

Berichte aus der Biologie

Oliver Leismann

**Molekulare Grundlagen der
Schwesterchromatidentrennung:
Charakterisierung der PIM Funktion und
Identifizierung genetisch interagierender
chromosomaler Loci in *Drosophila melanogaster***

Shaker Verlag
Aachen 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Leismann, Oliver:

Molekulare Grundlagen der Schwesterchromatidentrennung: Charakterisierung der PIM Funktion und Identifizierung genetisch interagierender chromosomaler Loci in *Drosophila melanogaster*/ Oliver Leismann.

Aachen : Shaker, 2002

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Bayreuth, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9741-9

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-9741-9

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Trennung von Schwesterchromatidenpaaren während der Mitose ist ein komplexer Prozess, der sehr sorgfältig reguliert werden muss. Sie darf erst erfolgen, wenn das letzte Chromatidenpaar korrekt in der Metaphasenplatte angeordnet ist. Wenn dieser Zustand erreicht ist, wird die Anaphase eingeleitet. In der Anaphase wird einerseits die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden vollständig aufgelöst (Schwesterchromatidentrennung) und andererseits werden die getrennten Schwesterchromatiden durch die mitotische Spindel zu den entgegengesetzten Polen gezogen (Schwesterchromatidensegregation). Erste Einblicke in die molekularen Grundlagen von Kohäsion und Schwesterchromatidenseparation sind erst kürzlich erhalten worden.

In *Drosophila melanogaster* wird das Protein Pimples (PIM) für die Trennung der Schwesterchromatiden in der Mitose benötigt. Dieses Protein zeigt keine Sequenzverwandtschaft mit anderen Proteinen. PIM akkumuliert während der Interphase und wird in der Mitose degradiert. Außerdem komplexiert PIM mit dem Protein Three Rows (THR), das ebenfalls für die Schwesterchromatidentrennung essentiell ist.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des PIM Proteins beschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß der Abbau von PIM die Funktion der Proteine Fizzy/Cdc20 und Fizzy-related/Hct1 benötigt. Fizzy/Cdc20 und Fizzy-related/Hct1 sind für die Aktivität des APC/C notwendig, der Substratproteine mit KEN- und D-Box- Motiven polyubiquitiniert und somit für den Abbau markiert. PIM besitzt sowohl ein KEN-Motiv, als auch eine neuartige D-Box-Variante. Mutationen in diesen Motiven führen zu einer Stabilisierung von PIM und zu einer Inhibition der Schwesterchromatidentrennung. Die Überexpression von wildtypischem PIM blockiert die Schwesterchromatidentrennung ebenfalls. Interessanterweise ist PIM in Zellen stabil, die durch eine Behandlung mit Colchizin in der Mitose arretiert wurden. Die Persistenz von PIM in diesem Arrest könnte also erklären, warum Colchizin-behandelte Zellen ihre Schwesterchromatiden nicht trennen. Diese Resultate unterstreichen eine deutliche funktionelle Verwandtschaft zwischen PIM und den sogenannten Securinen, die in der Bäckerhefe, der Spaltheefe und in Vertebraten identifiziert worden sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden Untersuchungen zur Identifikation von weiteren Genen, die für den Prozess der Schwesterchromatidenseparation benötigt werden, beschrieben. Dabei wurde ausgenutzt, daß die Expression von PIM und THR Δ C (ein mutantes THR Protein, in dem ein carboxy-terminaler Teil deletiert wurde) in der Augenheimmaginalscheibe zur Ausbildung eines abnormalen Augenphänotyps führt. Es konnten Bereiche im *Drosophila* Genom gefunden werden, deren Deletion eine Modifikation (Verstärkung oder Suppression) dieser Augenphänotypen hervorruft. In einem dieser Bereiche liegt die Mutation *l(3)85Aa*, die als dominanter Phänotyp-Verstärker wirkt. Individuen, die homozygot für die Mutation *l(3)85Aa* sind, sterben in der Embryonalphase. Die mutanten Embryonen zeigen starke Störungen in der Verteilung des Chromatins in der Mitose. Diese Störungen basieren vermutlich weder auf einem Defekt der mitotischen Spindel, noch auf einem Problem bei der DNA-Replikation, sondern vielmehr auf einer fehlerhaften Auflösung der centromernahen Kohäsion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das *l(3)85Aa*⁺ Genprodukt analog PIM und THR für die Schwesterchromatidentrennung benötigt wird.

2. SUMMARY

The distribution of sister chromatids during mitosis is a complex and highly regulated process. This process should only occur when all sister chromatid pairs have congressed to the metaphase plate successfully and show a correct bipolar attachment to the spindle poles. When these criteria are fulfilled, anaphase initiates. At the metaphase to anaphase transition the cohesion between sister chromatids is completely dissolved (sister chromatid separation). Then, the separated sister chromatids are pulled to the spindle poles by the shortening of kinetochore microtubules (sister chromatid segregation). Only recently, important advances have been made in the understanding of the molecular basis of cohesion and sister chromatid separation.

In *Drosophila melanogaster* the Pimples (PIM) protein is required for sister chromatid separation in mitosis. This protein does not have any significant sequence similarities to other proteins. PIM accumulates during interphase and is degraded in mitosis. Moreover, PIM binds to Three Rows (THR) *in vivo*. Like PIM, THR is also essential for sister chromatid separation.

The first part of the presented work deals with the functional characterization of PIM. It could be shown that the degradation of PIM depends on the two proteins Fizzy/Cdc20 and Fizzy-related/Hct1. Both Fizzy/Cdc20 and Fizzy-related/Hct1 are required for the activation of the APC/C which polyubiquitinates substrates containing KEN- and D-Box motifs marking them for destruction. PIM contains a KEN motif as well as an unusual D-Box variant. Mutations in these motifs induce a stabilization of PIM and inhibit the separation of sister chromatids. High levels of wildtype PIM also block sister chromatid separation. Interestingly, PIM is stabilized in cells which were arrested in mitosis by colchicine treatment. Thus, the persistence of PIM in this arrest might be an explanation why colchicine treated cells cannot separate their sister chromatids. Based on these results PIM shows distinct functional homologies to the so-called securin proteins which have been identified in budding yeast, fission yeast and vertebrates.

The second part of this work describes experiments to identify further genes that are involved in the process of sister chromatid separation. For this purpose, the fact was exploited that the overexpression of PIM and THR Δ C (a mutant THR protein in which a part of the C-terminal

domain was deleted) during eye development results in an abnormal eye pattern. It was possible to identify regions in the *Drosophila* genome that, in the case of their deletion, induce a modification (enhancement or suppression) of this abnormal eye phenotype. One of those regions contains the mutation *l(3)85Aa* which is a dominant enhancer of the abnormal eye phenotype. Individuals who are homozygous mutant for *l(3)85Aa* die during embryonic development. Mutant embryos show clear defects in the distribution of chromosomes during mitosis. These defects are probably neither based on spindle defects nor on problems with DNA replication but rather on difficulties in the dissolution of centromeric cohesion. In conclusion the results suggest that the *l(3)85Aa*⁺ gene product is required for sister chromatid separation like PIM and THR.