

# **Cohesin-assoziierte Proteine und ihre Funktion bei der Schwesterchromatid-Kohäsion**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Martin Robert Schumacher

aus Karlsruhe

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

28.11.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Andrei N. Lupas

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alfred Nordheim

## **Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. Andrei Lupas für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen und beenden zu können. Ich möchte Ihm auch für die gute Betreuung und die Unterstützung in schwierigen Zeiten danken. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und hat dadurch entscheidend zum erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich ebenfalls bei Constanze Christ, Prof. Dr. Alfred Nordheim und Prof. Dr. Ulrike Zentgraf für ihre Unterstützung bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Alfred Nordheim für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Dissertation und für die Bereitschaft die Zweitkorrektur meiner Doktorarbeit zu übernehmen. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Andrei Lupas, Prof. Dr. Alfred Nordheim, Prof. Dr. Ulrike Zentgraf und Prof. Dr. Klaus Hantke für die Teilnahme an der Disputation meiner Arbeit bedanken.

Ich danke Dr. Dmitri Ivanov für die Bereitstellung von Hefestämmen und anderen Materialien sowie für die Anregungen und Diskussionen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Kornelius Zeth für die zahlreichen inspirierenden Diskussionen bedanken, bei Dr. Jörg Martin für die vielen Hilfestellungen in biochemischen Fragen, bei Dr. Silke Hauf für die wertvolle Hilfe bei Fragen zur Mikroskopie und bei Dr. Matthias Flötenmeyer für die ständige Bereitschaft, meine Proben elektronenmikroskopisch zu analysieren.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Reinhard Albrecht und Kerstin Bär für die tatkräftige Hilfe bei meinen zahlreichen Kristallisationsansätzen und bei Marcus Hartmann, Dr. Reinhard Albrecht und Dr. Kornelius Zeth für die Messung meiner Kristalle bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich bei Marcus Hartmann für die Hilfe und Geduld bei der Analyse der Messdaten bedanken.

Daneben möchte ich mich bei den Kollegen und Mitarbeitern des Friedrich-Miescher-Laboratoriums und dem MPI für Entwicklungsbiologie für die angenehme und hilfreiche Arbeitsatmosphäre bedanken: Janina Metzler, Vikash Verma, Dr. Reinhard Albrecht, Dr. Kornelius Zeth, Dr. Jörg Martin, Kerstin Bär, Olaf-Oliver Wolz, Marcus Hartmann, Michael Hauer, Maria Langegger, Irina Kulemzina, Eva Sulz, Astrid Ursinus, Dr. Silke Hauf, Dr. Marek Dynowski, Dr. Silke Patzer, Dr. Birte Hernandez-Alvarez, Dr. Stephanie Helbig, Martin Schückel, Karin Lehmann, Herta Söffel, Eva Illgen, Dr. Remco Sprangers, Dr. Jack Leo, Dr. Heinz Schwarz, Jürgen Berger, Benjamin Vollmer, Dr. Suat Özdirekcan, Dara Forouzan, Dr. Moritz Ammelburg, Iuliia Boichenko, Vasuki Ranjani Chellamuthu, Prof. Dr. Volkmar Braun, Dr. Dirk Linke, Silvia Deiss, Franka Scharfenberg, Anitha Jeganantham, Adrian Fuchs, Silvia Wuertenberger und Iwan Grin.

Im Besonderen möchte ich hier auch von ganzem Herzen meiner Mutter danken, die mir immer zur Seite stand und mir auch in der langen Zeit während der Anfertigung dieser Arbeit eine wertvolle Hilfe war. Ohne Ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Im selben Atemzug möchte ich meiner Lebensgefährtin Eva Winklbauer für die fortwährende Unterstützung während meiner Doktorarbeit und den dabei entstehenden Höhen und Tiefen bedanken. Sie war mir auch in schwierigen Zeiten eine große Hilfe.

Außerdem möchte ich mich bei Regina Ort-Winklbauer bedanken, die auch niemals am guten Ausgang dieser Arbeit zweifelte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.



# Inhaltsverzeichnis

<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Der Zellzyklus .....	1
1.2. Die Mitose .....	2
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus .....	4
1.4. Die Schwesterchromatid-Kohäsion im Verlauf des Zellzyklus.....	7
1.4.1. Der Cohesinkomplex .....	7
1.4.2. Verwandte Smc-Komplexe.....	11
1.4.3. Das Beladen der DNS mit dem Cohesinkomplex .....	13
1.4.4. Die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion .....	15
1.4.4.1. Die Acetyltransferase Eco1 .....	17
1.4.5. Die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion .....	18
1.4.6. Die Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion während der Mitose.....	20
1.4.6.1. Der Metaphase-Kontrollpunkt .....	22
1.5. Weitere Funktionen des Cohesinkomplexes.....	23
1.6. Cohesinopathien .....	26
1.7. Ziel dieser Arbeit .....	27
<b>2. ERGEBNISSE</b> .....	<b>29</b>
2.1. Eigenanteil und gemeinschaftliche Veröffentlichungen .....	29
2.2. <i>In vitro</i> -Interaktionsstudien der Cohesin-assoziierten Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 mit Cohesin.....	30
2.3. Die Rolle der Cohesin-assoziierten Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 bei der Schwesterchromatid-Kohäsion .....	35
2.3.1. Zellzyklusphasen-spezifische Depletion der Proteine Pds5 und Scc3 <i>in vivo</i> .....	36
2.3.2. <i>In vivo</i> -Depletion von Pds5 und Scc3 mit Hilfe des <i>ECO1</i> -Degrons.....	41
2.3.3. Die Quantität von Scc1 wird durch die Deletion von <i>WPL1</i> nicht beeinflusst .....	46
2.3.4. Die Integrität von Cohesin ist nicht von Pds5 und Scc3 abhängig .....	46
2.3.5. Cohesin kann ohne Pds5, Scc3 oder Wpl1 an die DNS binden .....	50
2.3.6. Die DNS-Assoziation von Pds5, Scc3 und Wpl1 ist unabhängig.....	55

2.3.7.	Pds5 und Scc3 lokalisieren ausschließlich als Teil von Cohesin auf den Chromosomen .....	58
2.3.8.	<i>PDS5</i> -Degron- und <i>SCC3</i> -Degron-Stämme zeigen Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion und der Biorientierung .....	60
2.3.9.	<i>SCC3</i> -Degron-Zellen sind nach Zugabe von Nocodazol nicht mehr lebensfähig..	65
<b>2.4.</b>	<b>Die Acetyltransferase Eco1 .....</b>	<b>68</b>
2.4.1.	Die Expression und Aufreinigung von Eco1 .....	68
2.4.2.	Eco1 bildet einen stabilen Komplex mit PCNA .....	70
2.4.3.	Die Kristallstruktur von PCNA im Komplex mit einem Eco1-Peptid .....	71
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>3.1.</b>	<b>Interaktionen von Pds5, Scc3, Wpl1 und Cohesin .....</b>	<b>77</b>
<b>3.2.</b>	<b>Pds5, Scc3, Wpl1 und die DNS-Assoziation von Cohesin .....</b>	<b>80</b>
3.2.1.	Die Depletion von Pds5 und Scc3 <i>in vivo</i> .....	81
3.2.2.	Pds5, Scc3 und Wpl1 sind nicht für die stabile DNS-Assoziation von Cohesin notwendig .....	82
3.2.3.	Die Rolle von Pds5, Scc3 und Wpl1 bei der Schwesterchromatid-Kohäsion .....	84
3.2.3.1.	Etablierung oder Aufrechterhaltung der Kohäsion? .....	84
<b>3.3.</b>	<b>Haben Pds5 und Scc3 neben ihrer Rolle bei der Schwesterchromatid-Kohäsion weitere Funktionen? .....</b>	<b>89</b>
<b>3.4.</b>	<b>Die Acetyltransferase Eco1 .....</b>	<b>91</b>
3.4.1.	Die Interaktion von Eco1 mit PCNA .....	91
<b>3.5.</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>93</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>95</b>
<b>4.1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>95</b>
4.1.1.	DNS-Oligonukleotide .....	95
4.1.2.	<i>E. coli</i> -Expressionsplasmide .....	97
4.1.3.	<i>E. coli</i> -Stämme .....	99
4.1.4.	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme .....	100
4.1.5.	Medien und Platten .....	104
<b>4.2.</b>	<b>Bioinformatische Methoden und verwendete Software .....</b>	<b>105</b>
<b>4.3.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>106</b>
4.3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	106
4.3.2.	DNS-Analyse durch Agarose-Gelelektrophorese .....	106
4.3.3.	Restriktionsverdau von DNS .....	107
4.3.4.	Dephosphorylierung von linearisierter DNS .....	107
4.3.5.	Ligation von DNS-Fragmenten .....	107

4.3.6.	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen .....	108
4.3.7.	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	108
4.3.8.	Isolation von Plasmiden .....	108
4.3.9.	Ortspezifische DNS-Mutagenese .....	108
4.3.10.	Bestimmung von DNS-Konzentrationen .....	109
4.3.11.	DNS-Sequenzierung .....	109
4.3.12.	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	109
<b>4.4.</b>	<b>Kultivierung von und Arbeit mit <i>S. cerevisiae</i>-Stämmen .....</b>	<b>109</b>
4.4.1.	Wachstumsbedingungen und Lagerung .....	109
4.4.2.	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen .....	110
4.4.3.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	110
4.4.4.	Genomische Integration durch homologe Rekombination .....	111
4.4.5.	Kreuzung von haploiden <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen .....	111
4.4.6.	Sporulation und Tetradenanalyse diploider Hefestämme .....	111
4.4.7.	Bestimmung des Kreuzungstyps.....	112
4.4.8.	Isolation genomischer DNS aus <i>S. cerevisiae</i> .....	112
4.4.9.	Zellzyklus-spezifische Synchronisation von Hefen .....	113
4.4.9.1.	G <sub>1</sub> -Phase-Arrest .....	113
4.4.9.2.	G <sub>2</sub> /M-Phase-Arrest .....	113
4.4.10.	<i>In vivo</i> -Proteindepletion durch Degroninduktion .....	114
4.4.11.	Analyse des DNS-Gehalts durch Durchflusszytometrie.....	114
4.4.12.	Cycloheximid-Assay .....	115
<b>4.5.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>116</b>
4.5.1.	Protein-Immunopräzipitation aus Hefezellen .....	116
4.5.2.	TCA-Präzipitation von Proteinen aus Hefezellen .....	116
4.5.3.	TCA-Präzipitation von aufgereinigten Proteinen .....	117
4.5.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	117
4.5.5.	Färbemethoden .....	118
4.5.6.	Western-Blot und Immunodetektion .....	119
4.5.7.	<i>In vitro</i> -Proteinexpression.....	120
4.5.8.	Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	120
4.5.9.	Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen .....	121
4.5.10.	Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen .....	123
4.5.11.	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	125
4.5.12.	CD-Spektroskopie .....	125
4.5.13.	Tryptophan-Fluoreszenz .....	126
4.5.14.	Dichtegradientenzentrifugation .....	126
4.5.15.	<i>In vitro</i> -Immunopräzipitation rekombinanter Proteine .....	126
4.5.16.	Röntgenstrukturanalyse .....	127

4.5.16.1.	Bestimmung der Kristallstruktur des PCNA/Eco1-Peptid-Komplexes .....	127
<b>4.6.</b>	<b>Mikroskopische Methoden .....</b>	<b>128</b>
4.6.1.	Methanolfixierung von Hefezellen .....	128
4.6.2.	Visualisierung der Schwesterchromatid-Kohäsion.....	129
4.6.3.	Visualisierung der Biorientierung der Chromosomen .....	129
4.6.4.	Chromosomenspreizungen .....	130
4.6.5.	Elektronenmikroskopie .....	131
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>132</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>148</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die einzelnen Phasen der Mitose. ....	3
Abb. 1.2: Mögliche Verbindungen der Kinetochore mit dem Spindelapparat. ....	4
Abb. 1.3: Haploide und diploide Proliferation in <i>S. cerevisiae</i> . ....	5
Abb. 1.4: Schematische Darstellung von Cohesin. ....	7
Abb. 1.5: Die schematische Darstellung der Acetyltransferase Eco1. ....	17
Abb. 1.6: Die Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion während der Mitose. ....	20
Abb. 2.1: Pds5, Scc3 und Wpl1 formen einen ternären Komplex <i>in vitro</i> . ....	31
Abb. 2.2: Wpl1(S416A) bildet Subkomplexe mit Pds5 und Scc3, für die Interaktion des Wpl1-Proteins mit Pds5 und Scc3 ist der N-Terminus notwendig. ....	34
Abb. 2.3: Das Temperatur-induzierbare DHFR-Degron erlaubt eine gezielte Depletion der Zielproteine. ....	37
Abb. 2.4: Die Auswirkungen der Depletion von Pds5 und Scc3 in der G <sub>2</sub> /M-Phase auf den DNS-gebundenen Cohesinkomplex. ....	38
Abb. 2.5: Die Auswirkungen der Depletion von Pds5 und Scc3 in der G <sub>1</sub> -Phase auf die DNS-Assoziation von Cohesin. ....	40
Abb. 2.6: Die zelluläre Gesamtmenge des $\alpha$ -Kleisins Scc1 wird durch die Depletion von Pds5 oder Scc3 nicht beeinträchtigt. ....	42
Abb. 2.7: Die Quantifizierung der Depletion der Pds5- und Scc3-HA-Degron-Fusionsproteine in der Zelle. ....	43
Abb. 2.8: Die Depletion der Pds5- und Scc3-HA-Degron-Fusionsproteine wird durch eine reduzierte Proteinstabilität verursacht. ....	45
Abb. 2.9: Die Deletion des <i>WPL1</i> -Gens hat keine Auswirkung auf die zelluläre Gesamtmenge an Scc1. ....	46
Abb. 2.10: Pds5 und Scc3 sind für die Integrität von Cohesin (Scc1) nicht notwendig. ....	48
Abb. 2.11: Pds5 und Scc3 sind für die Integrität von Cohesin (Smc3) nicht notwendig. ....	49
Abb. 2.12: Scc1 bindet unabhängig von Pds5 und Scc3 an die DNS. ....	51
Abb. 2.13: Cohesin ist auch ohne Pds5 und Scc3 auf der DNS vorhanden. ....	53
Abb. 2.14: Cohesin bindet unabhängig von Wpl1 an die DNS. ....	54
Abb. 2.15: Pds5 und Scc3 binden voneinander unabhängig an die DNS. ....	56
Abb. 2.16: Die DNS-Assoziation von Pds5 und Scc3 ist nicht von Wpl1 abhängig. ....	57
Abb. 2.17: Pds5 und Scc3 binden nur als Teil des Cohesinkomplexes an die Chromosomen. ....	59
Abb. 2.18: Die Depletion von Pds5 und Scc3 verursacht einen starken Defekt bei der Kohäsion der Schwesterchromatiden. ....	61
Abb. 2.19: Die Depletion von Pds5 und Scc3 verursacht Defekte bei der Biorientierung der Chromosomen. ....	64
Abb. 2.20: Die Überlebensrate nach Behandlung mit Nocodazol ist in <i>SCC3</i> -Degron-Zellen	

dramatisch reduziert.....	65
Abb. 2.21: Scc3 und Sgo1 interagieren nicht und Scc3 ist vermutlich nicht für die Lokalisation von Sgo1 notwendig.....	67
Abb. 2.22: Eco1 und PCNA bilden einen Komplex <i>in vitro</i> .....	71
Abb. 2.23: Das MBP-Eco1(As 1-26)-Fusionsprotein interagiert mit PCNA.....	73
Abb. 2.24: Die Kristallstruktur von PCNA im Komplex mit dem Eco1-Peptid.....	75
Abb. 2.25: Die PCNA/Eco1-Bindung ist stark konserviert. ....	76
Abb. 3.1: Ein Modell der Funktion von Pds5, Scc3 und Wpl1 im Kontext der Schwesterchromatid-Kohäsion. ....	88
Abb. 6.1: Die Aufreinigung von rekombinantem Eco1-Protein.....	148
Abb. 6.2: Alignment des Eco1-PIP-Box-Bereichs in verschiedenen Pilzen und im Menschen. ....	149
Abb. 6.3: Die Aufreinigung von rekombinantem MBP-Eco1(As 1-26)-Fusionsprotein.....	150

# Abkürzungsverzeichnis

°	Grad (Winkel)
A	Alanin
A	Ampere
Å	Ångström
ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>C</u> assette
ACT	<u>A</u> cetyl <u>t</u> ransferase
ad	<u>a</u> ddiere
APC/C	<u>A</u> naphase- <u>p</u> romoting <u>C</u> omplex/ <u>C</u> yclosome
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
ARS	<u>A</u> utonomously <u>r</u> eplicating <u>S</u> equence
As	<u>A</u> minosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
b	Basenpaar
BIS-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
Bub	Budding <u>u</u> ninhibited by <u>B</u> enzimidazole
°C	Grad Celsius
C	Chromosomensatz
C	Cystein
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	<u>C</u> ircular <u>d</u> ichroismus
Cdc	<u>C</u> ell <u>D</u> ivision <u>C</u> ycle
Cdk	<u>C</u> yclin- <u>d</u> eependent <u>K</u> inase
CdL	<u>C</u> ornelia <u>d</u> e <u>L</u> ange
ChIP-qPCR	<u>C</u> hromatin <u>I</u> mmunoprecipitation - <u>q</u> uantitative PCR
Cib	<u>C</u> yclin <u>B</u>
CTCF	<u>C</u> CC <u>T</u> C- <u>b</u> inding <u>F</u> actor
Ctf	<u>C</u> hromosome <u>T</u> ransmission <u>E</u> idelity
Cse	<u>C</u> hromosome <u>S</u> egregation
Δ	Deletion
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DF	<u>D</u> urch <u>f</u> luss
Deg	<u>D</u> egron
DHFR	<u>D</u> ihydro <u>f</u> olat <u>r</u> eduktase
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulf <u>o</u> xid
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
DNase	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukle <u>a</u> se
DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
dNTP	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreit <u>o</u> l
ECL	<u>E</u> nhanced <u>C</u> hemiluminescence
Eco	<u>E</u> stablishment of <u>C</u> ohesion
Esco	<u>E</u> stablishment of <u>C</u> ohesion
Eso	<u>E</u> ssential for <u>S</u> - <u>C</u> hromatin <u>O</u> rganisation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> ccetat
F	Phenylalanin
FGF	Phenylalanin/Glycin/Phenylalanin (Sequenzmotiv)
FRAP	<u>F</u> luorescence <u>R</u> ecovery <u>a</u> fter <u>P</u> hoto <u>b</u> leaching

G	Glycin
g	Gramm
G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub>	<u>Gap</u> (Zellzyklusphasen)
GAL	<u>Galaktose</u>
GFP	<u>Green Fluorescent Protein</u>
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GNAT	<u>GCN5-related N-Acetyltransferase</u>
GST	<u>Glutathion S-Transferase</u>
h	Stunde
H	Histidin
HA	<u>Hämagglutinin</u>
HCl	Hydrogenchlorid
HEAT	<u>Huntingtin, Elongation Factor 3, Protein Phosphatase 2A, PI3 Kinase IOR1</u>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HP	<u>Heterochromatin Protein</u>
HRP	<u>Horseradish Peroxidase</u>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
I	Isoleucin
IDCL	<u>Interdomain-connecting Loop</u>
Ile	Isoleucin
IN	<u>Input</u>
IP	<u>Immunoprecipitation</u>
K	Kelvin
K	Lysin
k	kilo (Präfix)
Kan	<u>Kanamycin</u>
KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kaliumsulfat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
Irr	<u>Irregular</u>
L	Leucin
LB	<u>Luria-Betani</u>
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Meter
m	milli (Präfix)
M	Mega (Präfix)
M	<u>Mitose</u>
M	Molar
<i>MAT</i>	<u>Mating Type</u>
MBP	<u>Maltosebinderprotein</u>
Mcd	<u>Mitotic Chromosome Determinant</u>
Met	Methionin
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Mis	<u>Minichromosome Loss Mutant</u>
μ	mikro (Präfix)
min	Minute
muk	" <u>mukaku</u> " (japanisch für kernlos)
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MYC	<u>Myelocytomatosis</u>
n	nano (Präfix)
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NAT	<u>N</u> ourseothricin <u>N</u> - <u>A</u> cetyl <u>t</u> ransferase
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Natriumsulfat
NHEJ	<u>N</u> on- <u>h</u> omologous <u>E</u> nd joining
Ni <sup>2+</sup> -NTA	<u>N</u> ickel- <u>N</u> itrilo <u>t</u> riacetat
Nipbl	<u>N</u> ipped <u>B</u> -like
NPS	<u>N</u> atriumphosphat <u>S</u> alts
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
PAP	<u>P</u> eroxidase anti- <u>P</u> eroxidase
PBS	<u>P</u> hosphat buffered <u>S</u> aline
PBS-T	<u>P</u> hosphat buffered <u>S</u> aline + 0,05% <u>T</u> ween 20
PCB	Sodium <u>P</u> ropionate/Sodium <u>C</u> acodylate/ <u>B</u> IS-TRIS Propane
PCNA	<u>P</u> roliferating <u>C</u> ell <u>N</u> uclear <u>A</u> ntigen
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
Pds	<u>P</u> recocious <u>D</u> issociation of <u>S</u> isters
PEG	<u>P</u> olyethylenglykol
PEM	<u>P</u> IPES/ <u>E</u> DTA/ <u>M</u> agnesiumsulfat
pH	<u>p</u> otentia <u>H</u> ydrogenii
Phe	Phenylalanin
PIP	<u>P</u> CNA-interacting <u>P</u> rotein
PIPES	<u>P</u> iperazin- <u>N</u> , <u>N</u> '-bis(2- <u>e</u> thanesulfonsäure)
Plk	<u>P</u> olo-like <u>K</u> inase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POL	Polymerase
PP2A	<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>2A</u>
PVDF	<u>P</u> olyvinylidenfluorid
psi	<u>P</u> ound-force per <u>S</u> quare <u>I</u> nch
Q	Glutamin
R	Arginin
Rad	<u>R</u> adiation sensitive
Rec	<u>R</u> ecombination
RIL	Arginin, Isoleucin, Leucin
RNase	Ribonuklease
RNS	<u>R</u> ibonukleinsäure
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
S	Serin
S	<u>S</u> ynthese
SA	<u>S</u> tromal <u>A</u> ntigen
SAC	<u>S</u> pindle <u>A</u> ssembly <u>C</u> heckpoint
Scc	<u>S</u> ister <u>C</u> hromatid <u>C</u> ohesion
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	<u>S</u> kp1- <u>C</u> ullin- <u>E</u> - <u>B</u> ox
Scp	<u>S</u> egregation and <u>C</u> ondensation <u>P</u> rotein
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate (Natriumlaurylsulfat)
sec	Sekunde
Ser	Serin
Sgo	" <u>S</u> hugoshin" (japanisch für Wächter)
Smc	<u>S</u> tructural <u>M</u> aintenance of <u>C</u> hromosomes
Spc	<u>S</u> pindle <u>P</u> ole <u>C</u> omponent
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
STAG	<u>S</u> tromal <u>A</u> ntigen
Swi	<u>S</u> witching deficient
t	Zeitpunkt
T4	T4-Bakteriophage

T7	T7-Bakteriophage
TAE	<u>T</u> ris/ <u>A</u> cetate/ <u>E</u> DTA
TAP	<u>T</u> andem <u>A</u> ffinity <u>P</u> urification
TCA	<u>T</u> richloro <u>a</u> cetic Acid (Trichloressigsäure)
TEMED	<u>T</u> etra <u>m</u> ethylethylendi <u>a</u> min
TetA	<u>T</u> etra <u>z</u> yklin- <u>T</u> rans <u>a</u> ktivator
tetO	<u>T</u> etra <u>z</u> yklin- <u>O</u> perator
TetR	<u>T</u> etra <u>z</u> yklin- <u>R</u> epressor
TEV	<u>T</u> obacco <u>E</u> tch <u>V</u> irus
TPR	<u>T</u> etra <u>t</u> ricopeptide <u>R</u> epeats
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Tryptophan
Trx	<u>T</u> hio <u>r</u> edoxin
u	Unit
Ubr	<u>U</u> biquitin Protein Ligase E3 Component N- <u>R</u> ecognin
Upm	<u>U</u> mdrehungen <u>p</u> ro <u>M</u> inute
URA	<u>U</u> racil
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	Valin
V	Volt
vgl	vergleiche
v/v	Volume per Volume
Wpl	<u>W</u> ings <u>a</u> part- <u>l</u> ike
Wapl	<u>W</u> ings <u>a</u> part- <u>l</u> ike
WHD	<u>W</u> inged- <u>H</u> elix <u>D</u> omain
wt	<u>W</u> ild <u>t</u> yp
w/v	Weight per Volume
YEPD	<u>Y</u> east <u>E</u> xtract <u>P</u> eptone <u>D</u> extrose
YEPG	<u>Y</u> east <u>E</u> xtract <u>P</u> eptone <u>G</u> alactose
YEPR	<u>Y</u> east <u>E</u> xtract <u>P</u> eptone <u>R</u> affinose
Zn	Zink
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat
zyk	<u>z</u> yklisierend

## Zusammenfassung

Während des Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle werden die Chromosomen in der S-Phase repliziert. Die entstehenden Schwesterchromatiden werden von ihrer Synthese an bis zu ihrer späteren Aufteilung in der Mitose zusammengehalten. Der Zusammenhalt zwischen den Schwesterchromatiden eines jeden Chromosoms wird Schwesterchromatid-Kohäsion genannt.

Die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden wird dabei durch den Proteinkomplex Cohesin ermöglicht. Der Cohesinkomplex besteht aus den drei Kernuntereinheiten Scc1, Smc1 und Smc3 und bildet eine ringförmige Struktur aus, die groß genug ist, um eine oder auch zwei Chromatinfasern topologisch umschließen zu können. Während die Funktion von Scc1, Smc1 und Smc3 als strukturelle Komponenten des Cohesinkomplexes allgemein akzeptiert ist, ist die Rolle der Cohesin-assoziierten Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 weniger gut verstanden.

Für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion ist die Acetyltransferase Eco1 notwendig, die zwei benachbarte Lysine des Smc3-Proteins modifiziert. Die Eco1-abhängige Acetylierung der Cohesinkomplexe erfolgt dabei in der S-Phase des Zellzyklus. Eco1 bindet über ein konserviertes PIP-Box-Motiv an den Replikationsfaktor PCNA, die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion erfolgt daher wahrscheinlich während oder kurz nach der Replikation der Chromosomen. Zellen ohne funktionelles Eco1-Protein sind nicht lebensfähig, die genaue molekulare Funktion der Acetylierung ist bisher allerdings nur unzureichend aufgeklärt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pds5, Scc3 und Wpl1 einen ternären Komplex ausbilden, für die stabile Assoziation von Cohesin mit den Chromosomen aber nicht notwendig sind. Die Depletion von Pds5 und Scc3 bzw. die Deletion von *WPL1* verursacht allerdings starke Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion. Die Kohäsionsdefekte können dabei durch essenzielle Funktionen dieser Proteine bei der Etablierung und/oder Aufrechterhaltung der Kohäsion erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass nur 8% bzw. 4% der Cohesinkomplexe mit Pds5 bzw. Scc3 für die

Lebensfähigkeit der Zelle ausreichen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass Pds5 und Scc3 als stabile Komponenten des Cohesinkomplexes für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion verantwortlich sind. Ich bevorzuge das Modell, dass sowohl Pds5 wie auch Scc3 während der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion notwendig sind, für die Aufrechterhaltung der Kohäsion in späteren Zellzyklusphasen aber nicht mehr benötigt werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Interaktion zwischen Eco1 und PCNA genauer untersucht. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte die Bindung von Eco1 an PCNA auf molekularer Ebene visualisiert werden. Es zeigte sich, dass die auf dem konservierten PIP-Box-Motiv basierende Interaktion zwischen Eco1 und PCNA strukturell nahezu identisch mit anderen PIP-Box/PCNA-Komplexen ist, obwohl im PIP-Box-Motiv des Eco1-Proteins typische N- und C-terminal flankierende Sequenzen nicht vorhanden sind.



# 1. Einleitung

## 1.1. Der Zellzyklus

Die kleinste funktionelle Einheit des Lebens ist die Zelle, von einzelligen Organismen wie der Bäckerhefe bis zu hoch komplexen multizellulären Organismen wie dem Menschen [1]. Proliferation und Zellteilung sind dabei fundamentale Prozesse und sichern durch die Generierung nahezu identischer Nachkommen den Fortbestand einer jeden Spezies. Punktuelle Änderungen im Erbmateriale der Nachkommen sind die Grundlage der Evolution [2].

Das Wachstum einer eukaryotischen Zelle mit der abschließenden Aufteilung in zwei Tochterzellen wird als Zellzyklus (für einen Überblick siehe [3,4]) bezeichnet und wird traditionsgemäß in vier Phasen unterteilt: die G<sub>1</sub>-Phase (Gap), die S-Phase (Synthese), die G<sub>2</sub>-Phase und die M-Phase (Mitose; bestehend aus der Kernteilung, auch Mitose genannt, und der eigentlichen Zellteilung (Zytokinese)).

Die G<sub>1</sub>-Phase dient der Zelle hauptsächlich dazu, durch Aufnahme von Nährstoffen Zellwachstum (Proliferation) zu ermöglichen. In multizellulären Organismen haben proliferierende Zellen zudem die Möglichkeit, durch Eintritt in die sogenannte G<sub>0</sub>-Phase das Zellwachstum zu unterbrechen oder dauerhaft einzustellen. Die meisten ausdifferenzierten Zellen in einem multizellulären Organismus befinden sich in dieser Phase abseits des Zellzyklus. Der Eintritt in die G<sub>0</sub>-Phase kann auch zum Schutz des Organismus als Folge von DNA-Schäden oder Zellerterung geschehen.

In der auf die G<sub>1</sub>-Phase folgende S-Phase wird das genetische Material verdoppelt. Dabei entstehen pro Chromosom zwei nahezu identische Schwesterchromatiden, die schon während ihrer Replikation eng beieinander liegen und nach ihrer Duplikation auch in den späteren Zellzyklusphasen zusammen gehalten werden müssen. Dieser Zusammenhalt wird als Schwesterchromatid-Kohäsion bezeichnet, ein großer Proteinkomplex, Cohesin genannt, ist dafür verantwortlich (Abschnitt 1.4.1).

Nach der vollständigen Replikation der DNS in der S-Phase folgt die G<sub>2</sub>-Phase. Diese wird von der Zelle für weiteres Zellwachstum genutzt, bevor die Chromosomen dann in der Mitose (Abschnitt 1.2) durch Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion (Abschnitt 1.4.6) auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt werden. Nach der Aufteilung des Erbmaterials erfolgt die Zytokinese.

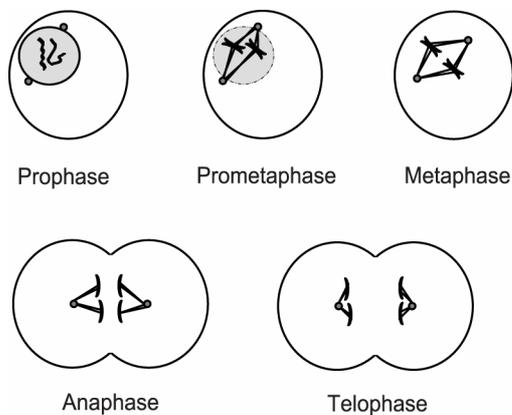
Die fehlerfreie Weitergabe des Erbmaterials ist für den Fortbestand einer Spezies essenziell, der zeitliche und funktionelle Ablauf des Zellzyklus wird von der Zelle sehr genau überwacht. In multizellulären Organismen können Fehler im Zellzyklus zudem zu unkontrolliertem Wachstum einzelner Zellen und letztendlich auch zu Krebs führen. Zur Überwachung des Zellzyklus existieren verschiedene Kontrollpunkte. Diese Kontrollpunkte erlauben nur dann ein Voranschreiten des Zellzyklus, wenn alle Abläufe der vorherigen Zellzyklusphase korrekt und vollständig abgelaufen sind. Einer dieser Kontrollpunkte ist der Metaphase-Kontrollpunkt, welcher den Übergang von Metaphase zu Anaphase während der Mitose überwacht (Abschnitt 1.4.6.1).

## **1.2. Die Mitose**

Bevor die Zytokinese stattfinden kann, muss gewährleistet sein, dass das genetische Material gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt ist. Diese Verteilung des Erbmaterials wird in der Kernteilung erreicht. Die Mitose wird dabei traditionell in fünf Phasen unterteilt: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase (Abb. 1.1). Nach der Telophase erfolgt die Zytokinese [5].

In der mitotischen Prophase beginnt die Kondensation der einzelnen Chromosomen und die Zentrosomen beginnen zu den gegenüberliegenden Polen in der Zelle zu wandern. Die Zentrosomen sind dabei für den folgenden Aufbau des mitotischen Spindelapparats verantwortlich. In der Bäckerhefe existieren keine Zentrosomen, hier übernehmen die sogenannten Spindelpolkörper den Aufbau des Spindelapparats [6,7].

In der nachfolgenden Prometaphase erfolgt in den meisten Eukaryoten der Abbau der Kernmembran, in einigen Organismen wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* bleibt die Kernhülle hingegen während des gesamten Zellzyklus intakt [4]. Die Chromosomen werden über die Kinetochore an die von den Zentrosomen ausgehenden Mikrotubuli des Spindelapparats angeheftet. In der Bäckerhefe ist dabei im Gegensatz zu vielen anderen Eukaryoten nur ein Mikrotubulus pro Kinetochor vorhanden und die Zentromere aller 16 Chromosomen liegen während des gesamten Zellzyklus dicht beieinander [8,9]. Gegen Ende der Prometaphase beginnen die Chromosomen sich in der Mitte zwischen den Polen anzuordnen.



**Abb. 1.1: Die einzelnen Phasen der Mitose.**

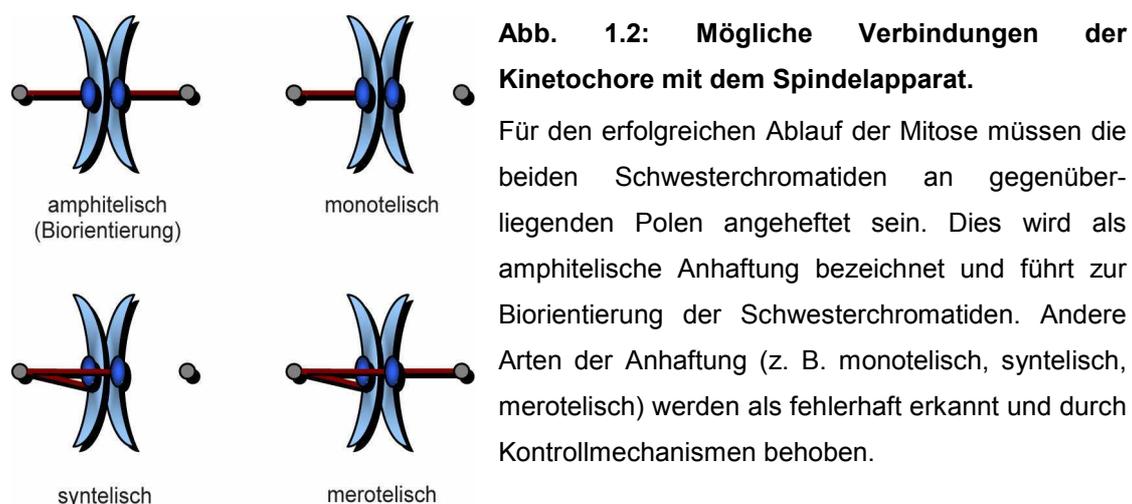
Die Mitose wird traditionell in fünf Stadien eingeteilt: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. In der Prophase beginnt die Kondensierung der Chromosomen und die Zentrosomen wandern auseinander. In der Prometaphase bildet sich der Spindelapparat aus, die Kernhülle löst sich auf. In der Metaphase sind die kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle angeordnet. In der Anaphase wird die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden aufgelöst, die Chromatiden werden zu den gegenüberliegenden Polen gezogen. In der Telophase haben die Schwesterchromatiden die Pole erreicht, der Spindelapparat wird abgebaut, die Dekondensation der Chromosomen beginnt und die Zytokinese wird vorbereitet.

In der Metaphase ist die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene, welche in der Mitte zwischen den beiden Polen liegt, abgeschlossen. Dabei ist es für die kommende Aufteilung der Schwesterchromatiden von fundamentaler Bedeutung, dass die Chromosomen biorientiert sind, d. h. dass die Schwesterchromatiden an jeweils gegenüberliegenden Zentrosomen angeheftet sind (Abb. 1.2). Die Zugkraft der angehefteten Mikrotubuli wird dabei von der kohäsiv wirkenden Kraft der Schwesterchromatid-Kohäsion neutralisiert [10], die Chromosomen stehen im Bereich ihrer Zentromere daher unter Zugspannung [11,12,13].

Durch die auf die Chromosomen wirkende Spannung sind die Schwesterkinetochore etwa 1-2  $\mu\text{m}$  voneinander entfernt [14,15,16]. Fehlerhafte Anhaftungen der Chromatiden führen im späteren Verlauf der Mitose zur ungleichen Verteilung des genetischen Materials. Die Mitose wird daher sehr genau überwacht (Abschnitt 1.4.6.1).

In der Anaphase wird die Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion eingeleitet (Abschnitt 1.4.6), die einzelnen Chromatiden können dann durch die Zugkraft der Mikrotubuli zu den gegenüberliegenden Polen gezogen werden. Die Anaphase wird dabei durch die Aktivität des APC/C-Komplexes (Anaphase-promoting Complex/Cyclosome), ein hoch konservierter Multiproteinkomplex mit Ubiquitin-Ligase-Aktivität [17,18,19], eingeleitet.

In der Telophase haben die Chromatiden die gegenüberliegenden Pole erreicht, die Dekondensation der Chromosomen beginnt, der Spindelapparat wird abgebaut und die Zytokinese wird vorbereitet.



**Abb. 1.2: Mögliche Verbindungen der Kinetochore mit dem Spindelapparat.**

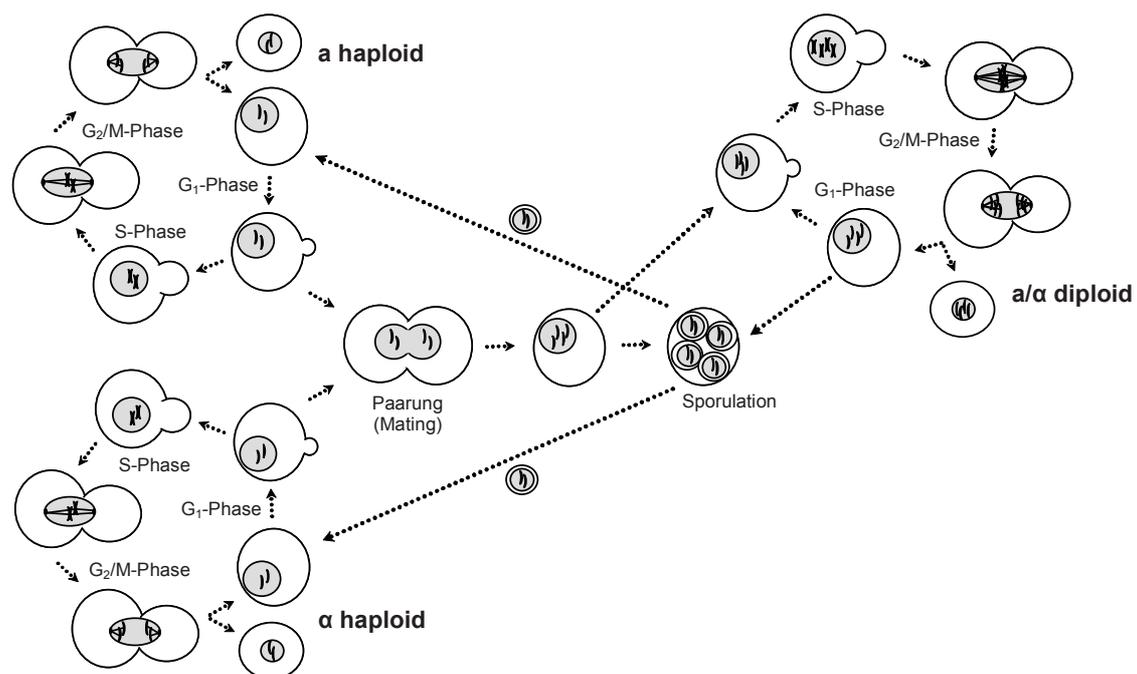
Für den erfolgreichen Ablauf der Mitose müssen die beiden Schwesterchromatiden an gegenüberliegenden Polen angeheftet sein. Dies wird als amphitelische Anhaftung bezeichnet und führt zur Biorientierung der Schwesterchromatiden. Andere Arten der Anhaftung (z. B. monotelisch, syntelisch, merotelisch) werden als fehlerhaft erkannt und durch Kontrollmechanismen behoben.

### 1.3. *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* diente in der Biologie schon früh als Modellorganismus. Durch Größe und Form dieses unizellulären Ascomyceten kann der Zellzyklusstatus sehr einfach unter dem Mikroskop bestimmt werden. Daher war es bereits sehr früh möglich, temperatursensitive Mutanten zu isolieren, die in bestimmten Phasen des Zellzyklus arretiert werden können [20]. Studien in der Bäckerhefe haben nicht nur viel zu

unserem heutigen Verständnis des Zellzyklus und dessen Kontrolle beigetragen [21,22], sondern auch in anderen Bereichen der Zellbiologie wichtige Erkenntnisse gebracht [23,24]. Das Genom der Bäckerhefe ist das erste vollständig sequenzierte Genom eines Eukaryoten. Das 14 Mb große Genom enthält mehr als 5500 Gene, verteilt auf 16 verschiedene Chromosomen [25,26].

Die Bäckerhefe besitzt einen haploiden und einen diploiden Lebenszyklus (Abb. 1.3). In Abwesenheit von geeigneten Paarungspartnern durchlaufen haploide Zellen einen normalen Zellzyklus mit mitotischer Teilung. Dadurch ist die Bäckerhefe besonders gut für die genetische Analyse von Mutanten geeignet, da sich der Phänotyp (sofern vorhanden) im haploiden genetischen



**Abb. 1.3: Haploide und diploide Proliferation in *S. cerevisiae*.**

In Abwesenheit eines geeigneten Paarungspartners durchlaufen *S. cerevisiae*-Zellen einen haploiden mitotischen Zellzyklus (links). Unter bestimmten Bedingungen können haploide Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp verschmelzen (Mitte). Die entstandene diploide Zygote kann entweder sporulieren und nach einer Meiose vier haploide Sporen generieren (Mitte) oder in einen diploiden mitotischen Zellzyklus übergehen (rechts).

Hintergrund direkt erkennen lässt. Ist ein geeigneter Partner für die Paarung vorhanden, so können haploide Zellen zu diploiden Zygoten verschmelzen und in einen diploiden mitotischen Zellzyklus übergehen.

In der  $G_1$ -Phase des haploiden Zellzyklus bilden die Zellen eine Knospe aus, die im weiteren Zellzyklusverlauf zur Tochterzelle heranreift. Der Nukleus wandert in den Grenzbereich zwischen Mutterzelle und knospender Tochterzelle und wird während der Mitose letztendlich in zwei Tochterkerne geteilt, die auf Mutter- und Tochterzelle verteilt werden. Durch die abschließende Zytokinese entsteht eine kleine Tochterzelle sowie eine wesentlich größere Mutterzelle. Die Kernhülle bleibt dabei im Gegensatz zu anderen Eukaryoten intakt, der Spindelapparat befindet sich innerhalb des Kerns. Während die  $G_1$ - und S-Phasen biochemisch und phänotypisch klar erkennbar sind, ist der Übergang von der sehr kurzen  $G_2$ -Phase in die Mitose fließend. Man spricht in der Bäckerhefe daher meist von der  $G_2/M$ -Phase.

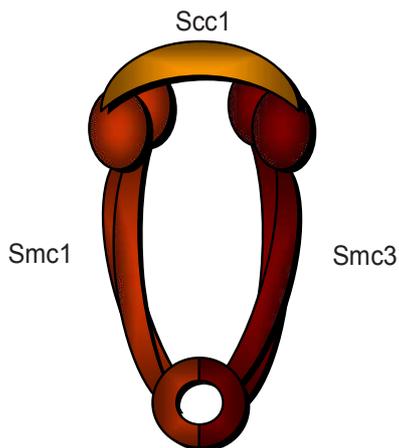
Haploide Zellen können auch zu einer diploiden Zygote verschmelzen. Das „Geschlecht“ der haploiden Zellen wird dabei durch den Paarungstyp (*MAT*, Mating Type) bestimmt. Nur zwei Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp (*MAT $\alpha$*  und *MAT $\alpha$* ) können zu einer diploiden Zygote verschmelzen. Zellen mit dem Paarungstyp *MAT $\alpha$*  sondern vor der Plasmogamie ein Pheromon,  $\alpha$ -Faktor genannt, ab. Das Pheromon sorgt für eine Synchronisation der Population in der  $G_1$ -Phase [27] und stellt so sicher, dass nur Zellen mit nicht repliziertem Genom verschmelzen. Das Pheromon wird daher auch im Laboralltag zur Synchronisation von Hefepopulationen in Flüssigkultur verwendet.

Nach der Plasmogamie erfolgt die Karyogamie, die Zygote proliferiert und kann sich mitotisch vermehren. Bei schlechten Nährstoffbedingungen hingegen sporuliert die Zygote und bildet durch Meiose vier haploide Sporen (Tetrade genannt) aus. Die entstandenen Sporen können entweder in einen haploiden mitotischen Zyklus eintreten oder erneut zu einer diploiden Zygote verschmelzen. Die einzelnen Sporen der Tetrade können durch Mikromanipulation getrennt werden, diese sogenannte Tetraden-Dissektion stellt eine wichtige Methode in der klassischen Hefegenetik dar [28,29].

## 1.4. Die Schwesterchromatid-Kohäsion im Verlauf des Zellzyklus

### 1.4.1. Der Cohesinkomplex

Der Cohesinkomplex (für einen Überblick siehe [30,31]) besteht aus den drei Kernkomponenten Scc1, Smc1 und Smc3 (Abb. 1.4 und [32,33]).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung von Cohesin.**

Cohesin besteht aus den drei Komponenten Scc1, Smc1 und Smc3. Beide Smc-Proteine bilden lange Coiled-Coil-Bereiche, die die N- und C-terminalen Domänen des Smc-Proteins zu einer funktionellen ATPase-Domäne zusammenkommen lassen. Zwischen den beiden Strängen des Coiled-Coil-Bereichs liegt eine halbkreisförmige Dimerisierungsdomäne, die für die Dimerisierung der beiden Smc-Proteine verantwortlich ist. Durch die Bindung der dritten Komponente Scc1 an die ATPase-Domänen beider Smc-Proteine wird ein ringförmiger Proteinkomplex ausgebildet.

Beide Smc-Proteine (Structural Maintenance of Chromosomes) besitzen globuläre N- und C-terminale Domänen, einen hoch konservierten [34,35], antiparallelen [36] und intramolekularen [32] Coiled-Coil-Bereich sowie eine Dimerisierungsdomäne, die zwischen den beiden Coiled-Coil-Strängen lokalisiert ist. Die Smc-Proteine bilden über ihre Dimerisierungsdomänen ein Smc1/Smc3-Heterodimer aus [32]. Die kürzlich gelöste Struktur dieser Domäne zeigt eine ringförmige Anordnung mit zwei getrennten Interaktionsbereichen – ein Halbring wird von Smc1, der andere von Smc3 gebildet [37]. Durch die Rückfaltung des langen Coiled-Coil-Bereichs kommen die N- und C-terminalen Domänen des Smc-Proteins zusammen und formen eine ABC<sup>1</sup>-ähnliche (ATP-binding Cassette) ATPase-Domäne. Biochemische

<sup>1</sup> ABC-Transporter bezeichnen eine Superfamilie von Transmembranproteinen, die anhand ihrer ATP-Bindedomäne klassifiziert werden. Zwei charakteristische, durch etwa 90-120 Aminosäuren getrennte Motive, Walker A und Walker B, sowie ein ABC-Signaturmotiv sind in allen Mitgliedern dieser Familie zu finden [38]. ATP wird durch die Walker A- und Walker B-Motive gebunden, anschließend kommt es zu einer Signaturmotiv-abhängigen →

Studien [39,40] und die Kristallstruktur eines ATPγS-gebundenen Smc1-Homodimers zusammen mit der C-terminalen Domäne von Scc1 [41] zeigen, dass jedes Smc-Protein über seine Walker A- und Walker B-Motive ein Molekül ATP binden kann. Durch das ABC-Signaturmotiv können die ATPase-Domänen von Smc1 und Smc3 dimerisieren, das Signaturmotiv des einen Smc-Proteins bindet dabei das im anderen Smc-Protein gebundene ATP-Molekül, dadurch wird die Dimerisierung der ATPase-Domänen und die spätere Hydrolyse der beiden gebundenen Moleküle ATP ermöglicht. Sowohl die Bindung wie auch die Hydrolyse von ATP ist für die Assoziation von Cohesin mit den Chromosomen essenziell [39].

Das Scc1-Protein (Sister Chromatid Cohesion) gehört zur Superfamilie der α-Kleisine [42]. Der C-Terminus von Scc1 bildet eine Winged-Helix-Domäne<sup>2</sup>, die für die Bindung der ATPase-Domäne von Smc1 notwendig und ausreichend ist [32,41]. Der N-Terminus von Scc1 ist wahrscheinlich ähnlich gefaltet und für die Bindung an die ATPase-Domäne des Smc3-Proteins verantwortlich [32]. Durch die direkte Dimerisierung von Smc1 und Smc3 und die durch Scc1 verbundenen ATPase-Domänen beider Smc-Proteine entsteht so ein großer, ringförmiger Proteinkomplex mit einem Durchmesser von 35-50 nm [45].

Schon bald nachdem die Interaktionen zwischen den einzelnen Cohesinuntereinheiten bekannt waren, wurde vermutet, dass die DNS-Bindung von Cohesin topologischer Natur ist [45,46]. Andere Modelle wurden allerdings ebenfalls postuliert [47]. Der Proteinring ist groß genug, um eine oder auch zwei Chromatinfasern umschließen zu können [45,46,48]. Durch gleichzeitige chemische Quervernetzung der Scc1/Smc1- und Smc1/Smc3-

---

<sup>1</sup> (fortführend) Dimerisierung zweier ABC-Proteine. Durch die Dimerisierung können die beiden gebundenen ATP-Moleküle durch die Walker B-Motive hydrolysiert werden, das Dimer zerfällt und die beiden ABC-Proteine können einen neuen ATP-Hydrolysezyklus beginnen [39].

<sup>2</sup> Die Winged-Helix-Domäne (WHD) gehört zu Superfamilie der Helix-Turn-Helix-Familie. WHDs enthalten typischerweise drei α-Helices gefolgt von zwei β-Strängen und sind in den meisten Fällen in eine sequenzspezifische Interaktion mit DNS involviert. Dabei ist die dritte Helix für die spezifische Basenerkennung notwendig [43]. In seltenen Fällen sind WHDs auch für Interaktionen zwischen Proteinen verantwortlich [41,44].

Kontaktflächen und einer Fusion der Scc1/Smc3-Kontaktfläche wurde gezeigt, dass Cohesin auch nach einer Hitzedenaturierung mit 2-Micron-Minichromosomen assoziiert bleibt. Durch eine Linearisierung des Minichromosoms hingegen dissoziiert der quervernetzte und denaturierte Cohesinkomplex von der DNS [49]. Bis vor Kurzem war allerdings nicht klar, ob sich diese bei Minichromosomen gemachten Beobachtungen auch auf die wesentlich größeren Chromosomen in der Zelle übertragen lassen. Kürzlich wurde die chemische Quervernetzung des Cohesins mit folgender Hitzedenaturierung mit einem wesentlich größeren, linearen Minichromosom (46 kb) wiederholt [50], eine topologische Interaktion von Cohesin mit der DNS findet also sehr wahrscheinlich auch im Fall der Chromosomen statt [30].

Neben den Kernkomponenten des Komplexes sind noch weitere Proteine für die Funktion des Cohesinkomplexes notwendig, namentlich Pds5 (Precocious Dissociation of Sisters; [51,52]), Scc3 [32,53] und Wapl (Wings apart-like; [54,55]). Diese werden über das  $\alpha$ -Kleisin an den Cohesinkomplex rekrutiert [32,55,56]. Scc3 wurde ebenfalls als Kernkomponente von Cohesin entdeckt [33] und wird auch heute noch oft als für die Integrität des Komplexes notwendige Komponente beschrieben [57]. Im Verlauf dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass Cohesin auch ohne stabil gebundenes Scc3 funktionell ist. Daher wird Scc3 im Folgenden als Cohesin-assoziiertes Protein bezeichnet, während der Kernkomplex aus Scc1, Smc1 und Smc3 in dieser Arbeit Cohesin(komplex) genannt wird.

Scc3 ist ein sehr großes Protein und wurde als für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenzielles Genprodukt identifiziert [33]. Allerdings übt Scc3 auch eine Rolle bei der Destabilisierung der DNS-Bindung von Cohesin aus [58].

Pds5 ist ähnlich groß, besteht hauptsächlich aus HEAT-Wiederholungen<sup>3</sup> [52,60] und ist für die Rekrutierung von Wapl an den Cohesinkomplex

---

<sup>3</sup> Die HEAT-Wiederholung ist eine Proteindomäne, die hauptsächlich in zytoplasmatischen Proteinen vorgefunden wird. Eine einzelne Wiederholung besteht dabei aus 37-47 Aminosäuren, eine Anordnung von 3-36 Wiederholungen resultiert in einer langezogenen helikalen Struktur, die als Interaktionsplattform für andere Proteine dienen kann. Die →

verantwortlich [54,55,56]. Pds5 wurde ebenfalls als ein für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenzielles Protein identifiziert [51,52], ist allerdings nicht in allen Organismen essenziell [61]. Zusätzlich ist auch Pds5 an der Destabilisierung der DNS-Bindung von Cohesin beteiligt [56,62]. Wie Pds5 und Scc3 die Schwesterchromatid-Kohäsion auf molekularer Ebene stabilisieren, ist nicht verstanden.

Wapl wurde ursprünglich als Genprodukt beschrieben, welches im Menschen, in der Maus und in der Fruchtfliege essenziell ist und eine wichtige Funktion bei der Bildung von Heterochromatin und der Schwesterchromatid-Kohäsion [63] sowie bei der Kondensation der Chromosomen und deren folgender Trennung während der Mitose besitzt [64]. Außerdem begünstigt die Überexpression von Wapl die Tumorgenese [65]. Wenige Jahre später wurde Wapl als Faktor beschrieben, welcher in höheren Eukaryoten für die Dissoziation von Cohesin von der DNS verantwortlich ist [54,55,56]. Homologe Proteine (Rad61/Wpl1; Radiation sensitive; Wapl-like Protein) wurden in der Folge auch in niederen Eukaryoten wie der Bäckerhefe identifiziert [55]. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde im Labor von Dr. Kim Nasmyth auch für das Wpl1-Protein der Bäckerhefe eine Rolle bei der Dissoziation des Cohesinkomplexes von der DNS nachgewiesen [66].

Die Hauptfunktion von Pds5, Scc3 und Wapl ist ihre inhibitorische Rolle bei der Etablierung und/oder der späteren Aufrechterhaltung der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden [67,68,69,70], die auf molekularer Ebene bisher allerdings kaum verstanden ist (Abschnitt 1.4.4).

Während es in der Hefe nur je eine Version von Smc1 und Smc3 gibt, existieren in Säugetieren zwei Versionen von Smc1, Smc1 $\alpha$  und das Meiose-spezifische Smc1 $\beta$ . Daneben gibt es drei Versionen von Scc1, drei von Scc3/SA (Stromal Antigen) und zwei von Pds5. Daraus ergeben sich insgesamt 18 verschiedene mögliche Cohesinkomplexe (Tabelle 1.1 und [30]). In der Bäckerhefe sind hingegen lediglich zwei verschiedene Kombinationen

---

<sup>3</sup> (fortführend) Abkürzung HEAT steht für die vier typischen Vertreter dieser Familie: Huntingtin, dem Elongationsfaktor 3 (EF3), der Proteinphosphatase 2A (PP2A) und der PI3-Kinase IOR1 [59].

des Cohesinkomplexes möglich, der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* eignet sich daher sehr gut zum Studium von Cohesin.

**Tabelle 1.1: An der Schwesterchromatid-Kohäsion beteiligte Proteine in den verschiedenen Modellorganismen.**

Meiose-spezifische Varianten sind unterstrichen. Alternative Bezeichnungen sind hinter dem Schrägstrich vermerkt.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. sapiens</i>
<b>Smc-Proteine</b>	Smc1, Smc3	Psm1, Psm3	Smc1, Smc3	Smc1 $\alpha$ , <u>Smc1<math>\beta</math></u> , Smc3
<b><math>\alpha</math>-Kleisine</b>	Scs1/Rad21/Mcd1, <u>Rec8</u>	Rad21, <u>Rec8</u>	Rad21, <u>C(2)M</u>	Scs1, <u>Rad21L</u> , <u>Rec8</u>
<b>Scs3</b>	Scs3/Irr1	Psc3, <u>Rec11</u>	SA	SA1, SA2, <u>STAG3</u>
<b>Pds5</b>	Pds5	Pds5	Pds5	Pds5A, Pds5B/APRIN
<b>Wapl</b>	Rad61/Wpl1/Wapl	Wpl1	Wapl	Wapl
<b>Scs2</b>	Scs2	Mis4	Nipped B	Scs2/Nipbl
<b>Scs4</b>	Scs4	Ssl3	Scs4	Scs4/Mau2

#### 1.4.2. Verwandte Smc-Komplexe

In Eukaryoten existieren neben dem Cohesinkomplex noch zwei weitere Smc-Komplexe, Condensin [71] und der Smc5/Smc6-Komplex [72,73]. Beide Komplexe sind ebenfalls durch zwei Smc-Proteine (Smc2/Smc4 im Fall von Condensin), ein Kleisin ( $\beta$ -Kleisin bei Condensin und  $\gamma$ -Kleisin beim Smc5/Smc6-Komplex) sowie weitere assoziierte Proteine definiert.

Condensin ist für die strukturelle Organisation der Chromosomen während der Interphase [74] und der Mitose [71] notwendig. Condensin kann positive Supercoils in isolierte DNS-Moleküle und in Chromosomen einfügen [75,76,77]. Dieser Vorgang ist wahrscheinlich für die Organisation der Chromosomen während der Mitose (Chromosomenkondensation) und für die folgende Trennung der Schwesterchromatiden notwendig [78]. Vor Kurzem wurde gezeigt, dass Condensin – genau wie Cohesin auch (Abschnitt 1.4.1) – durch die proteolytische Prozessierung einer Untereinheit von zirkulärer DNS abgelöst werden kann [79]. Dies deutet genau wie auch bei Cohesin auf eine topologische Interaktion mit der DNS hin.

Der Smc5/Smc6-Komplex ist ebenfalls essenziell und bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNS beteiligt [80]. Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Telomere und dem Neustart von Replikationsgabeln sowie für den normalen Ablauf der Mitose wurden ebenso beschrieben [81,82]. Alle diese Funktionen könnten sich aber letztendlich auf die Reparaturfunktion dieses Komplexes zurückführen lassen.

Die meisten Eubacteria besitzen hingegen nur einen einzigen Smc-Komplex, bestehend aus einem Smc-Protein, dem Kleisin ScpA (Segregation and Condensation Protein) sowie dem assoziierten Protein ScpB. Das Smc-Protein bildet dabei über seine Dimerisierungsdomäne – analog zum Smc1/Smc3-Heterodimer – ein Homodimer aus, ScpA und ScpB binden an die ATPase-Domänen des Homodimers. Der bakterielle Condensinkomplex ist für die Kondensation und die Weitergabe des bakteriellen „Chromosoms“ notwendig [83,84].

*E. coli* und andere Mitglieder der  $\gamma$ -Proteobakterien besitzen hingegen keinen Smc-Komplex, stattdessen sind hier die Proteine MukB, MukE und MukF („mukaku“, japanisch für kernlos) für die Chromosomenkondensation verantwortlich [85,86,87]. MukB bildet ebenfalls einen homodimeren Komplex, die strukturelle Organisation gleicht dabei der der Smc-Proteine [36]. MukB weist zudem eine schwache Sequenzhomologie mit Smc-Proteinen auf [88]. MukE und MukF bilden einen Komplex mit dem MukB-Homodimer [85,89,90,91,92]. Obwohl MukE und MukF keine Sequenzhomologien zu ScpA und ScpB zeigen [84], wird postuliert, dass diese Proteine die funktionell homologen Proteine zu ScpA und ScpB sind [83,90]. Kürzlich gelöste Kristallstrukturen dieses Komplexes in verschiedenen Konformationen festigen diese Hypothese [91].

Vieles deutet darauf hin, dass Smc-Komplexe sehr ursprüngliche Proteinkomplexe sind, die bereits in Prokaryoten existieren und sich in Eukaryoten durch Genduplikationen in mehrere verschiedene Komplexe mit unterschiedlichen Aufgabengebieten entwickelt haben [88].

### 1.4.3. Das Beladen der DNS mit dem Cohesinkomplex

Das Beladen der DNS mit Cohesin findet während der gesamten Interphase statt. Zwar wird Scc1 in der frühen G<sub>1</sub>-Phase nicht exprimiert, doch liegen noch Cohesinkomplexe aus der vorangegangenen Zellteilung vor, die zum großen Teil schon in der Telophase der Mitose (Säugetiere) oder in der G<sub>1</sub>-Phase (Bäckerhefe) wieder auf die Chromosomen geladen werden [56,57].

Für den Beladungsprozess ist die ATP-Hydrolyseaktivität beider Smc-Proteine notwendig, Hydrolyse-defiziente Mutanten binden nur transient an die DNS, vermutlich in einem Zwischenschritt des eigentlichen Ladevorgangs fixiert [39,93]. Ein separater Komplex bestehend aus Scc2 und Scc4 (Tabelle 1.1 und [33,94]), Kollerin genannt [30], ist für den Ladevorgang erforderlich. Scc2 ist ein großes Protein mit mehreren HEAT-Wiederholungen, während Scc4 wesentlich kleiner ist und einige TPR-Wiederholungen<sup>4</sup> aufweist [97]. Es ist weder genau verstanden wie der Ladevorgang funktioniert, noch ob geladenes Cohesin eine einzelne G<sub>1</sub>-Chromatinfaser topologisch umschließt und/oder mit (un)spezifischen DNS-Sequenzen interagiert. Für den Ladevorgang ist eine intakte Dimerisierungsdomäne der Smc-Proteine notwendig, es wurde daher während des Ladevorgangs eine transiente Dissoziation von Smc1 und Smc3 im Bereich der Dimerisierungsdomäne postuliert [98]. Auch das Scc3-Protein, nicht aber Pds5 und Wapl, ist für den Ladevorgang erforderlich [93].

In *S. cerevisiae* sind die Zentromere für den Großteil des DNS-gebundenen Cohesins, bis zu 30 kb vom Zentromer entfernt, verantwortlich [93,99]. Die Beteiligung einzelner Kinetochorproteine wurde ebenfalls berichtet [100]. In der Spaltheefe *Saccharomyces pombe* wird Cohesin zwischen einigen, allerdings nicht allen, konvergent transkribierten Genen gefunden [101,102]. Es wird daher vermutet, dass ein Großteil des Cohesins in der Nähe der Zentromere auf die DNS geladen wird und danach weite Strecken auf den

---

<sup>4</sup> TPR-Wiederholungen (Tetratricopeptide Repeat) bezeichnen ein strukturelles Motiv, welches in vielen Proteinen vorhanden ist und für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Ein typisches TPR-Motiv besteht dabei aus 3-16 TPR-Wiederholungen mit jeweils 34 Aminosäuren [95,96].

Chromatinfasern entlanggleiten kann. Die hohe Konzentration von Kollerin an den Zentromeren selbst sowie die lediglich transiente DNS-Assoziation von Hydrolyse-defizienten Cohesinkomplexen an den Zentromeren, nicht aber in perizentrischen Bereichen [93], unterstützen dieses Modell. Das Entlanggleiten muss dabei nicht aktiv stattfinden, z. B. kann die Akkumulation von Cohesin an Orten konvergierender Transkription durch ein Voranschieben des Cohesinrings durch RNS-Polymerasen erklärt werden [103,104].

In Säugetieren kolokalisiert Cohesin mit dem Transkriptionsfaktor CTCF (CCCTC-binding Factor), ohne dass dieser Faktor für die Lokalisation von Cohesin verantwortlich zu sein scheint (Abschnitt 1.5). Auch diese Kolokalisation kann durch ein passives Entlanggleiten des Cohesinkomplexes erklärt werden. In *Drosophila* kolokalisiert ein großer Teil des Cohesins mit Kollerin, während in Hefen Cohesin und der Scc2/Scc4-Komplex meist an unterschiedlichen Stellen zu finden sind [105,106]. Während die Zentromere in allen Organismen eine hohe Konzentration an Cohesin aufweisen, ist die Lokalisation und Verteilung von Cohesin entlang der Chromosomenarme in den verschiedenen Organismen oft sehr unterschiedlich. Zentromere und die dort vorhandenen Proteinkomponenten können daher nicht die einzige Stelle im Genom sein, an denen das Beladen der Chromosomen mit dem Cohesinkomplex möglich ist.

Die an die DNS gebundene Cohesinfraktion liegt vermutlich in einem stabilen Gleichgewicht mit dem zytoplasmatischen Cohesinpool vor. Während Kollerin die DNS fortwährend mit Cohesin belädt, wird DNS-gebundenes Cohesin durch die Aktivität von Pds5/Wapl, Releasinkomplex genannt [30], wieder entfernt [54,55,66]. Während der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion wird ein Teil des DNS-gebundenen Cohesins dauerhaft gegen die Releasinaktivität geschützt (Abschnitt 1.4.4). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung wurde in *Drosophila* gezeigt, dass die Menge an DNS-gebundenem Cohesin in der Interphase von der Menge an Nipped-B (Scc2-Homolog), Pds5 und Wapl abhängt [107].

#### 1.4.4. Die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion

In der S-Phase des Zellzyklus wird die DNS repliziert, die entstehenden Schwesterchromatiden werden von ihrer Synthese an bis zu ihrer späteren Trennung zu Beginn der Anaphase zusammengehalten. Für die Schwesterchromatid-Kohäsion ist der Cohesinkomplex verantwortlich [33,53,108].

Es ist bisher nicht vollständig verstanden, wie die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion auf molekularer Ebene funktioniert. Ein Neubeladen mit Cohesin direkt nach oder während der Replikation wird ebenso diskutiert wie die direkte Passage des Replisoms durch vorhandene, bereits eine Chromatinfaser umschließende Cohesinkomplexe [109]. Eine Interaktion des essenziellen Kohäsionsfaktors Eco1 (siehe unten) mit PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen; [110]) unterstützt die zuletzt genannte Hypothese ebenso wie beobachtete Kohäsionsdefekte, die durch Mutationen in spezifischen, bei der Replikation beteiligten Genen verursacht werden [111,112,113]. Da die Kohäsion zwischen Schwesterchromatiden allerdings auch – induziert durch DNS-Schäden – in der G<sub>2</sub>-Phase etabliert werden kann [114,115,116], kann die Passage des Replisoms durch den Cohesinring nicht die einzige Möglichkeit sein, Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden zu generieren.

Für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion ist die Acetyltransferase Eco1 (Abschnitt 1.4.4.1 und [117,118]) essenziell. Eco1 acetyliert zwei benachbarte, hoch konservierte Lysine in der ATPase-Domäne des Smc3-Proteins, die in der Bäckerhefe K112 und K113 und im Menschen K105 und K106 entsprechen [67,68,69,70]. Die Mutation beider Lysine zu Argininen ist in *S. cerevisiae* letal [67,69], der Austausch von K113 zu Asparagin [67] oder zu Threonin [68] erlaubt hingegen ein Zellwachstum in Abwesenheit des Eco1-Proteins. Eco1 ist von der Bäckerhefe bis hin zum Menschen konserviert. Im Gegensatz zur Bäckerhefe und zum Menschen ist die Acetylierung der entsprechenden Lysinreste in der Spaltheife nicht für das Überleben der Zelle essenziell, die Acetyltransferase selbst hingegen schon [119]. Dies sowie die Beobachtung, dass die Etablierung der Kohäsion in der

G<sub>2</sub>-Phase in der Folge von DNS-Schäden wahrscheinlich über die Acetylierung von Scc1 und nicht von Smc3 erfolgt [120], lässt weitere Substrate des Eco1-Proteins in speziellen Situationen und/oder einzelnen Organismen vermuten.

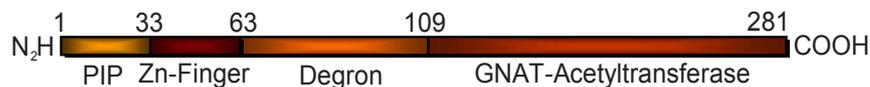
Die molekulare Funktion der Acetylierung des Smc3-Proteins ist bisher allerdings kaum verstanden. Die Acetylierung könnte die Passage des Replisoms durch bereits auf der DNS vorhandene Cohesinkomplexe ermöglichen oder bereits etablierte kohäsive Cohesinkomplexe nach deren Entstehung stabilisieren. Diese beiden Möglichkeiten schließen sich dabei nicht aus. In der Bäckerhefe heben eine Deletion von *WPL1* sowie spezifische Punktmutationen in *PDS5*, *SCC3* oder in der ATPase-Domäne des Smc3-Proteins die Notwendigkeit der Acetylierung auf, die Zellen sind auch ohne das *ECO1*-Gen lebensfähig [61,67,68,69,121]. Wapl und Pds5 formen den Releasinkomplex, der für die Dissoziation des Cohesinkomplexes von den Chromosomen verantwortlich ist [56,66]. Aufgrund der beschriebenen Supressormutationen wird daher vermutet, dass die vom Releasinkomplex angetriebene DNS-Dissoziation von Cohesin im Bereich der ATPase-Domäne des Smc3-Proteins erfolgt und dass die Acetylierung dieser Domäne im Gegenzug die Releasinaktivität blockiert [66]. Mutationen, die die mögliche Interaktions- oder Effektorstelle (Scc3, Smc3) oder die Releasinkomponenten selbst (Pds5, Wapl) verändern oder inaktivieren heben daher die Notwendigkeit der Acetylierung für die dauerhafte Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion auf.

In Säugetieren führt die Acetylierung von Smc3 zusätzlich zur Rekrutierung von Sororin. Dieser Faktor verdrängt Wapl von seiner Pds5-Bindestelle [62,122,123]. Es wird postuliert, dass die Acetylierung und als Folge der Austausch von Wapl zu Sororin für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion in der G<sub>2</sub>-Phase (Abschnitt 1.4.5) notwendig ist. In niederen Eukaryoten wie der Bäckerhefe wurde ein zu Sororin orthologes Protein allerdings bisher noch nicht identifiziert.

#### 1.4.4.1. Die Acetyltransferase Eco1

Eco1/Ctf7 (Establishment of Cohesion/Chromosome Transmission Fidelity) wurde in der Bäckerhefe als Faktor identifiziert, der für die Etablierung, nicht aber für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion notwendig ist [53,118]. Wenige Jahre später wurde Eco1 als Acetyltransferase, die zur Superfamilie der GNAT-Acetyltransferasen<sup>5</sup> [124] gehört, identifiziert [117]. Homologe Proteine wurden in der Folge in allen wichtigen Modellorganismen gefunden (z. B. Eso1 (Essential for S-Chromatin Organisation) in *S. pombe*, Deco und San in *D. melanogaster*, Esco1 und Esco2 (Establishment of Cohesion) im Menschen).

In *S. cerevisiae* ist Eco1 mit 31 kDa ein relativ kleines Protein, in anderen Organismen wie der Fruchtfliege oder der Spaltheife existieren jedoch wesentlich größere Varianten. Das Eco1-Protein der Bäckerhefe besitzt einen flexiblen und sehr wahrscheinlich ungefalteten N-terminalen Teil, eine Zinkfinger-Domäne, einen Prolin- und Serin-reichen mittleren Teil sowie die Acetyltransferase-Domäne im C-Terminus (Abb. 1.5 und [117]).



**Abb. 1.5: Die schematische Darstellung der Acetyltransferase Eco1.**

Das Eco1-Protein in *S. cerevisiae* ist 31 kDa groß und in mehrere Bereiche unterteilt. Die ersten 33 Aminosäuren beinhalten ein PCNA-Interaktionsmotiv (PIP), dass für die Bindung an PCNA verantwortlich ist. Es folgt eine putative Zn-Finger-Domäne mit unbekannter Funktion und ein Degron, welches den Zellzyklus-spezifischen Abbau von Eco1 verursacht. Der C-Terminus bildet eine Acetyltransferase-Domäne aus, die zur Superfamilie der GNAT-Acetyltransferasen gehört.

Der N-terminale Teil (As 1 bis As 33) enthält ein PIP-Box-Motiv (PCNA-interacting Protein; [126,127]) und ist für die Bindung an PCNA notwendig und

<sup>5</sup> GNAT steht für GCN5-related-N-Acetyltransferase und bezeichnet eine Superfamilie von Acetyltransferasen, die in allen Domänen des Lebens existiert. Das GNAT-Motiv zeichnet sich dabei durch 6-7 konservierte  $\beta$ -Stränge aus, die zusammen mit 4  $\alpha$ -Helices die funktionelle N-Acetyltransferase-Domäne ausbilden [124,125].

ausreichend [110]. Die Zinkfinger-Domäne ist essenziell, der Bindungspartner wurde bisher allerdings nicht entdeckt [128]. Im Verlauf dieser Arbeit wurde im Labor von Dr. Dmitri Ivanov der Prolin- und Serin-reiche mittlere Teil von Eco1 als Degron identifiziert [129], der Cdk1-spezifisch phosphoryliert wird und dadurch in der Folge proteolytisch abgebaut wird [130,131]. Die Phosphorylierung erfolgt dabei an vier Cdk1-Konsensusmotiven. Die Transkription von *ECO1* ist in der G<sub>1</sub>-Phase ebenfalls reduziert [132].

Die essenzielle Funktion von Eco1 ist die Acetylierung des Smc3-Proteins während der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion (Abschnitt 1.4.4). Die Interaktion mit PCNA [110] ist ebenfalls für das Wachstum der Zellen notwendig, ebenso der Zinkfinger. Der Interaktionspartner (ob DNS oder Protein) der Zn-Finger-Domäne ist bisher nicht bekannt. Strukturelle Informationen über das Eco1-Protein sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vorhanden.

#### **1.4.5. Die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion**

Das Eco1-Protein wird nach dem Abschluss der S-Phase durch die mitotische Cdk-Kinase (Cdk1-Clb2; Cyclin-dependent Kinase; Cyclin B) phosphoryliert und anschließend durch die Ubiquitin-Ligase SCF (Skp1-Cullin-E-Box E3-Ligase Complex) polyubiquitiniert. Das so modifizierte Eco1-Protein wird dann vom Proteasom erkannt und abgebaut (Abschnitt 1.4.4.1 und [130,131]). Da die Acetylierung des Smc3-Proteins durch Eco1 für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenziell ist [67,68,69,70], kann Cohesin in der G<sub>2</sub>-Phase durch den Kollerinkomplex zwar weiterhin auf die DNS geladen werden, doch neue Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden entsteht dabei nicht [41,133]. Mutationen in den Cdk1-Konsensusmotiven von Eco1 [130] oder DNS-Schäden [114,116,120] stabilisieren allerdings das Eco1-Protein und erlauben so auch die Generierung von Schwesterchromatid-Kohäsion in postreplikativen Zellen. Im Normalfall wird nach der S-Phase allerdings keine neue Kohäsion etabliert, die in der S-Phase entstandene Kohäsion muss also bis zur Trennung der Chromatiden während der Mitose aufrecht erhalten werden. In Übereinstimmung damit zeigen FRAP-

Experimente (Fluorescence Recovery after Photobleaching) in menschlichen Zellen [134] sowie in der Hefe [9,135] einen stabilen Cohesinpool auf der DNS, welcher erst in der G<sub>2</sub>-Phase nachgewiesen werden kann.

Die kohäsiven Cohesinkomplexe werden dabei sehr wahrscheinlich durch die Acetylierung am Smc3-Protein (S-Phase-Kohäsion) oder am Scc1-Protein (G<sub>2</sub>-Phase-Kohäsion) vor der Wapl/Pds5-Aktivität geschützt [67,69,120]. Der von der Smc3-Acetylierung abhängige Austausch von Wapl zu Sororin in menschlichen Zellen spricht ebenfalls für eine Schutzfunktion der Acetylierung [62,122,123]. Da Mutationen in *PDS5*, *SCC3*, *SMC3* und *WPL1* das Wachstum von Hefen auch ohne *ECO1* erlauben (Abschnitt 1.4.4), wird vermutet, dass für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion ein kurzzeitiges Öffnen des Cohesinrings oder eine transiente Konformationsänderung oder Interaktion an der ATPase-Domäne von Smc3 notwendig ist. Es wird postuliert, dass die Acetylierung von Smc3 den Cohesinkomplex dauerhaft resistent gegenüber der Releasinaktivität macht und somit die Kohäsion nach deren Etablierung schützt [66]. In Übereinstimmung mit diesem Modell wird die Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion in der Mitose von *S. cerevisiae* durch Proteolyse und nicht durch eine Wpl1-abhängige Dissoziation erreicht (Abschnitt 1.4.6). Die Proteolyse-unabhängige Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion in höheren Eukaryoten ist dabei auf zahlreiche mitotische Modifikationen des Cohesinkomplexes zurückzuführen [30,58].

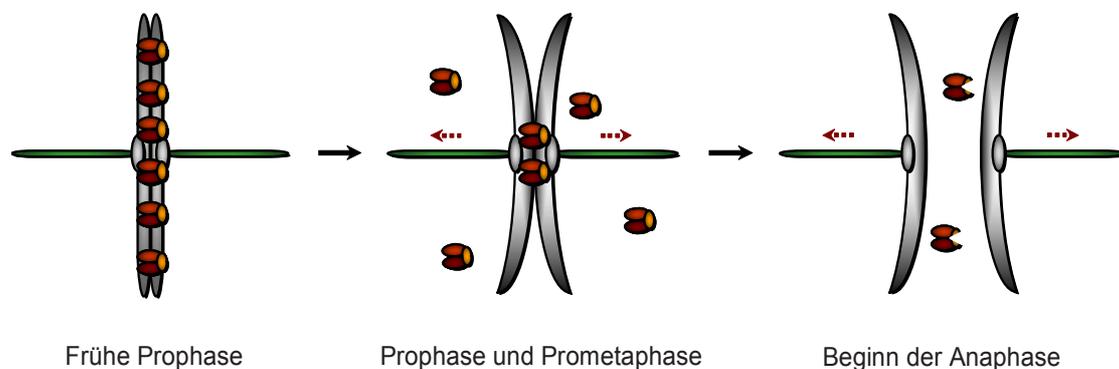
Pds5 wurde seit seiner Entdeckung als für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenziell beschrieben [51,52], die genaue Funktion des Proteins bei diesem Prozess ist allerdings bis heute nicht verstanden [57].

In den Eizellen von Säugetieren ist die Aufrechterhaltung der Kohäsion von besonderer Bedeutung, da hier die bivalenten Chromosomen Jahre bis hin zu Jahrzehnten zusammengehalten werden müssen. Es wird angenommen, dass die Kohäsion bereits in den frühen Stadien der Eizelle generiert wird und nicht auf die Neusynthese von Meiose-spezifischen Cohesinproteinen wie Rec8 (Recombination Protein 8; [136]) und Smc1 $\beta$  [137] angewiesen ist.

Defekte bei der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden werden auch in Verbindung mit den im Alter häufiger auftretenden Trisomien gebracht (Abschnitt 1.6).

#### 1.4.6. Die Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion während der Mitose

Während der Mitose werden die Schwesterchromatiden zu den gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen, jede Tochterzelle erhält dabei genau eine Kopie eines jeden Chromosoms. Für diesen Vorgang muss die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden aufgelöst werden (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6: Die Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion während der Mitose.**

In der frühen Prophase werden die Schwesterchromatiden durch den Cohesinkomplex zusammengehalten (links). Während der Pro- und Prometaphase dissoziiert ein großer Teil des Cohesins von den Chromosomen (Mitte). Dieser Prozess ist von Wapl und Pds5 abhängig, ein Teil des Cohesins im Bereich der Zentromere ist allerdings vor der Aktivität des Releasinkomplexes geschützt. Mit dem Ende der Metaphase wird die Protease Separase aktiviert und schneidet alle auf der DNS verbliebenen Cohesinkomplexe (rechts). Die Schwesterchromatid-Kohäsion wird dadurch zerstört, die Schwesterchromatiden können zu den gegenüberliegenden Polen gezogen werden.

Ein Großteil des auf der DNS vorhandenen Cohesins wird dabei schon während der Pro- und Prometaphase von den Chromatiden entfernt [138]. Dieser Prozess wird Prophase-Weg genannt (Abb. 1.6, links) und kommt ohne eine proteolytische Prozessierung (siehe unten) des Cohesinkomplexes aus [139].

Für diese Dissoziation von Cohesin ist eine Plk1-abhängige (Polo-like Kinase) Phosphorylierung von Scc1 [140,141,142], die Phosphorylierung von Scc3/SA2 sowie die Aktivität der Aurora B-Kinase [58] notwendig. Da auch Sororin zu Beginn der Mitose phosphoryliert wird [62], wird vermutet, dass eine ausgiebige „Hyperphosphorylierung“ des Cohesinkomplexes die Dissoziation vorantreibt und dadurch auch die Dissoziation von acetyliertem Cohesin ermöglicht [30]. Kollerin wird ebenfalls phosphoryliert, vermutlich um die Neubeladung der DNS mit Cohesin zu hemmen [58]. Die Dissoziation des phosphorylierten Cohesins ist dabei von Releasin abhängig, die Depletion von Pds5 oder Wapl verhindert den Prophase-Weg [56,143].

Fast alle Zentromer-gebundenen Cohesinkomplexe sowie einige wenige Komplexe im Bereich der Chromosomenarme sind allerdings vor der mitotischen Phosphorylierung geschützt und verbleiben dadurch bis zu Beginn der Anaphase auf den Chromatiden [139]. Das Shugoshin-Protein (Sgo1; japanisch für Wächter), das vor allem im Bereich der Zentromere konzentriert auftritt [144,145], rekrutiert die Phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A; [146,147]) und verhindert dadurch eine kontinuierliche Phosphorylierung von Scc1, Scc3 und Sororin.

In der Bäckerhefe sind die Komponenten des Releasinkomplexes, Pds5 und Wpl1, zwar vorhanden, eine Dissoziation von Cohesin vor dem Beginn der Anaphase findet allerdings nicht statt [148]. Es wird vermutet, dass der Prophase-Weg unter anderem für die Auftrennung der wesentlich größeren Chromosomen in höheren Eukaryoten notwendig wurde, in Organismen mit kleineren Chromosomen aber im Prinzip nicht benötigt wird [50].

Während des Übergangs von der Metaphase zur Anaphase findet dann eine proteolytische Spaltung von Scc1 statt. Die Proteolyse von Scc1 hat die unmittelbare Auflösung der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden zur Folge (Abb. 1.6, Mitte, und [148,149,150]). Die Proteolyse von Scc1 wird dabei durch die Aktivierung einer zuvor inaktiven Protease ermöglicht. Am Ende der Metaphase wird das Protein Securin durch die steigende Aktivität des APC/C-Komplexes polyubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Dadurch

wird die von Securin inaktiv gehaltene Protease Separase freigesetzt und kann das Scc1-Protein an zwei spezifischen Sequenzen im mittleren Teil des Proteins proteolytisch schneiden [148,151].

Während in höheren Eukaryoten der größte Teil des Cohesins bereits durch den Prophase-Weg von der DNS entfernt wurde, ist in der Bäckerhefe die proteolytische Spaltung von Scc1 der einzige Weg, die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden zu zerstören.

Die Acetylierung des Smc3-Proteins (Abschnitt 1.4.4) bleibt während der gesamten G<sub>2</sub>-Phase bestehen, Smc3 wird erst nach der Dissoziation von den Chromatiden deacetyliert [152,153,154]. Da lediglich deacetylierte Cohesinkomplexe in der nächsten Runde des Zellzyklus Kohäsion etablieren können [152,153,154] und da die Separase nur DNS-assoziiertes Cohesin schneiden kann [150], wird vermutet, dass in höheren Eukaryoten der Prophase-Weg nach der abgeschlossenen Zellteilung auch einen ausreichend großen Pool an intaktem Cohesin bereitstellt, der schon in der Telophase, also fast direkt nach der Trennung der Chromatiden, wieder auf die DNS geladen werden kann. Es wird postuliert, dass dies auch eine Rolle bei der Regulation der Genexpression und der Organisation von Heterochromatin spielt [30].

#### **1.4.6.1. Der Metaphase-Kontrollpunkt**

Der Metaphase-Kontrollpunkt, oft auch „Spindle Assembly Checkpoint“ (SAC) genannt, überwacht die korrekte Anheftung der einzelnen Kinetochore an die Mikrotubuli des Spindelapparats und kann, falls notwendig, den Beginn der Anaphase blockieren (für einen Überblick siehe [155,156]). Der fehlerfreie Aufbau des Spindelapparats ist für die Verteilung des genetischen Materials absolut notwendig [157,158,159,160]. Der Kontrollpunkt wurde ursprünglich in Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, die nach Zugabe von Spindelgiften keinen Zellzyklusarrest initiieren konnten [161,162].

Der Metaphase-Kontrollpunkt reagiert dabei auf nicht angeheftete Mikrotubuli [163,164] sowie auf fehlende Spannung zwischen den jeweiligen Schwesterchromatiden im Bereich der Kinetochore [165,166,167,168]. Es

wird postuliert, dass das Shugoshin-Protein, welches auch für den Schutz von Cohesin auf der DNS verantwortlich ist (Abschnitt 1.4.6), fehlende Spannung zwischen Schwesterkinetochoren an den Metaphase-Kontrollpunkt weiterleitet [12,169]. Shugoshin besitzt eine Mikrotubuli-Bindedomäne und ist im Bereich der Kinetochore auf der DNS lokalisiert [169]. Da Shugoshin ein Homodimer ausbilden kann, könnte die Zugspannung durch Monomere an benachbarten Kinetochoren wahrgenommen werden, während fehlende Spannung eine Dimerisierung von Shugoshin auslöst und damit den Kontrollpunkt aktiviert [147].

Die Komponenten des aktivierten Metaphase-Kontrollpunkts binden Cdc20 (Cell Division Cycle), einen Aktivator des APC/C-Komplexes, und verhindern so den Beginn der Anaphase [170,171,172,173]. Ohne APC/C-Aktivität werden Cyclin B und Securin nicht abgebaut, die Zelle wird dadurch in der Metaphase des Zellzyklus arretiert. Erst wenn alle Mikrotubuli korrekt an die Kinetochore angeheftet sind und jedes biorientierte Chromosom unter Spannung steht, wird der Kontrollpunkt deaktiviert [163,165]. Der Arrest der Zelle ist aufgehoben und die Anaphase kann eingeleitet werden.

### **1.5. Weitere Funktionen des Cohesinkomplexes**

In *S. cerevisiae* kann Scc1 auf 10% der ursprünglichen Menge reduziert werden, ohne dass dabei Kohäsionsdefekte entstehen. Allerdings verursacht diese Depletion von Cohesin Defekte bei der Reparatur von DNS-Schäden und der Kondensation der Chromosomen [174]. Auch in *Drosophila* führt eine 80%-ige Reduktion von Cohesin zu keinen erkennbaren Defekten bei der Schwesterchromatid-Kohäsion, die Regulation der Transkription wird jedoch dramatisch beeinflusst [175].

Beim Cornelia-de-Lange-Syndrom (Abschnitt 1.6), eine Erbkrankheit die häufig durch eine Loss-of-Function-Mutation im *NIPBL*-Gen (Nipped-B-like) verursacht wird, zeigen aus Patienten isolierte Zellen keine offensichtlichen Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion, wohl aber tiefgreifende Veränderungen der Genexpression sowie Beeinträchtigungen bei der Reparatur von DNS-Schäden [176,177,178]. Weitere Studien in *Drosophila*

und der Maus, in welchen verschiedene Untereinheiten von Cohesin oder Kollerin reduziert wurden, zeigen signifikante Auswirkungen auf die Genexpression und Entwicklung, nicht aber auf die Schwesterchromatid-Kohäsion [179,180,181,182,183,184]. Auch die Depletion von Cohesin in postreplikativen Zellen verursacht in Säugetieren [185] und in der Fruchtfliege [186] Änderungen der Genexpression.

Der Cohesinkomplex weist also neben seiner ursprünglich beschriebenen Funktion, der Schwesterchromatid-Kohäsion, noch weitere Rollen, z. B. bei der Reparatur von DNS-Schäden und bei der Regulation der Genexpression, auf.

Wie die Genexpression durch den Cohesinkomplex beeinflusst oder reguliert wird, ist bisher allerdings kaum verstanden. In der Fruchtfliege wurde gezeigt, dass der Cohesinkomplex die Transkription durch eine gesteigerte Enhancer/Promotor-Interaktion positiv beeinflusst [182]. In Mäusezellen wurde eine direkte Interaktion des Mediatorkomplexes mit Cohesin und eine Lokalisation von Cohesin sowohl an Enhancersequenzen als auch an Promotorsequenzen beobachtet [187]. Es ist bekannt, dass der Mediatorkomplex direkt an die RNS-Polymerase bindet und durch eine Schleifenbildung der DNS Enhancer und Promotor in räumliche Nähe bringen kann [188]. Der Cohesinkomplex könnte die Ausbildung dieser DNS-Schleifen ermöglichen oder stabilisieren und dadurch die Transkription positiv beeinflussen. Eine Schleifenbildung der DNS durch Cohesin wurde auch während der Replikation beobachtet [189].

In Vertebraten wurde eine Koloalisation sowie eine direkte und funktionelle Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor CTCF und Cohesin beobachtet [187,190,191]. CTCF kann die Transkription verschiedener Gene, abhängig vom genetischen Kontext, entweder reprimieren oder aktivieren [192]. Ähnlich wie bei der Mediator-vermittelten Transkriptionsaktivierung wird auch hier oft eine Schleifenbildung der DNS beobachtet, die durch Cohesin positiv beeinflusst wird [193,194]. In anderen Organismen wie z. B. der Fruchtfliege ist eine (funktionelle) Interaktion zwischen Cohesin und CTCF dagegen nicht vorhanden [195,196]. Auch für den Kollerinkomplex wurde eine Kontext-spezifische Rolle bei der Regulation der Genexpression beobachtet [197].

Aufgrund dieser Beobachtungen in verschiedenen Organismen wird angenommen, dass die Regulation durch Cohesin in den meisten Fällen Kontext- und Organismus-spezifisch ist und kein allgemeingültiges Prinzip vorliegt [57].

Es gibt zwei Hauptwege, DNS-Doppelstrangbrüche zu reparieren, den NHEJ-Weg (Non-homologous End joining) und homologe Rekombination.

Der NHEJ-Weg ist nicht auf homologe Chromatiden angewiesen und kann daher auch in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus stattfinden, in welchem noch keine homologen Chromatiden vorhanden sind [198]. Dabei werden Brüche in der DNS wieder zusammengefügt, was oft zu einem Verlust an genetischer Information führt.

Während der S- und G<sub>2</sub>-Phase existieren dagegen homologe Chromatiden, daher werden in den postreplikativen Phasen des Zellzyklus DNS-Doppelstrangbrüche hauptsächlich durch homologe Rekombination repariert [199]. Da die Schwesterchromatiden identische Erbinformationen codieren, ist die Reparatur durch homologe Rekombination wesentlich genauer und führt im Allgemeinen nicht zum Verlust von genetischer Information [200]. Die Reparatur durch homologe Rekombination benötigt die räumliche Nähe der Schwesterchromatiden, daher wird eine Beteiligung von Cohesin postuliert [201]. Übereinstimmend damit ermöglichen DNS-Doppelstrangbrüche die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion außerhalb der S-Phase [120]. Weitere Studien in Zelllinien von Vertebraten weisen ebenfalls auf eine Funktion von Cohesin während dieser Art der Reparatur hin [202,203].

Cohesin ist auch bei der Bildung von Heterochromatin beteiligt [57]. In *Saccharomyces pombe* wurde eine Interaktion von Cohesin mit Swi6 (Switching deficient), dem HP1-Homolog (Heterochromatin Protein), berichtet. Swi6 ist für die perizentrische Lokalisation des Cohesinkomplexes notwendig [204,205]. In höheren Eukaryoten scheinen Heterochromatin-Bindeproteine für die Lokalisation von Cohesin allerdings nicht notwendig zu sein [206,207], in *S. cerevisiae* existiert kein zu Swi6 homologes Protein.

Die Beobachtung, dass eine leichte Beeinträchtigung der Funktion des Cohesinkomplexes in unterschiedlichen Organismen die Kohäsion der Schwesterchromatiden nicht beeinflusst, wohl aber Auswirkungen auf andere Abläufe in der Zelle wie etwa die Transkription zeigt, sowie die unterschiedlichen Arten der Regulation der Genexpression durch Cohesin lassen vermuten, dass die ursprünglichste und robusteste Funktion des Komplexes die Schwesterchromatid-Kohäsion ist. Andere Funktionen wie die Regulation der Genexpression könnten sich mit steigender Komplexität der Organismen teilweise Kontext-spezifisch entwickelt haben [57].

### **1.6. Cohesinopathien**

Mutationen in Komponenten des Cohesinkomplexes selbst oder in Proteinen, die an der Schwesterchromatid-Kohäsion beteiligt sind, sind auch die Ursache verschiedener menschlicher Erbkrankheiten. Diese werden daher auch als Cohesinopathien bezeichnet [143,208,209].

Das Cornelia-de-Lange-Syndrom (CdL-Syndrom) zeichnet sich durch schwere Wachstumsdefekte, zahlreiche Entwicklungsfehler und Schwachsinn aus. Etwa die Hälfte aller Fälle weist eine Loss-of-Function-Mutation im *NIPBL*-Gen auf, dem menschlichen *Scs2*-Ortholog [210,211,212], in wenigen Fällen wurden Mutationen in *Smc1* oder *Smc3* berichtet [213,214]. Die Schwesterchromatid-Kohäsion selbst scheint bei den Patienten allerdings größtenteils fehlerfrei zu funktionieren, die Symptome werden wahrscheinlich durch Defekte bei der Genexpression und der DNS-Reparatur verursacht [176,177,178].

Das Roberts-Syndrom ist eine sehr seltene Krankheit, weltweit wurden bisher weniger als 200 Fälle beschrieben. Auch das Roberts-Syndrom ist durch starke Entwicklungsstörungen gekennzeichnet, die meisten Patienten sterben schon bald nach der Geburt. Die Krankheit wird mit einer Mutation im *Esco2*-Gen in Verbindung gebracht, hier wurden im Gegensatz zum CdL-Syndrom auch Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion beschrieben [215,216]. Die Defekte der Kohäsion könnten daher den im Vergleich zum Cornelia-de-Lange-Syndrom sehr schweren Verlauf dieser Krankheit erklären.

Kohäsionsdefekte werden auch als Ursache häufig auftretender Trisomien wie etwa der Trisomie 21 diskutiert [217]. Andere Trisomien treten wahrscheinlich mit gleicher Häufigkeit auf, aber außer den schweren Trisomien 13 und 18 sind diese bereits während der Embryogenese letal. Mit zunehmendem Alter werden in den Eizellen frühzeitige Trennungen von Schwesterchromatiden und ungepaarte Chromatiden häufiger beobachtet, ein möglicher Hinweis auf Fehlfunktionen des Cohesinkomplexes [218]. Konsistent mit dieser Vermutung zeigen Mäuse, in denen das Meiose-spezifische *Smc1 $\beta$* -Gen mutiert ist, in den Eizellen ähnliche Defekte auf [219]. Es ist umstritten, ob die Schwesterchromatid-Kohäsion in menschlichen Eizellen, die oft mehrere Dekaden anhalten muss, auf eine *de novo*-Etablierung der Kohäsion angewiesen ist, ob die DNS fortwährend mit Cohesin beladen/entladen wird oder ob die kohäsiven Komplexe, einmal in der S-Phase etabliert, die Schwesterchromatiden Jahre oder gar Jahrzehnte zusammenhalten können [143].

### 1.7. Ziel dieser Arbeit

*PDS5* und *SCC3* wurden beide als Genprodukte identifiziert, die für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenziell sind. Es wurde postuliert, dass die Acetylierung von Smc3 während der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion die stabilisierende Wirkung von Pds5 und Scc3 (transient) aufheben kann und dadurch zwei Chromatinfasern im Inneren des Cohesinrings eingeschlossen werden können. Die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion ist auf molekularer Ebene bisher nicht verstanden.

Auf der anderen Seite sind Pds5 und Scc3 auch bei der Dissoziation des Cohesinkomplexes von der DNS beteiligt. In Säugetieren führt die Phosphorylierung von Scc3/SA während der Mitose zur Dissoziation eines Großteils des DNS-gebundenen Cohesins. Pds5 bildet mit Wapl den Releasinkomplex und kann während des gesamten Zellzyklus Cohesin von der DNS entfernen.

Pds5 und Scc3 scheinen also sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Funktionen während der Schwesterchromatid-Kohäsion auszuüben. Dieser Widerspruch ist bisher nicht verstanden.

In dieser Arbeit wurde durch die Depletion von Pds5 und Scc3 *in vivo* untersucht, ob diese Proteine für die stabile Assoziation von Cohesin mit der DNS und damit für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion benötigt werden. Es zeigte sich, dass weder Pds5 noch Scc3 für die stabile DNS-Assoziation von Cohesin notwendig sind, wenige Moleküle dieser Proteine reichen für die Lebensfähigkeit der Zelle aus. Es ist daher wahrscheinlich, dass die beiden Proteine nicht für die Aufrechterhaltung der Kohäsion verantwortlich sind.

Die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion erfolgt in einem ungestörten Zellzyklus während der Replikation der DNS. Durch die Acetylierung des Smc3-Proteins durch die Acetyltransferase Eco1 wird der Zusammenhalt von zwei Schwesterchromatiden durch den Cohesinkomplex ermöglicht. Der molekulare Ablauf der Etablierung ist bisher allerdings nicht verstanden. Es wurde gezeigt, dass Eco1 mit PCNA, dem Prozessivitätsfaktor der DNS-Replikation, interagiert. Die Interaktion erfolgt über ein konserviertes PCNA-Bindemotiv des Eco1-Proteins. Auch andere Replikationsfaktoren spielen eine Rolle bei der Etablierung der Kohäsion, die Etablierung scheint also eng mit der DNS-Replikation verknüpft zu sein. Eco1 ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert, strukturelle Informationen sind bisher aber nicht vorhanden.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Struktur des Eco1-Proteins zu lösen und so den Prozess der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion genauer verstehen zu können. Leider war es nicht möglich, eine Kristallstruktur des kompletten Eco1-Proteins zu erlangen. Mit Hilfe eines Peptids, welches den Teil des Eco1-Proteins enthält, der für die Bindung an PCNA verantwortlich ist, war es allerdings möglich, die Interaktion von Eco1 und PCNA auf struktureller Ebene zu visualisieren. Durch den Vergleich mit anderen PCNA-Bindeproteinen konnte die starke strukturelle Konservierung der Eco1/PCNA-Interaktion demonstriert werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Eigenanteil und gemeinschaftliche Veröffentlichungen

Ein wesentlicher Anteil der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente (Abschnitt 2.2 und 2.3) wurde als Teil der folgenden Publikation veröffentlicht:

*“Cohesin Rings Devoid of Scc3 and Pds5 Maintain Their Stable Association with the DNA.”*

Irina Kulemzina, **Martin R. Schumacher**, Vikash Verma, Jochen Reiter, Janina Metzler, Antonio Virgillio Failla, Christa Lanz, Vipin T. Sreedharan, Gunnar Rättsch und Dmitri Ivanov (PLoS Genetics, August 2012)

Ich war maßgeblich an der Planung der Experimente, den Diskussionen über den Themenbereich der Schwesterchromatid-Kohäsion und der Erstellung der Abbildungen für das Manuskript beteiligt.

Viele der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme waren bereits zu Beginn dieser Arbeit vorhanden oder wurden im Labor von Dr. Dmitri Ivanov angefertigt und freundlicherweise bereitgestellt. Eine Auflistung der verwendeten Stämme sowie deren Ursprung ist in Kapitel 4.1.4 zu finden. Die Aufreinigung von rekombinantem Pds5 und Smc3 (Coiled-Coil-Bereich), welche beide für die Glycerol-Dichtegradienten-Experimente in Kapitel 2.2 verwendet wurden, wurde von Vikash Verma durchgeführt. Drei der dort gezeigten Gradienten (Pds5, Pds5/Scc3 und Pds5/Scc3/Wpl1) wurden ebenfalls von Vikash Verma angefertigt. Alle anderen Experimente in den Kapiteln 2.2 und 2.3 wurden von mir selbst durchgeführt.

Der Verlauf des in Kapitel 2.4 beschriebenen Projekts wurde durch zahlreiche Diskussionen mit Prof. Dr. Andrei Lupas, Dr. Kornelius Zeth, Dr. Jörg Martin und Dr. Dmitri Ivanov entscheidend geprägt. Das Alignment der verschiedenen Eco1-Sequenzen sowie die Planung der Eco1-Fusionskonstrukte fand mit Unterstützung von Prof. Dr. Andrei Lupas statt. Die Kristallisationsversuche wurden von Dr. Reinhard Albrecht und Kerstin

Bär aufgetragen, die Messungen der Kristalle wurden von Marcus Hartmann, Dr. Reinhard Albrecht und Dr. Kornelius Zeth durchgeführt. Die Strukturaufklärung wurde durch die freundliche Hilfe von Marcus Hartmann und Dr. Kornelius Zeth ermöglicht. Alle anderen Experimente wurden von mir persönlich angefertigt.

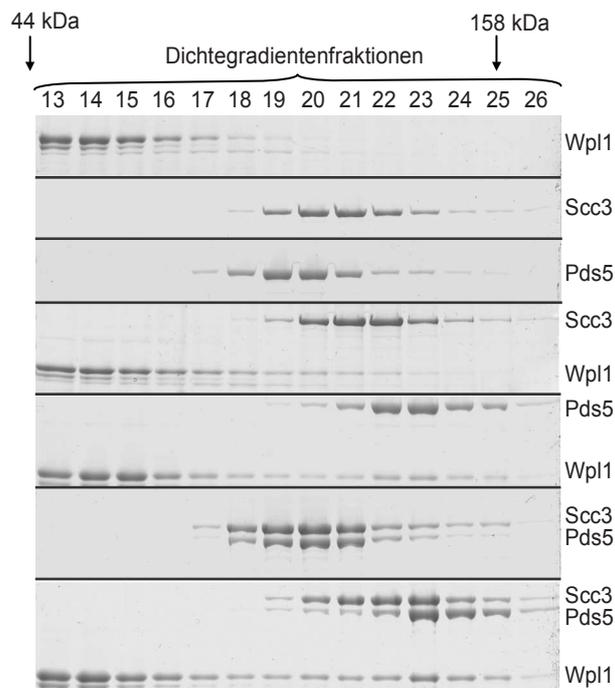
## **2.2. *In vitro*-Interaktionsstudien der Cohesin-assoziierten Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 mit Cohesin**

Die genaue Anordnung der Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 als Teil des Cohesinkomplexes ist bisher nur unvollständig verstanden (Abschnitt 1.4.1). In der Bäckerhefe wurde die Bindung von Scc3 an den C-Terminus von Scc1 [32] nachgewiesen, für die Interaktion des humanen Scc3-Proteins ist hingegen der mittlere Teil des Scc1-Proteins verantwortlich [56]. Das humane Pds5-Protein bindet ebenfalls an den mittleren Bereich von Scc1 [55,56]. Wapl bildet in Vertebraten einen ternären Komplex mit Scc1 und Scc3 aus [54], ein weiterer Subkomplex, Pds5/Wapl, bindet nur sehr schwach an Cohesin [55]. Für diese Interaktionen sind konservierte FGF-Motive im N-terminalen Bereich des Wapl-Proteins notwendig und ausreichend [56]. In der Bäckerhefe ist die Bindung von Pds5 an Cohesin salzsensitiv [46], zudem wurde *in vivo* eine Lokalisation an der Dimerisierungsdomäne der beiden Smc-Proteine beobachtet [220]. Im Verlauf dieser Arbeit wurde im Labor von Dr. Kim Nasmyth zudem ein ternärer Komplex der *S. cerevisiae*-Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 berichtet [68].

Der mittlere Bereich des Scc1-Proteins [42] sowie der N-terminale Teil von Wapl [56] ist nur innerhalb höherer Vertebraten konserviert, nicht jedoch in niederen Eukaryoten wie der Bäckerhefe. Es ist daher unklar, wie die Cohesin-assoziierten Proteine in *S. cerevisiae* interagieren.

Um daher die Interaktionen der Proteine untereinander genauer zu untersuchen und um mögliche weitere Interaktionen von Pds5, Scc3 und Wpl1 aus der Bäckerhefe mit Cohesin zu entdecken, wurden rekombinante, aus *E. coli* aufgereinigte Proteine verwendet. Die Interaktionsstudien wurden mit Hilfe eines Glycerol-Dichtegradienten durchgeführt. Bei dieser Methode

wandern die Proteine entsprechend ihrer Größe und Form unterschiedlich schnell durch einen Dichtegradienten. Ein Proteinkomplex wandert aufgrund seiner Größe daher schneller durch den Gradienten als die einzelnen Untereinheiten des Komplexes für sich alleine. Sehr große Partikel wie z. B. Proteinaggregate setzen sich sehr schnell am Boden des Gradienten ab.



**Abb. 2.1: Pds5, Scc3 und Wpl1 formen einen ternären Komplex *in vitro*.**

Rekombinant aus *E. coli* aufgereinigte Pds5-, Scc3- und Wpl1-Proteine wurden in den angezeigten Ansätzen für eine Stunde inkubiert und anschließend auf einen 10-30%-igen Glycerol-Dichtegradienten geladen. Als Kontrollen wurden die Proteine jeweils alleine auf den Gradienten geladen. Der Gradient wurde für 38 h bei 38.000 Upm zentrifugiert, anschließend wurden Fraktionen zu je 400 µl geerntet. Die Fraktionen wurden aufkonzentriert und auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die Positionen eines 44 kDa- und eines 158 kDa-Gradientenmarkers sind über den Fraktionen angezeigt.

Pds5 und Wpl1 sowie Scc3 und Wpl1 bilden stabile Subkomplexe, ein Pds5/Scc3-Komplex ist nicht vorhanden. Ein ternärer Pds5/Scc3/Wpl1-Komplex kann ebenfalls beobachtet werden, dieser wandert aufgrund möglicher Instabilität oder ungewöhnlicher Form aber langsamer als erwartet durch den Gradienten.

Für Pds5 und Wpl1 kann in Übereinstimmung mit der oben erwähnten Studie im Labor von Dr. Kim Nasmyth [68] ein stabiler Komplex beobachtet werden (Abb. 2.1, Reihe 5). Eine Interaktion zwischen Scc3 und Wpl1 ist ebenfalls

vorhanden (Abb. 2.1, Reihe 4). Im Vergleich zum Pds5/Wpl1-Subkomplex ist in den Fraktionen des Scc3/Wpl1-Komplexes weniger Wpl1-Protein vorhanden, zudem ist der Shift des Scc3-Proteins weniger dominant. Eine Interaktion zwischen den Proteinen Pds5 und Scc3 wurde nicht gefunden (Abb. 2.1, Reihe 6).

Pds5, Scc3 und Wpl1 zusammen resultieren in einem stärker ausgeprägten Shift nach rechts (Abb. 2.1, Reihe 7), die drei Proteine bilden einen ternären Komplex aus. Der im Vergleich zur Größe des Komplexes geringe Shift der beiden großen Proteine Pds5 und Scc3 lässt allerdings auf einen instabilen Komplex schließen, der wahrscheinlich mit hoher Dissoziationsrate in die beiden möglichen Subkomplexe Pds5/Wpl1 und Scc3/Wpl1 zerfällt. Alternativ kann das ungewöhnliche Laufverhalten des Komplexes auch auf einen sehr langgezogenen Komplex zurückzuführen sein.

Für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion ist die Acetylierung der ATPase-Domäne des Smc3-Proteins durch Eco1 notwendig (Abschnitt 1.4.4). Dabei werden zwei benachbarte, hoch konservierte Lysinreste acetyliert, die in der Bäckerhefe den Aminosäuren Lys112 und Lys113 [67,68,69] entsprechen. Eine K112,113N-Mutation im Smc3-Protein, welche allgemein als Acetylierungs-vortäuschende Mutation gilt [67,69], sowie spezifische Mutationen in *PDS5*, *SCC3* und *WPL1* [68] heben die Notwendigkeit der Acetylierung auf. Es wurde daher postuliert, dass Pds5, Scc3 und Wpl1 im Bereich der ATPase-Domäne von Smc3 eine der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion gegensätzliche Funktion ausüben (Abschnitt 1.4.4 und [68]). Es ist unklar, ob diese gegensätzliche Funktion durch direkte Protein-Protein-Interaktion verursacht wird. Daher wurden potentielle Interaktionen mit der ATPase-Domäne des Smc3-Proteins mit Hilfe eines Glycerol-Dichtegradienten untersucht. Pds5, Scc3 und Wpl1 bilden weder alleine noch in Kombination (Pds5/Wpl1, Scc3/Wpl1 oder Pds5/Scc3/Wpl1) einen Komplex mit Smc3 oder mit der Acetylierungs-vortäuschenden (K112,113N) Variante von Smc3 (Daten nicht gezeigt).

Während der C-terminale Bereich des Wapl-Proteins in allen Eukaryoten konserviert ist, ist der N-terminale Teil mit den FGF-Motiven, welcher in

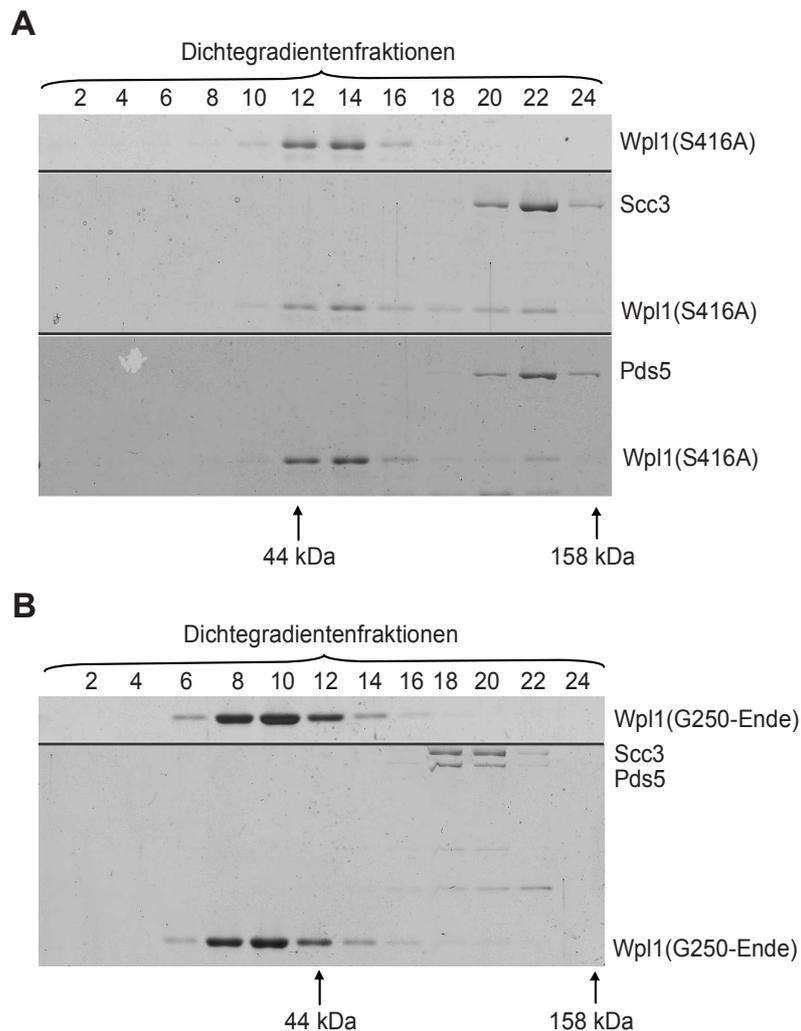
Vertebraten für die Bindung an Pds5 und Scc3 notwendig ist, nur in höheren Eukaryoten vorhanden. Das homologe Wpl1-Protein aus der Bäckerhefe ist wesentlich kürzer [55,56]. Trotzdem bindet das Wpl1-Protein an Pds5 und Scc3 (Abb. 2.1 und [68]). Die Mutationen im Wpl1-Protein, die die Deletion des *ECO1*-Gens *in vivo* erlauben, sind allesamt im konservierten C-terminalen Teil des Proteins lokalisiert [68].

Um zu untersuchen, ob diese Mutationen *in vitro* Auswirkungen auf die Interaktion mit Pds5 und/oder Scc3 haben, wurde eine der beschriebenen Mutationen, S416A, in das rekombinante Wpl1-Protein eingeführt. Die Bindung an Pds5 und Scc3 wurde erneut mit Hilfe eines Glycerol-Dichtegradienten untersucht (Abb. 2.2A). Ein Scc3/Wpl1-Komplex wird auch mit der S416A Variante von Wpl1 ausgebildet, das Gleiche gilt für Pds5/Wpl1(S416A). Der Pds5/Wpl1(S416A)-Komplex scheint im Vergleich zum Wildtypkomplex (Abb. 2.1) allerdings weniger stark ausgeprägt zu sein. Um herauszufinden, ob genau wie bei Vertebraten der N-terminale Teil des Wpl1-Proteins für die Interaktion mit Pds5 und Scc3 verantwortlich ist, wurde eine N-terminal verkürzte Version des Wpl1-Proteins (G250-Ende) kloniert und aufgereinigt. Das rekombinante Protein war löslich, die Faltung wurde mit Hilfe eines CD-Spektrums überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Interaktion mit Pds5 und Scc3 untersucht. Weder Pds5 noch Scc3 binden an den C-Terminus des Wpl1-Proteins (Abb. 2.2B).

Die  $\Delta eco1$ -Suppressormutation in Wpl1 beeinflusst die Bindung an Pds5 und Scc3 *in vitro* also nicht. Der C-Terminus von Wpl1 alleine zeigt keine Interaktion mit Pds5 oder Scc3, genau wie in höheren Eukaryoten ist hierfür der N-terminale Teil des Proteins notwendig, auch wenn die konservierten FGF-Motive hier nicht vorhanden sind.

Potentielle Interaktionen von Pds5, Scc3 oder Wpl1 mit der Acetyltransferase Eco1, der ATPase-Domäne von Smc1, der Coiled-Coil-Domäne von Smc3 sowie der Dimerisierungsdomäne von Smc1/Smc3 wurden ebenfalls mit Hilfe von Glycerol-Dichtegradienten untersucht. Es wurden in allen möglichen Kombinationen keine weiteren, bisher unbekanntenen Interaktionen entdeckt (Daten nicht gezeigt). Mögliche Interaktionen mit Scc1 konnten mit dieser

Methode nicht untersucht werden, da das Scc1-Protein in *E. coli* nicht löslich exprimiert werden konnte (siehe auch Abschnitt 3.1).



**Abb. 2.2: Wpl1(S416A) bildet Subkomplexe mit Pds5 und Scc3, für die Interaktion des Wpl1-Proteins mit Pds5 und Scc3 ist der N-Terminus notwendig.**

(A) Rekombinant aus *E. coli* aufgereinigtes Wpl1(S416A)-Protein wurde alleine oder als Pds5/Wpl1(S416A)- bzw. Scc3/Wpl1(S416A)-Mischung auf einen Dichtegradienten geladen. Nach 38 h Zentrifugation wurden Fraktionen zu je 400  $\mu$ l geerntet und mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels analysiert. Die Positionen eines 44 kDa- und eines 158 kDa-Gradientenmarkers sind über den Fraktionen angezeigt. (B) Eine N-terminal verkürzte Version des Wpl1-Proteins (G250-Ende) wurde alleine oder mit Pds5 und Scc3 auf einen Dichtegradienten geladen und analysiert.

Die mutierte Form des Wpl1-Proteins, Wpl1(S416A), interagiert weiterhin sowohl mit Pds5 als auch mit Scc3. Für diese Interaktion ist der N-Terminus des Proteins notwendig, da das N-terminal verkürzte Wpl1-Protein (G250-Ende) die Bindungsfähigkeit an Pds5 und Scc3 verliert.

### 2.3. Die Rolle der Cohesin-assoziierten Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 bei der Schwesterchromatid-Kohäsion

Die Funktion der Cohesin-assoziierten Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 im Kontext der Schwesterchromatid-Kohäsion ist bisher nur unzureichend verstanden.

*PDS5* [51,52] und *SCC3* [53] wurden in *Saccharomyces cerevisiae* als Gene beschrieben, welche für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenziell sind, da temperatursensitive Mutanten schwere Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion aufwiesen. Neuere Studien weisen zudem darauf hin, dass beide Proteine auch an der Dissoziation des Cohesinkomplexes von der DNS beteiligt sind. In Vertebraten bildet Pds5 einen stabilen Subkomplex mit Wapl, Releasin genannt [30,54,55]. Die Assoziation von Cohesin mit der DNS steht wahrscheinlich in einem stabilen Gleichgewicht [66,134,221]. Während der Kollerinkomplex die DNS mit Cohesin belädt [30,94], ist Wapl als Teil des Releasinkomplexes für die Dissoziation des DNS-gebundenen Cohesins verantwortlich [54,55,66]. Scc3 ist ebenfalls an der Destabilisierung der DNS-Bindung von Cohesin beteiligt. Die Phosphorylierung von Scc3/SA während der Mitose in Säugetieren führt zu einer Wapl-abhängigen Dissoziation eines Großteils der DNS-gebundenen Cohesinkomplexe, dem Prophase-Weg [58,139,143]. In der Bäckerhefe existiert dieser Weg nicht.

Wapl ist als Teil des Releasinkomplexes [30,54,55,66] sowie als Komponente des Prophase-Wegs [143] ebenfalls an der Destabilisierung der DNS-Bindung beteiligt. Daneben gibt es widersprüchliche Studien in der Bäckerhefe, in welchen in *wpl1*-Mutanten mehr bzw. weniger Cohesin auf der DNS vorgefunden wurde [67,68].

Pds5, Scc3 und Wpl1 scheinen also alle sowohl eine Rolle bei der Stabilisierung wie auch bei der Destabilisierung der Assoziation des Cohesinkomplexes mit den Chromosomen zu besitzen. Während Wapl in allen bisher untersuchten Organismen eine wichtige Rolle bei der Dissoziation des Cohesinkomplexes von der DNS ausübt, sind die genaue(n) Funktion(en) von Pds5 und Scc3 bisher nicht verstanden.

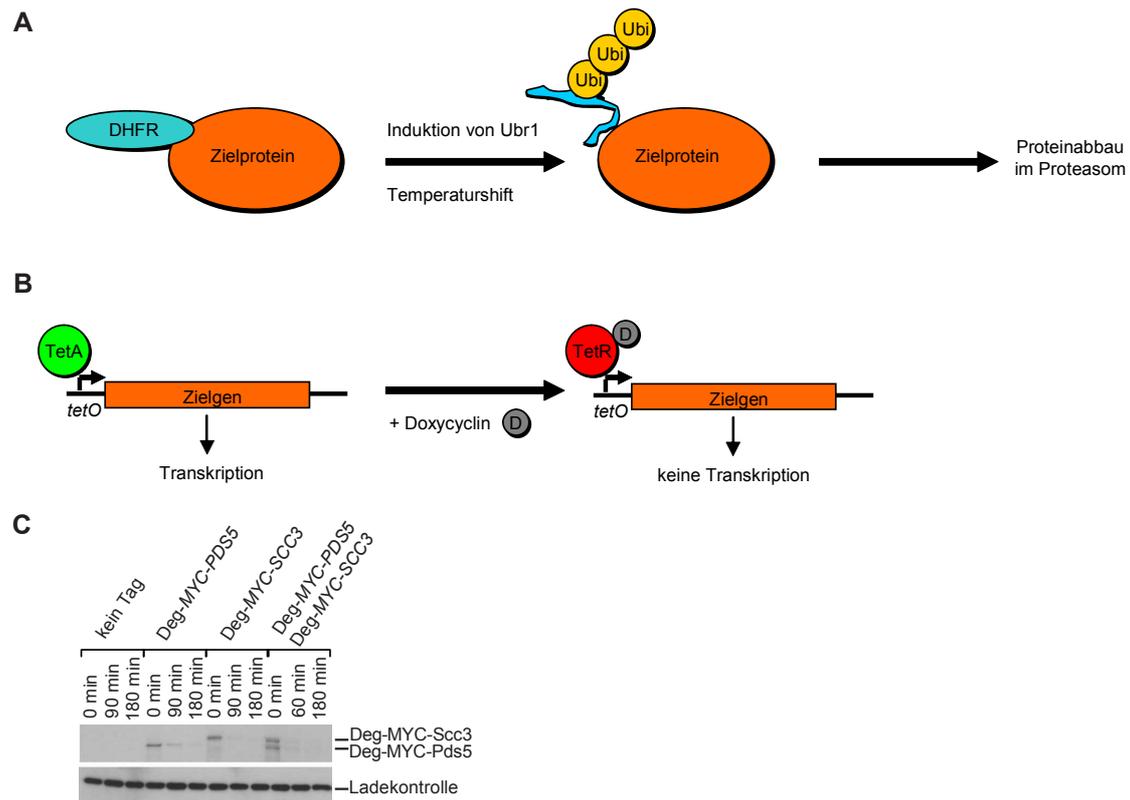
### **2.3.1. Zellzyklusphasen-spezifische Depletion der Proteine Pds5 und Scc3 *in vivo***

Die DNS wird bereits vor der Replikation mit dem Cohesinkomplex beladen (Abschnitt 1.4.3 und [33,39,93,94]), die Kohäsion zwischen den entstehenden Chromatiden wird während der S-Phase etabliert (Abschnitt 1.4.4 und [53,118]). Wenn Pds5 und/oder Scc3 wichtige Funktionen bei der Stabilisierung der DNS-Bindung des Cohesinkomplexes nach der Etablierung der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden ausüben, so sollte eine Depletion dieser Proteine nach dem Abschluss der S-Phase zu einer Reduktion an DNS-gebundenem Cohesin führen.

Für die spezifische Depletion von Pds5 und Scc3 *in vivo* wurde ein Temperatur-induzierbares Degronsystem genutzt (Abb. 2.3). Als Degron wurde eine mutierte Form der Dihydrofolatreduktase (DHFR) verwendet, die bei 24°C stabil vorliegt, sich bei 37°C jedoch entfaltet [222,223]. Das DHFR-Degron liegt N-terminal an die Zielproteine (Pds5 und Scc3) fusioniert vor [129]. Durch einen Temperaturshift auf 37°C wird das Degron von der Ubiquitinierungs-Maschinerie der Zelle als Substrat erkannt und polyubiquitiniert. Das polyubiquitinierte DHFR-Fusionsprotein wird dann ins Proteasom transportiert und abgebaut. Um eine vollständige Ubiquitinierung zu gewährleisten, steht das für das Ubiquitinbindeprotein codierende Gen *UBR1* zusätzlich unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors *GAL1* (Abb. 2.3A).

Für eine effiziente Depletion wird das für das Degron-Fusionsprotein codierende Gen zusätzlich durch einen *tetO*-Operator reguliert [224]. Im Normalfall aktiviert der Transaktivator TetA den *tetO*-Promotor und die Transkription kann stattfinden. Wird jedoch Doxycyclin zugegeben, verdrängt der Repressor TetR den Transaktivator und inhibiert die Transkription (Abb. 2.3B).

Durch den induzierten posttranslationalen Abbau des Degron-Fusionsproteins in Kombination mit der Hemmung der Neusynthese des Fusionsproteins wird eine starke Depletion von Pds5, Scc3 sowie beiden Proteinen zugleich in der Zelle erreicht (Abb. 2.3C).

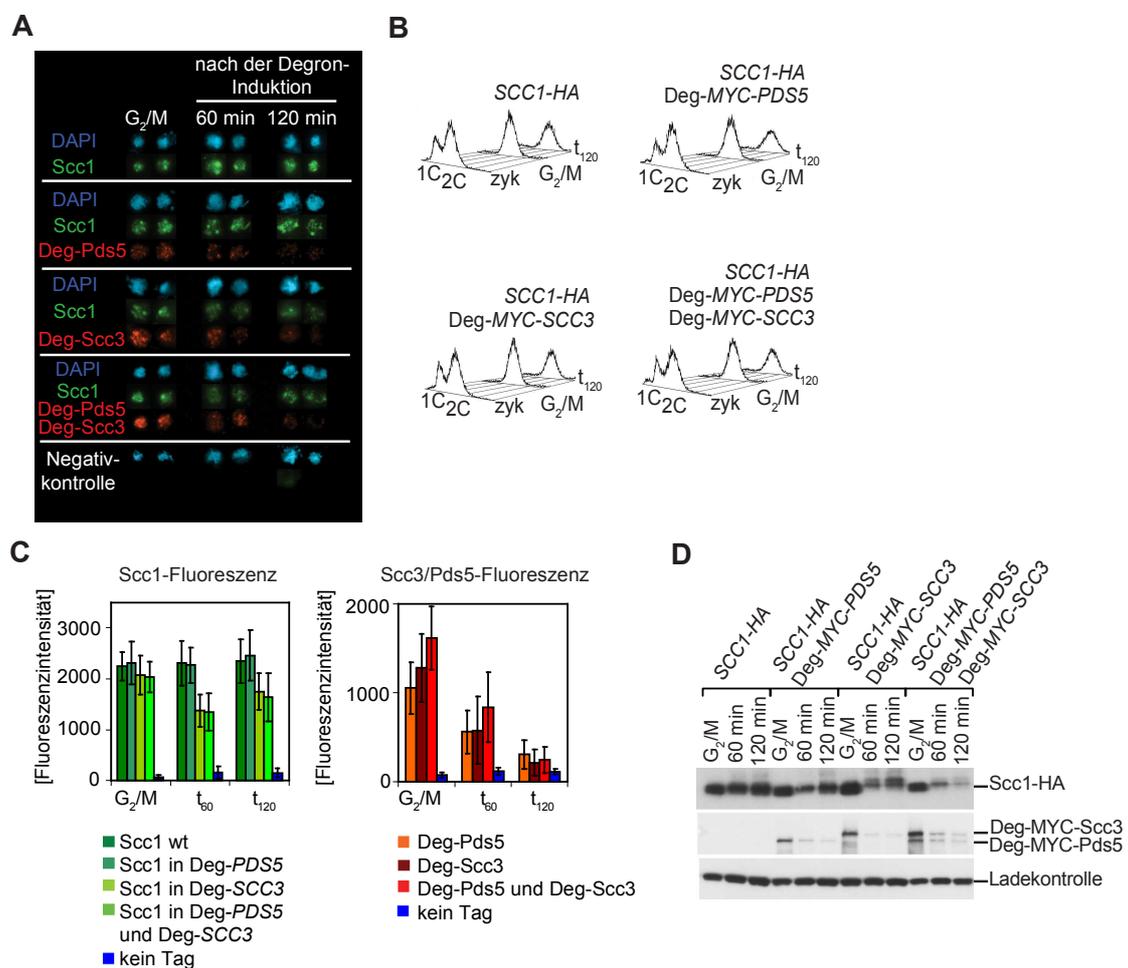


**Abb. 2.3: Das Temperatur-induzierbare DHFR-Degron erlaubt eine gezielte Depletion der Zielproteine.**

(A) Eine mutierte Form der Dihydrofolatreduktase (DHFR) wurde als Degron verwendet. Der Abbau des Zielproteins wird durch die N-terminale Fusion des DHFR-Degrone an das zu depletierende Protein erreicht. Durch einen Temperaturshift auf 37°C entfaltet sich das Degron, wird polyubiquitiniert, ins Proteasom transportiert und anschließend abgebaut. Um eine effiziente Ubiquitinierung zu gewährleisten, steht das Ubiquitinbindeprotein Ubr1 unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors *GAL1*. (B) Zusätzlich wird die Expression des Degron-Fusionsproteins durch den *tetO*-Promotor kontrolliert, um auch die Transkription gezielt unterbinden zu können. Ohne Doxycyclin bindet der Transaktivator TetA an den Operator und die Transkription findet statt. Bei Zugabe von Doxycyclin kann der an Doxycyclin gebundene Repressor TetR den Transaktivator verdrängen und die Transkription wird inhibiert. (C) Die Depletion der DHFR-Fusionsproteine wurde mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse untersucht. Hefestämme, die entweder Pds5 und/oder Scc3 als Degron-Fusionsprotein(e) exprimieren, wurden angezogen und in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert (t<sub>0</sub>). Die Depletion der Proteine wurde induziert, anschließend wurden die Zellen bei 37°C für 3 h in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten (t<sub>60</sub> und t<sub>180</sub>) wurden Proben entnommen und für eine Western-Blot-Analyse prozessiert. Die Degron-Fusionsproteine wurden mit einem α-MYC-Antikörper nachgewiesen, als Ladekontrolle diente ein α-Cdc28-Antikörper.

Durch den posttranslationalen Abbau und die gleichzeitig stattfindende Inhibition der Transkription wurde eine effiziente Depletion von Pds5 und Scc3 in der Zelle erreicht.

Mit Hilfe der gezielten Depletion von Pds5 und/oder Scc3 wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Rolle dieser Proteine bei der Stabilisierung der DNS-Bindung von Cohesin nach dem Ende der S-Phase zu untersuchen. Dafür wurden Hefestämme verwendet, die neben den entsprechenden Degron-Fusionsproteinen das  $\alpha$ -Kleisin Scc1 als HA-getaggte Variante exprimieren. Die Zellen wurden angezogen, in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert und anschließend in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen. Dann wurde der Abbau der Degron-Fusionsproteine induziert. Wenn Pds5 oder Scc3 für die Stabilisierung der DNS-Bindung notwendig sind, so sollte die Depletion dieser Proteine zu einer Reduktion von Cohesin auf den Chromosomen führen. Dies wurde mit Hilfe von Chromosomenspreizungen [33] untersucht (Abb. 2.4).



**Abb. 2.4: Die Auswirkungen der Depletion von Pds5 und Scc3 in der G<sub>2</sub>/M-Phase auf den DNS-gebundenen Cohesinkomplex.**

(A) Hefestämme, die Scc1 als HA-getaggte Variante und Pds5, Scc3 oder beide Proteine zugleich als MYC-getaggte Degron-Fusionsprotein(e) exprimieren, wurden angezogen, in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert und für 2 h in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen. Dann wurde das →

In der G<sub>2</sub>/M-Phase ist Scc1 in Übereinstimmung mit früheren Publikationen [33] auf der DNS vorhanden. Die Zerstörung von Pds5 führt zu einer sehr leichten, die von Scc3 zu einer deutlichen Reduktion von Scc1 auf den Chromosomen. Die gleichzeitige Depletion von Pds5 und Scc3 zeigt keine zusätzlichen Auswirkungen (Abb. 2.4A und C). Um auszuschließen, dass die induzierte Depletion von Pds5 und/oder Scc3 auch zu einer Reduktion des zellulären Levels an Scc1 führt, wurden Zelllysate der einzelnen Hefestämme zu den angegebenen Zeitpunkten durch eine Western-Blot-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass die gezielte Zerstörung von Pds5 zu einer leichten Reduktion von Scc1 in der Zelle führt, die Depletion von Scc3 sogar zu einer ausgeprägten Reduktion (Abb. 2.4D).

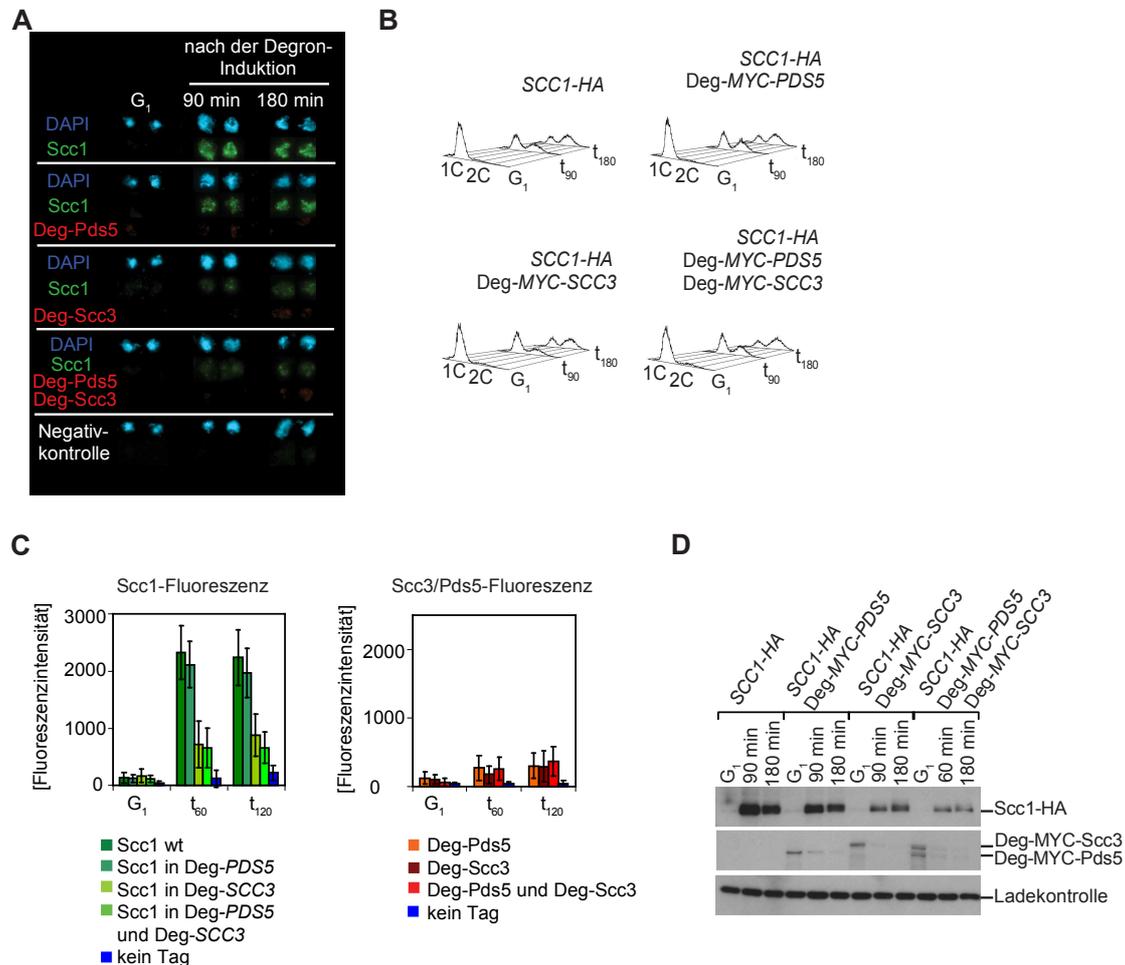
Der induzierte Abbau von Pds5 und Scc3 führt also auch zu einer Instabilität des mit den beiden Proteinen assoziierten  $\alpha$ -Kleisins Scc1. Daher kann mit diesem Experiment nicht beantwortet werden, ob die Reduktion von Scc1 durch ein Fehlen der Funktion(en) von Pds5 und/oder Scc3 verursacht wird.

**Abb. 2.4 (fortführend):**

Degron induziert ( $t_0$ ), der G<sub>2</sub>/M-Arrest wurde dabei aufrechterhalten ( $t_{60}$  und  $t_{120}$ ). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und Chromosomenspreizungen durchgeführt, um die getaggten Proteine auf den Chromosomen durch Immunofluoreszenz visualisieren zu können. Die DNS wurde mit DAPI angefärbt. Hefestämme mit Wildtypvarianten von *PDS5* oder *SCC3*, die zusätzlich Scc1-HA exprimieren und der Wildtypstamm wurden als Kontrollen verwendet. **(B)** Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Zellzyklusstatus während des Experiments überwacht. **(C)** Die Fluoreszenzintensität für Scc1, Pds5 und/oder Scc3 wurde pro Stamm und Zeitpunkt für je 100 Zellen quantifiziert. **(D)** Um die Gesamtmenge der Proteine in der Zelle zu untersuchen, wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen, lysiert und anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Ein  $\alpha$ -HA-Antikörper diente zur Detektion von Scc1, ein  $\alpha$ -MYC-Antikörper für die Detektion von Degron-Pds5 und Degron-Scc3. Als Ladekontrolle wurde ein  $\alpha$ -Cdc28-Antikörper verwendet.

Die Depletion von Pds5 und Scc3 in der G<sub>2</sub>/M-Phase führt zusätzlich auch zu einer Reduktion des Scc1-Proteins in der Zelle. Es ist daher wahrscheinlich, dass die beobachtete Reduktion von Scc1 auf der DNS durch die als Nebeneffekt auftretende Reduktion des Proteins selbst und nicht durch einen Verlust der Funktion(en) von Pds5 und Scc3 per se verursacht wird.

Die Induktion der Depletion der DHFR-fusionierten Pds5- und Scc3-Proteine bereits in der G<sub>1</sub>-Phase, d. h. bevor die DNS mit Cohesin beladen wird, führte ebenfalls zu einer begleitenden Reduktion des zellulären Gesamtlevels von Scc1 (Abb. 2.5).



**Abb. 2.5: Die Auswirkungen der Depletion von Pds5 und Scc3 in der G<sub>1</sub>-Phase auf die DNS-Assoziation von Cohesin.**

(A) Es wurden die gleichen Hefestämme wie in Abb. 2.4 verwendet. Die Stämme wurden angezogen und in der G<sub>1</sub>-Phase arretiert. Anschließend erfolgte die Induktion des Degrons, der G<sub>1</sub>-Arrest wurde dabei aufrechterhalten (t<sub>60</sub> und t<sub>120</sub>). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und Chromosomenspreizungen angefertigt. (B) Der Zellzyklusstatus wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie überwacht. (C) Die Fluoreszenzintensität wurde wie in Abb. 2.4 quantifiziert. (D) Die zelluläre Gesamtmenge der Proteine wurde durch eine Western-Blot-Analyse untersucht.

Die Depletion von Pds5 und Scc3 bereits in der G<sub>1</sub>-Phase führt ebenfalls zu einer Reduktion des  $\alpha$ -Kleisins in der Zelle. Es ist daher wahrscheinlich, dass die beobachtete Reduktion von Scc1 auf der DNS durch die Instabilität des Proteins selbst und nicht durch das Fehlen von Pds5 oder Scc3 per se verursacht wird.

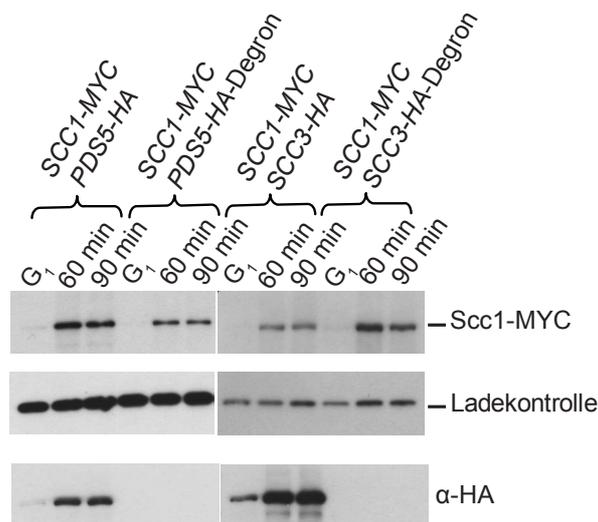
Die Zerstörung von Pds5 und/oder Scc3 mit Hilfe des Temperatur-induzierbaren DHFR-Degrans hat somit auch die Instabilität des mit Pds5 und Scc3 assoziierten Scc1-Proteins zur Folge. Dabei ist es unerheblich, in welcher Zellzyklusphase das DHFR-Degron induziert wird (Abb. 2.4 und Abb. 2.5). Daher ist dieses induzierbare Degronsystem für die Untersuchung der Auswirkungen der Depletion von Pds5 und Scc3 auf den Cohesinkomplex ungeeignet. Die beobachtete Reduktion von Scc1 ist sehr wahrscheinlich auf die induzierte Instabilität des Proteins selbst und nicht auf ein Fehlen von Pds5 oder Scc3 zurückzuführen. Es ist bekannt, dass die Reduktion von Scc1 zu einer verringerten Menge an Cohesin auf der DNS führt [174].

### **2.3.2. *In vivo*-Depletion von Pds5 und Scc3 mit Hilfe des *ECO1*-Degrans**

Da die Depletion von Pds5 und Scc3 mit Hilfe des DHFR-Degrans auch zu einem Abbau von Scc1 geführt hat, wurde versucht, die Depletion der Proteine mit dem kürzlich entdeckten Eco1-Degron (siehe Abschnitt 1.4.4.1 und [130]) zu erreichen. Die *ECO1*-Degron-Sequenz wurde zusammen mit einem 6xHA-Epitop-Tag an das endogene *PDS5*- bzw. *SCC3*-Gen fusioniert [129]. Die entsprechenden Hefestämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein verlangsamtes Wachstum, waren jedoch lebensfähig. Eine Western-Blot-Analyse zeigte eine Reduktion von Pds5 und Scc3 über den gesamten Zellzyklus (diese Arbeit und [129]).

Sowohl Pds5 wie auch Scc3 binden direkt an die Kleisin-Untereinheit des Cohesinkomplexes [32,66]. Um auszuschließen, dass die Instabilität der Pds5- und Scc3-HA-Degron-Fusionsproteine wie im Fall des DHFR-Degrans auch zum Abbau des assoziierten  $\alpha$ -Kleisins führt, wurde die zelluläre Gesamtmenge an Scc1 untersucht (Abb. 2.6). Dazu wurden Stämme, die das Pds5- oder Scc3-Degron-Fusionsprotein und eine MYC-getaggte Variante von Scc1 exprimieren, verwendet. Die Zellen wurden in der G<sub>1</sub>-Phase, in welcher Scc1 in der Zelle nicht vorliegt [33], synchronisiert und anschließend in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen, um die Synthese von Scc1 zu gewährleisten. Dann wurden Proben für eine Western-Blot-Analyse entnommen und die Proteine

wurden mit  $\alpha$ -HA- bzw.  $\alpha$ -MYC-Antikörpern nachgewiesen. Die Menge an Scc1-Protein ist im *PDS5*-Degron-Hintergrund kaum verändert, im *SCC3*-Degron-Hintergrund ist das zelluläre Level an Scc1 sogar leicht erhöht. Das *ECO1*-Degron erlaubt also eine spezifische Depletion der Zielproteine *in vivo*, während die Menge an Scc1 in der Zelle kaum beeinflusst wird.



**Abb. 2.6: Die zelluläre Gesamtmenge des  $\alpha$ -Kleisins Scc1 wird durch die Depletion von Pds5 oder Scc3 nicht beeinträchtigt.**

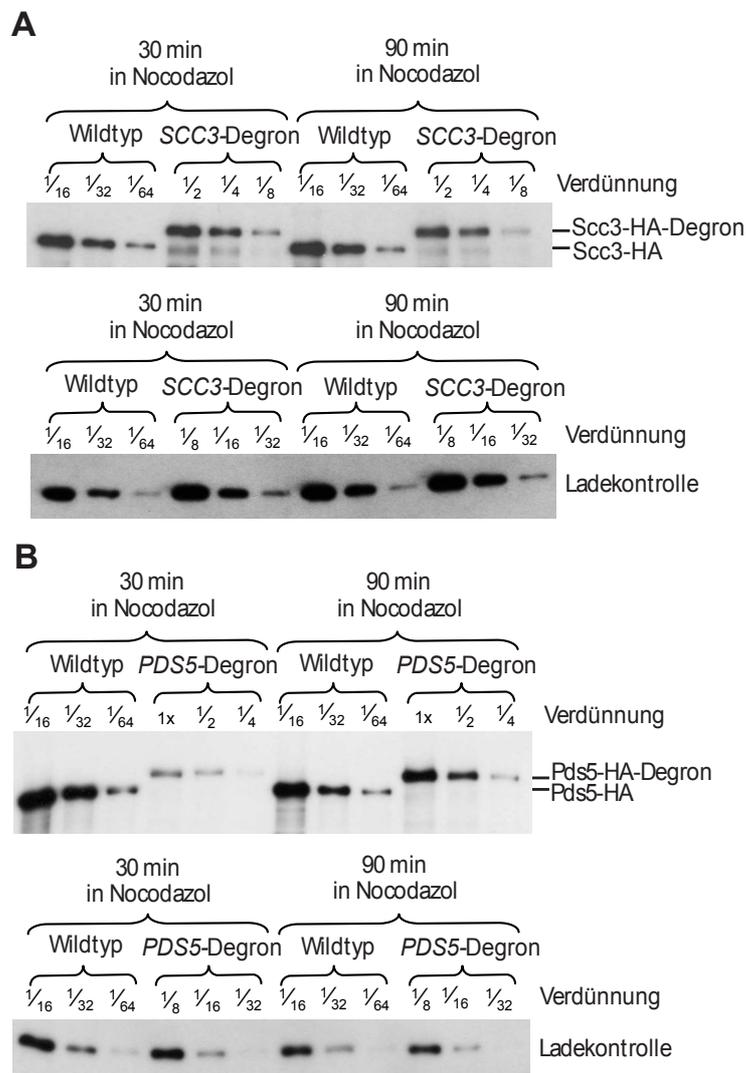
Hefestämme, welche die angezeigten Proteine als Epitop-getaggte Varianten exprimieren, wurden in der  $G_1$ -Phase synchronisiert und in einen  $G_2/M$ -Arrest entlassen. Zu den gezeigten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und für eine Western-Blot-Analyse prozessiert. Für die Detektion der getaggten Proteine wurden

$\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -MYC-Antikörper verwendet, als Ladekontrolle diente ein  $\alpha$ -Cdc28-Antikörper.

Die Gesamtmenge an Scc1 in der Zelle wird durch die Fusion des *ECO1*-Degrons an *PDS5* oder *SCC3* kaum beeinflusst. Die Depletion ist spezifisch und hat keine Auswirkung auf den Interaktionspartner Scc1.

In zwei Studien wurde mit Hilfe Epitop-getaggtter Proteine abgeschätzt, wieviele Moleküle Pds5, Scc1, Scc3, Smc1 und Smc3 in einer haploiden Hefezelle vorliegen [225,226]. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Reduktion von Scc1 zu einer verringerten Menge Cohesin auf der DNS führt, ohne dabei erkennbare Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion zu verursachen [174]. Um den Grad der Reduktion der Degron-Fusionsproteine zu bestimmen, wurden die Proteinmengen im Wildtyp und in den entsprechenden Degronstämmen quantifiziert. Dafür wurden Hefestämme verwendet, die entweder das Pds5- oder das Scc3-HA-Degron-Protein exprimieren. Als Kontrollen wurden Stämme mit den entsprechenden Epitop-getaggtten Wildtypvarianten genutzt. Die Zellen wurden angezogen und in der  $G_2/M$ -Phase arretiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben gezogen und für eine Western-Blot-Analyse prozessiert. Um die

Proteinmengen in den Degron- und Wildtypstämmen vergleichen zu können, wurden Verdünnungsreihen erstellt (Abb. 2.7).



**Abb. 2.7: Die Quantifizierung der Depletion der Pds5- und Scc3-HA-Degron-Fusionsproteine in der Zelle.**

Hefestämme, die entweder das Pds5- oder Scc3-Degron-Fusionsprotein oder das entsprechende HA-getaggte Wildtypprotein exprimieren, wurden angezogen und durch Zugabe von Nocodazol in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben gezogen und für eine Western-Blot-Analyse prozessiert. Um die Mengen an Wildtyp- bzw. Fusionsprotein vergleichen zu können, wurden Verdünnungsreihen erstellt. Die Epitop-getaggtten Proteine wurden mit einem α-HA-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente α-Cdc28.

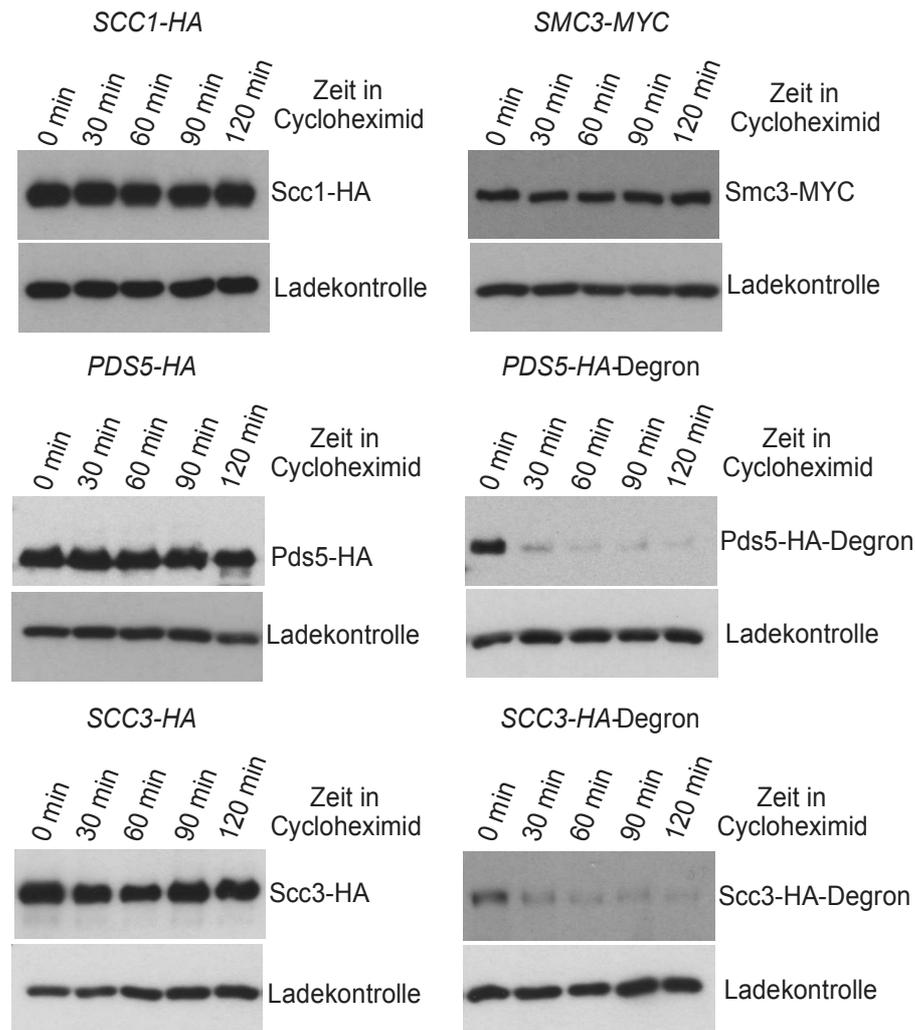
(A) Das Pds5-HA-Degron-Fusionsprotein ist im Vergleich zum Wildtyp nach 30 min in Nocodazol etwa 128×, nach 90 min in Nocodazol etwa 32× reduziert. (B) Die Menge an Scc3-HA-Degron-Fusionsprotein ist im Vergleich zum Wildtypprotein nach 30 min in Nocodazol um den Faktor 16, nach 90 min in Nocodazol um den Faktor 32 verringert.

Scc3 ist nach 30 Minuten im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 8 reduziert, nach 90 Minuten sogar um den Faktor 16. Da die Scc3-HA-Degron-Proben 2× konzentriert sind (vgl. Ladekontrolle) ergibt sich daraus eine 16- bis 32-fache Reduktion des Degron-Fusionsproteins (Abb. 2.7A). Die Reduktion von Pds5-HA-Degron ist sogar noch ausgeprägter, insgesamt ist die Menge an Fusionsprotein im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 128 bzw. 32 verringert (Abb. 2.7B). Beide Proteine können also mit Hilfe des *ECO1*-Degrons erfolgreich depletiert werden.

Das *ECO1*-Degron führt nach der S-Phase zu einem Cdk1-spezifischen Abbau des Eco1-Proteins [130]. Die Fusion an Pds5 und Scc3 verursacht dagegen eine Proteinreduktion über den gesamten Zellzyklus [129]. Die Reduktion kann verschiedene Ursachen haben, die verringerte Stabilität der Fusionsproteine stellt dabei eine Möglichkeit dar. Die Stabilität der Proteine wurde daher *in vivo* durch eine Behandlung mit dem Translationshemmer Cycloheximid überprüft. Während sich das Niveau stabiler Proteine in der Zelle durch eine Hemmung der Translation nicht verändern sollte, ist für instabile Proteine eine fortwährende Neusynthese notwendig, um das Proteinlevel in der Zelle konstant zu halten.

Dazu wurden Stämme verwendet, die entweder Epitop-getaggte Wildtypproteine oder Degron-Fusionsproteine exprimieren, um die Proteinmenge auf einem Western-Blot untersuchen zu können. Die Hefestämme wurden in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert, da in dieser Phase des Zellzyklus alle Cohesinuntereinheiten und Cohesin-assoziierten Proteine in der Zelle vorhanden sind. Anschließend wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt, um die Neusynthese von Proteinen zu unterbinden (Abb. 2.8).

Auch zwei Stunden nach der Hemmung der Translation sind die Mengen an Pds5 und Scc3 nicht verändert. Die Degron-Fusionsproteine weisen hingegen schon nach 30 Minuten eine deutliche Reduktion der Proteinmenge auf. Scc1 und Smc3, zwei Unterheiten des Cohesinrings, sind ebenfalls stabil (Abb. 2.8). Die Depletion der Fusionsproteine wird also durch die Instabilität dieser Proteine in der Zelle erreicht.



**Abb. 2.8: Die Depletion der Pds5- und Scc3-HA-Degron-Fusionsproteine wird durch eine reduzierte Proteinstabilität verursacht.**

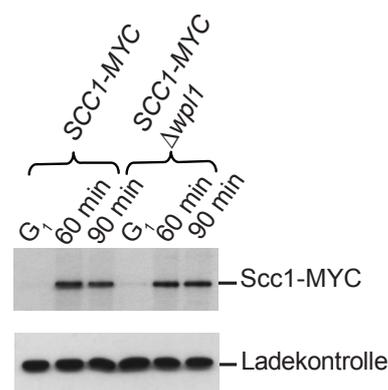
Hefestämme, die entweder Epitop-getaggte Wildtypproteine oder Degron-Fusionsproteine exprimieren, wurden in der  $G_2/M$ -Phase arretiert und mit dem Translationshemmer Cycloheximid behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden vor ( $t_0$ ) und nach der Zugabe des Zellgiftes Proben entnommen und für eine Western-Blot-Analyse prozessiert. Für die Detektion der Epitop-getaggtten Proteine wurden  $\alpha$ -HA- oder  $\alpha$ -MYC-Antikörper verwendet,  $\alpha$ -Cdc28 wurde als Ladekontrolle benutzt.

Die Menge an Pds5 und Scc3 bleibt auch nach Hemmung der Translationsmaschinerie konstant, die Degron-Fusionsproteine zeigen hingegen schon nach 30 min eine starke Reduktion. Scc1 und Smc3, beide Untereinheiten des Cohesinkomplexes, sind ebenfalls stabil.

### 2.3.3. Die Quantität von Scc1 wird durch die Deletion von *WPL1* nicht beeinflusst

Im Gegensatz zu Pds5 und Scc3 ist das Wpl1-Protein in der Bäckerhefe nicht essenziell [67]. Daher ist es möglich, die Auswirkungen einer Wpl1-Reduktion auf die DNS-Assoziation von Cohesin mit Hilfe von  $\Delta wpl1$ -Deletionsmutanten zu untersuchen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass das Fehlen von Wpl1 auch negative Effekte auf Scc1 hat.

Um dies auszuschließen wurden Stämme mit Epitop-getaggttem Scc1-Protein im  $\Delta wpl1$ - bzw. Wildtyp-Hintergrund in der G<sub>2</sub>/M-Phase untersucht. Die Menge an Scc1 bleibt unverändert (Abb. 2.9), die Deletion des *WPL1*-Gens hat somit keine Auswirkung auf das Gesamtlevel des  $\alpha$ -Kleisins in der Zelle.



**Abb. 2.9: Die Deletion des *WPL1*-Gens hat keine Auswirkung auf die zelluläre Gesamtmenge an Scc1.**

Hefestämme, die Scc1 als MYC-getaggte Variante im  $\Delta wpl1$ - bzw. Wildtyp-Hintergrund exprimieren, wurden in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert und anschließend in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben gezogen und für eine Western-Blot-Analyse prozessiert. Scc1-MYC wurde mit einem  $\alpha$ -MYC-Antikörper nachgewiesen,  $\alpha$ -Cdc28 diente als Ladekontrolle.

Die Deletion des *WPL1*-Gens hat keine Auswirkung auf die Menge des  $\alpha$ -Kleisins Scc1 in der Zelle.

Durch die *in vivo*-Depletion von Pds5 und Scc3 mit Hilfe des *ECO1*-Degrons und der Deletion von *WPL1* war es in der vorliegenden Arbeit somit möglich, die Rolle dieser Proteine bei der Schwesterchromatid-Kohäsion sowie bei der stabilen DNS-Assoziation von Cohesin *in vivo* zu untersuchen.

### 2.3.4. Die Integrität von Cohesin ist nicht von Pds5 und Scc3 abhängig

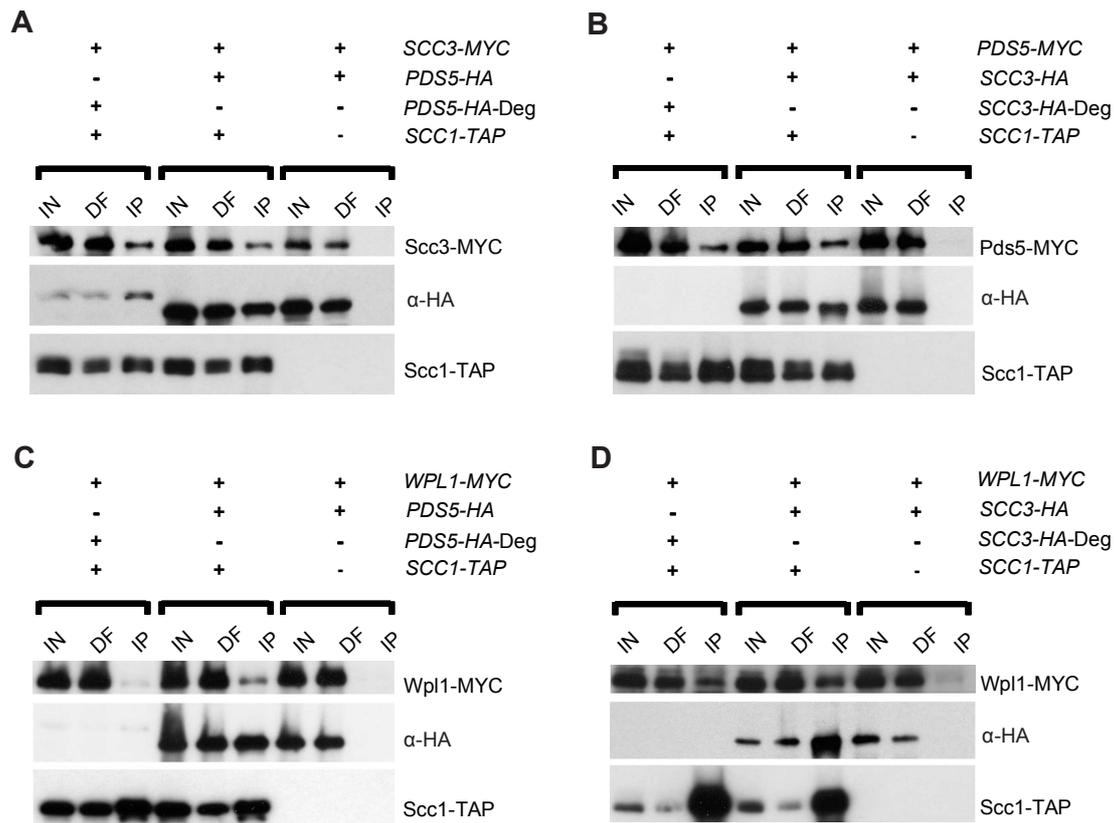
In der Bäckerhefe kann Cohesin durch Scc3 koimmunopräzipitiert werden, Scc3 liegt stabil an Cohesin gebunden vor [46]. Auch in *S. cerevisiae* durchgeführte FRAP-Experimente mit Pds5 und Scc3 zeigen, dass Pds5 und

Scs3 eine stabile Assoziation mit der DNS aufweisen [66,129]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DNS-Bindung beider Proteine vom Cohesinkomplex abhängig ist (Abschnitt 2.3.7).

Sowohl Pds5 wie auch Scs3 sind essenzielle Proteine und es wird allgemein angenommen, dass beide bei der Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion beteiligt sind [57]. Die Funktion von Pds5 und Scs3 könnte dabei eine Stabilisierung der an die DNS gebundenen Cohesinkomplexe sein.

Durch die Depletion von Pds5 und Scs3 war es in der vorliegenden Arbeit möglich, die Integrität des Cohesinkomplexes *in vivo* in Abwesenheit dieser Proteine zu untersuchen. Dazu wurden Immunopräzipitationsexperimente mit verschiedenen Kombinationen Epitop-getaggtter Varianten von Pds5, Scs3, Wpl1 und Scs1 angefertigt. Die Immunopräzipitationen wurden dabei mit Scs1-TAP durchgeführt und koimmunopräzipitierte Proteine wurden mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 2.10).

Scs3-MYC konnte mit Scs1-TAP sowohl im *PDS5-HA*- wie auch im *PDS5-HA*-Degron-Hintergrund koimmunopräzipitiert werden (Abb. 2.10A), das Gleiche wurde für Pds5-MYC im *SCC3-HA*- bzw. im *SCC3-HA*-Degron-Hintergrund beobachtet (Abb. 2.10B). Wpl1-MYC konnte dagegen im *PDS5-HA*-Degron-Hintergrund nur in geringen Mengen koimmunopräzipitiert werden (Abb. 2.10C). Dies bestätigt bereits vorhandene Publikationen, die die Assoziation von Wapl mit Cohesin als von Pds5 abhängig beschreiben [54,55]. Die Menge an immunopräzipitiertem Wpl1-Protein im *SCC3-HA*-Degron-Hintergrund ist dagegen kaum beeinträchtigt (Abb. 2.10D).



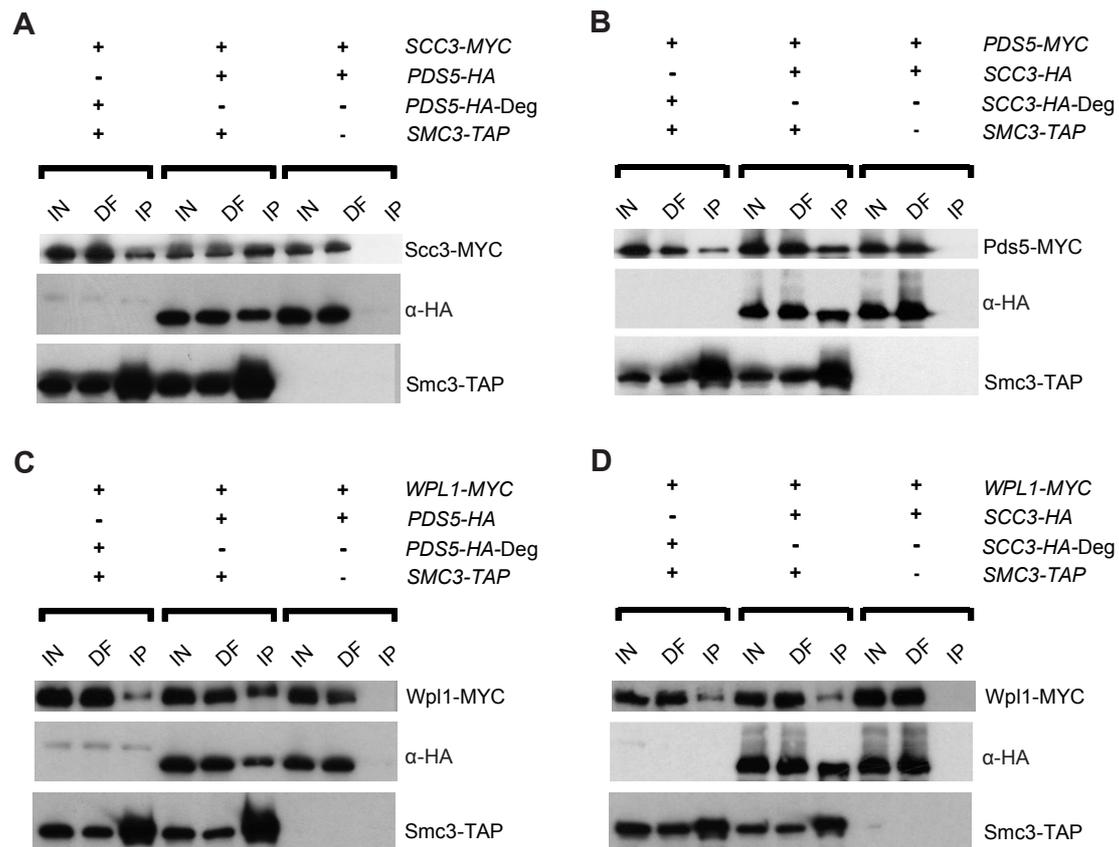
**Abb. 2.10: Pds5 und Scc3 sind für die Integrität von Cohesin (Scc1) nicht notwendig.**

Hefestämme, die die angezeigten Epitop-getaggten Proteinvarianten exprimieren, wurden angezogen und in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert. Anschließend wurden Immunopräzipitationen von Scc1-TAP mit IgG-Sepharose durchgeführt. Der Input (IN), der Durchfluss (DF) und die Immunopräzipitation (IP) wurden durch eine Western-Blot-Analyse mit α-MYC, α-HA und PAP analysiert.

Der Cohesinkomplex ist auch in Abwesenheit von Pds5 oder Scc3 intakt. Lediglich die Menge des Wpl1-Proteins, welches direkt über Pds5 an den Komplex rekrutiert wird, ist in Abwesenheit von Pds5 stark reduziert.

Sowohl Pds5 wie auch Scc3 binden direkt an das α-Kleisin Scc1 [32,66,129] und auch die Assoziation des humanen Wapl-Proteins mit dem Cohesinkomplex ist von Pds5, Scc3 und auch von Scc1 abhängig [55]. Daher kann durch die gezeigten Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass Pds5, Scc3 und Wpl1 direkt über Scc1 koimmunopräzipitiert werden, ohne dass ein funktioneller Cohesinkomplex vorliegt.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde das Experiment mit Smc3-TAP statt Scc1-TAP wiederholt (Abb. 2.11). Zuvor wurde bereits gezeigt, dass weder Pds5, Scc1, Scc3 noch Wpl1 direkt an das Smc3-Protein binden kann (Abschnitt 2.2).



**Abb. 2.11: Pds5 und Scc3 sind für die Integrität von Cohesin (Smc3) nicht notwendig.**

Die Immunopräzipitationen mit den angezeigten Hefestämmen wurden analog zu den in Abb. 2.10 gezeigten Experimenten durchgeführt. Die Immunopräzipitation erfolgte über Smc3-TAP. Der Cohesinkomplex ist auch in Abwesenheit von Pds5 oder Scc3 intakt. Scc3 kann auch in Abwesenheit von Pds5 koimmunopräzipitiert werden, das Gleiche gilt für Pds5 im *SCC3-HA-Degron*-Hintergrund. Da keines der beiden Proteine direkt an Smc3 bindet, muss daher ein intakter Cohesinkomplex vorliegen.

Scc3-MYC konnte mit Smc3-TAP im *PDS5-HA-Degron*-Hintergrund ähnlich effizient wie im *PDS5-HA*-Hintergrund koimmunopräzipitiert werden (Abb. 2.11A). Auch die Mengen an Pds5-MYC waren im *SCC3-HA-Degron*- bzw. *SCC3-HA*-Hintergrund ähnlich (Abb. 2.11B). Die Menge an koimmunopräzipitiertem Wpl1-MYC war im *PDS5-HA-Degron*-Hintergrund erneut stark reduziert (Abb. 2.11C), im *SCC3-HA-Degron*-Hintergrund ist dagegen kaum eine Reduktion des Wpl1-Proteins zu erkennen (Abb. 2.11D).

Scc3 kann also auch in Abwesenheit von Pds5 durch Smc3-TAP koimmunopräzipitiert werden, das Gleiche gilt auch für den umgekehrten Fall der Koimmunopräzipitation von Pds5. Da weder Pds5 noch Scc3 direkt an

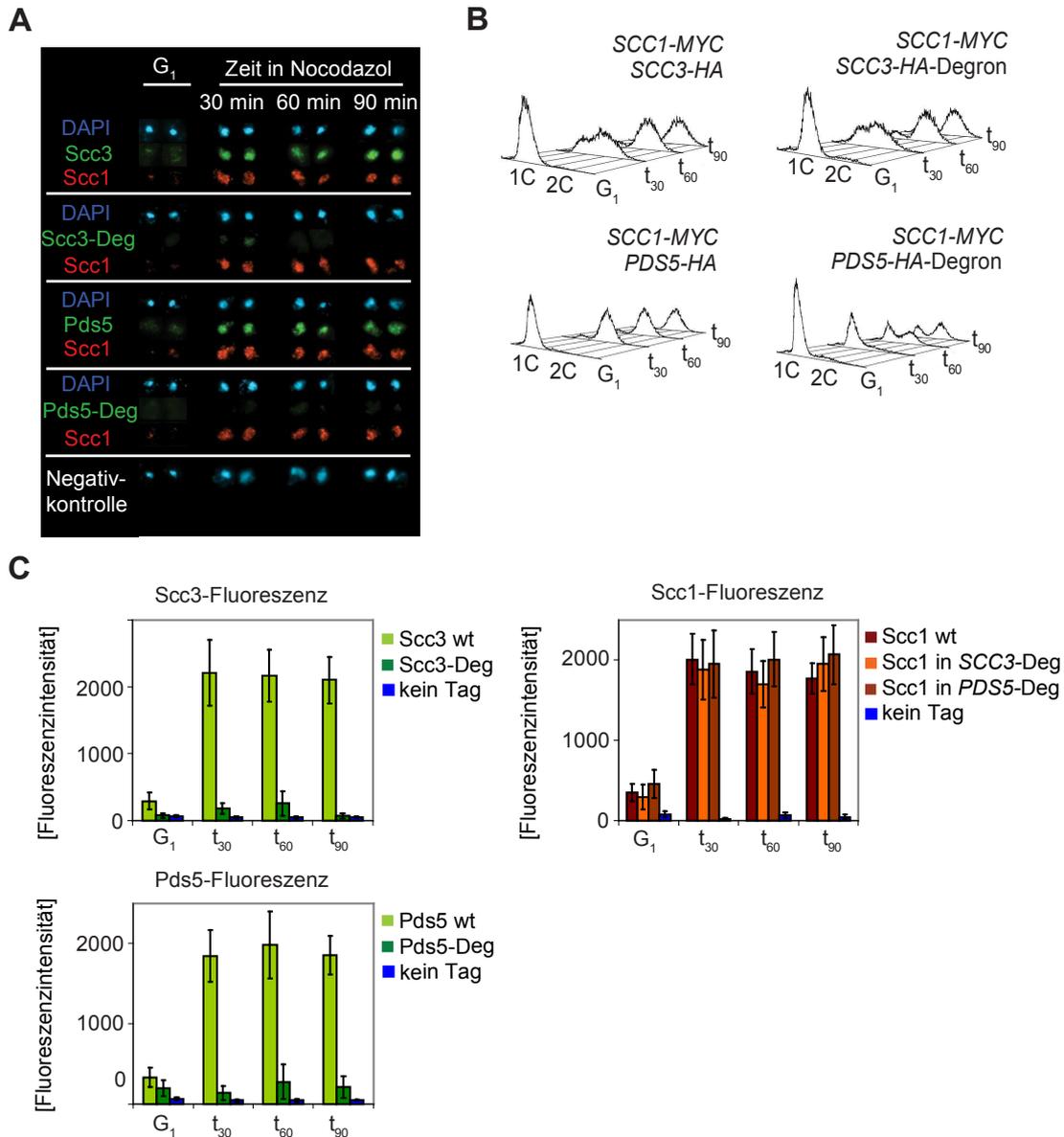
das Smc3-Protein binden können, muss der Cohesinkomplex intakt vorliegen. Daraus folgt, dass die Integrität von Cohesin durch die Depletion der essenziellen Proteine Pds5 und Scc3 nicht beeinträchtigt wird.

### **2.3.5. Cohesin kann ohne Pds5, Scc3 oder Wpl1 an die DNS binden**

Die Immunopräzipitationsexperimente (Abb. 2.10 und Abb. 2.11) zeigen, dass der Cohesinkomplex auch ohne die Cohesin-assoziierten Proteine Pds5 und Scc3 intakt in der Zelle vorliegt. *PDS5* [51,52] und *SCC3* [33,53] sind aber ursprünglich als essenzielle Gene im Kontext der Schwesterchromatid-Kohäsion identifiziert worden (Abschnitt 1.4.1). Zudem ist Scc3, nicht aber Pds5, für das Beladen der DNS mit dem Cohesinkomplex erforderlich [93]. Es ist daher möglich, dass die Reduktion dieser Proteine auch zu einer verringerten Menge an DNS-assoziiertem Cohesin führt.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten wurde der Cohesinkomplex durch Chromosomenspreizungen im *PDS5*- bzw. *SCC3*-Degron-Hintergrund auf der DNS visualisiert und quantifiziert. Dazu wurden Hefestämme, die Scc1 als MYC-getaggte Variante und Pds5 oder Scc3 als Degron-Fusionsproteine oder HA-getaggte Wildtypvarianten exprimieren, verwendet. Die Zellen wurden in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert und dann in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen, da in dieser Phase des Zellzyklus Cohesin auf den Chromosomen vorhanden ist (Abschnitt 1.4.5). Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Epitop-getaggten Proteine wurden auf der DNS sichtbar gemacht (Abb. 2.12).

Die Pds5- und Scc3-Degron-Fusionsproteine zeigen nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal. Dies steht in Übereinstimmung mit der geringen Menge der in der Zelle vorhandenen Fusionsproteine (Abschnitt 2.3.2). Die entsprechenden Epitop-getaggten Wildtypproteine sind dagegen in großer Menge auf den Chromosomen lokalisiert (Abb. 2.12A). Das  $\alpha$ -Kleisin Scc1 ist als Teil des Cohesinkomplexes im *PDS5-HA*- und *SCC3-HA*-Wildtyp-Hintergrund ebenfalls auf der DNS lokalisiert. Überraschenderweise ist die Menge an DNS-gebundenem Scc1 durch die Depletion von Pds5 oder Scc3 nicht beeinträchtigt (Abb. 2.12A). Nach einer Chromosomenspreizung kann der Zellzyklusstatus der lysierten Zelle allerdings nicht mehr bestimmt



**Abb. 2.12: Scc1 bindet unabhängig von Pds5 und Scc3 an die DNS.**

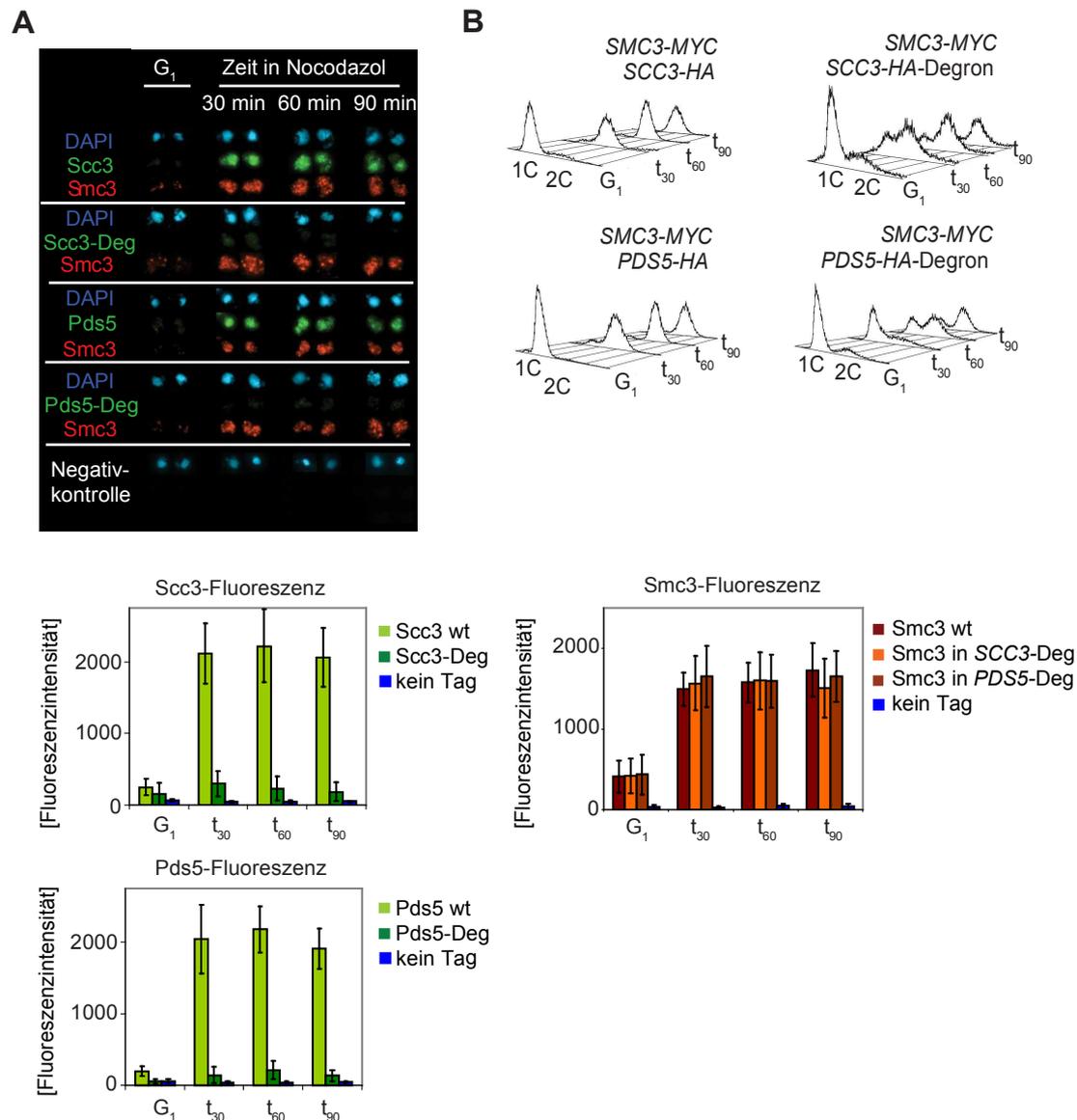
(A) Hefestämme, die die angezeigten Epitop-getaggte Proteinvarianten exprimieren, wurden in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert und dann in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, Chromosomenspreizungen angefertigt, die Proteine durch Immunofluoreszenz visualisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Pds5 und Scc3 wurden dabei mit einem α-HA-Antikörper und Scc1 mit einem α-MYC-Antikörper detektiert. Die DNS wurde mit DAPI angefärbt. (B) Der Zellzyklusstatus wurde während des Experiments mit Hilfe der Durchflusszytometrie überwacht. (C) Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde für jedes Epitop-getaggte Protein zu jedem Zeitpunkt quantifiziert, es wurden pro Protein und Zeitpunkt je 100 Zellen untersucht.

Das α-Kleisin Scc1 ist auch ohne Pds5 oder Scc3 auf der DNS zu finden, die Menge an Scc1-Protein bleibt unverändert.

werden. Um daher auszuschließen, dass die beobachtete Reduktion auf einzelne terminale oder nicht in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretierte Zellen zurückzuführen ist, wurden pro Protein und Zeitpunkt je 100 Zellen quantifiziert (Abb. 2.12C). Durch eine FACS-Analyse wurde gezeigt, dass der Großteil der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert ist (Abb. 2.12B).

Während die getaggtten Wildtypvarianten von Pds5 und Scc3 ein deutliches Fluoreszenzsignal aufweisen, resultieren die entsprechenden Degron-Fusionsproteine in einem merklich abgeschwächtem Signal. Die Intensität des Scc1-Signals ist in den einzelnen Stämmen dagegen nicht unterscheidbar. Das  $\alpha$ -Kleisin bindet somit auch in Abwesenheit von Pds5 und Scc3 an die DNS. Es ist allerdings möglich, dass Scc1 ohne Pds5 und Scc3 lediglich alleine und nicht als Teil des Cohesinkomplexes auf den Chromosomen lokalisiert ist. Um dies auszuschließen wurde das Experiment mit MYC-getaggttem Smc3-Protein wiederholt (Abb. 2.13).

Das MYC-getaggte Smc3-Protein (Abb. 2.13A) weist eine ähnliche Intensität wie das MYC-getaggte Scc1-Protein (Abb. 2.12A) auf. Die Menge an Smc3 auf der DNS scheint also in etwa der Menge an Scc1 zu entsprechen, dies wurde im Verlauf dieser Arbeit auch durch eine andere Studie bestätigt [66]. Die Intensität der Fluoreszenz von Smc3 ist zwischen den Degron- und Wildtypstämmen nicht zu unterscheiden (Abb. 2.13A und C). Daraus folgt, dass die DNS-Bindung von Smc3 nicht von Pds5 oder Scc3 abhängig ist. Zusammen mit den Immunopräzipitationsexperimenten (Abschnitt 2.3.4) lässt sich somit ableiten, dass der intakte Cohesinkomplex unabhängig von Pds5 und Scc3 auf den Chromosomen vorliegt.



**Abb. 2.13: Cohesin ist auch ohne Pds5 und Scc3 auf der DNS vorhanden.**

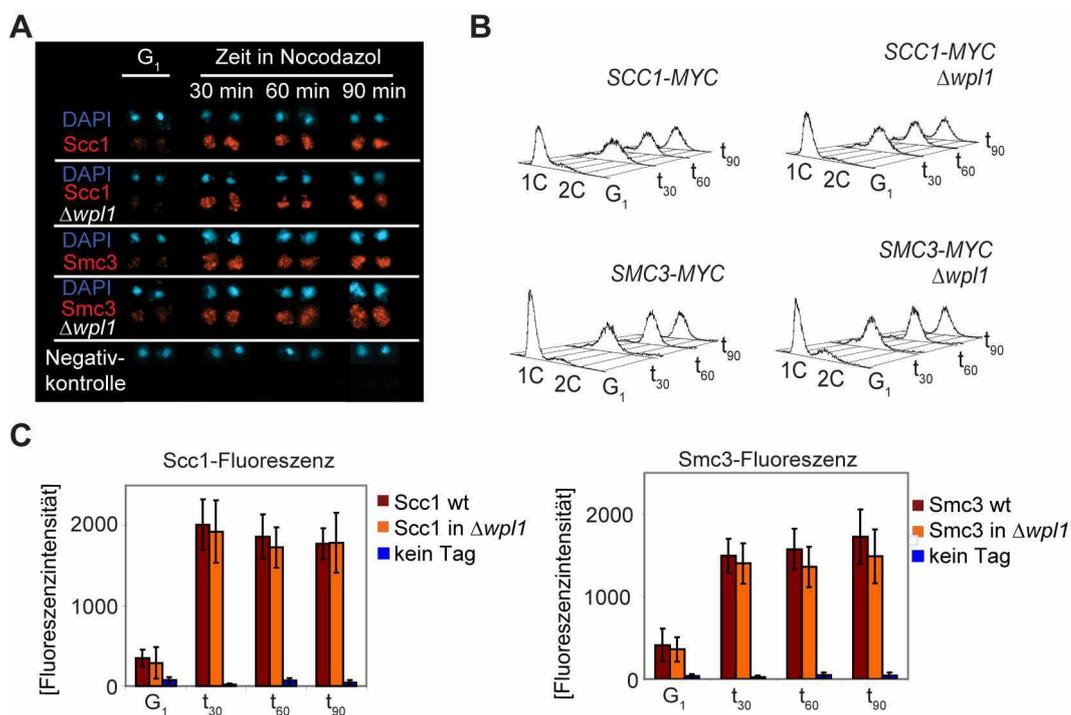
Das Experiment wurde analog zum in Abb. 2.12 gezeigten Experiment durchgeführt. Statt Scc1 liegt hier Smc3 als MYC-getaggte Variante vor.

Das Smc3-Protein ist in Abwesenheit von Pds5 oder Scc3 mit der DNS assoziiert. Die Menge an Smc3-Protein bleibt dabei unverändert. Cohesin ist daher auch ohne Pds5 oder Scc3 in der Lage, an die Chromosomen zu binden.

Die Auswirkung der Deletion von *WPL1* auf die Menge an Cohesin auf der DNS ist bisher nicht eindeutig geklärt. Zwar ist bekannt, dass Wapl/Wpl1 für die Dissoziation von DNS-gebundenem Cohesin verantwortlich ist [54,55,56,66], es existieren aber auch gegensätzliche Studien, die in einem  $\Delta wpl1$ -Deletionshintergrund weniger [68,121] bzw. mehr [67] Cohesin auf den Chromosomen berichten. Daher wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von

Chromosomenspreizungen die Auswirkung einer *WPL1*-Deletion auf die Menge an Cohesin auf der DNS untersucht.

Dazu wurden Hefestämme verwendet, die neben einer  $\Delta wpl1$ -Deletion *Sccl* oder *Smc3* ausschließlich als MYC-getaggte Variante exprimieren. Die Zellen wurden in der  $G_1$ -Phase synchronisiert und anschließend in einen  $G_2/M$ -Arrest entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Epitop-getaggtten Proteine auf der DNS visualisiert (Abb. 2.14).



**Abb. 2.14: Cohesin bindet unabhängig von Wpl1 an die DNS.**

(A) Es wurden Hefestämme, die eine Deletion des *WPL1*-Gens besitzen und daneben ausschließlich MYC-getaggttes *Sccl*- oder *Smc3*-Protein exprimieren, verwendet. Als Kontrollen dienten die entsprechenden Stämme ohne  $\Delta wpl1$ . Die Hefestämme wurden in der  $G_1$ -Phase synchronisiert und anschließend in einen  $G_2/M$ -Arrest entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Chromosomenspreizungen angefertigt und die Proteine wurden durch Immunofluoreszenz visualisiert und ausgewertet. (B) Die Zellzyklusphase wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt. (C) Die Fluoreszenzintensität der MYC-getaggtten *Sccl*- und *Smc3*-Proteine wurde für jeden Zeitpunkt und Stamm quantifiziert, es wurden je 100 Zellen ausgewertet.

Der Cohesinkomplex assoziiert auch ohne das *Wpl1*-Protein mit der DNS, die Mengen an Chromatid-gebundenen Cohesinuntereinheiten *Sccl* und *Smc3* sind nicht unterscheidbar.

Weder für Scc1 noch für Smc3 ist im  $\Delta wpl1$ -Deletionshintergrund eine Reduktion auf der DNS zu erkennen (Abb. 2.14A und C). Daraus folgt, dass das Wpl1-Protein nicht für die Bindung von Cohesin an die DNS notwendig ist.

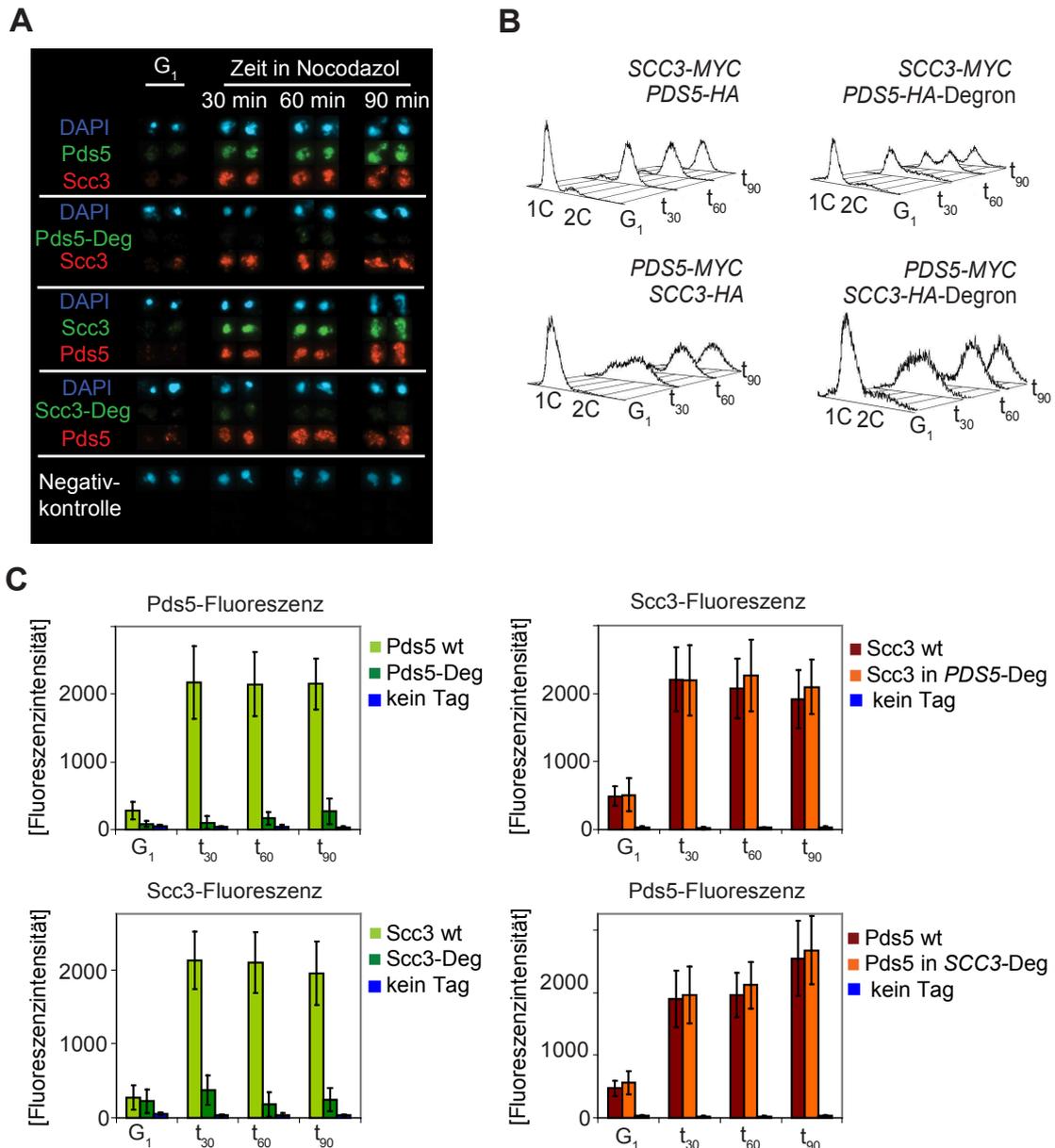
### **2.3.6. Die DNS-Assoziation von Pds5, Scc3 und Wpl1 ist unabhängig**

Für die Integrität des Cohesinkomplexes sind Pds5 und Scc3 nicht notwendig (Abb. 2.10 und Abb. 2.11). Die DNS-Bindung von Cohesin ist ohne Pds5, Scc3 oder Wpl1 möglich (Abb. 2.12, Abb. 2.13 und Abb. 2.14). Es ist allerdings möglich, dass Pds5 und Scc3 zwar voneinander unabhängig lösliches Cohesin binden können, für eine stabile Assoziation von Pds5 und Scc3 mit Cohesin auf der DNS aber beide Proteine notwendig sind.

Um diese Fragestellung zu untersuchen wurden Chromosomenspreizungen mit Pds5-MYC im *SCC3-HA-Degron*- bzw. *SCC3-HA*-Hintergrund und Scc3-MYC im *PDS5-HA-Degron*- bzw. *PDS5-HA*-Hintergrund durchgeführt (Abb. 2.15).

Ist die Assoziation mit der DNS nicht voneinander abhängig, so sollte sich die Fluoreszenzintensität der Epitop-getaggen Pds5- bzw. Scc3-Proteine im Wildtyp- bzw. Degronhintergrund nicht unterscheiden.

Die Intensität des Pds5-Signals ist im *SCC3-Degron*-Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp-Hintergrund nicht verändert, Pds5 liegt also unabhängig von Scc3 auf der DNS vor (Abb. 2.15A und C). Das Gleiche gilt auch vice versa (Abb. 2.15A und C). Pds5 und Scc3 assoziieren somit voneinander unabhängig mit der DNS.

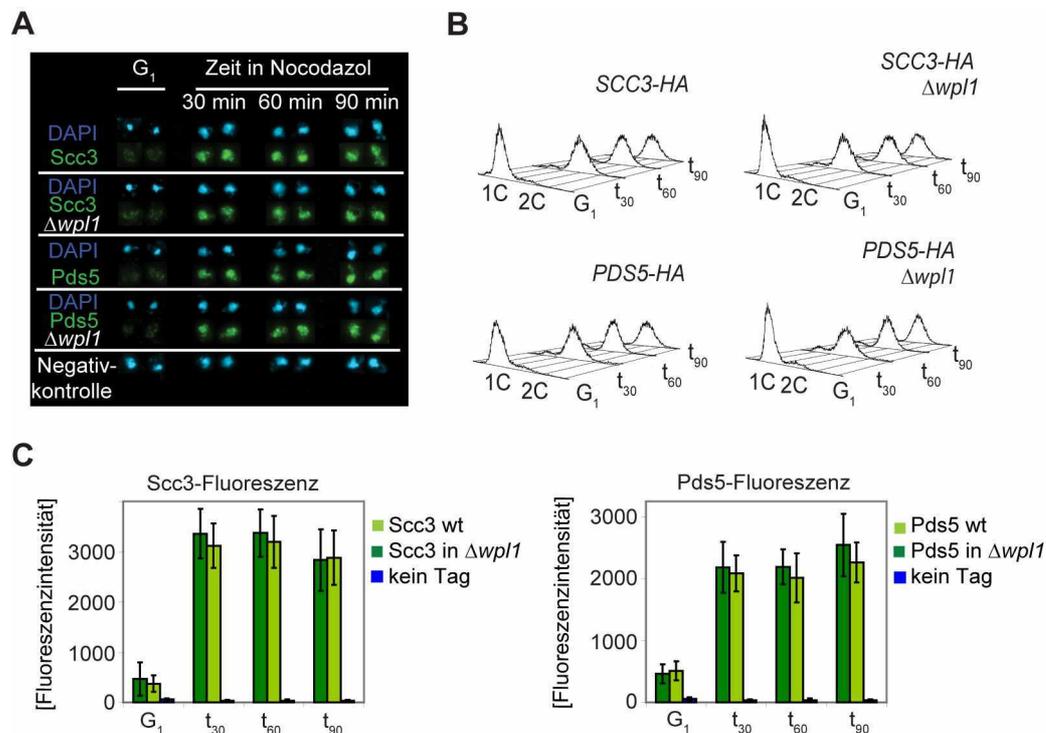


**Abb. 2.15: Pds5 und Scc3 binden voneinander unabhängig an die DNS.**

(A) Hefestämme, die Pds5 bzw. Scc3 als MYC-getaggte Variante und Scc3 bzw. Pds5 als Degron-Fusionsprotein oder HA-getaggte Variante exprimieren, wurden in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert und in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Chromosomenspreizungen erstellt und mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (B) Die Zellzyklusphase der einzelnen Zeitpunkte wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. (C) Pro Stamm und Zeitpunkt wurde das Fluoreszenzsignal für MYC und HA von je 100 Zellen quantifiziert.

Pds5 und Scc3 binden also voneinander unabhängig an die Chromosomen, beide Proteine sind auch in Abwesenheit des jeweiligen anderen Proteins in ähnlichen Mengen auf der DNS zu finden.

Um zu untersuchen, ob das Wpl1-Protein für die DNS-Assoziation von Pds5 oder Scc3 notwendig ist, wurden Chromosomenspreizungen mit Hefestämmen, die Pds5 oder Scc3 als HA-getaggte Varianten im Wildtyp- bzw. im  $\Delta wpl1$ -Hintergrund exprimieren, durchgeführt (Abb. 2.16).



**Abb. 2.16: Die DNS-Assoziation von Pds5 und Scc3 ist nicht von Wpl1 abhängig.**

(A) Hefestämme, die Pds5-HA bzw. Scc3-HA im Wildtyp- bzw. im  $\Delta wpl1$ -Deletionshintergrund exprimieren, wurden angezogen, in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert und in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Chromosomenspreizungen angefertigt, die Proteine detektiert und die Proben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. (B) Der Zellzyklusstatus wurde durch Durchflusszytometrie überwacht. (C) Pro Stamm und Zeitpunkt wurden jeweils 100 Zellen quantifiziert.

Das Wpl1-Protein spielt bei der DNS-Lokalisation von Pds5 und Scc3 keine Rolle.

Es zeigte sich, dass die Deletion des *WPL1*-Gens keinen Einfluss auf die DNS-Lokalisation von Pds5 oder Scc3 hat. Die Intensität der Fluoreszenzsignale von Pds5 bzw. Scc3 sind zwischen Wildtyp- und  $\Delta wpl1$ -Hintergrund nicht zu unterscheiden (Abb. 2.16A und C). Da Epitop-getaggtetes Wpl1 unter den in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Bedingungen nicht auf den Chromosomen visualisiert werden konnte, konnte nicht untersucht werden, ob die DNS-Assoziation von Wpl1 durch die Depletion von

Pds5 oder Scc3 beeinflusst wird. Wpl1 bindet nur sehr schwach und salzsensitiv an den Cohesinkomplex und wird deshalb vermutlich während der Durchführung der Chromosomenspreizungen von der DNS gewaschen. Mit weniger stringenten Bedingungen bei den Chromosomenspreizungen verbleiben zu viele zytoplasmatische Kontaminationen auf der DNS und machen eine Auswertung des Experiments unmöglich (Daten nicht gezeigt).

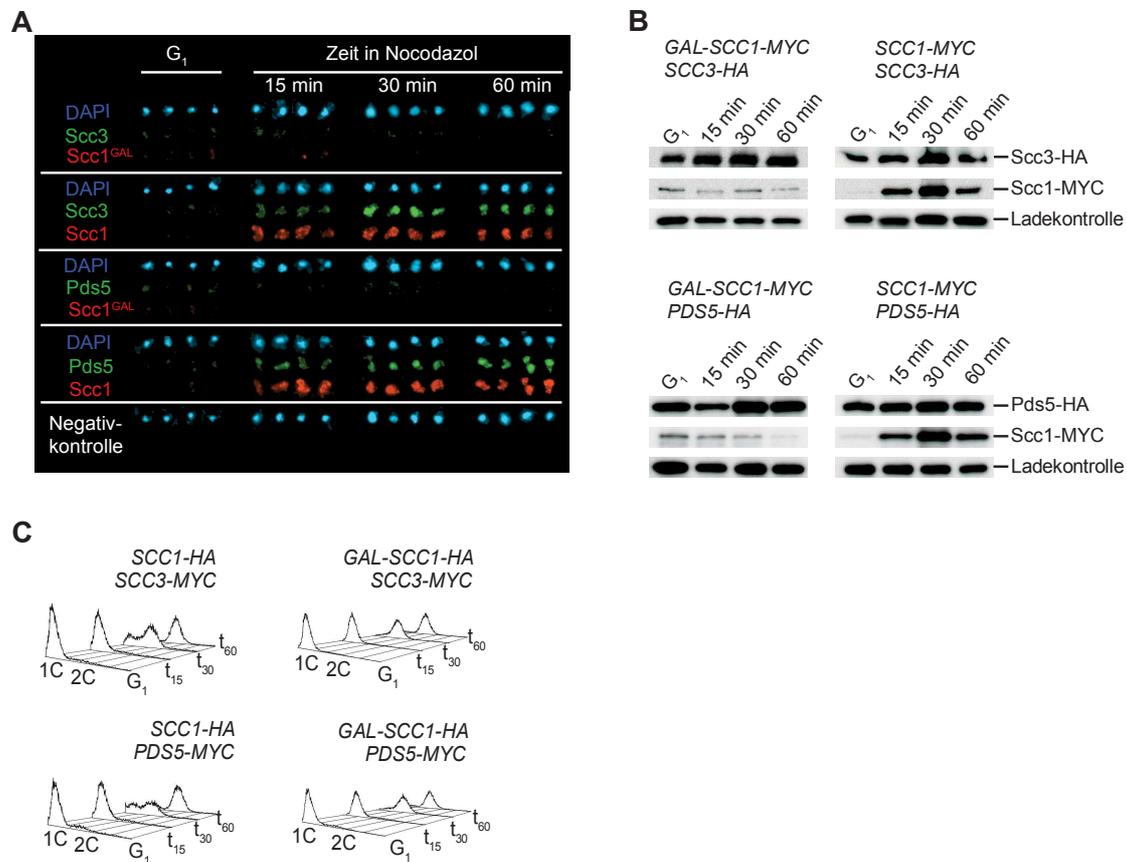
### **2.3.7. Pds5 und Scc3 lokalisieren ausschließlich als Teil von Cohesin auf den Chromosomen**

Es wurde gezeigt, dass die DNS-Bindung von Pds5 und Scc3 voneinander unabhängig stattfindet. Auch das Wpl1-Protein wird für die Assoziation dieser Proteine mit der DNS nicht benötigt (Abschnitt 2.3.6). Aus diesen Experimenten kann allerdings nicht abgeleitet werden, ob Pds5 und Scc3 nur als Teil des Cohesinkomplexes oder (auch) ohne Bindung an Cohesin mit der DNS assoziiert vorliegen. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit erneut mit Hilfe von Chromosomenspreizungen untersucht.

Deletionsmutanten von Scc1, Smc1 oder Smc3 sind nicht lebensfähig [33], eine Fusion des *ECO1*-Degrons an *SCC1* ist ebenfalls letal [129]. Daher wurden Hefestämme verwendet, in welchen das endogene *SCC1*-Gen als MYC-getaggte Variante exprimiert wird und zudem unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors (*GAL1*) steht. Zusätzlich exprimieren diese Stämme Pds5 bzw. Scc3 ausschließlich als HA-getaggte Varianten. Dadurch ist es möglich, die Expression von Scc1 gezielt zu unterbinden und anschließend die Auswirkungen auf die DNS-Assoziation von Pds5 und Scc3 zu untersuchen.

Die beschriebenen Stämme wurden in Medium mit Galaktose (YEPG) angezogen um die Expression von Scc1 zu ermöglichen. Dann wurden die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase arretiert. Daraufhin wurde Galaktose durch Glukose (YEPD) ersetzt, um die Expression des Scc1-Proteins in den arretierten Zellen zu unterdrücken. Anschließend wurden die Zellen in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest in YEPD-Medium entlassen und die DNS-Lokalisation der getaggtten Proteine

wurde untersucht. Als Kontrolle dienten Stämme, in welchen *SCC1-MYC* unter der Kontrolle des nativen Promotors vorliegt (Abb. 2.17).



**Abb. 2.17: Pds5 und Scc3 binden nur als Teil des Cohesinkomplexes an die Chromosomen.**

Für die Chromosomenspreizungen wurden Hefestämme, in welchen das endogene *SCC1*-Gen MYC-getaggt und unter der Kontrolle eines *GAL*-Promotors vorliegt, verwendet. Zusätzlich exprimieren diese Stämme noch endogene, HA-getaggte Varianten von Pds5 oder Scc3. Als Kontrolle dienten *SCC1-MYC*-Stämme, bei welchen das *SCC1*-Gen unter der Kontrolle des nativen Promotors steht. Die Hefestämme wurden in Medium mit Galaktose (YEPG) angezogen und in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert. Dann wurde das Galaktose-Medium ausgewaschen und mit YEPD-Medium ersetzt, um die Transkription des *GAL-SCC1-MYC*-Gens zu unterbinden. Die Zellen wurden in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest entlassen, zu den angezeigten Zeitpunkten wurden (A) Chromosomenspreizungen und eine (B) Western-Blot-Analyse des Zellextraktes durchgeführt. HA-getaggte Proteine wurden mit  $\alpha$ -HA-, MYC-getaggte Proteine mit  $\alpha$ -MYC-Antikörpern nachgewiesen, als Ladekontrolle diente ein  $\alpha$ -Cdc28-Antikörper. (C) Der Zellzyklusstatus wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Pds5 und Scc3 sind nur als Teil des Cohesinkomplexes auf der DNS zu finden, ohne Scc1 assoziieren weder Pds5 noch Scc3 mit den Chromosomen.

Pds5 und Scc3 sind – in Übereinstimmung mit anderen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten – auf den Chromosomen vorhanden. Ohne Cohesin (visualisiert durch Scc1-MYC) kann weder Pds5 noch Scc3 auf der DNS detektiert werden (Abb. 2.17A). Die Western-Blot-Analyse der Zellextrakte zeigt, dass die Gesamtmenge an Pds5 und Scc3 durch die Reprimierung der Transkription von *SCC1* nicht beeinflusst wird (Abb. 2.17B). Die Reduktion von Scc1 führt also zu einem spezifischen Verlust der DNS-Assoziation von Pds5 und Scc3. Beide Proteine sind daher nur als Teil des Cohesinkomplexes mit den Chromosomen assoziiert.

### **2.3.8. *PDS5*-Degron- und *SCC3*-Degron-Stämme zeigen Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion und der Biorientierung**

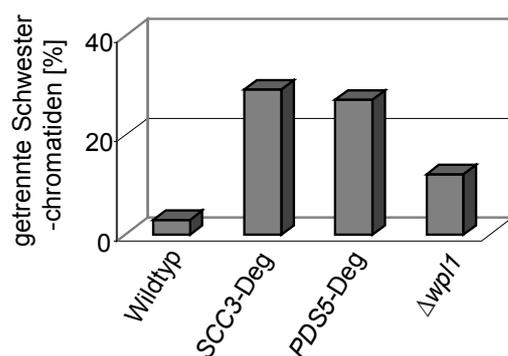
Die Depletion von Pds5 und Scc3 hat keinen Einfluss auf die Integrität des Cohesinkomplexes (Abschnitt 2.3.4) oder dessen Assoziation mit den Chromosomen (Abschnitt 2.3.5). Es wurde postuliert, dass nur ein Bruchteil der auf der DNS vorhandenen Cohesinkomplexe für die Schwesterchromatid-Kohäsion verantwortlich ist [66,134]. In Übereinstimmung damit führt eine Reduktion von Scc1 *in vivo* zwar zu signifikant weniger Cohesin auf den Chromosomen, Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion können allerdings nicht nachgewiesen werden [174].

Es ist möglich, dass die Depletion von Pds5 und Scc3 keine detektierbaren Auswirkungen auf die Menge an DNS-gebundenem Cohesin hat, die Schwesterchromatid-Kohäsion jedoch negativ beeinflusst.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der Depletion von Pds5 und Scc3 auf die Schwesterchromatid-Kohäsion untersucht. Die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden wurde dabei in lebenden Zellen mit einer bereits etablierten Methode sichtbar gemacht [33]. Bei dieser Methode werden die Chromosomen indirekt durch ein TetR-GFP-Fusionsprotein visualisiert. Die verwendeten Hefestämme besitzen dazu eine Abfolge von *tetO*-Operatorsequenzen, 35 kb vom Zentromer des Chromosoms IV entfernt integriert vorliegend. Zusätzlich exprimieren diese Zellen ein TetR-GFP-Fusionsprotein. Durch die Bindung des fluoreszierenden

TetR-GFP-Fusionsproteins an die *tetO*-Operatoresequenzen auf Chromosom IV wird das Chromosom unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. In diesem genetischen Hintergrund war es möglich, die Schwesterchromatid-Kohäsion im *PDS5*-Degron- und *SCC3*-Degron-Stamm zu untersuchen. Als Kontrolle dienten der Wildtyp und eine  $\Delta wpl1$ -Deletionsmutante (Abb. 2.18).

In Zellen mit funktioneller Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden liegen die beiden TetR-GFP-tragenden Chromatiden von Chromosom IV dicht beieinander, unter dem Mikroskop kann daher nur ein GFP-Signal (oft auch zwei dicht beieinander liegende, aber noch getrennt erkennbare Signale) erkannt werden. Zwei deutlich getrennte GFP-Signale weisen hingegen auf getrennte Schwesterchromatiden und damit auf einen Defekt bei der Schwesterchromatid-Kohäsion hin [33].



**Abb. 2.18: Die Depletion von Pds5 und Scc3 verursacht einen starken Defekt bei der Kohäsion der Schwesterchromatiden.**

Für das Experiment wurden Hefestämme, in denen die Schwesterchromatid-Kohäsion mit Hilfe eines TetR-GFP-Fusionsproteins und durch in Chromosom IV integrierte *tetO*-Sequenzen visualisiert werden kann,

verwendet. Der Wildtyp, ein *PDS5*-Degron-, ein *SCC3*-Degron- sowie ein  $\Delta wpl1$ -Stamm wurden getestet. Die Stämme wurden in der  $G_1$ -Phase synchronisiert und in einen  $G_2/M$ -Arrest entlassen. Nach 100 min wurden Proben entnommen und ohne Fixierung direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Pro Stamm wurden je 100 Zellen ausgezählt.

Der *PDS5*-Degron- und der *SCC3*-Degron-Stamm weisen starke Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion auf, der Kohäsionsdefekt im  $\Delta wpl1$ -Deletionshintergrund ist weniger stark.

Die Deletion von *WPL1* verursacht im Vergleich zum Wildtyp einen moderaten Kohäsionsdefekt (Abb. 2.18), wie bereits in anderen Publikationen berichtet [68,121,227]. Die *PDS5*- und *SCC3*-Degron-Stämme zeigen dagegen einen stark ausgeprägten Kohäsionsdefekt. Dieser Defekt ist in seiner starken Ausprägung mit bereits bekannten Kohäsionsdefekten in *eco1*-Mutanten vergleichbar [67].

Pds5 und Scc3 üben somit eine wichtige Rolle bei der Schwesterchromatid-Kohäsion aus, da die Depletion dieser Proteine zu starken Kohäsionsdefekten in der Zelle führt.

Am Ende der Metaphase sind die Chromosomen in der Äquatorialebene angeordnet (Abschnitt 1.2). Die Schwesterchromatiden sind dabei jeweils an von gegenüberliegenden Spindelpolen ausgehenden Mikrotubuli angeheftet. Dadurch wird eine Zugspannung auf die Chromosomen ausgeübt, welche die Chromatiden zu gegenüberliegenden Polen zieht. Der Cohesinkomplex hält die Schwesterchromatiden während der Metaphase allerdings noch zusammen und verhindert so die vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden. Durch diese gegensätzlich wirkenden Kräfte – die Zugkraft der angehefteten Mikrotubuli und die kohäsive Kraft des Cohesinkomplexes – stehen die Chromosomen unter Spannung, die Kinetochore sind dabei den Spindelpolen zugewandt. Dieser Zustand wird Biorientierung der Chromosomen genannt [12,228]. Nur unter Spannung stehende Mikrotubulus/Kinetochor-Verbindungen werden vom Kontrollsystem der Zelle als korrekt erkannt und stabilisiert. Kürzlich wurde postuliert, dass die auf die Chromatiden wirkende Zugspannung auch für die Trennung der ineinander verflochtenen Schwesterchromatiden während der Mitose notwendig ist [50].

Die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden spielt somit eine entscheidene Rolle bei der Biorientierung der Chromosomen. Die beobachteten Kohäsionsdefekte in den *PDS5*-Degron- und *SCC3*-Degron-Stämmen könnten daher auch die Biorientierung der Chromosomen beeinträchtigen. Daher wurde diese in der vorliegenden Arbeit untersucht.

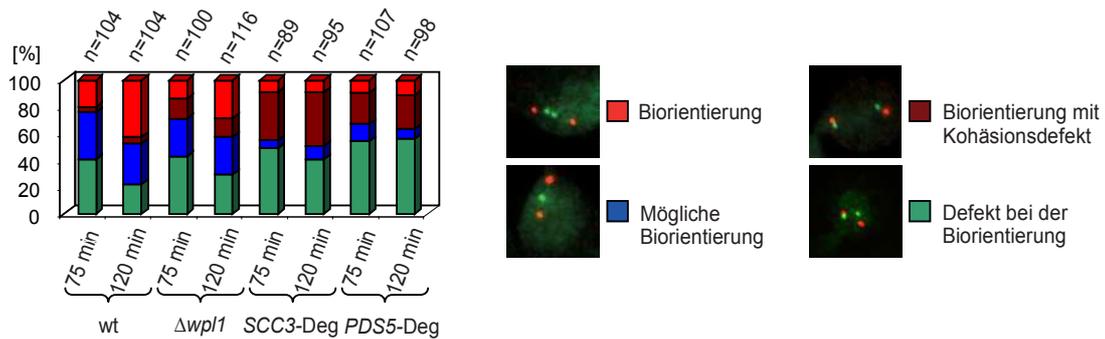
Dazu wurde die Biorientierung des Chromosoms IV indirekt unter dem Mikroskop sichtbar gemacht [229]. Die hierfür verwendeten Stämme besitzen eine Abfolge von *tetO*-Operatorsequenzen, die ins Genom nahe des Zentromers von Chromosom IV integriert sind. Zusätzlich wird das TetR-GFP-Fusionsprotein exprimiert, um das Chromosom IV durch Fluoreszenz indirekt visualisieren zu können. Daneben ist Spc42 (Spinde Pole Component), eine Komponente des Spindelpols, mit dem fluoreszierenden Protein Tomato fusioniert. Jeder Spindelpol ist daher unter dem Mikroskop durch ein

einzelnes Tomato-Signal erkennbar [229]. In einem durch das Spindelgift Nocodazol verursachten G<sub>2</sub>/M-Arrest ist die Untersuchung der Biorientierung nicht möglich, da aufgrund der depolymerisierten Mikrotubuli keine Zugspannung auf die Chromosomen ausgeübt wird. Daher steht in den verwendeten Stämmen *CDC20*, welches für eine Untereinheit des APC/C-Komplexes codiert, unter der Kontrolle eines Methionin-reprimierbaren Promotors. Durch Zugabe von Methionin können die Zellen so in einem G<sub>2</sub>/M-Arrest geführt werden, ohne die Mikrotubuli-Polymerisation zu hemmen [229].

Hefestämme mit *PDS5*-Degron, *SCC3*-Degron oder  $\Delta wpl1$  im beschriebenen genetischen Hintergrund wurden angezogen und in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert (*Cdc20* wird exprimiert). Anschließend wurden die Zellen in YEPD-Medium mit Nocodazol und Methionin entlassen (*Cdc20* wird nicht mehr exprimiert). Unter diesen Bedingungen arretieren die Zellen in einem Metaphase-ähnlichem Stadium mit bereits getrennten Spindelpolen und depolymerisierten Mikrotubuli. Anschließend wurde das Spindelgift mit YEPD-Medium mit Methionin ausgewaschen (*Cdc20* wird weiterhin nicht exprimiert), um eine Neubildung der Mikrotubuli und damit eine Etablierung der Biorientierung in den G<sub>2</sub>/M-arretierten Zellen zu ermöglichen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit Methanol fixiert und unter dem Mikroskop analysiert (Abb. 2.19).

Zwei getrennte Tomato-Signale (rot, die Spindelpole) mit zwei dicht beieinanderliegenden GFP-Signalen (grün, die beiden Chromatiden von Chromosom IV) bedeuten biorientierte, in der Äquatorialebene angeordnete Chromosomen. Ein einzelnes GFP-Signal kann in den meisten Fällen ebenfalls als Biorientierung interpretiert werden – die beiden GFP-Signale liegen dabei zu dicht beieinander, um unter dem Mikroskop als zwei getrennte Signale wahrgenommen werden zu können.

Beide GFP-Signale in der Nähe desselben Spindelpols oder ein GFP-Signal am Spindelpol und das andere GFP-Signal in der Mitte oder abseits der Spindelpolebene wurden dagegen als Defekte bei der Etablierung der Biorientierung interpretiert.



**Abb. 2.19: Die Depletion von Pds5 und Scc3 verursacht Defekte bei der Biorientierung der Chromosomen.**

Für das Experiment wurden Hefestämme, die eine Abfolge von *tetO*-Operatorsequenzen im Chromosom IV integriert tragen und dazu TetR-GFP exprimieren, verwendet. Spc42, eine Komponente des Spindelpols, liegt als Spc42-Tomato-Fusionsprotein vor. Um einen G<sub>2</sub>/M-Arrest ohne Destabilisierung der Mikrotubuli zu ermöglichen, steht zudem *CDC20*, welches für eine Komponente des APC/C-Komplexes codiert, unter der Kontrolle eines Methionin-reprimierbaren Promotors. Die Biorientierung wurde im Wildtyp, im *PDS5*-Degron-, im *SCC3*-Degron- sowie im  $\Delta wpl1$ -Hintergrund untersucht. Dafür wurden die Stämme angezogen, in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert und anschließend in YEPD-Medium mit Methionin und Nocodazol in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert. Anschließend wurde das Spindelgift ausgewaschen und an den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Depletion von Pds5 und Scc3 führt zu einer reduzierten Effizienz bei der Etablierung der Biorientierung. Im  $\Delta wpl1$ -Deletionshintergrund ist dieser Effekt weniger stark ausgeprägt.

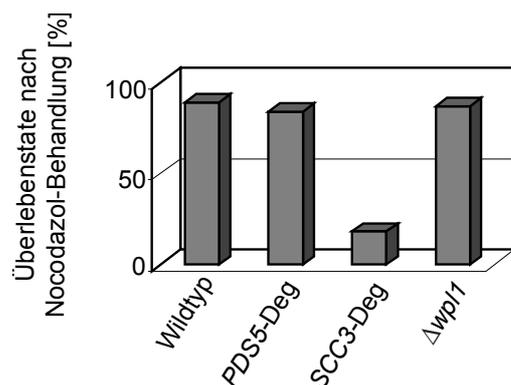
In den *PDS5*-Degron- und *SCC3*-Degron-Stämmen wurde zudem häufig je ein GFP-Signal pro Spindelpol beobachtet. Diese Konstellation wurde bisher nicht beschrieben [229] und wurde als Biorientierung mit begleitendem Kohäsionsdefekt gedeutet. In beiden Degronstämmen ist die Effizienz der Etablierung der Biorientierung beeinträchtigt. Nach zwei Stunden haben etwa 50-60% der Zellen das Chromosom IV biorientiert, im Wildtyp sind es dagegen etwa 80% der Zellen. Die Defekte in der Schwesterchromatid-Kohäsion scheinen somit auch die Biorientierung der Chromosomen zu beeinflussen.

Im  $\Delta wpl1$ -Deletionshintergrund sind nach zwei Stunden etwa 70% der Zellen in der Lage, das Chromosom IV korrekt zu biorientieren. Dieser vergleichsweise milde Phänotyp kann mit dem im Vergleich zu den *PDS5*-

und SCC3-Degron-Stämmen weniger stark ausgeprägtem Kohäsionsdefekt in den  $\Delta wpl1$ -Zellen erklärt werden (Abb. 2.18).

### 2.3.9. SCC3-Degron-Zellen sind nach Zugabe von Nocodazol nicht mehr lebensfähig

Im Verlauf dieser Arbeit wurde entdeckt, dass die Zugabe von Spindelgiften wie z. B. Nocodazol die Lebensfähigkeit von SCC3-Degron-Zellen nach dem Auswaschen des Gifts dramatisch reduziert. Zellen mit genetischem *PDS5*-Degron- oder  $\Delta wpl1$ -Hintergrund besitzen dagegen eine fast 100%-ige Überlebensrate nach dem Entfernen des Spindelgifts, wie es auch im Wildtyp der Fall ist (Abb. 2.20).



**Abb. 2.20: Die Überlebensrate nach Behandlung mit Nocodazol ist in SCC3-Degron-Zellen dramatisch reduziert.**

Hefezellen mit den angezeigten Genotypen wurden durch Zugabe von Nocodazol in der G<sub>2</sub>M-Phase arretiert. Nach 2 h wurde das Spindelgift ausgewaschen. Aliquots vor und nach der Zugabe von Nocodazol wurden auf

YEPD-Platten ausplattiert und die entstehenden Kolonien wurden ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien nach dem Auswaschen von Nocodazol geteilt durch die Anzahl der Kolonien vor der Zugabe des Spindelgifts ergibt die Überlebensrate. Es wurden pro Stamm mindestens vier Platten ausgezählt, der Mittelwert ist angezeigt.

Die Überlebensrate nach Behandlung mit Nocodazol liegt im Wildtyp sowie in den *PDS5*-Degron- und  $\Delta wpl1$ -Stämmen bei nahezu 100%. Der SCC3-Degron-Stamm zeigt dagegen eine dramatische Reduktion der Überlebensrate.

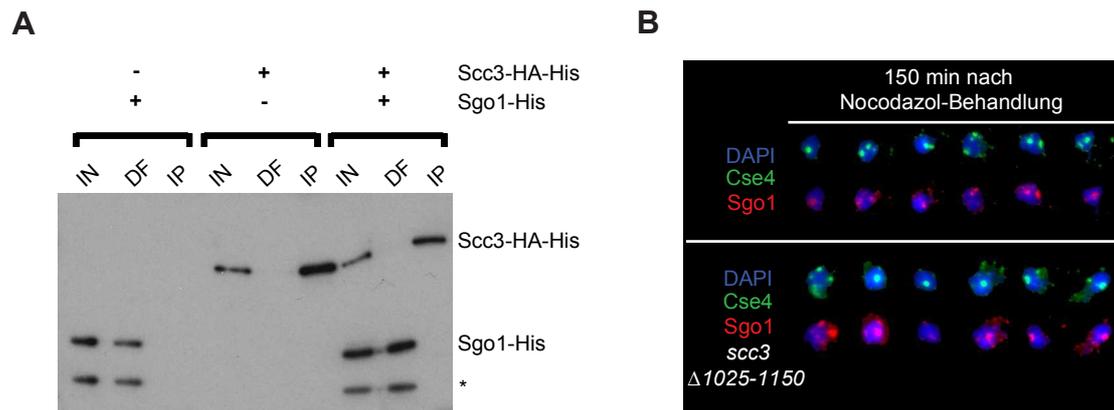
Zahlreiche Mutationen in verschiedenen Komponenten des Metaphase-Kontrollpunkts führen ebenfalls zu einem Absterben der Zellen nach der Zugabe von Nocodazol [230], da der Kontrollpunkt auf nicht angeheftete Mikrotubuli nicht reagieren kann und es dadurch zur fehlerhaften Verteilung der Chromosomen kommt. In SCC3-Degron-Zellen ist der Kontrollpunkt allerdings aktiv, Substrate des APC/C-Komplexes wie Cyclin B und Securin

werden stabilisiert (Dr. Dmitri Ivanov, persönliche Kommunikation). Die Zellen sterben also trotz eines aktivierten Kontrollpunkts ab.

Mutationen in Sgo1 [169] sowie Bub1 (Budding uninhibited by Benzimidazole; [229]), einer Komponente des Metaphase-Kontrollpunkts, führen ebenfalls zu einem Verlust der Lebensfähigkeit nach der Zugabe von Nocodazol, obwohl in diesen Zellen der Metaphase-Kontrollpunkt aktiviert werden kann. Es wurde gezeigt, dass Bub1 für die korrekte Lokalisation von Sgo1 notwendig ist [229]. In *sgo1*-Zellen können nicht angeheftete Mikrotubuli zwar erkannt werden und führen auch zu einer Aktivierung des Kontrollpunkts, die Fähigkeit fehlende Spannung zwischen den Schwesterkinetochoren zu erkennen, ist aber nicht mehr gegeben [12]. Werden die *sgo1*-Zellen mit Nocodazol behandelt und das Spindelgift wird anschließend ausgewaschen, so wird in diesen Zellen der Spindelapparat zwar neu aufgebaut, angeheftete Mikrotubuli, die keine Zugspannung verursachen, werden allerdings nicht erkannt. Die fehlerhaften Anheftungen werden in der Folge nicht korrigiert. Dadurch kommt es zu massiven Problemen bei der späteren Aufteilung der Chromosomen und die Zellen sterben letztendlich ab. Es wurde postuliert, dass die Chromosomen in einem ungestörten Zellzyklus eine intrinsische Veranlagung besitzen, die Kinetochore an Mikrotubuli von gegenüberliegenden Spindelpolen anzuheften [12].

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob der Verlust der Überlebensfähigkeit von SCC3-Degron-Zellen nach der Behandlung mit Nocodazol auf eine fehlerhafte Lokalisation von Sgo1 zurückgeführt werden kann. Eine Möglichkeit stellt dabei die direkte Interaktion zwischen Sgo1 und Scc3 dar, die im SCC3-Degron-Stamm aufgrund des Fehlens von Scc3 nicht mehr gegeben wäre. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden rekombinant aufgereinigte Scc3-HA-His- und Sgo1-His-Proteine in einem Immunopräzipitationsexperiment verwendet (Abb. 2.21A).

Sgo1 kann nicht mit Scc3-HA immunopräzipitiert werden, eine direkte Interaktion *in vitro* besteht nicht. Eine (in)direkte oder durch posttranslationale Modifikationen vermittelte Interaktion zwischen Scc3 und Sgo1 *in vivo* kann mit Hilfe dieses Experiments allerdings nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 2.21: Scc3 und Sgo1 interagieren nicht und Scc3 ist vermutlich nicht für die Lokalisation von Sgo1 notwendig.**

(A) Scc3-HA-His, Sgo1-His sowie beide Proteine zusammen wurden mit  $\alpha$ -HA-Agarose-Beads präzipitiert. Der Input (IN), der Durchfluss (DF) und die Immunopräzipitation (IP) wurden durch eine Western-Blot-Analyse mit einem  $\alpha$ -His-Antikörper untersucht. Die schwere Kette des  $\alpha$ -HA-Antikörpers ist durch einen Stern (\*) markiert.

Sgo1 kann nicht mit Scc3 koimmunopräzipitiert werden, eine direkte Interaktion besteht *in vitro* also nicht.

(B) Hefestämme, die die angezeigten Proteine als Epitop-getaggte Varianten exprimieren, wurden angezogen und in der  $G_1$ -Phase synchronisiert. Anschließend wurden sie in einen Nocodazol-induzierten  $G_2/M$ -Arrest entlassen und für 2 h inkubiert. Dann wurde das Spindelgift ausgewaschen, nach weiteren 2,5 h wurden Chromosomenspreizungen angefertigt und ausgewertet. Die Epitop-getaggten Proteine wurden dabei durch Immunofluoreszenz, die DNS durch DAPI-Färbung visualisiert.

Scc3 ist für die DNS-Lokalisation von Sgo1 wahrscheinlich nicht notwendig, das Sgo1-Protein kolokalisiert auch in der *scc3*-Deletionsmutante im Bereich der Zentromere.

Daher wurde untersucht, ob die DNS-Lokalisation von Sgo1 vom Scc3-Protein abhängig ist. Dazu wurde ein Hefestamm verwendet, in welchem das Zentromer-assoziierte Protein Cse4 (Chromosome Segregation) HA-getaggt und Sgo1 MYC-getaggt vorliegt. Um die Rolle von Scc3 bei der Lokalisation von Sgo1 zu untersuchen, wurde eine Deletionsmutante ( $\Delta$ As1025-Ende) verwendet, die nach Behandlung mit Nocodazol den gleichen Phänotyp wie der SCC3-Degron-Stamm zeigt (Dr. Dmitri Ivanov, persönliche Kommunikation). Die Hefen wurden in der  $G_1$ -Phase synchronisiert und in einen  $G_2/M$ -Arrest mit Nocodazol entlassen. Nach zwei Stunden wurde das Gift ausgewaschen und die Zellen in frischem Medium inkubiert. Nach 150 Minuten wurden Chromosomenspreizungen angefertigt und ausgewertet

(Abb. 2.21B). Sgo1 (rot) kolokalisiert in den meisten Fällen mit dem Zentromer (grün). Das Muster der Kolokalisation ist dabei zwischen dem Wildtyp und der *scc3*-Deletionsmutante nicht zu unterscheiden.

Auch nach diesen Experimenten bleibt es somit weiterhin ungeklärt, wieso der Verlust von Scc3 zum Zelltod nach der Behandlung mit Nocodazol führt.

## **2.4. Die Acetyltransferase Eco1**

Das Eco1-Protein (Abschnitt 1.4.4.1) ist für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenziell, für die folgende Aufrechterhaltung der Kohäsion zwischen den beiden Schwesterchromatiden ist das Protein allerdings nicht mehr notwendig [53,118]. Das Eco1-Protein der Bäckerhefe ist 31 kDa groß und der N-terminale Teil besitzt ein PIP-Box-Motiv, welches für die Bindung an PCNA verantwortlich ist [110]. Auf den N-Terminus folgt eine Zinkfinger-Domäne, ein ungeordneter mittlerer Teil der als Degron fungiert [130] und eine C-terminal lokalisierte Acetyltransferase-Domäne [117]. Die Acetyltransferase gehört zur Familie der GNAT-Acetyltransferasen, einige typische Sekundärstrukturelemente scheinen allerdings zu fehlen [117]. Strukturelle Informationen über das Eco1-Protein der Bäckerhefe oder über homologe Proteine in anderen Organismen gibt es bisher nicht. Diese Informationen würden allerdings helfen, die Funktion dieses Proteins im Kontext der Schwesterchromatid-Kohäsion genauer zu verstehen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Kristallstruktur des Eco1-Proteins aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* zu lösen.

### **2.4.1. Die Expression und Aufreinigung von Eco1**

Die Expression des Eco1-Proteins in *E. coli* als His-getaggte Variante oder als GST-Fusionsprotein war sehr schlecht und resultierte lediglich in unlöslichem Protein (Daten nicht gezeigt). Daher wurde eine für *E. coli* Codon-optimierte Gensequenz von *ECO1* bestellt (Genscript) und die Expression mit N- oder C-terminalem His-Tag analysiert. Beide Konstrukte resultierten in einer guten Expression und ermöglichten eine Aufreinigung des Eco1-Proteins in

ausreichender Menge und löslicher Form. Im Anhang ist eine beispielhafte Aufreinigung des Eco1-6xHis-Proteins zu finden (Abb. 6.1). Leider war keiner der zahlreichen durchgeführten Kristallisationsversuche mit dem Eco1-Protein (verschiedene Pufferzusätze, verschiedene Proteinkonzentrationen, Zugabe von bekannten Co-Faktoren wie Coenzym A) erfolgreich. Vermutlich ist das Eco1-Protein während der Kristallisationsversuche ausgefallen, da es auch bei relativ niedrigen Konzentrationen (1-5 mg/ml) nur wenige Stunden in Lösung gehalten werden konnte. Verschiedene Teilkonstrukte von Eco1, die auf der bereits bekannten Domänenanordnung des Proteins basieren (Abschnitt 1.4.4.1 und [117]), wurden in *E. coli* auch mit der Codon-optimierten Sequenz nur sehr schlecht exprimiert und konnten nur unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden (Tabelle 2.1). Eine Rückfaltung war nicht möglich. Die Kristallisation des Eco1-Proteins war somit weder in Fragmenten noch als ganzes Protein möglich.

**Tabelle 2.1: Die verschiedenen Eco1-Konstrukte.**

Alle angezeigten Konstrukte wurden mit der für *E. coli* Codon-optimierten *eco1*-Sequenz als Template kloniert.

Konstrukt	Expression	Löslichkeit
Eco1(As 1-33)-His	ja	nein
His-Eco1(As 1-63)	ja	nein
His-Eco1(As 1-79)	ja	nein
Eco1(As 1-109)-His	ja	nein
Eco1(As 34-281)-His	ja	nein
Eco1(As 107-281)-His	ja	nein
Eco1(As 113-281)-His	ja	nein

Da die Kristallisation von Eco1 alleine nicht erfolgreich war, wurde versucht, das Protein zusammen mit seinem bekannten Bindungspartner PCNA [110] zu kristallisieren. PCNA bildet einen trimeren Ring aus drei identischen Untereinheiten [231,232] und spielt bei der Replikation der DNS eine entscheidene Rolle. PCNA ist für die Prozessivität der replikativen DNS-Polymerasen verantwortlich [233] und agiert daneben auch als eine Art Plattform, die für die Rekrutierung zahlreicher Faktoren für Prozesse während oder nach der Replikation verantwortlich ist (für einen Überblick siehe

[126,127]). PCNA spielt unter anderem bei der Prozessierung der Okazaki-Fragmente [234,235] und dem Zusammenbau der Histone direkt nach der DNS-Replikation [236,237] eine wichtige Rolle.

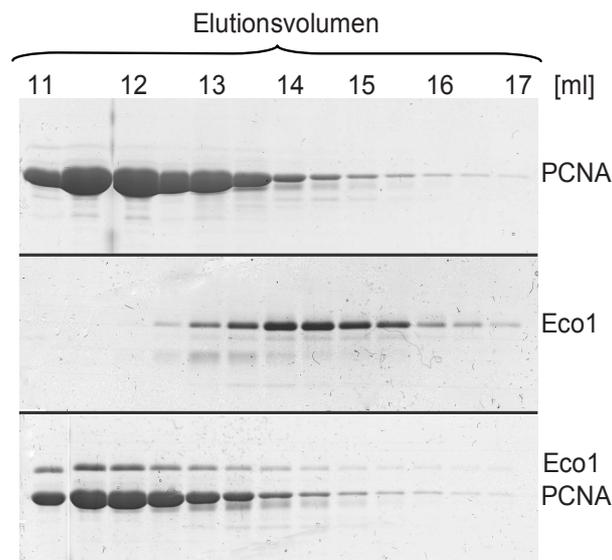
Die Kristallstruktur von PCNA ist bereits seit fast zwei Jahrzehnten bekannt [231,232], zudem wurden in den darauf folgenden Jahren die Strukturen zahlreicher Bindungspartner im Komplex mit PCNA gelöst [234,238,239,240]. Das rekombinante PCNA-Protein resultierte bereits nach wenigen Tagen in Kristallen mit einer Auflösung von bis zu 2,5 Å (Daten nicht gezeigt).

#### **2.4.2. Eco1 bildet einen stabilen Komplex mit PCNA**

Eco1 interagiert mit PCNA *in vivo* und als GST-Fusion auch *in vitro*. Für die Interaktion ist das PIP-Box-Motiv QxxL/I (x steht für eine beliebige Aminosäure) im N-Terminus des Eco1-Proteins notwendig und ausreichend [110]. Das PIP-Box-Sequenzmotiv von Eco1 stellt dabei die kleinste mögliche Variante dieses PCNA-Bindemotivs dar. In anderen PCNA-Bindeproteinen, die eine PIP-Box aufweisen, ist die Kernsequenz QxxL/I am Carboxy-Ende zusätzlich von den Aminosäuren xxFF flankiert, in seltenen Fällen existiert auch ein N-terminal lokalisiertes Sequenzmotiv KAx [110,127,240].

PCNA ist ein Homotrimer und besitzt daher im Prinzip drei identische Bindestellen für das Eco1-Protein. Es ist unklar, wieviele Moleküle Eco1 pro PCNA-Homotrimer binden können. Das molare Verhältnis des PCNA-Homotrimers zu seinem Interaktionspartner kann für eine erfolgreiche Kristallisation allerdings entscheidend sein [234]. Daher wurde in dieser Arbeit die Bindung von rekombinantem Eco1 an PCNA genauer untersucht.

Dazu wurde das Elutionsvolumen von Eco1 und PCNA jeweils alleine auf einer analytischen Gelfiltrationssäule bestimmt (Abb. 2.22). Anschließend wurden verschiedene Verhältnisse von Eco1 zu PCNA analysiert. Es zeigte sich, dass ein 1:1 Verhältnis (Eco1 : PCNA-Homotrimer) in einem kompletten Shift des Eco1-Proteins resultiert (Abb. 2.22). Der Shift kann durch die Bildung eines Eco1/PCNA-Komplexes erklärt werden. Der Einsatz von mehr Eco1-Protein führte hingegen zu keinem weiteren Shift sondern sogar zur Dissoziation des PCNA-Homotrimers und zur Präzipitation beider Proteine (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 2.22: Eco1 und PCNA bilden einen Komplex *in vitro*.**

Rekombinant aufgereinigtes Eco1- bzw. PCNA-Protein wurde auf eine analytische Gelfiltrationssäule („Superose 6 10/300 GL“ (GE Healthcare)) aufgetragen und die einzelnen Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE analysiert. Die Mischung der Eco1- und PCNA-Proteine im Verhältnis 1:1 (Eco1 : PCNA-Homotrimer) verursacht einen

kompletten Shift des Eco1-Proteins, während das Elutionsvolumen des PCNA-Proteins größtenteils unverändert bleibt. Der Shift des Eco1-Proteins wird durch eine stabile Interaktion mit PCNA verursacht.

Es bindet also etwa ein Eco1-Protein pro PCNA-Homotrimer, die Zugabe von mehr Eco1-Protein hat dagegen negative Auswirkungen auf die Bildung des Eco1/PCNA-Komplexes. Daher wurde für den Kristallisationsversuch beider Proteine ein 1:1 Verhältnis (Eco1 : PCNA-Homotrimer) angesetzt. Die entstehenden Kristalle enthielten allerdings nur PCNA.

Eine erzwungene gemeinsame Kristallisation durch Fusion des Eco1-Proteins an den N- oder den C-Terminus des PCNA-Monomers war ebenfalls nicht erfolgreich. Beide Fusionskonstrukte konnten nur unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden, eine Rückfaltung war nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

### 2.4.3. Die Kristallstruktur von PCNA im Komplex mit einem Eco1-Peptid

Um die Bindung von Eco1 an PCNA auf struktureller Ebene zu verstehen, wurde versucht, den für die PCNA-Bindung verantwortlichen N-Terminus des Eco1-Proteins als MBP- oder Trx-Fusionsprotein (Maltosebindeprotein; Thioredoxin) zu exprimieren. Basierend auf dem Vergleich der Eco1-Sequenzen verschiedener Pilze sowie Vorhersagen der Sekundärstruktur

(siehe Anhang, Abb. 6.2) wurden verschiedene Konstrukte erstellt (Tabelle 2.2). Eco1(As 1-26) enthält nur den N-terminalen Teil des Proteins mit dem PIP-Box-Motiv, Eco1(As 1-63) besitzt zusätzlich die nachfolgende Zinkfinger-Domäne, das Eco1(As 1-79)-Konstrukt beinhaltet neben der PIP-Box und dem Zinkfinger noch den folgenden  $\beta$ -Strang am Carboxy-Terminus.

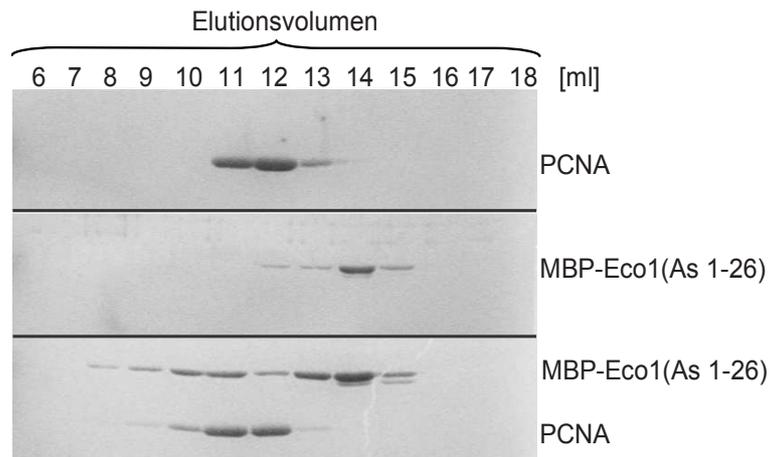
**Tabelle 2.2: Die verschiedenen Fusionskonstrukte mit N-terminalen Bereichen des Eco1-Proteins.**

Alle gezeigten Konstrukte wurden mit der für *E. coli* Codon-optimierten *eco1*-Sequenz als Template kloniert.

Konstrukt	Expression	Löslichkeit
Trx-Eco1(As 1-26)	nein	nein
Trx-Eco1(As 1-63)	nein	nein
Trx-Eco1(As 1-79)	nein	nein
MBP-Eco1(As 1-26)	ja	ja
MBP-Eco1(As 1-63)	ja	nein
MBP-Eco1(As 1-79)	ja	nein

Alle Konstrukte, die die Zinkfinger-Domäne besitzen, resultierten in einem unlöslichen Fusionsprotein, welches nicht zurückgefaltet werden konnte. Die Fusion der ersten 26 Aminosäuren an das Maltosebindepotein resultierte dagegen in einer guten Expression und einem löslichen Fusionsprotein. Eine beispielhafte Aufreinigung des MBP-Eco1(As 1-26)-Fusionsproteins ist im Anhang zu finden (Abb. 6.3). Mit Hilfe analytischer Gelfiltration wurde die PCNA-Bindung des MBP-Eco1(As 1-26)-Fusionsproteins untersucht (Abb. 2.23). Das MBP-Eco1(As 1-26)-Fusionsprotein interagiert ebenso wie das komplette Eco1-Protein mit PCNA.

Leider resultierten Kristallisationsversuche des Fusionsproteins mit PCNA in verschiedenen Verhältnissen nur in Kristallen, die das PCNA-Protein alleine enthielten. Eine Abspaltung des MBP-Tags war trotz vorhandener TEV-Erkennungssequenz nicht möglich.



**Abb. 2.23: Das MBP-Eco1(As 1-26)-Fusionsprotein interagiert mit PCNA.**

MBP-Eco1(As 1-26) bzw. PCNA wurde auf eine analytische Gelfiltrations säule („Superose 6 10/300 GL“ (GE Healthcare)) aufgetragen und die einzelnen Elutionsfraktionen

wurden mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE analysiert. Eine Mischung von MBP-Eco1(As 1-26) und PCNA wurde ebenfalls analysiert.

Die Mischung des Fusionsproteins mit PCNA resultiert in einem starken Shift von MBP-Eco1(As 1-26). Die Interaktion von MBP-Eco1(As 1-26) und dem PCNA-Homotrimer ist somit vorhanden.

Daher wurde versucht, bereits vorhandene PCNA-Kristalle mit einem Peptid, welches die PIP-Box-Sequenz des Eco1-Proteins (NLIQSKLQVNNNGSKS) beinhaltet, zu „soaken“. Mit diesem Ansatz wurden Kristalle mit einer Auflösung von bis zu 2,5 Å erreicht (Tabelle 2.3), in der asymmetrischen Einheit war jede PCNA-Untereinheit an ein Eco1-Peptid gebunden. Jedes PCNA-Monomer ist in zwei  $\alpha+\beta$  Domänen<sup>6</sup> gefaltet, welche durch einen langen Loop (IDCL, Interdomain-connecting Loop) verbunden sind (Abb. 2.24A). Die  $\alpha$ -Helices sind dabei zur Innenseite des Rings gerichtet, die  $\beta$ -Faltblätter bilden die Außenseite des Rings. Diese Anordnung ist charakteristisch für alle Prozessivitätsfaktoren der DNS-Replikation [242,243], die hier gezeigte Struktur ist zudem mit der Kristallstruktur des PCNA-Moleküls alleine nahezu identisch [231].

Die Elektronendichte des Peptids war an zwei der drei PCNA-Untereinheiten (Monomer II und III) ausreichend um acht (Monomer II) bzw. neun (Monomer III) Aminosäuren des Peptids modellieren zu können. Die Elektronendichte um

<sup>6</sup>  $\alpha+\beta$ -Domänen zeichnen sich durch räumlich getrennte  $\alpha$ -Helices und (meist antiparallele)  $\beta$ -Faltblätter aus, in denen im Gegensatz zur  $\alpha/\beta$ -Domäne  $\beta\alpha\beta$ -Supersekundärstrukturen fehlen [241].

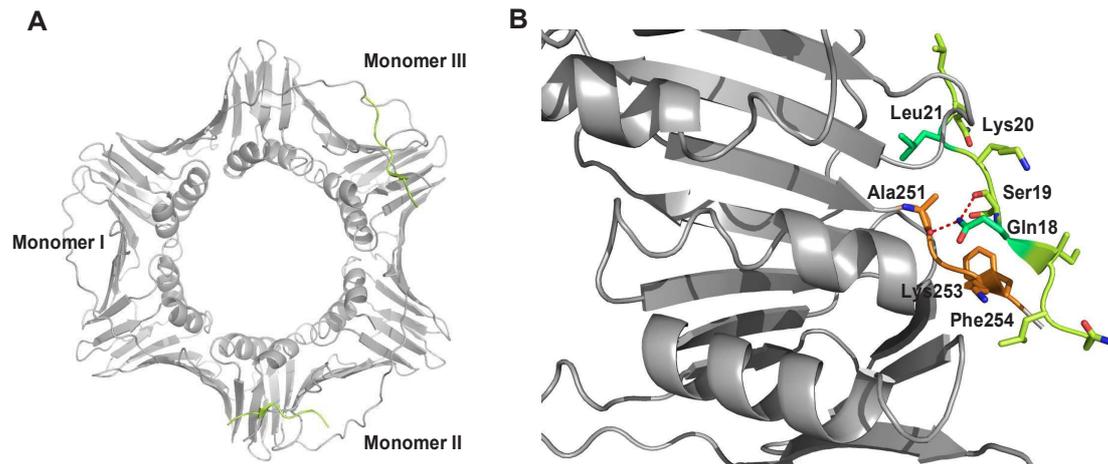
das PIP-Box-Motiv QSKL war dabei sehr gut definiert und erlaubte eine genaue Anordnung der Seitenketten. Die restlichen Aminosäuren wurden auf Basis der Positionierung dieser vier Aminosäuren modelliert. Die übrigen Aminosäuren des Peptids waren ungeordnet und zeigten keine klar definierte Elektronendichte.

**Tabelle 2.3: Die Diffraktionsdaten der Röntgenstrukturanalyse des PCNA/Eco1-Peptid-Komplexes.**

Die jeweiligen Werte in Klammern beziehen sich auf die äußere Resolution-Shell.

Diffraktionsdaten der Röntgenstrukturanalyse	PCNA/Eco1-Peptid
Wellenlänge [Å]	1
Raumgruppe	P1
Dimensionen der Elementarzelle [Å bzw. °]	a=70,580, b=84,580, c=84,690, $\alpha=119,93$ , $\beta=98,68$ , $\gamma=100,33$
Auflösungsgrenzen [Å]	38-2,45 (2,60-2,45)
Vollständigkeit [%]	96,3 (94,3)
Redundanz [%]	2,43 (2,48)
$I/\sigma(I)$	11,96 (1,77)
$R_{\text{merge}}$ [%]	5,1 (57,7)
<b>Modellverfeinerung</b>	
Auflösungsgrenzen [Å]	38-2,45 (2,51-2,45)
$R_{\text{cryst}}$ [%]	0,21 (0,29)
$R_{\text{free}}$ [%]	0,29 (0,39)

Ähnlich wie in anderen PCNA/PIP-Box-Peptid-Strukturen bildet das Eco1-Peptid einen kurzen  $\beta$ -Strang (Ile17, Gln18) aus, der zusammen mit einem  $\beta$ -Strang im C-Terminus von PCNA (Lys253, Phe254) ein  $\beta$ -Faltblatt formt (Abb. 2.24B). In einem ungebundenen PCNA-Molekül liegt dieser  $\beta$ -Strang nicht vor, hier bilden die Aminosäuren Lys253, Phe254 und Asn255 mit den letzten drei Aminosäuren Asp256, Glu257 und Glu258 stattdessen eine Haarnadelstruktur aus [231]. Durch die Bindung des PIP-Box-Peptids bildet sich im C-Terminus von PCNA ein  $\beta$ -Strang und die letzten drei Aminosäuren (Asp256, Glu257, Glu258) liegen ungeordnet vor (Abb. 2.24 und [240]).



**Abb. 2.24: Die Kristallstruktur von PCNA im Komplex mit dem Eco1-Peptid.**

(A) Gesamtansicht der Kristallstruktur von PCNA (grau) im Komplex mit dem Eco1-Peptid (grün). Für die an PCNA gebundenen Peptide sind nur die Reste NLIQSKLQ (Monomer II) bzw. NLIQSKLQV (Monomer III) angezeigt. Die restlichen Aminosäuren sind ungeordnet und weisen keine definierte Elektronendichte auf. Für die Modellierung des an Monomer I gebundenen Peptids war die Qualität der Elektronendichte nicht ausreichend. (B) Detailansicht des Modells im Bereich der PCNA/PIP-Box-Bindestelle. Das für die Bindung verantwortliche  $\beta$ -Faltblatt wird von den Resten Ile17 und Gln18 des Eco1-Peptids (grün) sowie Lys253 und Phe254 von PCNA (orange) ausgebildet. Zusätzlich wird die Bindung durch die Wasserstoffbrückenbindungen (rote gestrichelte Linien) zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Gln18 (grün) und dem Carbonylsauerstoff von Ser19 (Eco1 Peptid, grün) sowie dem Carbonylsauerstoff von Ala251 (PCNA, orange) stabilisiert. Die letzten drei Aminosäuren von PCNA (Asp256, Glu257, Glu258) liegen aufgrund der Peptidbindung ungeordnet vor und sind daher im Modell nicht dargestellt.

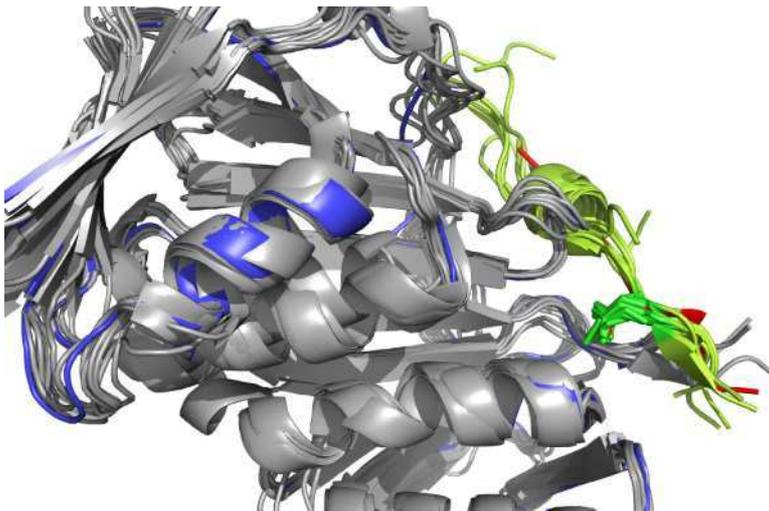
Die  $3_{10}$ -Helix<sup>7</sup>, die in den meisten PIP-Box-Motiven im Sequenzbereich LXXFF ausgebildet ist und welche als eine Art hydrophober Anker an die Bindetasche von PCNA, die durch Aminosäuren im N-Terminus und dem IDCL definiert ist, binden kann [245,246], ist hingegen nicht vorhanden. Das Fehlen der Helix ist dabei wahrscheinlich durch die nicht vorhandene C-terminal flankierende Sequenz XXFF zu erklären.

Das Eco1-Protein bindet also über das konservierte PIP-Box-Motiv QSKL an PCNA, das  $\beta$ -Faltblatt im Bereich Ile17 und Gln18 (Eco1-Peptid) bzw. Lys253

<sup>7</sup> Die  $3_{10}$ -Helix ist eine rechtshändig gedrehte Helix, die im Gegensatz zur gewöhnlichen  $\alpha$ -Helix nur 3 statt 3,6 Aminosäuren pro Drehung besitzt. Daher ist die  $3_{10}$ -Helix weniger stabil, häufig sind nur kurze Bereiche in einem Protein in eine  $3_{10}$ -Helix gefaltet [244].

und Phe254 (PCNA) sowie die Wasserstoffbrücken zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Gln18 und dem Carbonylsauerstoff von Ser19 (Eco1-Peptid) bzw. von Ala251 (PCNA) sind dabei für die Bindung verantwortlich. Die klassische  $3_{10}$ -Helix des PIP-Box-Motivs fehlt dagegen.

Um zu zeigen, dass die PCNA/Eco1-Bindung auch auf struktureller Ebene konserviert ist, wurde das Modell des PCNA/Eco1-Peptid-Komplexes mit den bekannten Strukturen anderer PCNA/PIP-Box-Protein-Komplexe überlagert. Es wurden alle bekannten Strukturen aus Eukaryoten und Archaeobakterien verwendet (Abb. 2.25). Die Bindung des Peptids ist in allen Strukturen bemerkenswert ähnlich, speziell die Lage und Anordnung des  $\beta$ -Faltblatts und die Seitenkette des konservierten Glutamins (selten Methionin) ist in allen Strukturen nahezu identisch.



**Abb. 2.25: Die PCNA/Eco1-Bindung ist stark konserviert.**

Die Detailansicht des PCNA/Eco1-PIP-Box-Modells (blau: PCNA, rot: Eco1-Peptid) wurde mit bekannten Strukturen anderer PCNA/PIP-Box-Protein-Komplexe überlagert (grau: PCNA, hellgrün: PIP-Box-Peptid). Für das konservierte Glutamin (selten Methionin) ist die Seitenkette angezeigt (rot: Eco1-Peptid, grün: andere PIP-Box-Peptide), alle anderen Seitenketten sind zugunsten der Übersichtlichkeit ausgeblendet worden. Die verwendeten eukaryotischen Strukturen sind: 2OD8 [240], 3P87 [238], 2ZVK [239], 2ZVL [239], 2ZVM [239], 1VYJ [247], 1U7B [248], 1U76 [248], 2ZVV [249] und 2ZVW [249]. Die verwendeten Strukturen aus Archaeobakterien sind: 1RXZ [250] und 1ISQ [251].

### 3. Diskussion

Der Cohesinkomplex, bestehend aus den drei Kernkomponenten Scc1, Smc1 und Smc3, ist für die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden verantwortlich. Die Proteine bilden dabei einen ringförmigen Komplex, dessen Integrität für die Interaktion mit den Chromosomen notwendig ist. Die Funktion der Cohesin-assoziierten Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 ist dagegen weniger gut verstanden.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von Pds5, Scc3 und Wpl1 im Kontext der Schwesterchromatid-Kohäsion genauer untersucht. Um die Anordnung der Cohesin-assoziierten Proteine als Teil des Kernkomplexes zu verstehen wurden *in vitro*-Interaktionsstudien mit rekombinant aufgereinigten Proteinen durchgeführt. Mit Hilfe von Depletions- bzw. Deletionsmutanten wurde die Funktion dieser Proteine *in vivo* überprüft.

Durch die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse kann die Rolle dieser Cohesin-assoziierten Proteine bei der Schwesterchromatid-Kohäsion genauer eingegrenzt werden. Die eigentliche Funktion von Pds5 und Scc3 bleibt allerdings weiterhin ungeklärt, weitere Studien sind für eine vollständige Aufklärung notwendig.

#### 3.1. Interaktionen von Pds5, Scc3, Wpl1 und Cohesin

Die Interaktion der Cohesin-assoziierten Proteine mit Cohesin unterscheidet sich zwischen verschiedenen Spezies. Im Menschen ist Scc1 für die direkte Bindung von Pds5, Scc3/SA und Wapl verantwortlich. Jedes der drei Proteine interagiert dabei direkt mit Scc1, die Bindung von Wapl und Pds5 wird durch einen bereits bestehenden Scc1/Scc3-Komplex verstärkt [54,56]. Pds5 und Wapl bilden einen weiteren stabilen Subkomplex aus, der nur schwach mit den Chromosomen assoziiert ist [55]. Die für diese Protein-Interaktionen notwendigen Bereiche (die sogenannte Rad21/Rec8-Homologie-Stelle im mittleren Bereich von Scc1 sowie der N-terminale Teil von Wapl mit seinen vier konservierten FGF-Motiven) sind nur innerhalb der Vertebraten

konserviert, in anderen Eukaryoten wie der Bäckerhefe sind diese nicht vorhanden [56]. In *S. cerevisiae* ist der C-Terminus von Scc1 für die Bindung von Scc3 verantwortlich [32]. Die Cohesinbindung von Pds5 ist auch in der Bäckerhefe von Scc1 abhängig, FRAP-Experimente zeigen allerdings auch eine Lokalisierung von Pds5 an der Dimerisierungsdomäne der beiden Smc-Proteine [220].

In dieser Arbeit konnten mit Hilfe rekombinanter Proteine und Glycerol-Dichtegradienten die Interaktionen zwischen Pds5 und Wpl1 sowie Scc3 und Wpl1 nachgewiesen werden. Ein ternärer Komplex aus Pds5, Scc3 und Wpl1 ist ebenfalls vorhanden (Abb. 2.1). Der trimere Proteinkomplex wandert für seine Größe ungewöhnlich schnell durch den Dichtegradienten, was a) auf eine hohe Dissoziationsrate oder b) auf eine langgezogene Form des Komplexes schließen lässt. Die Interaktionen zwischen Pds5, Scc3 und Wpl1 stehen in Übereinstimmung mit einer im Verlauf dieser Arbeit erschienenen Publikation [68]. In dieser Studie wurden die Interaktionen zwischen den Cohesin-assoziierten Proteinen allerdings mit Hilfe analytischer Gelfiltrations-Chromatographie untersucht und die beschriebenen Komplexe eluierten im Bereich der Ausschlussgrenze der verwendeten Säule. Es ist bei diesen Experimenten daher unklar, ob einige der Komplexe auf mögliche Proteinaggregation und nicht auf eine Komplexbildung zurückzuführen sind. Im Gegensatz dazu sind die in dieser Arbeit gefundenen Komplexe zwischen Pds5/Wpl1, Scc3/Wpl1 und Pds5/Scc3/Wpl1 mit Sicherheit keine Proteinaggregate, alle beschriebenen Komplexe waren im mittleren Teil des Gradienten zu finden. Proteinaggregate würden hingegen sehr schnell auf den Boden des Gradienten absinken.

Die Bindung der Cohesin-assoziierten Proteine an Scc1 konnte durch Dichtegradientenzentrifugation nicht untersucht werden, da rekombinantes Scc1 unlöslich war. Durch Pull-down-Experimente mit GST-Scc1 (Vikash Verma, persönliche Kommunikation) konnte allerdings nachgewiesen werden, dass Pds5/Wpl1 an den N-Terminus von Scc1 und Scc3/Wpl1 an den C-Terminus des Scc1-Proteins bindet [129]; die Bindung von Pds5 an den N-Terminus von Scc1 wurde kürzlich in einer weiteren Studie bestätigt [66].

Das Wpl1-Protein der Bäckerhefe benötigt seinen N-Terminus für die Bindung an Pds5 und Scc3, der C-Terminus von Wpl1 alleine interagiert weder mit

Pds5 noch mit Scc3 (Abb. 2.2B). Da die FGF-Motive im Wpl1-Protein von *S. cerevisiae* nicht vorhanden sind, ist bisher noch nicht verstanden, welche Aminosäuren des Wpl1-Proteins für die Bindung notwendig sind.

Die Immunopräzipitationsexperimente dieser Arbeit (Abschnitt 2.3.4) zeigen, dass Pds5 und Scc3 in der Bäckerhefe im Unterschied zum Menschen voneinander unabhängig mit dem Cohesinkomplex interagieren können. Die Menge an Cohesin-gebundenem Pds5 wird durch die Abwesenheit von Scc3 nicht beeinflusst, das Gleiche gilt für Scc3 bei einer stark reduzierten Menge an Pds5-Protein. Die Cohesinbindung von Wpl1 erfolgt hauptsächlich durch Pds5, da im *PDS5*-Degron-Hintergrund nur sehr wenig Wpl1-Protein mit Cohesin präzipitiert werden kann. Die Depletion von Scc3 zeigt hingegen nur eine leichte Beeinträchtigung der Wpl1-Assoziation mit Cohesin.

Pds5, Scc3/SA und Wpl1/Wapl bilden also sowohl in höheren Eukaryoten [54,55,56] wie auch in weniger komplexen Organismen wie der Bäckerhefe (diese Arbeit und [129]) einen trimeren Komplex aus. Die Bindung an Cohesin erfolgt dabei über Scc1. Die Stabilität der einzelnen Subkomplexe ist in verschiedenen Organismen allerdings unterschiedlich ausgeprägt, ebenso unterscheiden sich die für die Interaktion verantwortlichen Proteinbereiche. Während Pds5 und Scc3 stabil an Cohesin gebunden vorliegen (diese Arbeit und [46,66,129]) ist die Bindung von Wpl1 an Cohesin nur sehr schwach (diese Arbeit und [55,66,129]). Übereinstimmend damit sind die in der Bäckerhefe vorhandenen etwa<sup>8</sup> 700 Wpl1-Moleküle [225] nicht ausreichend, um jeden in der Zelle vorhandenen Cohesinkomplex abzudecken. Eine im Verlauf dieser Arbeit erschienene Studie zeigt ebenfalls, dass Wpl1 nur transient und in substöchiometrischen Mengen an den Cohesinkomplex bindet [66].

Seit der Entdeckung des Cohesinkomplexes und dessen Rolle bei der Schwesterchromatid-Kohäsion [33,53,108,118] wurden in zahlreichen Studien

---

<sup>8</sup> Die genaue Anzahl an Wpl1-Molekülen in der erwähnten Studie [225] beträgt 721.

verschiedene Interaktionen zwischen Kernkomponenten von Cohesin und Cohesin-assoziierten Proteinen berichtet, die bisher nicht bestätigt werden konnten: Pds5 wurde *in vivo* an der Dimerisierungsdomäne der Smc-Proteine beobachtet [220], für das Beladen der DNS mit Cohesin wurde eine direkte Interaktion zwischen den ATPase-Domänen und der Dimerisierungsdomäne der Smc-Proteine postuliert [98,220] und in einigen Organismen wurde eine direkte Interaktion zwischen Pds5 und Eco1 gezeigt [61]. In dieser Arbeit konnte keine dieser Interaktionen bestätigt werden (Abschnitt 2.2). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass einige dieser Interaktionen *in vivo* auf zusätzliche Ereignisse wie z. B. posttranslationale Modifikationen angewiesen sind und daher *in vitro* nicht nachgewiesen werden konnten.

### **3.2. Pds5, Scc3, Wpl1 und die DNS-Assoziation von Cohesin**

Pds5 und Scc3 sind in der Bäckerhefe essenziell, temperatursensitive Mutationen in diesen Proteinen verursachen schwere Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion. Scc3 liegt stabil an den Cohesinkomplex gebunden vor (Abschnitt 2.3.4 und [46]) und die DNS-Assoziation von Scc3 über den gesamten Zellzyklus gleicht der von Scc1 [134]. Die Bindung von Pds5 an Cohesin ist weniger stark [46]. Kürzlich durchgeführte FRAP-Studien lassen jedoch vermuten, dass Pds5 unter physiologischen Bedingungen ebenfalls stabil an den Cohesinkomplex binden kann [66,129]. Die Immunopräzipitationsexperimente in dieser Arbeit (Abschnitt 2.3.4) deuten ebenfalls auf eine stabile Assoziation von Pds5 mit Cohesin hin. Sowohl Pds5 wie auch Scc3 gelten seit ihrer Entdeckung als für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion notwendige Faktoren [51,52,53,57], auch wenn ihre molekulare Funktionsweise bisher immer noch nicht verstanden ist. Andererseits sind beide Proteine aber auch an Prozessen, die eine Dissoziation Cohesins von der DNS zur Folge haben, beteiligt. Die Phosphorylierung von Scc3/SA ist in Säugetieren für die Entfernung eines Großteils an DNS-gebundenem Cohesin während der Mitose (Prophase-Weg) notwendig [58]. Pds5 ist als Teil des Releasinkomplexes direkt für diese Dissoziation verantwortlich, auch wenn der molekulare Ablauf bisher nicht

verstanden ist [30,56,66]. In der Bäckerhefe ist der Prophase-Weg nicht vorhanden [66].

Es wird daher vermutet, dass Pds5 und Scc3 einmal etablierte kohäsive Cohesinkomplexe stabilisieren (z. B. indem sie eine erneute Öffnung des Cohesinrings verhindern) und dadurch die Schwesterchromatid-Kohäsion aufrechterhalten. Unter bestimmten Umständen können Pds5 und Scc3 ihre stabilisierende Funktion allerdings verlieren (z. B. durch Phosphorylierungsereignisse während der Mitose) und ermöglichen so die Dissoziation Cohesins von der DNS [30,68].

Wapl bildet zusammen mit Pds5 den Releasinkomplex [56]. Eine aktuelle Studie zeigt, dass das Wpl1-Protein der Bäckerhefe ebenfalls für die Dissoziation des Cohesinkomplexes von den Chromosomen verantwortlich ist [66].

#### **3.2.1. Die Depletion von Pds5 und Scc3 *in vivo***

Während die Funktion von Wpl1 in der Bäckerhefe mit Hilfe von Deletionsmutanten untersucht werden kann, ist die Deletion der essenziellen Gene *PDS5* und *SCC3* nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, durch Fusion einer Degronsequenz an diese Proteine eine *in vivo*-Depletion zu erreichen. Das DHFR-Degron erwies sich dabei als unbrauchbar, da die DHFR-induzierte Depletion von Scc3 auch eine starke Reduktion von Scc1 zur Folge hatte. Die Auswirkung der DHFR-induzierten Depletion von Pds5 auf Scc1 war weniger stark ausgeprägt, doch auch hier war die Gesamtmenge des  $\alpha$ -Kleisins leicht reduziert (Abschnitt 2.3.1).

Dagegen ermöglichte die Fusion [129] des kürzlich beschriebenen *ECO1*-Degrons (Abschnitt 2.3.2 und [129,130]) an Pds5 und Scc3 eine effiziente Reduktion der Zielproteine, ohne dabei die Gesamtmenge von Scc1 in der Zelle (Abb. 2.5) oder die Integrität des Cohesinkomplexes selbst (Abschnitt 2.3.4) zu beeinträchtigen.

Die Proteindepletion durch das *ECO1*-Degron wird dabei durch eine stark verminderte Stabilität der Degron-Fusionsproteine verursacht. Die Wildtypvarianten von Pds5 und Scc3 liegen stabil vor, die Proteinmenge wird

durch die Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid nicht beeinflusst. Die entsprechenden Degron-Fusionsproteine sind dagegen schon kurz nach der Zugabe von Cycloheximid kaum mehr nachzuweisen (Abb. 2.8). Beide Proteine sind im Durchschnitt um den Faktor 32 reduziert (Abb. 2.7).

In einer haploiden Hefezelle liegen etwa<sup>9</sup> 4000 Scc1- [226], 6000 Smc1- und 3000 Smc3-Moleküle [225] vor. Daraus errechnen sich maximal 3000 mögliche Cohesinkomplexe in der Zelle. Nimmt man weiterhin an, dass alle Cohesinkomplexe DNS-gebunden vorliegen und die Verteilung auf die 16 Chromosomen gleichmäßig ist (die unterschiedlichen Größen der Chromosomen werden auf Kosten der Einfachheit nicht beachtet), so sind etwa 190 Cohesinkomplexe pro Chromosom vorhanden. Da allerdings etwa zwei Drittel aller Cohesinkomplexe löslich vorliegen [134] liegen sehr wahrscheinlich nur etwa 60 Cohesinkomplexe pro Chromosom vor.

Die Anzahl an Pds5-Molekülen in einer haploiden Hefezelle beträgt etwa<sup>9</sup> 8000, die Anzahl an Scc3-Molekülen lediglich 4000 [225]. Eine 32-fache Reduktion dieser Proteine durch die Fusion an das *ECO1*-Degron führt daher zu 250 Molekülen Pds5 und 125 Molekülen Scc3 in der Zelle. Daraus folgt, dass in den *PDS5*- bzw. *SCC3*-Degron-Stämmen lediglich 8% bzw. 4% der Cohesinkomplexe Pds5 bzw. Scc3 besitzen können.

### **3.2.2. Pds5, Scc3 und Wpl1 sind nicht für die stabile DNS-Assoziation von Cohesin notwendig**

Die Integrität von Cohesin ist für die Chromosomenbindung des Komplexes notwendig [45,46]. In der Bäckerhefe führt eine Reduktion von Scc1 auf 13% der normalerweise vorhandenen Proteinmenge zu 70% weniger Cohesin auf den Chromosomen [174].

Pds5 und Scc3 binden an Cohesin (Abschnitt 2.3.4 und [52,53]) und interagieren voneinander unabhängig (Abb. 2.15) und ausschließlich als Teil

---

<sup>9</sup> Die genaue Anzahl an Molekülen in der erwähnten Studie [225] sind: 7720 Moleküle Pds5, 4090 Moleküle Scc3, 5710 Moleküle Smc1 und 2660 Moleküle Smc3. Für eine einfach nachzuvollziehende Diskussion wurden die Zahlen in 1000er Schritten gerundet.

des Cohesinkomplexes (Abb. 2.17) mit der DNS. Die Immunopräzipitationsexperimente zeigen, dass die Reduktion von Pds5 bzw. Scc3 auf 8% bzw. 4% des normalen zellulären Levels keine Auswirkung auf die Integrität des Cohesinkomplexes hat (Abschnitt 2.3.4). Chromosomenspreizungen in dieser Arbeit zeigen zudem, dass die Menge an DNS-gebundenem Cohesin durch die Depletion dieser Proteine ebenfalls nicht vermindert wird (Abb. 2.10 und Abb. 2.11). Pds5 und Scc3 sind daher nicht für die stabile Assoziation von Cohesin mit den Chromosomen notwendig.

Das Wapl-Protein ist in vielen Organismen für die Dissoziation von Cohesin von der DNS verantwortlich ist [56,139], die Rolle des homologen Wpl1-Proteins war zum Zeitpunkt dieser Arbeit allerdings ungeklärt. Eine kürzlich publizierte Studie zeigt allerdings, dass das Wpl1-Protein auch in der Bäckerhefe für die Dissoziation des Cohesinkomplexes von der DNS verantwortlich ist [66]. Einige Arbeitsgruppen berichten allerdings auch, dass die Deletion von *WPL1* zu weniger Cohesin auf der DNS führt [66,67].

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Chromosomenspreizung konnte keine Auswirkung der *WPL1*-Deletion auf die Menge an DNS-gebundenem Cohesin festgestellt werden (Abb. 2.14). Leichte Änderungen der Cohesinmenge können durch Chromosomenspreizungen dabei nicht ausgeschlossen werden, da die Sensitivität dieser Methode im Vergleich zu anderen Methoden geringer ist. Z. B. wurde in der Arbeitsgruppe Ivanov durch ChIP-qPCR eine leichte Reduktion von chromosomalem Scc1 im *PDS5*-Degron-Hintergrund festgestellt, welche vermutlich durch die verringerte Rekrutierung von Wpl1 in diesem Degronstamm verursacht wird [129]. Das Fehlen von Wpl1 scheint also tatsächlich eine sehr milde Reduktion an DNS-gebundenem Cohesin zu verursachen, solche leichten Änderungen sind mit Chromosomenspreizungen aber nicht zu detektieren. Der Widerspruch, dass die Deletion von *WPL1* zu weniger Cohesin auf der DNS führt, die Funktion von Wpl1 aber gleichzeitig die Dissoziation des Cohesinkomplexes von den Chromosomen ist, bleibt weiterhin ungeklärt.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Wpl1-Protein nicht für die Rekrutierung von Pds5 oder Scc3 an den DNS-gebundenen Cohesinkomplex notwendig ist (Abb. 2.16).

### **3.2.3. Die Rolle von Pds5, Scc3 und Wpl1 bei der Schwesterchromatid-Kohäsion**

Pds5, Scc3 und Wpl1 sind für die stabile DNS-Assoziation von Cohesin nicht notwendig. Die Deletion von *WPL1* verursacht jedoch leichte Defekte bei der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden, die Kohäsionsdefekte in den *PDS5*- und *SCC3*-Degron-Stämmen sind sogar noch wesentlich stärker ausgeprägt (Abb. 2.18). Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion können im Prinzip durch drei verschiedene Ursachen ausgelöst werden: 1.) durch weniger Cohesin auf der DNS, 2.) durch Defekte bei der Etablierung der Kohäsion und 3.) durch Fehler bei der Aufrechterhaltung der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden. Die erstgenannte Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, da die Menge an Cohesin auf der DNS durch die Depletion von Pds5 und Scc3 bzw. die Deletion von *WPL1* nicht wesentlich beeinflusst wird (Abschnitt 3.2.2) und 13% der ursprünglichen Cohesinmenge für eine funktionelle Kohäsion ausreichend sind [174]. Die beiden anderen Möglichkeiten werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### **3.2.3.1. Etablierung oder Aufrechterhaltung der Kohäsion?**

Das Beladen der DNS mit Cohesin findet bereits vor der DNS-Replikation statt (Abschnitt 1.4.3), die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden wird in einem ungestörten Zellzyklus nur während der S-Phase etabliert (Abschnitt 1.4.4). Für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion ist die Acetylierung der ATPase-Domäne von Smc3 an zwei benachbarten Lysinresten durch die Acetyltransferase Eco1 notwendig. Wie die Acetylierung bestehende Cohesinkomplexe in einen kohäsiven Zustand überführt ist unklar. Die entstandenen kohäsiven Cohesinkomplexe halten dann die Schwesterchromatiden bis zu ihrer späteren Trennung während der Mitose zusammen. Mutationen in *PDS5*, *SCC3* oder *WPL1* [67,68,69] ermöglichen

ein Wachstum der Zelle ohne funktionelles Eco1-Protein. Sowohl Pds5 wie auch Scc3 wurden nach ihrer Entdeckung als Faktoren für die Aufrechterhaltung der Kohäsion beschrieben [33,51,52].

In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass die Reduktion von Pds5 bzw. Scc3 auf 8% bzw. 4% des normalen zellulären Levels zwar Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion verursacht (Abb. 2.18), die Zellen jedoch weiterhin lebensfähig sind. Da die Kohäsionsdefekte nicht durch eine reduzierte Anzahl an DNS-gebundenen Cohesinkomplexen verursacht werden (Abschnitt 3.2.3), müssen Etablierung und/oder Aufrechterhaltung der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden durch die Reduktion von Pds5 und Scc3 beeinträchtigt sein. Da die Etablierung bzw. die Aufrechterhaltung der Kohäsion in verschiedenen Phasen des Zellzyklus stattfinden, könnte diese Fragestellung durch eine Zellzyklusphasen-spezifische Depletion dieser Proteine untersucht werden. Leider war die induzierte Depletion von Scc3 nicht erfolgreich, durch das DHFR-Degronsystem wurde nicht nur das Zielprotein, sondern auch das interagierende  $\alpha$ -Kleisin Scc1 abgebaut. Die Fusion des DHFR-Degrans an Pds5 beeinflusste die Menge an Scc1 ebenfalls, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als die Fusion des Degrans an Scc3 (Abschnitt 2.3.1).

Durch die Fusion von *PDS5* und *SCC3* an das *ECO1*-Degron konnte hingegen eine spezifische Depletion der Zielproteine ohne begleitende negative Auswirkungen auf den Interaktionspartner Scc1 erreicht werden (Abb. 2.6). Die Reduktion ist allerdings nicht induzierbar, sondern findet während des gesamten Zellzyklus statt [129]. Daher kann mit dem *ECO1*-Degronsystem nicht eindeutig zwischen Defekten bei der Etablierung oder der Aufrechterhaltung unterschieden werden.

Die Pds5- und Scc3-Degron-Fusionsproteine sind in der Zelle nicht in stöchiometrischen Mengen vorhanden. Liegen alle Cohesinkomplexe in der Zelle DNS-gebunden vor, so sind in den Degronstämmen pro Chromosom 16 Cohesinkomplexe mit Pds5 bzw. 8 mit Scc3 vorhanden. In Säugetieren sind nach der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion etwa 30% des in der

Zelle vorliegenden Cohesins stabil an die DNS gebunden. Dieser Teil des Cohesin-pools kann als für die Schwesterchromatid-Kohäsion verantwortlich interpretiert werden [134]. Falls dies auch für *S. cerevisiae* gilt, so sind in den Degronstämmen lediglich fünf bzw. zwei Cohesinkomplexe mit Pds5 bzw. Scc3 auf den Chromosomen vorhanden (dies entspricht 2% bzw. 1% des gesamten Cohesin-pools). Selbst wenn in den Degronstämmen alle verbliebenen Pds5- und Scc3-Degron-Proteine spezifisch an DNS-gebundene Cohesinkomplexe binden würden, liegt der Anteil der Cohesinkomplexe mit Pds5 bzw. Scc3 bei lediglich 8% bzw. 4%. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass diese geringe Anzahl an Cohesinkomplexen mit Pds5 bzw. Scc3 für die Aufrechterhaltung der Kohäsion ausreichen.

Die *PDS5*-Degron-, *SCC3*-Degron- und  $\Delta wpl1$ -Stämme zeigen Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion (Abb. 2.18), ohne dass die Menge an Cohesin auf den Chromosomen signifikant verringert ist (Abschnitt 3.2.2). Dieser Phänotyp wurde auch für Mutationen im *ECO1*-Gen beschrieben [53,67,69]. Eco1 ist für die Etablierung, nicht aber für die Aufrechterhaltung der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden notwendig [53].

Pds5 und Wapl bilden in höheren Eukaryoten den für die Dissoziation von DNS-gebundenem Cohesin verantwortlichen Releasinkomplex [56]. Auch in der Bäckerhefe ist Wpl1 für die Dissoziation von chromosomalem Cohesin verantwortlich [66]. Die Acetylierung von Smc3 ist sowohl in der Bäckerhefe wie auch im Menschen für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion notwendig [67,69,70]. Die Acetylierung scheint dabei der Funktion von Wapl/Wpl1 entgegenzusteuern, denn die Deletion von *WPL1* hebt die Notwendigkeit der Eco1-vermittelten Acetylierung auf. Daneben ermöglichen auch bestimmte Mutationen in *PDS5*, *SCC3* und *SMC3* ein Zellwachstum ohne funktionelles Eco1-Protein [67,68,69,70,121]. In einigen Organismen scheint Smc3 allerdings nicht das (einzige) Substrat des Eco1-Proteins zu sein [119].

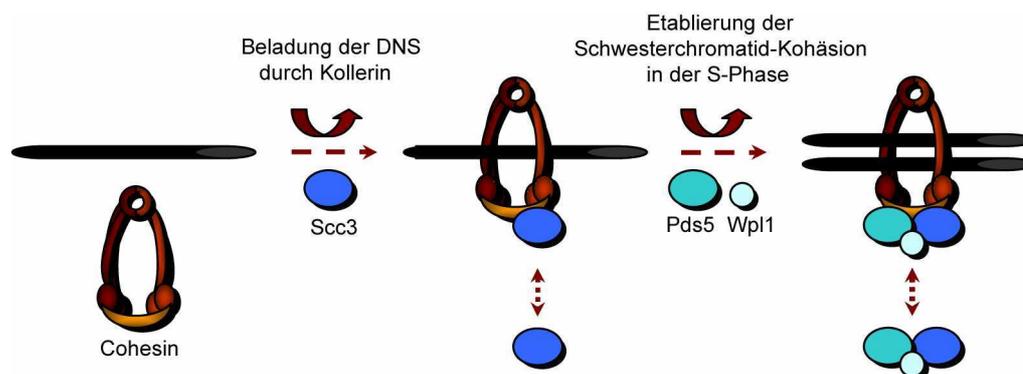
Es wird daher vermutet, dass der Pds5/Wpl1 Komplex für eine (transiente) Öffnung/Konformationsänderung von Cohesin verantwortlich ist, vermutlich im

Bereich der Scc1/Smc3 Kontaktstelle [66]. Die Modifikation durch Eco1 macht den Cohesinkomplex gegenüber der Pds5/Wpl1-Funktion resistent [66,68].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Depletion von Pds5 und Scc3 sowie die Deletion von *WPL1* ausgeprägte Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion verursachen. Für eine effiziente Etablierung der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden ist also nicht nur die Acetylierung durch Eco1, sondern auch die Funktion von Pds5, Scc3 und (in wesentlich geringerem Ausmaß) Wpl1 notwendig. Da wenige Moleküle Pds5 und Scc3 die Lebensfähigkeit der Zelle gewährleisten, kann diese Funktion wahrscheinlich auch transient ausgeübt werden und ist nicht auf eine stabile, dauerhafte Interaktion mit Cohesin angewiesen.

Das mögliche Zusammenspiel von Pds5, Scc3 und Wpl1 bei der Schwesterchromatid-Kohäsion ist in Abb. 3.1 nochmals zusammengefasst. Für das Beladen der DNS mit Cohesin sind Pds5 und Wpl1 nicht notwendig, Scc3 hingegen schon (Abb. 3.1, Mitte, und [93]). Scc3 muss dabei nicht als stabile Komponente von Cohesin vorliegen (durch den roten Pfeil angedeutet). Für die nachfolgende Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion muss die Aktivität von Pds5/Wpl1 durch die Acetylierung von Smc3 blockiert werden; Scc3 wird dabei ebenfalls benötigt (Abb. 3.1, rechts). In höheren Eukaryoten resultiert die Acetylierung von Smc3 zusätzlich in der Bindung von Sororin an Pds5 und der Verdrängung des Wapl-Proteins [62,122,123]. Für eine effiziente Etablierung der Kohäsion müssen Pds5, Scc3 und Wapl vorhanden sein, die (transiente) Änderung von Cohesin durch Pds5/Wapl begünstigt also auch den Vorgang der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion. Es ist unklar, wie dies auf molekularer Ebene stattfindet, möglich sind z. B. eine einfachere Passage des Replisoms durch den Cohesinring oder die transiente Öffnung des Cohesinkomplexes. In Abwesenheit von Wpl1 oder Pds5 sind die Zellen daher im Prinzip lebensfähig [61,67], die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion ist allerdings beeinträchtigt (Abb. 2.18). Die Acetylierung (und die in Vertebraten stattfindende Rekrutierung von Sororin) macht die etablierten kohäsiven

Cohesinkomplexe anschließend resistent gegenüber der Pds5/Wapl-Aktivität, für eine effiziente Etablierung ist die Funktion von Pds5/Wapl zuvor allerdings notwendig. Die acetylierten Cohesinkomplexe bleiben dann kohäsiv, Pds5, Scc3 und Wpl1 spielen bei der Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion keine Rolle mehr.



**Abb. 3.1: Ein Modell der Funktion von Pds5, Scc3 und Wpl1 im Kontext der Schwesterchromatid-Kohäsion.**

Cohesin wird durch den Kollerinkomplex auf die DNS geladen. Scc3 ist dafür notwendig, Pds5 und Wpl1 nicht. Während der S-Phase wird die Kohäsion zwischen den neu entstandenen Schwesterchromatiden etabliert. Für die effiziente Etablierung der Kohäsion sind neben der Acetylierung durch Eco1 (nicht gezeigt) auch die Funktionen von Pds5, Scc3 und Wpl1 notwendig. Für die spätere Aufrechterhaltung der Kohäsion werden Pds5, Scc3 und Wpl1 hingegen nicht mehr benötigt.

Scc3 interagiert mit Pds5 und Wpl1 (Abb. 2.1), die Rolle dieses Proteins bei der Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion könnte daher durch eine direkte Interaktion mit Pds5/Wpl1 erklärt werden. Es ist denkbar, dass Pds5/Wpl1 für seine Releasinaktivität mit dem Scc3-Protein interagieren muss. In Übereinstimmung mit dieser Idee verstärkt in Vertebraten ein bereits bestehender Scc1/Scc3-Komplex die Bindung von Pds5 und Wapl [54,56].

Allerdings weisen keine der beschriebenen Suppressormutationen in *PDS5*, *SCC3* oder *WPL1 in vitro* ein verändertes Bindungsverhalten auf (Abb. 2.2A und [68]). Die Funktion von Pds5, Scc3 und Wpl1 kann daher nicht (ausschließlich) durch fehlende oder neu hinzugekommene Interaktionen erklärt werden. Um die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion und das Zusammenspiel der beteiligten Proteine auf molekularer Ebene zu verstehen, sind daher noch weitere Studien notwendig.

In diesem Zusammenhang ist es sehr interessant, dass neben Pds5 [51,52] und wahrscheinlich Scc3 [60] auch Scc2 [97], eine Untereinheit des Cohesin-Ladekomplexes (Abschnitt 1.4.3), HEAT-Wiederholungen besitzt und Scc3 sowohl für den Ladevorgang [93] wie auch für die Etablierung der Kohäsion (diese Arbeit) notwendig zu sein scheint.

Eine Redundanz der Funktionen von Pds5 und Scc3 kann durch die in dieser Arbeit ausgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden. Allerdings zeigen die *PDS5*- und *SCC3*-Degron-Stämme starke Unterschiede in der Überlebensrate nach einer Behandlung mit dem Spindelgift Nocodazol (Abb. 2.20) und der Effekt der DHFR-Depletion von Pds5 und Scc3 ähnelt der Depletion von Scc3 alleine (Abb. 2.4 und Abb. 2.5). Zudem sind die *PDS5-ECO1*-Degron- und *SCC3-ECO1*-Degron-Stämme nicht kombinierbar [129] und Pds5, nicht aber Scc3, ist in einigen Organismen nicht essenziell [61]. Daher ist es wahrscheinlich, dass Pds5 und Scc3 (auch) unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben.

#### **3.3. Haben Pds5 und Scc3 neben ihrer Rolle bei der Schwesterchromatid-Kohäsion weitere Funktionen?**

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Pds5 und/oder Scc3 neben ihrer Rolle im Kontext der Schwesterchromatid-Kohäsion noch weitere Funktionen in der Zelle besitzen. Eine Redundanz der beiden Proteine ist allerdings unwahrscheinlich (siehe oben).

In dieser Arbeit konnten aber keine Hinweise auf zusätzliche Funktionen von Pds5 gefunden werden. Im Gegensatz dazu überleben Scc3-depletierte Zellen die Behandlung mit dem Spindelgift Nocodazol nicht, während die Depletion von Pds5 keine Auswirkungen auf die Überlebensrate der Zellen zeigt (Abb. 2.20). Der Zelltod kann nicht auf einen dysfunktionalen Kontrollpunkt zurückgeführt werden, der Metaphase-Kontrollpunkt ist in den *SCC3*-Degron-Zellen nach Behandlung mit Nocodazol aktiv (Dr. Dmitri Ivanov, persönliche Kommunikation). Mutationen in *SGO1* oder *BUB1* verursachen ebenfalls ein Absterben der Zellen nach einer Behandlung mit

Nocodazol, obwohl der Metaphase-Kontrollpunkt aktiviert wird [12,169]. Die Chromosomen in der Bäckerhefe besitzen eine intrinsische Veranlagung zur Biorientierung, die in einem ungestörten Zellzyklus die korrekte Biorientierung erlaubt. Nach Zugabe von Nocodazol werden die Mikrotubuli allerdings abgebaut, nach dem Auswaschen des Spindelgifts werden die neu entstehenden Mikrotubuli dann zufällig an die Kinetochore angeheftet. Ohne das Sgo1-Protein kann dann die fehlende Zugspannung zwischen den Schwesterkinetochoren – durch fehlerhafte Anheftung der Mikrotubuli verursacht – nicht erkannt werden. Dadurch kommt es im Verlauf der Mitose zu Fehlern bei der Verteilung der Schwesterchromatiden [12]. Bub1, eine Komponente des Metaphase-Kontrollpunkts, ist für die korrekte Lokalisation von Sgo1 verantwortlich. Daher führen Mutationen in *BUB1* nach einer Behandlung mit dem Spindelgift Nocodazol ebenfalls zum Tod der Zelle [229].

Es ist möglich, dass der Zelltod nach der Zugabe von Nocodazol im *SCC3*-Degron-Hintergrund ebenfalls durch eine fehlerhafte Lokalisation des Sgo1-Proteins verursacht wird. Eine direkte Interaktion zwischen *Scc3* und Sgo1 konnte in dieser Arbeit *in vitro* allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb. 2.21A). Die zentromerische Lokalisation von Sgo1 war in einer *scc3*-Mutante ebenfalls nicht beeinträchtigt (Abb. 2.21B). Die fehlerhafte Lokalisation von Sgo1 ist also sehr wahrscheinlich nicht für den Zelltod der *SCC3*-Degron-Stämme in Nocodazol verantwortlich. Für eine Bestätigung dieser Hypothese sind allerdings weitere Experimente *in vivo* nötig.

Die Ursache für das Absterben der *SCC3*-Degron-Zellen bleibt damit weiterhin ungeklärt. Interessanterweise ist die Menge an Zentromer-assoziiertem Cohesinkomplex in *SCC3*-Degron-Zellen signifikant reduziert [129]. Es ist nicht verstanden, wie das Sgo1-Homodimer die Spannung zwischen den Chromatiden misst. Denkbar ist eine Bindung an Komponenten der Kinetochore, an die DNS der Zentromere selbst oder an Zentromer-assoziierte Cohesinkomplexe. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bearbeitet.

### 3.4. Die Acetyltransferase Eco1

Die Acetylierung von Smc3 durch Eco1 ist in fast allen Organismen für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenziell [67,68,69,70,119]. Eco1 besitzt neben der Acetyltransferase-Domäne [117] noch ein PCNA-Bindemotiv [110], einen putativen Zinkfinger [117] sowie ein für den Zellzyklus-spezifischen Abbau verantwortliches Degron [130]. Die molekulare Funktion der Acetylierung ist allerdings ebenso wie die Funktion des Zinkfingers nicht verstanden, strukturelle Informationen über das Eco1-Protein existieren bisher nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, die Kristallstruktur des Eco1-Proteins aus *S. cerevisiae* zu lösen. Leider war eine Kristallisation des kompletten Proteins nicht erfolgreich. Die Kristallisation von einzelnen Domänen des Eco1-Proteins war ebenfalls nicht möglich, da alle in dieser Arbeit getesteten Konstrukte in unlöslichen Proteinen resultierten (Tabelle 2.1). Da PCNA als Bindepartner des Eco1-Proteins bekannt ist [110] und die gemeinsame Kristallisation von PCNA mit anderen Interaktionspartnern bereits erfolgreich war [234,238] wurde versucht, die Struktur des Eco1-Proteins im Komplex mit dem Interaktionspartner PCNA zu lösen.

#### 3.4.1. Die Interaktion von Eco1 mit PCNA

Die PIP-Box des Eco1-Proteins ist ein konserviertes PCNA-Bindemotiv [127], die Bindung an PCNA wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen [110]. Das PCNA-Protein bildet ein Homotrimer aus drei identischen Untereinheiten [231,232], für einen erfolgreichen Eco1/PCNA-Kristallisationsansatz muss daher bekannt sein, wieviele Eco1-Proteine pro PCNA-Homotrimer binden können.

Mit Hilfe von rekombinant aufgereinigten Proteinen und analytischer Gelfiltration konnte gezeigt werden, dass die Bindung von mehreren Eco1-Molekülen pro PCNA-Homotrimer *in vitro* sogar negative Auswirkungen auf die Eco1/PCNA-Komplexbildung hat und dass lediglich das Verhältnis von einem Eco1-Protein pro PCNA-Homotrimer in einem stabilen Komplex

resultiert (Abb. 2.22). Leider führte der Kristallisationsansatz in diesem Verhältnis nur zu PCNA-Kristallen ohne gebundenes Eco1-Protein.

Da der N-Terminus des Eco1-Proteins vermutlich flexibel ist [117] und sowohl der N- wie auch der C-Terminus von PCNA frei aus der globulären Struktur herausragen [231], wurde versucht, Eco1-PCNA- bzw. PCNA-Eco1-Fusionskonstrukte zu kristallisieren. Alle getesteten Fusionsproteine waren allerdings unlöslich und konnten auch nicht zurückgefaltet werden.

Um die Interaktion zwischen Eco1 und PCNA auf struktureller Ebene zu verstehen, reicht es im Prinzip aus, den Bereich um das PIP-Box-Motiv des Eco1-Proteins im Komplex mit PCNA zu betrachten. Daher wurde versucht, den N-terminalen Teil von Eco1 als Fusionsprotein zu exprimieren und mit PCNA zusammen zu kristallisieren. Von den getesteten Fusionskonstrukten (Tabelle 2.2) war lediglich das Fusionsprotein MBP-Eco1(As 1-26) löslich (Abb. 6.3) und zeigte *in vitro* eine Interaktion mit PCNA (Abb. 2.23), ein Kristallisationsansatz zusammen mit PCNA war allerdings nicht erfolgreich.

Daher wurde versucht, vorhandene PCNA-Kristalle mit reinem Eco1-Peptid (NLIQSKLQVNNNGSKS) zu inkubieren. Dieser Ansatz führte zu PCNA-Kristallen mit gebundenem Eco1-Peptid, die Auflösung betrug bis zu 2,5 Å (Abb. 2.24A). Jede PCNA-Untereinheit zeigt die typische Anordnung von zwei  $\alpha$ + $\beta$ -Domänen, die durch einen langen Loop verbunden sind. Jede Untereinheit ist an ein Eco1-Peptid gebunden, die Elektronendichte des an Monomer I gebundenen Peptids war für die Modellierung allerdings nicht ausreichend. Die Elektronendichte der Peptide an den Monomeren II und III war jedoch sehr gut, vor allem im Bereich des konservierten PIP-Box-Motivs QSKL. Basierend auf diesen vier Aminosäuren konnten acht (Monomer II) bzw. neun (Monomer III) Aminosäuren der Peptide modelliert werden, die restlichen Aminosäuren waren ungeordnet und zeigten keine definierte Elektronendichte (Abb. 2.24B). Ähnlich wie in anderen PCNA/PIP-Box-Peptid-Strukturen bildet das Eco1-Peptid einen kurzen  $\beta$ -Strang (Ile17, Gln18) aus, der mit einem kurzen  $\beta$ -Strang im C-Terminus von PCNA (Lys253, Phe254) interagiert. Die letzten drei Aminosäuren von PCNA liegen durch die Bindung

des Eco1-Peptids ungeordnet vor, dies wurde bei anderen PCNA/PIP-Box-Peptid-Strukturen ebenfalls beobachtet [240]. Die Wasserstoffbrückenbindungen der  $\epsilon$ -Aminogruppe des konservierten Glutamins mit den Carbonylsauerstoff-Atomen von Ser19 (Eco1-Peptid) und Ala251 (PCNA) stabilisieren die PCNA/Eco1-Peptid-Interaktion zusätzlich. Die typische  $3_{10}$ -Helix, die in den meisten PIP-Box-Motiven vorhanden ist, fehlt hingegen. Diese Helix wird normalerweise im C-terminalen Teil des Motivs (xxFF) ausgebildet, welcher im Eco1-PIP-Box-Motiv fehlt.

Es ist unklar, wieso *in vitro* lediglich ein Molekül Eco1 pro PCNA-Homotrimer binden kann, obwohl in der PCNA/Eco1-Peptid-Struktur an jedem PCNA-Monomer ein Peptid bindet. Es ist möglich, dass das komplette Eco1-Protein *in vivo* mit den anderen PIP-Box-Bindestellen interferiert und dadurch die Bindung von mehr als einem Eco1-Protein pro PCNA-Homotrimer unmöglich macht. Die Struktur des an PCNA gebundenen Eco1-Peptids alleine liefert allerdings keine Erklärung für diese *in vitro* beobachtete Begrenzung der Bindekapazität.

Die Bindung von Eco1 an PCNA ist bemerkenswert konserviert. Eine Überlagerung mit anderen bekannten PCNA/PIP-Box-Peptid-Strukturen aus Eukaryoten und Archaeobakterien zeigt, dass die räumliche Anordnung des Peptids im Bereich des konservierten Sequenzmotivs QxxL nahezu identisch ist (Abb. 2.25). Vor allem die Lage des kurzen  $\beta$ -Faltblatts zwischen PCNA und dem Peptid ist in allen Strukturen hoch konserviert, ebenso wie die Anordnung der konservierten Aminosäure Glutamin (selten Methionin), welche für die Ausbildung der stabilisierenden intra- und intermolekularen Wasserstoffbrücken verantwortlich ist. Das Eco1-PIP-Box-Motiv zeigt also trotz der nicht vorhandenen flankierenden Sequenzen KAX und xxFF im Kernbereich des Motivs (QSKL) eine bemerkenswerte strukturelle Konservierung.

### 3.5. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cohesin-assoziierten Proteine Pds5, Scc3 und Wpl1 nicht für eine stabile Assoziation des

Cohesinkomplexes mit der DNS verantwortlich sind, da die Depletion von Pds5 und Scc3 bzw. die Deletion von *WPL1* keine Auswirkungen auf die Menge an DNS-gebundenem Cohesin zeigte.

Für die Überlebensfähigkeit der Zelle ist es ausreichend, wenn 8% bzw. 4% aller Cohesinkomplexe in der Zelle Pds5 bzw. Scc3 besitzen. Die Depletion von Pds5 und Scc3 verursacht allerdings einen ausgeprägten Kohäsionsdefekt, der auf Fehler bei der Etablierung und/oder der Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion zurückgeführt werden kann.

Da der beobachtete Phänotyp – keine Reduktion des DNS-gebundenen Cohesins bei gleichzeitig vorhandenen Defekten bei der Schwesterchromatid-Kohäsion – dem Phänotyp von *eco1*-Mutanten ähnelt, bevorzuge ich die Hypothese, dass Pds5, Scc3 und Wpl1 als Faktoren während der Etablierung der Kohäsion als transiente Faktoren benötigt werden. Eine Rolle bei der späteren Aufrechterhaltung der Schwesterchromatid-Kohäsion als stabile Komponenten von kohäsiven Cohesinkomplexen ist mit der stark reduzierten Menge an Pds5 und Scc3 in den Degronstämmen nur sehr schwer zu erklären. Während die Rolle von Wpl1 als Dissoziationsfaktor von Cohesin mittlerweile allgemein akzeptiert wird, ist die genaue Funktion der Cohesin-assoziierten Proteine Pds5 und Scc3 allerdings auch nach dieser Arbeit ungeklärt.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PCNA-Bindung des Eco1-Proteins, das für die Etablierung der Schwesterchromatid-Kohäsion essenziell ist, auch auf struktureller Ebene hoch konserviert ist. Das Eco1-Protein besitzt dabei das kleinste mögliche PIP-Box-Motiv QXXL, N- und C-terminale Sequenzmotive fehlen. Trotzdem ist die Lage und die strukturelle Anordnung des Eco1-Peptids im Bereich der PCNA/PIP-Box-Bindung mit anderen bekannten Strukturen nahezu identisch.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. DNS-Oligonukleotide

Die Sequenzen aller DNS-Oligonukleotide sind in 5'-3' Richtung angegeben.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendungszweck
<i>Eco1-ACT-up1</i>	GCAGCCCATGGGGTCTATTACCCATCAGGAAGAAAAATC GTG	Klonierung von <i>pET28b-eco1(339-843)-His</i>
<i>Eco1-ACT-up2</i>	AATCACCATGGGCGAAAAAATCGTGTATGTTTCGTCCGG	Klonierung von <i>pET28b-eco1(321-843)-His</i>
<i>Eco1(As1-33)-up</i>	AGCTCCCATGGATGAATCTTATCCAGTCTAAATTGCAAG	Klonierung von <i>pET28b-eco1(1-99)-His</i>
<i>Eco1(As1-33)-down</i>	ACGACCTCGAGATGGTTTCGCTCTGTGTATAC	Klonierung von <i>pET28b-eco1(1-99)-His</i>
<i>Eco1(FL)-down</i>	ATACACTCGAGGATGTACACCGGCAGCAGCAG	Klonierung diverser C-His-Eco1-Konstrukte
<i>Eco1(K13N)-for</i>	CGCAAAGCGGGCTCTAACCCGAACCTGATTTCAGAGC	<i>Eco1(K13N)</i> -Mutagenese
<i>Eco1(K13N)-rev</i>	GCTCTGAATCAGGTTCCGGTTAGAGCCCGCTTTGCG	<i>Eco1(K13N)</i> -Mutagenese
<i>Eco1(K13R)-for</i>	CGCAAAGCGGGCTCTAGACCGAACCTGATTTCAGAGC	<i>Eco1(K13R)</i> -Mutagenese
<i>Eco1(K13R)-rev</i>	GCTCTGAATCAGGTTCCGGTCTAGAGCCCGCTTTGCG	<i>Eco1(K13R)</i> -Mutagenese
<i>Eco1-PCNA-down1</i>	CATACGGTACCACCGCCACCGCGGATGTACACCGGCAGC AGCAG	Klonierung von <i>pET28b-eco1-POL30-His</i>
<i>Eco1-PCNA-down2</i>	ACCATCTCGAGTTCTTCATCGTTGAACTTAGG	Klonierung von <i>pET28b-eco1-POL30-His</i>
<i>Eco1-PCNA-up1</i>	ACTGACATATGAAAGCACGTAAAAGCCAG	Klonierung von <i>pET28b-eco1-POL30-His</i>
<i>Eco1-PCNA-up2</i>	CAATCGGTACCGGTGGCGGTGGCGGTTTGAAGCTAAAT TTGAAGAAGCA	Klonierung von <i>pET28b-eco1-POL30-His</i>
<i>Eco1-Peptid-down2</i>	ACTAGCTCGAGTTAGTTACGTTCCGTATACACAATGC	Klonierung der N-His-getaggen <i>Eco1</i> -Peptidvarianten
<i>Eco1-Peptid-up</i>	ACTAGCATATGAAAGCACGTAAAAGCCAGCGC	Klonierung der N-His-getaggen <i>Eco1</i> -Peptidvarianten
<i>Eco1-MBP/Trx-down-l</i>	GCTACCTCGAGTTAATTACGTTCCGTATACACAATGC	Klonierung der MBP- <i>Eco1</i> - und Trx- <i>Eco1</i> -Fusionskonstrukte
<i>Eco1-MBP/Trx-down-m</i>	ACTACCTCGAGTTAGCCATGCAGCTGCAG	Klonierung der Trx- <i>Eco1</i> -, MBP- <i>Eco1</i> - und N-His- <i>Eco1</i> -Peptid-Konstrukte
<i>Eco1-MBP/Trx-down-s</i>	AATCACTCGAGTTAACCGTTGTTACCTGCAG	Klonierung der Trx- <i>Eco1</i> -

		und MBP-Eco1-Fusionskonstrukte
<i>Eco1-MBP-up</i>	AATCACCATGGGCATGAAAGCACGTAAAAGCCAG	Klonierung der MBP-Eco1-Fusionskonstrukte
<i>Eco1-Trx-up</i>	AATCAGGATCCATGAAAGCACGTAAAAGCCAGCGC	Klonierung der Trx-Eco1-Fusionskonstrukte
<i>Eco1-up</i>	ATACACTCGAGCGGACTAGATTTTTTCAGCGGGCT	Klonierung von <i>pET28b-eco1(1-327)-His</i>
<i>Eco1(FL)-up</i>	CAGTACCATGGGGAAAGCACGTAAAAGCCAGCGC	Klonierung diverser C-His-Eco1-Konstrukte
<i>PCNA-up</i>	ACTAGCCATGGGATTGGAAGCTAAATTTGAAGAAGCA	Klonierung von <i>pET28b-POL30-His</i>
<i>PCNA-down</i>	AGTCCTCGAGTTCTTCATCGTTGAACTTAGGAGC	Klonierung von <i>pET28b-POL30-His</i>
<i>Smc1-C-Duet-down</i>	ATCTGCTCGAGGCCCTGGAAGTACAAGTTTTCTCCCTGGA AATATAAATTCTCACCTTGAAATATAAGTTCTCTTCTGCG TAATTGCTCAAGTCCAAAGTTATG	Klonierung von <i>pETDuet-smc(Heads)</i>
<i>Smc1-C-Duet-up</i>	ACTGCCTGCAGACTAGTCTCGTCCCGAGAGGCTCCAAGA CATTTGATTATGTGAGCGACCATTTAGACGC	Klonierung von <i>pETDuet-smc(Heads)</i>
<i>Smc1-Head-down</i>	ATGCTCTCGAGCAGATTTTCACCCTGAAGTACAGATTTTC GCCC	Klonierung von <i>pET-smc1(Head)-His</i>
<i>Smc1-Head-up</i>	ACTAGCCATGGGAGGCCGCTGGTGGGTCTGGAAGT	Klonierung von <i>pET-smc1(Head)-His</i>
<i>Smc1-Hinge-down1</i>	ATGATGCGGCCGCCTATAAAGACATTAAGCTTTGATATTC TTCTTTATCCCACC	Klonierung von <i>pRSF-SMC(sh-Hinge)</i>
<i>Smc1-Hinge-down2</i>	ACGTTGCGGCCGCCTACGAGTTCAATAGTGAAACAC	Klonierung von <i>pRSF-SMC(Hinge)</i>
<i>Smc1-Hinge-up1</i>	GCACGGAATTCGAAGTTGAGGGAAACGTTGGT	Klonierung von <i>pRSF-SMC(sh-Hinge)</i>
<i>Smc1-Hinge-up2</i>	GCACGGAATTCGACGAGCTGAAAAATTACAATCTG	Klonierung von <i>pRSF-SMC(Hinge)</i>
<i>Smc1-N-Duet-down</i>	ACGGCCTGCAGTGGATGTTTTGAGGATTCTGATACTTCTT CAAACATTCTTG	Klonierung von <i>pETDuet-smc(Heads)</i>
<i>Smc1-N-Duet-up</i>	CTCGAGGTACCATGGGACGTTTAGTTGGCTT	Klonierung von <i>pETDuet-smc(Heads)</i>
<i>Smc3-cc-down</i>	AAGCTCTCGAGCGGAACCAGACGTTTCGAAAACCGCTTCG AAATTTTCAGAACTTTCTGAAAGGTGCTATCAACGGC	Klonierung von <i>pET21-smc3(cc)</i>
<i>Smc3-cc-up</i>	AGCTAGAATTCGATTCTGAACTGAGTAAAGAAGAAAAAGA ACG	Klonierung von <i>pET21-smc3(cc)</i>
<i>Smc3-C-Duet-up</i>	CTGCAGAATTCAGTCTCGTCCCGAGAGGCTCCGAATCTAA AGACTCAATTCAAGATC	Klonierung von <i>pETDuet-smc(Heads)</i>
<i>Smc3-C-Duet-down</i>	ACTGCGGATCCTTACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGAT AGACTTCAGCGAATTTATTGCTACCTC	Klonierung von <i>pETDuet-smc(Heads)</i>
<i>Smc3-Head-down</i>	ATGCTCTCGAGCACTTCCGCGAATTTATTACTACCGCG	Klonierung von <i>pET-smc3(Head)-His</i>

## 4. Material und Methoden

<i>Smc3-Head-up</i>	ACTAGCCATGGGATACATCAAACGTGTGATCATCAAAGGC	Klonierung von <i>pET-smc3(Head)-His</i>
<i>Smc3-Hinge-down1</i>	AGGATCTCGAGCTACAAATCTTCTTCAGAAATCAACTTTTG TTCTTTGTGTTGACTTCTTGATTC	Klonierung von <i>pRSF-SMC(sh-Hinge)</i>
<i>Smc3-Hinge-down2</i>	AGGATCTCGAGCTACAAATCTTCTTCAGAAATCAACTTTTG TTCTCTTATATTCCCGTTTACTTGATC	Klonierung von <i>pRSF-SMC(Hinge)</i>
<i>Smc3-Hinge-up1</i>	CCGCGCCAGATCTATGTTGAAACTTTATTAAGTGACGTC	Klonierung von <i>pRSF-SMC(sh-Hinge)</i>
<i>Smc3-Hinge-up2</i>	CCGCGCCAGATCTATGAAGGAATTGTGGAGAAAGGAGC	Klonierung von <i>pRSF-SMC(Hinge)</i>
<i>Smc3(K112N)-for</i>	GCACGGTTGGCCTGAACAAAGATGATTATCAGC	<i>Smc3(K112N)</i> -Mutagenese
<i>Smc3(K112N)-rev</i>	GCTGATAATCATCTTTGTTCCAGGCCAACCGTGC	<i>Smc3(K112N)</i> -Mutagenese
<i>Smc3(K113N)-for</i>	GCACGGTTGGCCTGAAAAACGATGATTATCAGC	<i>Smc3(K113N)</i> -Mutagenese
<i>Smc3(K113N)-rev</i>	GCTGATAATCATCGTTTTTCAGGCCAACCGTGC	<i>Smc3(K113N)</i> -Mutagenese
<i>Smc3(K112,113N)-for</i>	GCACGGTTGGCCTGAACAACGATGATTATCAGC	<i>Smc3(K112,113N)</i> - Mutagenese
<i>Smc3(K112,113N)-rev</i>	GCTGATAATCATCGTTGTTCCAGGCCAACCGTGC	<i>Smc3(K112,113N)</i> - Mutagenese
<i>Smc3-N-Duet-down</i>	ATCGCGAATTCAGTTGGATGTTTTGAGGATTCCTCTGTTTC CTCCATTTTTTTCAATG	Klonierung von <i>pETDuet-smc(Heads)</i>
<i>Smc3-N-Duet-up</i>	ATCGACCATGGATGTATATCAAAGGGTGATAATTAAGGG	Klonierung von <i>pETDuet-smc(Heads)</i>
<i>Smc3-TAP-Tag-for</i>	GAAGAAGCAATCGGATTCATTAGAGGTAGCAATAAATTCG CTGAAGTCTCCATGGAAAAGAGAAG	Generierung des <i>SMC3-TAP</i> -Hefestamms
<i>Smc3-TAP-Tag-rev</i>	ATGTAAGCAAAAAGTATTTTTATATACAAATCGTTTCAA TATCTCTACGACTCACTATAGGG	Generierung des <i>SMC3-TAP</i> -Hefestamms
<i>Wpl1-down</i>	ACGATCTCGAGAATCGTGATACGTTTCAGAGGT	Klonierung der C-His- <i>Wpl1</i> -Konstrukte (Codon- optimiert)
<i>Wpl1(G209-end)-up</i>	ACGATCCATGGGCAAATTCCTGACGATCCTGATC	Klonierung von <i>pET28b-wpl1(627-1941)-His</i>
<i>Wpl1(G250-end)-up</i>	ACGATCCATGGGCTGACCAGCACGAACCACTAT	Klonierung von <i>pET28b-wpl1(750-1941)-His</i>
<i>Wpl1(S416A)-up</i>	GGAAATGCACGGTAACCTGGCCCTGGATATTATCAAACG	<i>Wpl1(S416A)</i> -Mutagenese
<i>Wpl1(S416A)-down</i>	CGTTTGATAATATCCAGGGCCAGGTTACCGTGCATTTC	<i>Wpl1(S416A)</i> -Mutagenese

### 4.1.2. *E. coli*-Expressionsplasmide

Plasmidbezeichnung	Codierte(s) Protein(e)	Referenz
<i>pGEX-GST-ECO1</i>	N-terminale GST-Eco1-Fusion	[117]
<i>pET28b-His-eco1</i> (Codon-optimiert)	N-terminal 6×His-getaggtes Eco1	Genscript

<i>pET28b-eco1-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Eco1	diese Arbeit
<i>pET28b-eco1(K13N)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Eco1, K13N	diese Arbeit
<i>pET28b-eco1(K13R)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Eco1, K13R	diese Arbeit
<i>pET-Trx-eco1(1-78)</i> (Codon-optimiert)	N-terminale Trx-Eco1-Fusion, As 1-26 (6xHis vor Trx, Thrombinschnittstelle nach Trx)	diese Arbeit
<i>pET-Trx-eco1(1-189)</i> (Codon-optimiert)	N-terminale Trx-Eco1-Fusion, As 1-63 (6xHis vor Trx, Thrombinschnittstelle nach Trx)	diese Arbeit
<i>pET-Trx-eco1(1-237)</i> (Codon-optimiert)	N-terminale Trx-Eco1-Fusion, As 1-79 (6xHis vor Trx, Thrombinschnittstelle nach Trx)	diese Arbeit
<i>pET-MBP1a-eco1(1-78)</i> (Codon-optimiert)	N-terminale MBP-Eco1-Fusion, As 1-26 (6×His-Tag vor MBP, TEV-Erkennungssequenz nach MBP)	diese Arbeit
<i>pET-MBP1a-eco1(1-189)</i> (Codon-optimiert)	N-terminale MBP-Eco1-Fusion, As 1-63 (6×His-Tag vor MBP, TEV-Erkennungssequenz nach MBP)	diese Arbeit
<i>pET-MBP1a-eco1(1-237)</i> (Codon-optimiert)	N-terminale MBP-Eco1-Fusion, As 1-79 (6×His-Tag vor MBP, TEV-Erkennungssequenz nach MBP)	diese Arbeit
<i>pET28b-eco1(1-99)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Eco1, As 1-33	diese Arbeit
<i>pET28b-His-eco1(1-189)</i> (Codon-optimiert)	N-terminal 6×His-getaggttes Eco1, As 1-63	diese Arbeit
<i>pET28b-His-eco1(1-237)</i> (Codon-optimiert)	N-terminal 6×His-getaggttes Eco1, As 1-79	diese Arbeit
<i>pET28b-eco1(1-327)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Eco1, As 1-109	diese Arbeit
<i>pET28b-eco1(102-843)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Eco1, As 34-281	diese Arbeit
<i>pET28b-eco1(321-843)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Eco1, As 107-281	diese Arbeit
<i>pET28b-eco1(339-843)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Eco1, As 113-281	diese Arbeit
<i>pET21a-POL30</i>	PCNA	Genscript
<i>pET28b-POL30-His</i>	C-terminal 6×His-getaggttes PCNA	diese Arbeit
<i>pET28b-eco1-POL30-His</i> ( <i>eco1</i> ist Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggtte Eco1-PCNA-Fusion	diese Arbeit
<i>pET28b-His-pol30-eco1</i> (Codon-optimiert)	N-terminal 6×His-getaggtte Eco1-PCNA-Fusion	Genscript
<i>pET21-smc3(cc-short)</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6xHis-getaggtter Coiled-Coil-Bereich von Smc3 (As 167-516, Linker, As 672-1047)	Genscript
<i>pET21-smc3(cc)</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6xHis-getaggtter Coiled-Coil-Bereich von Smc3 (As 167-516, Linker, As 672-1057)	diese Arbeit
<i>pETDuet-SMC(Heads)</i>	C-terminal S-getaggtte Smc1-ATPase-Domäne (As 1-214, Linker, As 1024-1225) und C-terminal HA-getaggtte Smc3- ATPase-Domäne (As 1-190, Linker, As 841-1230)	diese Arbeit

## 4. Material und Methoden

<i>pETDuet-smc(Heads)</i> (Codon-optimiert)	C-terminal S-getaggte Smc1-ATPase-Domäne (As 1-214, Linker, As 1024-1225) und C-terminal HA-getaggte Smc3-ATPase-Domäne (As 1-190, Linker, As 841-1230)	Genscript
<i>pET-smc1(Head)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggte Smc1-ATPase-Domäne (As 1-214, Linker, As 1024-1225)	diese Arbeit
<i>pET-smc3(Head)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggte Smc3-ATPase-Domäne (As 1-190, Linker, As 841-1230)	diese Arbeit
<i>pET-smc3(Head,K112N)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggte Smc3-ATPase-Domäne (As 1-190, Linker, As 841-1230), K112N	diese Arbeit
<i>pET-smc3-(Head,K113N)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggte Smc3-ATPase-Domäne (As 1-190, Linker, As 841-1230), K113N	diese Arbeit
<i>pET-smc3-(Head,K112,113N)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggte Smc3-ATPase-Domäne (As 1-190, Linker, As 841-1230), K112,113N	diese Arbeit
<i>pRSF-SMC(sh-Hinge)</i>	N-terminal 6×His-getaggtter Smc1-Hinge (As 491-688) und C-terminal MYC-getaggtter Smc3-Hinge (As 493-699)	diese Arbeit
<i>pRSF-SMC(Hinge)</i>	N-terminal 6×His-getaggtter Smc1-Hinge (As 469-722) und C-terminal MYC-getaggtter Smc3-Hinge (As 480-727)	diese Arbeit
<i>pRSF-smc(Hinge)</i> (Codon-optimiert)	N-terminal 6×His-getaggtter Smc1-Hinge (As 469-722) und C-terminal MYC-getaggtter Smc3-Hinge (As 480-727)	Genscript
<i>pET28b-sgo1-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Sgo1	Genscript
<i>pET21a-scc3-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Scc3	Genscript
<i>pET21a-scc3-His-HA</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-3×HA-getaggttes Scc3	[129]
<i>pET28b-pds5-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Pds5	Genscript
<i>pET28b-WPL1-His</i>	C-terminal 6×His-getaggttes Wpl1	Jochen Reiter
<i>pET28b-wpl1-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Wpl1	Genscript
<i>pET28b-wpl1(627-1941)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Wpl1, As 209-647	diese Arbeit
<i>pET28b-wpl1(750-1941)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Wpl1, As 250-647	diese Arbeit
<i>pET28b-wpl1(S416A)-His</i> (Codon-optimiert)	C-terminal 6×His-getaggttes Wpl1, S416A	diese Arbeit

### 4.1.3. *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	endA1 hsdR17( $r_{k12}^-$ , $m_{k12}^+$ ) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> $\Delta$ M15::Tn10(Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RIL	F <sup>-</sup> ompT hsdS gal dcm $\Delta$ (srl-recA)3006::Tn10(Tet <sup>R</sup> ) (DE3) pRIL (Cm <sup>R</sup> )	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold	F <sup>-</sup> ompT hsdS gal dcm $\Delta$ (srl-recA)3006::Tn10(Tet <sup>R</sup> ) (DE3)	Stratagene
<i>E. coli</i> C41 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm hsdS <sub>B</sub> ( $r_B^-$ $m_B^-$ ) (DE3)	Lucigen

#### 4.1.4. *S. cerevisiae*-Stämme

Falls nicht anderweitig angegeben stammen alle aufgelisteten Stämme vom Laborstamm *Saccharomyces cerevisiae* W303 ab und besitzen den folgenden Genotyp:

*MATa ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112, his3-11,15 ura3 GAL psi+*

**Abb. 2.3C:**

Stamm	Genotyp	Referenz
2395	<i>UBR1::GAL-HA-UBR1 (HIS3) SCC1-HA6::TRP1</i>	[129]
2452	<i>UBR1::GAL-HA-UBR1 (HIS3) SCC1-HA6::TRP1 PDS5::tet02-DHFR-Myc18-PDS5::kanMX</i>	[129]
2455	<i>UBR1::GAL-HA-UBR1 (HIS3) SCC1-HA6::TRP1 SCC3::tet02-DHFR-Myc18-SCC3::kanMX</i>	[129]
2456	<i>UBR1::GAL-HA-UBR1 (HIS3) SCC1-HA6::TRP1 SCC3::tet02-DHFR-Myc18-SCC3::kanMX PDS5::tet02-DHFR-Myc18-PDS5::kanMX</i>	[129]

**Abb. 2.4 und Abb. 2.5:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1021	Wildtyp	[129]
2395	<i>UBR1::GAL-HA-UBR1 (HIS3) SCC1-HA6::TRP1</i>	[129]
2452	<i>UBR1::GAL-HA-UBR1 (HIS3) SCC1-HA6::TRP1 PDS5::tet02-DHFR-Myc18-PDS5::kanMX</i>	[129]
2455	<i>UBR1::GAL-HA-UBR1 (HIS3) SCC1-HA6::TRP1 SCC3::tet02-DHFR-Myc18-SCC3::kanMX</i>	[129]
2456	<i>UBR1::GAL-HA-UBR1 (HIS3) SCC1-HA6::TRP1 SCC3::tet02-DHFR-Myc18-SCC3::kanMX PDS5::tet02-DHFR-Myc18-PDS5::kanMX</i>	[129]

**Abb. 2.6:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1625	<i>SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]
1813	<i>SCC3-HA6::HIS3 SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]
1815	<i>SCC1-Myc18::HIS3 PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]
1818	<i>PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]

**Abb. 2.7:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1323	<i>SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
1479	<i>SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1675	<i>PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]

---

1677	<i>PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]
------	-----------------------	-------

---

**Abb. 2.8:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1323	<i>SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
1479	<i>SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1675	<i>PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
1677	<i>PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]
1759	<i>SMC3-Myc18::HIS3</i>	[129]
10589	<i>SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]

---

**Abb. 2.9:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1906	<i>SCC1-Myc18::HIS3 wpl1::HPH</i>	[129]
10589	<i>SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]

---

**Abb. 2.10:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1734	<i>PDS5-MYC18::TRP1 SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1771	<i>PDS5-HA6::TRP1 SCC3-Myc18::HIS3</i>	[129]
1829	<i>SCC1-HA-TAP::TRP1 PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT SCC3-Myc18::HIS3 TetR-GFP::LEU2 TetO200::URA3</i>	[129]
1834	<i>SCC1-HA-TAP::TRP1 SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT PDS5- Myc18::TRP1</i>	[129]
1880	<i>SCC3-HA6::HIS3 WPL1-myc18::HIS3</i>	[129]
1882	<i>PDS5-HA6::TRP1 WPL1-myc18::HIS3</i>	[129]
1956	<i>SCC1-HA-TAP::TRP1 PDS5-Myc18::TRP1 SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1958	<i>SCC1-HA-TAP::TRP1 SCC3-Myc18::HIS3 PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]
2012	<i>SCC1-HA-TAP::TRP1 SCC3-HA6::HIS3 WPL1-Myc18::HIS3</i>	[129]
2014	<i>SCC1-HA-TAP::TRP1 PDS5-HA6::TRP1 WPL1-Myc18::HIS3</i>	[129]
2016	<i>SCC1-HA-TAP::TRP1 PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT WPL1-Myc18::HIS3</i>	[129]
2018	<i>SCC1-HA-TAP::TRP1 SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT WPL1- Myc18::HIS3</i>	[129]

---

**Abb. 2.11:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1734	<i>PDS5-MYC18::TRP1 SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1771	<i>PDS5-HA6::TRP1 SCC3-Myc18::HIS3</i>	[129]
1880	<i>SCC3-HA6::HIS3 WPL1-myc18::HIS3</i>	[129]
1882	<i>PDS5-HA6::TRP1 WPL1-myc18::HIS3</i>	[129]
2249	<i>SMC3-TAP::TRP1 PDS5-Myc18::TRP1 SCC3-HA6::HIS3</i>	diese Arbeit und [129]
2251	<i>SMC3-TAP::TRP1 PDS5-HA6::TRP1 SCC3-Myc18::HIS3</i>	diese Arbeit und [129]
2253	<i>SMC3-TAP::TRP1 PDS5-HA6::TRP1 WPL1-Myc18::HIS3</i>	diese Arbeit und [129]
2261	<i>SMC3-TAP::TRP1 SCC3-HA6::HIS3 WPL1-Myc18::HIS3</i>	diese Arbeit und [129]
2264	<i>SMC3-TAP::TRP1 SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT PDS5-Myc18::TRP1</i>	diese Arbeit und [129]
2265	<i>SMC3-TAP::TRP1 PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT WPL1- Myc18::HIS3</i>	diese Arbeit und [129]
2271	<i>SMC3-TAP::TRP1 SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT WPL1-Myc18::HIS3</i>	diese Arbeit und [129]
2290	<i>SMC3-TAP::TRP1 PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT SCC3-Myc18::HIS3</i>	diese Arbeit und [129]

**Abb. 2.12:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1021	Wildtyp	[129]
1625	<i>SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]
1813	<i>SCC3-HA6::HIS3 SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]
1815	<i>SCC1-Myc18::HIS3 PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]
1818	<i>PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]

**Abb. 2.13:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1021	Wildtyp	[129]
1776	<i>SMC3-Myc18::HIS3 SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
1779	<i>SMC3-Myc18::HIS3 PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
2197	<i>SMC3-Myc&lt;18::HIS3 PDS5-HA6::TRP1</i>	diese Arbeit und [129]
2227	<i>SCC3-HA6::HIS3 SMC3-MYC&lt;18::HIS3</i>	diese Arbeit und [129]

**Abb. 2.14:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1021	Wildtyp	[129]
1759	<i>SMC3-Myc18::HIS3</i>	[129]
1769	<i>SMC3-Myc18::HIS3 wpl1::HPH</i>	[129]
1906	<i>SCC1-Myc18::HIS3 wpl1::HPH</i>	[129]
10589	<i>SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]

**Abb. 2.15:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1021	Wildtyp	[129]
1734	<i>PDS5-MYC18::TRP1 SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1744	<i>SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT PDS5-Myc18::TRP1</i>	[129]
1771	<i>PDS5-HA6::TRP1 SCC3-Myc18::HIS3</i>	[129]
1796	<i>PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT SCC3-Myc18::HIS3</i>	[129]

**Abb. 2.16:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1021	Wildtyp	[129]
1479	<i>SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1677	<i>PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]
1864	<i>wpl1::HPH SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1866	<i>wpl1::HPH PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]

**Abb. 2.17:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1021	Wildtyp	[129]
1813	<i>SCC3-HA6::HIS3 SCC1-Myc18::HIS3</i>	[129]
1815	<i>SCC1-Myc18::HIS3 PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]
1835	<i>scc1:: TRP1::GAL1-SCC1-Myc18:: HIS3</i> <i>SCC3-HA6::HIS3</i>	[129]
1839	<i>scc1:: TRP1::GAL1-SCC1-Myc18:: HIS3</i> <i>PDS5-HA6::TRP1</i>	[129]

**Abb. 2.18:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1417	<i>TetO200::URA3 TetR-GFP::LEU2</i>	[129]
1621	<i>TetR-GFP::LEU2 TetO200::URA3</i> <i>SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
1678	<i>TetO200::URA3, TetR-GFP::LEU2</i> <i>PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
2190	<i>delta wpl1::HPH TetO200::URA3 TetR-GFP::LEU2</i>	[129]

**Abb. 2.19:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1822	<i>TetR-GFP::LEU2 CENIV::TetO448::URA3</i> <i>cdc20::MET-CDC20::URA SPC42-Tomato::NAT</i>	[229]
1832	<i>TetR-GFP::LEU2 CENIV::TetO448::URA3</i> <i>cdc20::MET-CDC20::URA SPC42-Tomato::NAT</i> <i>SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]

1833	<i>TetR-GFP::LEU2 CENIV::TetO448::URA3 cdc20::MET-CDC20::URASPC42-Tomato::NAT PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
2436	<i>CEN IV::TetO448::URA3 pURA3-tetR-GFP::LEU2 SPC42-Tomato::NAT cdc20::Met-CDC20::URA delta wpl1::HPH</i>	[129]

**Abb. 2.20:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1021	Wildtyp	[129]
1323	<i>SCC3-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]
1366	<i>delta wpl1::HPH</i>	[129]
1675	<i>PDS5-HA6-ECO1(aa63-109)::NAT</i>	[129]

**Abb. 2.21B:**

Stamm	Genotyp	Referenz
1798	<i>delta cse4::NAT CSE4-HA6::LEU2 SGO1-MYC9:TRP1</i>	AG Ivanov
1842	<i>delta cse4::NAT CSE4-HA6::LEU2 SGO1-MYC9:TRP1 SCC3(V1025Stop)::HPH</i>	AG Ivanov

#### 4.1.5. Medien und Platten

Die Angaben für die folgenden Nährmedien beziehen sich auf die jeweiligen Flüssigmedien, die Zusätze für Nährplatten sind in Klammern angegeben.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium; [252]):

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
(Agar)	(20g)

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.

YEPD-Medium:

Hefeextrakt	10 g
Bacto-Pepton	20 g
D-(+)-Glukose	20 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
(Agar)	(20 g)

YEPG-Medium:

Hefeextrakt	10 g
Bacto-Pepton	20 g

D-(+)-Galaktose	20 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
(Agar)	(20 g)

---

### YEPR-Medium:

Hefeextrakt	10 g
Bacto-Pepton	20 g
D-(+)-Raffinose	20 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
(Agar)	(20 g)

---

### Synthetisches Drop-out-Medium:

Difco-Yeast-Nitrogen-Base	8 g
D-(+)-Glukose	20 g
L-Arginin	2 g
L-Isoleucin	6 g
L-Histidin	1 g
L-Leucin	6 g
L-Lysin	4 g
L-Methionin	1 g
L-Phenylalanin	6 g
L-Threonin	5 g
L-Tryptophan	4 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
(Agar)	(20 g)

---

Die Aminosäure, auf welche die gegebene Mangelmutante selektioniert werden sollte, wurde nicht zum Medium zugegeben.

### Minimalmedium (Hefe):

Difco-Yeast-Nitrogen-Base	8 g
D-(+)-Glukose	20 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
(Agar)	(20 g)

---

### Sporulationsmedium:

Hefeextrakt	25 g
Kaliumacetat	15 g
D-(+)-Glukose	1 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
(Agar)	(20 g)

---

## 4.2. Bioinformatische Methoden und verwendete Software

Für die Sequenzanalyse von Genen und Proteinen wurden das Toolkit des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie, Abteilung Proteinevolution (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de>; [253]) und die Online-Dienste des „National

Center for Biotechnology Information“ (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet. Für die Erstellung und Bearbeitung von Sequenzalignments wurde „Jalview 2.7“ [254] benutzt. Die DNS-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Gene wurden von der *Saccharomyces*-Gendatenbank ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) bezogen. Für die Anfertigung dieser Arbeit wurde „Microsoft Office“ (Microsoft Cooperation) und „Adobe Design Premium CS4“ (Adobe Systems Incorporated) verwendet.

### 4.3. Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNS-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) verwendet [255].

Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Es wurden 50 ng DNS-Template, je 0,5 µM 5'- und 3'-Primer, je 0,2 µM pro ddNTP (10 mM Stammlösung, Fermentas) und 1-2,5 u DNS-Polymerase („Pfu DNA Polymerase“ oder „Taq DNA Polymerase“ (beide Fermentas)) sowie der entsprechende Puffer zugegeben und mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Anlagerungstemperatur wurde entsprechend der Länge und des GC%-Gehalts der in der Reaktion verwendeten DNS-Primer bestimmt. Die Dauer der Polymerisation war abhängig von der Länge des gewünschten Endprodukts. Für die Pfu-Polymerase gilt dabei 2 min / 1 kb, für die Taq-Polymerase 1 min / 1 kb.

Falls nicht anderweitig angegeben wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet:

Anfängliche Denaturierung (1×)	95°C, 10 min	} 30×
Denaturierung	95°C, 1 min	
Anlagerung der Primer	48 -58 °C, 1 min	
Polymerisation	72°C, 0,5 -10 min	
Finale Polymerisation (1×)	72°C, 10 min	

#### 4.3.2. DNS-Analyse durch Agarose-Gelelektrophorese

Für die Isolierung und Aufreinigung von DNS-Fragmenten wurden 0,5-2%-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Anfärbung der DNS wurde der Farbstoff

„DNA Stain G“ (Serva) 1:100 verdünnt zum Agarosegel zugegeben. Die DNS wurde mit „6× DNA Loading Dye“ (Fermentas) versetzt und bei 100 V für 45 min in 1× TAE-Puffer (10 mM Tris/Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Standard wurde der „GeneRuler™ 1 kb Ladder“ von Fermentas verwendet.

Anschließend wurden die DNS-Fragmente mit Hilfe eines Geldokumentationsgeräts (ChemiDoc (Biorad)) durch UV-Licht visualisiert und photographiert. Zur Isolierung der DNS-Fragmente wurden diese mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem „Gel Extraction Kit“ von Quiagen aufgereinigt.

### **4.3.3. Restriktionsverdau von DNS**

Der Restriktionsverdau von DNS-Molekülen wurde nach Standardprotokollen [256] und nach Angaben der Hersteller (Fermentas, NEB) durchgeführt.

Im Normalfall wurden 1-4 µg DNS mit 5-10 u des entsprechenden Restriktionsenzym für 1 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

### **4.3.4. Dephosphorylierung von linearisierter DNS**

Um die Religierung von linearisierten Plasmiden zu inhibieren, wurden diese mit 5-10 u Phosphatase („Shrimp Alkaline Phosphatase“ (Fermentas)) für 1 h bei 37°C behandelt.

### **4.3.5. Ligation von DNS-Fragmenten**

Die Menge an geschnittenem Vektor und Insert wurde durch Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt. Typischerweise wurde ein Verhältnis von 1:3 bis 1:10 (Vektor zu Insert) in der Reaktion eingesetzt. Für die Ligation wurde die „T4 DNA Ligase“ (Fermentas) verwendet, die Reaktion erfolgte für mindestens 1 h bei 16°C.

#### **4.3.6. Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen**

50 ml LB-Medium wurden mit einer Übernacht-Kultur des gewünschten *Escherichia coli*-Stamms 1:100 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 180 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,6 angezogen und anschließend abgeerntet (5.000 Upm, 4°C, 10 min). Das Zellpellet wurde vorsichtig in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (5.000 Upm, 4°C, 10 min) wurde das Zellpellet in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von sterilem Glycerol (15% Endkonzentration) wurden die Zellen über Nacht auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.3.7. Transformation von *E. coli*-Zellen**

Chemisch kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde die gewünschte Plasmid-DNS zugegeben (im Normalfall zwischen 50-200 ng) und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert, darauf folgte ein Hitzeschock (42°C, 1 min). Nach erneuter Inkubation auf Eis (5 min) wurde 1 ml LB-Medium zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden für 1 h bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert.

#### **4.3.8. Isolation von Plasmiden**

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen wurde mit dem kommerziell erhältlichen „Plasmid Mini Preparation Kit“ von Quiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNS wurde in der Regel mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

#### **4.3.9. Ortspezifische DNS-Mutagenese**

Zur Änderung oder Deletion einzelner oder mehrerer (2-4) DNS-Basen in einem gegebenen DNS-Fragment wurde das „QuikChange Site-directed

Mutagenesis Kit“ (Stratagene) benutzt. Die DNS-Oligonukleotide für die Mutagenese wurden nach den Vorgaben des Herstellers erstellt.

### **4.3.10. Bestimmung von DNS-Konzentrationen**

Die Konzentration gereinigter DNS-Fragmente wurde photometrisch mit Hilfe eines „NanoDrop N-1000“ (Pepqlab) ermittelt.

### **4.3.11. DNS-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNS-Fragmenten wurde im Genomcenter des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie mit einem „ABI 3730xl DNA Analyser“ durchgeführt. Die DNS-Sequenzen wurden mit „Chromas Lite 2.33“ ([www.technelysium.com](http://www.technelysium.com)) und „Vector NTI“ (Invitrogen) ausgewertet.

### **4.3.12. Kultivierung und Lagerung von *E. coli*-Stämmen**

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme wurden, sofern nicht anders angegeben, unter selektiven Bedingungen bei 37°C und 180 Upm auf dem Rundschüttler in LB-Medium [257] kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde über die Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt, eine  $OD_{578} = 0,5$  entspricht dabei etwa  $5 \times 10^8$  Bakterien / ml Kultur.

Zur langfristigen Lagerung der Bakterienstämme wurden 4 ml einer in LB-Medium exponentiell wachsenden Kultur ( $OD_{578} = 0,4-0,5$ ) mit 1 ml 87%-igem Glycerol (steril) versetzt. 1 ml Aliquots der Glycerolkulturen wurden bei -80°C gelagert.

## **4.4. Kultivierung von und Arbeit mit *S. cerevisiae*-Stämmen**

### **4.4.1. Wachstumsbedingungen und Lagerung**

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme wurden nach Standardmethoden kultiviert und gelagert [258]. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen in YEPD-Medium bei 180 Upm und 30°C angezogen.

Zur langfristigen Lagerung der Stämme wurden diese auf YEPD-Platten ausgestrichen und für 1-3 Tage bei 30°C inkubiert. Dann wurde eine Zahnstocherspitze mit Zellmaterial von der Platte genommen und in sterilem 15%-igen Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **4.4.2. Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen**

Die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen für die Transformation von DNS-Fragmenten [259] erfolgte mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode [260]. Dafür wurden 50 ml einer sich in der mittleren Log-Phase befindlichen Hefekultur ( $OD_{600} = 0,8-1$ ) abgeerntet (3.000 Upm, 3 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml 1 M Lithiumacetat resuspendiert und erneut abzentrifugiert (4.000 Upm, 1 min). Anschließend wurden die pelletierten Zellen in einem 1:1 Verhältnis (v/v) in 1 M Lithiumacetat resuspendiert. Für die folgende Transformation wurden 24 µl Zellsuspension verwendet.

#### **4.4.3. Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen**

24 µl kompetente Hefezellen wurden mit 8 µl aufgereinigtem PCR-Produkt oder 8 µl Plasmid, 8 µl „Salmon Sperm DNA“ (Fermentas) und 90 µl einer 50%-igen Polyethylenglykol 3350-Lösung (steril) gemischt. Die Suspension wurde 30 min bei RT inkubiert, anschließend wurden 12 µl 60%-iges Glycerol (steril) hinzugefügt. Die Probe wurde gut gemischt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt (10 min, 42°C). Für die Selektion über Antibiotikaresistenz wurde 1 ml YEPD-Medium zu den Zellen hinzugegeben und die Zellen wurden anschließend für 4 h bei 180 Upm und 30°C inkubiert. Dann wurden die Hefezellen auf YEPD-Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Für eine auxotrophe Selektion wurden die Zellen direkt auf Selektivmedium-Platten ausplattiert. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30°C bebrütet, entstandene Kolonien wurden auf Einzelkolonien ausgestrichen.

### **4.4.4. Genomische Integration durch homologe Rekombination**

Für die genomische Integration von Genen und für das Markieren endogener Gene wurden Hefepiasmide der YIplac-Serie verwendet [261]. Diese Vektoren enthalten keine autonome Replikationssequenz (ARS), daher können nur stabil ins Hefegenom integrierte Vektoren weitergegeben werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zum Markieren endogener Hefeproteine mit Epitop-Tags verwendet.

Die Markierung endogener Hefeproteine wurde durch das Amplifizieren spezifischer DNS-Kassetten erreicht [262]. Diese Kassetten enthalten neben der für den gewünschten Epitop-Tag codierenden DNS-Sequenz einen Selektionsmarker und können in *E. coli* repliziert und weitergegeben werden [263]. Für das Einführen eines C-terminalen Tags wurde die DNS-Kassette mit spezifischen Primern so amplifiziert, dass am 5'-Ende der amplifizierten Kassette etwa 50 bp homolog zur Sequenz vor dem Stopcodon des gewünschten Gens und am 3'-Ende etwa 50 bp homolog zur Sequenz direkt nach dem Stopcodon sind. Die amplifizierte DNS-Kassette wurde aufgereinigt und in Hefezellen transformiert.

### **4.4.5. Kreuzung von haploiden *S. cerevisiae*-Stämmen**

Zellmaterial der gewünschten *MATa*- und *MAT $\alpha$* -Stämme wurde von einer frisch gewachsenen YEPD-Platte entnommen und in 20  $\mu$ l sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in einem 1:1 Verhältnis gemischt und auf eine YEPD-Platte getropft. Die Kreuzung erfolgte für 5-7 h bei RT. Entstandene diploide Zellen wurden mit Hilfe eines Dissektionsmikroskops („MSM System 300 TSA“ (Singer Instruments)) isoliert [28,29] oder auf Selektionsmedium selektiert.

### **4.4.6. Sporulation und Tetradenanalyse diploider Hefestämme**

Die aus einer Kreuzung entstandenen Kolonien wurden auf Einzelkolonien ausgestrichen und anschließend auf Sporulations-Platten gegeben und für 2-4 Tage bei 30°C bebrütet.

Eine Zerstocherspitze Zellmaterial wurde von der Platte genommen und in 90  $\mu$ l 1 M Sorbitol (steril) resuspendiert. Für den Verdau der Zellwand wurden 10  $\mu$ l Zymolase T100 (10 mg/ml Stammlösung in 20%-igem Glycerol) zugegeben und die Zellsuspension wurde für 30 min im Wasserbad bei 30°C inkubiert. Dann wurden 20  $\mu$ l dieser Suspension auf eine YEPD-Platte pipettiert. Die Trennung der Tetraden wurde mit Hilfe eines Dissektionsmikroskops („MSM System 300 TSA“ (Singer Instruments)) durchgeführt [28,29], die einzelnen Sporen wurden auf YEPD-Platten für 2-3 Tage bei 30°C bebrütet. Entstandene Kolonien wurden auf Platten mit dem entsprechendem Selektionsmarker untersucht.

#### **4.4.7. Bestimmung des Kreuzungstyps**

Zur Identifizierung des Kreuzungstyps wurden die zu untersuchenden haploiden Hefekolonien auf Minimalmedium-Platten replika-plattiert, auf welchen zuvor der Teststamm 216 (*MAT $\alpha$* ) oder der Teststamm 217 (*MATa*) ausgestrichen worden war. Die Teststämme enthalten das *his1*-Allel und können daher ohne die Zugabe von Histidin auf Minimalmedium nicht wachsen. Da der zu testende haploide Stamm das Wildtyp-Allel trägt, können die aus der Kreuzung entstandenen diploiden Zellen anwachsen, während haploide Zellen nicht wachsen können.

#### **4.4.8. Isolation genomischer DNS aus *S. cerevisiae***

Von einer ausreichend angewachsenen Hefekolonie wurde eine Zahnstocherspitze Zellmaterial entnommen und in 200  $\mu$ l SEC-Puffer (1 M Sorbitol, 0,1 M Natriumcitrat, 60 mM EDTA, pH 7), 20  $\mu$ l Zymolase T100 (10 mg/ml Stammlösung) und 1,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert. Der Verdau der Zellwand wurde durch die Zugabe des Enzyms Zymolase induziert (37°C, 10 min). Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200  $\mu$ l Lysepuffer (2% SDS, 0,1 M Tris/HCl pH 9, 50 mM EDTA) und Inkubation bei 65°C für 5 min aufgeschlossen. Proteinverunreinigungen wurden mit 200  $\mu$ l 5 M Kaliumacetat präzipitiert (13.000 Upm, 4°C, 10 min). Um störende Salze aus der DNS-Probe zu entfernen, wurden 350  $\mu$ l des

Überstands mit 800 µl Ethanol versetzt und abzentrifugiert (13.000 Upm, RT, 10 min). Das DNS-Pellet wurde anschließend bei 65°C getrocknet und in 400 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **4.4.9. Zellzyklus-spezifische Synchronisation von Hefen**

#### **4.4.9.1. G<sub>1</sub>-Phase-Arrest**

Haploide Hefezellen des Paarungstyps *MATa* arretieren bei Zugabe des Pheromons  $\alpha$ -Faktor in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus [27,264]. Durch Auswaschen des Pheromons kann der G<sub>1</sub>-Arrest der Zellen anschließend wieder aufgehoben werden.

Hefestämme in Flüssigkultur wurden bei einer OD<sub>600</sub> = 0,2 für 2 h mit  $\alpha$ -Faktor arretiert (2 µg/ml Endkonzentration; Stammlösung 5 mg/ml in 100%-igem Methanol). Da das Pheromon von den Hefen verstoffwechselt wird, musste nach 1 h Inkubationszeit erneut  $\alpha$ -Faktor zu den Zellen gegeben werden. Um die Zellen aus dem G<sub>1</sub>-Arrest in den Zellzyklus zu entlassen, wurde 3× mit je 50 ml eiskaltem Medium gewaschen, dann wurden die Zellen in passendem Medium resuspendiert (50-200 ml, RT) und inkubiert.

#### **4.4.9.2. G<sub>2</sub>/M-Phase-Arrest**

Nocodazol [265,266] und Benomyl [267,268] sind Inhibitoren der Mikrotubuli-Polymerisation. Nocodazol führt zu einer Aktivierung des Metaphase-Kontrollpunkts und dadurch zu einem Arrest in einem Metaphase-ähnlichem Stadium (für einen Überblick siehe [269]).

Hefestämme in Flüssigkultur wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,6-0,8 angezogen, dann wurden die Zellen für 2 h in Nocodazol (15 µg/ml Endkonzentration; Stammlösung 1 mg/ml in 100%-igem DMSO) und Benomyl (10 µg/ml Endkonzentration; Stammlösung 10 mg/ml in 100%-igem DMSO) arretiert.

Um die in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretierten Hefezellen anschließend in den Zellzyklus zu entlassen, wurden diese 3× mit je 50 ml eiskaltem Medium gewaschen. Dann wurden die Zellen in Medium resuspendiert (50-200 ml, RT) und weiter inkubiert.

#### **4.4.10. *In vivo*-Proteindepletion durch Degroninduktion**

Zur spezifischen Depletion von Proteinen *in vivo* wurden Hefestämme verwendet, die am N-Terminus des zu untersuchenden endogenen Proteins eine Hitze-induzierbare Degronsequenz tragen. Diese Degronsequenz ist eine mutierte Form der Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus *Mus musculus*, welche bei 24°C gefaltet vorliegt, aber sich bei 37°C teilweise entfaltet und dadurch zum Substrat des Ubiquitin-Konjugationsenzym Ubc2 wird. Durch die folgende Polyubiquitinierung wird das Degron zum Abbau ins Proteasom der Zelle geleitet. Zusätzlich steht das endogene *UBR1*-Gen, welches für das Ubiquitinbindeprotein Ubr1 codiert, unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors *GAL1*, um die Frequenz der Ubiquitierung zu erhöhen [223]. Zusätzlich zur Depletion auf Proteinebene sind die zu untersuchenden Proteine auch auf der Ebene der Transkription reguliert. Das entsprechende Gen steht unter der Kontrolle des *tetO*-Promotors, der durch die Zugabe von Doxycyclin reprimiert wird [224].

Für die Proteindepletion wurde eine Hefekultur in der exponentiellen Wachstumsphase in 50 ml YEPR-Medium verwendet, die je nach Fragestellung nicht arretiert war oder in der G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert wurde. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4.000 Upm, 5 min) und in 50 ml YEPG-Medium resuspendiert. Durch die folgende Inkubation für 45 min bei 30°C in diesem Galaktose-haltigem Medium wurde die Expression von Ubr1 erreicht. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 50 ml YEPG-Medium, vorgewärmt auf 37°C, resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µg/ml Doxycyclin (Stammlösung 5 mg/ml in 50%-igem Ethanol) wurden die Zellen für 2 h bei 37°C angezogen, um die Induktion des Degrons sowie die Repression der Transkription zu gewährleisten.

#### **4.4.11. Analyse des DNS-Gehalts durch Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, die Zellzyklusphase von einzelnen Zellen in Flüssigkultur zu bestimmen [270]. Dazu wird die DNS mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der DNS-Gehalt einer einzelnen Zelle kann dadurch gemessen werden. Aufgrund der unterschiedlichen

Fluoreszenzintensitäten kann auf die Zellzyklusphase der Zelle geschlossen werden.

Für die Messung wurden 1 ml einer Hefekultur abzentrifugiert (4.000 Upm, 1 min), in 1 ml 70%-igem Ethanol resuspendiert und bei -20°C (mindestens 1 h) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4.000 Upm, 1 min), die Zellen in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert und die RNS der Zellen über Nacht mit 10 µg/ml „RNase A“ (Fermentas) bei 37°C verdaut. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, resuspendiert (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 78 mM MgCl<sub>2</sub>, 211 mM NaCl, 30 µg/ml Propidiumiodid) und mit Ultraschall (5 sec, Output-Control 2-2,5 („Sonifier S-450 Analogue“)) behandelt, um störende Zellklumpen aufzulösen.

Für die Messung wurden die Zellen mit „Sheath Fluid“ (Partec GmbH) verdünnt (1:20 bis 1:50). Die Analyse der Zellen wurde mit einem „CyFlow SL“ (Partec GmbH) durchgeführt, mindestens 10.000 Zellen wurden pro Probe analysiert. Die Messungen wurden mit der FloMax-Software von Partec ausgewertet und graphisch aufbereitet.

### **4.4.12. Cycloheximid-Assay**

Um die Stabilität von Proteinen *in vivo* zu untersuchen, wurde der Translationshemmer Cycloheximid verwendet. Nach Zugabe von Cycloheximid kann keine Neusynthese zellulärer Proteine mehr stattfinden. Hat das zu untersuchende Protein also eine geringe Halbwertszeit, wird die Menge des zellulären Proteins schon bald nach der Zugabe des Antibiotikums stark abnehmen.

25 ml YEPD-Medium wurden mit einer Übernacht-Kultur des gewünschten Hefestammes auf eine OD<sub>600</sub> = 0,2 angeimpft und bei 30°C und 180 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 angezogen. Anschließend wurden die Zellen mit 15 µg/ml Nocodazol und 10 µg/ml Benomyl bei 30°C in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert. Um die Expression neuer Proteine zu unterbinden, wurde Cycloheximid hinzugegeben (0,1 mg/ml Endkonzentration) und die Zellen wurden für weitere 2 h inkubiert (180 Upm, 30°C). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die Durchflusszytometrie und die TCA-Präzipitation gezogen.

## **4.5. Proteinbiochemische Methoden**

### **4.5.1. Protein-Immunopräzipitation aus Hefezellen**

Um TAP-getaggte Proteine aus Hefestämmen zu immunopräzipitieren, wurden die Hefen in 200 ml YEPD-Medium angezogen und für 2 h mit 15 µg/ml Nocodazol und 10 µg/ml Benomyl bei 30°C in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert. Anschließend wurden die Zellen abgeerntet (4.000 Upm, 4°C, 3 min) und resuspendiert (Puffer I: 50 mM HEPES/KOH pH 7,3, 70 mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat, 10% Glycerol, 0,1% Triton X-100, 1× „complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix“ (Roche), 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Pepstatin, 0,5 mM DTT). Die Zellyse erfolgte mit Hilfe von Glaskügelchen (Sigma) in einer Fastprep (3× 20 sec, Speed 6,5; zwischen jedem Lauf wurden die Proben 5 min auf Eis inkubiert) von Qbiogen. Anschließend wurde mit einer Nadel ein Loch in das Vetter-Reaktionsgefäß gestochen und die Zellsuspension wurde 2× mit je 200 µl 10%-iger TCA-Lösung eluiert (1.200 Upm, 4°C, 3 min). Die beiden Eluate wurden zusammengefasst, die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden angeglichen und dann mit IgG-Sepharose 6-Beads (GE Healthcare) für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads zweimal mit Puffer I, einmal mit Puffer I + 100 mM Kaliumacetat, einmal mit Puffer I + 120 mM Kaliumacetat und einmal mit Puffer I + 150 mM Kaliumacetat gewaschen. Um die salzsensitive Bindung von Wpl1 an den Cohesinkomplex nicht zu zerstören, wurde bei Immunopräzipitationen, bei welchen Wpl1 detektiert werden sollte, nur dreimal mit Puffer I und zweimal mit Puffer I + 100 mM Kaliumacetat gewaschen. Die anschließende Elution der gebundenen Proteine erfolgte denaturierend in 2× SDS-PAGE-Probenpuffer für 10 min bei 99°C.

### **4.5.2. TCA-Präzipitation von Proteinen aus Hefezellen**

1 ml einer exponentiell gewachsenen Hefekultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 4°C, 3 min) und in 1 ml eiskalter 10%-iger TCA-Lösung resuspendiert. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4.000 Upm, 4°C, 1 min). Nach diesem Schritt konnten die Zellpellets bei Bedarf längere Zeit bei -20°C gelagert werden. Die Zellpellets wurden danach in 200

µl 10%-iger TCA-Lösung resuspendiert und die Suspension wurde in Vetter-Reaktionsgefäße (Roland Vetter Laborbedarf OHG), die zuvor mit 1,2 ml Glaskügelchen (Sigma) befüllt wurden, überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe der Fastprep (40 sec, Speed 6,5), dann wurde mit einer Nadel ein Loch in das Vetter-Reaktionsgefäß gestochen und die Zellsuspension wurde 2x mit je 200 µl 10%-iger TCA-Lösung eluiert (1.200 Upm, 4°C, 3 min). Die Proben wurden erneut zentrifugiert (13.000 Upm, RT, 10 min), das Pellet wurde in 100 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert. Nachdem der pH-Wert mit ~25 µl 1M Tris neutralisiert wurde, sind die Proben für 10 min bei 99°C inkubiert worden. Um vorhandene Zelltrümmer zu entfernen, wurde die Suspension erneut abzentrifugiert (13.000 Upm, RT, 10 min) und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **4.5.3. TCA-Präzipitation von aufgereinigten Proteinen**

Zu 1 ml der zu konzentrierenden Proteinprobe wurden 15 µl einer 1%-igen Desoxycholsäure-Lösung zugegeben und gemischt. Dann wurde die Probe 20 min auf Eis inkubiert, bevor 250 µl einer eiskalten 30%-igen TCA-Lösung zugegeben wurden. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis (30 min) wurde die Probe abzentrifugiert (13.000 Upm, 4°C, 30 min) und der Überstand vorsichtig entfernt. Die Zentrifugation wurde wiederholt (13.000 Upm, 4°C, 3 min), um den Überstand komplett entfernen zu können. Das Proteinpellet wurde in 20-50 µl 2x SDS-PAGE-Ladepuffer resuspendiert und der pH-Wert wurde mit 2 µl 1 M Tris neutralisiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 99°C inkubiert.

### **4.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli [271]. Für das Trenngel wurde eine für das zu untersuchende Protein geeignete Acrylamidkonzentration gewählt. Für das Sammelgel wurde immer eine 4%-ige Acrylamidkonzentration verwendet.

Pipettierschema des Trenngels:

Stammlösung	Finale Acrylamidkonzentration im Trenngel				
	6%	8%	10%	12%	15%
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7,50 ml
1,5 M Tris/HCl pH 7,5, 0,4% SDS	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
ddH <sub>2</sub> O	8,25 ml	7,25 ml	6,25 ml	5,25 ml	3,75 ml
10% (w/v) APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

#### Sammelgel:

Für das Sammelgel wurden 0,65 ml 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid, 1,25 ml Puffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% SDS) und 3,05 ml ddH<sub>2</sub>O gemischt. Für die Polymerisierung wurden 25 µl 10%-iges APS und 5 µl TEMED zugegeben.

Die Proteinproben wurden mit SDS-PAGE-Ladepuffer (6× Stammlösung: 2% SDS, 20% Glycerol, 1% Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM β-Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min bei 99°C inkubiert, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben auf das SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und mit SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris, 20 mM Glycin, 0,1% SDS) für 90 min bei 110 V laufen gelassen. Als Proteinmarker wurde der „Precision Plus Protein Dual Color Standard“ von Biorad verwendet.

#### **4.5.5. Färbemethoden**

Die mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden, abhängig von Konzentration und Fragestellung, entweder mit einer Coomassie- oder einer Silberfärbung sichtbar gemacht.

Für die Coomassiefärbung wurden die Gele für wenige Sekunden in Färbelösung (250 mg/l Coomassie G-250, 10% Essigsäure) gekocht und anschließend weitere 10 min inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch Kochen in ddH<sub>2</sub>O (10 min) und anschließender Inkubation für mindestens 1 h. Die so angefärbten Gele wurden eingescannt oder mit einem Geldokumentationsgerät (ChemiDoc (Biorad)) photographiert.

Für die Silberfärbung wurde das „PageSilver™ Staining Kit“ von Fermentas verwendet. Die Färbung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 4.5.6. Western-Blot und Immunodetektion

#### Verwendete Puffer und Lösungen:

##### Transferpuffer:

Tris-Base	25 mM
Glycin	125 mM
Methanol	10% (v/v)

---

##### Phosphatpuffer (PBS):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM

---

Der Phosphatpuffer wurde auf pH 7,2 titriert.

##### PBS-T:

Phosphatpuffer (PBS) mit 0,05% Tween 20.

##### Blockierungspuffer:

Phosphatpuffer (PBS) mit 0,05% Tween 20 und 5% BSA.

##### ECL-Lösung A:

Tris/HCl pH 8,6	100 mM
Luminol	250 mg/l

---

Die Lösung wurde bei 8°C gelagert.

##### ECL-Lösung B:

11 mg para-Hydrocoumarinat wurden in 10 ml DMSO gelöst. Die Lösung wurde lichtgeschützt bei RT gelagert.

#### Protokoll:

Der Transfer von zuvor durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen erfolgte mit Hilfe eines Semi-Dry-Blots („Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“ (Biorad)).

Das SDS-Polyacrylamid-Gel, die PVDF-Membran (Biorad) sowie das Whatman-Papier (Biorad) wurden für einige Sekunden in Transferpuffer

inkubiert. Anschließend wurde der Blot zusammengebaut und der Transfer erfolgte für 15 min bei 15 V.

Zur Immunodetektion von Proteinen wurde die Bindungskapazität der Membran zunächst abgesättigt. Dazu wurde die Membran 30 min in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde 2× je 15 min mit PBS-T gewaschen. Dann wurde die Membran 1 h mit dem Primärantikörper inkubiert (Primärantikörper 1:5000 bis 1:10000 in 1:10 verdünntem Blockierungspuffer). Nicht gebundener Primärantikörper wurde ausgewaschen (3× 15 min mit PBS-T), die Membran wurde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert (Sekundärantikörper 1:5000 in 1:10 verdünntem Blockierungspuffer). Der jeweils verwendete Sekundärantikörper war an die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Die Membran wurde erneut gewaschen (3× 15 min mit PBS-T) und mit ECL-Lösung (1 ml ECL-Lösung A, 100 µl ECL-Lösung B, 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, direkt vor der Reaktion vermischt) für 3 min inkubiert. Die durch das Umsetzen von Luminol entstehende Chemolumineszenz wurde mit einem photographischen Film („Hyperfilm ECL Western“ (GE Healthcare)) dokumentiert.

#### **4.5.7. *In vitro*-Proteinexpression**

Die zellfreie Expression von Genen basiert darauf, alle für die Transkription und Translation nötigen Faktoren rekombinant herzustellen oder aus *E. coli* aufzureinigen. In dieser Arbeit wurde das „PUREexpress™ Protein *in vitro* Synthesis Kit“ von Stratagene verwendet, mit welchem eine zellfreie Expression von Plasmid-codierten Genen unter der Kontrolle eines T7-Promotors möglich ist. Der Erfolg der Expression wurde mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE überprüft.

#### **4.5.8. Proteinexpression in *E. coli***

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte durch Autoinduktion mit Laktose [272].

### Verwendete Puffer:

#### 20× NPS:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	66 g
KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	136 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	178 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

---

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 6,75 eingestellt, die Lösung wurde autoklaviert.

#### 50× 5052:

Glycerol	250 g
D-(+)-Glukose	25 g
D-(+)-Laktose	100 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

---

Die Lösung wurde autoklaviert.

### Protokoll:

Zu dem gewünschten Volumen LB-Medium wurde 1 mM MgSO<sub>4</sub> (steril), 1× NPS, 1× 5052 sowie das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die Kultur wurde 1:100 angeimpft und bei 180 Upm und 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7 angezogen. Die Kultur wurde auf die entsprechende Expressionstemperatur eingestellt und die Zellen wurden über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeerntet (5.000 Upm, 4°C, 7 min).

### **4.5.9. Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen**

Rekombinante Proteine mit N- oder C-terminalem 6×His-Tag wurden in *E. coli* BL21(Gold) oder *E. coli* BL21(RIL) durch Autoinduktion exprimiert und durch Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

### Verwendete Puffer:

#### 2× Lysepuffer:

HEPES/KOH pH 7,5	40 mM
NaCl	600 mM
Imidazol	10 mM
Glycerol	10%
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM

PMSF	2 mM
„complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix“ (Roche)	1×

---

β-Mercaptoethanol, PMSF und der Proteaseinhibitor wurden direkt vor dem Experiment zum Puffer zugegeben.

#### Waschpuffer:

HEPES/KOH pH 7,5	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	30 mM
Glycerol	5%
β-Mercaptoethanol	5 mM
PMSF	1 mM
„complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix“ (Roche)	1×

---

β-Mercaptoethanol, PMSF und der Proteaseinhibitor wurden direkt vor dem Experiment zum Puffer zugegeben.

#### Elutionspuffer:

HEPES/KOH pH 7,5	20 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
Glycerol	5%
β-Mercaptoethanol	1 mM

---

β-Mercaptoethanol wurde direkt vor dem Experiment zum Puffer zugegeben.

#### Gelfiltrationspuffer:

HEPES/KOH pH 7,5	20 mM
NaCl	100 mM
Glycerol	5%
β-Mercaptoethanol	1 mM

---

Der Puffer wurde filtriert und entgast.

#### Protokoll:

Das Zellpellet der abgeernteten Zellen wurde 1:1 (v/v) in 2× Lysepuffer resuspendiert. Für den Verdau der genomischen DNS wurden 1-3 Spatelspitzen „DNase I“ (AppliChem) und 5 mM MgSO<sub>4</sub> zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer auf 4°C vorgekühlten French-Press (American Instrument Company, Silver Spring) bei 1000 psi. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen, wurde der Lauf weitere 2-mal wiederholt.

Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (35.000 Upm, 4°C, 30 min) und der Proteinüberstand mit einer der Expression des rekombianten Proteins entsprechenden Menge an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Beads („Protino<sup>®</sup> Ni<sup>2+</sup>-NTA

Agarose“ (Macherey-Nagel)) versetzt. Anschließend wurde die Suspension für 2 h bei 4°C inkubiert (rotierend), um eine Bindung des rekombinanten Proteins an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Beads zu ermöglichen. Die Suspension wurde auf eine zuvor in Lysepuffer equilibrierte Chromatographiesäule (Biorad) aufgetragen und mit Waschpuffer gewaschen. Es wurde solange weiter Waschpuffer auf die Säule gegeben, bis keine unspezifisch gebundenen Proteine mehr von der Säule eluiert wurden (Der Durchfluss wurde mit Hilfe eines „NanoDrop N-1000“ (Peqlab) kontrolliert). Anschließend wurde das Protein mit 1-20 ml Elutionspuffer eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht und anschließend auf eine geeignete Gelfiltrationssäule (Äkta-System (GE Healthcare)) in Gelfiltrationspuffer aufgetragen. Die das rekombinante Protein enthaltenden Fraktionen wurden mit 10% Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 4.5.10. Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Rekombinante Proteine mit N- oder C-terminalem 6×His-Tag wurden in *E. coli* BL21(Gold) oder *E. coli* BL21(RIL) durch Autoinduktion exprimiert und durch Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt.

#### Verwendete Puffer:

##### 2× Lysepuffer:

HEPES/KOH pH 7,5	40 mM
NaCl	600 mM
Imidazol	10 mM
Glycerol	10%
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM
PMSF	2 mM
„complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix“ (Roche)	1×

---

β-Mercaptoethanol, PMSF und der Proteaseinhibitor wurden direkt vor dem Experiment zum Puffer zugegeben.

#### Waschpuffer:

HEPES/KOH pH 7,5	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	30 mM
Glycerol	5%
Harnstoff	8 M
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 mM

$\beta$ -Mercaptoethanol wurde direkt vor dem Experiment zum Puffer zugegeben.

#### Elutionspuffer:

HEPES/KOH pH 7,5	20 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
Glycerol	5%
Harnstoff	8 M
$\beta$ -Mercaptoethanol	1 mM

$\beta$ -Mercaptoethanol wurde direkt vor dem Experiment zum Puffer zugegeben.

#### Rückfaltungspuffer I:

HEPES/KOH pH 7,5	20 mM
NaCl	100 mM
Glycerol	5%
$\beta$ -Mercaptoethanol	1 mM

$\beta$ -Mercaptoethanol wurde direkt vor dem Experiment zum Puffer zugegeben.

#### Rückfaltungspuffer II:

Tris/HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	500 mM
Glycerol	10%
ZnSO <sub>4</sub>	500 $\mu$ M
Reduziertes Glutathion	1 mM
Oxidiertes Glutathion	0,1 mM
Tween 20	0,005%
PMSF	1 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	1 mM

$\beta$ -Mercaptoethanol und PMSF wurden direkt vor dem Experiment frisch zum Puffer zugegeben.

#### Protokoll:

Das Zellpellet der abgeernteten Zellen wurde 1:1 (v/v) in 2 $\times$  Lysepuffer resuspendiert. Für den Verdau der genomischen DNS wurden 1-3 Spatelspitzen „DNase I“ (AppliChem) und 5 mM MgSO<sub>4</sub> zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer auf 4°C vorgekühlten French-Press (American Instrument Company, Silver Spring) bei 1000 psi. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen, wurde der Lauf zweimal wiederholt.

Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (35.000 Upm, 4°C, 30 min) und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 2× Lysepuffer 1:1 (v/v) bei RT unter Zugabe von Harnstoff auf eine Endkonzentration von 8 M Harnstoff vollständig resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 1 h bei RT inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (16.000 Upm, 30 min) und der Überstand wurde mit einer der Expression des rekombianten Proteins entsprechenden Menge an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Beads („Protino<sup>®</sup> Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose“ (Macherey-Nagel)) versetzt. Anschließend wurde die Suspension für 2 h bei RT inkubiert (rotierend), um eine Bindung des rekombinanten Proteins an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Beads zu ermöglichen. Die Suspension wurde auf eine zuvor in Waschpuffer equilibrierte Chromatographiesäule (Biorad) aufgetragen und mit ausreichend Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit 1-20 ml Elutionspuffer eluiert und gegen den gewünschten Rückfaltungspuffer über Nacht bei 8°C dialysiert. Der Erfolg der Rückfaltung wurde durch Gelfiltration, Tryptophan-Fluoreszenz oder CD-Spektroskopie überprüft.

### **4.5.11. Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von Proteinen wurde photometrisch mit Hilfe eines „NanoDrop N-1000“ (Peylab) ermittelt.

### **4.5.12. CD-Spektroskopie**

Der Anteil an Sekundärstrukturen in einer Proteinprobe wurde durch CD-Spektroskopie („Jasco CD-Spectropolarimeter J-810“) abgeschätzt. Ein hoher Anteil an Sekundärstrukturen deutet dabei auf ein korrekt gefaltetes Protein. Durch die Aufnahme von einzelnen CD-Spektren bei steigenden Temperaturen wurde die Schmelzkurve einer gegebenen Proteinprobe bestimmt.

#### **4.5.13. Tryptophan-Fluoreszenz**

In korrekt gefalteten Proteinen liegen hydrophobe Tryptophanreste im Normalfall im hydrophoben Kern eines Proteins begraben. Ein Emissionsmaximum bei 357 nm (abhängig von der Art des Proteins) nach Anregung der Tryptophan-Fluoreszenz bei 293 nm deutet auf das Vorhandensein eines hydrophoben Kerns hin und kann daher als Indikator für die Faltung eines Proteins angesehen werden. Für die Messung der Tryptophan-Fluoreszenz wurde ein Spektrofluorometer („Jasco FP-6500“) verwendet.

#### **4.5.14. Dichtegradientenzentrifugation**

Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde in dieser Arbeit die Dichtegradientenzentrifugation verwendet.

10-30%-ige Glycerol-Dichtegradienten wurden in 10 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 75 mM NaCl, 0,25 mM EDTA und 1× „EDTA-free Protease Inhibitor Mix“ (Roche) mit Hilfe einer Gradientenmaschine (Biocomp) vorbereitet.

Die zu untersuchenden Proteine wurden in 400 µl Volumen für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Oberfläche des Dichtegradienten pipettiert. Dann wurden die mit der Proteinprobe beladenen Dichtegradienten für 38 h bei 38.000 Upm und 4°C in einem SW40 Ti-Rotor zentrifugiert. Es wurden 44 Fraktionen zu je 400 µl mit der Gradientenmaschine geerntet.

#### **4.5.15. *In vitro*-Immunopräzipitation rekombinanter Proteine**

Um die Interaktion von Proteinen *in vitro* zu untersuchen, wurden rekombinant aufgereinigte und getaggte Proteine verwendet. Das zu untersuchende Protein besitzt einen 6×His- sowie einen 3×HA-Tag, während der mögliche Interaktionspartner zum Nachweis lediglich einen 6×His-Tag besitzt.

Die beiden Proteine wurden in einem molaren 1:1 Verhältnis (etwa 50 µg pro Protein) in 500 µl Puffer I (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,005% Tween 20, 1 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1× „EDTA-free Protease Inhibitor Mix“ (Roche)) gemischt und für 2 h bei 8°C rotierend inkubiert. Dann wurden 40 µl zuvor in Puffer I equilibrierte „Anti-HA

Agarose Antibody Beads“ (Sigma) zu der Mischung hinzugegeben und für weitere 2 h bei 8°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde 5× mit je 1 ml Puffer I gewaschen. Die Beads wurden abezentriugiert und in 50 µl 2× SDS-PAGE-Ladepuffer für 10 min gekocht. Der Überstand (IP) enthält nun alle ehemals an die Beads gebundenen Proteine. Die Immunopräzipitation wurde mit Hilfe eines Western-Blots mit folgender Immunodetektion gegen den 6×His-Tag der Proteine analysiert.

### **4.5.16. Röntgenstrukturanalyse**

Die Röntgenstrukturanalyse dient der Gewinnung von hochauflösenden Proteinstrukturen. Alle Kristallisationsansätze wurden mit aufkonzentrierten (5-50 mg/ml) und reinen Proteinproben bei 20°C durchgeführt. Mit einem Pipettierroboter („Honeybee 961 Crystallization Robot“ (Genomic Solutions)) wurden je 400 nl Proteinlösung mit 400 nl Reservoirlösung vermischt und auf Mikrotiterplatten mit insgesamt 768 verschiedenen Bedingungen aufgetragen („Nextal Screens“ (Quiagen)). Von den einzelnen Tropfen wurden zu verschiedenen Zeiten (nach einem Tag, nach einer Woche und nach einem Monat) Bilder aufgenommen („RockImager 54 Device“ (Formulatrix)) und manuell ausgewertet. Das Diffraktionsmuster von Proteinkristallen wurde an der „Swiss Light Source“ (Paul-Scherer-Institut, Villingen in der Schweiz) an der „Beamline 10SXA“ bei einer Wellenlänge von 1 Å und 100 K gemessen und mit einem PILATUS 6M-Detektor (Dectris) aufgezeichnet.

Dr. Reinhard Albrecht und Kerstin Bär haben den Pipettierroboter bedient, die Messung der Kristalle und die Lösung der Strukturen wurde von Marcus Hartmann, Dr. Reinhard Albrecht und Dr. Kornelius Zeth übernommen. Ich möchte mich an dieser Stelle nochmals für die tatkräftige Hilfe bedanken.

#### **4.5.16.1. Bestimmung der Kristallstruktur des PCNA/Eco1-Peptid-Komplexes**

Für den Kristallisationsansatz wurden 5 mg/ml PCNA in 20 mM HEPES, pH 8, 100 mM NaCl, 5% Glycerol und 1 mM β-Mercaptoethanol verwendet. Bereits nach einem Tag wurden mit 0,1 M PCB Buffer pH 6 und 25% PEG-1500

Kristalle erreicht. Die Kristalle wurden geerntet und in Reservoirlösung gewaschen. Anschließend wurde der Kristall mit dem Eco1-PIP-Box-Peptid (NLIQSKLQVNNNGSKS (JPT Peptide Technologies, Berlin)) inkubiert. Dazu wurde das Eco1-Peptid in 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 5% Glycerol und 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol gelöst (Endkonzentration 10 mM). Dann wurden 1  $\mu$ l der Peptidlösung mit 1  $\mu$ l der Reservoirlösung vermischt. Der gewaschene PCNA-Kristall wurde in den Tropfen überführt und der Ansatz wurde 3 Tage bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde der Kristall mit Reservoirlösung gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren, das Diffraktionsmuster wurde an der „Swiss Light Source“ gemessen. Bei der Arbeit mit den Kristallen wurde ich freundlicherweise von Dr. Reinhard Albrecht und Marcus Hartmann unterstützt.

Die Kristallstruktur wurde von Marcus Hartmann durch Molecular-Replacement-Methoden gelöst (verwendete Referenzstruktur: 2OD8 [240]). Die Verfeinerung des Modells wurde mit Unterstützung von Marcus Hartmann mit „Refmac“ [273] und „Coot“ [274] durchgeführt. Die Sekundärstrukturen wurden mit Hilfe von „DSSP“ [275,276] bestimmt und mit „dssp2pdb“ ([www.jamesstroud.com](http://www.jamesstroud.com)) in das Modell integriert. Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen und Strukturüberlagerungen wurden mit „PyMOL 1.5“ (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.) erstellt.

## **4.6. Mikroskopische Methoden**

### **4.6.1. Methanolfixierung von Hefezellen**

In Flüssigkultur angezogene Hefestämme wurden mit Hilfe von Methanol fixiert. Dazu wurde 1 ml der Hefekultur abzentrifugiert (4.000 Upm, 4°C, 1 min) und das Zellpellet mit 1 ml eiskaltem Methanol resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Dann konnten die Zellen für 1-2 Wochen bei 4°C gelagert werden. Für die mikroskopische Analyse wurden die Zellen zuvor gewaschen (1× mit 50%-igem Methanol, 1× mit PEM Puffer (100 mM PIPES/KOH pH 6,8, 1 mM EDTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>)).

#### 4.6.2. Visualisierung der Schwesterchromatid-Kohäsion

Für die Untersuchung der Schwesterchromatid-Kohäsion wurden Hefestämme verwendet, die eine Abfolge von 336 *tetO*-Operatorsequenzen in den *URA3*-Lokus (etwa 35 kp vom Zentromer entfernt) auf Chromosom V integriert tragen. Da die Zellen ebenfalls das Fusionsprotein TetR-GFP exprimieren, können die Chromosomen so indirekt unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden [33]. Die zu untersuchenden Hefezellen wurden mit dem Pheromon  $\alpha$ -Faktor in der  $G_1$ -Phase synchronisiert und dann in Medium mit Nocodazol und Benomyl entlassen. Nach 100 min wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop („Zeiss Axio Imager.Z1“) untersucht. Zellen, bei welchen nur ein einziges GFP-Signal zu erkennen ist, weisen keinen Defekt bei der Schwesterchromatid-Kohäsion auf. Zwei getrennte GFP-Signale treten auf, wenn Defekte bei der Kohäsion der Schwesterchromatiden vorhanden sind.

#### 4.6.3. Visualisierung der Biorientierung der Chromosomen

Um Defekte bei der Biorientierung der Chromosomen zu untersuchen, wurde der Chromosomen-Biorientation-Assay [229] mit leichten Abweichungen durchgeführt. Die verwendeten Stämme haben eine Abfolge von *tetO*-Sequenzen in den *LEU2*-Lokus auf Chromosom IV (etwa 2 kb vom Zentromer entfernt) integriert. Daneben werden in den Zellen TetR-GFP- und Spc42-Tomato-Fusionsproteine exprimiert, um die Chromosomen bzw. Spindelpole zu visualisieren. *CDC20* steht zudem unter der Kontrolle eines Methionin-reprimierbaren Promotors, um einen Metaphase-Arrest der Zellen zu ermöglichen [229]. Die zu untersuchenden Hefestämme wurden in 50 ml -Met-Medium (synthetisches Drop-Out-Medium ohne Methionin) auf eine  $OD_{600} = 0,05$  angeimpft und bei 180 Upm und 30°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,2$  angezogen. Die Zellen wurden für 2 h mit  $\alpha$ -Faktor in der  $G_1$ -Phase synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml YEPD-Medium + 8 mM Methionin und  $\alpha$ -Faktor resuspendiert und 1 h bei 180 Upm und 30°C inkubiert. Die Zellen wurden aus dem  $G_1$ -Arrest entlassen (durch 3× Waschen mit 50 ml vorgekühltem (4°C) YEPD + 8 mM Methionin) und in 50 ml YEPD +

8 mM Methionin in Nocodazol und Benomyl für 2 h bei 30°C in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert. Dann wurden die Spindelgifte ausgewaschen (3× 50 ml YEPD + 8 mM Methionin, 4°C) und die Zellen wurden in 50 ml YEPD + 8 mM Methionin entlassen. Die weitere Inkubation erfolgte bei 180 Upm und 25°C, an den im Experiment angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die Methanolfixierung und die Durchflusszytometrie gezogen.

Die mit Methanol fixierten Proben wurden an einem Fluoreszenzmikroskop („Zeiss Axio Imager.Z1“) visualisiert und mit der „Metamorph®“ Software Version 7.1.3.0“ (Molecular Devices) ausgewertet.

#### **4.6.4. Chromosomenspreizungen**

Chromosomenspreizungen sind eine häufig genutzte Methode, um die chromosomale Lokalisation von getaggten Proteinen in eukaryotischen Zellen zu untersuchen [33]. Dafür wurden 2 ml Hefekultur (abhängig von der Fragestellung zyklisierende oder arretierte Kulturen) mit einer OD<sub>600</sub> > 0,6 verwendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4. 000 Upm, 4°C, 2 min) und in 300 µl auf 37°C vorgewärmter Lösung I (0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 M Sorbitol, 20 mM DTT) resuspendiert. Durch Zugabe von Zymolase T100 (0,1 mg/ml Endkonzentration) wurde die Zellwand der Hefen bei 37°C für 5 min im Wasserbad verdaut. Anschließend wurde der Verdau mit 1 ml eiskalter Lösung II (0,1 M MES pH 6,4, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M Sorbitol, 1 mM EDTA) abgestoppt. Die so entstandenen Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (2.000 Upm, 3 min, 4°C) und vorsichtig in 200 µl Lösung II resuspendiert. Zur Fixierung und Lyse der Zellen wurden 20 µl Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben. Direkt danach wurden 40 µl Fixativ (4% Para-Formaldehyd), 80 µl 1%-iges Lipsol und 80 µl Fixativ auf die Zellsuspension pipettiert. Die Lyse der Zellen und die Spreizung der Chromosomen erfolgte durch das Rollen eines Glasstabs über die Suspension, ohne dabei den Objektträger zu berühren. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht getrocknet und bei Bedarf bei -20°C gelagert.

Um die getaggten Proteine detektieren zu können, wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Die Objektträger wurden dazu 10 min in PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit 100 µl Blockierungspuffer (0,5% BSA, 0,5%

Gelatine) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (10 min, PBS) wurden 60 µl des primären Antikörpers (in 1:10 Blockierungspuffer 1:500 verdünnt; α-HA (Maus, 16B12) und α-MYC (Kaninchen, 71D10)) zugegeben und für 2 h inkubiert. Die Objektträger wurden erneut gewaschen (10 min, PBS), dann wurde der sekundäre Antikörper (in 1:10 Blockierungspuffer 1:500 verdünnt; Alexa Fluor 488 α-Maus und Alexa Fluor 568 α-Kaninchen) zugegeben und für 1 h in vollständiger Dunkelheit inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (10 min, PBS) wurde 35 µl DAPI-Lösung (4 Teile DAPI (Invitrogen), 3 Teile Blockierungspuffer) auf die Probe gegeben. Ein Deckglas wurde vorsichtig (unter Vermeidung von Luftblasen) auf den Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt. Die Proben konnten bis zu 6 Monaten bei -20°C und Dunkelheit gelagert werden.

Die Proben wurden an einem Fluoreszenzmikroskop („Zeiss Axio Imager.Z1“) visualisiert und mit der „Metamorph® Software Version 7.1.3.0“ (Molecular Devices) analysiert und quantifiziert.

### **4.6.5. Elektronenmikroskopie**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von aufgereinigten rekombinanten Proteinen wurden von Dr. Heinz Schwarz, Dr. Matthias Flötenmeyer und Jürgen Berger in der Elektronenmikroskopie-Abteilung des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie durchgeführt.

## 5. Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Maton, A., D. Lahart, et al. (1997). "Cells: Building Blocks of Life. New Jersey. Prentice Hall."
- <sup>2</sup> Ayala, F. J., B. Alberts, et al. (2008). Science, Evolution, and Creationism, The National Academies Press. Washington, D. C.
- <sup>3</sup> Morgan, D. O. (2007). The cell cycle: principles of control, (London, UK, New Science Press Ltd in association with Oxford University Press and Sinauer Associates, Inc., Publishers).
- <sup>4</sup> Alberts, B., A. Johnson, et al. (2008). Molecular Biology of the Cell, New York: Garland Science (5th ed.).
- <sup>5</sup> Pines, J. and C. L. Rieder (2001). "Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. In *Nat Cell Biol*, pp. E3."
- <sup>6</sup> Adams, I. R. and J. V. Kilmartin (2000). "Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication?" Trends Cell Biol **10**(8): 329-35.
- <sup>7</sup> Jaspersen, S. L. and M. Winey (2004). "The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 1-28.
- <sup>8</sup> Jin, Q. W., J. Fuchs, et al. (2000). "Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization." J Cell Sci **113** (Pt 11): 1903-12.
- <sup>9</sup> Yeh, E., J. Haase, et al. (2008). "Pericentric chromatin is organized into an intramolecular loop in mitosis." Curr Biol **18**(2): 81-90.
- <sup>10</sup> Tanaka, T., J. Fuchs, et al. (2000). "Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation." Nat Cell Biol **2**(8): 492-9.
- <sup>11</sup> Zhou, J., J. Yao, et al. (2002). "Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint." J Cell Sci **115**(Pt 18): 3547-55.
- <sup>12</sup> Indjeian, V. B. and A. W. Murray (2007). "Budding yeast mitotic chromosomes have an intrinsic bias to biorient on the spindle." Curr Biol **17**(21): 1837-46.
- <sup>13</sup> Dewar, H., K. Tanaka, et al. (2004). "Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle." Nature **428**(6978): 93-7.
- <sup>14</sup> Goshima, G. and M. Yanagida (2000). "Establishing biorientation occurs with precocious separation of the sister kinetochores, but not the arms, in the early spindle of budding yeast." Cell **100**(6): 619-33.
- <sup>15</sup> He, X., S. Asthana, et al. (2000). "Transient sister chromatid separation and elastic deformation of chromosomes during mitosis in budding yeast." Cell **101**(7): 763-75.
- <sup>16</sup> Tanaka, T. U., N. Rachidi, et al. (2002). "Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections." Cell **108**(3): 317-29.
- <sup>17</sup> Amon, A., S. Irniger, et al. (1994). "Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle." Cell **77**(7): 1037-50.
- <sup>18</sup> Kops, G. J., M. van der Voet, et al. (2010). "APC16 is a conserved subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome." J Cell Sci **123**(Pt 10): 1623-33.

- 
- <sup>19</sup> Schreiber, A., F. Stengel, et al. (2011). "Structural basis for the subunit assembly of the anaphase-promoting complex." Nature **470**(7333): 227-32.
- <sup>20</sup> Hartwell, L. H., J. Culotti, et al. (1970). "Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(2): 352-9.
- <sup>21</sup> Forsburg, S. L. and P. Nurse (1991). "Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*." Annu Rev Cell Biol **7**: 227-56.
- <sup>22</sup> Piggott, J. R., R. Rai, et al. (1982). "A bifunctional gene product involved in two phases of the yeast cell cycle." Nature **298**(5872): 391-3.
- <sup>23</sup> Lew, D., J. Weinert, et al. (1997). "Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. pp 607-695. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*, Pringle, J. R., Broach, J. R. and Jones, E. W., eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press."
- <sup>24</sup> Forsburg, S. L. (1999). "The best yeast? ." Trends Genet **15**: 340-344.
- <sup>25</sup> Goffeau, A. (1996). "1996: a vintage year for yeast and Yeast." Yeast **12**(16): 1603-5.
- <sup>26</sup> Goffeau, A., B. G. Barrell, et al. (1996). "Life with 6000 genes." Science **274**(5287): 546, 563-7.
- <sup>27</sup> Bucking-Throm, E., W. Duntze, et al. (1973). "Reversible arrest of haploid yeast cells in the initiation of DNA synthesis by a diffusible sex factor." Exp Cell Res **76**(1): 99-110.
- <sup>28</sup> Sherman, F. (1973). "Micromanipulator for yeast genetic studies." Appl Microbiol **26**(5): 829.
- <sup>29</sup> Sherman, F. (1975). "Use of micromanipulators in yeast studies." Methods Cell Biol **11**: 189-99.
- <sup>30</sup> Nasmyth, K. (2011). "Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates?" Nat Cell Biol **13**(10): 1170-7.
- <sup>31</sup> Nasmyth, K. and C. H. Haering (2009). "Cohesin: its roles and mechanisms." Annu Rev Genet **43**: 525-58.
- <sup>32</sup> Haering, C. H., J. Lowe, et al. (2002). "Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex." Mol Cell **9**(4): 773-88.
- <sup>33</sup> Michaelis, C., R. Ciosk, et al. (1997). "Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids." Cell **91**(1): 35-45.
- <sup>34</sup> Beasley, M., H. Xu, et al. (2002). "Conserved disruptions in the predicted coiled-coil domains of eukaryotic SMC complexes: implications for structure and function." Genome Res **12**(8): 1201-9.
- <sup>35</sup> White, G. E. and H. P. Erickson (2006). "Sequence divergence of coiled coils--structural rods, myosin filament packing, and the extraordinary conservation of cohesins." J Struct Biol **154**(2): 111-21.
- <sup>36</sup> Melby, T. E., C. N. Ciampaglio, et al. (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**(6): 1595-604.
- <sup>37</sup> Kurze, A., K. A. Michie, et al. (2011). "A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion." EMBO J **30**(2): 364-78.

- <sup>38</sup> Dean, M., A. Rzhetsky, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Genome Res **11**(7): 1156-66.
- <sup>39</sup> Arumugam, P., S. Gruber, et al. (2003). "ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes." Curr Biol **13**(22): 1941-53.
- <sup>40</sup> Arumugam, P., T. Nishino, et al. (2006). "Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminal Winged-Helix domain of its kleisin subunit." Curr Biol **16**(20): 1998-2008.
- <sup>41</sup> Haering, C. H., D. Schoffnegger, et al. (2004). "Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction." Mol Cell **15**(6): 951-64.
- <sup>42</sup> Schleiffer, A., S. Kaitna, et al. (2003). "Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners." Mol Cell **11**(3): 571-5.
- <sup>43</sup> Gajiwala, K. S. and S. K. Burley (2000). "Winged helix proteins." Curr Opin Struct Biol **10**(1): 110-6.
- <sup>44</sup> Zubieta, C., X. Z. He, et al. (2001). "Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases." Nat Struct Biol **8**(3): 271-9.
- <sup>45</sup> Gruber, S., C. H. Haering, et al. (2003). "Chromosomal cohesin forms a ring." Cell **112**(6): 765-77.
- <sup>46</sup> Ivanov, D. and K. Nasmyth (2005). "A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome." Cell **122**(6): 849-60.
- <sup>47</sup> Huang, C. E., M. Milutinovich, et al. (2005). "Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1455): 537-42.
- <sup>48</sup> Ivanov, D. and K. Nasmyth (2007). "A physical assay for sister chromatid cohesion in vitro." Mol Cell **27**(2): 300-10.
- <sup>49</sup> Haering, C. H., A. M. Farcas, et al. (2008). "The cohesin ring concatenates sister DNA molecules." Nature **454**(7202): 297-301.
- <sup>50</sup> Farcas, A. M., P. Uluocak, et al. (2011). "Cohesin's concatenation of sister DNAs maintains their intertwining." Mol Cell **44**(1): 97-107.
- <sup>51</sup> Hartman, T., K. Stead, et al. (2000). "Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **151**(3): 613-26.
- <sup>52</sup> Panizza, S., T. Tanaka, et al. (2000). "Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion." Curr Biol **10**(24): 1557-64.
- <sup>53</sup> Toth, A., R. Ciosk, et al. (1999). "Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication." Genes Dev **13**(3): 320-33.
- <sup>54</sup> Gandhi, R., P. J. Gillespie, et al. (2006). "Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase." Curr Biol **16**(24): 2406-17.
- <sup>55</sup> Kueng, S., B. Hegemann, et al. (2006). "Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin." Cell **127**(5): 955-67.
- <sup>56</sup> Shintomi, K. and T. Hirano (2009). "Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1." Genes Dev **23**(18): 2224-36.
- <sup>57</sup> Dorsett, D. and L. Ström (2012). "The ancient and evolving roles of cohesin in gene expression and DNA repair." Curr Biol **22**(7): R240-50.
- <sup>58</sup> Hauf, S., E. Roitinger, et al. (2005). "Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2." PLoS Biol **3**(3): e69.

- <sup>59</sup> Andrade, M. A. and P. Bork (1995). "HEAT repeats in the Huntington's disease protein." Nat Genet **11**(2): 115-6.
- <sup>60</sup> Neuwald, A. F. and T. Hirano (2000). "HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions." Genome Res **10**(10): 1445-52.
- <sup>61</sup> Tanaka, K., Z. Hao, et al. (2001). "Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism." EMBO J **20**(20): 5779-90.
- <sup>62</sup> Nishiyama, T., R. Ladurner, et al. (2010). "Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl." Cell **143**(5): 737-49.
- <sup>63</sup> Verni, F., R. Gandhi, et al. (2000). "Genetic and molecular analysis of wings apart-like (wapl), a gene controlling heterochromatin organization in *Drosophila melanogaster*." Genetics **154**(4): 1693-710.
- <sup>64</sup> Dobie, K. W., C. D. Kennedy, et al. (2001). "Identification of chromosome inheritance modifiers in *Drosophila melanogaster*." Genetics **157**(4): 1623-37.
- <sup>65</sup> Oikawa, K., T. Ohbayashi, et al. (2004). "Expression of a novel human gene, human wings apart-like (hWAPL), is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression." Cancer Res **64**(10): 3545-9.
- <sup>66</sup> Chan, K. L., M. B. Roig, et al. (2012). "Cohesin's DNA Exit Gate Is Distinct from Its Entrance Gate and Is Regulated by Acetylation." Cell **150**(5): 961-74.
- <sup>67</sup> Ben-Shahar, T. R., S. Heeger, et al. (2008). "Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion." Science **321**(5888): 563-6.
- <sup>68</sup> Rowland, B. D., M. B. Roig, et al. (2009). "Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity." Mol Cell **33**(6): 763-74.
- <sup>69</sup> Ünal, E., J. M. Heidinger-Pauli, et al. (2008). "A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion." Science **321**(5888): 566-9.
- <sup>70</sup> Zhang, J., X. Shi, et al. (2008). "Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast." Mol Cell **31**(1): 143-51.
- <sup>71</sup> Hirano, T., R. Kobayashi, et al. (1997). "Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein." Cell **89**(4): 511-21.
- <sup>72</sup> Fujioka, Y., Y. Kimata, et al. (2002). "Identification of a novel non-structural maintenance of chromosomes (SMC) component of the SMC5-SMC6 complex involved in DNA repair." J Biol Chem **277**(24): 21585-91.
- <sup>73</sup> Taylor, E. M., J. S. Moghraby, et al. (2001). "Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18/Spr18 complex." Mol Biol Cell **12**(6): 1583-94.
- <sup>74</sup> Rawlings, J. S., M. Gatzka, et al. (2011). "Chromatin condensation via the condensin II complex is required for peripheral T-cell quiescence." EMBO J **30**(2): 263-76.
- <sup>75</sup> Bazett-Jones, D. P., K. Kimura, et al. (2002). "Efficient supercoiling of DNA by a single condensin complex as revealed by electron spectroscopic imaging." Mol Cell **9**(6): 1183-90.

- <sup>76</sup> Kimura, K., O. Cuvier, et al. (2001). "Chromosome condensation by a human condensin complex in *Xenopus* egg extracts." J Biol Chem **276**(8): 5417-20.
- <sup>77</sup> Kimura, K. and T. Hirano (1997). "ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation." Cell **90**(4): 625-34.
- <sup>78</sup> Renshaw, M. J., J. J. Ward, et al. (2010). "Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation." Dev Cell **19**(2): 232-44.
- <sup>79</sup> Cuylen, S., J. Metz, et al. (2011). "Condensin structures chromosomal DNA through topological links." Nat Struct Mol Biol **18**(8): 894-901.
- <sup>80</sup> Andrews, E. A., J. Palecek, et al. (2005). "Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage." Mol Cell Biol **25**(1): 185-96.
- <sup>81</sup> Lindroos, H. B., L. Strom, et al. (2006). "Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways." Mol Cell **22**(6): 755-67.
- <sup>82</sup> Murray, J. M. and A. M. Carr (2008). "Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication?" Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 177-82.
- <sup>83</sup> Mascarenhas, J., J. Soppa, et al. (2002). "Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein." EMBO J **21**(12): 3108-18.
- <sup>84</sup> Soppa, J., K. Kobayashi, et al. (2002). "Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB." Mol Microbiol **45**(1): 59-71.
- <sup>85</sup> Yamazoe, M., T. Onogi, et al. (1999). "Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*." EMBO J **18**(21): 5873-84.
- <sup>86</sup> Niki, H., A. Jaffe, et al. (1991). "The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*." EMBO J **10**(1): 183-93.
- <sup>87</sup> Hiraga, S., H. Niki, et al. (1989). "Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells." J Bacteriol **171**(3): 1496-505.
- <sup>88</sup> Cobbe, N. and M. M. Heck (2004). "The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications." Mol Biol Evol **21**(2): 332-47.
- <sup>89</sup> Ku, B., J. H. Lim, et al. (2010). "Crystal structure of the MukB hinge domain with coiled-coil stretches and its functional implications." Proteins **78**(6): 1483-90.
- <sup>90</sup> Fennell-Fezzie, R., S. D. Gradia, et al. (2005). "The MukF subunit of *Escherichia coli* condensin: architecture and functional relationship to kleisins." EMBO J **24**(11): 1921-30.
- <sup>91</sup> Woo, J. S., J. H. Lim, et al. (2009). "Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions." Cell **136**(1): 85-96.

- <sup>92</sup> Li, Y., A. J. Schoeffler, et al. (2010). "The crystal structure of the hinge domain of the Escherichia coli structural maintenance of chromosomes protein MukB." J Mol Biol **395**(1): 11-9.
- <sup>93</sup> Hu, B., T. Itoh, et al. (2011). "ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its scc2/4 loading complex." Curr Biol **21**(1): 12-24.
- <sup>94</sup> Ciosk, R., M. Shirayama, et al. (2000). "Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins." Mol Cell **5**(2): 243-54.
- <sup>95</sup> Sikorski, R. S., M. S. Boguski, et al. (1990). "A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis." Cell **60**(2): 307-17.
- <sup>96</sup> Goebel, M. and M. Yanagida (1991). "The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription." Trends Biochem Sci **16**(5): 173-7.
- <sup>97</sup> Watrin, E., A. Schleiffer, et al. (2006). "Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression." Curr Biol **16**(9): 863-74.
- <sup>98</sup> Gruber, S., P. Arumugam, et al. (2006). "Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge." Cell **127**(3): 523-37.
- <sup>99</sup> Weber, S. A., J. L. Gerton, et al. (2004). "The kinetochore is an enhancer of pericentric cohesin binding." PLoS Biol **2**(9): E260.
- <sup>100</sup> Fernius, J. and A. L. Marston (2009). "Establishment of cohesion at the pericentromere by the Ctf19 kinetochore subcomplex and the replication fork-associated factor, Csm3." PLoS Genet **5**(9): e1000629.
- <sup>101</sup> Gullerova, M. and N. J. Proudfoot (2008). "Cohesin complex promotes transcriptional termination between convergent genes in *S. pombe*." Cell **132**(6): 983-95.
- <sup>102</sup> Schmidt, C. K., N. Brookes, et al. (2009). "Conserved features of cohesin binding along fission yeast chromosomes." Genome Biol **10**(5): R52.
- <sup>103</sup> Glynn, E. F., P. C. Megee, et al. (2004). "Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." PLoS Biol **2**(9): E259.
- <sup>104</sup> Lengronne, A., Y. Katou, et al. (2004). "Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription." Nature **430**(6999): 573-8.
- <sup>105</sup> MacAlpine, H. K., R. Gordan, et al. (2010). "Drosophila ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading." Genome Res **20**(2): 201-11.
- <sup>106</sup> Pauli, A., J. G. van Bommel, et al. (2010). "A direct role for cohesin in gene regulation and ecdysone response in *Drosophila* salivary glands." Curr Biol **20**(20): 1787-98.
- <sup>107</sup> Gause, M., Z. Misulovin, et al. (2010). "Dosage-sensitive regulation of cohesin chromosome binding and dynamics by Nipped-B, Pds5, and Wapl." Mol Cell Biol **30**(20): 4940-51.
- <sup>108</sup> Guacci, V., D. Koshland, et al. (1997). "A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*." Cell **91**(1): 47-57.

- <sup>109</sup> Lengronne, A., J. McIntyre, et al. (2006). "Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork." Mol Cell **23**(6): 787-99.
- <sup>110</sup> Moldovan, G. L., B. Pfander, et al. (2006). "PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase." Mol Cell **23**(5): 723-32.
- <sup>111</sup> Hanna, J. S., E. S. Kroll, et al. (2001). "Saccharomyces cerevisiae CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion." Mol Cell Biol **21**(9): 3144-58.
- <sup>112</sup> Mayer, M. L., S. P. Gygi, et al. (2001). "Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*." Mol Cell **7**(5): 959-70.
- <sup>113</sup> Petronczki, M., B. Chwalla, et al. (2004). "Sister-chromatid cohesion mediated by the alternative RF-CCTf18/Dcc1/Ctf8, the helicase Chl1 and the polymerase-alpha-associated protein Ctf4 is essential for chromatid disjunction during meiosis II." J Cell Sci **117**(Pt 16): 3547-59.
- <sup>114</sup> Ström, L., C. Karlsson, et al. (2007). "Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break." Science **317**(5835): 242-5.
- <sup>115</sup> Ström, L., H. B. Lindroos, et al. (2004). "Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair." Mol Cell **16**(6): 1003-15.
- <sup>116</sup> Ünal, E., J. M. Heidinger-Pauli, et al. (2007). "DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7)." Science **317**(5835): 245-8.
- <sup>117</sup> Ivanov, D., A. Schleiffer, et al. (2002). "Eco1 is a novel acetyltransferase that can acetylate proteins involved in cohesion." Curr Biol **12**(4): 323-8.
- <sup>118</sup> Skibbens, R. V., L. B. Corson, et al. (1999). "Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery." Genes Dev **13**(3): 307-19.
- <sup>119</sup> Feytout, A., S. Vaur, et al. (2011). "Psm3 acetylation on conserved lysine residues is dispensable for viability in fission yeast but contributes to Eso1-mediated sister-chromatid cohesion by antagonizing Wpl1." Mol Cell Biol.
- <sup>120</sup> Heidinger-Pauli, J. M., E. Unal, et al. (2009). "Distinct targets of the Eco1 acetyltransferase modulate cohesion in S phase and in response to DNA damage." Mol Cell **34**(3): 311-21.
- <sup>121</sup> Sutani, T., T. Kawaguchi, et al. (2009). "Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction." Curr Biol **19**(6): 492-7.
- <sup>122</sup> Lafont, A. L., J. Song, et al. (2010). "Sororin cooperates with the acetyltransferase Eco2 to ensure DNA replication-dependent sister chromatid cohesion." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20364-9.
- <sup>123</sup> Rankin, S., N. G. Ayad, et al. (2005). "Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates." Mol Cell **18**(2): 185-200.
- <sup>124</sup> Dyda, F., D. C. Klein, et al. (2000). "GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 81-103.

- <sup>125</sup> Vetting, M. W., S. d. C. LP, et al. (2005). "Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases." Arch Biochem Biophys **433**(1): 212-26.
- <sup>126</sup> Maga, G. and U. Hübscher (2003). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3051-60.
- <sup>127</sup> Moldovan, G. L., B. Pfander, et al. (2007). "PCNA, the maestro of the replication fork." Cell **129**(4): 665-79.
- <sup>128</sup> Onn, I., V. Guacci, et al. (2009). "The zinc finger of Eco1 enhances its acetyltransferase activity during sister chromatid cohesion." Nucleic Acids Res **37**(18): 6126-34.
- <sup>129</sup> Kulemzina, I., M. R. Schumacher, et al. (2012). "Cohesin rings devoid of scc3 and pds5 maintain their stable association with the DNA." PLoS Genet **8**(8): e1002856.
- <sup>130</sup> Lyons, N. A. and D. O. Morgan (2011). "Cdk1-dependent destruction of Eco1 prevents cohesion establishment after S phase." Mol Cell **42**(3): 378-89.
- <sup>131</sup> Ubersax, J. A., E. L. Woodbury, et al. (2003). "Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1." Nature **425**(6960): 859-64.
- <sup>132</sup> Spellman, P. T., G. Sherlock, et al. (1998). "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization." Mol Biol Cell **9**(12): 3273-97.
- <sup>133</sup> Uhlmann, F. and K. Nasmyth (1998). "Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication." Curr Biol **8**(20): 1095-101.
- <sup>134</sup> Gerlich, D., B. Koch, et al. (2006). "Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication." Curr Biol **16**(15): 1571-8.
- <sup>135</sup> Mishra, A., B. Hu, et al. (2010). "Both interaction surfaces within cohesin's hinge domain are essential for its stable chromosomal association." Curr Biol **20**(4): 279-89.
- <sup>136</sup> Tachibana-Konwalski, K., J. Godwin, et al. (2010). "Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes." Genes Dev **24**(22): 2505-16.
- <sup>137</sup> Revenkova, E., K. Herrmann, et al. (2010). "Oocyte cohesin expression restricted to predictyate stages provides full fertility and prevents aneuploidy." Curr Biol **20**(17): 1529-33.
- <sup>138</sup> Losada, A., M. Hirano, et al. (1998). "Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion." Genes Dev **12**(13): 1986-97.
- <sup>139</sup> Waizenegger, I. C., S. Hauf, et al. (2000). "Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase." Cell **103**(3): 399-410.
- <sup>140</sup> Losada, A., M. Hirano, et al. (2002). "Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis." Genes Dev **16**(23): 3004-16.
- <sup>141</sup> Sumara, I., E. Vorlaufer, et al. (2002). "The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase." Mol Cell **9**(3): 515-25.

- <sup>142</sup> Alexandru, G., F. Uhlmann, et al. (2001). "Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast." Cell **105**(4): 459-72.
- <sup>143</sup> Peters, J. M., A. Tedeschi, et al. (2008). "The cohesin complex and its roles in chromosome biology." Genes Dev **22**(22): 3089-114.
- <sup>144</sup> McGuinness, B. E., T. Hirota, et al. (2005). "Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells." PLoS Biol **3**(3): e86.
- <sup>145</sup> Salic, A., J. C. Waters, et al. (2004). "Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis." Cell **118**(5): 567-78.
- <sup>146</sup> Riedel, C. G., V. L. Katis, et al. (2006). "Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I." Nature **441**(7089): 53-61.
- <sup>147</sup> Xu, Z., B. Cetin, et al. (2009). "Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction." Mol Cell **35**(4): 426-41.
- <sup>148</sup> Uhlmann, F., F. Lottspeich, et al. (1999). "Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1." Nature **400**(6739): 37-42.
- <sup>149</sup> Uhlmann, F., D. Wernic, et al. (2000). "Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast." Cell **103**(3): 375-86.
- <sup>150</sup> Sun, Y., M. Kucej, et al. (2009). "Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner." Cell **137**(1): 123-32.
- <sup>151</sup> Hauf, S., I. C. Waizenegger, et al. (2001). "Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells." Science **293**(5533): 1320-3.
- <sup>152</sup> Borges, V., C. Lehane, et al. (2010). "Hos1 deacetylates Smc3 to close the cohesin acetylation cycle." Mol Cell **39**(5): 677-88.
- <sup>153</sup> Xiong, B., S. Lu, et al. (2010). "Hos1 is a lysine deacetylase for the Smc3 subunit of cohesin." Curr Biol **20**(18): 1660-5.
- <sup>154</sup> Beckouet, F., B. Hu, et al. (2010). "An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion." Mol Cell **39**(5): 689-99.
- <sup>155</sup> Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 379-93.
- <sup>156</sup> Pines, J. (2011). "Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(7): 427-38.
- <sup>157</sup> Compton, D. A. (2000). "Spindle assembly in animal cells." Annu Rev Biochem **69**: 95-114.
- <sup>158</sup> Kline-Smith, S. L., A. Khodjakov, et al. (2004). "Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments." Mol Biol Cell **15**(3): 1146-59.
- <sup>159</sup> Kline-Smith, S. L. and C. E. Walczak (2004). "Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics." Mol Cell **15**(3): 317-27.
- <sup>160</sup> Scholey, J. M., I. Brust-Mascher, et al. (2003). "Cell division." Nature **422**(6933): 746-52.
- <sup>161</sup> Hoyt, M. A., L. Totis, et al. (1991). "S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function." Cell **66**(3): 507-17.

- <sup>162</sup> Li, R. and A. W. Murray (1991). "Feedback control of mitosis in budding yeast." Cell **66**(3): 519-31.
- <sup>163</sup> Rieder, C. L., R. W. Cole, et al. (1995). "The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores." J Cell Biol **130**(4): 941-8.
- <sup>164</sup> Waters, J. C., R. H. Chen, et al. (1998). "Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension." J Cell Biol **141**(5): 1181-91.
- <sup>165</sup> Li, X. and R. B. Nicklas (1995). "Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint." Nature **373**(6515): 630-2.
- <sup>166</sup> Biggins, S. and A. W. Murray (2001). "The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint." Genes Dev **15**(23): 3118-29.
- <sup>167</sup> Stern, B. M. and A. W. Murray (2001). "Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast." Curr Biol **11**(18): 1462-7.
- <sup>168</sup> Liu, D., G. Vader, et al. (2009). "Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates." Science **323**(5919): 1350-3.
- <sup>169</sup> Indjeian, V. B., B. M. Stern, et al. (2005). "The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes." Science **307**(5706): 130-3.
- <sup>170</sup> Yu, H. (2002). "Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint." Curr Opin Cell Biol **14**(6): 706-14.
- <sup>171</sup> De Antoni, A., C. G. Pearson, et al. (2005). "The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint." Curr Biol **15**(3): 214-25.
- <sup>172</sup> Fang, G. (2002). "Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex." Mol Biol Cell **13**(3): 755-66.
- <sup>173</sup> Kulukian, A., J. S. Han, et al. (2009). "Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding." Dev Cell **16**(1): 105-17.
- <sup>174</sup> Heidinger-Pauli, J. M., O. Mert, et al. (2010). "Systematic reduction of cohesin differentially affects chromosome segregation, condensation, and DNA repair." Curr Biol **20**(10): 957-63.
- <sup>175</sup> Schaaf, C. A., Z. Misulovin, et al. (2009). "Regulation of the Drosophila Enhancer of split and invected-engrailed gene complexes by sister chromatid cohesion proteins." PLoS One **4**(7): e6202.
- <sup>176</sup> Kaur, M., C. DeScipio, et al. (2005). "Precocious sister chromatid separation (PSCS) in Cornelia de Lange syndrome." Am J Med Genet A **138**(1): 27-31.
- <sup>177</sup> Liu, J., Z. Zhang, et al. (2009). "Transcriptional dysregulation in NIPBL and cohesin mutant human cells." PLoS Biol **7**(5): e1000119.
- <sup>178</sup> Vrouwe, M. G., E. Elghalbzouri-Maghrani, et al. (2007). "Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: evidence for impaired recombinational repair." Hum Mol Genet **16**(12): 1478-87.
- <sup>179</sup> Dorsett, D., J. C. Eissenberg, et al. (2005). "Effects of sister chromatid cohesion proteins on cut gene expression during wing development in Drosophila." Development **132**(21): 4743-53.

- 180 Horsfield, J. A., S. H. Anagnostou, et al. (2007). "Cohesin-dependent  
regulation of Runx genes." Development **134**(14): 2639-49.
- 181 Rollins, R. A., M. Korom, et al. (2004). "Drosophila nipped-B protein  
supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Scc3  
cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene." Mol  
Cell Biol **24**(8): 3100-11.
- 182 Rollins, R. A., P. Morcillo, et al. (1999). "Nipped-B, a Drosophila  
homologue of chromosomal adherins, participates in activation by  
remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes." Genetics **152**(2):  
577-93.
- 183 Zhang, B., J. Chang, et al. (2009). "Dosage effects of cohesin regulatory  
factor PDS5 on mammalian development: implications for  
cohesinopathies." PLoS One **4**(5): e5232.
- 184 Zhang, B., S. Jain, et al. (2007). "Mice lacking sister chromatid cohesion  
protein PDS5B exhibit developmental abnormalities reminiscent of  
Cornelia de Lange syndrome." Development **134**(17): 3191-201.
- 185 Schuldiner, O., D. Berdnik, et al. (2008). "piggyBac-based mosaic screen  
identifies a postmitotic function for cohesin in regulating developmental  
axon pruning." Dev Cell **14**(2): 227-38.
- 186 Pauli, A., F. Althoff, et al. (2008). "Cell-type-specific TEV protease  
cleavage reveals cohesin functions in Drosophila neurons." Dev Cell  
**14**(2): 239-51.
- 187 Kagey, M. H., J. J. Newman, et al. (2011). "Mediator and cohesin connect  
gene expression and chromatin architecture." Nature **467**(7314): 430-5.
- 188 Conaway, R. C. and J. W. Conaway (2011). "Function and regulation of  
the Mediator complex." Curr Opin Genet Dev **21**(2): 225-30.
- 189 Guillou, E., A. Ibarra, et al. (2010). "Cohesin organizes chromatin loops at  
DNA replication factories." Genes Dev **24**(24): 2812-22.
- 190 Wendt, K. S., K. Yoshida, et al. (2008). "Cohesin mediates transcriptional  
insulation by CCCTC-binding factor." Nature **451**(7180): 796-801.
- 191 Xiao, T., J. Wallace, et al. (2011). "Specific sites in the C terminus of CTCF  
interact with the SA2 subunit of the cohesin complex and are required  
for cohesin-dependent insulation activity." Mol Cell Biol **31**(11): 2174-  
83.
- 192 Ohlsson, R., M. Bartkuhn, et al. (2010). "CTCF shapes chromatin by  
multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on  
understanding the workings of chromatin." Chromosoma **119**(4): 351-  
60.
- 193 Hou, C., R. Dale, et al. (2010). "Cell type specificity of chromatin  
organization mediated by CTCF and cohesin." Proc Natl Acad Sci U S  
A **107**(8): 3651-6.
- 194 Kang, H., A. Wiedmer, et al. (2011). "Coordination of KSHV latent and lytic  
gene control by CTCF-cohesin mediated chromosome conformation."  
PLoS Pathog **7**(8): e1002140.
- 195 Mohan, M., M. Bartkuhn, et al. (2007). "The Drosophila insulator proteins  
CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning." EMBO J  
**26**(19): 4203-14.
- 196 Moon, H., G. Filippova, et al. (2005). "CTCF is conserved from Drosophila  
to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator." EMBO Rep  
**6**(2): 165-70.

- <sup>197</sup> Lin, W., H. Jin, et al. (2011). "Scc2 regulates gene expression by recruiting cohesin to the chromosome as a transcriptional activator during yeast meiosis." Mol Biol Cell **22**(12): 1985-96.
- <sup>198</sup> Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-8.
- <sup>199</sup> Ohnishi, T., E. Mori, et al. (2009). "DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes." Mutat Res **669**(1-2): 8-12.
- <sup>200</sup> San Filippo, J., P. Sung, et al. (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." Annu Rev Biochem **77**: 229-57.
- <sup>201</sup> Sjögren, C. and K. Nasmyth (2001). "Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Biol **11**(12): 991-5.
- <sup>202</sup> Atienza, J. M., R. B. Roth, et al. (2005). "Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells." Mol Cancer Ther **4**(3): 361-8.
- <sup>203</sup> Schmitz, J., E. Watrin, et al. (2007). "Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase." Curr Biol **17**(7): 630-6.
- <sup>204</sup> Bernard, P., J. F. Maure, et al. (2001). "Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres." Science **294**(5551): 2539-42.
- <sup>205</sup> Nonaka, N., T. Kitajima, et al. (2002). "Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast." Nat Cell Biol **4**(1): 89-93.
- <sup>206</sup> Koch, B., S. Kueng, et al. (2008). "The Suv39h-HP1 histone methylation pathway is dispensable for enrichment and protection of cohesin at centromeres in mammalian cells." Chromosoma **117**(2): 199-210.
- <sup>207</sup> Lechner, M. S., D. C. Schultz, et al. (2005). "The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain." Biochem Biophys Res Commun **331**(4): 929-37.
- <sup>208</sup> Mannini, L., S. Menga, et al. (2010). "The expanding universe of cohesin functions: a new genome stability caretaker involved in human disease and cancer." Hum Mutat **31**(6): 623-30.
- <sup>209</sup> Liu, J. and I. D. Krantz (2008). "Cohesin and human disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 303-20.
- <sup>210</sup> Tonkin, E. T., T. J. Wang, et al. (2004). "NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome." Nat Genet **36**(6): 636-41.
- <sup>211</sup> Krantz, I. D., J. McCallum, et al. (2004). "Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B." Nat Genet **36**(6): 631-5.
- <sup>212</sup> Pehlivan, D., M. Hullings, et al. (2012). "NIPBL rearrangements in Cornelia de Lange syndrome: evidence for replicative mechanism and genotype-phenotype correlation." Genet Med **14**(3): 313-22.
- <sup>213</sup> Deardorff, M. A., M. Kaur, et al. (2007). "Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation." Am J Hum Genet **80**(3): 485-94.

- <sup>214</sup> Musio, A., A. Selicorni, et al. (2006). "X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations." Nat Genet **38**(5): 528-30.
- <sup>215</sup> Schule, B., A. Oviedo, et al. (2005). "Inactivating mutations in ESCO2 cause SC phocomelia and Roberts syndrome: no phenotype-genotype correlation." Am J Hum Genet **77**(6): 1117-28.
- <sup>216</sup> Vega, H., Q. Waisfisz, et al. (2005). "Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion." Nat Genet **37**(5): 468-70.
- <sup>217</sup> Gilliland, W. D. and R. S. Hawley (2005). "Cohesin and the maternal age effect." Cell **123**(3): 371-3.
- <sup>218</sup> Pellestor, F., B. Andreo, et al. (2006). "The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes." Eur J Med Genet **49**(2): 103-16.
- <sup>219</sup> Hodges, C. A., E. Revenkova, et al. (2005). "SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction." Nat Genet **37**(12): 1351-5.
- <sup>220</sup> Mc Intyre, J., E. G. Muller, et al. (2007). "In vivo analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **26**(16): 3783-93.
- <sup>221</sup> Bernard, P., C. K. Schmidt, et al. (2008). "Cell-cycle regulation of cohesin stability along fission yeast chromosomes." EMBO J **27**(1): 111-21.
- <sup>222</sup> Kanemaki, M., A. Sanchez-Diaz, et al. (2003). "Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo." Nature **423**(6941): 720-4.
- <sup>223</sup> Sanchez-Diaz, A., M. Kanemaki, et al. (2004). "Rapid depletion of budding yeast proteins by fusion to a heat-inducible degron." Sci STKE **2004**(223): PL8.
- <sup>224</sup> Yen, K., P. Gitsham, et al. (2003). "An improved tetO promoter replacement system for regulating the expression of yeast genes." Yeast **20**(15): 1255-62.
- <sup>225</sup> Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, et al. (2003). "Global analysis of protein expression in yeast." Nature **425**(6959): 737-41.
- <sup>226</sup> Weitzer, S., C. Lehane, et al. (2003). "A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA." Curr Biol **13**(22): 1930-40.
- <sup>227</sup> Warren, C. D., D. M. Eckley, et al. (2004). "S-phase checkpoint genes safeguard high-fidelity sister chromatid cohesion." Mol Biol Cell **15**(4): 1724-35.
- <sup>228</sup> Nasmyth, K. (2005). "How might cohesin hold sister chromatids together?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1455): 483-96.
- <sup>229</sup> Fernius, J. and K. G. Hardwick (2007). "Bub1 kinase targets Sgo1 to ensure efficient chromosome biorientation in budding yeast mitosis." PLoS Genet **3**(11): e213.
- <sup>230</sup> Straight, A. F., A. S. Belmont, et al. (1996). "GFP tagging of budding yeast chromosomes reveals that protein-protein interactions can mediate sister chromatid cohesion." Curr Biol **6**(12): 1599-608.
- <sup>231</sup> Krishna, T. S., D. Fenyo, et al. (1994). "Crystallization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *Saccharomyces cerevisiae*." J Mol Biol **241**(2): 265-8.

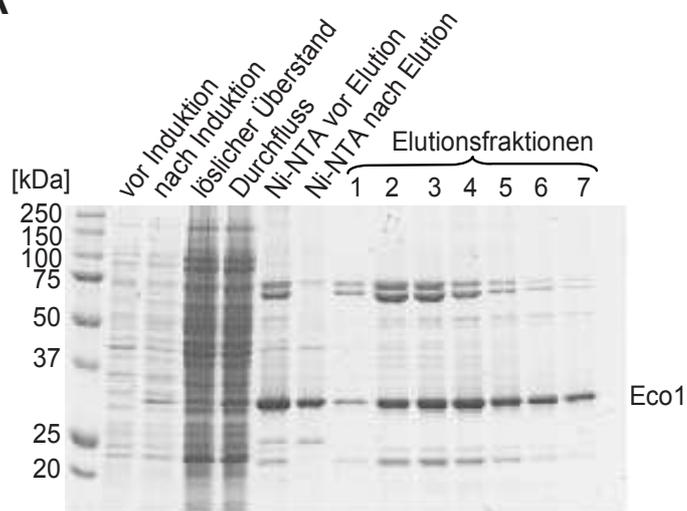
- <sup>232</sup> Krishna, T. S., X. P. Kong, et al. (1994). "Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA." Cell **79**(7): 1233-43.
- <sup>233</sup> Johnson, A. and M. O'Donnell (2005). "Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork." Annu Rev Biochem **74**: 283-315.
- <sup>234</sup> Sakurai, S., K. Kitano, et al. (2005). "Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA." EMBO J **24**(4): 683-93.
- <sup>235</sup> Beattie, T. R. and S. D. Bell (2011). "The role of the DNA sliding clamp in Okazaki fragment maturation in archaea and eukaryotes." Biochem Soc Trans **39**(1): 70-6.
- <sup>236</sup> Shibahara, K. and B. Stillman (1999). "Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin." Cell **96**(4): 575-85.
- <sup>237</sup> Moggs, J. G., P. Grandi, et al. (2000). "A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage." Mol Cell Biol **20**(4): 1206-18.
- <sup>238</sup> Bubeck, D., M. A. Reijns, et al. (2011). "PCNA directs type 2 RNase H activity on DNA replication and repair substrates." Nucleic Acids Res **39**(9): 3652-66.
- <sup>239</sup> Hishiki, A., H. Hashimoto, et al. (2009). "Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen." J Biol Chem **284**(16): 10552-60.
- <sup>240</sup> Vijayakumar, S., B. R. Chapados, et al. (2007). "The C-terminal domain of yeast PCNA is required for physical and functional interactions with Cdc9 DNA ligase." Nucleic Acids Res **35**(5): 1624-37.
- <sup>241</sup> Efimov, A. V. (1995). "Structural similarity between two-layer alpha/beta and beta-proteins." J Mol Biol **245**(4): 402-15.
- <sup>242</sup> Hingorani, M. M. and M. O'Donnell (2000). "A tale of toroids in DNA metabolism." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 22-30.
- <sup>243</sup> Bruck, I. and M. O'Donnell (2001). "The ring-type polymerase sliding clamp family." Genome Biol **2**(1): REVIEWS3001.
- <sup>244</sup> Vieira-Pires, R. S. and J. H. Morais-Cabral (2010). "3(10) helices in channels and other membrane proteins." J Gen Physiol **136**(6): 585-92.
- <sup>245</sup> Warbrick, E. (1998). "PCNA binding through a conserved motif." Bioessays **20**(3): 195-9.
- <sup>246</sup> Jonsson, Z. O. and U. Hubscher (1997). "Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases." Bioessays **19**(11): 967-75.
- <sup>247</sup> Kontopidis, G., S. Y. Wu, et al. (2005). "Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(6): 1871-6.
- <sup>248</sup> Bruning, J. B. and Y. Shamoo (2004). "Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1." Structure **12**(12): 2209-19.
- <sup>249</sup> Strzalka, W., T. Oyama, et al. (2009). "Crystal structures of the Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment." Protein Sci **18**(5): 1072-80.
- <sup>250</sup> Chapados, B. R., D. J. Hosfield, et al. (2004). "Structural basis for FEN-1 substrate specificity and PCNA-mediated activation in DNA replication and repair." Cell **116**(1): 39-50.

- <sup>251</sup> Matsumiya, S., S. Ishino, et al. (2002). "Physical interaction between proliferating cell nuclear antigen and replication factor C from *Pyrococcus furiosus*." Genes Cells **7**(9): 911-22.
- <sup>252</sup> Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* " Journal of Bacteriology **62**(3): 293-300.
- <sup>253</sup> Biegert, A., C. Mayer, et al. (2006). "The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W335-9.
- <sup>254</sup> Waterhouse, A. M., J. B. Procter, et al. (2009). "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." Bioinformatics **25**(9): 1189-91.
- <sup>255</sup> Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- <sup>256</sup> Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- <sup>257</sup> Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. ." Journal of Bacteriology **62**: 293-300.
- <sup>258</sup> Amberg, D. C., Strathern, J. N. (2005). Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- <sup>259</sup> Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak, et al. (1981). "Yeast transformation: a model system for the study of recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(10): 6354-8.
- <sup>260</sup> Ito, H., Fukuda, Y., Fukuda, Y. (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations " Journal of Bacteriology **153**(1): 163-168.
- <sup>261</sup> Gietz, R. D. and A. Sugino (1988). "New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites." Gene **74**(2): 527-34.
- <sup>262</sup> Goldstein, A. L., McCusker, J. H. (1999). "Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* " Yeast **15**(14): 1541-1553.
- <sup>263</sup> Janke, C., M. M. Magiera, et al. (2004). "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." Yeast **21**(11): 947-62.
- <sup>264</sup> Duntze, W., D. Stotzler, et al. (1973). "Purification and partial characterization of  $\phi$ -factor, a mating-type specific inhibitor of cell reproduction from *Saccharomyces cerevisiae*." Eur J Biochem **35**(2): 357-65.
- <sup>265</sup> Hoebeke, J., G. Van Nijen, et al. (1976). "Interaction of oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin." Biochem Biophys Res Commun **69**(2): 319-24.
- <sup>266</sup> Lee, J. C., D. J. Field, et al. (1980). "Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin." Biochemistry **19**(26): 6209-15.
- <sup>267</sup> Bartlett, M. S., T. D. Edlind, et al. (1992). "Antimicrotubule benzimidazoles inhibit in vitro growth of *Pneumocystis carinii*." Antimicrob Agents Chemother **36**(4): 779-82.

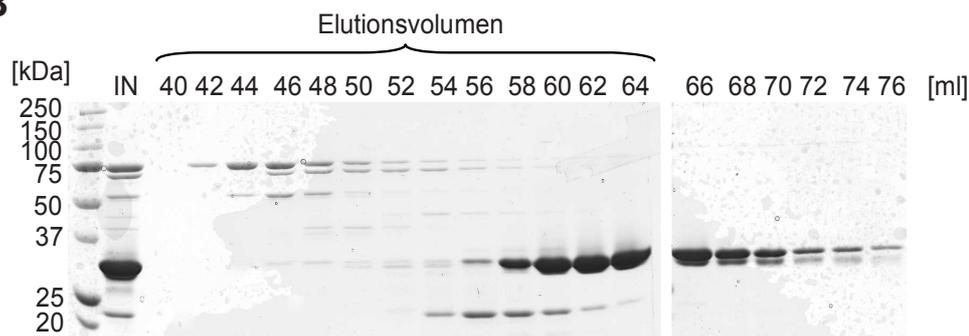
- 
- <sup>268</sup> Kwa, M. S., J. G. Veenstra, et al. (1995). "Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*." J Mol Biol **246**(4): 500-10.
- <sup>269</sup> Amon, A. (1999). "The spindle checkpoint." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 69-75.
- <sup>270</sup> Haase, S. B. and S. I. Reed (2002). "Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle." Cell Cycle **1**(2): 132-6.
- <sup>271</sup> Lämmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- <sup>272</sup> Studier, F. W. (2005). "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." Protein Expr Purif **41**(1): 207-34.
- <sup>273</sup> Vagin, A. A., R. A. Steiner, et al. (2004). "REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2184-95.
- <sup>274</sup> Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
- <sup>275</sup> Kabsch, W. and C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers **22**(12): 2577-637.
- <sup>276</sup> Joosten, R. P., T. A. te Beek, et al. (2010). "A series of PDB related databases for everyday needs." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D411-9.
- <sup>277</sup> Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity." BMC Bioinformatics **5**: 113.
- <sup>278</sup> Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Res **32**(5): 1792-7.

## 6. Anhang

**A**



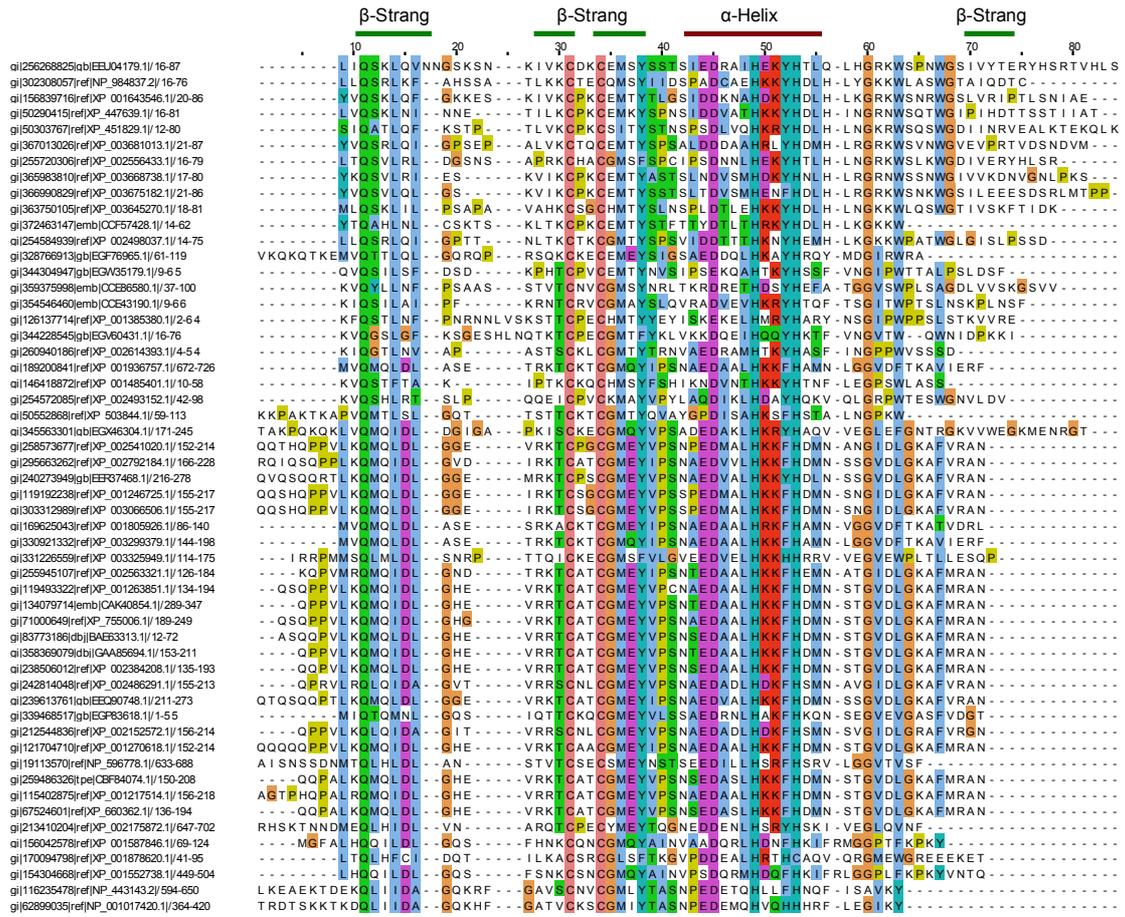
**B**



**Abb. 6.1: Die Aufreinigung von rekombinatem Eco1-Protein.**

(A) *E. coli* BL21-Zellen, die das Eco1-6xHis-Expressionsplasmid tragen, wurden angezogen und die Expression wurde induziert. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Eco1-Protein wurde mit Hilfe von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose aus dem Überstand aufgereinigt. Die einzelnen Schritte der Aufreinigung wurden mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE analysiert.

(B) Bestehende Kontaminationen sowie Imidazol wurden nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie durch eine Gelfiltration („Superdex 75 HiLoad 16/60“ (GE Healthcare)) entfernt.

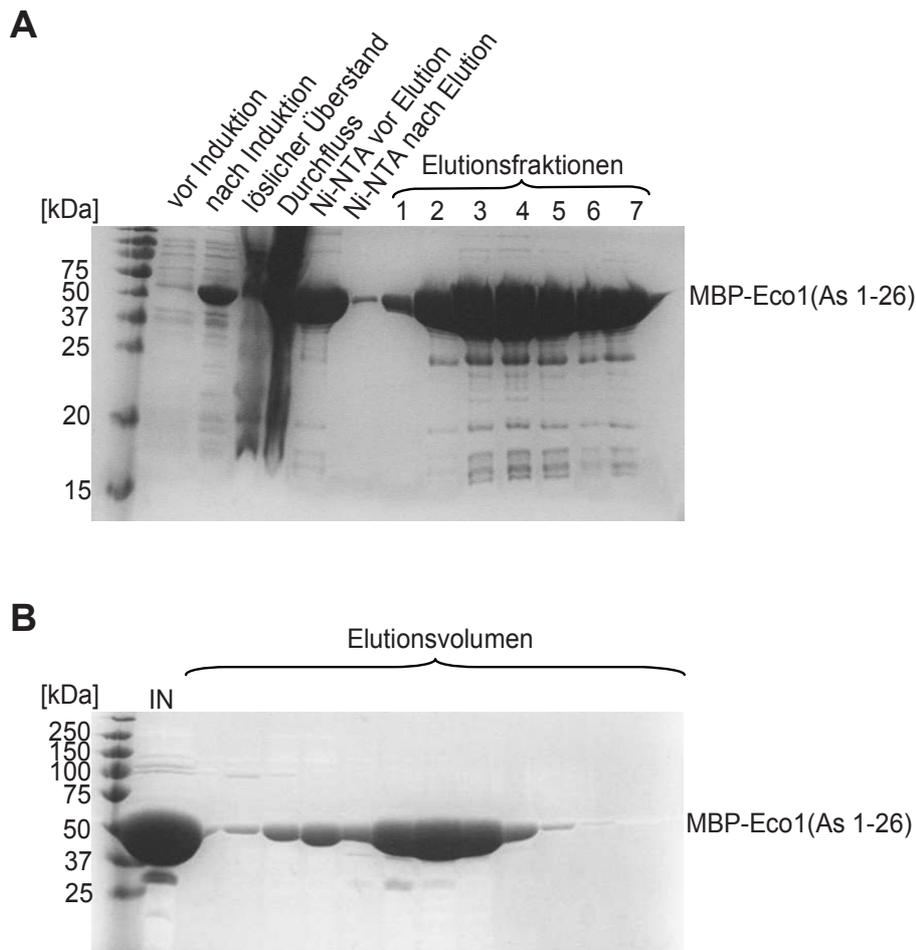


**Abb. 6.2:** Alignment des Eco1-PIP-Box-Bereichs in verschiedenen Pilzen und im Menschen.

Das multiple Alignment wurde mit „Jalview 2.7“ [254] und „MUSCLE“ [277,278] erstellt und zeigt den Bereich um das PIP-Box-Motiv des Eco1-Proteins (QxxL/I) in verschiedenen Pilzen. Zum Vergleich wurden die Sequenzen der humanen Proteine Esco1 und Esco2 mit einbezogen. Die Vorhersage der Sekundärstrukturen wurde mit dem Toolkit des MPI Tübingen [253] erstellt. Die angezeigten Organismen sind (von oben nach unten): *Saccharomyces cerevisiae*, *Ashbya gossypii*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulospora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Naumovozyma dairenensis*, *Naumovozyma castelli*, *Eremothecium cymbalariae*, *Kazachstania africana*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Spathaspora passalidarum*, *Millerozyma farinosa*, *Candida parapsilosis*, *Schefferomyces stipidis*, *Candida tenuis*, *Clavispora lusitanae*, *Pyrenophora tritici-repensis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Komagataella patoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Arthrobotrys oligospora*, *Uncinocarpus reesii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Ajellomyces capsulatus*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Pyrenophora teres*, *Puccinia graminis*, *Penicillium chrysogenum*, *Neosarorya fischeri*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus flavus*, *Talaromyces stipitatus*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Mycosphaerella graminicola*, →

**Abb. 6.2 (fortführend):**

*Penicillium marneffe*, *Aspergillus clavatus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans AFU orthologue*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans FGSC A4*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Laccaria bicolor*, *Botryotinia fuckeliana*, *Homo sapiens ESCO1*, *Homo sapiens ESCO2*.



**Abb. 6.3: Die Aufreinigung von rekombinantem MBP-Eco1(As 1-26)-Fusionsprotein.**

(A) *E. coli* BL21-Zellen, die das MBP-Eco1(As 1-26)-Expressionsplasmid besitzen, wurden angezogen und die Expression wurde durch Autoinduktion gestartet. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Fusionsprotein wurde mit Hilfe von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose aus dem Überstand aufgereinigt. Die einzelnen Schritte der Aufreinigung wurden mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE analysiert.

(B) Imidazol und vorhandene Kontaminationen wurden nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie durch eine Gelfiltration („Superdex 75 HiLoad 26/60“ (GE Healthcare)) entfernt.

