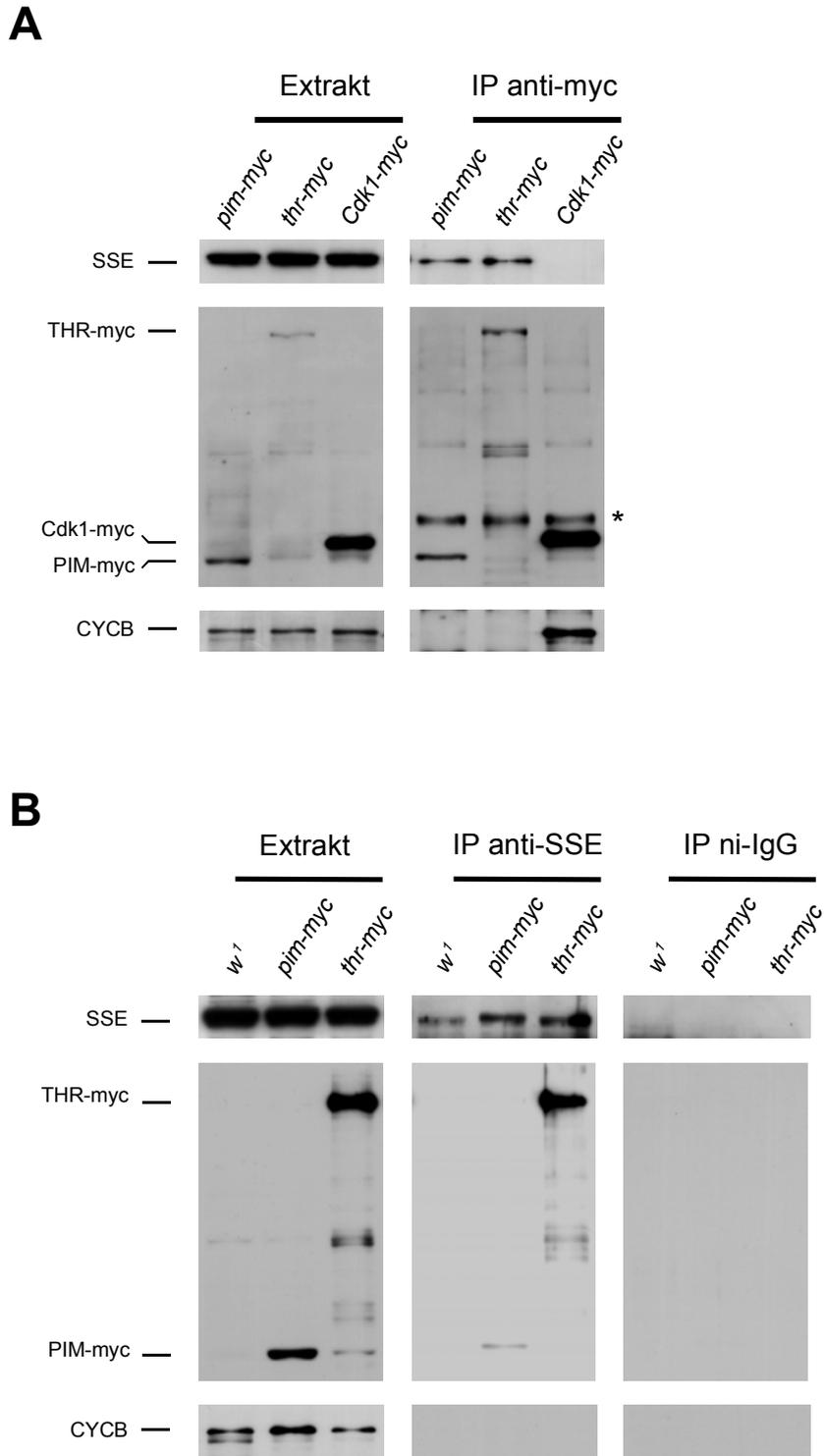


Abbildung 5-8: SSE interagiert *in vivo* mit PIM und THR.

Aus 3-6h alten Embryonen wurden Extrakte aus *w¹*, *gpim-myc* (*pim-myc*), *gthr-myc* (*thr-myc*) oder *UAS-Cdk1-myc* (*Cdk1-myc*) hergestellt. Bei den Extrakten der Embryonen aus *pim-myc* und *thr-myc* erfolgt die ektopische Expression der myc-epitopmarkierten Proteine unter Kontrolle des endogenen Promotors, während die Expression von *Cdk1-myc* in den Embryonen von *Cdk1-myc* durch *arm-GAL4* vermittelt erfolgt. Diese Extrakte wurden zusammen mit den Immunopräzipitationen eines Antikörpers gegen das myc-Epitop (IP anti-myc) (A), des anti-SSE-aff. 2 Antikörpers (IP-anti-SSE) und der IgGs aus nicht immunisierten Kaninchen (IP-ni-IgG) (B) über Immunoblotting analysiert. Zum Nachweis der Proteine wurden die Antikörper gegen SSE, gegen das myc-Epitop sowie gegen Cyclin B (CYCB) verwendet. Der Stern markiert Banden, die von den schweren Ketten des Antikörpers gegen das myc-Epitop stammen.

Zur Bestimmung der Komplexzusammensetzung *in vivo* konnte in weiteren Koimmunopräzipitationen von Alf Herzig gezeigt werden, dass SSE in Abwesenheit von PIM auch *in vivo* mit THR interagiert. Im Unterschied zum Ergebnis aus dem Two-Hybrid-Experiment war die im Koimmunopräzipitations-Experiment feststellbare Wechselwirkung zwischen SSE und PIM in Abwesenheit von THR nur sehr schwach ausgeprägt (Alf Herzig, persönliche Mitteilung). Waren alle drei Proteine vorhanden, so konnten sie in etwa gleicher Menge präzipitiert werden (Alf Herzig, persönliche Mitteilung). Diese Experimente erfolgten mit Extrakten aus 12-15 h alten Embryonen in denen diejenigen Kombinationen der epitopmarkierten Proteine über das GAL4/UAS-System ektopisch exprimiert wurden, deren Interaktion untersucht wurde. In diesen Extrakten sollten infolge der Instabilität von PIM und THR die endogenen Produkte sehr stark reduziert sein (Abb. 5-9). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass PIM,THR und SSE *in vivo* einen ternären Komplex ausbilden und dass zusätzlich zu diesem Komplex auch ein dimerer THR/SSE-Komplex existiert.

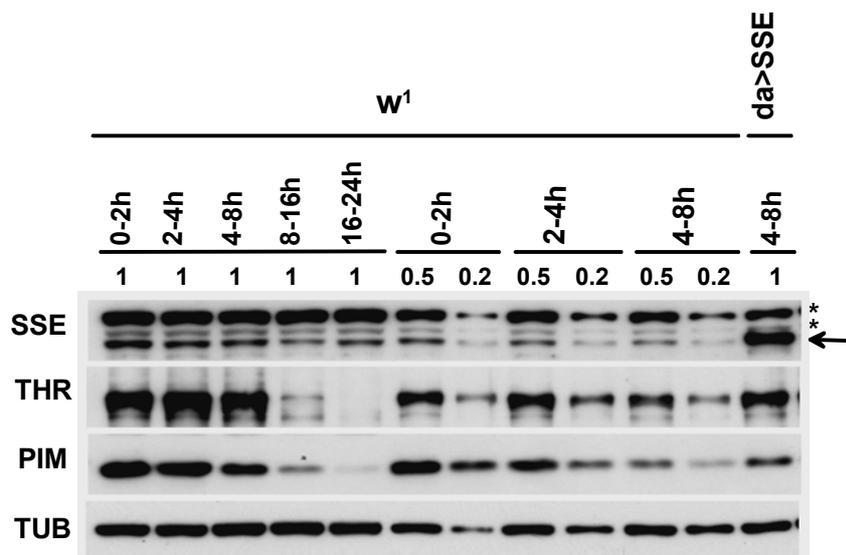


Abbildung 5-9: Proteinestabilität von SSE während der Embryonalentwicklung.

Die Proteinestabilität von SSE, PIM und THR wurde anhand von Extrakten aus *w*¹-Embryonen des Alters 0-2 h, 2-4 h, 4-8 h, 8-16 h und 16-24 h überprüft. Weiterhin wurde als Kontrolle ein Extrakt von 4-8 h alten Embryonen aufgetragen, bei dem die *UAS-Sse*-Expression *da-GAL4* vermittelt erfolgte (*da>SSE*). Die SSE-Sondierung erfolgte mit dem Antikörper anti-SSE-aff. 1. Zusätzlich erfolgten Sondierungen gegen THR und PIM. Die Sondierung gegen Tubulin (TUB) diente der Quantifizierung der Lademengen. Die mit Pfeil markierte Bande entspricht der SSE-Bande und die mit Sternen markierten Banden sind Kreuzreaktionen des Antikörpers anti-SSE-aff. 1. Mit 1, 0.5 und 0.2 sind die Lademengen angegeben. Bei 0.5 wurden 50 % der zuvor mit 1 bezeichneten Menge des jeweiligen Extraktes und bei 0.2 wurden 20% des Ausgangsextraktes auf das Proteingel aufgetragen.

5.4 Separase-Komplexe aus *D. melanogaster*

Die Ergebnisse der Two-Hybrid-Experimente und der Koimmunopräzipitationen erlauben es ein Arbeitsmodell zu entwerfen (Abb. 5-10). Nach dem Modell bildet sich der trimere Komplex bestehend aus SSE, PIM und THR im Verlauf der Interphase aus und bleibt bis zur proteolytischen Degradation des Securins PIM am Metaphasen/Anaphasen-Übergang bestehen. Dieser Komplex stellt den inaktiven Separase-Komplex dar. Durch die Securin-Degradation kommt es zur Bildung des binären Separase-Komplexes, bestehend aus SSE und THR, der die aktive Form des Komplexes repräsentiert. Nach diesem Modell sollte der aktive binäre Komplex proteolytische Aktivität entfalten.

Die Ergebnisse des Two-Hybrid-Interaktionstests zwischen THR und PIM zeigen dieselbe Wechselwirkung, wie es bereits für die Separase/Securin-Wechselwirkung von *S. cerevisiae* und *S. pombe* beschrieben wurde (Kumada et al. 1998; Jensen et al. 2001). Aufgrund dieses Ergebnisses kann vermutet werden, dass THR dem N-terminalen Teil der „großen“ Separasen gleichgesetzt werden kann. Dies wird im Modell durch die gestrichelte Verbindung zwischen dem C-Terminus von THR mit dem N-Terminus von SSE angedeutet. Diese Verbindung soll des Weiteren andeuten, dass die Separase in *D. melanogaster* aus *Sse* und *thr* aufgebaut ist. Der Unterschied zu den bekannten „großen“ Separasen könnte dadurch erklärt werden, dass in *D. melanogaster* eine Aufspaltung eines ursprünglich „großen“ Separasegen in *Sse* und *thr* erfolgte.

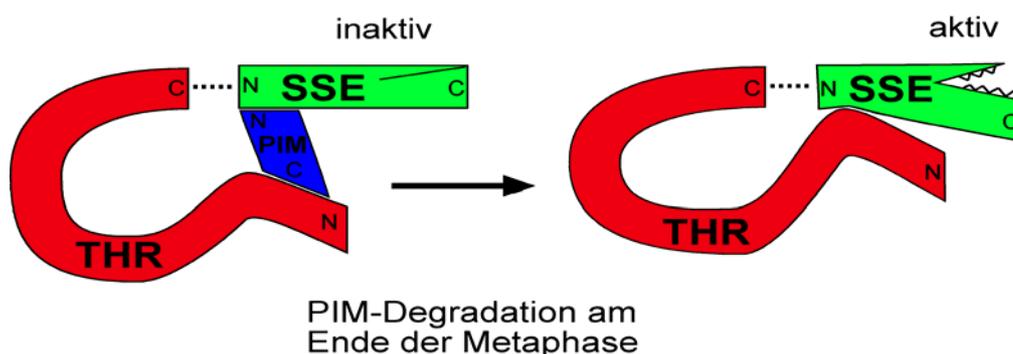


Abbildung 5-10: Modell für den SSE/PIM/THR-Komplex.

Im Verlauf der Interphase kommt es zur Ausbildung eines trimeren Komplexes bestehend aus SSE, PIM und THR. In diesem Komplex ist SSE inaktiv. Am Ende der Metaphase wird PIM in einer APC/C-abhängigen Reaktion degradiert. Dadurch kommt es zur Ausbildung des aktiven binären Komplexes zwischen SSE und THR, der für die Spaltung des Scc1 *Drosophila* Homologs verantwortlich sein sollte. Der C-Terminus von THR ist in Verbindung mit dem N-Terminus von SSE gezeigt. Dies soll andeuten, dass THR den korrespondierenden N-terminalen Teil von Separasen aus anderen Organismen darstellt. Dies lässt weiter vermuten, dass in *D. melanogaster* eine Trennung einer ursprünglich „großen“ Separase in die beiden Gene *Sse* und *thr* erfolgte.

5.5 SSE-, THR- und PIM-Orthologe aus weiteren *Drosophiliden*

5.5.1 SSE-Orthologe aus entfernt verwandten *Drosophiliden*

Der im Arbeitsmodell postulierte trimere Separase-Komplex bestehend aus SSE, PIM und THR unterscheidet sich von den bekannten binären Separase-Komplexen aus anderen Eukaryoten. Diese bestehen aus einer „großen“ Separase, die mit ihrer inhibitorischen Untereinheit, dem Securin, assoziiert sind. Um einschätzen zu können, welche Bandbreite an Spezies ebenfalls über einen trimeren Separase-Komplex verfügt, wurde versucht in entfernt verwandten *Drosophiliden* die zu *Sse*-, *thr*- und *pim*-orthologen Gene zu isolieren. Zur Isolierung von *Sse*-orthologen Genen wurde mit degenerierten Oligonukleotiden über PCR aus genomischer DNA von *D. virilis* und *D. willistoni* ein Bereich der konservierten Separase-Domäne amplifiziert. Mit diesen *Sse*-Amplifikaten aus *D. virilis* und *D. willistoni* gelang es die orthologen Gene *D. virilis* *Sse* (*DvSse*) und *D. willistoni* *Sse* (*DwSse*) zu identifizieren (Abb. 8-1, 8-2). Bei *D. virilis* und *D. willistoni* handelt es sich um entfernte Verwandte von *D. melanogaster* (Abb. 5-11).

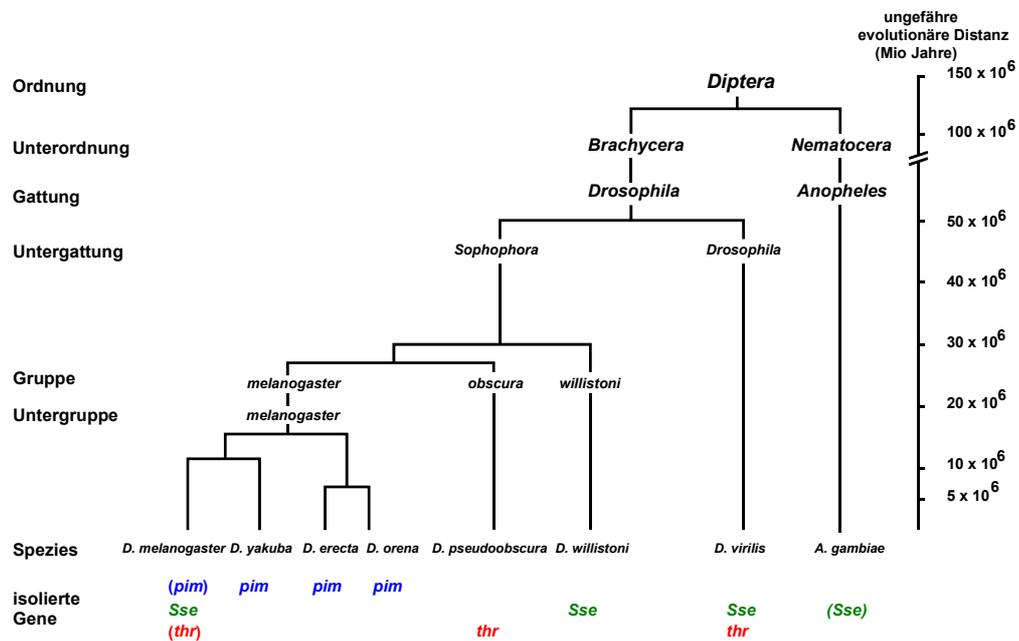


Abbildung 5-11: Ausschnitt des Stammbaums der Dipteren.

In diesem evolutionären Stammbaum ist ein Ausschnitt der Ordnung der *Dipteren* dargestellt. Die angenäherte evolutionäre Distanz zwischen den unterschiedlichen Spezies ist am rechten Rand als Zeitskala dargestellt. In blau sind die in dieser Arbeit isolierten *pim*-orthologen, in grün die *Sse*-orthologen und in rot die *thr*-orthologen Gene markiert. Sie sind unter den Organismus geschrieben, aus dem sie identifiziert wurden.

Über den Vergleich der abgeleiteten SSE-Proteine von *D. virilis* und *D. willistoni* mit SSE aus *D. melanogaster* war es möglich die genomische Organisation der *Sse*-Orthologen festzulegen (Abb. 5-12). Die vorhergesagten Exon-Intron-Übergänge der *Sse*-orthologen

Gene wurden zusätzlich über die Sequenzierung von cDNA-Klonen abgesichert. Bei den cDNA-Klonen handelte es sich um PCR-Amplifikate aus einer zuvor über reverse Transkription hergestellten Erststrang-cDNA-Bibliothek aus *D. virilis* und *D. willistoni* Embryonen.

Die Exon-Intron-Struktur der drei Separase-Gene ist weitestgehend identisch. Die Ausnahme bildet das vierte Intron von *DmSse* und *DvSse*, das in *DwSse* fehlt.

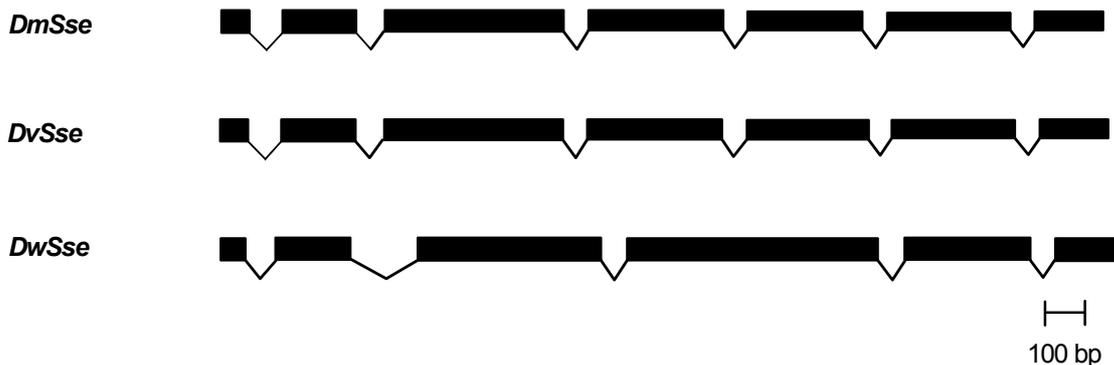


Abbildung 5-12: Genomische Organisation der drei Sse-Gene.

Mit Ausnahme des Fehlens von Intron 4 in *DwSse* sind die Positionen der Introns in den Sse-orthologen Genen konserviert. Die Exons sind als schwarze Rechtecke dargestellt. Die dazwischenliegenden Intronbereiche sind durch die Verbindung zwischen den Exons dargestellt. Die 5'- und 3'- untranslatierten Bereiche der Sse-orthologen Gene sind nicht eingezeichnet.

Die Sequenzen der cDNAs von *DvSse* und *DwSse* zeigen weiter, dass stromaufwärts der vermutlichen Startkodons im 5'-untranslatierten Sequenzbereich Stopkodons innerhalb des Leserahmens auftreten (Abb. 8-1, 8-2). Dies ist ein starker Hinweis, dass die isolierten Sse-cDNA-Klone von *D. virilis* und *D. willistoni* komplette cDNA-Klone darstellen. Die hieraus abgeleiteten Größen der Separasen sind mit 640 AS für *DvSse* und mit 635 AS für *DwSse* der Größe von SSE aus *D. melanogaster* (*DmSse*) mit 634 AS sehr ähnlich.

Durch Northern-Blot-Analyse von mRNA aus 0-10 h alten Embryonen wurde untersucht, ob die isolierten cDNA-Klone von *D. virilis* und *D. willistoni* vollständige Transkripte repräsentieren (Abb. 5-13). Die nachweisbaren Sse-Transkripte von *DvSse* und *DwSse* zeigen Größen zwischen etwa 2,0 und 2,2 kb. Die identifizierten Sse-Transkripte der beiden *Drosophiliden* können damit maximal für Proteine zwischen 670 und 740 AS kodieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass in *D. virilis* und *D. willistoni* die Größe der Transkripte gut mit den Größen der identifizierten cDNA-Klone übereinstimmen. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die cDNA-Klone vollständig sind. Voraussetzung für die korrekte Interpretation der Größe der Sse-Transkripte ist, dass über die Northern-Blot-Analyse auch größere Transkripte nachweisbar sind. Für *D. virilis* wurde deshalb das zu *thr*-orthologe Transkript aus *D. virilis* nachgewiesen, das eine Größe von etwa 4,3 kb aufweist (Abb. 5-13).

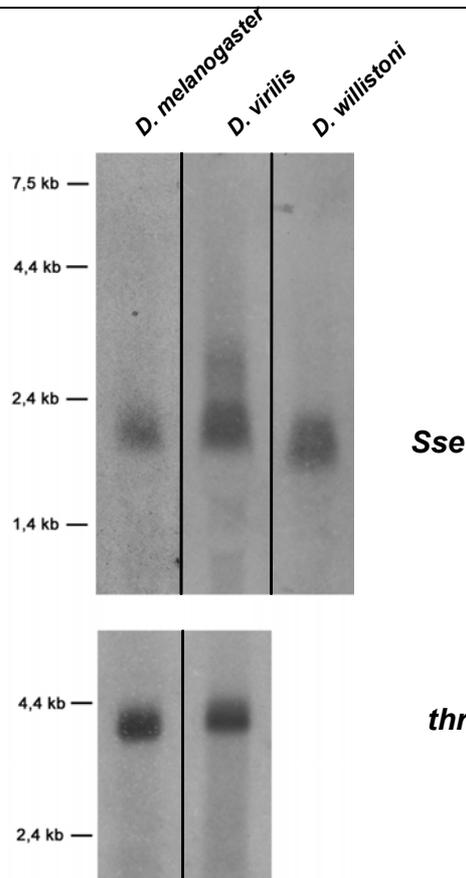


Abbildung 5-13: Northern-Blot Nachweis von Sse- und thr-spezifischen Transkripten.

Über Northern-Blot Analyse von mRNA aus 0-10 h alten Embryonen von *D. melanogaster*, *D. virilis* und *D. willistoni* wurden mit spezifischen DNA-Sonden die Sse- sowie thr-Transkripte nachgewiesen. Am linken Rand sind die Größen eines RNA-Längenstandards dargestellt. Der obere Abschnitt zeigt die Identifikation der Sse-Transkripte und der untere Abschnitt den Nachweis der thr-Transkripte.

Ein Sequenzvergleich der drei SSE-Proteine (Abb. 5-14) ergibt eine Sequenz-übereinstimmung die im Bereich zwischen 53% und 61% liegt. Innerhalb des Sequenzvergleichs lassen sich fünf Bereiche identifizieren, die neun oder mehr konservierte benachbarte Aminosäuren umfassen. Zwei dieser fünf Abschnitte sind die hoch konservierten Bereiche um die katalytischen Aminosäurereste Histidin und Cystein, welche die katalytische Duade der Proteasen der CD-Familie bilden. Des Weiteren fällt auf, dass vier der fünf konservierten Blöcke im C-terminalen Drittel lokalisiert sind. In diesem Punkt stimmen die SSE-Orthologen mit den „großen“ Separasen überein, denn auch in diesen ist der C-terminale Teil der konservierteste Proteinabschnitt. Vergleicht man die vier C-terminalen konservierten Blöcke der SSE-Orthologen mit den entsprechenden Abschnitten der bekannten „großen“ Separasen, so fällt auf, dass diese vier Bereiche allgemein konserviert sind (Abb. 5-3B). Die Sequenzübereinstimmung dieser Regionen ist jedoch innerhalb der „großen“ Separasen deutlicher ausgeprägt. Der fünfte, N-terminal lokalisierte, konservierte Block kann in den anderen Separasen nicht identifiziert werden und repräsentiert eventuell einen für die Separasen der *Drosophiliden* spezifischen Bereich (Daten nicht gezeigt).

```

DmSSE      1 MLETGDEAEMLAGFTSSDDVGPEAKEYNLLRADEEYRNGNVEHSIYYQVKAQFQSTDLRYLTESAELENQR
DvSSE      1 MFDAEATENELTSLTSVLGPETKKEYNLLRADEEYRNGNEQDSIYYQVRALFQCADMRLLTEAQELENQQ
DwSSE      1 --MELMDSLLLSSYHNADLGPKEAKENLLKADEEYRNNRLDHSIYYQVRAQFHSTDLRYLSELEQLDHF
  . . . . . * . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      71 PTAEELIKSATKLEKKDYKSKFLQNI IKYLQQMEQEQPKKPINEIPEYL---DFLDDVQDPTEGLTRI
DvSSE      71 PSTAEILSEASAKEKADYKSNKFFQNILRYQQKLEQSKAKIK--EPPVDSL---DFLEDVSEPTAGFARI
DwSSE      69 PNIKDLLANASGKEQKDYKRNFQNIILVNLKDEKRCRNKKNKRS LPTGSMTKFDFLEDIRQPSDGWERI
  * . . . . * . . . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      138 SEKNSLPQEWCVLQLCKSFNPATTVSVFNEIIASDGA IYLTLLRHRCS SQLGPICLKISNENTANLFRE
DvSSE      136 THICRQLPDEWCVLQLCKSFNAATTVSTFCEIAGANGDIYVSLLRHRCSPELAATCLRLNSDAMASLFKA
DwSSE      139 TDICRQLPNEWCVIQLTKSYNPSTTVSYNEIASSKGS IYLAMLRHRCSPELEPTCLKVTNERLVEVFQE
  . . . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      208 YSTLVERFRRVVTVDP LNMKGKEAKQKYWEELNGFD TFLQKLLADFRDIISPYSFLFFGKRYDCTVVQKQ
DvSSE      206 YGTLVERFRRVVTVDP LTVKAQEA KAKYKVEVNAFE EFLKKLIADLGSVFPSPYSVFLGKRYPSAAVQQQ
DwSSE      209 YSTLVERFRRVVNDP IILAKNKETKRKYWVDLHEF GKVLEKLIADLREIILPYAF LFGKRYATKSVTKL
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      278 IKATYTRVDDFCLLNQWGTHQRVLLSQAASHANRLEIADLKLICYELS-----SNENIQSAYELLK
DvSSE      276 TKAVYGRVDEFCVQHSWNHQRVLLSQAALHANR LPRDQMKQLSYELSGNSQNNNNNTEALLVYELLK
DwSSE      279 SQQIFREVDFECQHKNQHQRIILSQAAYHANHIKKADI AVL SWKLAS-----DNEEAMQLVEDLLN
  . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      340 GLASDWAEEVEERQPLASRRFPIILVVDERLDHLHWEQLVTVQEF SRVKS LHCLWRL FQNHKSNIKHGYYT
DvSSE      346 SCASDWQLEQREPLAAKRFPIILVVDERLDHMHW EQLASMQECTRIKSLHSLWRLFKCHKNIQCYYT
DwSSE      342 KWSQNWEELKELS--SHKRFP TILVVDERLDHFW EQLATTQEF SRVKS LHLLWRLYQWHKPNIIHHGYYT
  . . . * . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      410 TNIKRGMCVINPDADLVNSGRRLRSFFEYWLSQW QHLFETVPNEEVMVKQALQADCFVYAGHGSGLYYVN
DvSSE      416 VNIKRGITVINPDADLANSGRRLRSFLEYWLTHW EHMVETVPSEQFMLEKAFKADCFVYAGHGSSLQYVS
DwSSE      410 VNIESGISVINPDGDL PNSGRRLRGFFEYWLGHWRNMFETVP TEDVIVKEVFKSKCFVYAGHGSGLYYIS
  . . . * . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      480 GRIICRARVRSV VFLFGCDSTRMLGTGLYSALYGA HDYYHGALCPSIVGTLMPALDGNMDTISVTILSRW
DvSSE      486 TRLIYRNRIKGV VFLFGCDSTRVLSSGLYSALYGA QDYHGALCPTVMGTLMPALDANMDNVSANMLSQW
DwSSE      480 GRTICRCRVEGI VFLFGCDSTKILGTGLHSALYGS HDYYHGALCPTIVGTLMPALDSNIDNISSILSKF
  . * . * * * . . . * * * * * * * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      550 LAPGDNKMPWTHIDRV PWLKNGI IKGKDE--TPTMNDQPNYH LGS LCSILSLVQQKVEPNINCCIYV
DvSSE      556 TKPANPQIVP WTHIDRQAWISQGT VKALKG--NTETLAQQPDY QLGSLCAILANVHM GKTEPKIYNCCVYV
DwSSE      550 LAPSHRKMPWSEIDT VTWVKKGLVQAQDES NPQYLDQYADY QMGSLPAIISRVQQGLIDPVI FNCCIYV
  . * . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DmSSE      619 CRGLPAWNLA VEK LPL 634
DvSSE      625 CRGLPAWNLA VQQLPF 640
DwSSE      620 CRGLPAWNLSV QKMPF 635
  * * * * * * * * * * * * * * * * . . . . .
  
```

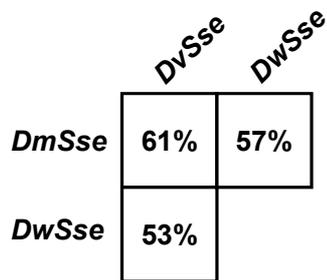


Abbildung 5-14: Sequenzvergleich der SSE-Proteine.
 Sequenzvergleich der SSE-orthologen Proteine aus *D. melanogaster*, *D. virilis* und *D. willistoni*. Die hervorgehobenen Bereiche markieren Protein-Sequenzabschnitte, in denen neun oder mehr benachbarte Aminosäuren innerhalb der drei SSE-Orthologen konserviert sind. Die schwarz unterlegten Bereiche markieren die Region der katalytischen Duade der Separase, wobei die katalytischen Reste Histidin und Cystein durch Pfeile markiert sind. Die grau unterlegten Bereiche markieren drei zusätzliche in den SSE-Orthologen konservierte Sequenzabschnitte. Ein Stern unterhalb der Sequenzen markiert Positionen, an denen alle drei Sequenzen übereinstimmen und ein Punkt Positionen, an denen die Sequenzen Ähnlichkeiten besitzen. Im unteren Teil der Abbildung sind die prozentualen Sequenzidentitäten zwischen den unterschiedlichen SSE-Orthologen dargestellt.

5.5.2 THR-Orthologe aus entfernt verwandten *Drosophiliden*

Da die *Sse*-Gene aus *D. willistoni* und *D. virilis* für kleine Separasen kodieren, ist nach dem Modell anzunehmen, dass in diesen *Drosophiliden* auch zu *thr*-orthologe Gene existieren. Obwohl es nicht möglich war, das *thr*-Ortholog aus *D. willistoni* zu identifizieren, gelang es die zu *thr*-orthologen Gene aus *D. pseudoobscura* und *D. virilis* zu isolieren (Abb. 8-3, 8-4). *D. pseudoobscura* ist ein weiterer entfernter Verwandter von *D. melanogaster* (Abb. 5-11). Über den Vergleich der abgeleiteten Leserahmen von *thr* aus *D. pseudoobscura* (*Dpthr*) und *thr* aus *D. virilis* (*Dvthr*) mit THR aus *D. melanogaster* war es möglich für diese beiden Gene die Exon-Intron-Struktur vorherzusagen (Abb. 5-15). Für *D. virilis* wurde dies über die Sequenzierung eines cDNA-Klons abgesichert. Dieser cDNA-Klon war wiederum ein PCR-Amplifikat aus der *D. virilis* Erststrang-cDNA-Bibliothek.

Während die Position der beiden 5'-terminalen Introns in allen drei *thr*-Genen konserviert ist, sind in *Dvthr* zwei zusätzliche weiter 3'-terminal gelegene Introns identifizierbar (Abb. 5-15).

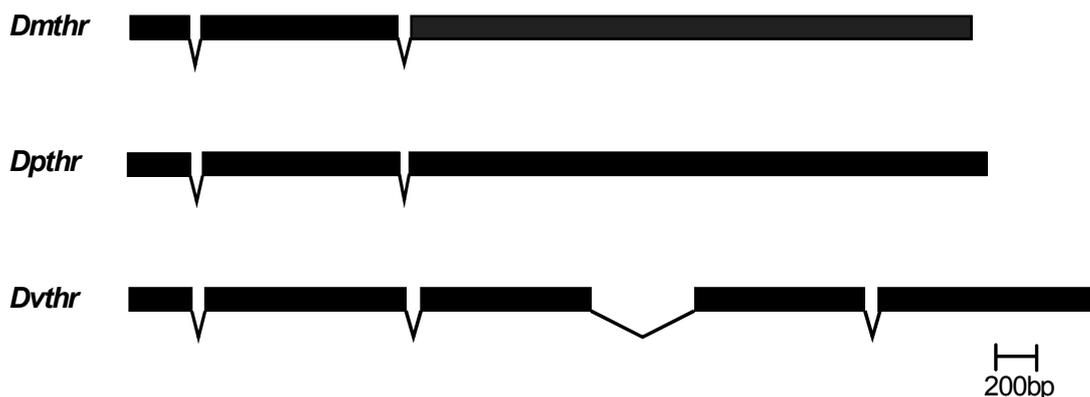


Abbildung 5-15: Genomische Organisation der drei *thr*-Gene.

Mit Ausnahme der zusätzlichen Introns 3 und 4 in *Dvthr* sind die Positionen der Introns in den *thr*-orthologen Genen konserviert. Die Exons sind als schwarze Rechtecke dargestellt. Die dazwischenliegenden Intronbereiche sind durch die Verbindung zwischen den Exons dargestellt. Die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche der *thr*-orthologen Gene sind nicht eingezeichnet, da hierzu von *Dpthr* und *Dvthr* keine Daten vorliegen.

Die Größe von DpTHR mit 1409 AS und DvTHR mit 1411 AS ist vergleichbar zu THR aus *D. melanogaster* (DmTHR), das eine Größe von 1379 AS aufweist.

Die THR-Orthologen zeigen eine Sequenzübereinstimmung, die zwischen 41% und 57% liegt (Abb. 5-16). Im Vergleich zu den SSE-Orthologen, bei denen 5 konservierte Bereiche mit neun oder mehr benachbarten Aminosäuren nachweisbar sind, lassen sich in den THR-Orthologen nur drei konservierte Bereiche identifizieren, mit sieben oder mehr identischen benachbarten Aminosäureresten und dies obwohl die THR-Orthologen doppelt so groß sind wie die SSE-Orthologen. Somit sind die THR-Orthologen im Vergleich zu den SSE-Orthologen weniger konserviert.

DmTHR	1	MST-DIATQLKGRSRSDVEKVRKTVEAKFRELSG-----DGLPLRYEVNVLRHICLALKDNLHQNSDLYC
DpTHR	1	MSA-DIVKQLKGRSRSDVKAATTELKFKFESKIGINDASFLRYELSVLRQLCLALKDNLHQHADLYC
DvTHR	1	MSLGDVKEQLGRSRTEAKNAAKLIQVQFERVRNGGTTVALRALKYELNLRQLCCALQENFHQHADIYC ** * . **.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	64	DIMGIMLPRVVPCEEKPSLWEAHLSSLRYIHHGLFHQRSIEACQKLYNLIRQQPCRLQEEESDYKIYLDIH
DpTHR	70	GIAATMLPHVEPYEEKPSLWEAHLTSLRYIHHGLCQERSLTECQKIYGLIRSQPCRLQEEADYKYFYLDIH
DvTHR	71	DIAADMLPHVAPHLPPQDYWNHLSLQYIHHALCREQTIKQCQRFYELINAQSCQMKNKSEYKYIIDIH . . . **.* * * ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	134	LTHFNQFHVLLQKQKLEATSQCYALESGLDFAAMTQRQISLCATLLVQLNES--LFGKRSRSFFKS
DpTHR	140	LTHFNQIYLQMKEKPLAATDQLYALEAMGVLFDTMHRKVAKNAALLVQLNDS--LFSKRTKAFLKY
DvTHR	141	IRHVYFFGHQLGKQSAASEAKAQLCQALQALGKLEENMLQLKAEQNEGYSELMGELNQLGKRSIGYLNK*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	202	LSFLPSESLAKMFNALLMLLAS---STSSNLANLFPECLSLTLALVQID----MFSPQS--NQMSLQL
DpTHR	208	LSALPPESTTKMYDPLKLLSWSWATPSELTNQFTEYLGLVLAALVQID----MFSIEAPLEQQLLKL
DvTHR	211	LASLPLTAMNRLWKPLFKLIACN--GGTDQLNAQFSEYLSALLALLQDDNVWQLQQSEAQAQTPLSLQL * . ** ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	262	LRMSKELFRQESNLQCYALQMLYYIKLIFVREPTGDFKRTYIDLSSKFQHFFEHKVAHAVEQWLADFLV
DpTHR	273	LRICRDLYKDVSPQNYISIQLLYYVKLMYVREATAADFKQTYIDLCKKFVYFFEHHKATHAKEQWFMDDLIV
DvTHR	280	LHSCRELYKNQTAQNNVLQLLYNYLKLNT--QADLKRYSIDLAKKVFVHFEHKAHSVHVEQWYLDLFL *.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	332	AIQLLQVLIHQSNKLSQPFQIFWQQFDGESSPDIYTAHFQLLQTCASLAVNITR-SPLGCTCS--HEAC
DpTHR	343	FFQRLQTLHQSNN--KPPLDIFWQQLEGDDSEVYTAHFQLLHGCLGLAVNVVR-SPLGTSCS--NEAC
DvTHR	348	VLVRVQKHLHQIDN-KVPSLERFQCLGGQDSATAYAAHFELLQCLTSRVMKIGRGSPLAASCSGNDASC*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	399	KSVRRHCILAYGLCALDAYINWKPAEQKTNVSPHKPLLVVYKYSMDVAKTMKCLGPTSVEIIKLVQRIT
DpTHR	408	KSIRRHCLLYFGMCALEAYINWQPTTEQKADKAPYKPLLGILGYTLVAKSMKCLGPCAMELVKLVRLLA
DvTHR	417	PSVLKHCVFTLGCCATVAYSSWQPEAQTLPKASQLCLASIIHYAIDVAKVTKCLTPNSELVTFAWYLI . . . **.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	469	YVADQVTCPEQMSVLLPLEPLQKLRPLVADQDMSLLRRLFKASSHCSDSNIACRIQASYLASITNPAR
DpTHR	478	LVAEKVSCPEQMSLVLAFLPLEQLRPLIASQDMSVLRRIYKASVHCKSSDMANRLQSTYLAALTNPSP
DvTHR	487	NMAEKVTTATQMYLLEHLLKPLQELRPLSPPYAQQLVRRRLFKASAHSSNPESALLHGAYIVSMSCPAP . . . **.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	539	LRSQVCLVYHNLGKKGTEIKRCVYEWHESTPLFPPLTPDQKKLYDTDFFALLHYLRSPTAHMESLIRC
DpTHR	548	LRSQLFAHYHNNANN---TEKCVYEWHESSPMNPLTPAQTKQLYDVLAVLHFLSAPPVPLQLSLLRC
DvTHR	557	QFQQLCVFYHTPKN---DTEQCLELCEKSPCLSPLNATEKRKLYELDMLAVLANKKTP--KLLQSLLRH*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	609	RTSDYHLVLLARQMRKDD-SISKKCIHVHDKLR--QQRSLSRMDNLCGHASVGLLLDALEAQTQKVTST
DpTHR	614	RHNDYHLALLARKMRTDS-EVVRQCEELRSQHLSTALKQPLSRMQLLAIGHTSISVLLLEALEAQTQKFSI
DvTHR	622	CQTDYQMVLLGRMRTDKRSAGQQIEELRVRLQRLGRKQQLTRLQQLILGHATVTKLLEAAETQKIKIHI . . . **.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	675	KEITENMFEELLSKNLWQMNIQREQLRVNASEAISAFSNNFDRADQEPKLANETSIDWEALIDDAIAT
DpTHR	683	KETAENCLEELIVKNNLELNKREHRLVELATSAIAFAAFFERADQEPKLCDDTPIDWEALIDDAVAA
DvTHR	692	KEMTEKTEVLVVKYKLFDLTISSEMPLLELATTAIGAFESFYEQADAEPKLANETSIDWEALIDDGIAA **.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	745	ANALSSMGYQSEEDAWLLLLRMRLLDRFTYLRALNHFLSQNEVSSRLNKLKGGEEVEVAEELDDDLWP
DpTHR	753	AMALSTMGYTAQADEAWLLLRIGQMLDRFTYLRALHFLGQDLHNSNQQQLQSEEVDRADQELDDDLWP
DvTHR	762	AMALSTMGYIPQRDNALLLRICRLLGDRFNRLRALSHFLPR--YTQHALFDLPAEVSHEAQLLDELWP *.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	815	QLKNGKFFKQQTIVMLCFCHLASYYARMECYSHAQLLLLHVEQLREEFPERQKSDIVLLTLQTVRFRI
DpTHR	823	QLQNGWFFKQQTIVMLCCLMASYYARQDCLCHAQLLLLQAEELRAQFDERVGKCDIVQITIQTVRFRL
DvTHR	830	QLHAAHLLKRHTTVLLCLCNLALYARLDCVRAQLLLLHAQRPPLEFEERAGKCDIQLTIQTVRFRL **.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	885	GYQQRK--PTNCRPLPTLRQLDILLDNVRSFCNLSSLDGGSLQLLLSTLVRESTECSANRLSERLSFSNI
DpTHR	893	EYLRNKRCSLPRRPTLRQLDILVDVSNRYCTVSSVDLQALQLLADLVRESTECSANRLSERLRFYFYGT
DvTHR	900	CYQQRH-CRSLARLPTALQQLDILTESVRSFTCISSMDNGALILLLGDMVRDTECTANRSELNPFNSNS *.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
DmTHR	953	ALHLVLQSGLALRAIEVFLAWLWTLQMESFDKAQSKLRLIEHCLGKQLNPT-SRPE-----K
DpTHR	963	MLNLVLQSGMALRTIEVLISWLWMLQMEYLDQAQSKLRLLDHLLAIKPLSRT-LVEQTSATYVPAIAAK
DvTHR	969	LLQQLLQSGLVLRAVELLISWLWTLNRMECLDKAHSKLRLIEHFLGMQPLESRAALEQTSNKGSLLTAP . . . **.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

```

DmTHR 1011 EAIKDVAIRDLASNMHLLQL-----VEPIRKOQLLNMASPNLLKMRPHSPNPQLDLDRYITLDVAPAN-
DpTHR 1032 EDLKANAMSELTSNMLLMQL-----VEPIRKNQMDVATIKSLPMHEFIPTS-HQLQRYMSKQGTTPH-
DvTHR 1039 MDAQSKHMTLVGKMLVMQLEQSGACVEPIRKOQLTMSSP---RRELPLPSARPKLQRYVSLDMQQSHF
      .....* .....** *****.....* .....*..**.....

DmTHR 1074 -LRENSQLQCLYFVTGCLHARLRFQLRNSEQLDEFYGRAHSMQEKPPMSSALYPMLHAQQLYHLNLYLRF
DpTHR 1094 -LRDSMQLQCIYFIVGCLHARFSLKRENDQLDDFYVAGNWLQEDPVRTATLGSMLLVHELYHLNLYLRF
DvTHR 1106 MLRSSVQLQCIYFMAGCLHARLYFLNREHEQLDDFYALANAWLQQNAARGNALGHMLLVLHIYQANYLRA
      **..****.*. ....**.*. ....**.*. * ..* . . . .*.. *..****.

DmTHR 1143 ARKHVEAISTAQLGLKMRS-----RAVDINFEYNFLAQLKTAQLELKPVGQDKPQVKILRRALVFNHSPE
DpTHR 1163 RKKHKEALSYAEAGLKSVEY-----QTADINYSFNFMVQLKTARLELHPVG--KARAKTIRRALAFNTSPE
DvTHR 1176 RRRQQQAIELTETALKLAGSEQLQQRIDVNYRNYNLLLQLRTAQLELEPPS---KPQNPRRALTFNISPE
      .....*..*..**.. . .*.**.*.....**.*..... . . . .**** ** **

DmTHR 1208 DKKRTAIGSVSAVKNTASKVKQSAKKAPRFRIYEELELRPPS--ATSCSSSGGSGTENTP-----PS
DpTHR 1226 DKRR-----KGVVEGSTKAKSSARKTPRFKIYTELELRPPIGCSNSSSSSSSKGNENTP-----PS
DvTHR 1242 EKLP-----RPVRKVATASKKPAKFAYTE-DVRPASSTSSSSSSSENASSPERKSTKSKSP
      .*.. . . .*.....* .....**.*.....*..*..**.*.....*.....* . . . .

DmTHR 1268 DHVDLNACQAIEISDDDDSPVST-----KKTQPKSREKAKPKAT----SKACKVLTLDNSLEIVET
DpTHR 1282 DHVDLNACQAIEISDDDAASVSASTPAPSQVKRSQSVPAKATKTRSTRVGSQVKVPEI IELDDTMEETPS
DvTHR 1301 KRLDLNACQLIDI IDLSDDDETEAVVQLQP-AKSTSALSTRSTRTRAQRQPDTLVAPLRRATAPNPLSAE
      ...*****.*.*..... . . . .*..... . . . .

DmTHR 1326 PT-----ITSTRSTRARLRQPVEPKTATLSSKRTRRQVLEAQAPETESISTRTRHRH 1379
DpTHR 1352 TSTAATVKRYPTTDARSTRARNRQLEETPATTRG---RPRKRVPEP-APQGETVSLRRRQRN 1409
DvTHR 1370 AT-----PKTIGTRARARRQNTAEQPTTTTT-----ATPKVDSVSSRRRHRN 1411
      . . . .* ..**.*.. . .*.**.*.. . . . .* ..**.*.*..
    
```

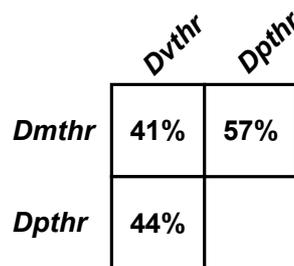


Abbildung 5-16: Sequenzvergleich der THR-Proteine.

Sequenzvergleich der THR-Orthologen aus *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura* und *D. virilis*. Die hervorgehobenen Bereiche markieren Sequenzabschnitte in denen sieben oder mehr benachbarte Aminosäuren innerhalb der drei THR-Orthologen konserviert sind. Der schwarz unterlegte Bereich markiert den Sequenzabschnitt mit der Sequenzübereinstimmung zum Konsensus einer Separase-Schnittstelle und die grau unterlegten Bereiche zwei zusätzlich konservierte Sequenzabschnitte. Ein Stern unterhalb der Sequenzen markiert Positionen, an denen alle drei Sequenzen übereinstimmen und ein Punkt Positionen, an denen die Sequenzen Ähnlichkeiten besitzen. Unten dargestellt sind die prozentualen Sequenzidentitäten zwischen den unterschiedlichen THR-Orthologen.

Der am weitesten C-terminal lokalisierte Block besitzt Sequenzübereinstimmung zum Konsensus ExxR für eine potentielle Separase-Spaltstelle. DmTHR wird im Verlauf der Mitose an dieser Position gespalten und diese Spaltung von DmTHR trägt zur Inaktivierung der Separase bei (Herzig et al. 2002).

Aus der Existenz von *thr* und *Sse* in *D. virilis* lässt sich schließen, dass die vorhergesagte Spaltung eines ursprünglich „großen“ Separase-Gens in die beiden Einzelgene *thr* und *Sse*

vor der Separation der Untergattungen *Sophophora* und *Drosophila* stattgefunden hat. Diese Spaltung liegt etwa 40-60 Millionen Jahre zurück (Abb. 5-11).

In dem vor kurzem sequenzierten Genom der Malaria-Mücke *Anopheles gambiae* konnte durch Datenbankanalyse ein Sequenzabschnitt identifiziert werden, der signifikante Übereinstimmungen zu den Sse-Genen aufweist. Das über den Vergleich zu den SSE-Proteinen abgeleitete Translationsprodukt gibt Hinweise darauf, dass die Separase auch hier nur relativ kurz ist. Die Existenz dieser kurzen Separase wiederum lässt vermuten, dass die Genspaltung bereits zum Zeitpunkt vor der Aufspaltung der Mücken und der Fliegen entstanden ist, das heißt vor mehr als 135 Millionen Jahren (Abb. 5-11). Die Identifizierung eines zu *thr*-orthologen Genabschnitts im Genom von *A. gambiae* war vermutlich aufgrund zu geringer Sequenzübereinstimmungen nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

5.5.3 PIM-Orthologe aus nahe Verwandten von *D. melanogaster*

Da der trimere Komplex in *D. melanogaster* neben SSE und THR auch das Securin PIM (DmPIM) enthält, wurde versucht aus *D. pseudoobscura* und *D. virilis* die PIM-Orthologen zu identifizieren. Hierzu wurden unterschiedliche Ansätze gewählt. Im ersten getesteten Ansatz wurden mit einem markierten Fragment von *pim* die Genbanken von *D. pseudoobscura* und *D. virilis* nach *pim*-Orthologen durchsucht. Jedoch führte dieser Ansatz weder in *D. pseudoobscura* noch in *D. virilis* zur Identifikation eines zu *pim*-orthologen Genbereichs. Beim zweiten Ansatz wurde versucht mit degenerierten Oligonukleotiden, die aus der PIM-Sequenz von *D. melanogaster* abgeleitet wurden, aus genomischer DNA von *D. pseudoobscura* und *D. virilis* über PCR einen Bereich zu amplifizieren, dessen abgeleitete Proteinsequenz Sequenzübereinstimmung zu PIM aufweist. Diese PCR-Amplifikate sollten als markierte Sonde für die Durchsuchung von Genbanken eingesetzt werden. Diese PCR-Ansätze lieferten jedoch in weder mit genomischer DNA aus *D. pseudoobscura* noch aus *D. virilis* Amplifikate deren abgeleitete Proteinsequenz mit PIM Sequenzübereinstimmungen zeigte, so dass keine geeigneten Sonden zur Verfügung standen. Nachdem diese beiden direkten Ansätze nicht zum Erfolg führten, wurde in einem weiteren indirekten, Synthänie-Ansatz versucht über die zu *D. melanogaster pim* distal und proximal benachbarten konservierten Gene das zu *pim*-orthologe Gene in *D. virilis* zu identifizieren (siehe 4.5.1). Auch dieser Ansatz führte nicht zum Erfolg.

Da die Experimente *pim*-orthologe Gene in entfernt verwandten *Drosophiliden* zu identifizieren bisher nicht zum Erfolg geführt hat, wurde in der Folge versucht *pim*-orthologe Gene aus näher verwandten *Drosophiliden* zu charakterisieren. Dies führte bei den etwa 6-15 Millionen Jahre entfernten Spezies *D. erecta*, *D. orena* und *D. yakuba* (Siedler 1998) zum

die jeweiligen K_a -Werte im Vergleich mit den orthologen Genen aus *D. melanogaster* bestimmten. Die ermittelten K_a -Werte lagen zwischen 0,006 für das konservierte Gen *pavarotti*, das für ein Kinesin-ähnliches Protein kodiert, und 0,168 für das Gen *carvaggio*, das für ein Satelliten-DNA-bindendes Protein kodiert (Schmid und Tautz, 1997). Für *pim* kann ein K_a -Wert von 0,072 berechnet werden. Dieser Wert deutet an, dass *pim* als relativ schnell evolvierendes Gen klassifiziert werden kann.

5.6 Die THR/SSE- und THR/PIM-Interaktion sind konserviert

Die Identifikation der zu *Dmthr*- und *DmSse*-Orthologen *Dvthr* und *DvSse* beziehungsweise *DwSse* ermöglichte es zu testen, ob die Komplexbildung zwischen THR und PIM, THR und SSE sowie zwischen SSE und PIM mit den unterschiedlichen Orthologen nachvollzogen werden kann.

Über Two-Hybrid-Experimente wurde hierbei zuerst überprüft, ob das DvTHR-Fragment (AS1-949) mit DmPIM beziehungsweise DmPIM² interagiert. Für das DmTHR-Fragment (AS1-933) konnte über Two-Hybrid-Versuche bereits gezeigt werden, dass es sowohl mit DmPIM als auch mit DmPIM² wechselwirkt (Abb. 5-6). Das Ergebnis des Versuchs mit DvTHR 1-949 ergab, dass dieses Proteinfragment ebenfalls mit PIM und mit PIM² interagiert (Abb. 5-18). Somit zeigt DvTHR 1-949 dasselbe Interaktionsverhalten mit PIM und PIM² wie DmTHR 1-933.

Für DmTHR 1-933 konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass es sowohl mit dem vollständigen DmSSE 1-634 als auch mit dem N-terminalen Fragment DmSSE 1-247 interagiert (Abb. 5-6). In weiteren Two-Hybrid-Experimenten wurde überprüft, ob DmTHR 1-933 auch mit den SSE-Orthologen wechselwirkt. Hierbei zeigte sich, dass DmTHR 1-933 sowohl mit den kompletten SSE-Orthologen DvSSE 1-640 und DwSSE 1-635 als auch mit den N-terminalen Bereichen dieser Proteine DvSSE 1-245 und DwSSE 1-248 interagiert (Abb. 5-18). Der entsprechende Interaktionstest zwischen dem DvTHR-Fragment 1-949 und den SSE-Orthologen-Konstrukten ergab, dass DvTHR 1-949 mit den kompletten SSE-Orthologen DmSSE 1-634, DvSSE 1-640 und DwSSE 1-635 und mit deren N-terminalen Fragmenten DmSSE 1-247, DvSSE 1-245 und DwSSE 1-250 interagiert (Abb. 5-17). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die beiden THR-Orthologen an dieselben, vermutlich konservierten, N-terminalen SSE-Regionen binden. Sie zeigen weiterhin, dass die THR/PIM- sowie die THR/SSE-Interaktionen evolutionär konserviert sind.

Bei der Überprüfung ob die kompletten SSE-Orthologen mit PIM interagieren, konnte nur die bereits bekannte Wechselwirkung zwischen DmSSE mit DmPIM reproduziert werden (Abb. 5-18). Es war weder mit DvSSE 1-640 noch mit DwSSE 1-635 eine Interaktion mit PIM zu

beobachten. Die SSE/PIM-Interaktion scheint somit im Unterschied zu den beiden anderen Interaktionen weniger konserviert zu sein.

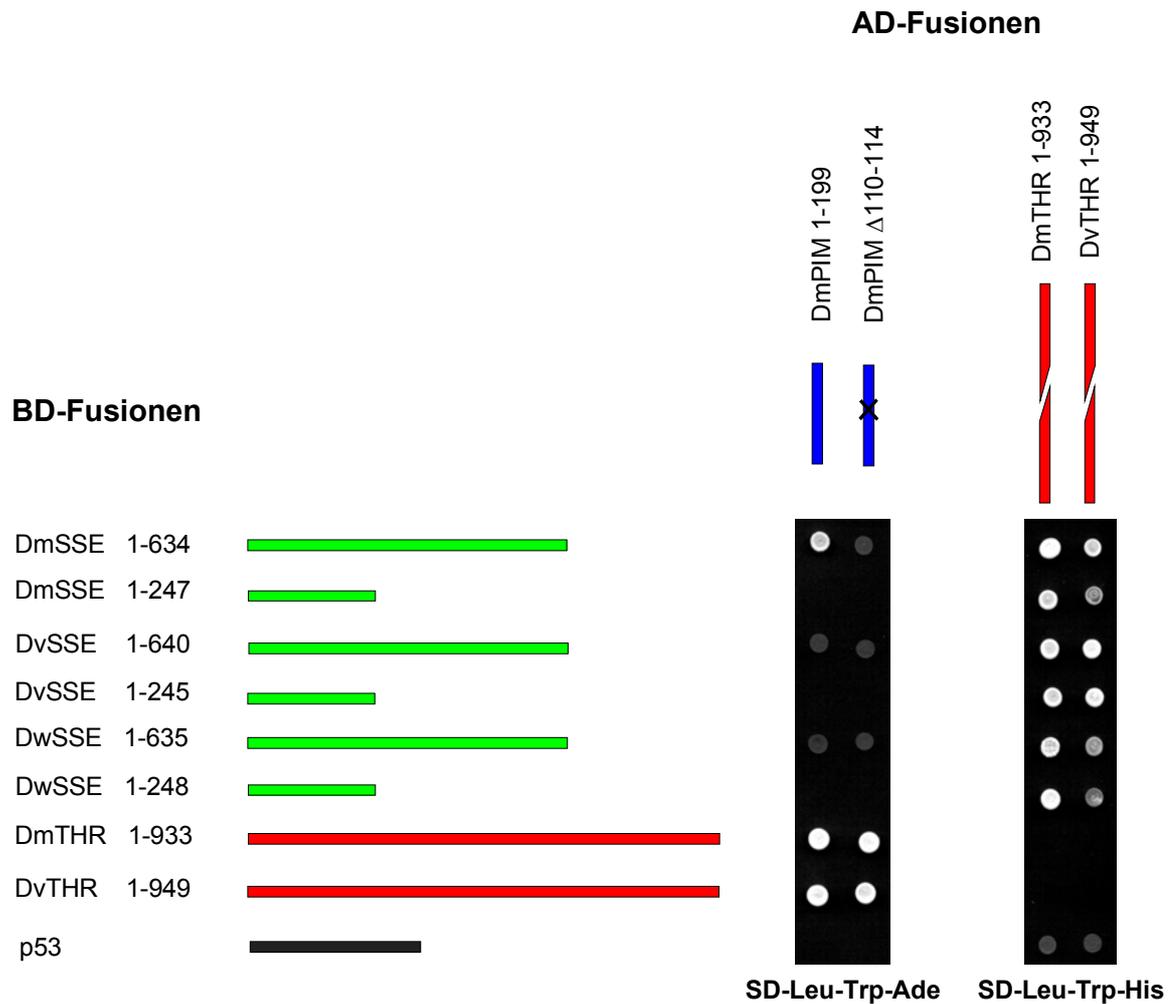


Abbildung 5-18: Two-Hybrid-Interaktionen zwischen den Orthologen von SSE, THR und PIM.

Die Konstrukte der SSE-Orthologen (grüne Balken) und THR-Orthologen (rote Balken) wurden an die GAL4-Bindedomäne (BD-Fusionen) fusioniert. Diese GAL4-BD-Konstrukte wurden zusammen mit den Konstrukten, die an die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD-Fusionen) fusioniert wurden, auf eine direkte Interaktion getestet. Bei den GAL4-AD Konstrukten handelte es sich um PIM, PIM² (PIM Δ 110-114) (blaue Balken) und die THR-Orthologen Deletionskonstrukte (unterbrochene rote Balken). Als weitere Kombination wurde das an die GAL4-Bindedomäne fusionierte p53 Protein (schwarzer Balken) mit den Konstrukten, der an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusionierten THR-Deletionskonstrukten getestet. Diese Kombination diente als Kontrolle für eine eventuelle Autoaktivierung durch die THR-Deletionskonstrukte. Eine Interaktion zwischen den getesteten GAL4-AD und GAL4-BD Kombinationen führte zur Aktivierung der Reportergene und ermöglichte dadurch das Wachstum auf den entsprechenden Selektivmedien. Als Selektivmedium dienten SD-Leu-Trp als Wachstumskontrolle (Daten nicht gezeigt), SD-Leu-Trp-His und SD-Leu-Trp-Ade. Es sind nur die stringentesten nachweisbaren Interaktionen abgebildet.

5.7 Der humane Separase-Komplex zeigt Parallelen zum *Drosophila* Separase-Komplex

Von den bisher bekannten Separasen zeigen ausschließlich die *Drosophila* Separasen mit etwa 640 AS eine relativ geringe Größe. Dennoch konnte für *D. melanogaster* SSE gezeigt werden, dass sie mit dem Securin PIM interagiert. In diesem Punkt gleicht SSE den bereits gut charakterisierten Separasen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe*. Auch für die humane Separase konnte *in vivo* die Interaktion zum humanen Securin hPTTG gezeigt werden (Zou et al. 1999). Das *Drosophila* Securin PIM zeigt neben der Interaktion zu SSE auch Wechselwirkung mit THR. Diese Interaktion und der Größenunterschied von SSE zu den restlichen Separasen lässt vermuten, dass THR funktionell dem N-terminalen Teil einer „großen“ Separase entspricht.

In der Folge sollte untersucht werden, ob die Separase/Securin-Interaktionen von höheren Eukaryoten mit einer „großen“ Separase Gemeinsamkeiten zum postulierten trimeren THR/SSE/PIM-Komplex aufweisen. Des Weiteren war von Interesse, ob entsprechend der THR/SSE-Interaktion auch eine interne Interaktion zwischen Separase-Bereichen der „großen“ Separasen identifizierbar ist. Exemplarisch wurde hierfür die humane Separase/Securin- und interne humane Separase-Interaktion über Hefe-Two-Hybrid-Experimente analysiert.

Sieben humane Separase (hSeparase)-Deletionsvarianten wurden daraufhin getestet ob sie mit hPTTG interagieren (Abb. 5-19). Dem Separase-Interaktionsmodell (Abb. 5-10) folgend, wäre für den inaktiven Separase-Komplex zu erwarten, dass hSeparase das Securin hPTTG an zwei Bindungsstellen kontaktiert. Diese Vorhersage basiert auf der Idee, dass THR dem N-terminalen Abschnitt der „großen“ Separasen entspricht. Die N-terminale hSeparase-Region sollte in Analogie zu der THR/PIM-Interaktion an die C-terminale hPTTG-Region binden (Abb. 5-10). Die zweite hPTTG-Bindungsstelle sollte im C-terminalen hSeparase-Bereich lokalisiert sein und entsprechend dem Modell mit der N-terminalen Region von hPTTG erfolgen (Abb. 5-10). Diese Separase/Securin-Interaktion wäre der *Drosophila* SSE/PIM-Interaktion gleichzusetzen.

Das Two-Hybrid-Experiment zeigte, dass das N-terminale hSeparase-Fragment (AS 1-931) sowohl mit dem vollständigen hPTTG (AS 1-202) als auch mit dessen C-terminalen Bereich (AS 104-202) interagiert. Diese Wechselwirkung zwischen hSeparase und hPTTG, die der *Drosophila* THR/PIM-Interaktion entspricht, konnte weder mit dem kurzen N-terminalen Konstrukt hSeparase 1-325 noch mit dem weiter zentral gelegenen Konstrukt hSeparase 326-931 identifiziert werden (Abb. 5-19). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der hSeparase-Bereich um Position 325 entscheidend an der Wechselwirkung zu hPTTG

beteiligt ist. Eine zweite hPTTG-Bindungsstelle innerhalb des C-terminalen Bereichs von hSeparase konnte jedoch mit dem Two-Hybrid-Versuch nicht identifiziert werden (Abb. 5-19).

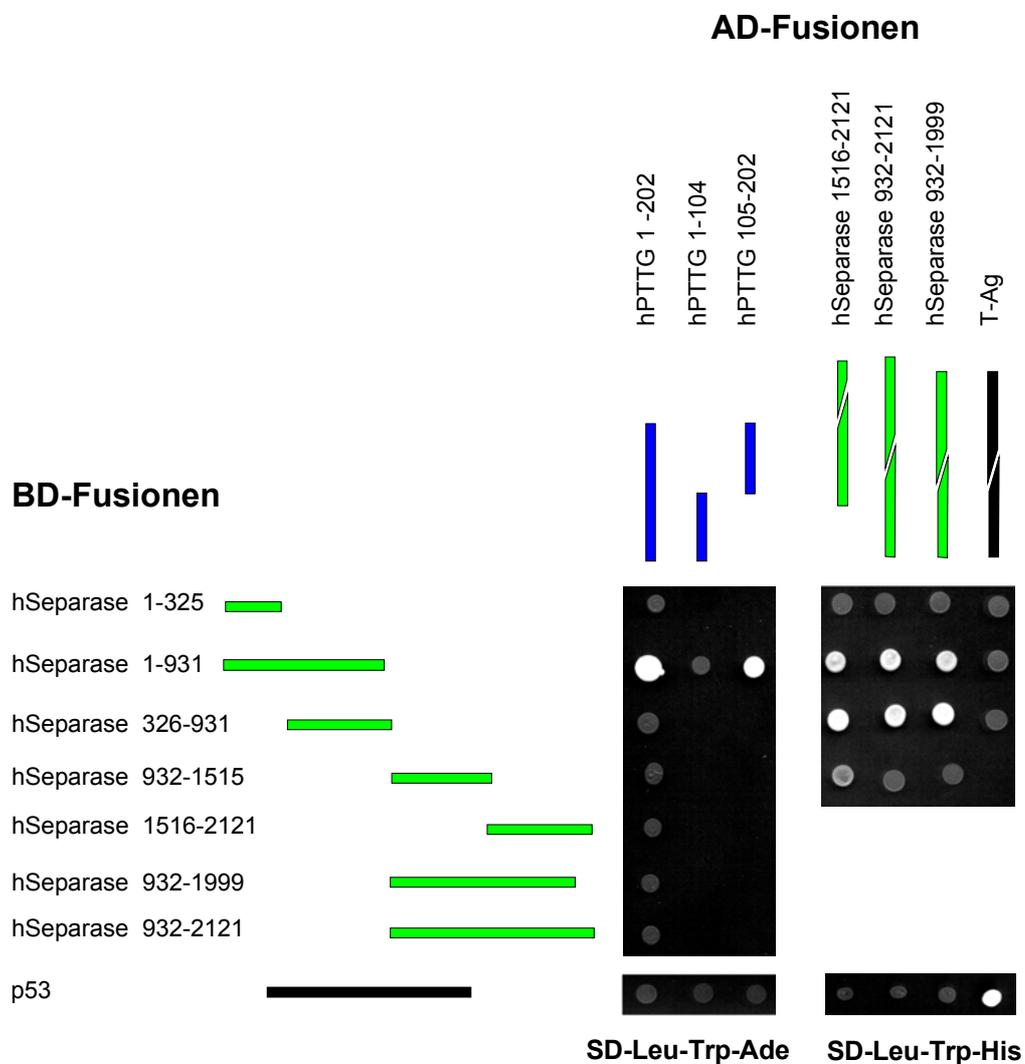


Abbildung 5-19: Interaktionen zwischen hSeparase und hPTTG im Hefe Two-Hybrid-System.

Die an die GAL4-Bindedomäne (BD) fusionierten hSeparase-Konstrukte (grüne Balken) wurden zusammen mit den, an die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) fusionierten hPTTG-Konstrukten (blaue Balken) oder den C-terminalen hSeparase-Konstrukten (unterbrochene grüne Balken), auf eine direkte Interaktion getestet. Die Kombinationen zwischen p53-BD (schwarzer Balken) und den AD-Konstrukten sowie zwischen T-Ag-AD (unterbrochener schwarzer Balken) mit den N-terminalen hSeparase-BD-Konstrukten dienten als Ansätze zur Überprüfung einer unspezifischen Autoaktivierung der Reportergene *ADE2* beziehungsweise *HIS3*. Die direkte Kombination von p53-BD mit T-Ag-AD zeigt Wachstum auf allen Selektionsmedien. Wenn eine Interaktion zwischen den getesteten GAL4-AD und GAL4-BD Kombinationen erfolgte, so führte dies zur Aktivierung der Reportergene und ermöglichte Wachstum auf dem entsprechenden Selektivmedium. Als Selektivmedien dienten SD-Leu-Trp als Wachstumskontrolle (Daten nicht gezeigt), SD-Leu-Trp-His und SD-Leu-Trp-Ade. Abgebildet sind immer die stringentesten nachweisbaren Interaktionen.

Eine weitere Annahme des Modells betrifft den aktiven Separase-Komplex. In *D. melanogaster* kommt es zu einer direkten Wechselwirkung zwischen THR und SSE. Wenn

THR dem N-terminalen Bereich einer ursprünglichen Separase entspricht, würde dies für die „großen“ Separasen bedeuten, dass der aktive Separase-Komplex durch eine direkte intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem N- und C-terminalen Bereich zustandekommt. Um diese interne Wechselwirkung zu überprüfen, wurden drei C-terminale hSeparase-Konstrukte mit weiteren hSeparase-Konstrukten auf eine direkte Interaktion im Hefe Two-Hybrid-System getestet (Abb. 5-19).

In der Tat zeigten die beiden N-terminalen Fragmente hSeparase 1-931 und hSeparase 326-931 eine Wechselwirkung mit den C-terminalen Konstrukten hSeparase 1516-2121, hSeparase 932-2121 und hSeparase 932-1999 (Abb. 5-19). Hieraus folgt, dass der C-terminale humane Separase-Bereich zwischen AS 1516–2121 für die Wechselwirkung mit der N-terminalen Region der humanen Separase von AS 326-931 ausreichend ist. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass mit Ausnahme der zweiten hPTTG-Bindungsstelle die Annahmen des Separase-Interaktionsmodells aus *Drosophila* auch auf den humanen Separase-Komplex übertragbar sind.

5.8 THR entspricht dem N-terminalen Teil der Separasen aus anderen Eukaryoten

In den *Drosophiliden* hat dem Separase-Interaktionsmodell folgend eine Genspaltung eines ursprünglich „großen“ Separase-Gens in die beiden Gene *Sse* und *thr* stattgefunden (Abb. 5-10). Um Hinweise dafür zu finden, inwiefern DmTHR tatsächlich dem N-Terminus einer ursprünglichen Separase entspricht, wurde ein heterologer Two-Hybrid-Interaktionstest zwischen den Separasen und Securinen von *D. melanogaster* und *H. sapiens* durchgeführt. Das Ergebnis des Two-Hybrid-Experiments zeigte eine direkte Wechselwirkung zwischen den hSeparase-Fragmenten 1-931, 326-931 und DmPIM beziehungsweise DmPIM² (Abb. 5-20). hSeparase 1-931 bindet dabei an den C-terminalen Bereich von DmPIM (AS 115-199). Das Interaktionsverhalten von hSeparase 1-931 stimmt somit vollständig mit der Wechselwirkung zwischen DmTHR 1-933 und DmPIM überein. Im Unterschied zur Interaktion zwischen hSeparase und hPTTG war hSeparase 326-931 für die Interaktion mit DmPIM ausreichend. Dies könnte bedeuten, dass DmPIM weiter C-terminal an die hSeparase bindet als hPTTG. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass beide Securine die hSeparase an der selben Stelle binden, aber hPTTG zusätzliche Interaktionsstellen benötigt, die in der Region 1-325 von hSeparase lokalisiert sind.

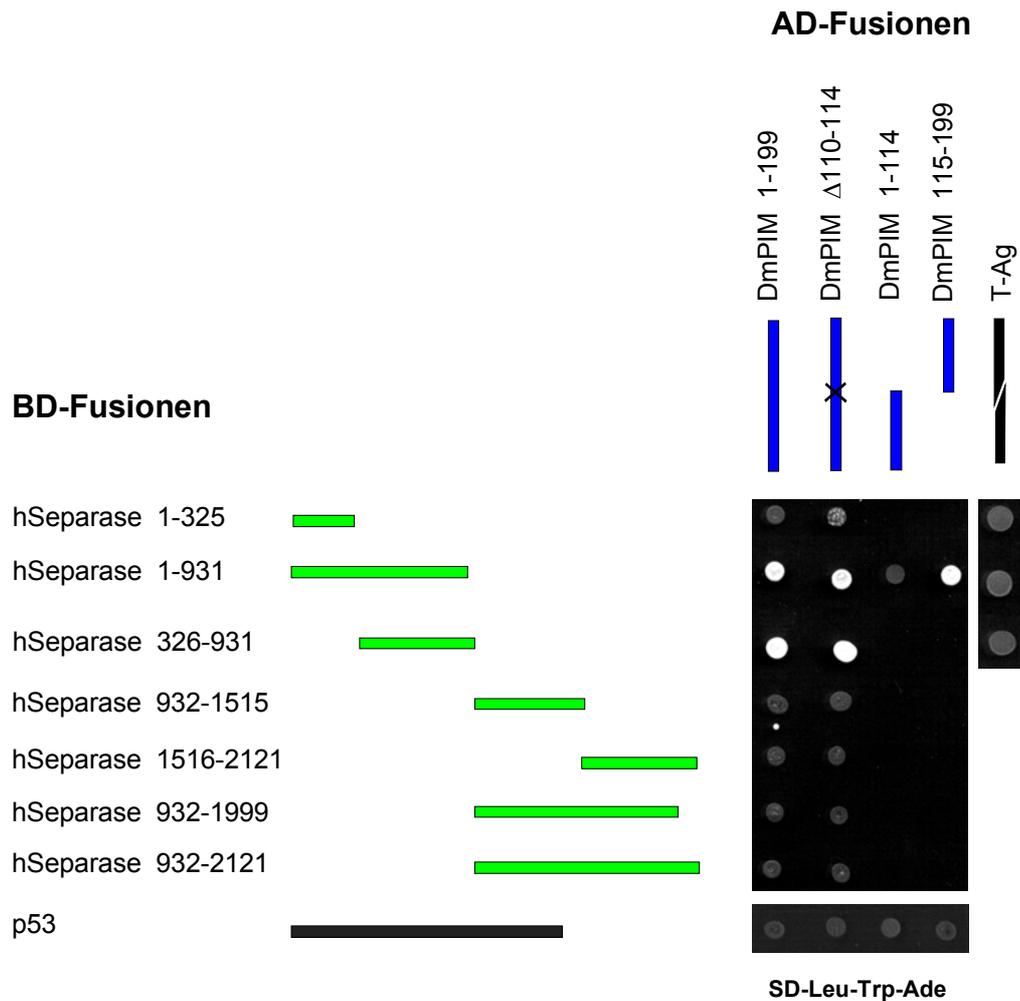


Abbildung 5-20: Interaktion zwischen hSeparase und PIM im Hefe Two-Hybrid-System.

Die an die GAL4-Bindedomäne (BD-Fusionen) fusionierten hSeparase-Konstrukte (grüne Balken) wurden zusammen mit den an die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD-Fusionen) fusionierten PIM-Konstrukten (blaue Balken), auf eine direkte Interaktion getestet. Die Kombinationen zwischen p53-BD (schwarzer Balken) und den PIM-AD-Konstrukten sowie zwischen T-Ag-AD (unterbrochener schwarzer Balken) mit den N-terminalen hSeparase-BD-Konstrukten wurden zur Kontrolle einer Autoaktivierung verwendet. Wenn eine Interaktion zwischen den getesteten GAL4-AD- und GAL4-BD-Fusionen erfolgte, so führte das zur Aktivierung der Reportergene, die das Wachstum auf dem entsprechenden Selektivmedium ermöglichten. Als Selektivmedien dienten als Wachstumskontrolle SD-Leu-Trp (Daten nicht gezeigt), SD-Leu-Trp-His und SD-Leu-Trp-Ade. Abgebildet sind die stringentesten nachweisbaren Interaktionen, das heißt in diesem Falle das Wachstum auf SD-Leu-Trp-Ade.

Im umgekehrten Experiment wurde getestet, ob hPTTG mit DmTHR und DmSSE interagiert. Das komplette hPTTG-Protein zeigt hierbei in der Tat eine schwache Interaktion mit beiden *Drosophila* Proteinen (Abb. 5-21). Die Wechselwirkung mit DmTHR 1-933 war nur für das vollständige hPTTG 1-202 nachweisbar (Abb. 5-21). Eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem C-terminalen Bereich von hPTTG (AS 105-202) und DmTHR 1-933 war nicht zu beobachten. Im Falle der Interaktion zwischen hPTTG und DmSSE war neben der Wechselwirkung der vollständigen Proteine DmSSE 1-634 und hPTTG 1-202 auch eine Interaktion zwischen DmSSE 1-634 und dem N-terminalen hPTTG Konstrukt (AS 1-104) festzustellen (Abb. 5-21).

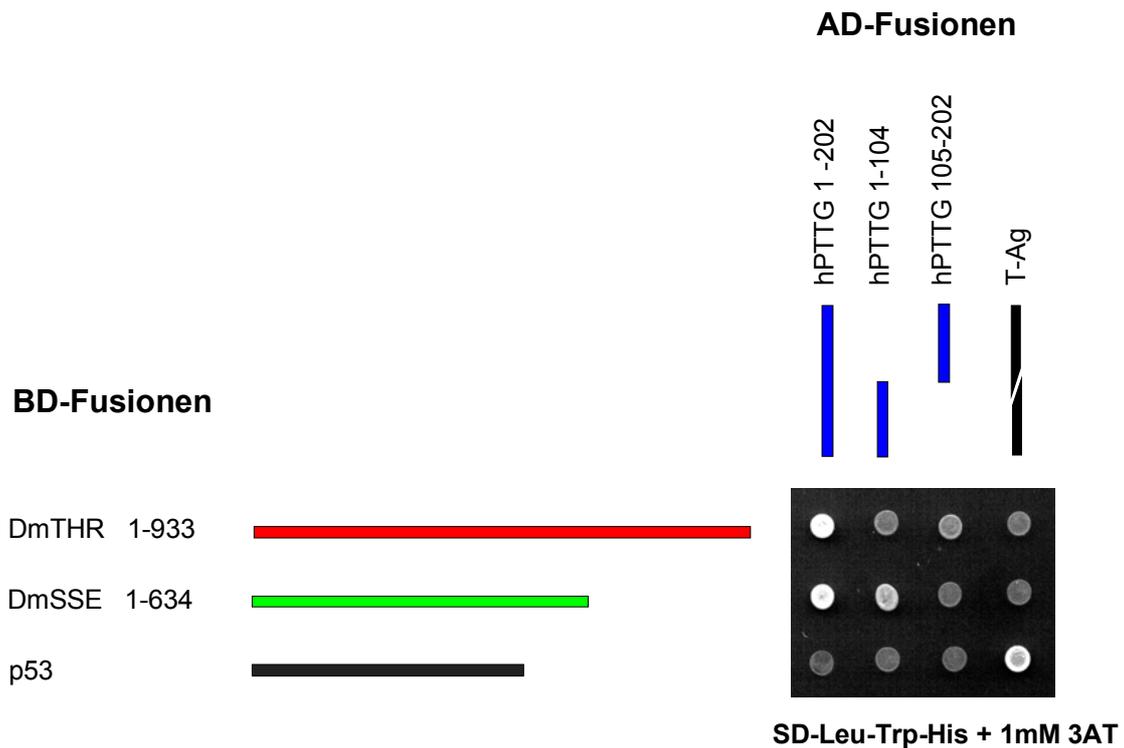


Abbildung 5-21: Interaktion zwischen hPTTG und DmTHR oder DmSSE im Hefe Two-Hybrid-System.

Die an die GAL4-Bindedomäne (BD-Fusionen) fusionierten *Drosophila* Konstrukte DmTHR 1-933 (roter Balken) und DmSSE 1-634 (grüner Balken) wurden zusammen mit den, an die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD-Fusionen) fusionierten hPTTG-Konstrukten (blaue Balken), auf eine direkte Interaktion getestet. Die Kombinationen zwischen p53-BD (schwarzer Balken) und den hPTTG-AD-Konstrukten sowie die Kombinationen von T-Ag-AD (unterbrochener schwarzer Balken) mit den *Drosophila* BD-Konstrukten wurden als Kontrollen einer Autoaktivierung verwendet. Die Kombination zwischen p53-BD mit T-Ag-AD zeigte ein Wachstum auf allen Selektivmedien. Wenn eine Interaktion zwischen den getesteten GAL4-AD und GAL4-BD Kombinationen feststellbar war, so führte das zur Aktivierung der Reportergene, die wiederum das Wachstum auf dem entsprechenden Selektivmedium ermöglichten. Als Selektivmedien dienten als Wachstumskontrolle SD-Leu-Trp (Daten nicht gezeigt), SD-Leu-Trp-His, SD-Leu-Trp-His + 1mM 3AT und SD-Leu-Trp-Ade. Abgebildet sind die stringentesten nachweisbaren Interaktionen, das heißt in diesem Falle das Wachstum auf SD-Leu-Trp-His + 1mM 3AT.

Die Ergebnisse des heterologen Interaktionsverhaltens zwischen PIM und den N-terminalen hSeparase-Deletionskonstrukten sowie zwischen hPTTG und dem N-Terminus von THR unterstützen die Hypothese, dass THR funktionell dem N-terminalen Bereich der „großen“ Separasen entspricht.

6. Diskussion

In allen Eukaryoten sind Vertreter der Proteinfamilien der Securine und der Separasen vorhanden. In Hefen sind diese Vertreter für einen korrekten Verlauf der Separation der Schwesterchromatiden verantwortlich. Der Separase kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, denn die proteolytische Aktivität dieses Enzyms ist in *S. cerevisiae* für die Einleitung der Anaphase ausreichend (Uhlmann et al. 2000). Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob auch die Separase aus *D. melanogaster* für die Trennung der Schwesterchromatiden notwendig ist.

6.1 SSE divergiert im Vergleich zu den weiteren Separasen

Die Separase-Familie zeichnet sich unter anderem durch Sequenzidentitäten von zwei konservierten Blöcken innerhalb der C-terminalen 200 AS aus. Bei diesen Bereichen handelt es sich zum einen um die Region der katalytischen Domäne mit den konservierten Resten Histidin und Cystein und zum anderen um einen weiter C-terminal gelegenen Bereich, der zwei konservierte Abschnitte umfasst (Abb. 5-3B). Die Identifikation von *Drosophila* SSE erfolgte über die Sequenzübereinstimmung zum Bereich der katalytischen Domäne. Dieser ist folglich auch in *D. melanogaster* SSE konserviert. Der zweite konservierte Bereich ist im Gegensatz hierzu in SSE in beiden Abschnitten divergent. Untersuchungen an *S. cerevisiae* ergaben, dass der erste dieser Abschnitte eine potentielle Ca^{2+} -Bindungsstelle beinhaltet (Jensen et al. 2001). Wird diese mutiert, so resultiert eine Fehllokalisierung der Separase. Normalerweise wird in *S. cerevisiae* die Separase im Verlauf der Metaphase auf die mitotische Spindel geladen und scheint im Verlauf der Anaphase wichtig für die Elongation der Spindel zu sein. Die Mutation der Ca^{2+} -Bindungsstelle führt zu einem Verlust der Spindellokalisierung (Jensen et al. 2001). In *D. melanogaster* SSE ist die potentielle Ca^{2+} -Bindungsstelle nicht konserviert, so dass eine Ca^{2+} -abhängige Regulation der Separase über diesen Bereich wenig wahrscheinlich ist. Zur Funktion des zweiten konservierten C-terminalen Abschnitts liegen bislang keine Daten vor. Unter Berücksichtigung der geringeren Sequenzidentität und der um etwa 50-70% reduzierten Größe der *Drosophila* Separase wird klar, dass SSE der evolutionär am weitesten entfernte Vertreter der Separase-Familie darstellt.

6.2 SSE ist notwendig für die Separation der Schwesterchromatiden

Obwohl *Drosophila* SSE im Vergleich zu weiteren Separase-Homologen deutlich divergiert, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SSE notwendig für den Verlauf der mitotischen Separation der Schwesterchromatiden ist. Somit scheint die Funktion der Separasen bei der Separation der Schwesterchromatiden, die bereits für die Separasen der niederen Eukaryoten *S. cerevisiae* und *S. pombe* gezeigt wurde, auch auf höhere Eukaryoten zuzutreffen.

Drosophila Mutanten, die *Sse* zygotisch nicht exprimieren können, durchlaufen die Embryogenese ohne identifizierbare Probleme. Während der Larvalentwicklung führt jedoch das Auslaufen der maternalen Kontribution zu Defekten, die spezifisch mitotisch proliferierende Zellen betreffen. Die zytologischen Untersuchungen der larvalen Gehirne bestätigten die Resultate von Gatti und Baker (1989) für das Allel *l(3)13m-281*. Für dieses *Sse*-Allel konnte hier gezeigt werden, dass es einen kompletten Verlust der zygotischen *Sse*-Funktion zur Folge hat. Mitotische Zellen in *Sse*-mutanten Larven beinhalten endoreduplizierte Chromosomen mit der doppelten oder vielfachen Anzahl an Chromatiden, die vorwiegend am zentromeren DNA-Bereich zusammengehalten werden. Solche Chromosomen konnten auch in frühen Embryonen von *pim*- und *thr*-Mutanten beobachtet werden (D'Andrea et al. 1993; Stratmann und Lehner 1996). Sowohl PIM als auch THR, die wie hier gezeigt mit SSE interagieren, sind für den korrekten Ablauf der Separation der Schwesterchromatiden notwendig.

Die *Sse*-, *pim*- und *thr*-Phänotypen legen nahe, dass die SSE-Aktivität vor allem für die Trennung der Schwesterchromatiden in der zentromeren Region verantwortlich ist. Im Gegensatz hierzu scheint die Aktivität der Separase keinen Einfluss auf den Eintritt in die Mitose, den Aufbau der mitotischen Spindel, die Kondensation der Chromosomen und die Ansammlung der Chromosomen in der Metaphasenplatte zu haben. In *pim*- und *thr*-Mutanten, bei denen die Separation der Schwesterchromatiden ebenfalls unterbleibt, scheint die Degradation der mitotischen Cycline und der Austritt aus der Mitose ohne zeitliche Verzögerung abzulaufen (D'Andrea et al. 1993; Philp et al. 1993; Stratmann und Lehner 1996).

Das Auftreten von Diplochromosomen in *Sse*-Mutanten zeigt, dass trotz der fehlenden Separation der Schwesterchromatiden die Chromosomen im darauffolgenden Zellzyklus normal repliziert werden, und die Zellen dann in die Mitose eintreten. Wäre *Sse* essentiell für den Austritt aus der Mitose, so müsste der Ablauf des nächsten Zyklus inhibiert sein, was jedoch nicht beobachtet werden konnte. Für die Separase aus *S. cerevisiae* ist im Gegensatz hierzu eine Funktion beim Austritt aus der Mitose beschrieben worden (Cohen-Fix und Koshland 1999; Tinker-Kulberg und Morgan 1999). Hier ist sie mitbeteiligt an der

Lokalisation der Cdc14 Phosphatase, die in *S. cerevisiae* eine essentielle Rolle bei der Steuerung der Clb/CDK Inaktivierung besitzt (Stegmeier et al. 2002).

In proliferierenden Zellen existieren sogenannte Kontrollpunkt-Mechanismen. Diese werden aktiviert, sobald ein fehlerhafter Prozess in der proliferierenden Zelle festgestellt wird und sorgen dann dafür, dass die Zelle im Zellzyklus nicht weiter voranschreitet. Die in den *Sse*-, *pim*- und *thr*-Mutanten vorkommenden endoreduplizierten Chromosomen scheinen von den Kontrollpunkt-Mechanismen nicht erkannt zu werden. Wäre dies der Falle, so dürften maximal Diplochromosomen, jedoch keine höher endoreduplizierten Chromosomen nachweisbar sein. Die Cytokinese wird in *pim*- und *thr*-Mutanten ebenfalls versucht, kann jedoch nicht vollendet werden. Ob das Versagen bei der Beendigung der Cytokinese einfach eine Konsequenz der Anwesenheit von nicht separierten Schwesterchromatiden in der Äquatorialplatte ist, oder ob die SSE-Aktivität direkt in die Cytokinese involviert ist, ist nicht bekannt. Da in *Sse*-Mutanten keine polyploiden Zellen mit normalen Chromosomen identifizierbar sind, kann für *Sse* jedoch ein primärer Cytokinesedefekt ausgeschlossen werden. Auch die Untersuchungen an *C. elegans* mit RNAi-vermittelter Inaktivierung der Separase lassen vermuten, dass die Separase für die Cytokinese von frühen Embryonen nicht direkt benötigt wird (Siomos et al. 2001). Eine weitere noch offenstehende und auch schwierige Frage ist, inwiefern die SSE-Aktivität Einfluss auf die Spindeldynamik in der Anaphase hat (Kumada et al. 1998; Uhlmann et al. 2000; Jensen et al. 2001). Da es mit den beiden affinitätsgereinigten anti-SSE-Antikörpern und auch mit den epitopmarkierten SSE-Konstrukten bislang nicht gelang die intrazelluläre Lokalisation von SSE zu bestimmen, sind genaue Immunofluoreszenz-Experimente momentan nicht möglich.

Die essentielle Rolle der Separase bei der Trennung der Schwesterchromatiden in höheren Eukaryoten wird auch durch Untersuchungen an *C. elegans* und an humaner Zellkultur unterstützt. Hier führten RNAi-Experimente zu deutlichen mitotischen Defekten. Die betroffenen Zellen sind, wie die Zellen der *Sse*-Mutanten, größer und haben einen sehr hohen DNA-Gehalt (Siomos et al. 2001; Waizenegger et al. 2002). Die Zellen der humanen Zellkultur, bei denen über RNAi die Expression der Separase abgeschaltet wurde, sind polyploid und zeigen abnormale Metaphasen. Im Gegensatz zu den *Sse*-, *pim*- und *thr*-mutanten Phänotypen zeigen diese Zellen interessanterweise jedoch keine Diplochromosomen oder höhere endoreduplizierte Chromosomen, die am zentromeren DNA-Bereich miteinander assoziiert sind (Waizenegger et al. 2002).

In vitro-Experimente mit der humanen Separase ergaben, dass diese mitotisch instabil ist. Sie wird zum Zeitpunkt, an dem das Securin APC/C-vermittelt abgebaut wird proteolytisch gespalten (Waizenegger et al. 2000; Stemmann et al. 2001; Waizenegger et al. 2002). Da bei einer katalytisch inaktiven Separase keine Spaltung mehr erfolgt und auch die Anwesenheit des humanen Securins diese Spaltung inhibiert, ist zu vermuten, dass die

Spaltung autokatalytisch verläuft (Waizenegger et al. 2002; Zou et al. 2002). Über die biologische Signifikanz dieser Spaltung ist bislang nichts bekannt. Die Untersuchung von nicht spaltbaren Separase-Mutanten in humaner Zellkultur ergab, dass sowohl die ungespaltene als auch gespaltene humane Separase *in vitro* katalytisch aktiv ist (Waizenegger et al. 2002; Zou et al. 2002). Gleichfalls zeigte eine Separase-Mutante, bei der die potentiellen autokatalytischen Schnittstellen mutiert wurden *in vitro* katalytische Aktivität. Diese Resultate zeigen, dass die Aktivierung der humanen Separase *in vitro* unabhängig von deren Spaltung stattfindet (Waizenegger et al. 2002; Zou et al. 2002).

Untersuchungen der Stabilität der *Drosophila* Separase geben keine Hinweise darauf, dass SSE mitotisch instabil ist. Die Stabilität von SSE wird auch durch das späte Auftreten des *Sse*⁻-Phänotyps gestützt. Im Unterschied zu den *pim*- und *thr*-Mutanten reicht das maternale SSE-Produkt aus, um die komplette Embryogenese zu durchlaufen. *pim*- und *thr*-Mutanten zeigen hingegen bereits während der frühen Embryogenese mitotische Defekte. Sowohl für PIM als auch für THR konnte gezeigt werden, dass ein Teil des zellulären Proteins beim Austritt aus der Mitose proteolytisch abgebaut wird (Stratmann und Lehner 1996; Leismann et al. 2000; Herzig et al. 2002). Entsprechend dem in dieser Arbeit postulierten Modell des *Drosophila* Separase-Komplexes entspricht THR dem N-terminalen Anteil von „großen“ Separasen. Untersuchungen der THR-Stabilität im Verlauf der Mitose ergaben, dass auch THR beim Metaphasen/Anaphasen-Übergang gespalten wird (Herzig et al. 2002). Diese Spaltung scheint ebenfalls SSE-abhängig zu sein, so dass Parallelen zwischen der autokatalytischen humanen Separase-Spaltung und der Spaltung von THR erkennbar sind. Im Unterschied zur Spaltung der humanen Separase konnte für die THR-Spaltung jedoch gezeigt werden, dass letztere für die Inaktivierung des *Drosophila* Separase-Komplexes wichtig ist (Herzig et al. 2002).

Untersuchungen an Hefe und humanen Zellkultur ergaben, dass die Kohäsin-Untereinheit Scc1 ein direktes Substrat der Separase ist (Uhlmann et al. 2000; Waizenegger et al. 2000; Hauf et al. 2001). In *S. cerevisiae* ist diese Spaltung sowohl notwendig als auch ausreichend für die Einleitung der Anaphase (Uhlmann et al. 2000). In höheren Eukaryoten erfolgt die Dissoziation der Kohäsin-Komplexe zu zwei unterschiedlichen mitotischen Zeitpunkten. Untersuchungen in *Xenopus*, humaner Zellkultur und *D. melanogaster* haben ergeben, dass in der Prophase der Hauptanteil der Kohäsin-Komplexe von den chromosomalen Armen abdissoziiert. In der zentromeren Region bleiben die Kohäsin-Komplexe weiterhin mit der DNA assoziiert und verhindern damit eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden (Losada et al. 1998, Sumara et al. 2000; Warren et al. 2000). Die Abdissoziation der Kohäsin-Komplexe in der Prophase ist in humaner Zellkultur Separase-unabhängig (Waizenegger et al. 2000). Der in der zentromeren Region verbleibende Anteil des Kohäsin-Komplexes verschwindet am Metaphasen/Anaphasen-Übergang durch die Separase-

vermittelte Spaltung von Scc1 von den Chromosomen, was die Einleitung der Anaphase zur Folge hat (Waizenegger et al. 2000; Hauf et al. 2001). Diese *in vitro*-Experimente mit der humanen Separase, die eine Scc1-Spaltung induzierte, erfolgten mit einem *Xenopus* Oocyten-Extrakt. Wurde zum mitotisch aktivierten *Xenopus* Oocyten-Extrakt ein Separase-Immunopräzipitat aus Zellen einer humanen Zellkultur zugegeben, so führte die Degradation des assoziierten Securins zur Aktivierung der Separase. Diese aktivierte Separase spaltet *in vitro* translatiertes humanes Scc1. In einem analogen *in vitro*-Ansatz wurde über die Aktivierung von *Drosophila* SSE im *Xenopus* Oocyten-Extrakt versucht, *in vitro* translatiertes *Drosophila* Scc1 zu spalten. Hier war jedoch keine Scc1-Spaltung feststellbar (Alf Herzig, persönliche Mitteilung). Obwohl auch die Immunoblotanalysen aus Extrakten von Embryonen, die nach unterschiedlichen mitotischen Stadien sortiert wurden, bislang keinen spezifischen mitotischen Abbau von Scc1 zeigten (Stefan Heidmann, persönliche Mitteilung), ist dennoch anzunehmen, dass die Separase-abhängige Spaltung von Scc1 auch in *Drosophila* stattfindet. Weshalb es bisher nicht gelang diese Spaltung zu zeigen, liegt vermutlich darin begründet, dass die Sensitivität der Immunoblot-Experimente hierfür nicht ausreichend ist.

Die *da-GAL4* vermittelte ektopische Expression der katalytisch inaktiven Separase-Variante *UAS-HASse^{C497S}* führte nicht zur Komplementation des *Sse*-mutanten Phänotyps. Im Gegensatz dazu konnte aber die *da-GAL4* vermittelte ektopische Expression von *UAS-HASse* den *Sse*-mutanten Phänotyp revertieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass obwohl es bislang nicht möglich war die proteolytische Aktivität direkt zu zeigen, diese dennoch für die SSE-Funktion von essentieller Bedeutung ist.

Neben der mitotischen Scc1-Spaltung hat die Separase auch bei der Meiose eine sehr wichtige Funktion. Untersuchungen in *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass die Separase-abhängige Spaltung der meiose-spezifischen Kohäsin-Untereinheit Rec8 zur Einleitung der Anaphase I führt, das heißt zur Trennung der homologen Chromosomen (Buonomo et al. 2000). Ähnliches konnte auch in *C. elegans* gezeigt werden. Die RNAi-vermittelte Inaktivierung der Separase verhinderte die Trennung der gepaarten homologen Chromosomen (Siomos et al. 2001).

Zur Untersuchung der SSE-Funktion bei der Meiose von *D. melanogaster* wurden in Vorversuchen Keimbahnklone erzeugt. Es sollte untersucht werden, ob in Eiern, die kein funktionelles SSE-Protein enthalten, meiotische Defekte beobachtbar sind. Solche Untersuchungen sind möglich, da *Drosophila* Eier die Meiose erst nach erfolgter Befruchtung komplettieren. Das vorläufige Ergebnis dieser Experimente zeigt, dass in Keimbahnklonen, in denen kein funktionelles SSE-Protein vorhanden ist, die Oogenese nicht beendet werden kann. Weibchen, in denen über die FLP/DFS-Technik (Chou et al. 1993, Chou und Perrimon 1996) während der Larvalentwicklung ein Rekombinationsereignis induziert wurde, konnten

keine Eier legen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass der frühe Ausfall der Sse-Funktion einen Defekt während der Oogenese induziert. Wie dieser Defekt sich phänotypisch äußert, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. Da dieses Ergebnis es nicht erlaubt die Funktion der Separase während der Meiose zu untersuchen, könnte in einem neuerlichen Ansatz, wie in Chou und Perrimon (1992) beschrieben, versucht werden, die Rekombination im späteren Pupalstadium zu induzieren. Dies könnte eventuell über die Stabilität des endogen noch vorhandenen SSE-Proteins dazu ausreichen, dass die Weibchen, in denen ein Rekombinationsereignis induziert wurde, zur Ablage von Eiern befähigt sind. Diese Eier könnten dann auf meiotische Phänotypen untersucht werden.

6.3 Modell der verschiedenen *Drosophila* Separase-Komplexe

Die Experimente der Scc1-Spaltung in *S. cerevisiae* und *H. sapiens* sowie die phänotypischen Untersuchungen von Sse-Mutanten in *D. melanogaster* zeigen, dass die Separase eine essentielle Funktion bei der Separation der Schwesterchromatiden wahrnimmt. Eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Separase spielen die Securine. Erst wenn diese inhibitorischen Untereinheiten proteolytisch abgebaut werden, wird die Separase aktiviert.

Basierend auf den Interaktionsstudien der *Drosophila* Proteine SSE, PIM und THR wurde ein Modell aufgestellt, das den Separase-Komplexen funktionelle Bedeutung zuordnet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PIM *in vivo* mit SSE interagiert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Funktion von PIM als *Drosophila* Securin. Auch die Interaktion des N-terminalen Anteils von SSE mit PIM stimmt mit früheren Untersuchungen in Hefe überein. Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* interagiert das Securin mit dem N-terminalen Bereich der entsprechenden Separase (Kumada et al. 1998; Jensen et al. 2001). Hierbei ist jedoch überraschend, dass weder im N-terminalen Bereich der Separasen noch innerhalb der Securine konservierte Bereiche identifiziert werden können. In gleichem Maße überraschend ist der Befund, dass THR *in vivo* für die Interaktion zwischen PIM und SSE notwendig ist, obwohl die Two-Hybrid-Ergebnisse zwischen PIM und SSE eine deutliche direkte Wechselwirkung zeigen. Zur Bildung eines trimeren Komplexes *in vivo* ist die Bindung von PIM an SSE jedoch wichtig (Jäger et al. 2001). Dies aufgrund des Resultats, dass PIM² *in vivo* nicht effizient in den trimeren Komplex eingebaut wird, obwohl es im Two-Hybrid-Experiment analog zu PIM an THR bindet (Jäger et al. 2001). Entsprechend dieser Daten ist ein Modell denkbar, nach welchem sich im Verlauf der Interphase der trimere Komplex bestehend aus SSE, PIM und THR ausbildet (Abb. 5-10). Dieser inaktive Separase-Komplex bleibt bis zur Mitose in dieser Konstellation erhalten.

In den Two-Hybrid-Experimenten und der Koimmunopräzipitation konnte auch eine direkte Wechselwirkung zwischen THR und SSE gezeigt werden. Da die N-terminale Domäne von SSE für die Bindung von THR und PIM ausreichend ist, kommt es innerhalb dieser N-terminalen 247 AS eventuell zu einer Überlappung der SSE/PIM- und SSE/THR-Interaktionsbereiche. Diese Überlappung könnte dafür verantwortlich sein, dass wenn PIM an SSE gebunden ist, die direkte Interaktion zwischen SSE und THR unterbunden wird. Im Arbeitsmodell wird erst durch den Abbau von PIM eine direkte Wechselwirkung zwischen SSE und THR ermöglicht. Die Wechselwirkungsbereiche innerhalb von PIM, die eine Wechselwirkung mit SSE und THR ermöglichen, unterscheiden sich. Während SSE mit der N-terminalen Hälfte von PIM interagiert, ist für die PIM/THR-Interaktion die C-terminale Hälfte von PIM ausreichend. Wird das Securin PIM über den APC/C-vermittelt degradiert, so kommt es zur Bildung des aktiven, binären SSE/THR-Komplexes. Laut dem Modell ist dieser aktive Komplex verantwortlich für die Spaltung von SCC1, wodurch die Separation der Schwesterchromatiden eingeleitet wird.

6.4 THR entspricht funktionell dem N-Terminus der „großen“ Separasen

Um das postulierte Modell auch auf weitere höhere Eukaryoten übertragen zu können, müsste geklärt werden, welches Protein in diesen Organismen die Rolle von THR übernehmen könnte. Eine Möglichkeit dies zu erklären wäre, dass die beiden Proteine SSE und THR zwei Fragmente der „großen“ Separase repräsentieren. THR entspräche dem nicht konservierten N-terminalen Anteil der Separase und SSE dem konservierten C-terminalen Bereich mit der katalytischen Domäne.

Wenn die These, dass THR dem N-terminalen Bereich von „großen“ Separasen gleichgesetzt werden kann zutrifft, sollte man entsprechend der THR/PIM-Interaktion für die Separase/Securin-Interaktion von „großen“ Separasen eine direkte Interaktion zwischen dem N-terminalen Anteil der Separasen mit dem C-terminalen Bereich der Securine erwarten.

In der Bäckerhefe und der Spaltheife konnte eine direkte Interaktion der sauren C-terminalen Hälften der jeweiligen Securine mit den entsprechenden N-terminalen Bereichen der Separasen identifiziert werden (Kumada et al. 1998; Jensen et al. 2001). Auch der N-terminale Anteil der humanen Separase interagiert im Two-Hybrid-Experiment mit dem C-terminalen Bereich von hPTTG. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass THR dem N-terminalen Bereich von „großen“ Separasen gleichgesetzt werden kann.

Ein weiterer überraschender Aspekt ist das Ergebnis, dass das N-terminale hSeparase-Fragment 1-930 im Two-Hybrid-Versuch mit PIM, dem *Drosophila* Securin, interagiert. Dieses hSeparase-Fragment zeigt mit PIM dieselbe Interaktion wie THR mit PIM. Da auch

THR im Two-Hybrid-Experiment mit hPTTG interagiert, sind zusammenfassend deutliche Parallelen zwischen THR und den N-terminalen Bereichen von „großen“ Separasen zu beobachten.

Die Separase/Securin-Interaktionen lassen einen konservierten Aufbau der N-terminalen Bereiche der Separasen erwarten. Auf der Ebene der Primärstruktur kann jedoch keine Sequenzübereinstimmung zwischen den N-terminalen Bereichen der Separasen identifiziert werden. Es gibt gut dokumentierte Beispiele dafür, dass Proteine auch ohne erkennbare Konservierung in der Primärstruktur bemerkenswert ähnliche 3-D-Strukturen besitzen. Dies trifft zum Beispiel auf Aktin und Hsc70 (heat shock cognate) sowie FtsZ und Tubulin zu (Kabsch und Holmes 1995; Lowe 1998). Folglich wäre denkbar, dass THR und die N-terminalen Separase-Abschnitte in der Tertiärstruktur ähnlich sind.

Das potentielle gemeinsame Strukturmotiv der N-terminalen Bereiche der Separasen sollte für die direkte Wechselwirkung zu den nicht konservierten Securinen verantwortlich sein. Über vergleichende 3-D-Strukturvorhersagen wurde für den N-terminalen Bereich von THR vorhergesagt, dass er strukturelle Ähnlichkeit zu Proteinen, die entweder Armadillo- oder HEAT-Wiederholungen besitzen, aufweist (H. Sticht, S. Heidmann und C. Lehner persönliche Mitteilung). Dies war auch der Fall, sofern die N-terminalen Bereiche von „großen“ Separasen für die vergleichende Strukturvorhersage verwendet wurden. Auch für diese wurden strukturelle Gemeinsamkeiten zu Proteinen, die Armadillo- oder HEAT-Wiederholungen beinhalten vorhergesagt (H. Sticht, S. Heidmann und C. Lehner persönliche Mitteilung).

Die Motive der Armadillo- und HEAT-Wiederholungen sind sich strukturell sehr ähnlich (Andrade et al., 2001). Eine parallele Anordnung der Wiederholungen führt zur Ausbildung eines Solenoids, das abhängig von der jeweiligen Struktur ein unterschiedliches Ausmaß an Krümmung zeigt. Alle diese Solenoidstrukturen zeigen eine Spalte, die an Protein/Protein-Wechselwirkungen beteiligt ist. Dies konnte am Beispiel von Importin- α mit verschiedenen Interaktionspartnern gezeigt werden (Conti et al. 1998; Cingolani et al. 1999).

Bezogen auf die Separase/Securin-Wechselwirkungen kann angenommen werden, dass die räumliche Anordnung der Armadillo/HEAT-Wiederholungen im N-terminalen Separase-Bereich zur Ausbildung einer Spalte führt, an die dann das Securin anbindet.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass neben den Interaktionsstudien auch die 3D-Strukturvorhersagen deutliche Hinweise liefern, dass THR die Funktion des N-terminalen Bereichs der „großen“ Separasen wahrnimmt.

6.5 Orthologe Proteine von SSE, THR und PIM

Drosophila besitzt im Gegensatz zu allen anderen Eukaryoten keine „große“ Separase. Die Existenz des verhältnismäßig kleinen *Sse*-Gens und *thr*, das Parallelen zum N-terminalen Bereich „großer“ Separasen aufweist, lässt vermuten, dass irgendwann in der Evolution eine Genspaltung eines ursprünglich „großen“ Separasegens stattfand. Die Identifikation von *Sse*- und *thr*-Orthologen aus anderen Spezies ist wichtig um Einblick zu bekommen, wann diese Spaltung evolutionär erfolgte. Der Zeitpunkt ist deshalb von Relevanz, da es über den Vergleich zu anderen Eukaryoten, die eine „große“ Separase besitzen, möglich sein sollte, der evolutionären Spaltung des Separase-Gens eine biologische Funktion zuzuordnen.

Die in *D. willistoni* und *D. virilis* identifizierten SSE-Orthologen zeigen in ihrer Größe und genomischen Organisation weitestgehend Übereinstimmung zu *D. melanogaster* SSE. Eine solche Konservierung der Genstruktur ist zwischen *D. melanogaster* und *D. virilis* trotz ihrer evolutionären Distanz von 40-60 Mio. Jahren oftmals zu finden (Hooper et al., 1992, Lovato et al., 2001). Was beim Sequenzvergleich der abgeleiteten SSE-Proteine jedoch etwas überraschte war, dass zwischen DmSSE und DvSSE mit 61% Sequenzidentität eine höhere Übereinstimmung festgestellt werden konnte, als mit 57% zwischen DmSSE und DwSSE. Dieses Ergebnis ist zwar zunächst unerwartet, da *D. virilis* entsprechend der evolutionären Distanz weiter von *D. melanogaster* entfernt ist als *D. willistoni*, aber dennoch nicht außergewöhnlich. Eine analoge Beobachtung wurde zum Beispiel auch bei Homologen zum *D. melanogaster* SISA (sisterless A)-Protein gemacht. SISA ist an der Festlegung des Geschlechts beteiligt. SISA aus *D. virilis* zeigt mit 58% zu SISA aus *D. melanogaster* eine höhere Sequenzübereinstimmung als SISA aus *D. pseudoobscura* mit 55%, obwohl auch in diesem Falle *D. virilis* evolutionär weiter von *D. melanogaster* entfernt ist als *D. pseudoobscura* (Abb. 5-11, Erickson und Cline, 1998).

Die Sequenzübereinstimmung der SSE-Orthologen lassen keine sehr umfangreichen konservierten Bereiche erkennen. Der am besten konservierte Bereich (AS 618-628) umfasst insgesamt elf Aminosäuren. Wird für den Sequenzvergleich der kurzen Separasen auch noch das aus *A. gambiae* postulierte SSE-Protein mitberücksichtigt, so lassen sich als konservierte Bereiche nur noch die Abschnitte der katalytisch aktiven Reste Histidin und Cystein sowie der Bereich am absoluten C-Terminus, der allgemein bei den Separasen eine Konservierung zeigt, feststellen (Abb. 8-7). Die Sequenzübereinstimmung zwischen SSE aus *D. melanogaster* und *A. gambiae* bezogen auf die kompletten Proteine zeigen nur noch 24% Identität. Diese Daten zeigen, dass die *Sse*-Orthologen, wie die „großen“ Separasen nur sehr wenige konservierte Proteinabschnitte besitzen. Zum SSE-Orthologen aus *A. gambiae* muss jedoch angemerkt werden, dass das aus dem potentiellen *Sse*-Genbereich abgeleitete Protein allein auf Sequenzanalysen basiert.

Die Identifikation von *thr* aus *D. virilis* bekräftigt die These, dass in all den Organismen, in denen eine kleine Separase identifiziert werden kann, auch ein *thr*-Ortholog existiert. Im Unterschied zu *Sse* ist die genomische Organisation zwischen *Dvthr* und *Dmthr* nicht konserviert. Beim Sequenzvergleich der THR-Orthologen aus *D. pseudoobscura* und *D. virilis* mit THR aus *D. melanogaster* zeigt sich, dass entsprechend der evolutionären Distanz, DvTHR mit 41% zu DmTHR weniger Sequenzidentität aufweist als DpTHR mit 57% zu DmTHR. Publierte Sequenzidentitätswerte zwischen Proteinen aus *D. virilis* und *D. melanogaster* liegen zwischen 36% für das Produkt des *tra* (*transformer*)-Gens (O'Neil und Belote; 1992) und 97% für das Protein, das vom *hsp82* (*heat shock protein 82*) Gen kodiert wird (Blackman und Meselson, 1986). Diese Daten zeigen, dass sich *thr* im Vergleich zu anderen Proteinen evolutionär verhältnismäßig schnell verändert.

Alle bekannten Securine zeigen auf Primärstrukturebene keine Sequenzübereinstimmung. Dies lässt vermuten, dass sich auch die Securine evolutionär schnell verändern. Diese Beobachtung konnte auch bei Orthologen des humanen Securins hPTTG gemacht werden (Zou et al. 1999). Das *Xenopus* Securin hat zu hPTTG eine Sequenzübereinstimmung von 36%, während die meisten anderen Zellzyklus-Proteine mehr als 80% Sequenzidentität aufweisen (Zou et al. 1999). Von den *Drosophila* Genen *Sse*, *pim* und *thr* scheint das Securin *pim* vermutlich auch das am schnellsten evolvierende Gen zu sein. Hierfür spricht unter anderem, dass alle bisherigen Versuche die *pim*-Orthologen in weiter entfernten Spezies zu identifizieren ergebnislos verliefen. Nimmt man die nicht synonymen Nukleotidaustausche als Marker für die Geschwindigkeit, mit der sich Gene im Verlauf der Evolution verändern, so kann aus den Vergleichswerten zwischen *D. melanogaster* und *D. yakuba* ersehen werden, dass *pim* zur Klasse der schnell evolvierenden Gene gehört (Schmid und Tautz 1997).

Den höchsten Grad an Konservierung unter den drei *Drosophila* Proteinen, die an der Separation der Schwesterchromatiden beteiligt sind, zeigen die SSE-Orthologen. Die Sequenzidentität zwischen DmSSE und DvSSE ist mit 61% deutlich höher als die 41% zwischen DmTHR und DvTHR. Somit evolviert THR vermutlich schneller als SSE. Hierfür spricht auch, dass in *A. gambiae* kein zu *thr*-orthologer Genbereich identifizierbar war, und die Beobachtung, dass in den THR-Orthologen im Vergleich zu den SSE-Orthologen weniger konservierte Abschnitte vorhanden sind. Die Berechnung von K_a -Werten zwischen den *Sse*- und den *thr*-orthologen Genen ist nicht möglich, da hierfür die Sequenzübereinstimmungen zu gering sind. Diese Berechnungen sind meistens nur zwischen Genen aus nahe verwandten Organismen, wie im Falle von *pim* aus *D. melanogaster* und *D. yakuba*, möglich. Die Identifikation von *Sse* und *thr* aus *D. virilis* deutet darauf hin, dass die Aufspaltung der ursprünglich „großen“ Separase in *Sse* und *thr* vor der Trennung der Untergattungen *Sophophora* und *Drosophila* stattgefunden hat (Abb. 5-11). Unter Berücksichtigung der

Analyse der genomischen Sequenz von *A. gambiae*, kann die Spaltung der „großen“ Separase eventuell auch auf die Ordnung der Dipteren ausgeweitet werden. Da alle diese Organismen der Klasse der Insekten angehören, bleibt als weiteres abzuklären, ob die Aufspaltung der Separase in *Sse* und *thr* ein Charakteristikum aller Insekten ist. Die Konservierung der katalytischen Domäne der Separasen sollte es ermöglichen Separase-Vertreter aus weiteren Spezies der Unterklassen der Insekten zu identifizieren, wodurch diese Frage beantwortet werden könnte.

Die Two-Hybrid-Interaktionsstudien zwischen den Orthologen von SSE, THR und PIM zeigten, dass die SSE/THR- sowie die THR/PIM-Interaktionen konserviert sind, während dies für die SSE/PIM-Interaktionen nicht zutrifft. In *D. melanogaster* ist die Interaktionsdomäne von SSE, die eine Wechselwirkung zu PIM und THR ermöglicht, auf das N-terminale Fragment der Aminosäuren 1-247 begrenzt. Da die SSE/THR-Interaktionen konserviert sind, ist naheliegend, dass der SSE-Sequenzbereich, der für die Interaktion mit THR verantwortlich ist, ebenfalls konserviert ist. Betrachtet man im Proteinsequenzvergleich der SSE-Orthologen den N-terminalen Abschnitt, so lassen sich drei Bereiche identifizieren, die für die Interaktion mit THR in Frage kommen könnten. Bezogen auf DmSSE sind das die Bereiche der Aminosäuren 20-48, 144-186 und 208-236. Der SSE-Bereich, der für die Interaktion mit PIM verantwortlich ist, ist vermutlich nicht konserviert.

6.6 Die Architektur der Separase-Komplexe ist konserviert

Die in *Drosophila* postulierte Spaltung einer „großen“ Separase in *thr* und *Sse* legt nahe, dass *thr* funktionell dem N-terminalen Teil der Separase entspricht und *Sse* dem C-terminalen Teil mit der katalytischen Domäne. Die Interaktionsstudien zwischen THR, SSE und PIM zeigten, dass PIM sowohl mit THR als auch mit SSE interagiert. In dem in dieser Arbeit postulierten Modell des inaktiven Separase-Komplexes kontaktiert PIM sowohl THR als auch SSE. Wenn dies auf den humanen Separase-Komplex übertragbar ist, würde man innerhalb der „großen“ hSeparase zwei potentielle Bindungsstellen für das humane hPTTG erwarten.

Die Two-Hybrid-Interaktionstests zwischen hSeparase und hPTTG zeigten, dass der N-terminale Teil der humanen Separase mit dem kompletten und dem C-terminalen Bereich von hPTTG interagiert. Da sowohl die hier präsentierte Interaktion zwischen THR und PIM als auch die früheren Interaktionstests zwischen den Securinen und den Separasen aus Hefe zum selben Ergebnis führten, scheint die Interaktion zwischen dem N-terminalen Teil der Separase mit dem sauren C-terminalen Bereich des Securins evolutionär konserviert zu sein (Kumada et al. 1998; Jensen et al. 2001).

Die postulierte zweite hPTTG-Bindungsstelle innerhalb der C-terminalen Domäne der hSeparase konnte in Two-Hybrid-Experimenten nicht identifiziert werden. Jedoch konnten in einer erst kürzlich publizierten Arbeit Daten gezeigt werden, die es möglich erscheinen lassen, dass eine zweite hPTTG-Bindungsstelle auch in hSeparase vorhanden ist (Waizenegger et al. 2002). Die gespaltene, aktivierte Form der humanen Separase war in der Lage rekombinantes hPTTG zu binden. Dies führte *in vitro* zum Verlust der proteolytischen Funktion der Separase. Des Weiteren hatte die Bindung des rekombinanten Securins zur Folge, dass das aktive Zentrum für einen spezifischen Peptidinhibitor nicht mehr zugänglich war (Waizenegger et al. 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bindung des Securins an den C-terminalen Bereich der hSeparase die Zugänglichkeit des Substrats zum aktiven Zentrum unterbindet.

Während diese Ergebnisse auch durch allosterische Umlagerungen erklärt werden könnten, wurde in *S. cerevisiae* über Koimmunopräzipitationen eine direkte Interaktion des Securins an den C-terminalen Teil der Separase nachgewiesen (Hornig et al. 2002). Somit bestätigen die Separase/Securin-Interaktionsstudien aus der Bäckerhefe die These einer zweiten Securin-Bindungsstelle innerhalb des C-terminalen Bereichs der Separase (Hornig et al. 2002). Bei den beiden von Hornig et al. getesteten Konstrukten sind entweder die ersten 156 oder die ersten 1390 Aminosäuren des insgesamt 1630 Aminosäuren umfassenden Separase-Proteins deletiert (Hornig et al. 2002). Die Interaktion zwischen den beiden C-terminalen Separase-Konstrukten und dem kompletten Securin ist jedoch deutlich schwächer als die Interaktion der vollständigen Separase mit dem Securin. Wenn das Ergebnis aus *S. cerevisiae* auch auf die humane Separase/Securin-Interaktion übertragbar ist, wäre auch hier nur eine sehr schwache Interaktion zwischen hPTTG und dem C-terminalen Bereich von hSeparase zu erwarten. Eine solch schwache Interaktion war eventuell der Grund, weshalb im Two-Hybrid-Versuch hPTTG nur mit dem C-terminalen Bereich von hSeparase interagiert. Da vollständiges hPTTG und dessen N-terminaler Bereich dazu in der Lage sind eine sehr schwache Interaktion mit DmSSE einzugehen, kann grundsätzlich gezeigt werden, dass die N-terminale Hälfte von hPTTG für eine Interaktion mit der C-terminalen Separase-Domäne ausreichend ist.

Aus den Separase/Securin-Interaktionen der unterschiedlichen Spezies kann folglich vermutet werden, dass das in dieser Arbeit postulierte Modell des inaktiven Separase-Komplexes nicht nur auf *Drosophila*, sondern auch auf *S. cerevisiae* und *H. sapiens* zutrifft (Abb. 6-1).

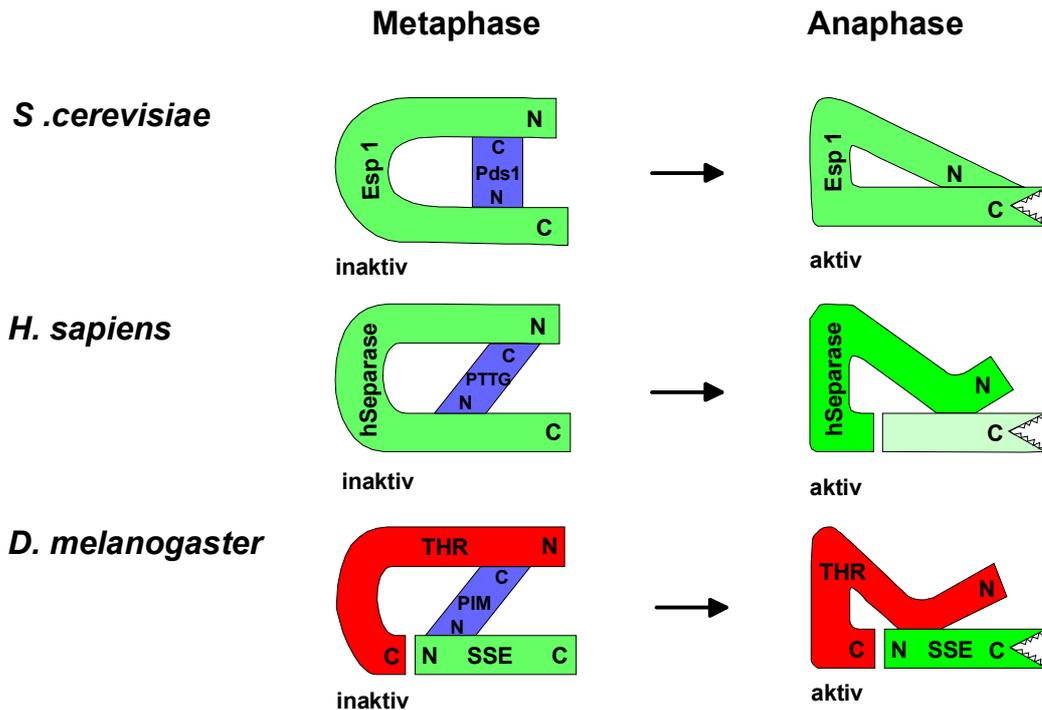


Abbildung 6-1: Modell der Separase-Komplexe aus *S. cerevisiae*, *H. sapiens* und *D. melanogaster*.

Die Separase-Komplexe aus *S. cerevisiae*, *H. sapiens* und *D. melanogaster* zeigen beim Aufbau des postulierten inaktiven und beim Aufbau des postulierten aktiven Separase-Komplexes Gemeinsamkeiten. Im Verlauf der Interphase bildet sich der Separase/Securin-Komplex aus. Die Bindung des Securins (blau markiert) verhindert, dass die Separase (grün markiert) zu früh aktiviert wird. Dieser inaktive Separase-Komplex bleibt bis zum Ende der Metaphase bestehen. Das Securin kontaktiert die Separase an zwei Bindungsstellen. Sie bindet mit ihrem N-Terminus an die C-terminale Region der Separase und mit dem C-Terminus an den N-terminalen Bereich. Durch den Abbau des Securins am Metaphasen/Anaphasen-Übergang erfolgt die Aktivierung der Separase. Diese aktive Form wird durch die Wechselwirkung des N-terminalen Bereichs der Separase mit deren C-terminalen Domäne ausgebildet. In *S. cerevisiae* erfolgt keine Spaltung der Separase (Esp1). Der aktive Komplex bildet sich nach der Securin (Pds1)-Degradation durch die intramolekulare Wechselwirkung des N-terminalen Separasebereichs mit dem C-terminalen Bereich. Die humane Separase wird nach Securin (PTTG)-Degradation autokatalytisch gespalten, die N- und C-terminalen Spaltfragmente (grün und hellgrün markiert) bleiben jedoch miteinander assoziiert und sind wie die ungespaltene Separase katalytisch aktiv. In *D. melanogaster* kommt es nach dem Securin (PIM)-Abbau zur Interaktion zwischen THR (rot markiert) und SSE, wodurch der Separase-Komplex aktiviert wird.

Die Daten lassen zusätzlich vermuten, dass die Ausbildung des inaktiven Separase-Komplexes in zwei Schritten erfolgen könnte. Im ersten Schritt bindet das Securin mit seiner C-terminalen Hälfte an die affine N-terminale Separase-Bindungsstelle. Dadurch wird das Securin in räumliche Nähe zur zweiten vorhandenen Bindungsstelle der Separase gebracht. Im zweiten Schritt bindet dann das Securin mit seiner N-terminalen Hälfte an die C-terminale Region der Separase. Diese C-terminale Bindungsstelle besitzt nur geringe Affinität zum Securin. In *Drosophila* müsste die Affinität der zweiten Bindung, das heißt der Bindung von PIM an SSE höher sein, da im Unterschied zu Organismen mit einer „großen“ Separase nicht nur zwei, sondern drei Proteine miteinander assoziieren (Abb. 6-1). Unabhängig von dieser Hypothese ist aufgrund der vorhandenen Daten anzunehmen, dass der Aufbau des inaktiven Separase-Komplexes für einfache und hochentwickelte Eukaryoten gleichermaßen zutrifft und somit evolutionär konserviert ist (Abb. 6-1).

Der aktive Separase-Komplex entsteht in *Drosophila* durch die Degradation des Securins PIM, wodurch SSE direkt mit THR interagiert. Wenn dies auf den humanen Komplex übertragen wird, so wäre anzunehmen, dass durch die hPTTG-Degradation der N-terminale hSeparase Bereich direkt mit dem C-terminalen Abschnitt interagiert. Diese Form sollte dann katalytisch aktiv sein (Abb. 6-1).

In der Tat kann in den Two-Hybrid-Experimenten eine Interaktion des C-Terminus der humanen Separase mit deren N-Terminus gezeigt werden. Dieses Resultat steht im Einklang mit dem postulierten Modell. Es wird weiterhin gestützt durch die Beobachtung, dass in humaner Zellkultur nach Securin Degradation die durch die autokatalytische Spaltung entstanden hSeparase-Fragmente miteinander assoziiert bleiben und dieser Komplex katalytisch aktiv ist (Waizenegger et al. 2002; Zou et al. 2002).

Auch für die Separase aus *S. cerevisiae* konnten Hinweise auf eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem N- und C-Terminus erhalten werden. In Versuchen mit einem Separase-Deletionskonstrukt, bei dem die N-terminalen 155 Aminosäuren deletiert sind, war *in vitro* zwar die Anbindung des Substrats Scc1 noch möglich, nicht jedoch dessen Spaltung (Hornig et al. 2002). Die Abhängigkeit der Separaseaktivität vom eigenen N-Terminus ließ vermuten, dass der N-terminale und C-terminale Separase-Abschnitt miteinander interagieren (Hornig et al. 2002). In der Tat wurde die Interaktion eines N-terminalen Separase-Fragments (AS 1-370) mit einem C-terminalen Fragment (AS 1390-1630) nachgewiesen. Dieses C-terminale Fragment beinhaltet auch die konservierte Proteasedomäne (Hornig et al. 2002). Die Annahme aus diesen Experimenten ist, dass nach erfolgter Securin-Degradation die intramolekulare Wechselwirkung zur Ausbildung der katalytisch aktiven Form führt (Abb. 6-1, Hornig et al. 2002).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass die Topologie der Separase-Komplexe aus verschiedenen Organismen vermutlich sowohl in der inaktiven als auch in der aktiven Form sehr ähnlich ist.

6.7 Die Aufspaltung der „großen“ Separase in *D. melanogaster* bietet zusätzliche Regulationsmöglichkeiten

Trotz der Gemeinsamkeiten im Aufbau der Separase-Komplexe der verschiedenen Organismen ist für den Separase-Komplex in *Drosophila* anzunehmen, dass dieser sich teilweise funktionell von den Separase-Komplexen aus Organismen mit einer „großen“ Separase unterscheidet. In *Drosophila* kommt es neben der Trennung der Separase in Sse und *thr* auch zur mitotischen THR-Spaltung (Herzig et al. 2002). Es ist denkbar, dass die Kombination aus beiden Spaltungen dazu führte, dass der *Drosophila* Separase-Komplex im

Verlauf der Evolution zusätzliche Funktionen übernommen hat. Hierbei wäre möglich, dass durch die Aufspaltung der Separase in zwei Gene zusätzliche Regulationsmechanismen der Separase-Aktivität entstanden sind.

Einen Hinweis auf einen *Drosophila*-spezifischen Regulationsmechanismus der Separase-Aktivität gibt die mitotische THR-Spaltung. Diese Spaltung ist an der Inaktivierung des *Drosophila* Separase-Komplexes beteiligt (Herzig et al. 2002). Da die zytologischen Untersuchungen der ektopischen Expression einer nicht spaltbaren THR-Variante unter anderem zu Defekten während der sehr schnellen synzytialen Teilungen im frühen Embryo führten (Herzig et al. 2002), wäre denkbar, dass die THR-Spaltung für eine schnelle Inaktivierung des aktiven Separase-Komplexes während der schnellen synzytialen Teilungen verantwortlich ist.

Zusätzlich könnte Sse weitere zelluläre Funktionen übernehmen. Die Untersuchungen einer nicht spaltbaren THR-Variante gaben des Weiteren Hinweise auf zusätzliche Separase-Substrate. Die ektopische Expression einer nicht spaltbaren THR-Variante führte zu temperaturabhängigen Zellularisierungsdefekten (Herzig et al. 2002). Während der Zellularisierung werden die etwa 6000 Kerne des synzytialen Blastoderms von Zellmembranen umschlossen. Hier scheint SSE in einen Prozess involviert zu sein, der unabhängig von der Separation der Schwesterchromatiden ist. Es wäre denkbar, dass die hyperaktive Separase zur Spaltung eines noch unbekanntes Proteins führte, das für die Zellularisierung wichtig ist. Dies wäre folglich ein Hinweis, dass die *Drosophila* Separase neben der Funktion bei der Trennung der Schwesterchromatiden noch an weiteren Prozessen beteiligt ist.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die Separasen aus *C. elegans* und *S. cerevisiae* gemacht werden. Die Separase aus *C. elegans* scheint Substrate zu besitzen, deren Spaltung wichtig für die osmotische Regulation sowie die Bildung der anterior-posterioren Achse im befruchteten Ei ist (Siomos et al. 2001; Rappleye et al. 2002). In *S. cerevisiae* ist gezeigt worden, dass Slk19 (synthetic lethal KAR3), ein Protein das in die Stabilität der Anaphasenspindel involviert ist, ein weiteres direktes Substrat der Separase ist (Sullivan et al. 2001). Neben diesem Substrat wurden über Datenbankanalysen 26 weitere potentielle Separase-Substrate postuliert (Rao et al. 2001).

Zusammenfassend scheint die Funktion der Separase während der Separation der Schwesterchromatiden konserviert zu sein. Zusätzlich zu dieser konservierten Funktion ist zu vermuten, dass die Separasen teilweise auch Spezies-spezifische Funktionen übernehmen. In *Drosophila* wird diese Spezies-spezifische Funktion vermutlich durch die Trennung der Separase in Sse und thr und über die mitotische THR-Spaltung erreicht.

7. Literaturverzeichnis

Adams M.D., S.E. Selniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne, et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-95.

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

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D.J. Lipman. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-402.

Anderson, D.E., A. Losada, H.P. Erickson und T. Hirano. (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol* **156**: 419-24.

Andrade, M.A., C. Petosa, S.I. O'Donoghue, C.W. Muller und P. Bork. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J Mol Biol* **309**: 1-18.

Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook* (Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith und K. Struhl (1997). *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, New York).

Blackman, R.K. und M. Meselson. (1986). Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila hsp 82* gene. *J.Mol. Biol.* **188**: 499-515.

Brand, A.H. und N. Perrimon. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415.

Brown, N.H. und F.C. Kafatos. (1988). Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J.Mol. Biol.* **203**: 425-437.

Buonomo, S.B., R.K. Clyne, J. Fuchs, J. Loidl, F. Uhlmann und K. Nasmyth. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* **103**: 387-398.

Chou, T.B. und E. Noll und N. Perrimon. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**: 643-653.

Chou, T.B. und N. Perrimon. (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**: 1673-1679.

Cingolani, G., C. Petosa, K. Weis und C.W. Muller. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* **399**: 221-9.

Ciosk, R., M. Shirayama, A. Shevchenko, T. Tanaka, A. Toth und K. Nasmyth. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell* **5**: 243-54.

Ciosk, R., W. Zachariae, C. Michaelis, A. Shevchenko, M. Mann und K. Nasmyth. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* **93**: 1067-1076.

- Cobbe, N. und M.M. Heck. (2000). Review: SMCs in the world of chromosome biology- from prokaryotes to higher eukaryotes. *J Struct Biol* **129**: 123-43.
- Cohen-Fix, O. und D. Koshland. (1999). Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes Dev* **13**: 1950-9.
- Cohen-Fix, O., J.M. Peters, M.W. Kirschner und D. Koshland. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* **10**: 3081-3093.
- Conti, E., M. Uy, L. Leighton, G. Blobel und J. Kuriyan. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**: 193-204.
- D'Andrea, R.J., R. Stratmann, C.F. Lehner, U.P. John und R. Saint. (1993). The *three rows* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a novel protein that is required for chromosome disjunction during mitosis. *Mol Biol Cell* **4**: 1161-1174.
- Dinardo, S., K.A. Voelkel und R.L. Sternglanz. (1984). DNA topoisomerase mutant of *S. cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2616-20.
- Downes, C.S., A.M. Mullinger und R.T. Johnson. (1991). Inhibitors of dna topoisomerase-II prevent chromatid separation in mammalian-cells but do not prevent exit from mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8895-8899.
- Eichinger, A., H.G. Beisel, U. Jacob, R. Huber, F.J. Medrano, A. Banbula, J. Potempa, J. Travis und W. Bode. (1999). Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold. *EMBO J* **18**: 5453-62.
- Engels, B. (2000). Untersuchungen zur Wechselwirkungen des *Drosophila melanogaster* Proteins CID, Diplomarbeit, Fakultät für Biologie/Chemie/Geowissenschaften, Universität Bayreuth.
- Erickson J. W. und T.W. Cline. (1998). Key aspects of the primary sex determination mechanism are conserved across the genus *Drosophila*. *Development* **125**: 3259-3268.
- Evan, G.I., G.K. Lewis, G. Ramsay und J.M. Bishop. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**: 3610-3616.
- Funabiki, H., K. Kumada und M. Yanagida. (1996a). Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J* **15**: 6617-6628.
- Funabiki, H., H. Yamano, K. Kumada, K. Nagao, T. Hunt und M. Yanagida. (1996b). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381**: 438-441.
- Gatti, M. und B.S. Baker. (1989). Genes controlling essential cell-cycle functions in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **3**: 438-453.
- Gimenez-Abian, J.F., D.J. Clarke, J. Devlin, M.I. Gimenez-Abian, C. De la Torre, R.T. Johnson, A.M. Mullinger und C.S. Downes. (2000). Premitotic chromosome individualization in mammalian cells depends on topoisomerase II activity. *Chromosoma* **109**: 235-44.
- Glotzer, M., A.W. Murray und M.W. Kirschner. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-138.
- Gonzalez, C. und D.M. Glower. (1993). Techniques for studying mitosis in *Drosophila*. In *The cell cycle: A practical approach* (ed. E. Brookes und D. Fantes) pp. 143-175. IRL press, Oxford, UK.
- Greenspan, R. J. (1997). Fly Pushing. The Theorie and Practice of *Drosophila* Genetics . (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Guacci, V., D. Koshland und A. Strunnikov. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* **91**: 47-57.
- Haering, C.H., J. Lowe, A. Hochwagen und K. Nasmyth. (2002). Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex. *Mol Cell* **9**: 773-88.
- Harlow, E. und D. Lane (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hauf, S., I.C. Waizenegger und J.M. Peters. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* **293**: 1320-1323.
- Herzig, A. (1999). Untersuchungen zu Wechselwirkungen der *Drosophila melanogaster* Proteine Pimples und Three Rows. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie/Chemie/Geowissenschaften, Universität Bayreuth.
- Herzig, A., C.F. Lehner und S. Heidmann. (2002). Proteolytic cleavage of the THR subunit during anaphase limits *Drosophila* separase function. *Genes Dev* **16**: 2443-54.
- Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev* **16**: 399-414.
- Holloway, S. L., M. Glotzer, R.W. King und A. W. Murray. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* **73**: 1393-1402.
- Hooper, J.E., M. Perez-Alonso, J.R. Bermingham, M. Prout, B.A. Rocklein, M. Wagenbach, J.E. Edstrom, R. de Frutos und M.P. Scott. (1992). Comparative studies of *Drosophila* Antennapedia genes. *Genetics* **132**: 453-69.
- Horn, C. und E.A. Wimmer. (2000). A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol* **210**: 630-7.
- Hornig, N.C., P.P. Knowles, N.Q. McDonald und F. Uhlmann. (2002). The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol* **12**: 973-82.
- Hoyt, M.A. (2001). A new view of the spindle checkpoint. *J Cell Biol* **154**: 909-11.
- Irniger, S., S. Piatti, C. Michaelis und K. Nasmyth. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* **81**: 269-278.
- Jäger, H. (1999). Strukturelle Konservierung der Gene *pimples* und *three rows*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie/Chemie/Geowissenschaften, Universität Bayreuth.
- Jäger, H., A. Herzig, C.F. Lehner und S. Heidmann. (2001). *Drosophila* Separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR. *Genes Dev* **15**: 2572-2584.
- Jallepalli, P.V., I.C. Waizenegger, F. Bunz, S. Langer, M.R. Speicher, J.M. Peters, K.W. Kinzler, B. Vogelstein und C. Lengauer. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* **105**: 445-457.
- Jensen, S., M. Segal, D.J. Clarke und S.I. Reed. (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.
- Kabsch, W. und K.C. Holmes. (1995). The actin fold. *Faseb J* **9**: 167-74.
- Karsenti, E. und I. Vernos. (2001). The mitotic spindle: a self-made machine. *Science* **294**: 543-7.
- King, R.W., J.-M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter und M.W. Kirschner. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**: 279-288.

- Knoblich, J.A. und C.F. Lehner. (1993). Synergistic action of *Drosophila* cyclin A and cyclin B during the G2-M transition. *EMBO J* **12**: 65-74.
- Knop, M., K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth und E. Schiebel. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-72.
- Kumada, K., T. Nakamura, K. Nagao, H. Funabiki, T. Nakagawa und M. Yanagida. (1998). Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Curr Biol* **8**: 633-641.
- Leismann, O., A. Herzig, S. Heidmann und C.F. Lehner. (2000). Degradation of *Drosophila* PIM regulates sister chromatid separation during mitosis. *Genes Dev* **14**: 2192-2205.
- Lindsley, D.L. und G. G. Zimm. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster* (San Diego: Academic Press).
- Losada, A., M. Hirano und T. Hirano. (1998). Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* **12**: 1986-97.
- Losada, A. und T. Hirano. (2001). Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation. *Bioessays* **23**: 924-35.
- Losada, A., T. Yokochi, R. Kobayashi und T. Hirano. (2000). Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol* **150**: 405-16.
- Lovato, T.L., S.M. Meadows, P.W. Baker, J.C. Sparrow und R.M. Cripps. (2001). Characterization of muscle actin genes in *Drosophila virilis* reveals significant molecular complexity inskeletal muscle types. *Insect Mol Biol* **10**: 333-40.
- Lowe, J. (1998). Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J Struct Biol* **124**: 235-43.
- Maney, T., L.M. Ginkel, A.W. Hunter und L. Wordeman. (2000). The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view. *Int Rev Cytol* **194**: 67-131.
- Melby, T.E., C.N. Ciampaglio, G. Briscoe und H.P. Erickson. (1998). The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol* **142**: 1595-604.
- Michaelis, C., R. Ciosk und K. Nasmyth. (1997). Cohesins: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**: 35-45.
- Nasmyth, K., J.M. Peters und F. Uhlmann. (2000). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* **288**: 1379-85.
- Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* **35**: 673-745.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* **297**: 559-65.
- Nüsslein-Volhard, C., E. Wieschaus und H. Kluding. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch Dev Biol* **193**: 267-282.
- O'Kane C.J. (1998). Enhancer Traps. In "*Drosophila - A Practical Approach*". D.B. Roberts, ed (Oxford University Press), pp.131-178.
- O'Neil, M.T. und J.M. Belote. (1992). Interspecific comparison of the *transformer* gene of *Drosophila* reveals an unusually high degree of evolutionary divergence. *Genetics* **131**: 113-128.

- Peters, J.M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**: 931-43.
- Pfleger, C.M. und M.W. Kirschner. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* **14**: 655-65.
- Philp, A.V., J.M. Axton, R.D.C. Saunders und D.M. Glover. (1993). Mutations in the *Drosophila melanogaster* gene *three rows* permit aspects of mitosis to continue in the absence of chromatid segregation. *J Cell Sci* **106**: 87-98.
- Pimpinelli, S., S. Bonaccorsi, L. Fanti und M. Gatti. (2000). Preparation and analysis of *Drosophila* protocols. (eds. W. Sullivan, M. Ashburner und R.S. Hawley), pp. 3-23. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Pirrotta, V. (1986). Cloning *Drosophila* Genes. In "*Drosophila - A Practical Approach*". D.B. Roberts , ed (Oxford: IRL Press) , pp.83-110.
- Pirrotta, V. (1988). Vectors for P-element transformation in *Drosophila*. In *Vectors. A survey of cloning vectors and their uses* (ed. R.L. Rodriguez and D.T. Denhardt), pp. 437-456. Butterworths, Boston and London.
- Preston, C.R. und W.R. Engels. (1996). P-element-induced male recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* **144**: 1611-22.
- Preston, C.R., J.A. Sved und W.R. Engels. (1996). Flanking duplications and deletions associated with P- induced male recombination in *Drosophila*. *Genetics* **144**: 1623-1638.
- Reichhart, J.M.und D. Ferrandon (1998). *Drosophila Information Service* **81**: 201-201.
- Rao, H., F. Uhlmann, K. Nasmyth und A. Varshavsky. (2001). Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* **410**: 955-959.
- Rappleye, C.A., A. Tagawa, R. Lyczak, B. Bowerman und R.V. Aroian. (2002). The anaphase-promoting complex and separin are required for embryonic anterior-posterior axis formation. *Dev Cell* **2**: 195-206.
- Roberts, D.B. (1986). *Drosophila: a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Rorth, P. (1998). *Gal4* in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev* **78**: 113-8.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanson, B., P. White und J.P. Vincent. (1996). Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* **383**: 627-630.
- Schmid, K.J. und D. Tautz. (1997). A screen for fast evolving genes from *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9746-9750.
- Siedler, M. (1998). Identifizierung und Isolierung eines *pimples* Homologs aus *Drosophila yakuba* und Konstruktion von *three rows*-Transgenen. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie/Chemie/Geowissenschaften, Universität Bayreuth.
- Shah, J.V. und D.W. Cleveland. (2000). Waiting for anaphase: Mad2 und the spindle assembly checkpoint. *Cell* **103**: 997-1000.
- Siomos, M.F., A. Badrinath, P. Pasierbek, D. Livingstone, J. White, M. Glotzer und K. Nasmyth. (2001). Separase is required for chromosome segregation during meiosis I in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **11**: 1825-1835.

- Skibbens, R.V., L.B. Corson, D. Koshland und P. Hieter. (1999). Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev* **13**: 307-19.
- Sone, M., E. Suzuki, M. Hoshino, D. Hou, H. Kuromi, M. Fukata, S. Kuroda, K. Kaibuchi, Y. Nabeshima und C. Hama. (2000). Synaptic development is controlled in the periaxonal zones of *Drosophila* synapses. *Development* **127**: 4157-68.
- Soppa, J. (2001). Prokaryotic structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: distribution, phylogeny, and comparison with MukBs and additional prokaryotic and eukaryotic coiled-coil proteins. *Gene* **278**: 253-64.
- Spradling, A.C. (1986). In "*Drosophila - A Practical Approach*". D. B. Roberts, ed. (Oxford: IRL Press), pp 175-198.
- Stegmeier, F., R. Visintin und A. Amon. (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* **108**: 207-20.
- Stemmann, O., H. Zou, S.A. Gerber, S.P. Gygi und M.W. Kirschner. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**: 715-726.
- Stratmann, R. und C.F. Lehner. (1996). Separation of sister chromatids in mitosis requires the *Drosophila pimples* product, a protein degraded after the metaphase anaphase transition. *Cell* **84**: 25-35.
- Sudakin, V., D. Ganoth, A. Bahan, H. Heller, J. Hershko, F.C. Luca, J. Ruderman und A. Hershko. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular Biology of the Cell* **6**: 185-198.
- Sullivan, M., C. Lehane und F. Uhlmann. (2001). Orchestrating anaphase und mitotic exit: separase cleavage and localization of Slk19. *Nat Cell Biol* **3**: 771-777.
- Sumara, I., E. Vorlaufer, C. Gieffers, B.H. Peters, und J.M. Peters. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* **151**: 749-62.
- Sumara, I., E. Vorlaufer, P.T. Stukenberg, O. Kelm, N. Redemann, E.A. Nigg und J.M. Peters. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* **9**: 515-25.
- Tinker-Kulberg, R.L. und D.O. Morgan. (1999). Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes Dev* **13**: 1936-49.
- Tomonaga, T., K. Nagao, Y. Kawasaki, K. Furuya, A. Murakami, J. Morishita, T. Yuasa, T. Sutani, S.E. Kearsey, F. Uhlmann, K. Nasmyth und M. Yanagida. (2000). Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev* **14**: 2757-2770.
- Toth, A., R. Ciosk, F. Uhlmann, M. Galova, A. Schleiffer und K. Nasmyth. (1999). Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev* **13**: 320-33.
- Truman, J.W., B.J. Taylor und T.A. Awad. (1993). Formation of the adult nervous system. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed M. Bate and A.M. Arias), pp 1245-1272. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tugendreich, S., J. Tomkiel, W. Earnshaw und P. Hieter. (1995). CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* **81**: 261-268.
- Uhlmann, F., F. Lottspeich und K. Nasmyth. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**: 37-42.

Uhlmann, F. und K. Nasmyth. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol* **8**: 1095-101.

Uhlmann, F., D. Wernic, M.A. Poupart, E.V. Koonin und K. Nasmyth. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**: 375-86.

Waizenegger, I.C., J.F. Gimenez-Abian, D. Wernic und J.-M. Peters. (2002). Regulation of Human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol* **12**: 1368-78.

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

Warren, W.D., S. Steffensen, E. Lin, P. Coelho, M. Loupart, N. Cobbe, J.Y. Lee, M.J. McKay, T. Orr-Weaver, M.M. Heck und C.E. Sunkel. (2000). The *Drosophila* RAD21 cohesin persists at the centromere region in mitosis. *Curr Biol* **10**: 1463-6.

Wittmann, T., A. Hyman und A. Desai. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol* **3**: E28-34.

Wodarz, A., U. Hinz, M. Engelbert und E. Knust. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma- membrane domains of ectodermal epithelia of drosophila. *Cell* **82**: 67-76.

Yamamoto, A., V. Guacci und D. Koshland. (1996). Pds1p, an inhibitor for faithful execution of anaphase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **133**: 85-97.

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

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

Zur, A. und M. Brandeis. (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J.* **20**: 792-801.

8. Anhang

8.1 Sequenzen der Sse-orthologen Gene aus *D. virilis* sowie *D. willistoni*

8.1.1 Sse-orthologes Gen aus *D. virilis*

Aus genomischer *D. virilis* DNA wurde ein 5 kb *HindIII*-Fragment kloniert, das den kompletten kodierenden Bereich des zu Sse-orthologen Gens umfasst. Die Positionen der Introns wurden über den Vergleich einer kompletten cDNA mit der genomischen Sequenz abgeleitet. Das Sse-Gen aus *D. virilis* (DvSse) ist aus sieben Exons aufgebaut und das aus der kodierenden Region abgeleitete Translationsprodukt hat eine Größe von 640 AS.

```

-139 gcgcagcactgtttttgcagcgttgccaacactgcccangcaaaactgtaaaacagcaacaacttgtggcatgcagaat
                                     #1          #2      Start
-59 ctgaagctgacggcgccggtttttcgaatttacaaattaaatttcaaccatattaatgcagaATGTTTGACGCCGAAGCAAC
                                     M F D A E A T      7
21  GGAAAATGAATTGACCAGCTTAAACAAGCGTGCAGCTTGGCCCCGAAACAAAAGgtaggtaaaatacacaattttcaatta
   E N E L T S L T S V Q L G P E T K E----- 25
101 gcaaccaactgcaaagcgcgctcctgacagAATACAATTTGCTGCGTGCGGACGAGGAGTACCGCAATGGGAACGAGCA
   -Intron----- Y N L L R A D E E Y R N G N E Q 41
181 GGACTCGATCTATTATCAGGTGCGAGCGCTCTTTCAGTGCAGGACATGCGGCTGCTGACCGAGGCACAGGAAGTGGAAA
   D S I Y Y Q V R A L F Q C A D M R L L T E A Q E L E N 68
261 ATCAGCAACCAAGCACAGCGGAAATTTCTCTCAGAAGCCAGCGCCAAGGAGAAAGCCGACTACAAAAGtgagtgtaacca
   Q Q P S T A E I L S E A S A K E K A D Y K S ----- 90
341 ggtggaaccatgtaaactgacgaaccgactctccgtactcttctgtgcagCAACAAGTTCTTCCAGAACATATTAAGAT
   -----Intron----- N K F F Q N I L R Y 100
421 ACCAACAGAAATTGGAACAGAGCAAGGCAAAAATCAAGAACCGCCGCTAGATAGTCTGGACTTTCTCAGGATGTGTCA
   Q Q K L E Q S K A K I K E P P V D S L D F L E D V S 126
501 GAGCCACAGCGGGCTTTGCGCGCATCACACACATATGCCGCCAGCTGCCCGACGAGTGGTGCCTGCTGCAGCTCTGCAA
   E P T A G F A R I T H I C R Q L P D E W C V L Q L C K 153
581 GAGCTTCAATGTGCCACCACATACTCCACATTCTGCGAGATTGCCGGGCCAATGGCGACATCTATGTGTCCCTGCTGC
   S F N A A T T Y S T F C E I A G A N G D I Y V S L L R 180
661 GTCACTGCCGAGTCCAGAGCTGGCCGCCACTTGCCTGCGCCTCAATAGCGACGCAATGGCCAGCTTATTTAAGGCGTAC
   H C R S P E L A A T C L R L N S D A M A S L F K A Y 206
741 GGCACGTTGGTGGAGCGTTTCAGGCGTGTGGTCACTGTCGATCCGCTGACGGTGAAGGCGCAGGAGGCCAAGGCCAAATA
   G T L V E R F R R V V T V D P L T V K A Q E A K A K Y 233
821 CTGGAAGGAAGTGAATGCCTTTGAAGAGTTCTTGAAGgtaaagctgtgatcctgcagttaccaaagtctcatgctcttga
   W K E V N A F E E F L K -----Intron----- 245
901 atcttgcagAAACTGATTGCGGATCTTGGCAGCGTGTTTAGCCCTACAGCTATGTGTTTCTGGGCAAGCGTTACCCAG
   -----K L I A D L G S V F S P Y S Y V F L G K R Y P S 269
980 CGCCGCCGTGCAGCAGCAAACCAAGGCGGTTTACGGCCGCGTGGATGAGTTTCTGTGTGCAGCACAGCTGGAGCAATCATC
   A A V Q Q Q T K A V Y G R V D E F C V Q H S W S N H Q 296

```

```

1061 AGCGCGTACTCCTTTTCGCAGGCGGCATTGCATGCGAATCGCCTGCCACGCGACCAGATGAAACAGCTGAGCTATGAGCTT
    R V L L S Q A A L H A N R L P R D Q M K Q L S Y E L 322
1141 AGCGGCAACAGCCAGAACAACAACAATAACAATGAGACTGAAGCGCTGCTCGTCTATGAGCTGCTCAAGAGCTGTGCCAG
    S G N S Q N N N N N N E T E A L L V Y E L L K S C A S 349
1221 CGACTGGCAGCAGCTGGAACAGCGGGAGCCGCTGGCTGCTAAACGTTTCCCATCATTCTGGTGGTGGATGAGgcaagct
    D W Q Q L E Q R E P L A A K R F P I I L V V D E ----- 373
1301 aagctcgcagcgtagtcagatttcgaaactcgtaattgttgttctatttagCGCCTGGATCATATGCATTGGGAGCAGCT
    -----Intron-----R L D H M H W E Q L 383
1381 GGCCTCCATGCAGGAGTGCACGCGCATCAAGTCGCTGCACAGCTTGTGGCGCCTGTTCAAGTGCCACAAGAACCAGATAC
    A S M Q E C T R I K S L H S L W R L F K C H K N Q I Q 410
1461 AATGTGGCTACTATACGGTTAACATTAAGCGCGGCATAACGGTCATCAATCCCAGTGCAGGATCTAGCCAATTCGGGTGCG
    C G Y Y T V N I K R G I T V I N P D A D L A N S G R 436
1541 CGTCTGCGCAGCTTTCTCGAGTACTGGTTGACTCACTGGGAGCACATGTACGAGACGGTGTCCAGCGAACAGTTTATGCT
    R L R S F L E Y W L T H W E H M Y E T V P S E Q F M L 463
1621 TGAGAAGGCCTTCAAAGCCGATTGCTTTGTgtaggtaaccacattatagctaacctggcaaccaaatgatccaacattct
    E K A F K A D C F V -----Intron----- 473
1701 cttgagcCTATGCAGGTCACGGCTCGAGTCTGCAGTATGTTTCAACTCGCTTGATTTATCGCAATCGCATCAAGGGCGTT
    ----- Y A G H G S S L Q Y V S T R L I Y R N R I K G V 497
1781 GTCTTTCTGTTTGGCTGCGATTTCGACGCGCGTCTAAGCTCGGGTCTGTACAGCGCCCTATATGGCGCCAGGACTATTA
    V F L F G C D S T R V L S S G L Y S A L Y G A Q D Y Y 524
1861
2101 AGGCAACACCGAGACACTGGCCCAGCAGCCGGACTACCAGCTGGGCAGCCTGTGCGCCATTTTGGCTAACGTTTCATATGG
    G N T E T L A Q Q P D Y Q L G S L C A I L A N V H M G 611
2181 GCAAAACGGAGCCCAAATCTACAATTGTTGCGTCTATGTGTGTGTCGGCCTGCCCGCTGGAATTTAGCCGTGCAGCAG
    K T E P K I Y N C C V Y V C R G L P A W N L A V Q Q 637
      Stop
2261 CTGCCCTTTTAGcccaacttcttgattagggtgaaggcttagcacataagtatattaaaatatttgtattaccccagcaaa
    L P F *
2341 agcccaacccaaaactccaaatagacttctttatagagtataaacccaacccagcttaatgtatatcatTTTTgatcagag
2421 tttgagctctgatcagtaattttgtatctaagcttgatcgaattcctgcagccccggggatccactagttctagagcg
2501 gccgccaccgcggtggagctccagc

```

Abbildung 8-1: Sse-Gen aus *D. virilis* und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz.

Die Zahlenangaben links bezeichnen die Nukleotidpositionen, die Zahlen rechts die Positionen der Aminosäuren. Die Nukleotidnummerierung startet beim Adenylat des ATG-Startkodons. Der genomische Genbereich kodiert für ein Protein mit 640 AS. Die Proteinsequenz ist unter der Nukleotidsequenz im Einbuchstabenkode dargestellt. Die in die Sequenz eingezeichneten Introns (blau markiert) wurden über den Vergleich einer cDNA zur genomischen Region abgeleitet. Das potentielle ATG-Startkodon sowie das TAG-Stopkodon sind rot markiert. Kodierende Bereiche sind in Großbuchstaben und nicht kodierende in Kleinbuchstaben dargestellt. Die grün markierten Kodons kennzeichnen die Positionen der Stopkodons kurz vor dem Translationsstart (#1-#2).

8.1.2 Sse-orthologes Gen aus *D. willistoni*

Aus einer genomischen *D. willistoni* λ -DASH-Bibliothek wurde ein Phage isoliert, der mit einer DNA-Sonde eines Sse-Fragments aus *D. willistoni* hybridisierte. Aus diesem rekombinanten Lambda-Phagen wurde ein 5 kb *Hind*III-Fragment kloniert, das den kompletten kodierenden Bereich des zu Sse-orthologen Gens aus *D. willistoni* umfasst. Die Positionen der Introns wurden über den Vergleich einer kompletten cDNA mit der genomischen Sequenz abgeleitet. Das Sse-Gen aus *D. willistoni* (*DwSse*) ist aus sechs Exons aufgebaut und das aus der kodierenden Region abgeleitete Translationsprodukt hat eine Größe von 635 AS.

```

-584 accgggccccccctcgaggctcgacggatcgataagctttcgattgttacttgcccttaagcatgcgctttgtttcctga
-504 tcacaaactttgtttgattttctttgtgcattttgtgcattgaaattaatcaaaaattgaaaattcacttttctaaacttt
-424 ctgataagaataaccgcgcaaaacaaaggaaaaaatgtactaaaaaatgccacaagcggcgagctagctatcgcatatcga
-344 taacataaataaagtgttgggaaatttatgactatcgatatacactaaataactagattttagtattttgggaaatgaaaa
-264 tgattatcgataaagctgggttgctattgtctgagcaaaaaaaaaatacttttgctgacattaaaagataaaataagttt
-184 ataaatttaaattatgcctataattcttattccgatactacttgaaatcgatatacggtatatgtaccgataatcaaacc
#1
-104 gcagtgttttatgtatcagccagcctggtcacactaaaatgtttgcgctttttaattgttttaggaaacttttaata

Start
-24 atcgcacccgctaataaataacaatATGGAACCTAATGGACAGTCTTCTGCTAAGCAGTTACCACAATGCCGATTTGGGCC
M E L M D S L L L S S Y H N A D L G P 19

55 AGAGGCTAAAGgtgcaacaactactctcgctttttgattttgctggcttttacatttaattgtcaattcacttttgaattg
E A K E-----Intron----- 23

135 tacttgcagAAAAATAATTGCTGAAAGCGGATGAAGAGTATCGCAATAATAGACTGGATCATTCAATTTACTATCAAGTT
----- N N L L K A D E E Y R N N R L D H S I Y Y Q V 46

215 AGGGCACAATCCATTCAACTGATTTGCGTTATCTCAGTGAACGGAAACAATGGATCATTTCGGCCGAATATCAAAGA
R A Q F H S T D L R Y L S E L E Q L D H F R P N I K D 73

295 TTTATTGGCAAATGCCAGTGGAAAGGAGCAAAGGATTATAAACGgtgaggcaacaatttgatttcacatggaatgga
L L A N A S G K E Q K D Y K R----- 88

375 cactttaaccacaagaattttatgttgcagccgcttttaagtgtatctcctagtttagatataaatgtgacaagaat
-----Intron-----

455 tgccctagatctaagaaaatgtaataattaactcaatgcaaacatggttagAAAATAAATCTTTTCAGAATATATTG
----- N K F F Q N I L 96

535 GTAAATCTTAAAGATGAGAAAAGATGCCGCAATAAGAATAAGAAACGCTCTCTACCAACTGGCTCCATGACAAAATTCGA
V N L K D E K R C R N K N K K R S L P T G S M T K F D 123

615 CTTCTAGAGGATATTAGACAACCCTCGGATGGCTGGGAACGCATCACAGACATCTGCCGCAATGGCCAATGAATGGT
F L E D I R Q P S D G W E R I T D I C R Q L P N E W C 150

695 GTGTGATACAATTGACCAAGAGTTACAATCCATCAACCACATATTCACTTTACAATGAGATCGCCTCATCGAAGGGTTC
V I Q L T K S Y N P S T T Y S L Y N E I A S S K G S 176

775 ATCTATTGGCCATGCTGCGACATTGCCGCTCACCTGAATTGGAACCCACCTGTTTGAAGTCACCAATGAACGCTGGT
I Y L A M L R H C R S P E L E P T C L K V T N E R L V 203

855 GGAAGTTTCCAGGAATATAGCACACTGGTTCGAACGATTTCTGTCGTGGTCAATGTGGATCCCATTCTGGCCAAGAATA
E V F Q E Y S T L V E R F R R V V N V D P I L A K N K 230

935 AGGAGACTAAACGAAAATACTGGGTGGATCTACATGAGTTGGTAAAGTGCTTGAGgtgagtaagagctaacccttattt
E T K R K Y W V D L H E F G K V L E ----- 248

1015 gattctgttccttctgactgagttacttattctattacagAAATTAATCGCTGACTTGCGTGAGATAATCCTACCCTAT
-Intron-----K L I A D L R E I I L P Y 261

```

```

1095 GCCTTCCTCTTTCTGGGCAAACGATATGCAACCAAATCGGTAACCAAACCTCAGTCAACAGATCTTTGAGAAGTCGATGA
    A F L F L G K R Y A T K S V T K L S Q Q I F R E V D E 288
1175 ATTCTGTGAGCAACATAAATGGAATCAACATCAACGCATAAATACTATCGCAAGCCGCTTATCATGCCAATCATATCAAGA
    F C E Q H K W N Q H Q R I I L S Q A A Y H A N H I K K 315
1255 AAGCGGATATTGCAGTGTATCTTGGAAACTGGCTTCGGATAATGAAGAGGCTATGCAACTGGTGAAGACTTGTCTAAAC
    A D I A V L S W K L A S D N E E A M Q L V E D L L N 341
1335 AAATGGTCCCAGAATTGGGAAGAAGTAAAGAAATTGTCAAGCCATAAGCGATTCCCCACTATTCTCATAGTCGATGAACG
    K W S Q N W E E L K E L S S H K R F P T I L I V D E R 368
1415 TTTGGATCACTTCCATTGGGAGCAGTTGGCCACAACAAGAATTTAGCCGGGTGAAATCTTTGCATTTGCTTTGGCGAC
    L D H F H W E Q L A T T Q E F S R V K S L H L L W R L 395
1495 TCTATCAATGGCATAAACCGAATATCCATCATGGTTACTATACTGTCAACATCGAAAGCGGAATATCTGTCATCAATCCC
    Y Q W H K P N I H H G Y Y T V N I E S G I S V I N P 421
1575 GATGGGGATTGGCCAAATTTGGCCGCAGATTGCGTGGCTTCTTTGAGTATTGGCTGGGCCATTGGCGGAATATGTTTGA
    D G D L P N S G R R L R G F F E Y W L G H W R N M F E 448
1655 AACAGTCCCACCGAAGATGTATAGTCAAGGAAGTCTTCAAATCAAATGCCTTGTgtaagagcttaaacctccttcag
    T V P T E D V I V K E V F K S K C F V ----- 467
1735 ctccctcctgccttaactttaaccataatcctattgccattatagTTACGCTGGTCATGGATCTGGGCTTCAATATATC
    -----Intron----- Y A G H G S G L Q Y I 478
1815 AGCGGTGCAACCAATTTGCCGTTGTCGCGTTGAGGGCATAGTTTTCTTTTCGGCTGCGATTCTACAAAAATTTGGGTAC
    S G R T I C R C R V E G I V F L F G C D S T K I L G T 505
1895 AGGCCTGCATAGTGCCCTGTATGGTAGCCACGATTATTATCACGGTGCCTTATGCCCCACCATAGTGGGCACTTTAATGC
    G L H S A L Y G S H D Y Y H G A L C P T I V G T L M P 532
1975 CAGCCTTGATTCGAATATAGACAATATATCTTCTAGCATCTTAAGTAAATTTCTAGCTCCATCGCATAGAAAAGTGATG
    A L D S N I D N I S S S I L S K F L A P S H R K V M 558
2055 CCTTGGTCGGAAATTGATACCGTAACTTGGGTGAAAAAGGGTTGGTGAAGgtaagttttgctcaggacatgactttta
    P W S E I D T V T W V K K G L V Q A----- 576
2135 actgcacttctaattcttctttttctgcagCTCAAGATGAATCAAATCCACAATACTTGGATCAATATGCCGACTATCAA
    -Intron----- Q D E S N P Q Y L D Q Y A D Y Q 592
2215 ATGGGAAGCCTGCCAGCAATTATATCTCGTGTCCAGCAAGGTCTAATCGATCCAGTAATCTTTAATTGTTGCATTTATGT
    M G S L P A I I S R V Q Q G L I D P V I F N C C I Y V 619

                                                Stop
2295 TTGTCGTGGTCTGCCGGCTTGGAAATTTGTCTGTCCAGAAAATGCCTTTTtagtgaagaatttaagaaaataaatatat
    C R G L P A W N L S V Q K M P F *
2375 aaaatatctaaaagaacctcgaattgtaag

```

Abbildung 8-2: Sse-Gen aus *D. willistoni* und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz.

Die Zahlenangaben links bezeichnen die Nukleotidpositionen, die Zahlen rechts die Positionen der Aminosäuren. Die Nukleotidnummerierung startet beim Adenylat des ATG-Startkodons. Der genomische Genbereich kodiert für ein Protein mit 635 AS. Die Proteinsequenz ist unter der Nukleotidsequenz im Einbuchstabenkode dargestellt. Die in die Sequenz eingezeichneten Introns (blau markiert) wurden über den Vergleich einer cDNA zur genomischen Region abgeleitet. Das potentielle ATG-Startkodon sowie das TAG-Stopkodon sind rot markiert. Kodierende Bereiche sind in Großbuchstaben und nicht kodierende in Kleinbuchstaben dargestellt. Das grün markierte Kodon kennzeichnet die Position des Stopkodons kurz vor dem Translationsstart (#1-#2).

8.2 Sequenzen der *thr*-orthologen Gene aus *D. pseudoobscura* und *D. virilis*

8.2.1 *thr*-orthologes Gen aus *D. pseudoobscura*

Aus einer genomischen *D. pseudoobscura* EMBL4-Bibliothek wurde ein Phage isoliert, der mit einer DNA-Sonde eines *thr*-Fragments aus *D. melanogaster* hybridisierte. Aus diesem rekombinanten Lambda-Phagen wurden insgesamt drei Fragmente subkloniert, deren zusammengesetzte Sequenz den kodierenden Bereich des zu *thr*-orthologen Gens aus *D. pseudoobscura* abdeckte (Jäger 1999). Die Positionen der Introns im *thr*-Gen von *D. pseudoobscura* wurden über den Vergleich des abgeleiteten Translationsproduktes mit THR aus *D. melanogaster* festgelegt. Das *thr*-Gen aus *D. pseudoobscura* (*Dpthr*) ist aus drei Exons aufgebaut und das aus der kodierenden Region abgeleitete Translationsprodukt hat eine Größe von 1409 AS.

```

-843 cgaatacgcctcggtaaatgcttggtaaatgctggatggagtcctacatctggtaggagaaatcgaatacgcactcggtttg
-763 tggcaaacgctaggggtacatactcgtaagttctctgtgaaggaagagatcatttaaaataatcattatgatttggcggct
-683 tatgaatgggaggggttgcacattatctccgtgaaccaaattcggctgcggcgcttggtagccgaagaccctgtga
-603 tctaactctagacagttcgtctgcaacatgctcgggtgtgtgaactggcacatctacgaatatatactgtatggggttactg
-523 gtttaattgagatgagatcgattgctgcgggaacagttgcttcaaaatctaaatttttttttaaaatttcctaaaaa
-443 ggcacgtaaaaagagataacggaggttttttttactggtgcttccatggggcttatatgaaaacagggcgcaacatat
-363 ttgaaacatacacatgccccttcaggtgctgcctttggtaaggaagttagtggaattggttaactattttacaatc
-283 aattccaataaaaaggagtattcaaaattttgtggattttagaaaaattgatttatcaatcgataaaaattacgatttca
-203 gagctaatttcttagccagtaataatataaccgaatataaaatcagaggaaatgtacaatagaatcgtcagtagacttac
-123 ggtattttttggatatatttctgagggtcaggtcacactgaaacacactcaaacgaagcaaagcgttgtaaaaaagtgc

                                Start
-43 aatttatttttaatgtaagaattccgaatcgaacgaatgacaaaATGCTCTGCCGATATAGTGAAACAGTTGAAAGGCACTC   13
                                M S A D I V K Q L K G T R

38 GATCCGATGTTAAGGCAGCCGCCACGACAATTGAGCTGAAATTCAGGAATTCAGCAAGGGCATCGGGATAAACGACGCT   39
   S D V K A A A T T I E L K F K E F S K G I G I N D A

118 TCCTTCCGCTCAGATATGAGTTGAGCGTTTTTGGCCAGCTGTGTCTCGCCCTGAAGGACAATCTGCACCAGCATGCCGA   66
   S F P L R Y E L S V L R Q L C L A L K D N L H Q H A D

198 TCTCTACTGCGGCATTGCGGCCACCATGCTACCTCACGTGGAGCCCTACGAGGAGAAGCCGAGCCTGTGGGAAGCTCATC   93
   L Y C G I A A T M L P H V E P Y E E K P S L W E A H L

278 TAACGAGCCTGCGGTACATACATCATGGGCTTTGTCCAGGAGtaagttgaagaaccaaagtgtgtagctggtgaagcta
   T S L R Y I H H G L C Q E -----Intron-----   106

358 tctaattgtacgggtgcttgcagAGATCCCTGACGGAATGCCAGAAAATATACGGCCTAATCCGATCGCAGCCCTGCCG
-----R S L T E C Q K I Y G L I R S Q P C R   125

438 CCTGCAAGAGGAGGCTGATTACAAGTTTTATTGGACATCCATCTGACGCACTTCAATGGCATTACTTGCAAATGCAGA   152
   L Q E E A D Y K F Y L D I H L T H F N G I Y L Q M Q K

518 AGGAGACGTTGCCCTCGCCGCCACAGATCAACTCTATTACGCCTTGGAGGCAATGGGTGTCTCTTTGACACCATGCAC   178
   E T L P L A A T D Q L Y Y A L E A M G V L F D T M H

598 CAGCGTAAAGTGGCAAAGAATGCGGCTCTCCTGGTCCAGTTGAATGATTCCCTGTTTCAGCAAGCGAAGCAAAGCCTTTCT   205
   Q R K V A K N A A L L V Q L N D S L F S K R T K A F L

678 GAAGTACCTGAGCGCCCTTCCGCCGAGAGCAGACGAAAATGTACGACCCGCTTCTCAAGCTCCTGAGCTGCAGCTGGG   232
   K Y L S A L P P E S T T K M Y D P L L K L L S C S W A

758 CCACACCAGCTCTGAGCTGACTAATCAATTCACGGAGTATCTGGCCCTGGTTCCTGGCACTGGTGCAGATCGATATGTTT   258
   T P S S E L T N Q F T E Y L G L V L A L V Q I D M F

```

838	TCCATAGAAGCGCCACTCGAACAACTGGCACTGAAGTTGCTGCGCATTTGTGCGACCTGTACAAGGACGCTCTCGCC S I E A P L E Q Q L A L K L L R I C R D L Y K D V S P	285
918	GCAGAACTACTCCATCCAGCTCCTCTACTACTACGTCAAGCTGATGTACGTGCGCGAGGCTACGGCGGACTTCAAGCAGA Q N Y S I Q L L Y Y Y V K L M Y V R E A T A D F K Q T	312
998	CTTACATCGATCTGTGCAAGAAGTTTCGTCTACTTCTTCGAGCACAAGGGCGCGACGCACGCCAAAGAGCAGTGGTTTCATG Y I D L C K K F V Y F F E H K G A T H A K E Q W F M	338
1078	GACCTGTGGTATTCTTCCAGCGCCTGCAGACGCTGCTCCATCAGAGCAGCAACAAGCCTCCCTTAGACATTTTTTGGCA D L L V F F Q R L Q T L L H Q S S N K P P L D I F W Q	365
1158	GCAGCTCGAAGGCGACGACAGTTCCGAGGTATACACCGCCCACTTCAACTGCTGCATGGCTGCCTTGGGCTGGCGGTGA Q L E G D D S S E V Y T A H F Q L L H G C L G L A V N	392
1238	ACGTAGTGAGGAGTCCGCTGGGGACCAGCTGCTCCAACGAGGCCTGTAAAAGCATTTCGACGGCATTGCCTTCTCTACTTC V V R S P L G T S C S N E A C K S I R R H C L L Y F	418
1318	GGGATGTGCGCCCTGGAAGCTTACATTAAGTGGCAGCCGACGACCGAACAGAAGGGCGACAAGgtacgtctgccaagct G M C A L E A Y I N W Q P T T E Q K A D K -----	439
1398	ggaaaccttttacctaagctatctcttcagGCACCTATAAGCCGCTCTTGGCATTCTTGGCTACACCTTGGACG -----Intron-----A P Y K P L L G I L G Y T L D V	455
1478	TGGCCAAGAGCATGAAGTGCCTGGGGCCCTGCGCCATGGAGCTAGTCAAGCTTGTGCGTCTACTGGCACTCGTGGCCGAA A K S M K C L G P C A M E L V K L V R L L A L V A E	481
1558	AAGGTATCGTGTCCGAACAAATGTCCCTTGTGTGGCCTTCTTGGAGCCCTTGCAACATCTACGACCGCTCATCGCCAG K V S C P E Q M S L V L A F L E P L Q H L R P L I A S	508
1638	CCAGGATATGCTTAGTGTGCTCCGGAGAATCTACAAAGCCAGTGTCCACTGCAAGAGCTCCGACATGGCCAACCGTCTGC Q D M L S V L R R I Y K A S V H C K S S D M A N R L Q	535
1718	AGTCCACCTACCTTGCAGCCCTAACGAATCCCTCGCGTTGCGTTCACAGCTCTTCGCCCACTACCACAATGCCAATAAT S T Y L A A L T N P S R L R S Q L F A H Y H N A N N	561
1798	ACGGAGAAGTGCCTTACGAGTGGCAGGAGTCCAGTCTATGCCCAACCCCTAACCCCGCCCAACGAAACAGCTATA T E K C V Y E W H E S S P M P N P L T P A Q T K Q L Y	588
1878	CGATGTGGATCTGTTGGCGGTGCTGCACCTTCTGAGTGGCCGCGCCGTACCCCTGCTGCAGTGCCTACTACGCTGCCGTC D V D L L A V L H F L S A P P V P L L Q S L L R C R H	615
1958	ACAATGACTACCACCTGGCTCTCCTGGCAGCAAGATGCGCACCAGCAGCGAGGTGGTGCCTCAGTGCAGGAACTGCGC N D Y H L A L L A R K M R T D S E V V R Q C E E L R	641
2038	TCCAGCTGCACAGCACGGCCCTCAAGCAACCGCTCAGCCGATGCAACAGCTGGCCATTGGCCATACCAGTATCAGCGT S Q L H S T A L K Q P L S R M Q Q L A I G H T S I S V	668
2118	GCTGCTGGAGGCTTTGGAGGCACAGAAGCAAGTTCTCGATCAAGGAGACGGCCGAGAACTGCCTGGAAGAGTTAATCG L L E A L E A Q K T K F S I K E T A E N C L E E L I V	695
2198	TCAAGAATAACTTGTGGAGCTCAACATTAAGCGGGAGCATCGCTGGTGGAGTTGGCCACATCGGCCATCGCTGCTTTC K N N L L E L N I K R E H R L V E L A T S A I A A F	721
2278	GCGGCCCTTCTTCGAACGTGCAGACCAAGACCCCTCGGCTGCGACGATACACCAATCGACTGGGAAGCTCTGATCGACGA A A F F E R A D Q E P L G C D D T P I D W E A L I D D	748
2358	TGCAGTTGCTGCAGCCATGGCTCTGTCCACCATGGGCTACACGGCGCAGGCCGATGAAGCTTGGCTGCTGATACTCAGGA A V A A A M A L S T M G Y T A Q A D E A W L L I L R I	775
2438	TTGGGCAAATGCTGGACGAGAGATTCACTACCTGCGAGCCCTGACCCACTTCTGGGACAAGACCATCTGAATTCTAAC G Q M L D E R F T Y L R A L T H F L G Q D H L N S N	801
2518	CAGCAGTCCAACCTCTCCGAGGAGGTGGATCGAGCGCAGGAGCTGCTTGACGATCTGTGGCCTCAGCTCCAAAACGGATG Q Q L Q L S E E V D R A Q E L L D D L W P Q L Q N G W	828
2598	GTTCCTTAAAGCGCAACATACTATAGTGATGCTCTGCCTCTGCCACATGGCCAGCTACTATGCGCGCAGGACTGTCTGT F F K R Q H T I V M L C L C H M A S Y Y A R Q D C L C	855
2678	GCCACGCCAGCTGCTGTTGCTGCAGGCCGAGGAGCTGCGCGCCAGTTTCGATGAGCGAGTTGGCAAGTGCACATTTGTG H A Q L L L L Q A E E L R A Q F D E R V G K C D I V	881
2758	CAGATCACAAATCCAGACAGTTTCGCTTTTCGATTGGAGTACCTGCGGAATAAGAGGTGCAGCAGCCTGCCTAGGAGCCGAC Q I T I Q T V R F R L E Y L R N K R C S S L P R R P T	908
2838	GCCCCTGCGACAGCTAGACACGCTGGTGCAGCGTGCAGCACTACTGCACAGTGTCCAGCGTGGACCTGGGAGCCCTGC P L R Q L D T L V D S V R N Y C T V S S V D L G A L Q	935

```

2918 AGCTGCTGCTGGCTGACCTCGTGCGGGAGAGCACCGAGTGTGCGGCCAACCGGCTGACCGAGCGGTTCGCCTTTTACGGC
    L L L A D L V R E S T E C A A N R L T E R F A F Y G      961
2998 ACCATGCTTAACCTGGTGTGTCAGTCGGGTATGGCCCTGCGGACCATTGAGGTGCTCATCTCGTGGCTCTGGATGAACCT
    T M L N L V L Q S G M A L R T I E V L I S W L W M N L      988
3078 GCAGATGGAGTACCTGGACCAGGCGCAGTCCAAGCTGCGCCTCCTAGACCATTGCTCGCCATCAAGCCGCTTAGTTCGAA
    Q M E Y L D Q A Q S K L R L L D H L L A I K P L S R T      1015
3158 CGCTGGTGGAGCAGACATCGGCCACATACGTCCCCGCAATCGCCGCAAGGAAGATCTCAAGGCGAATGCCATGAGCGAG
    L V E Q T S A T Y V P A I A A K E D L K A N A M S E      1041
3238 CTGACCAGCAACATGCTGCTCATGCAGCTCGTGGAGCCGATAAGGAAGCAGAACCAAATGGACGTGGCCACAATCAAATC
    L T S N M L L M Q L V E P I R K Q N Q M D V A T I K S      1068
3318 TCTGCCCATGCACGAGCCAATCCCACCAGCCATCAGCTGCAGCGCTATATGAGCAAGCAAGGGACGCCGCCCATCTAC
    L P M H E P I P T S H Q L Q R Y M S K Q G T P P H L R      1095
3398 GGGACAGCATGCAGCTGCAATGTATCTACTTTATCGTGGGATGTCTCCATGCCCGCTTCAGCTTCTTGAAAAGGGAGAAC
    D S M Q L Q C I Y F I V G C L H A R F S F L K R E N      1121
3478 GATCAGCTGGACGACTTCTACGTGGGGCGGGCAATTGGCTGCGAGGAGATCCCGTACGCACCGCCACACTTGGCTCCAT
    D Q L D D F Y V G A G N W L Q E D P V R T A T L G S M      1148
3558 GCTCCTCGTGCACGAACTCTACCACCTCAACTATCTTCGCTTACAGAAAGAAGCATAAGGAGGCTCTCAGCTATGCGGAGG
    L L V H E L Y H L N Y L R F R K K H K E A L S Y A E A      1175
3638 CAGGTCTCAAATCAGTGTACCAAACGGGCGGACATCAACTATAGCTTCAACTTCATGGTCCAGCTGAAGACGGCCCGGTTG
    G L K S V Y Q T A D I N Y S F N F M V Q L K T A R L      1201
3718 GAGCTGCATCCCGTTGGCAAAGCGAGGGCGAAGACCATTAGGCGAGCCCTCGCTTCAACACTTCGCCAGAGGATAAACG
    E L H P V G K A R A K T I R R A L A F N T S P E D K R      1228
3798 CAGGAAAGGTGTGTTGAGGGGTCTACCAAGGCAAAATCATCTGCCAGAAAGACGCCAGGTTCAAGATATACACGGAGC
    R K G V V E G S T K A K S S A R K T P R F K I Y T E L      1255
3878 TGGAATTGCGACCCCCATCGGCTGCAGCAACAGCAGCAGCAGTAGCAGCAAGAGCGGCAATGAGAACACGCCACCATCG
    E L R P P I G C S N S S S S S S K S G N E N T P P S      1281
3958 GATCATGTGGATCTGAATGCCTGCCAGGCGATCGAGATAAGCGATGACGATGCTGCTTCGGTTTCAGCGTCGACTCCGGC
    D H V D L N A C Q A I E I S D D D A A S V S A S T P A      1308
4038 TCCCTCTCAATTGAAACGATCCCAATCGGTGCCAGCTAAGGCCACAAAAACACGCTCCACTAGAGTTGGTAGCCAACTAA
    P S Q L K R S Q S V P A K A T K T R S T R V G S Q L K      1335
4118 AAGTACCAGAGATCATCGAATTGGACGATACCATGGAAGAGACGCCCTTCCACCTCGACGGCAGCCACAGTGAAGCGGTAT
    V P E I I E L D D T M E E T P S T S T A A T V K R Y      1361
4198 CCGACCACTGATGCAAGGAGCACTCGTGCCCGCAACAGGCAACTCGAGGAAACGCCAGCGACCACGCGGGGACGACCACG
    P T T D A R S T R A R N R Q L E E T P A T T R G R P R      1388
4278 TCGGAAGGTACCGGAGCCTGCACCCAGCAGGAGACAGTCAGCCTTAGGCGGCGACAAAGGAACTGAtcagagctaacac
    R K V P E P A P Q Q E T V S L R R R Q R N *      1409
4358 gtgcataggtttataaatagtttatagtttaagttttttgtagcttgccttattccatttgattgtgtattttataaacg
4438 ttatggcaaggagatcgacc

```

Abbildung 8-3: *thr*-Gen aus *D. pseudoobscura* und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz.

Die Zahlenangaben links bezeichnen die Nukleotidpositionen, die Zahlen rechts die Positionen der Aminosäuren. Die Nukleotidnummerierung startet beim Adenylat des ATG-Startkodons. Der genomische Genbereich kodiert für ein Protein mit 1409 AS. Die Proteinsequenz ist unter der Nukleotidsequenz im Einbuchstabenkode dargestellt. Die in die Sequenz eingezeichneten Introns (blau markiert) wurde über den Vergleich der abgeleiteten DpTHR Proteinsequenz mit DmTHR ermittelt. Das potentielle ATG-Startkodon sowie das TAG-Stopkodon sind rot markiert. Kodierende Bereiche sind in Großbuchstaben und nicht kodierende in Kleinbuchstaben dargestellt.

8.2.2 *thr*-orthologes Gen aus *D. virilis*

Aus einer genomischen *D. virilis* EMBL3-Bibliothek wurde ein Phage isoliert, der mit einer DNA-Sonde eines *thr*-Fragments aus *D. virilis* hybridisierte. Aus diesem rekombinanten Lambda-Phagen wurden insgesamt fünf Fragmente subkloniert, deren zusammengesetzte Sequenz den kodierenden Bereich des zu *thr*-orthologen Gens aus *D. virilis* abdeckte. Die Positionen der Introns im *thr*-Gen von *D. virilis* wurden über den Vergleich einer cDNA mit der genomischen Sequenz abgeleitet. Das *thr*-Gen aus *D. virilis* (*Dvthr*) ist aus fünf Exons aufgebaut und das aus der kodierenden Region abgeleitete Translationsprodukt hat eine Größe von 1411 AS.

```

-668 tctgtgtgtggctcatcaatcatcaagagtcctctggactgtgtgtgaaacttttagcgaaaacgttttaaacgtgacttcc
-588 gacattggagaatttcagagttgaacatgtctcgttgctactcccctcactgtgcccccttaaagtcaaatatatttat
-508 tacagcgatatgtttgccaataaaggaagccgcatgttatctgcgatgtgttacacttgtgccccgggcccgaaggtgt
-428 gaatatgcgcatagctgtttaccattttggccaacaaagcgtgcataaatcacacttgttggccattcgcgtgcattttc
-348 cacgctgtggcccataaattaaatctccagattcaatttagcgggctgacctttgctcgtggattttgcacgtttttgt
-268 agctgtgtccatagttgacttcttatgcagcgttcttctcgtgttcaaagacgcgcacacttgccttagagttcagtggt
-188 gccgtgcagtggtgtgtagcagattactcaacactgacaacaaatgcacagcagcagggtgctatcgataacagaactg
-108 aaatttatcggcgacatatacaaatccaacaagcaagcagcatagagaaatatattgaccaacgaatttaataaaactg

                                Start
-28  catcgagaagcatattttaataagtgaAAAATGTCACTGGGAGATGTGAAGGAGCAGCTGCGCGGCTCGCGGACTGAGGCGA
                                M S L G D V K E Q L R G S R T E A K 18
53  AGAACGCGGCCAAAGCTAATACAAGTGAATTCGAACGCGTCAGAAATGGCGGGACGACAAGCGTCGCTTTGCGTGCCTT
                                N A A K L I Q V Q F E R V R N G G T T S V A L R A L 44
133 AAATACGAATTGAATATACTGCGGCAGTTGTGTGTGCGCCTGCAGGAGAACTTCCATCAGCATGCGGACATCTACTGCGA
                                K Y E L N I L R Q L C C A L Q E N F H Q H A D I Y C D 71
213 CATTGCGGCCGACATGCTGCCACATGTGGCGCCCCATCTGCCACAGCCGACTACTGGGTCAATCATTGATGAGCCTGC
                                I A A D M L P H V A P H L P Q P D Y W V N H L M S L Q 98
293 AATATATACATCATGCGCTCTGCGCGAGGTAAGtcaatgcacattgctcgagaggattaggacagttcatctaatact
                                Y I H H A L C R E -----Intron----- 107
373 ccatttaaccgccagCAAACGATCAAACAATGCCAAAGATTCTATGAGCTGATCAACGCTCAATCCTGCCAAATGCAAAA
                                -----Q T I K Q C Q R F Y E L I N A Q S C Q M Q N 129
453 CAAGTCAGAATACAAATATTATATTGACATACATATCAGACATGTGTATTTTTTTGGCCACCAGCTGGGCAAGCAATCGG
                                K S E Y K Y Y I D I H I R H V Y F F G H Q L G K Q S A 156
533 CGGCGTCTGAGGCCAAGGCGCAGCTCTGCCAGGCACTGCAGGCCCTGGGCAAGCTGTTGGAGAACATGCTCCAGCTGAAG
                                A S E A K A Q L C Q A L Q A L G K L L E N M L Q L K 182
613 GCGGAACAAAACGAGGGCTACAGCGAGCTGATGGGCGAGCTCAATCAATTGCTGGGCAAGCGCAGCATTGGTTATCTCAA
                                A E Q N E G Y S E L M G E L N Q L L G K R S I G Y L K 209
693 GAACCTGGCCAGCTTGGCGCTGACCGCTATGAACAGGCTGTGGAAGCCGCTCTTCAAGCTAATTGCCTGCAATGGCGGCA
                                N L A S L P L T A M N R L W K P L F K L I A C N G G T 236
773 CCACGGACCAGCTGAACGCCAGTTTTTCGGAATATCTGAGCGCTTTGCTGGCCCTGCTGCAGCTGGACGACAAATGTGTGG
                                T D Q L N A Q F S E Y L S A L L A L L Q L D D N V W 262
853 CAGCTGCAGCAGTCGGAGGCGCAGGCGCAGACGCTCTGTGCTCCAGCTGCTGCACAGCTGCCGCGAGCTGTACAAAAA
                                Q L Q Q S E A Q A Q T P L S L Q L L H S C R E L Y K N 289
933 TCAAACGGCCCAAAACAATGTGCTGCAATTGCTCTACAATTACCTCAAGCTGTGTAACACACAGTCCGCGGACTTGAAGC
                                Q T A Q N N V L Q L L Y N Y L K L L N T Q S A D L K R 316
1013 GTTCGTACATCGATCTGGCCAAGAAATTTGTGCATTTCTTTGAGCACAAGGCCGTGTCGCATGTTTCAAGAACAGTGGTAC
                                S Y I D L A K K F V H F F E H K A V S H V Q E Q W Y 342
1093 CTGGATTTTCTGTTTGTGCTGGTGGCGTGCAGAACATCTGCATCAAATTGACAACAAGGTGCCCTCATTGGAGCGCTT
                                L D F L F V L V R V Q K H L H Q I D N K V P S L E R F 369
1173 CTGGCAGTCTTGGGTGGGCGAGGACAGCGCCACGGCATATGCCGCACACTTCGAGCTGCTGCAGTGCCTCACCAGCAGGG
                                W Q C L G G Q D S A T A Y A A H F E L L Q C L T S R V 396

```

1253 TCATGAAGATTGGCAGAGGCCAGTCCACTCGCCGCCAGCTGCAGCGGCAACGATGCCAGCTGCCCCGAGCGTGTCAAGCAT
M K I G R G S P L A A S C S G N D A S C P S V L K H 422

1333 TGCCTCTTTACGCTGGGCTGTGTGCGACCGTGGCCTACAGCAGCTGGCAGCCGGAGGCCAGGCGACGCTGCCAAGgt
C V F T L G C C A T V A Y S S W Q P E A Q A T L P K -- 448

1413 aaacctcaaatataactagaaatgtatatatgccaaactaatggtcatttacaaccgcagGCGTCACAGCTGTGCTTGGC
-----Intron-----A S Q L C L A 455

1493 CAGCATTATACACTATGCCATCGATGTGGCCAAGGTACCAAATGCTTGACGCCAACAGCAGCGAGCTGGTTACCTTTG
S I I H Y A I D V A K V T K C L T P N S S E L V T F A 482

1573 CCTGGTATCTGATCAACATGGCGGAAAAGGTGACGACAGCCACACAAATGTACCTATTGGAGCATCTGTTGAAGCCGCTG
W Y L I N M A E K V T T A T Q M Y L L E H L L K P L 508

1653 CAGGAGCTGCGCCGCTGCTCAGTCCGCCCTATGCACAGCAGCTAGTGCCTGCGCTATTC AAGGCCAGCGCCACAGCTC
Q E L R P L L S P P Y A Q Q L V R R L F K A S A H S S 535

1733 CAATCCGGAGCTGTCCGCTCTACTCCACGGCGCTACATAGTCAGCATGAGCTGCCCGGCTCGGCAATTCAGCAATTGT
N P E L S A L L H G A Y I V S M S C P A R Q F Q Q L C 562

1813 GCGTCTTCTATCACACACCAAAGAACGATACGGAGCAGTGCCTGCTCGAGCTGTGCGAGAAGACCCGCTGTGCAGCCCG
V F Y H T P K N D T E Q C L L E L C E K S P L C S P 588

1893 CTGAACGCAACGGAGAAGCGTAAGCTATACGAACTGGACATGTTGGCGGTGCTGGCCAACAAGAAGACGCCAAAGCTGCT
L N A T E K R K L Y E L D M L A V L A N K K T P K L L 615

1973 GCAGTCCCTGCTGCGGCACTGTGACAGCGACTATCAGATGGTGTGCTGCGAGCCAAATGCGCACGGACAAGCGCTCGG
Q S L L R H C Q T D Y Q M V L L G R Q M R T D K R S A 642

2053 CCGGCCAGCAGATCGAGGAGCTGCGCGTGGCGTGCAGCGTTTGGGCCGAAGCAGCAGCTGACGCGGCTGCAGCAGCTA
G Q Q I E E L R V R L Q R L G R K Q Q L T R L Q Q L 668

2133 ATCCTGGGCCATGCTACCGTCAAAAGCTACTGGAGCGGCCGAGACGCAAGATCAAATACACATCAAGGAGATGAC
I L G H A T V T K L L E A A E T Q K I K I H I K E M T 695

2213 TGAGAAGACGCTCGAGGTCCTGCTCGTCAAGTACAACTGTTTCGACCTCACCATTAAGCAGCGAAATGCCGCTGCTCGAAC
E K T L E V L L V K Y K L F D L T I S S E M P L L E L 722

2293 TGGCCACCACAGCCATTGGCGCTTTTGGAGAGCTTCTATGAACAGgtaaagaaccaagcaacaatatctcgactggccaagc
A T T A I G A F E S F Y E Q ----- 736

2373 atttagaataagttcttgaaaaatccgtgaaattgaaatgtttttaaactgcaaattcacttatttctgggaaataaattc

2453 acctgcgtgagttcgtgagatcgaccatattcatcgaaaaaaaaacggacgtacagagaagcatgaaatgagctgcatat

2533 aaaaaaaaaacggacgagcagacaagcagacggacataaatagatcaagaatccatattccagccaaaatacaatatgaatt
-----Intron-----

2613 tagttatgggaatatcacacaaccaatcgaaaatgggtgaaaacgttaaacattgacaattttaaagtgttttaact

2693 cacctgccttaaagctgggctcttaagtgtttatatgttattcttactccttggtgatccagaaaaagagtgaaaa

2773 ataggtgaaacagccaagaatttccatataatttcaactacaatctctcctccttctctctgcacagGCTGACGCGGAGC
-----A D A E P 741

2853 CTTTGAGCAGTGACGAGGCGCTCATCGACTGGGAGGCGCTAAATTGATGATGGCATTGCCGCCGCCATGGCGCTGTCCACC
L S S D E A L I D W E A L I D D G I A A A M A L S T 767

2933 ATGGGCTACATACCGCAGGCAGACAATGCCTGGCTGCTGCTGTGCGCATCTGCCGCTGCTGGGCGACAGATCAACTA
M G Y I P Q A D N A W L L L L R I C R L L G D R F N Y 794

3013 TCTGCGAGCGCTGAGTCACTTCTGCGCGCTACACACAACATGCGCTGTTTCGACCTGCCGCGGAGGTGTCGCATGCGG
L R A L S H F L P R Y T Q H A L F D L P A E V S H A E 821

3093 AGCAGCTGCTGGATGAGCTCTGGCCGAGCTGCATGCGGCGCATCTGCTGAAGCGCCATCATACTGCTGTTGTTGTGTC
Q L L D E L W P Q L H A A H L L K R H H T T V L L C 847

3173 CTCTGCAACCTGGCGTGTACTATGCGCGCCTGGATTGCGTACGGCAGCCCGAGCTGTGCTGCTGCACGCCCCAAGACT
L C N L A L Y Y A R L D C V R H A Q L L L L H A Q R L 874

3253 GCGGCTCGAGTTTGGAGGAGCAGGCAAGTGCACATTATCCAGCTGACCATCCAAACGGTACGCTTTCGCATGTGCT
E F E F E E R A G K C D I I Q L T I Q T V R F R M C Y 901

```

3333 ATCAGCAGCGGCATTGCCGACGCTGGCCCGTCTGCCACGGCGCTGCAGCAGCTGGACACGCTGACAGAGAGTGTGCCG
  Q Q R H C R S L A R L P T A L Q Q L D T L T E S V R 927
3413 AGCTTCACCTGCATCTCGTCCATGGACAATGGCGCGTATACTGCTGCTGGGTGACATGGTGC GCGATACCACGGAGTG
  S F T C I S S M D N G A L I L L L G D M V R D T T E C 954
3493 CACGGCGAATCGGCTGAGCGAACTGCCCAATTTCTCCAACAGCCTGCTGCAGCTGCTGCTCCAGAGCGGGCTGGTGTGC
  T A N R L S E L P N F S N S L L Q L L L Q S G L V L R 981
3573 GCGCCGTCGAGTTGCTCATCTCCTGGCTGTGGACCAATTTGCCGATGGAGTGCTTAGACAAGGCGCACTCCAAGCTGCCG
  A V E L L I S W L W T N L R M E C L D K A H S K L R 1007
3653 CTCATCGAGCACTTTCTGGGCATGCAGCCGCTGCTTGAGTCGCGAGCAGCGCTTGAGCAGACCAGCAACAAGGGCAGCCT
  L I E H F L G M Q P L L E S R A A L E Q T S N K G S L 1034
3733 GACCTTGGCGCCATGGATGCGCAGTCCAAGCACATGACCGAGCTGGTGGGCAAAATGTTGGTCATGCAGCTGGAGCAGA
  T L A P M D A Q S K H M T E L V G K M L V M Q L E Q S 1061
3813 GCGGGGCTGCGTGGAGCCATCCGAAAGCAGCAACAGTTGACCATGTGCTGCGCCGCTGGGtaagtagctgcctcaa
  G A C V E P I R K Q Q Q L T M S S P R R ----- 1081
3893 tcggaatctctcactcctcatgtctgcacgcctcaacagGAACTGCCGTTGCCAGCGCCAGACCCAAGCTGCAGCGCT
-----Intron-----E L P L P S A R P K L Q R Y 1095
3973 ATGTATCCCTAGACATGCAGCAGTCACATCCGATGCTTCGTTCCAGCGTGCAACTGCAGTGCATCTACTTTATGGCCGGC
  V S L D M Q Q S H P M L R S S V Q L Q C I Y F M A G 1121
4053 TGCCGTGCATGCGCGTCTCTACTTTCTGAATCGGGAGCACGAGCAACTGGACGATTTCTATGCGCTGGCCAATGCTGGTT
  C L H A R L Y F L N R E H E Q L D D F Y A L A N A W L 1148
4133 GCAGCAGAATGCCGACGCGGCAACGCCCTTGGGCCATATGCTGCTCGTGTGCACATCTATCAGGCCAACTATTTGCGTG
  Q Q N A A R G N A L G H M L L V L H I Y Q A N Y L R A 1175
4213 CCCGGCGCCGCGCAGCAGCAGGCCATTGAGCTGACCGAAACGGCACTGAAGCTGGCCGCGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCGC
  R R R Q Q Q A I E L T E T A L K L A G S E Q L Q Q R 1201
4293 ATCGATGTCAACTATCGCTACAATCTGCTGCTGCAGCTGCGCACGGCACAGTTGGAGCTGGAGCCGCCGAGCAAGCCGCA
  I D V N Y R Y N L L L Q L R T A Q L E L E P P S K P Q 1228
4373 GAATCCGCGACGTGCGCTCACATTTAATATATCGCCGGAGGAGAAGCTGCCAGGCCGGTCCGCAAGTGGCCACAGCTA
  N P R R A L T F N I S P E E K L P R P V R K V A T A S 1255
4453 GCAAAAAACCAGCTAAATTTGCCATCTACACGGAGGACGTGCGTCCAGCCAGTAGCACCACCAGCAGCAGCAGCAGTAGC
  K K P A K F A I Y T E D V R P A S S T T S S S S S S 1281
4533 AGCTCCAGCGAAAATGCCAGCAGTCCGGAGCGAAAAGTCAACCAAGTCCAAGTCCCCCAAACGCCCTGGATCTGAACGCCTG
  S S S E N A S S P E R K S T K S K S P K R L D L N A C 1308
4613 CCAGCTCATCGACATCATAGACTTGAGCGACGACGAAACGGAGGCCGTTGTCCAGCTGCAGCCGCCAAGTCCACGTCCG
  Q L I D I I D L S D D E T E A V V Q L Q P A K S T S A 1335
4693 CTTTGTCCACGCGCAGCACCCGAACGCGCGCTCAACGGCAGCCGGACAGCCTTGTGGCGCCCTCAGACGCACAGCCACA
  L S T R S T R T R A Q R Q P D T L V A P L R R T A T 1361
4773 GCGCCCAATCCGCTTTCCGCGGAGGCGACGCCCAAGACAATAGGCACACGTTGCGCGCGCCCGTCCGCAATAACGGCAGA
  A P N P L S A E A T P K T I G T R A R A R R Q N T A E 1388
4853 GCAGCCGACGACGACGACAACAGCCACGCCCAAGGTGGACTCGGTGAGCAGCAGGCGTCCACAGGAACTGAttacgct
  Q P T T T T A T P K V D S V S S R R R H R N * 1411
4933 tagattcatacgcgctctcgccgatattatgtgatcagtttttttagttttatagcacttgtcttttttatatattatc
5013 agcaataaatgttacactcatcgattccgcttgagctcttgatgggcagcaacgagcgcgccacatattatcgctcca
5093 aaggccgtgctgcggca

```

Abbildung 8-4: *thr*-Gen aus *D. virilis* und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz.

Die Zahlenangaben links bezeichnen die Nukleotidpositionen, die Zahlen rechts die Positionen der Aminosäuren. Die Nukleotidnummerierung startet beim Adenylat des ATG-Startkodons. Der genomische Genbereich kodiert für ein Protein mit 1411 AS. Die Proteinsequenz ist unter der Nukleotidsequenz im Einbuchstabenkode dargestellt. Die in die Sequenz eingezeichneten Introns (blau markiert) wurden über den Vergleich einer cDNA zur genomischen Region abgeleitet. Das potentielle ATG-Startkodon sowie das TAG-Stopkodon sind rot markiert. Kodierende Bereiche sind in Großbuchstaben und nicht kodierende in Kleinbuchstaben dargestellt.

8.3 Sequenzen der *pim*-orthologen Gene aus *D. erecta* und *D. orena*

8.3.1 *pim*-orthologes Gen aus *D. erecta*

Aus genomischer *D. erecta* DNA wurde ein 4 kb *Eco*RI-Fragment kloniert, das den kompletten kodierenden Bereich des zu *pim*-orthologen Gens umfasst. Die Positionen der Introns wurden über den Vergleich des abgeleiteten Translationsproduktes mit PIM aus *D. melanogaster* festgelegt. Das *pim*-Gen aus *D. erecta* ist aus drei Exons aufgebaut und das aus der kodierenden Region abgeleitete Translationsprodukt hat eine Größe von 199 AS.

```

                                Start
-49  tcagatataaggcactgggagtcctcccatctctaggaatgtgcccgcctcgtATGGATCAGATTTTGAACAAGGAAAACACC
                                M D Q I L N K E N T      10

 31  GGCATTAATTgtaagttgaattgagttcgattaccgttggattggaattctatgacctgtaaatattacagTACCGGCT
  G I N L-----Intron----- P A      16

111  AACCCAATGAAAAATGGAGTCCAAGCTAATTCCGTATTGAAGAAACCACTTGGGAAACTTGACAATGTGATGCACCAAAC
  N P M K N G V Q A N S V L K K P L G K L D N V M H Q T      43

191  TCCTGGAATAACCCCTTCAAAGGCACTACTCTGAACTAGAGGGTAGTATCGCCATGCTTTCGCTGCGAAAGGCTTCTA
  P G I T P F K G T T L K L E G S I A M L S L R K A S K      70

271  AACAAAATGTGATTCACAAGGATCGAGAGGAAGTCAGGTATAAAACAAATAGCTGCTTTTGGGCGCCTACGTTTGAAT
  Q N V I H K D R E E V R Y K T N S C F L G A Y V L N      96

351  TCGCAATCCAGAGTCGTAAATTTGTTCAATTATACTGACTTTCCAAACGGGAAATGTTTAAAGAAGTGCAGCAAGCgtaa
  C E S R V V N L F N Y T D F P N G K C L K N C S K P---- 122

431  gttcatttaataactcttgcttttgaaattttactatatacttttaaaattacagCGGTTACAGAGACCTGGTCCGAAAA
-----Intron----- V T E T W S E N      130

511  TCAACCGGGTTATGAAGGGCTATTGAATCAACTTTATCTTGATCTTTCGAACATTGGAGAACCATTGGAAAATAAGTGCC
  Q P G Y E G L L N Q L Y L D L R T L E N H L E N K C L      157

591  TTCCGCCCTAGATTTTAATGACCTGCCATACATATATAACTCAGAATACATGGAGGCTGCAGACCCTGAATACGGATTA
  P P L D F N D L P Y I Y N S E Y M E A A D P E Y G L      183

                                Stop
671  GATTTATTTCCCCCAATGCCCAATTTGGAAGGCATTGATATTCTATTTAGttccttggtttaaaagttcggttattatag
  D L F P P M P N L E G I D I L F *      199

751  tttcacaatcttaaaacttggtacctttataataactgaatgaatatttattaatgtaaatct

```

Abbildung 8-5: *pim*-Gen aus *D. erecta* und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz.

Die Zahlenangaben links bezeichnen die Nukleotidpositionen, die Zahlen rechts die Positionen der Aminosäuren. Die Nukleotidnummerierung startet beim Adenylat des ATG-Startkodons. Der genomische Genbereich kodiert für ein Protein mit 199 AS. Die Proteinsequenz ist unter der Nukleotidsequenz im Einbuchstabenkode dargestellt. Die in die Sequenz eingezeichneten Introns (blau markiert) wurden über den Vergleich der übersetzten *D. erecta* PIM-Sequenz mit PIM aus *D. melanogaster* ermittelt. Das potentielle ATG-Startkodon sowie das TAG-Stopkodon sind rot markiert. Kodierende Bereiche sind in Großbuchstaben und nicht kodierende in Kleinbuchstaben dargestellt.

8.3.2 *pim*-orthologes Gen aus *D. oreana*

Aus genomischer *D. oreana* DNA wurde ein 4 kb *EcoRI*-Fragment kloniert, das den kompletten kodierenden Bereich des zu *pim*-orthologen Gens umfasst. Die Positionen der Introns wurden über den Vergleich des abgeleiteten Translationsproduktes mit PIM aus *D. melanogaster* festgelegt. Das *pim*-Gen aus *D. oreana* ist aus drei Exons aufgebaut und das aus der kodierenden Region abgeleitete Translationsprodukt hat eine Größe von 199 AS.

```

-374 cagaaaaagccataaaacaatcccaagcgccaaatccaaaatttggtacattttggtggtataaaataaaatggtgaaat
-294 attttcttacaataacatatatgtttgtaagcctatatgttggtggtacaacaaaataatcaaagctaaaaattaaataa
-214 ataattttaagtattcatacctaatttggtcactggtatataatgtttccattatcatcgtttctgataagcggtaaa
-134 tcagatataaggcactgggagtcctcccatctctaggaatgtgcccgcctcgtttttgggaattatthtaaacgaaatcgca

                                Start
-54  ctcgctgctagaatataattcaatataaataactctacgtaataaaaagctaacaaaATGGATCAGATTTTGAACAAGGAAA
                                M D Q I L N K E N      9

26   ACACTGGCATTAAATTgtaagttgaattgagttcgattaccgttggtattggttaattccatagccagtttaattacagTA
    T G I N L-----Intron----- 14

106  CCGGCTAACCCCATGAAAAATGGAGTCCAAGCAAATTCGTATTGAAGAAACCACTTGGGAAACTTGACAATGTGATGCA
    P A N P M K N G V Q A N S V L K K P L G K L D N V M H      41

186  CCAAACCTCTGGAATAACGCCTTTCAAAGGCACTTCTCTGAAACTAGAGGGCAGTATTGCCAAGCTTTCGCTGCGAAAGG
    Q T P G I T P F K G T S L K L E G S I A K L S L R K A      68

266  CTCCTAAACAAAATGTGCTCCACAAGGATCGAGAAGAAGTCAGGTATAAGACAAAATAGCTGCTTTTTGGGCGCCTACGTT
    P K Q N V L H K D R E E V R Y K T N S C F L G A Y V      94

346  TTGAATGCGAATCCAGAGTCGTAATTTGTTCAATTATACTGACTTTCCAAACGGAAAATGTTTAAAGAACTGCAGCAA
    L N C E S R V V N L F N Y T D F P N G K C L K N C S K      121

446  GTgtaagttcatttaataatgttgcttttgaaatgttcactatgtacctgtaaaattacagCGGTTACAGAGACCTGGTC
    S-----Intron----- V T E T W S      128

546  CGAAAATCAGCCGGGCTATGAAGGGCTATTGGATCAACTTTATCTTGATCTTCGCACATTGGAAAACCATTTGAAAAATA
    E N Q P G Y E G L L D Q L Y L D L R T L E N H L E N K      155

626  AGTGCCTTCGCGCCTTAGATTTTACCGACCTGCCATACATATATAACTCAGAAAACATGGAGGCTGCGGACCATGAATAT
    C L P P L D F T D L P Y I Y N S E N M E A A D H E Y      181

                                Stop
706  GGATTAGATTTATTTCCCCCAATGCCCAATTTGGAAGCCATTGATATCTATTTTAGTtcttgtttaaaagttcgttgc
    G L D L F P P M P N L E A I D I L F *      199

786  tatattatagtgatcaatcataaactaggcaccttttaataactaaatgaatatttattaatgttaaatctaaggtaaacgg
866  ttaaatcattagctgtccaagttgtgtcaaatgttgtaatacaatttgcgacaaaaaaatthtatttacgtctaccg
946  cctccaaatacaactaaagttggttgaatgttacgctcctaatagatttagtagttaaaaaacgcacaaatgcatata

```

Abbildung 8-6: *pim*-Gen aus *D. oreana* und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz.

Die Zahlenangaben links bezeichnen die Nukleotidpositionen, die Zahlen rechts die Positionen der Aminosäuren. Die Nukleotidnummerierung startet beim Adenylat des ATG-Startkodons. Der genomische Genbereich kodiert für ein Protein mit 199 AS. Die Proteinsequenz ist unter der Nukleotidsequenz im Einbuchstabenkode dargestellt. Die in die Sequenz eingezeichneten Introns (blau markiert) wurden über den Vergleich der übersetzten *D. oreana* PIM-Sequenz mit PIM aus *D. melanogaster* ermittelt. Das potentielle ATG-Startkodon sowie das TAG-Stopkodon sind rot markiert. Kodierende Bereiche sind in Großbuchstaben und nicht kodierende in Kleinbuchstaben dargestellt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ferner erkläre ich, weder an der Universität Bayreuth, noch einer anderen Hochschule versucht habe, eine Dissertation einzureichen, oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

Hubert Jäger