
**Neue Aspekte im diffizilen Zusammenspiel der
SMC-Ringkomplexe Cohesin und Condensin mit
Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
- Doktor der Naturwissenschaften -
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin Juliane Karich

Bayreuth 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2009 bis Juni 2015 in Bayreuth am Lehrstuhl für Genetik unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Olaf Stemmann angefertigt.

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

Dissertation eingereicht am: 24. Juni 2015

Zulassung durch die Promotionskommission: 01. Juli 2015

Wissenschaftliches Kolloquium: 11. September 2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Olaf Stemmann (Erstgutachter)

PD Dr. Stefan Geimer (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Gerrit Begemann (Vorsitz)

PD Dr. Stefan Heidmann

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung	13
2.1	Der eukaryotische Zellzyklus	13
2.2	Die Bedeutung von Cohesin für die Kohäsion der Schwesterchromatiden	16
2.2.1	Zusammensetzung des Cohesinringkomplexes	17
2.2.2	Das Cohesin-Ringmodell	19
2.2.3	Chromosomale Rekrutierung von Cohesin und Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion	20
2.2.4	Die Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion während der Mitose	23
2.3	Die Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation	25
2.3.1	Die Assemblierung präreplikativer Komplexe an der DNA	25
2.3.2	Regulation der DNA-Lizensierung	29
2.4	Das Centrosom	30
2.4.1	Struktureller Aufbau des Centrosoms	31
2.4.2	Der Centrosomenzyklus	34
2.4.3	Parallelen zwischen Chromosomen- und Centrosomenzyklus	37
2.5	Die Einfluss von Condensin auf die strukturelle Organisation des eukaryotischen Chromatins	41
2.5.1	Zusammensetzung des Condensinringkomplexes	41
2.5.2	Lokalisation und molekularer Wirkmechanismus von Condensin	44
2.5.3	Rekrutierung und Regulation des eukaryotischen Condensins	45
2.6	Möglichkeiten und Grenzen des somatischen Kerntransfers	47
2.6.1	Epigenetische Faktoren mit Einfluss auf die Resistenz des Donorzellkerns	49
2.6.2	Der Einfluss von Mitose auf die Effizienz des Kerntransfers	52
2.7	<i>Xenopus laevis</i> als Modellsystem	56

3	Ergebnisse	58
3.1	Wird durch die centrosomale Rekrutierung des Multiproteinkomplexes Cohesin eine Centrosomenüberduplikation verhindert?	58
3.1.1	Aufreinigung und/oder Charakterisierung benötigter Antikörper	58
3.1.1.1	gerichtet gegen xC-Nap1	58
3.1.1.2	gerichtet gegen xSmc1/xSmc3	62
3.1.1.3	gerichtet gegen xOrc2	69
3.1.1.4	gerichtet gegen xMcm5	71
3.1.2	Die Eliminierung von Smc1/Smc3 oder Orc2 hat eine moderate Überduplikation von Centrosomen zur Folge	75
3.2	Kommt Condensin eine funktionelle Bedeutung bei der Chromatinreorganisation am Übergang von M- zu S-Phase zu?	90
3.2.1	Aufreinigung und Charakterisierung benötigter Antikörper	91
3.2.1.1	gerichtet gegen xTopoisomerase II α	91
3.2.1.2	gerichtet gegen xSmc2 und xSmc4	93
3.2.2	Etablierung des molekularen <i>Combing</i> s	95
3.2.3	Etablierung der <i>Maximum Fluorescence Halo Technique</i>	102
4	Diskussion	112
4.1	Die centrosomale Überduplikation in Abwesenheit von xCohesin bzw. xOrc2	112
4.1.1	xOrc2 ist an der centrosomalen Rekrutierung von Cohesin beteiligt und verhindert so die Centrosomenüberduplikation	112
4.1.2	Wann werden die pre-RC-Faktoren und Cohesin an den Centrosomen lokalisiert?	115
4.1.3	Wie bewerkstelligt Cohesin die Kopplung beider Centriolen?	118
4.1.4	Ist eine pre-RC-abhängige centrosomale Cohesinrekrutierung auch in anderen Modellsystemen denkbar?	119
4.2	Die Restrukturierung und Neuorganisation des Chromatins während der Mitose	120
4.2.1	Ist Condensin an der chromosomalen Restrukturierung in Mitose beteiligt?	120

4.2.2	Wie könnte eine chromosomale Restrukturierung auf molekularer Ebene erfolgen?	123
-------	---	-----

5 Material und Methoden **125**

5.1	Mikrobiologische Techniken	127
5.1.1	<i>E. coli</i> -Stämme	127
5.1.2	<i>E. coli</i> -Vektoren	127
5.1.3	<i>E. coli</i> -Medien	128
5.1.4	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	128
5.1.5	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	128
5.1.6	Transformation von <i>E. coli</i>	129
5.1.7	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	130
5.2	Molekularbiologische Methoden	131
5.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	131
5.2.2	Restriktionshydrolyse von DNA	131
5.2.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	131
5.2.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese	132
5.2.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	132
5.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	133
5.2.7	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	133
5.2.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	133
5.2.9	DNA-Sequenzierung	134
5.3	Proteinbiochemische Methoden	134
5.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	134
5.3.2	Kolloidale Coomassie-Blau-Färbung	135
5.3.3	Detektion von Proteinen mittels Western Blot	135
5.3.4	Native Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i>	136
5.3.4.1	Nickel-NTA-Affinitätschromatografie	137
5.3.4.2	Glutathion-Sepharose-Affinitätsreinigung	138
5.3.4.3	Kationenaustauschchromatografie	138
5.3.4.4	Gelpermeationschromatografie	139

5.3.5	Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i> unter denaturierenden Bedingungen	140
5.3.6	Kopplung von Peptiden an Maleimid-aktiviertes KLH	141
5.3.7	Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern	142
5.3.7.1	Affinitätsreinigung von Peptidantikörpern	143
5.3.7.2	Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper unter nativen Bedingungen	144
5.3.7.3	Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper unter denaturierenden Bedingungen	146
5.3.8	Immundepletion von <i>X. laevis</i> -Proteinen aus CSF-Extrakten	148
5.4	Zellbiologische Methoden	149
5.4.1	Verwendete Zelllinie	149
5.4.2	Zellkultivierung	149
5.4.3	Immunfluoreszenzfärbung an XS3-Zellen	150
5.5	Zellbiologische <i>in vitro</i> -Untersuchungen	151
5.5.1	DNA- <i>Combing</i>	151
5.5.1.1	Silanisierung von Deckgläschen	151
5.5.1.2	Molekulares <i>Combing</i>	152
5.5.2	Spreitung von Spermienchromosomen nach Reisolierung aus <i>Xenopus</i> -Eiextrakt	154
5.5.3	<i>Maximum Fluorescence Halo Technique</i> (MFHT)	155
5.5.4	Untersuchungen zur Centrosomenüberduplikation in <i>Xenopus</i> -Eiextrakten	157
5.6	Protokolle zu <i>Xenopus laevis</i>	158
5.6.1	Herstellung von <i>Xenopus laevis</i> -Eiextrakten	158
5.6.2	Präparation von <i>Xenopus laevis</i> -Spermienkernen	160
5.6.3	Präparation von Erythrocytenkernen aus <i>Xenopus laevis</i>	162
6	Abkürzungsverzeichnis	164
7	Literatur	167
8	Danksagung	188

1 Zusammenfassung

Der Multiproteinkomplex Cohesin hält die beiden, während der S-Phase synthetisierten Schwesterchromatiden zusammen und trägt somit zu deren fehlerfreien Segregation im Zuge der Mitose bei. Die chromosomale Rekrutierung des Cohesinkomplexes erfolgt in *S. cerevisiae* während der G1-Phase, in höheren Eukaryoten jedoch bereits in Telophase und bedarf der Anwesenheit des hochkonservierten Kollerinkomplexes (Scc2/Scc4). Dabei variiert die zugrunde liegende Rekrutierungskaskade interessanterweise in Abhängigkeit des Entwicklungszustands und des verwendeten Modellsystems deutlich. Während in Hefe, *Drosophila melanogaster* und Säugerzellen Cohesin vermittelt über Transkriptions-gekoppelte Mechanismen an die DNA dirigiert wird, haben diese Funktion in Extrakten aus Eiern des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis*, in denen keine Gentranskription stattfindet, Replikations-assoziierte Faktoren übernommen. In diesem Modellsystem, in welchem sich charakteristische Ereignisse der späten Meiose bzw. der frühen Embryonalentwicklung nachvollziehen lassen, sind insbesondere Komponenten des präreplikativen Komplexes (pre-RC) maßgeblich an der Rekrutierung von Cohesin an das Chromatin beteiligt.

Überzählige Centrosomen sind ein charakteristisches Merkmal vieler Krebszellen und wirken sehr wahrscheinlich an der Entstehung von Tumoren mit. Die am Ende der Mitose erfolgende Trennung der Centriolen stellt eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Centrosomenverdopplung während der S-Phase dar. Dieser, die Centrosomenzahl kontrollierende Lizenzierungsschritt ermöglicht die genau einmalige Duplikation der Centrosomen innerhalb einer Zellzyklusrunde. Interessanterweise verhindert Cohesin nicht nur die vorzeitige Separation der beiden Schwesterchromatiden, sondern wirkt auch einer verfrühten Trennung der Centriolen entgegen. Dabei ist jedoch bislang unklar, auf welchem Wege Cohesin an die Centrosomen gelangt. Um dies näher zu beleuchten wurden im Rahmen dieses Teilprojekts Antikörper generiert und charakterisiert, mit deren Hilfe Cohesin sowie möglicherweise an seiner centrosomalen Lokalisation beteiligte Faktoren aus *Xenopus*-Eiextrakten eliminiert werden konnten. Unter Verwendung solcher spezifisch immundepletierter Extrakte ergaben sich erste Hinweise darauf, dass Replikations-

gekoppelte Mechanismen nicht nur an der chromosomalen Rekrutierung von Cohesin mitwirken, sondern letzteres auch an die Centrosomen dirigieren, um dort den engen Kontakt zwischen beiden Centriolen aufrecht zu erhalten und somit eine vorzeitige Centrosomentrennung zu unterbinden. Konsistent mit der Tatsache, dass die Duplikation von Centrosomen durch die räumliche Trennung der Centriolen lizenziert wird, resultierte die Eliminierung von Cohesin bzw. der für seine Rekrutierung essentiellen Faktoren in einer Überduplikation von Centrosomen in S-Phase-arretierten Eiextrakten.

Kerntransferexperimente und die damit eng verknüpfte Generierung autologer pluripotenter Stammzellen stellen eine entscheidende Grundlage zellbasierter Therapieansätze für eine Vielzahl von Erkrankungen dar. Allerdings zeigen solche Experimente eine sehr geringe Erfolgsquote, da ein einmal ausdifferenzierter Zellkern nur schlecht und unzureichend auf die Erfordernisse der frühen embryonalen Entwicklung angepasst ist. Mittels verschiedener experimenteller Ansätze konnte gezeigt werden, dass nach Vorbehandlung der differenzierten Zellkerne in einer (quasi-)mitotischen Umgebung die Fehlerrate von Kerntransplantationen deutlich verringert werden kann, wobei nicht der zusätzliche Zeitgewinn sondern die Aktivität mitotischer Faktoren eine tragende Rolle zu spielen scheint. Letztere formen das Chromatin eines ausdifferenzierten Zellkerns so um, dass die Verdopplung der DNA in der nachfolgenden S-Phase fast genauso schnell und effizient ablaufen kann, wie dies in den Zellen früher Embryonen der Fall ist. Neben weiteren Modifikationen werden im Rahmen einer solchen Restrukturierung die Windungen der chromosomalen DNA um das protein-haltige Kerngerüst dichter gepackt, wobei sich die Länge der einzelnen DNA-Schleifen deutlich verkürzt. Mittels geeigneter Methoden, wie etwa der *Maximum Fluorescence Halo Technique* (MFHT) oder dem molekularen *Combing* von DNA-Fäden, lässt sich die Umorganisation der Chromosomenstruktur experimentell gut verfolgen. Über die Identität hieran teilnehmender Faktoren ist bislang allerdings nur wenig bekannt. Als ein möglicher Kandidat bietet sich der Multiproteinkomplex Condensin an, ist er doch an der strukturellen und funktionellen Organisation des Chromatins sowohl in der Interphase als auch während der Mitose maßgeblich beteiligt. Um zu klären, ob Condensin tatsächlich in die chromosomale Reorganisation während der Mitose involviert ist, sollten

ausdifferenzierte *Xenopus*-Zellkerne aus mitotischen Eiextrakten reisoliert werden, denen Condensin zuvor entzogen worden war. Hierfür wurden zunächst Antikörper generiert, welche eine spezifische Eliminierung des Condensinkomplexes ermöglichten. Um die chromosomale Konfiguration beurteilen zu können, wurden zudem die beiden experimentellen Methoden der MFHT und des molekularen *Combing*s etabliert. Trotz vielversprechender Anfänge gelang es in dem zur Verfügung stehenden Zeitrahmen leider nicht, deren Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit so weit zu verbessern, dass eine Anwendung auf ausdifferenzierte, in Condensin-depletierten *Xenopus*-Eiextrakten vorinkubierte Zellkerne sinnvoll erschien.

Summary

The multi-subunit complex cohesin, which holds sister chromatids together and therefore accounts for precise chromosome segregation in anaphase, is loaded onto chromatin during the previous telo- and G1 phase in higher eukaryotes and *S. cerevisiae*, respectively. Upstream of the conserved kollerin complex (Scc2/Scc4) the underlying cohesin recruiting cascade varies with developmental stage and model organism. Cohesin is directed onto DNA by transcription-coupled mechanisms in yeast, *Drosophila melanogaster* and mammalian cells, whereas this function is taken over by replication-associated factors in transcription-incompetent egg extracts of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. Within this late meiotic/early embryonic model system components of the pre-replicative complex (pre-RC) not only define licensed origins of replication but also recruit cohesin to chromatin.

Supernumerous centrosomes are a common feature of many tumor cells and likely contributing to the development of cancer. Duplication of centrosomes in S phase requires a preceding licensing step in late mitosis, centriole disengagement, which ensures that centrosomes are duplicated once and only once per cell cycle. Interestingly cohesin not only prevents premature separation of sister chromatids but also seems to counteract an untimely disengagement of centrioles, although until now it is not clear, how cohesin is targeted towards centrosomes. To answer this question in this project polyclonal antibodies were generated, which allow the elimination of both cohesin and its putative recruitment factors out of *Xenopus* egg extracts. Using such immunodepleted extracts provides first hints that DNA replication-coupled mechanisms are involved in the loading of cohesin onto centrosomes as it is the case for chromosomes. Furthermore, consistent with centriole disengagement licensing centrosome duplication, the absence of cohesin or its putative recruiting factors resulted in overduplication of centrosomes in S phase arrested egg extracts.

Nuclear transfer experiments are a powerful tool for cell-based therapies for various diseases but often fail due to the difficulties in reprogramming the differentiated nuclei for the early developmental events. Using different experimen-

tal approaches it has been shown that the efficiency for such experiments is raised when the nuclei are delivered in a mitotic(-like) environment where they are enabled to adopt a favourable constitution for an efficient DNA replication in the following S phase as it is the case for early embryonic cells. Amongst others this nuclear reprogramming implicates a tighter winding of the chromosomal DNA on the proteinous chromosome scaffold which can be visualized via maximum fluorescence halo technique (MFHT) and molecular combing analysis. Until now few is known about the identity of factors involved in the reorganisation of the chromosomal structure at the transition from M to S phase of the cell cycle. One possible candidate for this challenge is the multi-protein complex condensin which is identified as a key player in chromosome reorganisation events both in interphase and mitosis. To clarify condensin's putative involvement in the process of chromosomal reorganisation during mitosis differentiated nuclei from *Xenopus laevis* should be reisolated out of specific immunodepleted egg extracts. Therefore antibodies were generated which allow the specific elimination of the condensin complex. To estimate the chromosomal constitution both MFHT and molecular combing were established, too. Despite promising beginnings it was not possible to improve the reliability and the reproducibility of both experimental procedures. Therefore an application to differentiated nuclei reisolated from condensin-depleted *Xenopus* egg extracts seemed not reasonable.

2 Einleitung

2.1 Der eukaryotische Zellzyklus

Im Laufe des eukaryotischen Zellzyklus (siehe Abb. 1) wird das genetische Material einer Zelle zunächst dupliziert, um später äquivalent auf die beiden neu entstehenden Tochterzellen verteilt werden zu können. Die dabei ablaufenden physiologischen Prozesse erfordern eine zeitlich und räumlich genaue Regulation, da Fehler in einer Aneuploidie resultieren würden, welche eng verknüpft ist mit der Transformation von Zellen und der Entstehung von Krebs. Der eukaryotische Zellzyklus wird in vier verschiedene Phasen unterteilt: Während der S(Synthese)-Phase werden die Chromosomen verdoppelt, wobei ein als Cohesin bezeichneter Proteinkomplex (siehe auch Kapitel 2.2) für einen engen Zusammenhalt der dabei entstehenden Schwesterchromatiden sorgt. Die M(Mitose)-Phase setzt sich aus der Mitose, in welcher das Cohesin entfernt und somit die Trennung beider Schwesterchromatiden ermöglicht wird, und der sich anschließenden Cytokinese zusammen, als deren Folge zwei Tochterzellen mit identischem Erbgut erhalten werden. M- und S-Phase sind durch sog. *Gap*-Phasen voneinander abgegrenzt. Am Übergang von M- zu S-Phase findet sich die G1-, an dem von S- zu M-Phase die G2-Phase. Zusammen werden G1-, S- und G2-Phase auch als Interphase bezeichnet. Die Mitose lässt sich wiederum unterteilen in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Während der Prophase beginnen die Chromosomen zu kondensieren, gleichzeitig kommt es zur räumlichen Trennung der Centrosomen und die mitotische Spindel wird assembliert. Am Ende der Prophase löst sich die Kernhülle auf (*nuclear envelope breakdown*, NEBD). Im Zuge der sich anschließenden Prometaphase werden die Chromosomen durch die nun voll ausgebildete mitotische Spindel „eingefangen“, hierbei treten die vom Spindelapparat ausgehenden Mikrotubuli mit speziellen, an den Centromeren der Chromosomen assemblierten Proteinkomplexen, den sog. Kinetochoren in Kontakt. Den hierdurch von der mitotischen Spindel ausgeübten Zugkräften wirkt die Cohesin-vermittelte Kohäsion der Schwesterchromatiden entgegen, wodurch eine bipolare Anordnung sämtlicher Chromosomen in der Metaphaseplatte erreicht wird. Erst nach Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion am Übergang von Meta- zu Anaphase wird die

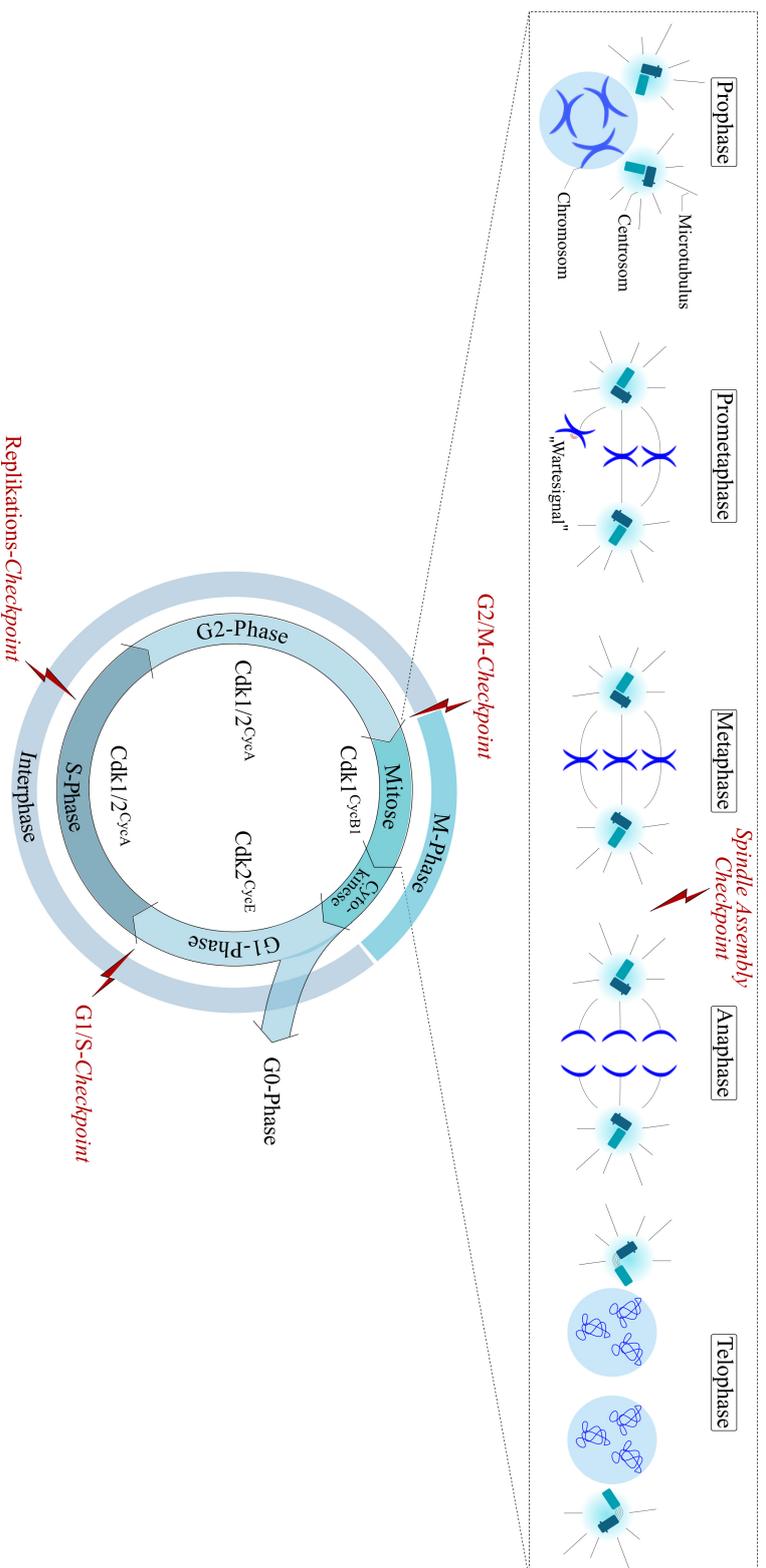


Abb. 1: Der eukaryotische Zellzyklus setzt sich aus fünf Phasen zusammen, welche als G1-, S-, G2-Phase (zusammengefasst zur Interphase) sowie Mitose und Cytokinese (zusammengefasst zur M-Phase) bezeichnet werden. Im Zuge einer beginnenden Zelldifferenzierung können Zellen der G1-Phase den Zyklus verlassen und in das sog. G0-Stadium (auch bezeichnet als Quieszenz) übergehen. Die zeitlich korrekte Aufeinanderfolge der einzelnen Phasen wird durch die entsprechenden Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) in Komplex mit den jeweiligen regulatorischen Cyclinen streng kontrolliert. Entscheidende Kontrollpunkte im Zellzyklusverlauf sind rot hervorgehoben.

Trennung der Chromosomen ermöglicht und als Folge von Mikrotubuliverkürzung (Anaphase A) und Vergrößerung des Centrosomenabstands (Anaphase B) werden beide Chromatiden zu den entgegengesetzten Zellpolen manövriert. In der darauffolgenden Telophase dekondensieren die Chromosomen wieder und die nun nicht mehr benötigte mitotische Spindel disassembliert. Gleichzeitig wird die Neuausbildung einer Kernhülle initiiert.

Um die korrekte, zeitlich-koordinierte Abfolge der einzelnen physiologischen Prozesse zu garantieren, steht der eukaryotischen Zelle ein komplexes Netzwerk regulatorischer Proteine zur Verfügung - das Zellzyklus-Kontrollsystem. Als dessen zentrale Komponenten sind Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDKs) zu betrachten, welche die Phosphorylierung ihrer Proteinsubstrate katalysieren und somit entweder deren enzymatische Aktivität oder aber ihre Bindungsaffinität zu weiteren Interaktionspartnern modifizieren. Aktiviert werden Cdk's durch die mit ihnen assoziierten regulatorischen Cycline, deren Konzentrationen in Abhängigkeit des Zellzyklusverlaufs stark schwanken können. Als direkte Folge oszilliert die enzymatische Aktivität der Cdk's, wodurch gleichfalls der Phosphorylierungszustand diverser Zellzykluskomponenten zyklischen Änderungen unterworfen ist. Zudem können Cdk's durch die Entfernung inhibitorischer Phosphatreste aktiviert werden. Zahlreiche Kontrollmechanismen sind an der Regulation der Cyclinkonzentrationen (und somit der Cdk-Aktivität) beteiligt, sodass die jeweiligen Cycline nur während bestimmter Zellzyklusphasen in ausreichender Menge vorhanden sind. Dies resultiert in der Akkumulation jeweils spezifischer Cyclin-Cdk-Komplexe, welche die ihnen unterliegenden Prozesse in einer zeitlich korrekten Art und Weise vorantreiben.

Des Weiteren wird der Zellzyklus sowohl durch extra- als auch intrazelluläre Signalkaskaden moduliert, wodurch sichergestellt werden kann, dass eine Zellteilung und -vermehrung nur unter geeigneten Wachstumsbedingungen fortgeführt wird. Gleichzeitig garantieren diverse Kontrollpunkte (sog. *Checkpoints*) innerhalb des Zellzyklus, dass die Zelle nur nach vollständiger Passage der vorausgehenden Zellzyklusphase in das nachfolgende Stadium eintreten kann. Hier fungieren diverse Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CKIs) als Negativregulatoren für ein breites

Spektrum von Cyclin/CDK-Komplexen, sodass unter ungünstigen Bedingungen vor allem ein Übergang von G1- zu S-Phase unterbunden und somit der Eintritt in eine neue Zellzyklusrunde verhindert werden kann.

2.2 Die Bedeutung von Cohesin für die Kohäsion der Schwesterchromatiden

Die Kohäsion beider während der S-Phase synthetisierten Schwesterchromatiden ist von essentieller Bedeutung, wirkt sie doch den Zugkräften der mitotischen Spindel entgegen, wodurch eine vorzeitige Trennung und Separation der Schwesterchromatiden verhindert und eine biorientierte Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphaseplatte ermöglicht wird. Prinzipiell wird die Schwesterchromatidkohäsion durch zwei unterschiedliche Mechanismen bewerkstelligt. Die im Zuge der DNA-Replikation ausgebildeten Tochterstränge liegen umeinander gewunden (kateniert) vor [1, 2]. Da der überwiegende Teil dieser Katenierung vermittelt durch das Enzym Topoisomerase II α bereits am Übergang von G2- zur M-Phase aufgelöst wird [3], spielt sie für den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden während der Mitose nur eine untergeordnete Rolle. Von weitaus größerer Bedeutung ist hier die physikalische Verknüpfung beider Schwesterchromatiden durch den Proteinringkomplex Cohesin [4, 5], von welchem angenommen wird, dass er mit beginnender DNA-Synthese beide DNA-Tochterstränge topologisch umfasst [6–8] und bis zu ihrer korrekten Trennung am Übergang von Meta- zu Anaphase eng gepaart zusammenhält [9, 10]. Allerdings scheinen die beiden genannten Mechanismen nicht unabhängig voneinander zu existieren, da Cohesin die Topoisomerase II-vermittelte Dekatenierung inhibiert und somit auch indirekt die Kohäsion beider Schwesterchromatiden aufrecht erhält [11, 12].

Zudem wird Cohesin mit einer Reihe weiterer chromosomaler Funktionen in Verbindung gebracht. Dies impliziert beispielsweise sowohl die Paarung der homologen Chromosomen [13] als auch die Co-Orientierung der Schwesterkinetochoren während der ersten meiotischen Teilung [14], die Kontrolle der Genexpression in *S. cerevisiae* [15], *Drosophila* [16, 17] und Säugern [18], die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in mitotischen [19] und meiotischen [20, 21] Zellen sowie

die Organisation der Chromosomenmorphologie während der Interphase [22]. Des Weiteren ist Cohesin beteiligt an der Regulation des somatischen Rekombinationsprozesses im T-Zell-Rezeptor- α -Locus, wodurch im Zuge der Immunabwehr die gesamte Bandbreite an möglichen T-Zell-Rezeptormolekülen bereitgestellt werden kann [23].

2.2.1 Zusammensetzung des Cohesinringkomplexes

Der Multiproteinringkomplex Cohesin setzt sich aus mindestens vier evolutionär konservierten Untereinheiten zusammen: Smc1 und Smc3, Scc1 (auch Mcd1 oder Rad21) und Scc3 (auch SA oder Stromalin). Die beiden Smc-Untereinheiten Smc1 und Smc3 gehören der Familie der *Structural Maintenance of Chromosome*-Proteine an, deren Polypeptidkette auf sich selbst zurückfaltet und somit einen antiparallelen *coiled coil* ausbildet (siehe auch Abb. 2A). Flankiert wird dieser Bereich einerseits von einer globulären Gelenkregion, welche der Dimerisierung beider Smc-Proteine dient, und andererseits von einer Nukleotid-bindenden Kopfdomäne (NBD), welche eine ATPase des ABC-Typs beinhaltet [24]. Das zur Familie der α -Kleisine gehörende *Sister Chromatid Cohesion* Protein Scc1 verknüpft die beiden Smc-Untereinheiten, indem sein Aminoterminus mit dem *coiled coil*-Bereich nahe der Smc3-Kopfdomäne und sein Carboxyterminus mit der Kopfdomäne von Smc1 in Wechselwirkung tritt [25, 26]. Zudem dient es der Rekrutierung der weiteren Cohesin-Untereinheit Scc3 und interagiert mit Pds5 und Wapl [27, 28]. Die beiden letzteren bilden einen auch als Releasin bezeichneten heterodimären Komplex, welcher zumindest in *S. pombe* und Vertebraten benötigt wird, um Cohesin Proteolyse-unabhängig von den Chromosomen zu entfernen und gleichsam dynamisch zu halten [8, 27, 28]. Als weiterer Interaktionspartner kommt hierbei Sororin ins Spiel, welches mit Wapl um die Interaktion mit Pds5 konkurriert und somit die Cohesin-vermittelte Schwesterchromatidkohäsion stabilisiert [29, 30]. In Säugern wurden bislang zwei verschiedene Smc1-Untereinheiten (Smc1 α und Smc1 β), drei unterschiedliche α -Kleisine (Rad21, Rad21L und Rec8), drei Scc3-Varianten (SA1, SA2 und STAG3) sowie zwei für Pds5 (Pds5a und Pds5b) identifiziert. Somit ergeben sich für den Cohesinringkomplex 18 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, wobei allerdings erwähnt sei, dass einige der genannten Untereinheiten nur

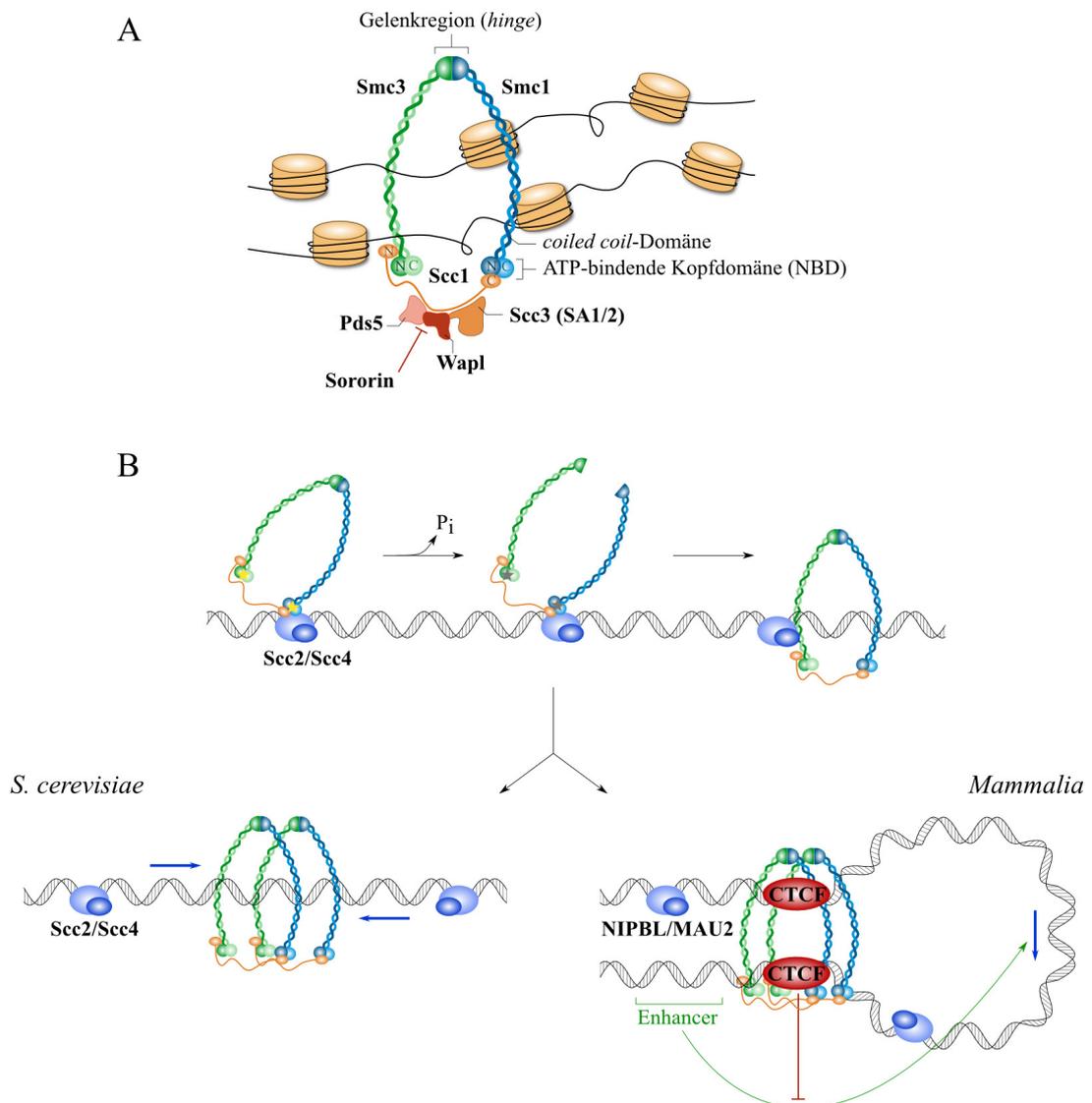


Abb. 2: Das Cohesin-Ringmodell. A) Zusammensetzung des Multiproteinringkomplexes Cohesin, welcher die beiden DNA-Schwesterstränge topologisch umfasst. B) Die Rekrutierung von Cohesin an die chromosomale DNA erfolgt in zwei Schritten. Vermittelt durch den Kollerinkomplex Scc2/Scc4 (NIPBL/MAU2 in Säugern) bindet Cohesin zunächst transient an die DNA, erst nach ATP-Hydrolyse in den NBDs beider Kopfdomänen wird der Ring an der Smc1-Smc3-Schnittstelle geöffnet und die DNA tritt ein. Nach Etablierung der Kohäsion ist Cohesin speziesabhängig an unterschiedlichen genomischen Stellen lokalisiert. Während es in *S. cerevisiae* bedingt durch die Aktivität der Transkriptionsmaschinerie zwischen aufeinander zulaufenden Transkriptionseinheiten akkumuliert, colokalisiert es in Säugern häufig mit dem CTCF-Insulatorprotein in der Nähe exprimierter Gene. Durch diese Interaktion wird die Wirkung weiter stromaufwärts lokalisierter Enhancerelemente aufgehoben. Die blauen Pfeile markieren transkribierte Gene, die gelben bzw. grauen Sterne das durch die NBDs gebundene ATP bzw. ADP.

in meiotischen Zellen zu finden sind.

2.2.2 Das Cohesin-Ringmodell

Die Identifizierung der wechselseitigen Protein-Protein-Interaktionen innerhalb des Cohesinkomplexes führte zu der Schlussfolgerung, dass dessen Untereinheiten Smc1, Smc3 und Scc1 einen dreigliedrigen Ring ausbilden, dessen innerer Durchmesser etwa 40 bis 50 nm beträgt und dessen Spaltung am Übergang von Meta- zu Anaphase in der Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion resultiert. Unterstützt wird das Cohesin-Ringmodell durch elektronenmikroskopische Aufnahmen aufgereinigter, humaner Cohesinkomplexe [31] und durch Röntgenstrukturanalysen an Cohesin-subkomplexen [32, 33]. Die bedeutendste Schwachstelle des Cohesin-Ringmodells bestand lange Zeit darin, dass nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, wie sich die Bindung zwischen Scc1 und Smc3 genau gestaltet, denn im Unterschied zur Smc1-Smc3-Interaktion in der Gelenkregion und jener zwischen Smc1 und Scc1 waren hierfür keine Kristallstrukturen verfügbar. Kürzlich gelang es jedoch Gligoris u. a. [26], einen Komplex bestehend aus der N-terminalen Kleisindomäne und der ATPase-Kopfdomäne des Smc3s zu kristallisieren und einer Röntgenstrukturanalyse zu unterziehen, wobei sich herausstellte, dass der N-Terminus von Scc1 mit einem Bereich der *coiled coil*-Domäne in unmittelbarer Nähe der NBD interagiert. Somit kann das Vorliegen eines dreigliedrigen Cohesinringkomplexes als endgültig erwiesen angesehen werden. Experimentelle Beobachtungen anhand von Minichromosomen in Hefe legen die Vermutung nahe, dass ein einzelner Cohesinring die beiden Schwesterchromatiden zusammenhält, indem er beide DNA-Stränge topologisch umfasst (vgl. auch Abb. 2A) [26, 34, 35]. Dem stehen andere Modelle entgegen, welche davon ausgehen, dass die Dimensionen des Cohesinrings die Aufnahme lediglich eines DNA-Moleküls erlauben, sodass zur physiologischen Verknüpfung beider Schwesterchromatiden mindestens zwei Cohesinkomplexe benötigt werden, welche entweder Ringkatene bilden oder deren α -Kleisin-Untereinheiten mit den NBDs beider Smc1-Smc3-Heterodimere interagieren [36, 37].

2.2.3 Chromosomale Rekrutierung von Cohesin und Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion

Im Unterschied zu höheren Eukaryoten spielt der Prophaseweg (siehe Kapitel 2.2.4) in Hefe bei der Eliminierung des chromosomal-gebundenen Cohesins nur eine sehr untergeordnete Rolle. Hier wird sämtliches, die Schwesterchromatidkohäsion vermittelndes Cohesin am Übergang von Meta- zu Anaphase durch die Cysteinprotease Separase gespalten. Deshalb stehen erst am Ende der G1-Phase wieder genügend neu-synthetisierte Cohesinkomplexe für eine Neubeladung des Chromatins zur Verfügung. Bewerkstelligt wird dieser Prozess durch einen auch als Kollerin bezeichneten heterodimären Proteinkomplex, welcher sich aus den beiden Komponenten Scc2 und Scc4 zusammensetzt [38]. Dieser wird für die initiale Cohesin-Rekrutierung dringend benötigt, spielt jedoch für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Cohesin-vermittelten Schwesterchromatidkohäsion während der folgenden S-Phase keine Rolle mehr [38, 39]. In höheren Eukaryonten wird Cohesin bereits mit dem Ausklingen der Telophase an die Chromosomen dirigiert, denn im Zuge des Prophasewegs wurde hier die überwiegende Mehrheit des Cohesins in intakter Form von den Chromosomenarmen entfernt und liegt somit bereits zu diesem Zeitpunkt in ausreichender Menge vor. Die in Säugetieren existierenden Orthologe von Scc2 und Scc4 werden als NIPBL bzw. MAU2 bezeichnet und ihre Eliminierung führt zu schweren Kohäsionsdefekten in der folgenden S-Phase. Wird hingegen nur ein Allel des *NIPBL*-Gens in Mitleidenschaft gezogen, wirkt sich dies auf die Kohäsion der Schwesterchromatiden nur geringfügig aus. Zusammengefasst unter dem Terminus Cornelia-de-Lange-Syndrom (CdLS) können diese Mutationen beim Menschen dennoch schwere Entwicklungsstörungen nach sich ziehen, eine Beobachtung, die vermutlich in engem Zusammenhang mit der Funktion des Cohesins als Regulator der Genexpression steht [40, 41].

Zumindest in meiotischen Eiextrakten von *Xenopus laevis* stellen die während der Telophase an der DNA assemblierten präreplikativen Komplexe (pre-RCs, siehe Kapitel 2.3.1) neben dem Kollerinkomplex eine weitere wichtige Voraussetzung für eine effiziente Cohesinrekrutierung dar. Vermittelt über eine Interaktion mit der Proteinkinase Cdc7 und eine ihrer aktivierenden Untereinheiten Dbf4 oder Dfr4

dirigieren diese den Scc2/Scc4-Komplex an die DNA [42–44]. In diesem Modellsystem ist also die Assemblierung der präreplikativen Komplexe eng mit der Rekrutierung des Kollerinkomplexes und folglich auch mit der des Cohesins verknüpft. Auch in *S. pombe* wird das Cdc7-Ortholog Hsk1 zur Bindung von Cohesin an pericentrisches Heterochromatin benötigt [45], was die Vermutung nahelegt, dass diese Funktion von Cdc7 hinsichtlich der Cohesinrekrutierung teilweise evolutionär konserviert worden ist. Zwar ist bislang nicht bekannt, ob auch in anderen Spezies ein direkter Zusammenhang zwischen der Assemblierung funktioneller pre-RCs und der chromosomalen Assoziation von Cohesin besteht, das gleichzeitige Auftreten beider Ereignisse in der Telophase lässt dies aber zumindest möglich erscheinen.

Experimentelle Untersuchungen in *Xenopus laevis* und HeLa-Zellen legen die Vermutung nahe, dass die Rekrutierung von Cohesin an die Chromosomen in einem zweistufigen Prozess erfolgt. Vermittelt über den Scc2/Scc4-Komplex wird Cohesin zunächst an die DNA dirigiert, doch bewirkt erst die ATP-Hydrolyse in den NBDs beider Smc-Proteine die Öffnung der zwischen ihnen befindlichen Gelenkregion (dem sog. „*entry gate*“), sodass die chromosomale DNA in den Ringkomplex aufgenommen werden kann (siehe auch Abb. 2B) [46–49]. Vermutlich spielt hierbei eine durch die Spaltung des ATPs induzierte Konformationsänderung in den NBDs eine Rolle. Es bleibt jedoch unklar, wie sich diese entlang der flexiblen *coiled coil*-Domänen auf die Gelenkregion überträgt. Eine mögliche Erklärung lässt sich anhand von *Atomic Force*-mikroskopischen Aufnahmen des Smc1-Smc3-Dimers aus *S. pombe* ableiten [50]: Die *coiled coil*-Bereiche des Cohesinringes könnten demnach einknicken, sodass dessen Gelenkregion in räumlicher Nähe der ATPase Kopfdomänen zu liegen kommt. Auch biochemische Analysen unterstützen diese Annahme [51].

Vermittelt durch die Interaktion mit dem Pds5-Wapl-Komplex wird der Cohesinring an der Kontaktstelle zwischen Smc3 und dem α -Kleisin (dem sog. „*exit gate*“) immer wieder geöffnet, sodass sich im Zusammenspiel mit der entgegengerichteten Wirkung des Scc2/Scc4-Komplexes ein hoch-dynamisches Verhalten des Cohesins ergibt. Erst im Zuge der DNA-Replikation werden zwei konservierte Lysinreste in der ATPase Kopfdomäne der Cohesin-Untereinheit Smc3 durch die Acetyltrans-

ferase Eco1 (in Wirbeltieren Esco1 und Esco2) acetyliert, was in der Rekrutierung von Sororin resultiert [7, 52]. Letzteres kompetitiert mit Wapl um die Bindung an Pds5 und stabilisiert somit den Cohesinringkomplex an der DNA [29]. Bisher noch unklar ist, ob die Ringdimensionen des Cohesins ausreichend sind, um die Passage der DNA-Replikationsmaschinerie zu erlauben, was automatisch in einer topologischen Umfassung beider Schwesterchromatiden resultieren würde, oder ob der Cohesinring Wapl-vermittelt transient geöffnet und anschließend wieder neu um beide DNA-Tochterstränge geladen werden muss.

Anhand von Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen konnte in *S. cerevisiae* eine deutliche Anreicherung von Cohesin an den Centromeren sowie an distinkten Bindungsstellen entlang der Chromosomenarme festgestellt werden [53, 54]. Diese Bindungsstellen sind 10 bis 15 kb voneinander entfernt und zeichnen sich durch einen hohen AT-Gehalt aus [53, 55]. Mit Hilfe hochauflösender Microarray-Analysen konnte später gezeigt werden, dass Hefe-Cohesin vorwiegend in den intergenischen Regionen zwischen konvergenten, RNA-Polymerase-II-transkribierten Genen akkumuliert wird (siehe auch Abb. 2B) [56, 57]. Dies deckt sich mit den vorangegangenen Beobachtungen, da diese Bereiche, insbesondere wenn sie über Terminationssequenzen verfügen, sehr AT-reich sind. Im Gegensatz zum Cohesin lässt sich der für seine Rekrutierung benötigte Scc2/Scc4-Komplex in den Promotorregionen stark exprimierter Gene lokalisieren [56, 58]. Dies hat zu der Annahme geführt, dass auch Cohesin hier zwar initial an das Chromatin dirigiert und gebunden wird. Vermittelt durch die Aktivität der Transkriptionsmaschinerie wird es dann aber entlang der DNA verschoben, bevor es schließlich in intergenischen Regionen zu liegen kommt. Seine Fähigkeit, sich unter Erhalt der topologischen DNA-Bindung entlang des Chromatins zu bewegen, könnte es dem Cohesinringkomplex ermöglichen, eine stabile Schwesterchromatidkohäsion aufrechtzuerhalten, ohne dass hierdurch gleichzeitig in der Zelle ablaufende hochdynamische Prozesse wie etwa die DNA-Transkription beeinträchtigt werden. Auch in Säugerzellen ist der Scc2/Scc4-Komplex in den Promotorbereichen exprimierter Gene lokalisiert und im Unterschied zu Hefe ist hier ein Teil des Cohesins ebenfalls zu finden [59]. Der weit größere Anteil befindet sich jedoch in Kollokalisierung mit dem CTCF-Insulatorprotein in unmittelbarer Nähe transkribierter Gene [60], wobei bislang

unklar ist, wie der Cohesinkomplex vom Ort seiner Rekrutierung zu den CTCF-Bindestellen gelangt (siehe auch Abb. 2B). Bekannt ist allerdings, dass Cohesin benötigt wird, um die Interaktion benachbarter Bindestellen zu ermöglichen, worin möglicherweise die molekulare Grundlage für seine Funktion bei der Kontrolle der Genexpression zu suchen ist [61, 62].

2.2.4 Die Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion während der Mitose

Nachdem die Zelle in Mitose eingetreten ist, wird während des sog. Prophasewegs ein Großteil des an die Chromosomenarme gebundenen Cohesins entfernt (siehe auch Abb. 3) [4, 63, 64]. Da die centromerische Schwesterchromatidkohäsion währenddessen aufrechterhalten bleibt, erhalten die Chromosomen in der sich anschließenden Metaphase ihre typische Schmetterlingsform. Neben der Kinaseaktivität von *Polo-like kinase 1* (Plk1) und Aurora B erfordert dieser Prozess eine Hyperaktivierung des Releasinkomplexes, welche durch Phosphorylierung von SA1/SA2, Sororin, Pds5, Wapl und des α -Kleisins bewerkstelligt wird [29, 30, 64]. Das Zusammenspiel all dieser Ereignisse führt zu einer nicht-proteolytischen Öffnung des Cohesinrings an der Smc3/Scc1-Schnittstelle (dem sog. „*exit gate*“) unter Freilassung der gebundenen DNA [65, 66] und wird begleitet von der Deacetylierung der Smc3-Untereinheit durch Cohesin-Deacetylasen [67]. Die gleichzeitige Phosphorylierung und Abdissoziation des Scc2/Scc4-Komplexes verhindert eine weitere Cohesinrekrutierung an das Chromatin [42].

Über die eigentliche Funktion des Prophasewegs lassen sich nur Mutmaßungen anstellen. So ist es beispielsweise denkbar, dass durch die Auflösung der Armkohäsion die Genauigkeit der späteren Chromosomensegregation erhöht werden kann, indem das Reaktionsgleichgewicht der daran beteiligten Topoisomerasen auf die Seite der Dekatenierung verschoben wird. Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen seitens Haarhuis u.a. [68], welche belegen, dass Wapl für die korrekte Segregation der Schwesterchromatiden benötigt wird, indem es einerseits die Dekatenierung vorantreibt und andererseits an der Korrektur fehlerhafter Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen beteiligt ist. Des Weiteren könnte der Prophaseweg in einem indirekten, jedoch sehr bedeutsamen Zusammenhang mit der

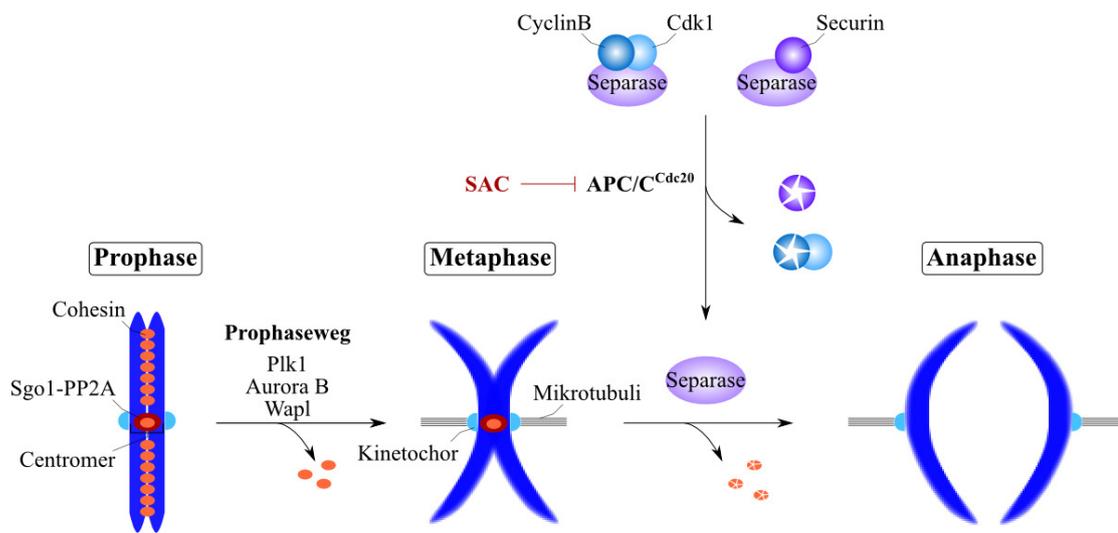


Abb. 3: Die Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion während der Mitose erfolgt in zwei Schritten.

Funktion von Cohesin bei der Kontrolle der Genexpression stehen. Denn da Cohesin als dessen Folge nicht-proteolytisch von den Chromosomen entfernt wird, verfügt die Zelle mit Ende der Mitose über große Mengen intakter Cohesinkomplexe, welche unmittelbar nach Neuausbildung der Kernhülle an die DNA dirigiert werden können. Somit ist Cohesin bereits mit dem Beginn der G1-Phase wieder in der Lage, seiner Rolle als Organisator des interphasischen Chromatins und Modulator der Genexpression gerecht zu werden.

Die centromerische Schwesterchromatidkohäsion bleibt bis zum Beginn der Anaphase bestehen, da die hier lokalisierten Cohesinkomplexe durch Shugoshin (Sgo1) vor dem Prophaseweg geschützt werden [69, 70]. Im Bereich der Centromere liegt Sgo1 in Komplex mit der Proteinphosphatase 2A (PP2A) vor und letztere nivelliert die am Cohesinringkomplex vorgenommenen Phosphorylierungsreaktionen, sodass Cohesin hier stabil gebunden bleibt [71, 72]. Erst infolge der biorientierten Ausrichtung sämtlicher Chromosomen in der Metaphaseplatte kommt es zu einer Inaktivierung des sog. *Spindle Assembly Checkpoints* (SAC). Letzterer stellt sicher, dass ein Voranschreiten in Anaphase erst dann möglich ist, wenn die Ki-

netochore sämtlicher Chromosomen korrekt mit dem Spindelapparat verknüpft sind. Die beiden Separaseinhibitoren Securin und CyclinB1 werden nun durch den Ubiquitin-E3-Ligasekomplex *Anaphase Promoting Complex/Cyclosom* (APC/C) für den proteasomalen Abbau markiert, Separase wird aktiv und sorgt mit dem Schneiden der α -Kleisinuntereinheit an zwei distinkten Stellen für eine Öffnung der verbleibenden Cohesinringkomplexe [9, 10, 63]. Nach deren Dissoziation können die nun vollständig getrennten Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen werden.

2.3 Die Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation

Während der S-Phase wird das einem jeden Chromosom zugrunde liegende DNA-Molekül dupliziert, ein Prozess, der nicht nur sehr schnell, sondern auch extrem genau erfolgen muss. Die DNA-Synthese beginnt dabei an den Replikationsursprüngen, wo ein auch als Replisom bezeichnetes komplexes Proteinkonglomerat die Replikation initiiert. Stimuliert und reguliert durch das Zellzyklus-Kontrollsystem geschieht dies genau ein einziges Mal im Laufe eines Zellzyklus. Die teilweise überaus strenge Konservierung der enzymatischen Funktionen innerhalb des Replisoms legen die Vermutung nahe, dass die grundlegenden Mechanismen der DNA-Vervielfältigung im Laufe der Evolution beibehalten wurden. Allerdings bestehen zwischen niederen und höheren Eukaryoten mitunter gravierende Unterschiede hinsichtlich der Erkennung und tatsächlichen Verwendung potenzieller Initiationsstellen. Eines der am besten charakterisierten Beispiele für dieses hohe Maß an Plastizität der DNA-Replikation ist die sehr schnelle Verdopplung des vollständigen Genoms in frühen Amphibienembryonen innerhalb von 20 bis 30 min verglichen mit einer Dauer von 8 bis 10 Stunden, die dieser Prozess in somatischen Zellen benötigt.

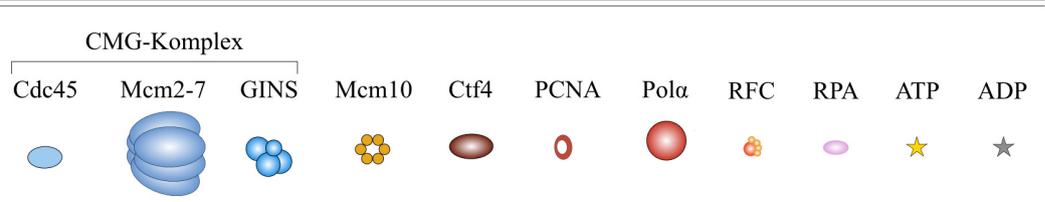
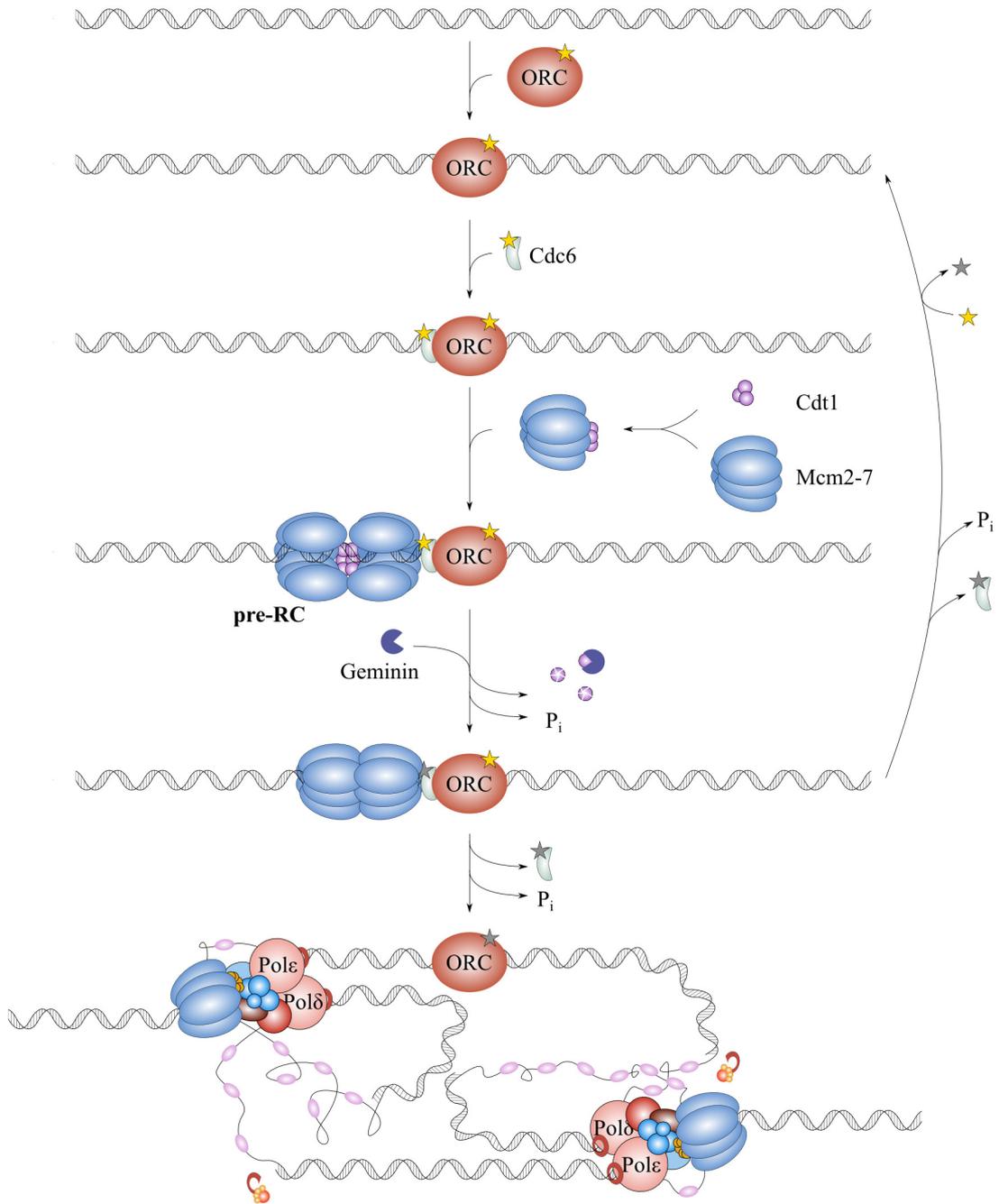
2.3.1 Die Assemblierung präreplikativer Komplexe an der DNA

Wie bereits erwähnt, stellt die vollständige Ausbildung der präreplikativen Komplexe (pre-RCs) zumindest in *Xenopus* eine essentielle Voraussetzung für die chromosomale Assoziation von Cohesin dar [42–44]. Möglicherweise impliziert dies eine enge zeitliche und räumliche Kopplung der Cohesinrekrutierung mit der pre-RC-

Assemblierung, sodass potenzielle Cohesinbindungsstellen (ebenso wie die Initiationsstellen der DNA-Replikation) bereits früh im Zellzyklus etabliert und regelmäßig entlang des Chromatins verteilt werden.

Die auch als *Origins of Replication* bezeichneten Initiationsstellen der DNA-Replikation weisen in höheren Eukaryonten keine Consensussequenz auf, sondern werden vielmehr durch die lokale Topologie der DNA, die Nähe von Promotorelementen sowie den Kompaktierungsgrad des umgebenden Chromatins definiert [73–76]. Allein in *S. cerevisiae* können fast alle Replikationsstartstellen bestimmten DNA-Segmenten, den sog. *Autonomous Replicating Sequences* (ARS) zugeordnet werden [77]. Gemeinsam mit Cdc6 werden chromosomale Replikationsursprünge durch den ringförmigen *Origin Recognition Complex* (ORC) identifiziert und markiert [78, 79]. Dieser heterohexamere Komplex besteht aus den Untereinheiten Orc1, Orc2, Orc3, Orc4 und Orc5, welche über AAA+ ATPase-Domänen verfügen und die Interaktion mit der DNA vermitteln, sowie Orc6, welches mit der ebenfalls ringförmigen replikativen Helikase in Wechselwirkung tritt (siehe auch Abb. 4) [80–82]. Letztere setzt sich wiederum aus sechs verschiedenen, evolutionär jedoch eng verwandten *Minichromosome Maintenance* (MCM)-Untereinheiten zusammen, welche als Mcm2-7 bezeichnet werden [84]. Vermittelt über die C-terminale *winged helix*-Domäne (WHD) in Mcm6 interagiert Mcm2-7 zunächst mit Cdt1, bevor der gesamte Komplex infolge des Zusammenwirkens von ORC und Cdc6 an die DNA rekrutiert werden kann [82, 85, 86]. Die relativ instabile Interaktion zwischen Mcm2 und Mcm5 fungiert hierbei als Eintrittspforte für die DNA und wird anschließend ATP-abhängig wieder geschlossen [87]. Da die ORC-Untereinheit Orc6 über zwei Cdt1-Bindungsstellen verfügt, werden pro Initiationsstelle zwei MCM-Hexamere geladen, welche in einer Kopf-an-Kopf-Anordnung zu liegen kommen [85]. Zusammen mit ORC, Cdc6 und Cdt1 bildet das Mcm2-7 Doppelhexamer den präreplikativen Komplex (pre-RC) aus, in welchem die replikative Helikase zunächst in inaktiver Form vorliegt [88, 89].

Erst infolge mehrerer Phosphorylierungsreaktionen seitens der beiden S-Phase-Kinasen Cdk2^{Cyclin E} und Cdc7^{Dbf4} (DDK) werden derart lizenzierte Replikationsursprünge mit zusätzlichen essentiellen Komponenten der DNA-Replikations-



maschinerie beladen und gleichsam aktiviert [90–92]. So assoziieren beispielsweise Cdc45 und der heterotetramere GINS-Komplex (bestehend aus Scl5 (*go*), Psf1 (*ichi*), Psf2 (*ni*) und Psf3 (*san*)) mit der Mcm2-7 Helikase und überführen letztere in ihren aktiven Zustand [93, 94]. Der auch als CMG bezeichnete Komplex kann sich nun in 3'→5'-Richtung entlang des DNA-Doppelstrangs fortbewegen und diesen dabei entwinden, was in der Ausbildung einer bidirektionalen Replikationsgabel resultiert. Stabilisiert werden die hierbei entstehenden einzelsträngigen Bereiche durch die Assoziation des heterotrimären Einzelstrang-bindenden Proteins RPA [95, 96]. Des Weiteren assoziiert Mcm10 mit der Mcm2-7 Helikase und dirigiert, verbrückt über Ctf4, den DNA-Polymerase α /Primase-Komplex an das Replisom, welche für die Synthese der Primer zuständig ist [97]. Eine Reihe zusätzlicher Faktoren wird ebenfalls an das sich assemblierende Replisom rekrutiert. Sie alle wirken letztendlich dahingehend zusammen, die DNA-Polymerasen ϵ und δ in ihrer enzymatischen Funktion bei der komplementären Ergänzung des Leit- bzw. Folgestrangs zu unterstützen. Eine besondere Rolle kommt hierbei dem homotrimären *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA)-Komplex zu, welcher vermittelt durch den Chaperon-ähnlichen Komplex RFC an die DNA dirigiert wird, letztere ringförmig umschließt und die stabile Interaktion der replikativen Polymerasen mit der DNA forciert. Frühe *in vitro*-Studien konnten eindrucksvoll belegen, dass sich die Prozessivität der DNA-Polymerasen durch die Anwesenheit von PCNA um das 1000fache steigern lässt [98, 99]. Zudem fungiert PCNA als

Abb. 4 (vorhergehende Seite): Die Initiation der DNA-Replikation. Eine als Replikationsursprung bezeichnete, spezifische DNA-Sequenz wird durch den heterohexameren ORC identifiziert und gebunden. An diesen wiederum bindet Cdc6. Beide Komponenten wirken anschließend zusammen um die Mcm2-7 Helikase hierhin zu dirigieren, sodass es zur Ausbildung eines pre-RCs kommt. In *S. cerevisiae* wird die Helikase im Komplex mit Cdt1 beladen. Ein solcher besteht zwar nicht in höheren Eukaryoten, jedoch ist auch hier die direkte Interaktion zwischen Cdt1 und Mcm2-7 für die Assemblierung der pre-RCs von entscheidender Bedeutung. Die ATP-Hydrolyse in Cdc6 induziert im Mcm2-7 Komplex eine Konformationsänderung, wodurch dessen Bindung an die DNA stabilisiert wird und Cdt1 abdissoziiert. Die anschließende Dissoziation von Cdc6 und ATP-Hydrolyse in ORC ermöglicht eine erneute Runde der Mcm2-7 Rekrutierung [83]. Mit Beginn der S-Phase werden eine Reihe weiterer essentieller Faktoren an die so lizenzierten Replikationsursprünge dirigiert, die allesamt dazu beitragen, die beiden DNA-Polymerasen ϵ und δ in ihrer enzymatischen Funktion bei der komplementären Ergänzung der beiden Matrizenstränge zu unterstützen. Abbildung modifiziert nach [290].

zentrale Verknüpfungsstelle, welche es erlaubt, die fortschreitende Replikationsmaschinerie mit verschiedensten, gleichzeitig in der Zelle ablaufenden Prozessen zu koordinieren [100]. So interagiert PCNA beispielsweise mit zahlreichen Komponenten unterschiedlicher DNA-Reparaturmechanismen oder mit Faktoren, welche die Chromatinstruktur beeinflussen. Vermittelt über PCNA scheint auch die Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion an die DNA-Replikation gekoppelt zu sein, denn sein Vorhandensein ist essentiell für die chromosomale Lokalisation der in Kapitel 2.2.3 bereits erwähnten Acetyltransferase Eco1 [101].

2.3.2 Regulation der DNA-Lizensierung

Jedes DNA-Segment des gesamten Genoms einer Zelle darf während einer Zellzyklusrunde nur ein einziges Mal repliziert werden, da die Reinitiation selbst einer einzigen bereits ausgelesenen Replikationsstartstelle in einer genomischen Instabilität resultieren könnte. Alle bisher bekannten Kontrollmechanismen sind dabei auf Ebene der pre-RC-Assemblierung angesiedelt. Obwohl die molekularen Regulationskaskaden zwischen verschiedenen Spezies deutlich variieren können, basieren sie alle auf einem gemeinsamen Prinzip: Assemblierung und Aktivierung der pre-RCs stellen zeitlich strikt voneinander getrennte Ereignisse dar und sind mit der Oszillation der Cdk-Aktivität eng korreliert. Wenn mit dem Austritt aus Mitose die Aktivität der mitotischen Cdks absinkt, werden in der späten M- und der frühen G1-Phase die pre-RCs an die Replikationsursprünge dirigiert. Jedoch wird die Replikation an den so lizenzierten Replikationsstartstellen erst mit dem Eintritt in S-Phase und infolge des daraus resultierenden Anstiegs der S-Phase-Cdk-Aktivität durch vielfältige Phosphorylierungsreaktionen tatsächlich initiiert. Gleichzeitig wird durch Cdk-abhängige Phosphorylierung diverser pre-RC-Komponenten die Relizensierung bereits ausgelesener Replikationsursprünge außerhalb der G1-Phase inhibiert.

In *S. cerevisiae* existieren mehrere inhibitorische Mechanismen zur Verhinderung der pre-RC-Reassemblierung, die allesamt einer Cdk-abhängigen Regulation unterliegen. So wird die Menge an verfügbarem Cdc6 durch Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau und Inhibition der *CDC6*-Transkription reduziert [102, 103]. Gleichzeitig werden Cdc6 und diverse ORC-Komponenten durch die Bindung spe-

zifischer Inhibitoren inaktiviert und Cdt1 sowie der MCM-Komplex werden aus dem Kern exportiert [104–106]. Auch in höheren Eukaryoten wird eine Relizensierung in S-Phase durch verschiedene Cdk-abhängige Maßnahmen unterbunden, welche beispielsweise die Inaktivierung von ORC oder den proteasomalen Abbau von Cdc6 beinhalten. Eine weitaus bedeutendere Rolle spielt hier jedoch die doppel-negative Regulation von Cdt1. Dessen Hauptanteil wird dem proteasomalen Abbau zugeführt, was sowohl durch Cdk-vermittelte Phosphorylierungsreaktionen als auch durch eine Interaktion mit Chromatin-gebundenem PCNA bewerkstelligt wird. Die Bindung des dann noch verbleibenden Cdt1 durch den spezifischen Inhibitor Geminin wirkt seiner Reassemblierung an die DNA entgegen. Geminin wird während der S-, G2- und M-Phase exprimiert, also genau in den Zellzyklusphasen, in welchen eine Relizensierung verhindert werden muss. Interessanterweise wurde allerdings in Studien mit *Xenopus* nachgewiesen, dass ein aus Geminin und Cdt1 bestehender heterodimerer Komplex noch immer befähigt ist, die Lizensierung von Replikationsursprüngen voranzutreiben [107]. Zusätzlich zeigten kristallografische Untersuchungen, dass Geminin zur Ausbildung von Homodimeren neigt, wobei eine zentrale *coiled coil*-Domäne die hochaffine Bindung an Cdt1 vermittelt [108]. Aus beiden Beobachtungen kann geschlossen werden, dass erst nach Überschreiten eines kritischen Verhältnisses von Geminin zu Cdt1 von 2 : 1 letzteres sterisch daran gehindert wird, erneut mit der DNA in Wechselwirkung zu treten. Da Geminin ein Substrat des APC/C-Ubiquitin-Ligasekomplexes darstellt und demnach mit Beginn der Anaphase dem proteasomalen Abbau unterliegt, wird die benötigte inhibitorische Konzentration an Geminin erst unmittelbar vor Initiation der DNA-Replikation in der späten G1-Phase erreicht.

2.4 Das Centrosom

Bedingt durch ihre Fähigkeit zur Assemblierung und Organisation von Mikrotubuli übernehmen Centrosomen als primäres Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC) in den meisten tierischen Zellen eine zentrale Rolle bei zahlreichen interphasischen Prozessen. So bestimmen sie die äußere Gestalt einer Zelle ebenso wie ihre innere Strukturierung und sind von entscheidender Bedeutung für deren polare Ausrichtung und Motilität [109, 110]. Zudem steuern sie den cytoplasmatischen

Materialtransport und sind an der Positionierung weiterer Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum beteiligt [111]. Des Weiteren geht die Ausbildung primärer Cilien oder Geißeln in ausdifferenzierten Zellen von maternalen Centriolen aus, welche zum Basalkörper umgestaltet wurden [112]. Im Rahmen der Zellteilung kommt den Centrosomen die entscheidende Aufgabe zu, Aufbau und Funktionalität des Spindelapparats zu koordinieren, welcher eine gleichmäßige Verteilung des replizierten Genoms auf die beiden neuentstehenden Tochterzellen gewährleistet [113]. Centrosomale Fehlfunktionen sind untrennbar mit chromosomalen Fehlverteilungen (Aneuploidien) und chromosomaler Instabilität verknüpft und beide Phänomene sind eng mit der Transformation von Zellen und der Entstehung von Tumoren assoziiert [114–116].

2.4.1 Struktureller Aufbau des Centrosoms

Ein ausgereiftes Centrosom setzt sich aus zwei orthogonal angeordneten Centriolen zusammen, welche von elektronendichtem Material, der pericentriolären Matrix (PCM) umgeben sind (siehe auch Abb. 5) [117, 118]. Dabei stellt jedes Centriol eine zylindrische Struktur dar, deren Wand durch neun parallel verlaufende Mikrotubulitriplets gebildet wird. Ein jedes solches Triplet wiederum besteht aus einem inneren A-, einem mittleren B- und einem äußeren C-Tubulus, wobei letzterer um etwa ein Drittel kürzer ist als die anderen beiden und folglich am distalen Ende des Centriols fehlt. Bedingt durch die kovalente Anknüpfung zahlreicher Acetyl- und Polyglutaminreste liegen die Mikrotubulitriplets innerhalb des Centrosoms sehr stabil vor und unterliegen nicht der für Mikrotubuli sonst typischen hohen Dynamik [119, 120]. Definiert und stabilisiert wird die neunfache radiale Symmetrie der Centriolen zunächst durch die sechsmalige Aufeinanderfolge einer sog. Wagenrad- (*cartwheel*)-Anordnung spezifischer Strukturproteine, lokalisiert im proximalen Teil der sich neu assemblierenden Centriolen. Die bedeutendste Strukturkomponente des Wagenrads stellt Sas6 dar. Dieses bildet Homodimere aus, wobei neun dieser Dimere über ihre benachbarten globulären N-Termini miteinander interagieren und so die Rad„nabe“ formen, während die C-terminalen parallelen *coiled coil*-Domänen nach außen zeigen und somit als Rad„speichen“ fungieren [121, 122]. Obwohl ansonsten nahezu identisch, verfügt das ältere Muttercentriol

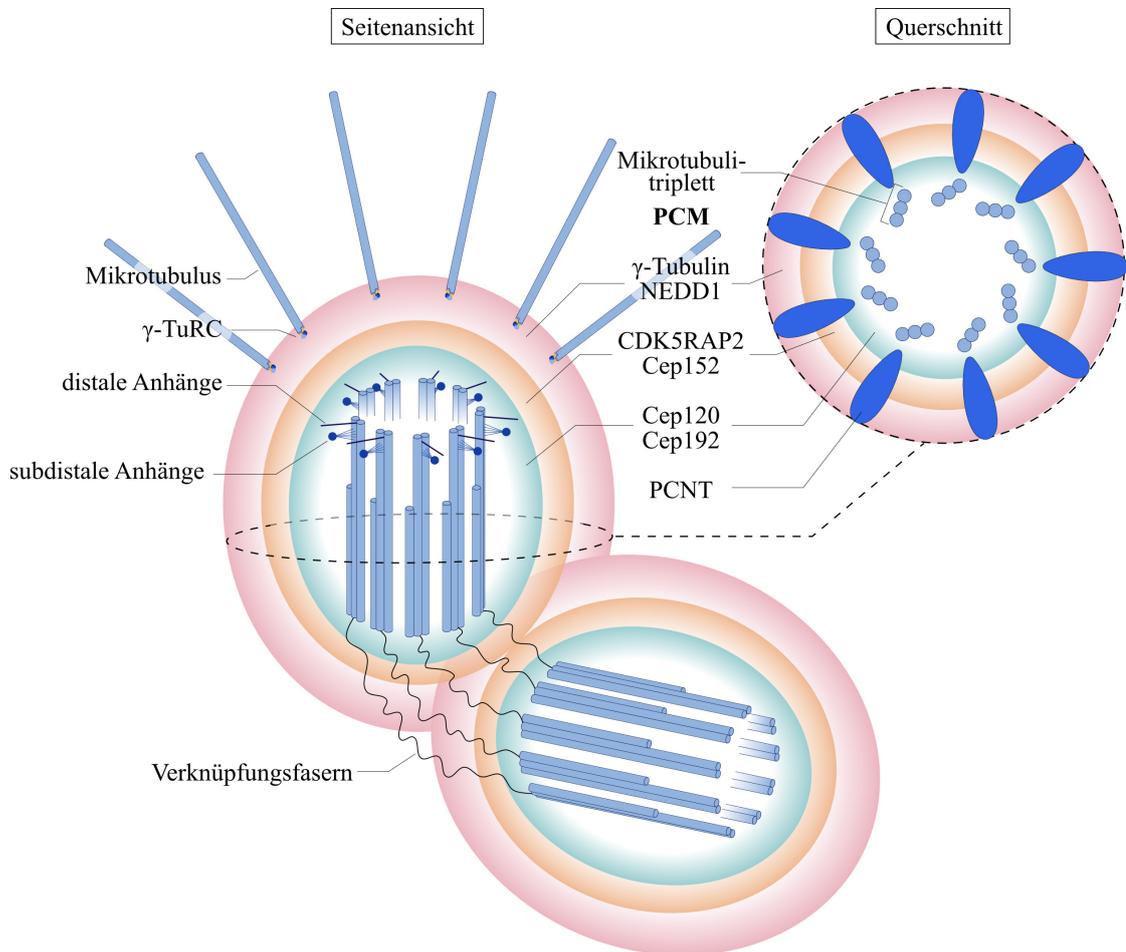


Abb. 5: Struktur des post-mitotischen Centrosoms von Wirbeltieren. Dargestellt ist ein Centrosom nach Entkopplung der Centriolen und vor Assemblierung neuer Procentriolen, Mutter- und Tochtercentriol sind voll ausgebildet und über Verknüpfungsfasern miteinander verbunden. Das die beiden Centriolen umgebende, elektronendichte pericentrioläre Material (PCM) weist eine deutliche Strukturierung auf: Centrosomale Komponenten wie Cep120, Cep192, Cep152, CDK5RAP2, NEDD1 und γ -Tubulin sind in einer sequentiellen, ringförmigen Konfiguration um die Centriolen lokalisiert. Das hierzu radial angeordnete Pericentrin (PCNT) durchspannt die PCM, indem sein C-terminales Ende auf das Centriol ausgerichtet ist und sein N-Terminus zur Peripherie hin zeigt. Abbildung modifiziert nach [292].

über zusätzliche distale und subdistale Anhänge, welche das Centrosom während der Ciliogenese in der Cytoplasmamembran einbetten bzw. der Verankerung von Mikrotubuli dienen [123, 124].

Zwar spielen die Centriolen eine entscheidende Rolle bei der Centrosomenduplikation, indem sie letztere als ein im Zellzyklusverlauf genau einmal stattfindendes Ereignis determinieren, für die Nukleation und Aufrechterhaltung der Mikrotubuli sind sie jedoch weitgehend verzichtbar [125, 126]. Vielmehr ist es die PCM, welche für einen Großteil der Mikrotubuli-organisierenden Aktivität des Centrosoms verantwortlich ist und die Assemblierung der Mikrotubuli initiiert sowie deren Anzahl, Polarität und Verteilung definiert [127]. Bis das neu-assemblierte Tochtercentriol während Mitose voll ausreift, ist der überwiegende Teil der PCM und somit auch die Fähigkeit zur Nukleation von Mikrotubuli mit dem Muttercentriol assoziiert. Das Tochtercentriol hingegen verbleibt bis zu Beginn der nächsten Zellzyklusrunde inaktiv [126, 128].

Aufgrund ihres einheitlichen Erscheinungsbildes in elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass die über hundert Proteinkomponenten der PCM ungeordnet und zufällig um die Centriolen lokalisiert werden. Unter Anwendung hoch-auflösender Mikroskopietechniken konnten neuere Untersuchungen an *Drosophila* S2- sowie humanen Zellen jedoch zeigen, dass die PCM-Komponenten vielmehr in hierarchisch aufeinanderfolgenden, ringförmigen Schichten um die Centriolen angeordnet sind [129, 130]. Eine besondere Funktion kommt hierbei dem riesigen (380 kDa) *coiled coil*-Protein Pericentrin (PCNT) zu, welches in einer langgestreckten Konformation vorliegt und dessen C-terminaler Bereich mit den Centriolen interagiert, während sich der N-Terminus zur Peripherie hin ausdehnt. Mit seiner die PCM durchspannenden Topologie fungiert PCNT möglicherweise als molekularer Anker, welcher funktionell nachgeschaltete PCM-Komponenten in hierarchischer Reihenfolge zunächst in unmittelbarer Nähe der Centriolen ringförmig assembliert und sie später in die Peripherie entlässt [130]. Dabei können zwei Gruppen von PCM-Proteinen beobachtet werden, welche sich hinsichtlich ihrer Dynamik und Funktion voneinander unterscheiden lassen. So bleiben beispielsweise Plk4 und Cep152 während des gesamten Zellzyklus eng mit dem

parentalen Centriol assoziiert und scheinen eine wichtige Rolle bei der Assemblierung und Aufrechterhaltung der PCM zu spielen. Dagegen werden PCNT, Cep192, CDK5RAP2, NEDD1 und γ -Tubulin zum überwiegenden Teil erst beim Eintritt in Mitose stabil in die periphere PCM integriert und sind hier für die Nukleation und Verankerung der Mikrotubuli von entscheidender Bedeutung [129]. Dabei bildet γ -Tubulin zusammen mit weiteren Proteinkomponenten eine kanonische ringförmige Struktur aus, die auch als γ -Tubulinringkomplex (γ -TuRC) bezeichnet wird. Mit seiner 13-fachen Symmetrie fungiert dieser Komplex während der Mikrotubulinukleation als Matrize, indem er die Zusammenlagerung der α/β -Tubulindimere zu einer röhrenförmigen Struktur bestehend aus 13 Protofilamenten forciert [131]. Gleichzeitig bedeckt er das (-)-Ende der entstehenden Mikrotubuli und verhindert somit deren Depolymerisation wie auch deren weiteres Auswachsen am (-)-Ende.

2.4.2 Der Centrosomenzyklus

Um die korrekte Segregation der Chromosomen zu gewährleisten, muss die Assemblierung neuer Centriolen streng kontrolliert werden, da überzählige Centrosomen in multipolaren Teilungen oder aber bipolaren Teilungen mit merotelischen Mikrotubuli-Anheftungen resultieren können [132]. Dabei erfolgt die Regulation der Centriolenzahl im Rahmen eines kanonischen Duplikationszyklus (siehe Abb. 6), welcher eng mit dem Chromosomenzyklus koordiniert wird. Beide sind durch charakteristische, mikroskopisch beobachtbare Ereignisse geprägt, die definierten Zellzyklusphasen zugeordnet werden können.

Während der meisten Zeit des Zellzyklus liegen Mutter- und Tochtercentriol in einer gekoppelten Konfiguration vor, d. h. beide Centriolen sind eng miteinander verbunden und orthogonal zueinander ausgerichtet. Erst während der späten Mitose kommt es im Zuge der Centriolenentkopplung zu einer Umorientierung beider Centriolen, wobei die enge physikalische Verknüpfung ihrer beider proximalen Enden verloren geht. Diese Entkopplung von Mutter- und Tochtercentriol ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Duplikation der Centrosomen in der späteren S-Phase [133, 134]. Hierfür werden zudem steigende Konzentrationen an Cdk2^{CyclinA/E} benötigt, wobei als molekulare Zielproteine der seitens Cdk2

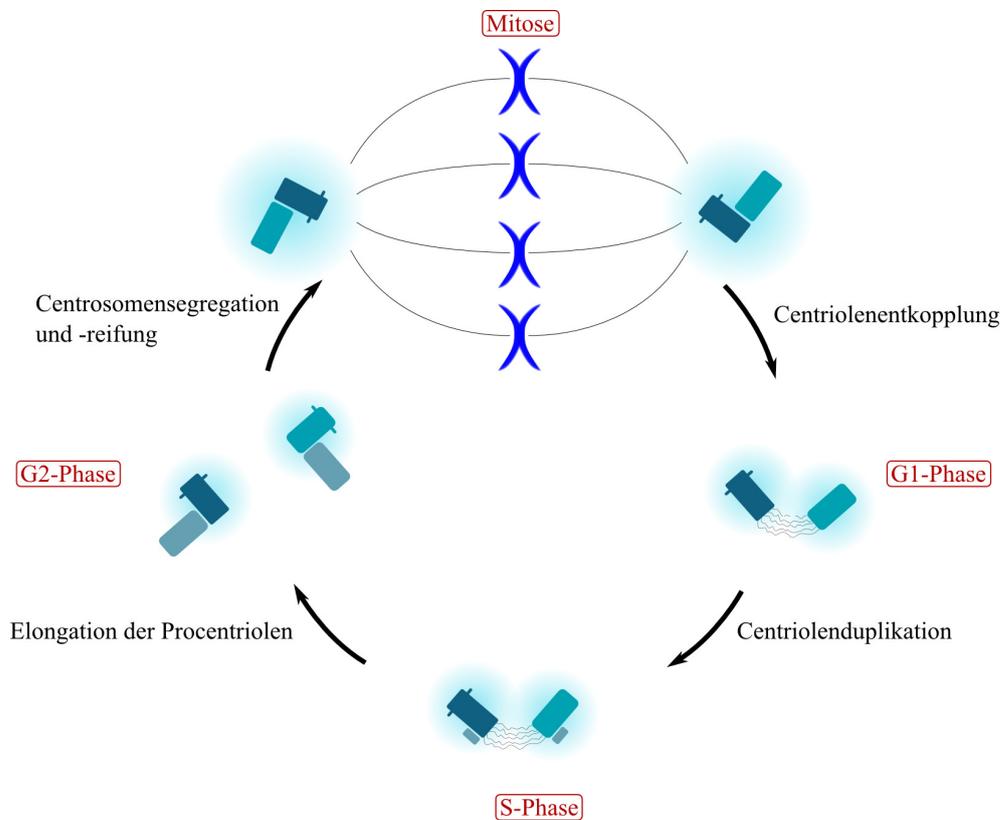


Abb. 6: Schematische Darstellung des kanonischen Centrosomenzyklus. Die Centrosomenduplikation beginnt mit der Entkopplung beider Centriolen eines Centrosoms am Ende der Mitose. Anschließend wird während der S-Phase $Cdk2^{CyclinE/A}$ -abhängig an jedem parentalen Centriol ein Procentriol ausgebildet, welches bis zum Beginn der G2-Phase stetig verlängert wird. Am Übergang der G2-Phase zur Mitose werden die Verknüpfungsfasern aufgelöst, welche bis dahin die beiden parentalen Centriolen lose miteinander verbunden haben. In der Folge separieren beide Centrosomen und reifen weiter aus. Während der Prophase bewegen sich beide Centrosomen weiter voneinander fort, bis sie schließlich in Metaphase an den sich gegenüber liegenden Seiten der kondensierten Chromosomen zu liegen kommen und hier die Assemblierung der bipolaren Spindel organisieren. Durch Auflösung der streng orthogonalen Anordnung von Mutter- und Tochtercentriol im Zuge der Centriolenentkopplung wird eine neue Runde des Centrosomenzyklus eingeleitet.

vorgenommenen Phosphorylierungsreaktionen das Chaperon Nucleophosmin sowie die Kinasen Mps1 und Plk1, 2 und 4 diskutiert werden [135–141]. In Komplex mit Cep152 und Cep192 lokalisiert letztere an das proximale Ende des Muttercentriols, genau dorthin wo das neue Procentriol auswachsen wird [142, 143]. Hier sorgt Plk4 für eine Stabilisierung von Sas6, welches zunächst im proximalen Lumen des parentalen Centriols akkumuliert und hier zu der sog. Wagenradstruktur inkorporiert wird [144–146]. In Abhängigkeit von Plk4 wird das Wagenrad anschließend wieder freigesetzt und an die Außenwand des Muttercentriols relokaliert, wo es als Matrix für das sich neu-assemblierende Procentriol fungieren kann [146]. Neben seiner Funktion bei der Stabilisierung der Wagenradstruktur ist Sas4 an der Rekrutierung der Mikrotubuli an dessen Rad,„speichen“ beteiligt, wobei die Nukleation des unidirektional auswachsenden A-Tubulus durch γ -Tubulin, die der sich bi-direktional ausdehnenden B- und C-Tubuli von δ - bzw. ϵ -Tubulin auszugehen scheint [147–150]. Das in engem Kontakt mit dem Muttercentriol stehende Procentriol erreicht seine vollständige Länge in G2-Phase, wo eine Anlagerung weiterer Tubulindimere durch die distale Bindung der *Capping*proteine CP110 und Cep97 unterbunden wird [151, 152].

Mit dem Übergang von G2-Phase in Mitose wird die Reifung der Procentriolen eingeleitet. Bedingt durch Aurora A- und Plk1-abhängige Phosphorylierungen akkumulieren sie PCM und erhalten somit die Fähigkeit, Mikrotubuli zu nukleieren [153, 154]. Zusätzlich bewirken beide Kinasen die Aktivierung einer dritten, der Nek2-Kinase [155, 156]. Letztere phosphoryliert mit C-Nap1 und Rootletin zwei Hauptkomponenten der Verknüpfungsfasern, welche bis dahin die proximalen Enden beider parentalen Centriolen lose miteinander verbanden [157, 158]. Nach deren Auflösung binden Mikrotubuli-abhängige Motorproteine (z. B. das Kinesin Eg5 sowie Dyneine) an anti-parallel ausgerichtete Astralmikrotubuli und verschieben die beiden Centrosomen solange gegeneinander, bis sie an gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns bzw. des Chromatins zu liegen kommen [159]. Prinzipiell existieren dabei zwei verschiedene Mechanismen zur Assemblierung der mitotischen Spindel. Während die Centrosomen in Prophase entlang der noch intakten Kernhülle manövriert werden können, erfolgt deren weitere Separierung nach Auflösung der Kernmembran in Prometaphase unter Einbeziehung von Kontakten zum

Zellkortex. Durch ortsspezifische Kontraktion und Relaxation desselben wird ein gerichteter kortikaler Fluss erzeugt, welcher die vollständige Segregation der Centrosomen zur Folge hat [160, 161]. Zur korrekten Ausbildung einer mitotischen Spindel werden also am Übergang von G₂-Phase zu Mitose die beiden Centrosomen einer Zelle separiert und dieser Prozess ist nicht mit der Entkopplung der beiden Centriolen innerhalb eines Centrosoms während der späten Mitose bzw. frühen G₁-Phase zu verwechseln.

Während der Metaphase liegen die Centrosomen voll ausgereift vor, verfügen also über ihre maximale Aktivität zur Assemblierung und Organisation von Mikrotubuli. Dies befähigt sie unter Mitwirkung der Kinetochore zum Aufbau eines funktionellen Spindelapparats. Infolge des proteolytischen Abbaus von Sas6 kommt es im proximalen Lumen des Tochtercentriols zur Disassemblierung der Wagenradstruktur, welche bis dahin die symmetrische Struktur des Centriols determinierte und fixierte [162]. Im Zuge der Prophase hat jedoch auch das Procentriol die Fähigkeit zur Rekrutierung von PCM erlangt und letztere leistet nun ihren Beitrag zur Stabilisierung des Centriols [163]. Spät in Mitose wird dann der enge Kontakt zwischen Mutter- und Tochtercentriol erneut gelöst und mit der Entkopplung beider Centriolen startet der Centrosomenzyklus in eine neue Runde.

2.4.3 Parallelen zwischen Chromosomen- und Centrosomenzyklus

Wie bereits angedeutet, ist eine enge Koordination zwischen Centrosomen- und Chromosomenzyklus außerordentlich wichtig, um die Entstehung multipolarer Spindeln oder fehlerhafter Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen zu verhindern. Zudem müssen beide Prozesse - Chromosomenreplikation und Centrosomenduplikation - exakt ein einziges Mal innerhalb des Zellzyklusverlaufs stattfinden. Während bei der DNA-Replikation die Rekrutierung der (noch inaktiven) replikativen Helikase an die Replikationsursprünge den kritischen Lizenzierungsschritt markiert, ist es im Rahmen des Centrosomenzyklus die Entkopplung der Centriolen, welches die genau einmalige Duplikation derselben in S-Phase erlauben soll. Wie für die Initiation der DNA-Synthese bereits erläutert, erfordert auch dieses Ereignis eine strenge Kontrolle, welche eine Centriolenüberduplikation und damit das Auftreten

überzähliger Centrosomen verhindern hilft.

Studien mit aufgereinigten Centrosomen inkubiert in *Xenopus*-Extrakten, lieferten einen ersten Hinweis darauf, dass möglicherweise die proteolytische Aktivität der Separase für die Entkopplung der Centriolen benötigt wird. So kann in Anwesenheit sowohl einer nicht-abbaubaren Securin- als auch einer stabilen CyclinB1-Variante die Trennung von Mutter- und Tochtercentriol unterbunden werden [133]. Über die Identität des potenziellen Separasesubstrats herrscht derzeit noch Uneinigkeit. Als erster möglicher Kandidat bietet sich natürlich die α -Kleisin-Untereinheit Scc1 des Cohesinringkomplexes an. Schließlich bewirkt dessen Separase-abhängige Spaltung auch die Trennung der Schwesterchromatiden am Übergang von Meta- zu Anaphase. Und tatsächlich legen einige Untersuchungen auch der hiesigen Arbeitsgruppe die Vermutung nahe, dass Cohesin die enge orthogonale Anordnung von Mutter- und Tochtercentriol aufrecht erhält und erst dessen proteolytische Spaltung die Entkopplung beider Centriolen ermöglicht [164, 165]. Untermauert wird diese These durch zahlreiche Studien, welche eine centrosomale Lokalisation diverser Cohesin-Untereinheiten verzeichnen konnten [166–170]. Da zumindest in *Drosophila* die Proteolyse von Scc1 für eine Trennung der Centriolen nicht ausreicht, wurden jedoch auch Vermutungen laut, dass möglicherweise nicht die Spaltung von Cohesin die Centriolenentkopplung vermittelt, sondern dass letztere vielmehr aus dem Zusammenwirken gegensätzlich gerichteter, von PCM und Cytoskelett ausgehender Kräfte resultiert [171]. Nach dieser Modellvorstellung werden die im gekoppelten Zustand eng beieinander liegenden Mutter- und Tochtercentriolen solange durch die PCM zusammengehalten, bis kortikale Mikrotubuli-abhängige Zugkräfte (möglicherweise bei gleichzeitiger Disassemblierung der PCM) für eine Trennung und Disorientierung derselben sorgen. Und tatsächlich wurde mit Pericentrin B (PCNTB)/Kendrin ein weiteres mögliches Separasesubstrat identifiziert, welches eine zentrale Funktion bei der Organisation der PCM übernimmt [172, 173]. Nach Proteolyse von PCNTB wird das resultierende C-terminale Fragment sehr schnell abgebaut, während der N-Terminus centrosomal lokalisiert bleibt. Erst dessen Freisetzung am Ende der Mitose hat, möglicherweise vermittelt durch eine partielle Auflösung der PCM, die Entkopplung von Mutter- und Tochtercentriol zur Folge [173]. Die Frage, wie die zeitliche Diskre-

panz zwischen Separase-abhängiger Substratproteolyse und Centriolenentkopplung überbrückt wird, wäre somit für PCNTB erklärbar, steht für den potenziellen Kandidaten Cohesin jedoch noch aus. Trotzdem ist es prinzipiell durchaus denkbar, dass beide Mechanismen, die proteolytische Spaltung von sowohl Cohesin als auch Pericentrin, für eine erfolgreiche Lizenzierung der Centrosomenduplikation benötigt werden, indem ihr Zusammenwirken eine möglichst effiziente Entkopplung von Mutter- und Tochtercentriol gewährleistet.

Interessanterweise existieren zahlreiche Untersuchungen, in denen für mehrere Regulatoren der DNA-Lizensierungsmaschinerie eine Doppelfunktion bei der Kontrolle sowohl der DNA-Replikation als auch der Centriolen-Duplikation beschrieben wird. So werden beispielsweise beide Prozesse in Gegenwart der Cycline E und A (in Komplex mit Cdk2) vorangetrieben. Des Weiteren weisen die ORC-Komponenten Orc1 und Orc2 eine centrosomale Lokalisierung auf und zumindest Orc1 scheint dort auch von funktioneller Bedeutung zu sein [174, 175]. So konnte nach siRNA-vermittelter Orc1-Depletion in den entsprechenden Zellen eine vorzeitige Entkopplung der Centriolen und die Überduplikation von Centrosomen beobachtet werden. In Anwesenheit von Hydroxyharnstoff (HU) kommt die DNA-Replikation durch Inhibition des Enzyms Ribonukleotidreduktase zum Erliegen. Da die Duplikation der Centrosomen jedoch ungehindert voranschreitet, kann auch im anhaltenden HU-induzierten S-Phase-Arrest eine Centrosomenüberduplikation festgestellt werden, ein Phänotyp der durch gleichzeitige Überexpression von Orc1 gerettet wird [175]. Ganz ähnlich verhält es sich mit Mcm5, einer Untereinheit der replikativen MCM-Helikase. In Abwesenheit von Mcm5 werden Centrosomen ebenfalls überdupliziert, wohingegen seine Gegenwart die im HU-induzierten S-Phase-Arrest auftretende Überduplikation von Centrosomen verhindert [176, 177]. Überraschenderweise wurden dieselben Phänotypen auch für den Negativregulator der Replikationslizenzierung Geminin beobachtet. Während seine Depletion in einer Centrosomenüberduplikation resultierte, konnte durch Überexpression von Geminin die Überduplikation von Centrosomen infolge eines HU-basierten Zellzyklusarrests unterbunden werden [178, 179]. Demnach unterscheiden sich die durch Geminin übernommenen Kontrollfunktionen im Rahmen der Centrosomenduplikation möglicherweise von denen bei der DNA-Lizensierung.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass einige der zentralen pre-RC-Komponenten eine wichtige Kontrollfunktion bei der semi-konservativen Verdopplung sowohl der DNA als auch der Centrosomen inne haben. Zudem wirken Faktoren der DNA-Lizensierungsmaschinerie zumindest während der frühen embryonalen Teilungen in *Xenopus* an der chromosomalen Rekrutierung von Cohesin mit, welchem ebenfalls eine wichtige centrosomale Funktion in der Verhinderung einer vorzeitigen Entkopplung beider Centriolen zukommt. Aus beiden Beobachtungen lässt sich somit die interessante Fragestellung ableiten, ob möglicherweise auch die Lokalisierung des Kopplungsfaktors Cohesin an die Centrosomen durch pre-RC-Komponenten bewerkstelligt wird. Zur Beantwortung dieser Frage eignet sich das Modellsystem *Xenopus laevis* im doppelten Sinne:

1. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Etablierung eines funktionellen pre-RCs und der chromosomalen Rekrutierung von Cohesin konnte bislang nur in *Xenopus* beobachtet werden, und so ist es nur logisch, eine solche, möglicherweise auch hinsichtlich der centrosomalen Cohesinrekrutierung bestehende Verbindung zunächst hier zu suchen.
2. Um die Relevanz einzelner pre-RC-Komponenten im Rahmen dieses Prozesses zu überprüfen, können die jeweiligen Faktoren relativ leicht aus *Xenopus*-Extrakten eliminiert werden. Die einzige essentielle Voraussetzung hierfür stellt die Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Antikörpern dar, welche zur spezifischen Immunpräzipitation des entsprechenden pre-RC-Faktors befähigt sind.

Der erste Teil dieser Dissertation widmete sich der Frage, ob an der Initiation der DNA-Replikation beteiligte Komponenten zumindest in *Xenopus laevis* nicht nur die chromosomale Rekrutierung von Cohesin vermitteln, sondern letzteres auch an die Centrosomen dirigieren und somit Chromosomen- und Centrosomenzyklus auf einer weiteren Ebene miteinander verknüpfen.

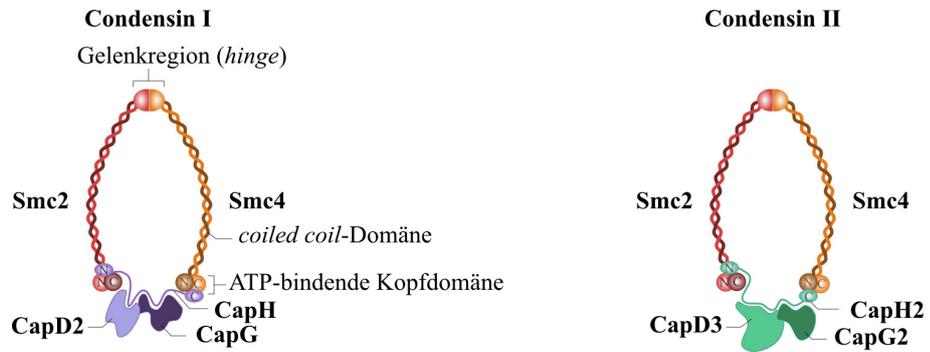
2.5 Die Einfluss von Condensin auf die strukturelle Organisation des eukaryotischen Chromatins

Um die gesamte genetische Information einer Mutterzelle auf die beiden neu entstehenden Tochterzellen verteilen zu können, werden die relaxierten und umeinandergeschlungenen interphasischen Chromatinfasern in kompakte, klar voneinander separierte Chromosomen überführt, welche später durch die Aktivität der mitotischen Spindel segregiert werden können. Ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Proteinkomplex namens Condensin ist für diesen Prozess der Chromosomenkondensation von zentraler Bedeutung. Zudem zeigen zahlreiche neuere Studien, dass Condensin auch an der strukturellen und funktionellen Organisation des interphasischen Chromatins beteiligt ist. Identifiziert wurden Condensine in allen bereits sequenzierten eukaryotischen Genomen und die allermeisten prokaryotischen Spezies scheinen ebenfalls über Condensin-homologe Komplexe zu verfügen [180–182], weshalb davon auszugehen ist, dass sich Condensine deutlich eher evolutionär etabliert haben als Nukleosomen, welche bekannterweise eine Hauptaufgabe bei der strukturellen Organisation des eukaryotischen Chromatins übernehmen.

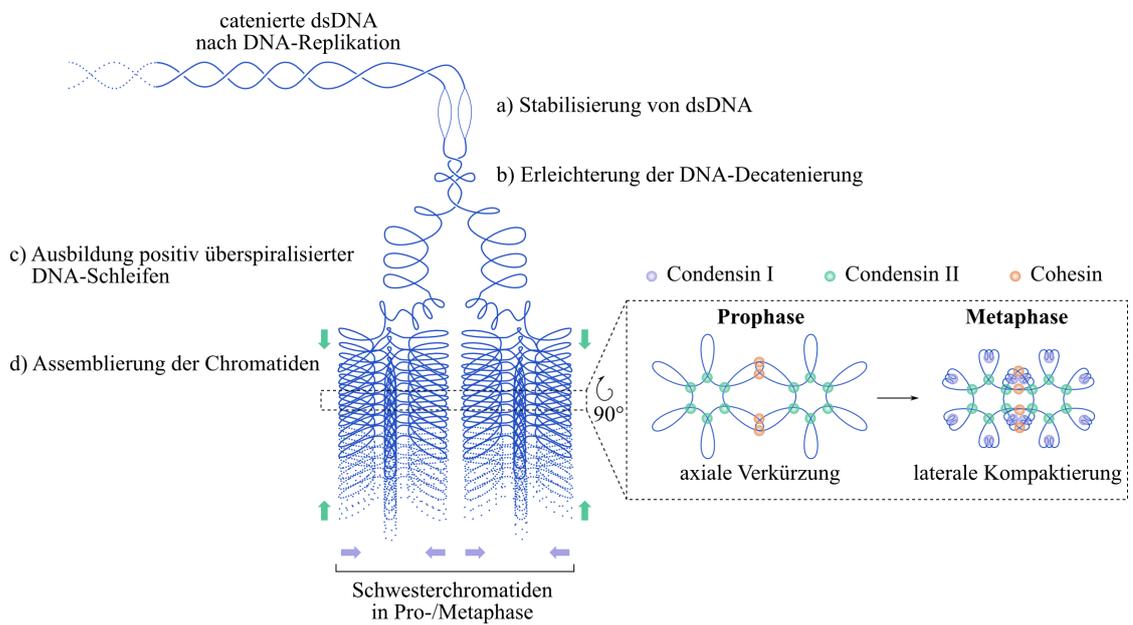
2.5.1 Zusammensetzung des Condensinringkomplexes

Wie im bereits besprochenen Cohesin sind auch im Condensinkomplex zwei Untereinheiten der SMC-Proteinfamilie zuzuordnen. Smc2 und Smc4 bestehen aus einem etwa 45 nm langen *coiled coil*-Bereich, welcher an einem Ende in eine ATPase-Kopfdomäne und am anderen Ende in die Gelenkregion übergeht (siehe auch Abb. 7A) [31]. Letztere vermittelt die Interaktion der beiden Smc-Untereinheiten, sodass diese ein V-förmiges Dimer ausbilden, an dessen beiden Enden die ATPase-Domänen lokalisiert sind. Durch die Assoziation zweier ATP-Moleküle können die Kopfdomänen miteinander in Wechselwirkung treten, was durch ATP-Hydrolyse wieder aufgehoben wird [183]. Da Mutationen in den Smc-Untereinheiten, welche die Bindung und/oder die Hydrolyse von ATP beeinträchtigen, letal sind, scheint dieser ATPase-Zyklus, obwohl nur unzureichend verstanden, für die Funktionalität von Condensin essentiell zu sein [184]. Auch wenn sie kein ATP gebunden haben, werden die ATPase-Kopfdomänen der beiden Smc-Untereinheiten durch ein β - oder γ -Kleisin verbrückt. Aus röntgenkristallografischen Analysen von Komple-

A



B



zen bestehend aus dem N- bzw. C-Terminus eines prokaryotischen Kleisins und der jeweiligen Smc-Kopfdomäne kann geschlussfolgert werden, dass durch eine im N-Terminus des Kleisins lokalisierte α -helikale Domäne und den *coiled coil*-Bereich der Smc-Untereinheit in unmittelbarer Nähe der ATPase-Domäne eine Tripelhelix ausgebildet wird, während zwischen der C-terminalen *winged helix*-Domäne (WHD) des Kleisins und der ATPase-Kopfdomäne der zweiten Smc-Untereinheit eine direkte Interaktion besteht [185]. Sehr wahrscheinlich ist diese asymmetrische Art der Bindung im eukaryotischen Condensinkomplex erhalten geblieben. Zusätzlich werden vermittelt durch die Kleisin-Untereinheit zwei weitere regulatorische Proteine an den Komplex rekrutiert. Diese beinhalten mehrere sog. HEAT-*Repeats*, mittels derer Protein-Protein-Interaktionen ausgebildet werden können [186]. Die meisten mehrzelligen Organismen verfügen über zwei verschiedene Condensinkomplexe, die sich anhand der assoziierten regulatorischen Untereinheiten voneinander unterscheiden lassen. Condensin I enthält das γ -Kleisin CapH, sowie die beiden HEAT-*Repeat*-Untereinheiten CapD2 und CapG. Das β -Kleisin CapH2 in Komplex mit den beiden HEAT-*Repeat*-Proteinen CapD3 und CapG2 werden in Condensin II gefunden [187, 188].

Abb. 7 (vorhergehende Seite): Aufbau und Funktionsweise von Condensin. A) Zusammensetzung des Multiproteinringkomplexes Condensin. In Vertebraten existieren zwei verschiedene Condensinkomplexe, die sich hinsichtlich ihrer regulatorischen Untereinheiten voneinander unterscheiden lassen. In Condensin I sind dies CapH, CapD2 und CapG, in Condensin II CapH2, CapD3 und CapG2. B) Mögliches Modell zur molekularen Wirkungsweise von Condensin I und II. Die Reannealingaktivität stellt das Vorliegen von dsDNA als Voraussetzung für weitere konformationelle Änderungen sicher (a). Die Einführung von positiv überspiralisierten Windungen in die umeinander gewundenen Schwesterchromatiden unterstützt deren Topo II-abhängige Dekatenierung, sodass sie später erfolgreich segregiert werden können (b). Durch weitere Condensin-vermittelte positive Überspiralisierung werden in beiden Schwesterchromatiden chirale Chromatinschleifen ausgebildet (c), was eine Voraussetzung für die geordnete Aufwindung der Chromatinfasern darstellt (d). Möglicherweise werden hierbei durch Interaktion mehrerer Condensinkomplexe die Achsen beider Schwesterchromatiden definiert. Zusätzlich ist eine Ansicht der aufgefalteten Schwesterchromatiden von oben dargestellt. Während Cohesin die beiden Schwesterchromatiden miteinander verknüpft, wirken die beiden Condensinkomplexe innerhalb eines DNA-Moleküls. Dabei sorgt das bereits in Prophase im Kern lokalisierte Condensin II für eine axiale Verkürzung der Chromatiden (grüne Pfeile/Kreise), während das erst später Chromatin-assoziierte Condensin I die ausgebildeten Chromatinschleifen lateral kompaktiert (violette Pfeile/Kreise). Beide Aktivitäten sind für die Ausbildung kompakter metaphasischer Chromosomen von essentieller Bedeutung. Abbildung modifiziert nach [180].

2.5.2 Lokalisation und molekularer Wirkmechanismus von Condensin

Seiner Funktion bei der Strukturierung und Organisation des mitotischen Chromatins entsprechend wird Condensin während der Mitose an Chromosomen lokalisiert, wobei sich die beiden verschiedenen Condensinkomplexe jedoch hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens unterscheiden. Condensin I ist während der Interphase cytoplasmatisch lokalisiert, erhält erst nach Auflösung der Kernhülle in der Prometaphase Zutritt zum Chromatin und bleibt bis zum Ende der Anaphase daran gebunden. Dagegen zeigt Condensin II bereits in Interphase eine deutliche Kernlokalisation und assoziiert ab der frühen Prophase bis zum Ende der Mitose mit den Chromosomen [187–190]. In der Immunfluoreszenzfärbung weisen die beiden Komplexe entlang der Chromosomenarme und an den Centromeren ein alternierendes Bindungsverhalten auf, sodass angenommen werden muss, dass beide Condensine unabhängig voneinander mit verschiedenen chromosomalen Bereichen interagieren [190]. Zudem zeigt Condensin II eine deutlich stabilere Chromatinassoziation als Condensin I [191]. Diese Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation und der Kinetik legen die Vermutung nahe, dass beide Condensinkomplexe verschiedene, jeweils essentielle Funktionen bei der Ausbildung mitotischer Chromosomen übernehmen. Mit Hilfe von Depletionsexperimenten in *Xenopus* und Hühner-DT40-Zellen konnte gezeigt werden, dass Condensin II an der axialen Verkürzung der Chromosomenarme beteiligt ist, wohingegen Condensin I die laterale Kompaktierung der Chromatinschleifen in Metaphase zu vermitteln scheint (vgl. Abb. 7B) [192, 193].

Der molekulare Wirkmechanismus der beiden Condensinkomplexe ist bislang weitgehend unverstanden. Studien an Minichromosomen von *S. cerevisiae* lassen vermuten, dass Condensin - ganz ähnlich dem Cohesin - doppelsträngige DNA topologisch umschließt [194]. Während Cohesin hierbei zwei verschiedene DNA-Moleküle, nämlich die beiden Schwesterchromatiden, zusammenhält, könnte Condensin unterschiedliche Segmente innerhalb eines DNA-Strangs verbrücken und somit dessen Topologie beeinflussen. Bereits ein aus Smc2 und Smc4 bestehendes Dimer ist zur stabilen Interaktion mit DNA befähigt, wobei eventuell vorliegende einzelsträngige Bereiche in dsDNA überführt werden (siehe auch Abb. 7B) [50, 195, 196]. Diese sog. *Re-Annealing*-Aktivität des Condensins ist unabhängig

von ATP und stellt möglicherweise eine wichtige Voraussetzung für weitere, darauf aufbauende Konformationsänderungen der DNA dar. Experimentell sehr gut charakterisiert ist die Fähigkeit von Condensin I zur Einführung positiv überspiralisierter Windungen in dsDNA. Diese Aktivität konnte sowohl *in vitro* anhand von isolierten DNA-Plasmiden als auch in *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *Xenopus* nachgewiesen werden und erfordert im Gegensatz zu der des *Re-Annealings* die Gegenwart des gesamten Condensinkomplexes sowie die von ATP [197–200]. Zudem ist Condensin I befähigt, solche überspiralisierten DNA-Schleifen in eine geordnete Solenoid-Konformation zu überführen [201]. Für die Einführung überspiralisierter Windungen in dsDNA ist die Aktivität mehrerer Condensinkomplexe vonnöten, durch deren Wechselbeziehungen die initiale Condensin-DNA-Interaktion möglicherweise stabilisiert wird [187, 202]. Ein weiterer Effekt der durch Condensin herbeigeführten DNA-Überspiralisierung wurde im Rahmen von *in vitro*-Studien nachgewiesen. Demnach können positiv überspiralisierte und katenierte DNA-Plasmide sehr viel effizienter durch Topoisomerase II aufgelöst werden als solche, die zwar kateniert jedoch nicht überspiralisiert vorliegen [203]. Diese Beobachtung konnte kürzlich auch *in vivo* bestätigt werden, wobei die Bedeutung von Condensin für die vollständige Auflösung von DNA-Katenanen mit zunehmender Chromosomengröße stärker zutage trat [204]. Die Condensin-vermittelte Ausbildung positiv überspiralisierter DNA-Windungen stellt somit eine wichtige Voraussetzung für die Assemblierung höher geordneter Chromatinkonformationen in der Pro- und Metaphase dar und ermöglicht gleichzeitig eine erfolgreiche Separation und Segregation der Schwesterchromatiden in der Anaphase.

2.5.3 Rekrutierung und Regulation des eukaryotischen Condensins

Ein ebenfalls wichtiger, jedoch bislang nur unzureichend aufgeklärter Aspekt der Funktionalität von Condensin betrifft dessen Rekrutierung an chromosomale DNA. Dabei ist zwischen zwei möglichen Szenarien zu unterscheiden: Condensinkomplexe könnten entweder direkt spezifische DNA-Sequenzelemente oder passende Chromatinbereiche erkennen und daran binden, oder aber zusätzliche Rekrutierungsfaktoren übernehmen diese Aufgabe und dirigieren Condensin an die DNA. Zumindest in *S. cerevisiae* scheinen beide Mechanismen parallel abzulaufen. Zum

einen vermittelt auch hier der im Zusammenhang mit der Cohesinrekrutierung bereits erwähnte Scc2/Scc4-Komplex die Assoziation von Condensin mit der DNA, wobei der Kollerinkomplex selbst zumindest teilweise durch den Transkriptionsfaktor TFIIC gebunden wird [58]. Als weitere Rekrutierungsfaktoren wurden in Hefe das an sog. *Replication Fork Barrier* (RFB)-Stellen am 3'-Ende von rDNA-Genen bindende Protein Fob1, das mit Topoisomerase I-interagierende Protein Tof2 sowie die Monopolin-Untereinheiten Csm1 und Lrs 4 identifiziert [205]. Neuere Studien zeigen zudem, dass die in den regulatorischen Untereinheiten CapD2 und CapG (in *S. cerevisiae* Ycs4 und Ycg1) enthaltenen HEAT-*Repeats* eine direkte Interaktion mit der DNA eingehen können, wodurch die ATPase-Aktivität in den Smc-Untereinheiten stimuliert wird [206]. Analog zum Rekrutierungsmechanismus von Cohesin (wo der Scc2/Scc4-Komplex die stimulatorische Funktion der ATPase-Aktivität in Smc1 und Smc3 übernimmt [48]) resultiert dies möglicherweise in einer Öffnung des Condensinrings, sodass Chromatinfasern topologisch umschlossen werden können.

In höheren Eukaryoten scheint die chromosomale Assoziation von Condensin über die Bindung an Histonkomponenten vermittelt zu werden. Hierbei spielen posttranslationale Modifikationen sowohl an den Condensin-Untereinheiten als auch an den Histonproteinen eine maßgebliche Rolle. Beispielsweise wird die Interaktion zwischen der Condensin I-Untereinheit CapH und dem Histon H2A sehr wahrscheinlich über elektrostatische Wechselwirkungen des phosphorylierten und damit negativ geladenem N-Terminus des γ -Kleisins und dem positiv geladenen N-terminalen Histonschwanz ausgebildet [207]. In einer weiteren Studie in humanen Zellen konnte eine Interaktion zwischen den regulatorischen Condensin II-Untereinheiten CapD3 und CapG2 mit dem N-Terminus des Histons H4 nur unter der Voraussetzung festgestellt werden, dass letzterer an einem spezifischen Lysinrest methyliert vorlag [208].

Die chromosomale Rekrutierung und funktionelle Aktivität der Condensinkomplexe wird durch ein vielschichtiges regulatorisches Netzwerk kontrolliert. So wird durch das Zusammenspiel von inhibitorischen Phosphorylierungen seitens Caseinkinase 2, einer niedrigen Cdk1-Aktivität und Kernexport Condensin I während der

Interphase in einem inaktiven Zustand gehalten [190, 209]. Neben der Entfernung der inhibitorischen Phosphatreste und der Auflösung der Kernmembran bedarf es zu dessen Aktivierung spezifischer, Cdk1^{CyclinB}-vermittelter Phosphorylierungsreaktionen [198, 210]. Diese Phosphorylierungen sind zur Stimulation der Condensinfunktionalität notwendig, jedoch nicht hinreichend. Erst durch weitere kooperative Phosphorylierungen seitens *Polo-like kinase* (PLK) und Aurora B-Kinase wird eine vollständige Condensin I-Aktivität erreicht [198, 207, 211–213]. Sehr wahrscheinlich wird Condensin II früher aktiviert als Condensin I. Mit Beginn der Prophase werden hierzu mehrere Cdk1^{Cyclin A}-abhängige Phosphorylierungsreaktionen benötigt, welche später durch solche seitens Cdk1^{Cyclin B} und PLK ergänzt werden [190, 214, 215]. Um nach Segregation der Schwesterchromatiden deren Dekondensation zu ermöglichen, müssen die beiden Condensinkomplexe am Ende der Anaphase wieder deaktiviert werden, was in *S. cerevisiae* durch Cdc14-, in höheren Eukaryoten durch PP2A-vermittelte Dephosphorylierungsreaktionen bewerkstelligt wird [216–218].

2.6 Möglichkeiten und Grenzen des somatischen Kerntransfers

Lange Zeit galt in der Entwicklungsbiologie die feste Gewissheit, dass Zellen, die einmal einen bestimmten Differenzierungsweg eingeschlagen haben, gleichzeitig ihre Fähigkeit verlieren, in ihren nach allen Seiten offenen, pluripotenten Ursprungszustand zurückzukehren, geschweige denn, dass sie die Gestalt und Funktion eines gänzlich anderen Zelltyps annehmen könnten. Erst die um 1960 seitens J. B. Gurdon durchgeführten Kerntransferexperimente im damals relativ neu etablierten Modellsystem *Xenopus laevis* führten zu einem langsamen Umdenken und wurden folgerichtig 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie honoriert. In seinen initialen Experimenten isolierte Gurdon die Zellkerne von Darmepithelzellen aus *Xenopus*-Kaulquappen und injizierte diese in Metaphase II-arretierte Eier, in denen die enthaltene DNA zuvor mittels UV-Bestrahlung zerstört worden war [219]. Interessanterweise hatte das UV-Licht einen weiteren günstigen Nebeneffekt, denn es führte zu einer teilweisen Denaturierung der die Eier umgebenden Gallerthülle und ermöglichte so das Eindringen der Glaspipette beim

Einbringen des somatischen Donorzellkerns. (In heutigen Experimenten wird diese Gallertschicht üblicherweise unter Einwirkung einer mild-alkalischen Cystein-Lösung entfernt, diese Methode war damals jedoch noch unbekannt.) Aus einigen wenigen der so behandelten Eizellen entwickelten sich unauffällige Kaulquappen und adulte Frösche, die Kerne der Darmepithelzellen konnten also erfolgreich „reprogrammiert“ werden. Ihre Nachkommen waren nicht länger auf die entodermale Entwicklungslinie beschränkt, sondern hatten die Fähigkeit erlangt, verschiedene Phänotypen anzunehmen und die damit einhergehenden Zellfunktionen zu erfüllen. Die überwiegende Mehrheit der so „befruchteten“ Eizellen (98,5 %) wiesen jedoch bereits während der frühen Teilungen Anomalien auf und gingen in Apoptose über. Die Ursachen der geringen Effizienz solcher Kerntransferexperimente ist sehr wahrscheinlich in dem Konflikt zu sehen, der zwischen cytoplasmatischen Komponenten der Eizelle und Kern-assoziierten Faktoren des Donorzellkerns ausgefochten werden muss. Denn während der frühen Embryonalphase stellt die DNA-Replikation den kritischen und zeitlimitierenden Schritt dar und so ist dann auch das Cytoplasma der Eizelle speziell darauf ausgelegt, das hoch-kondensierte und spezialisierte Chromatin einer natürlicherweise für die Befruchtung sorgenden Spermienzelle schnell zu entpacken und für die sich unmittelbar anschließende erste Replikationsrunde zu aktivieren. Dieselben Komponenten ermöglichen zwar auch die Aktivierung eines somatischen Zellkerns, doch ist dieser mit fortschreitender Differenzierung hierfür zunehmend unempfindlicher. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer Resistenz des Donorzellkerns gegenüber dem reprogrammierenden Potenzial der Eizelle. Spezielle, mit dem Donorzellkern mitgelieferte Komponenten stabilisieren dessen ausdifferenziertes Entwicklungsstadium und verhindern eine Rückführung in einen weniger spezialisierten Zustand. Dies ist auch durchaus sinnvoll, denn eine allzu leichte Umkehr in einen quasi-embryonalen Zustand würde die Entstehung von Tumoren und anderen Defekten begünstigen.

Da sie die Möglichkeit bietet, autologe Stammzellen für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke zu gewinnen, eröffnet die Reprogrammierung somatischer Zellen jedoch auch gänzlich neue Perspektiven in der medizinischen Forschung und Praxis. So generierte Stammzellen stimmen in ihren genetischen Merkmalen mit denen des zu therapierenden Patienten nahezu überein und darum wäre es einer-

seits vorstellbar, die Erkrankung des Patienten und mögliche Therapieansätze „im Reagenzglas“ zu simulieren. Des Weiteren würden derart erzeugte und zu Therapie Zwecken eingebrachte Zellen oder Gewebe eine hohe Immunkompatibilität zum Empfängerorganismus aufweisen, womit sich viele, der im Zuge heterologer Transplantationen auftretenden Komplikationen vermeiden ließen. Insbesondere könnte die bislang notwendige dauerhafte Verabreichung von Immunsuppressiva unnötig oder zumindest verringert und der bisherige Mangel an verfügbaren Transplantaten ausgeglichen werden. Bedingt durch die Fähigkeit geklonter Stammzellen, sich in Tumorzellen umzuwandeln, bergen Stammzelltherapien jedoch ein bis zum heutigen Zeitpunkt nicht kalkulierbares Risiko, welches es vor ihrer breiten Anwendung in der medizinischen Praxis zu beheben gilt.

2.6.1 Epigenetische Faktoren mit Einfluss auf die Resistenz des Donorzellkerns

Durch die Enzymfamilie der DNA-Methyltransferasen (Dnmts) wird die 5'-Position eines Cytosinrests methyliert, wobei die Methylierung zumeist innerhalb von CpG-Dinukleotiden auftritt [220]. Dicht aufeinanderfolgende CpG-Nukleotidwiederholungen werden auch als CpG-Inseln bezeichnet und durchziehen das gesamte eukaryotische Genom. Dabei ist die Methylierung solcher, in Promotorbereichen lokalisierter CpG-Inseln eng mit einer Inaktivierung der Genexpression assoziiert, denn durch die Assemblierung Methyl-CpG-bindender Proteine werden weitere Faktoren an die Promotorregion rekrutiert, welche die Initiation der DNA-Transkription hemmen [221]. Unmittelbar nach Befruchtung wird das DNA-Methylierungsprofil sowohl des Oozyten- als auch des Spermiengenoms gelöscht und im Laufe einer zunehmenden Zelldifferenzierung werden später zahlreiche zelllinienspezifische Methylierungsmuster *de novo* eingeführt. Im Unterschied zum Genom von Keimzellen wird der Methylierungszustand somatischer Zellkerne sehr stabil gehalten und wirkt sich deshalb negativ auf deren Reprogrammierbarkeit aus [222, 223]. Nach Depletion der DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1) wird die Effizienz von Kerntransferexperimenten deutlich gesteigert [224]. Somit kommt der DNA-Demethylierung im Rahmen der Reprogrammierung somatischer Kerne eine Schlüsselfunktion zu, indem sie die transkriptionelle Genreaktivierung reprimierter Gene sicherstellt.

Allerdings ist bislang noch unklar, ob hierbei tatsächlich die aktive Entfernung von Methylresten z. B. durch Hydroxylierung methylierter Cytosine durch sog. TET(*ten-eleven translocation*)-Enzyme benötigt wird oder ob deren allmählicher passiver Verlust infolge mehrerer aufeinanderfolgender Zellteilungen ausreichend ist [225].

Auch eine zu starke Verpackung des Chromatins wirkt sich negativ auf die Reprogrammierbarkeit eines somatischen Zellkerns aus. Auf erster Ebene der DNA-Kompaktierung wird der doppelsträngige DNA-Faden um Nucleosomen gewunden [226]. Die Enzymfamilie der sog. „*Nucleosome Remodeling*“-ATPasen interagiert mit DNA und Histonkomplexen und beeinflusst durch ATP-vermittelte Konformationsänderungen deren wechselseitige Interaktion. So können Nucleosomen ganz oder teilweise vom Chromatin entfernt, einzelne Histonvarianten gegeneinander ausgetauscht, Nucleosomen neu an der DNA assembliert oder aber Histonoktameren entlang der DNA verschoben werden. Die Mobilisierung und Reorganisation von Nucleosomen wird für eine effiziente Reprogrammierung somatischer Zellkerne dringend benötigt, um regulatorischen Transkriptionsfaktoren Zugang zu ihren jeweiligen genomischen Zielsequenzen zu verschaffen [227]. In erfolgreichen Kerntransfers markiert eine starke Volumenzunahme des Donorzellkerns um das 10- bis 30-fache die Dekondensation des Chromatins, welche von der Synthese neuer Gentranskripte und der gesteigerten Mobilität chromosomal assoziierter Proteine begleitet wird [228, 229]. In Oocyten sind bislang zwei, die Chromatindekondensation wesentlich beeinflussende Faktoren bekannt. Dies ist zum einen das Histonchaperon Nucleoplasmin und zum anderen eine Oocyten-spezifische Histon H1-Variante (B4 in Amphibien bzw. H1oo in Säugern) [230–232]. In *Xenopus* erfolgt deren vollständige Inkorporation unmittelbar nach Kerntransplantation innerhalb weniger Stunden und ist für die Aktivierung Pluripotenz-vermittelnder Gene essentiell [229]. Möglicherweise stellt diese spezielle Histon H1-Variante eine wichtige Voraussetzung für eine „offene“ Chromatinstruktur dar, sodass seitens der Oocyte bereitgestellte Transkriptionsaktivatoren Zugang zu Genen erhalten, die in somatischen Zellen üblicherweise reprimiert werden. Dieses durch die Oocyte vermittelte „Öffnen“ des Chromatins scheint globale Auswirkungen zu haben, denn auch zahlreiche zelllinienspezifische Gene können je nach Ursprung des transferierten somatischen

Zellkerns bereits in einem sehr frühen Stadium der Embryonalentwicklung reaktiviert werden. Beispielsweise wird die Expression von Muskel-spezifischen Genen in Zellen der neuroektodermalen und endodermalen Entwicklungslinie fortgesetzt, wenn der zu reprogrammierende Zellkern einer Muskelzelle entsprang [233]. Es ist durchaus denkbar, dass das epigenetische Gedächtnis solcher inadäquat aktivierten Gene mit der eingeschlagenen Differenzierungsrichtung interferiert und ebenfalls zur geringen Effizienz von Kerntransplantationsexperimenten beiträgt.

Die im N-terminalen Bereich der Histonproteine vorliegenden Lysinreste werden durch vielfältige posttranslationale Mechanismen modifiziert, welche einerseits die ionische Ladung des Histonschwanzes und damit die Bindung zwischen Histon und DNA beeinflussen und andererseits als Bindestelle für regulatorische Proteine fungieren können. In Säugerzellen sind zahlreiche Histonmodifikationen bekannt, welche die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, ADP-Ribosylierung und Biotinylierung der einzelnen Histon-Untereinheiten beinhalten und in ihrer Gesamtheit ein immenses kombinatorisches Spektrum ergeben, weshalb in diesem Zusammenhang oft von einem „Histoncode“ die Rede ist. Durch Acetylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten durch Histonacetyltransferasen (HATs) wird die positive Ladung der Lysinseitenkette neutralisiert, was gemeinhin mit einer Schwächung der Interaktion zwischen Histon und DNA und bedingt durch die sich ergebende verbesserte DNA-Zugänglichkeit beispielsweise für Transkriptionsfaktoren mit einer Aktivierung des entsprechenden DNA-Segments in Verbindung gebracht wird [234]. Die entgegengesetzte Reaktion der Histondeacetylierung geht mit der Repression von Genen in differenzierten Zellen einher. In diesem Zusammenhang ist es zu verstehen, warum durch Inhibition von Histondeacetylase die Effizienz von Kerntransferexperimenten deutlich verbessert werden kann [235, 236]. Im Unterschied zur Acetylierung wirkt sich die Methylierung von Histonen nicht durch die veränderte Ladung des Proteins aus, sondern ihr Einfluss auf die Genexpression beruht auf der Rekrutierung spezifischer Chromatinbindender Faktoren [237]. Während die Di- bzw. Trimethylierung von Histon H3 an Position 4 (H3K4me_{2/3}) einen positiven Effekt auf den Kerntransfer haben, ist die Dimethylierung an Position 9 (H3K9me₂) mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber der Reprogrammierung assoziiert, sodass nach Expression der entsprechenden

Demethylase bessere Erfolge erzielt werden können [238–240]. Die Histonvariante macroH2A wird nach Stilllegung bestimmter Gene inkorporiert und deshalb mit der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin in Verbindung gebracht [241]. Nach Depletion von macroH2A in Fibroblasten aus Mäuseembryonen gestalten sich nachfolgende Kerntransfers in *Xenopus*-Oocyten sehr viel effizienter [242]. Es wird angenommen, dass macroH2A in Kombination mit weiteren Faktoren den reprimierten Zustand von Genen in somatischen Zellen aufrechterhält und so zur Resistenz des Donorzellkerns gegenüber der Reprogrammierung beiträgt. Als mögliche Mechanismen kommen hierbei die Inhibition der Histonacetylierung, die Rekrutierung von Histondeacetylasen oder eine negative Rückkopplung mit Transkriptionsfaktoren in Frage [243–245].

2.6.2 Der Einfluss von Mitose auf die Effizienz des Kerntransfers

Wie bereits erwähnt, weist ein Großteil der aus Kerntransplantation resultierenden Embryonen Anomalien auf. Beispielsweise werden während der ersten Furchungsteilungen sehr häufig Embryonen beobachtet, deren eine Hälfte einem normal entwickelten Blastomer entspricht, deren andere Hälfte sich jedoch nicht geteilt hat [246]. Es wird vermutet, dass in solchen Fällen die Zeit bis zur ersten Furchungsteilung für eine vollständige DNA-Replikation des somatischen Kerngenoms nicht ausreichend ist. Während eine der resultierenden Blastomere den sich replizierenden Zellkern erhält, wo die DNA-Synthese vervollständigt wird und sich weitere Teilungen anschließen, bekommt die andere keine DNA und teilt sich nicht weiter. Üblicherweise sterben solche Embryonen kurz vor oder während der Gastrulation ab. Wird der Kern eines solchen Zweizellembryos jedoch entnommen und einem erneuten Kerntransfer in ein zuvor entkerntes Ei unterzogen, so entwickeln sich hieraus unauffällige Embryonen und adulte Tiere. Die Erfolgsquoten solcher serieller Transfers sind sogar sehr viel höher als die einer einmaligen Kerntransplantation [246]. Als mögliche Erklärung für diese Beobachtung wurde lange angenommen, dass die sich unmittelbar an die Kerntransplantation anschließende DNA-Replikation während der ersten S-Phase den kritischen und zeitlimitierenden Schritt darstellt. Indem sich der somatische Kern der nachfolgenden, ersten mitotischen Teilung entzieht, erhält er genügend Zeit, die initiale Verdopplung seines

Genoms zu vollenden. Hat ein somatischer Kern einmal erfolgreich diesen ersten kritischen Zellzyklus nach Kerntransfer durchlaufen, scheinen nachfolgende Zyklen keine Schwierigkeiten mehr zu bereiten, sodass sich nach einem zweiten Transfer normale Tiere entwickeln können.

Eine durch Lemaitre u. a. [247] vorgelegte Studie legt allerdings die Vermutung nahe, dass sich die höheren Erfolgsaussichten eines seriellen Transfers möglicherweise nicht allein mit dem größeren Zeitfenster zur Vervollständigung der ersten DNA-Replikationsrunde erklären lassen. Lemaitre u. a. [247] verglichen das Replikationspotenzial von ausdifferenzierten *Xenopus*-Erythrocytenkernen mit dem von Spermienkernen und erwartungsgemäß verlief die Verdopplung der DNA in Erythrocytenkernen sehr viel langsamer und ineffizienter als die in Spermienkernen. Erstaunlicherweise erlangten erstere jedoch die Fähigkeit zur schnellen und effizienten DNA-Synthese, wenn sie zuvor in einem mitotischen Extrakt vorinkubiert worden waren. Dabei wurde nicht nur eine insgesamt schnellere Replikation der DNA beobachtet, sondern letztere war auch sehr viel häufiger initiiert worden. Demnach schien der mitotische Extrakt in der Lage zu sein, das Chromatin eines ausdifferenzierten, somatischen Zellkerns sowohl strukturell als auch funktionell an die Erfordernisse einer schnellen und effizienten DNA-Replikation anzupassen. In einer solchen mitotischen Umgebung findet sich auch der unvollständig replizierte somatische Zellkern eines Zweizellembryos während der ersten Furchungsteilung wieder, vermutlich unterstützen erst jetzt aktive Komponenten auch dessen chromosomale Restrukturierung, was eine erfolgreiche Passage der sich anschließenden Zellzyklusrunde gewährleistet.

Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass das Chromatin eines somatischen Zellkerns nach Vorinkubation in mitotischem Extrakt schneller und effizienter repliziert werden kann, ist in Abbildung 8 modellhaft dargestellt. Die frühen embryonalen Zellzyklen in *Xenopus* setzen sich aus überlappenden S- und M-Phasen zusammen, die *Gap*-Phasen fehlen. Das Chromatin eines Zellkerns ist über sog. Matrix-assoziierte Regionen (MARs) an das proteinhaltige Kerngerüst verankert. Diese Kontakte sind so stabil, dass sie auch nach Extraktion unter Hochsalzbedingungen bestehen bleiben, können allerdings je nach Zellzyklusphase

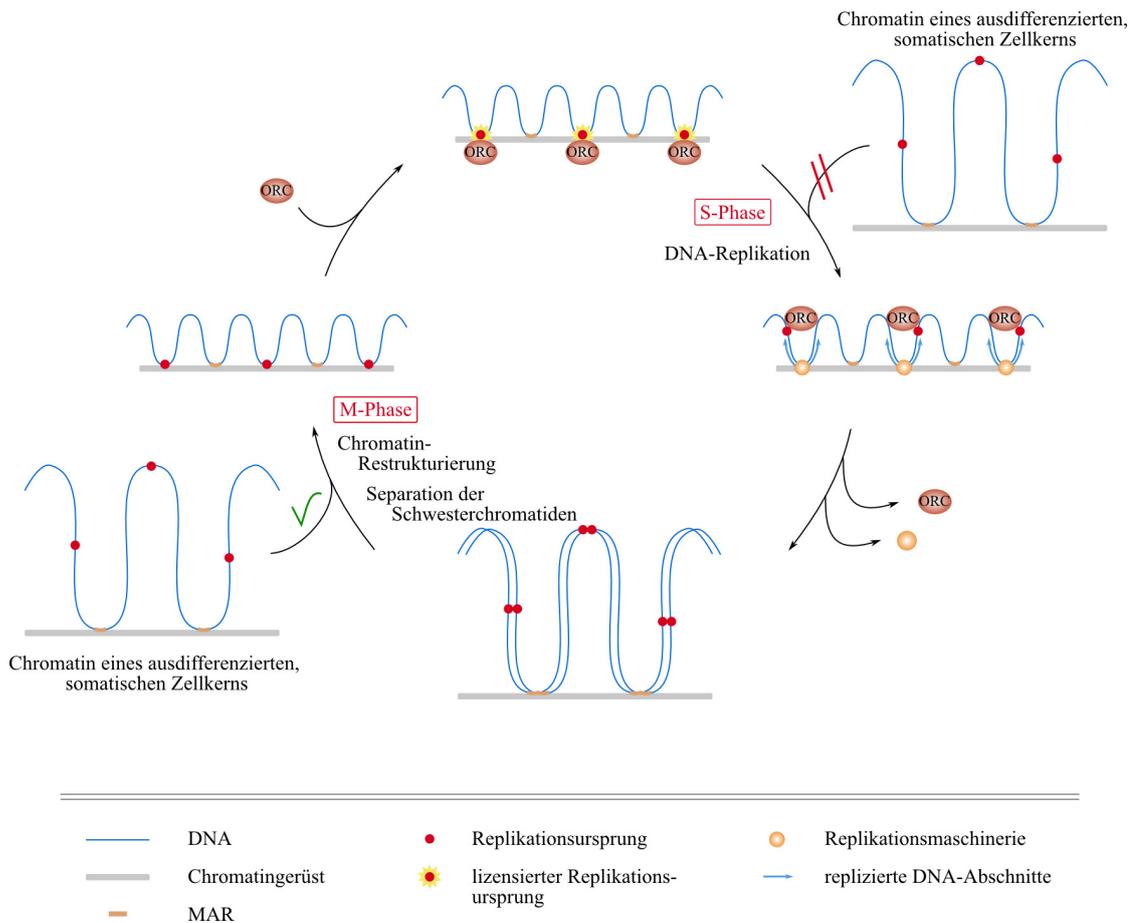


Abb. 8: Mögliches Modell zur Veranschaulichung der Wechselbeziehungen zwischen DNA-Replikationsmaschinerie und nukleärer Matrix während der frühen embryonalen Teilungen. Zu Beginn der S-Phase sind die Replikationsursprünge mit dem Chromatingerüst assoziiert, wodurch die effiziente Rekrutierung von pre-RC-Komponenten und funktionell nachgeschalteter Replikationsfaktoren gewährleistet wird. Während die enge Verknüpfung der DNA-Replikationsmaschinerie mit dem Kerngerüst nach Initiation der DNA-Synthese bestehen bleibt, werden bereits replizierte DNA-Abschnitte (und somit auch die Replikationsstartstellen) in die Peripherie entlassen. Nach vollständiger DNA-Verdopplung sorgen bestimmte Faktoren in der M-Phase für eine umfassende Restrukturierung des Chromatins, wobei der Kontakt zwischen Replikationsursprüngen und Chromatingerüst wiederhergestellt wird, um deren erneute Lizenzierung in Telophase zu ermöglichen. Wird im Rahmen einer Kerntransplantation ein somatischer Zellkern zunächst in Mitose vorinkubiert, so erfährt auch dessen Chromatin die in diesem Zeitfenster stattfindende Neuorganisation, was eine effiziente Lizenzierung aller verfügbarer Replikationsursprünge und deshalb eine schnellstmögliche DNA-Verdopplung in der nachfolgenden S-Phase erlaubt. Dagegen wird das Chromatin von Zellkernen, die unmittelbar vor Beginn der S-Phase eingebracht werden, nicht umorganisiert, sodass eine effiziente Lizenzierung und Initiation der DNA-Replikation in diesem Fall unterbleibt.

und Zelltyp variieren [248–251]. Während der M-Phase restrukturieren spezifische Faktoren das S-phasische Chromatin, wobei weitere Kontakte mit der nukleären Matrix ausgebildet werden. Insbesondere werden potenzielle Replikationsstartstellen an das Kerngerüst rekrutiert und fungieren dann als transiente MARs [252]. Die enge Interaktion zwischen Chromatingerüst und Replikationsursprüngen stellt eine essentielle Voraussetzung für die Assemblierung präreplikativer Komplexe dar (vgl. auch Kapitel 2.3.1), es werden also nur solche Replikationsstartstellen für die spätere DNA-Replikation lizenziert, welche zuvor an die nukleäre Matrix rekrutiert worden sind [253, 254]. Auch die einzelnen Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie werden unter Vermittlung des Kerngerüsts an die DNA dirigiert [255, 256]. Üblicherweise wird das Replisom in Darstellungen als sich entlang der Matrizen-DNA fortbewegende Funktionseinheit wiedergegeben (siehe auch Abb. 4). Sehr viel wahrscheinlicher jedoch bleiben die DNA-Polymerasen und akzessorische Faktoren während der DNA-Verdopplung in S-Phase statisch mit dem Chromatingerüst verbunden, während die DNA diese fixierten Stellen durchläuft und gleichzeitig repliziert wird [257]. Demzufolge werden bereits mit Beginn der S-Phase früh replizierte Bereiche (z. B. Replikationsstartstellen) in die Kernperipherie entlassen, sodass nach Fertigstellung der DNA-Synthese und Abdissoziation der Replikationsmaschinerie eine veränderte Kernarchitektur resultiert. Erst bei erneuter Passage der M-Phase werden die fakultativen MARs wieder an das Chromatinrückgrat rekrutiert, sodass eine effiziente Replikationsinitiation und -elongation auch während der nächsten Zellzyklusrunde gewährleistet ist.

In einem ausdifferenzierten Zellkern ist das Chromatin den Anforderungen einer produktiven Genexpression entsprechend in großen DNA-Schleifen angeordnet. Da die Replikation der DNA in quieszenten Zellen keine Rolle spielt, fungieren Replikationsstartstellen hier nicht als fakultative MARs. Vielmehr ist ein enger Kontakt zwischen der Transkriptionsmaschinerie und dem Kerngerüst zu beobachten, welcher für eine effiziente Genexpression essentiell zu sein scheint [258, 259]. Wird nun ein solcher Kern im Rahmen eines Kerntransfers zunächst in mitotischer Umgebung vorinkubiert, kann dessen Chromatin sowohl strukturell als auch funktionell umorganisiert werden. Alle verfügbaren Replikationsstartstellen sind dann

mit dem Chromatingerüst assoziiert, sodass eine effiziente Lizenzierung am Ende der M-Phase und eine schnelle DNA-Replikation mit Beginn der S-Phase sichergestellt ist. Wird jedoch ein somatischer Zellkern unmittelbar zu Beginn der S-Phase eingebracht (etwa bei Kerntransplantation in eine Metaphase II-arretierte Oocyte, in der bereits 20 min später die DNA-Replikation gestartet wird), unterbleibt diese Neustrukturierung des somatischen Chromatins. Zahlreiche Replikationsstartstellen werden nicht mehr lizenziert und infolge der resultierenden niedrigen DNA-Syntheseleistung können unvollständig replizierte DNA-Bereiche akkumulieren und zur Apoptose des frühen Embryos führen.

Spezifische M-Phase-Komponenten scheinen also für die Reprogrammierung somatischer Zellkerne von entscheidender Bedeutung zu sein. Als eine solche Komponente wurde Topoisomerase II identifiziert, deren Aktivität für die Fertigstellung der DNA-Replikation essentiell ist [247, 260]. Infolge der Termination der DNA-Synthese wird wiederum die Chromatindissoziation von RPA und ORC eingeleitet und diese „Freigabe“ potenzieller Replikationsursprünge stellt möglicherweise eine wichtige Voraussetzung für deren nachfolgende Neuorganisation in der M-Phase dar. Wie bereits erwähnt, arbeitet Topoisomerase II Hand in Hand mit Condensin [203, 204] und so ist es durchaus denkbar, dass letzteres ebenfalls an der Restrukturierung des Chromatins während der Mitose beteiligt ist. Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde deshalb der Fragestellung nachgegangen, ob die strukturelle und funktionelle Chromatinreorganisation eines somatischen Zellkerns nach dessen Vorinkubation in quasi-mitotischem *Xenopus*-Eiextrakt ganz oder teilweise unterbleibt, wenn diesem zuvor Condensin entzogen worden ist.

2.7 *Xenopus laevis* als Modellsystem

Aufgrund der recht einfachen Haltung und Zucht ist der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* bereits seit den 1940er Jahren in wissenschaftlichen Laboratorien beheimatet. Wurde er ursprünglich hauptsächlich als Indikator für eine bestehende Frühschwangerschaft verwendet (daher auch der Name „Apothekerfrosch“), hat er sich mittlerweile als Modellorganismus zum Studium zahlreicher molekular-, zell- und entwicklungsbiologischer Prozesse durchgesetzt. Die immense Bedeutung

von *Xenopus* als Modellsystem rührt zudem aus der Tatsache her, dass aus seinen abgelaichten Eiern ein zellfreier Extrakt hergestellt werden kann. Dieser stellt ein einfach zu handhabendes und leicht zu manipulierendes *in vitro*-System dar, mit welchem sich grundlegende Aspekte der frühen embryonalen Zellteilungen „im Reagenzglas“ reproduzieren lassen. Zur Gewinnung dieser Extrakte wird humanes Choriongonadotropin (hCG) in den dorsalen Lympfsack adulter, weiblicher Frösche injiziert, welche daraufhin anderntags bis zu 2000, in Metaphase der Meiose II arretierte Eier ablegen. Der Arrest in Metaphase II wird durch die Gegenwart eines sog. cyto-statischen Faktors (CSF) aufrechterhalten, der als xErp1 identifiziert wurde und einen Inhibitor des E3-Ubiquitinligasekomplexes APC/C darstellt [261]. Nach Entfernung der Gallerthülle unter mild-alkalischen Bedingungen können die Eier mittels Zentrifugation lysiert werden, wobei sich die Zellbestandteile entsprechend ihres spezifischen Gewichts auftrennen. Die cytoplasmatische Fraktion, welche noch immer in Metaphase II arretiert vorliegt und deshalb auch als CSF-Extrakt bezeichnet wird, kann nun entnommen und für vielfältige *in vitro*-Untersuchungen herangezogen werden. Die Zugabe geeigneter Reagenzien erlaubt eine synchrone Überführung und eventuelle Arretierung des Extraktes in verschiedenen Zellzyklusstadien. Beispielsweise kann durch Zugabe von Calciumionen (womit eine Befruchtung imitiert wird) der phosphorylierungsabhängige Abbau von xErp1 und der Eintritt in Interphase forciert werden [262]. Mit Hilfe geeigneter Antikörper können dem Extrakt spezifische Proteine entzogen und in rekombinant erzeugter Form wieder hinzugefügt werden, woraus sich Hinweise auf Funktion und Bedeutung der entsprechenden Proteine für mitotische oder meiotische Prozesse ergeben.

3 Ergebnisse

3.1 Wird durch die centrosomale Rekrutierung des Multiproteinkomplexes Cohesin eine Centrosomenüberduplikation verhindert und sind Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie daran beteiligt?

Wie in Abschnitt 2.4.3 bereits ausführlich erläutert, wird Cohesin nicht nur am Chromatin sondern auch an den Centrosomen lokalisiert und ist dort während der meisten Zeit des Zellzyklus an der Aufrechterhaltung der gekoppelten Konfiguration beider Centriolen beteiligt. Da der enge Kontakt zwischen Mutter- und Tochtercentriol der Assemblierung neuer Procentriolen entgegenwirkt, ist die Persistenz dieses gekoppelten Zustands zur Inhibition einer Centrosomenre- oder -überduplikation von maßgeblicher Bedeutung. Im Rahmen dieses Teilprojekts sollte nun geklärt werden, ob dem Multiproteinkomplex Cohesin hierbei eine funktionelle Bedeutung zukommt. Des Weiteren ist bisher unklar, auf welchem Wege Cohesin überhaupt an die Centrosomen gelangt. Zur Klärung beider Fragestellungen wurden im Rahmen dieses Teilprojekts Duplikationsexperimente etabliert. Außerdem waren verschiedene Antikörper zu generieren, welche es erlauben sollten, Cohesin sowie mögliche essentielle Faktoren der centrosomalen Cohesin-Rekrutierungskaskade zu eliminieren. Um Centrosomen mikroskopisch nachweisen und ihre Morphologie beurteilen zu können, war zudem ein gegen das an der centriolären Basis lokalisierte Protein xC-Nap1 gerichteter Antikörper aufzureinigen und zu charakterisieren.

3.1.1 Aufreinigung und Charakterisierung benötigter Antikörper

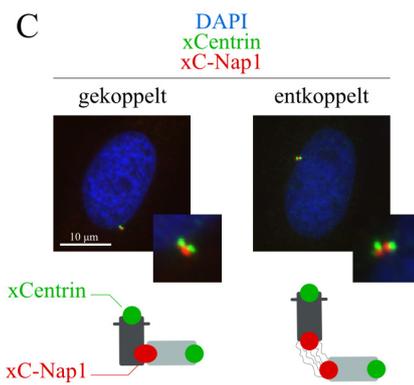
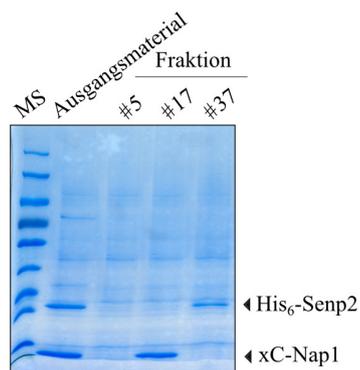
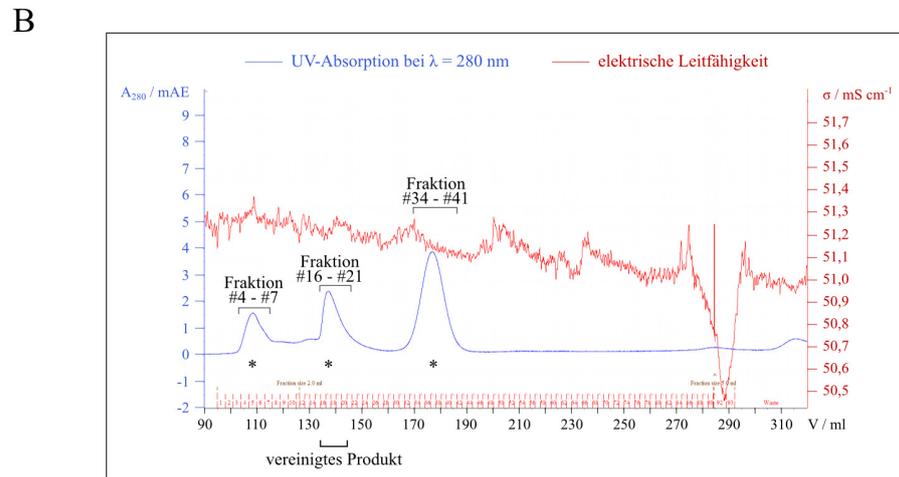
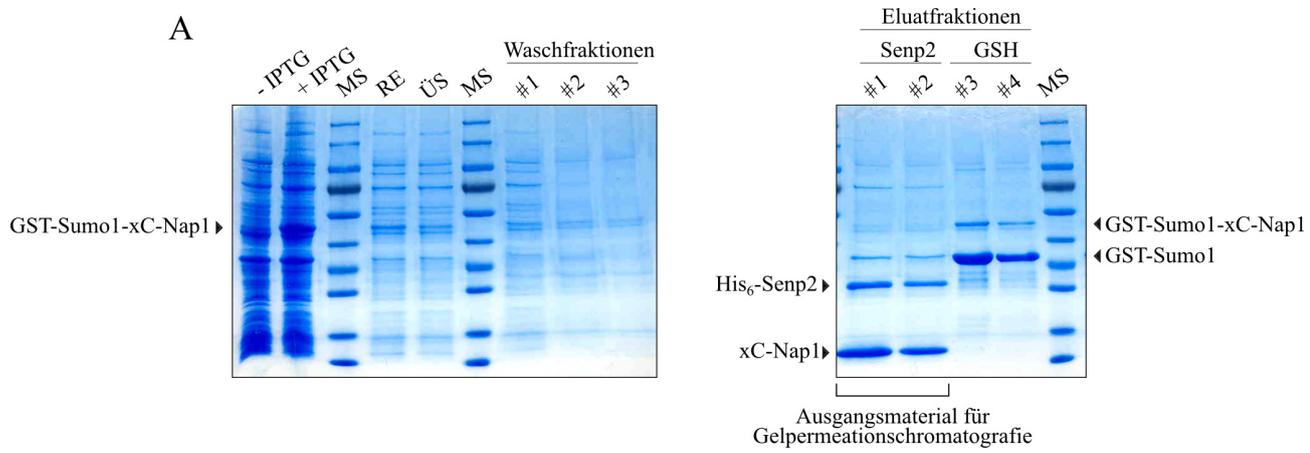
3.1.1.1 Aufreinigung und Charakterisierung eines gegen xC-Nap1 gerichteten Antikörpers

Für die späteren Duplikationsexperimente war es von essentieller Bedeutung, die aus dem CSF-Extrakt reisolierten Centrosomen mikroskopisch begutachten zu können. Hierzu sollten die beiden centrosomalen Komponenten xCentrin und xC-Nap1 mit Hilfe spezifischer Antikörper angefärbt werden. Zur Immunfluoreszenz-

färbung von Centrin konnte ein bereits etablierter *anti*-hCentrin2-Antikörper verwendet werden, da dieser auch mit dem *Xenopus*-Homolog interagiert. Für die Anfärbung von xC-Nap1 (auch bekannt als Cep250) jedoch musste ein neuer Antikörper generiert werden. Im Rahmen eines Forschungsmoduls war ein His₆-Sumo1-Fragment von xC-Nap1 bereits rekombinant exprimiert, *via* Nickel-NTA-Affinitätschromatografie gereinigt und zur Immunisierung zweier Meerschweinchen verwendet worden. Um die zu erwartenden Antiseren auf Basis der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung reinigen zu können, wurde nun eine Affinitätssäule benötigt. Hierzu wurde das xC-Nap1-Fragment als GST-Sumo1-Konstrukt rekombinant exprimiert und unter Ausnutzung der hochaffinen Bindung an Glutathion-Sepharose gereinigt (vgl. Abb. 9A). Unter Verwendung der Sumo-Protease Senp2 konnte das gewünschte xC-Nap1-Fragment quantitativ abgespalten werden, die nachfolgende Elution mit reduziertem Glutathion setzte nur noch geringe Mengen des ursprünglichen Konstrukts GST-Sumo1-xC-Nap1 frei. Zur anschließenden Eliminierung von Senp2 und weiterer Nebenprodukte wurde eine Gelpermeationschromatografie durchgeführt (vgl. Abb. 9B). Hierbei erlaubte das gewählte Säulenmaterial Superdex 75 eine effiziente Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht im Bereich zwischen 3 und 70 kDa, wobei Komponenten mit einem Molekulargewicht kleiner als 70 kDa in die porösen Polymere der Säulenmatrix eindringen und so später eluieren als große Proteine, die an dem Polymergranulat vorbeiströmen (und demnach eher aus der Säule austreten sollten). Überraschenderweise wurde jedoch das nur 12 kDa kleine xC-Nap1-Fragment (vgl. Abb. 9B, Maximum 2/Fraktion 17) eher von der Säule eluiert als die 29 kDa große, His₆-markierte Senp2-Protease (Maximum 3, Fraktion 37). Zur Kalibrierung der Chromatographiesäule war eine Mischung von sieben globulären Proteinen bekannter Größe (Ferritin, Aldolase, Conalbumin, Ovalbumin, Carboanhydrase, Ribonuklease A und Aprotinin) verwendet worden. Für jedes dieser Proteine ergibt sich nach der Gleichung

$$k_{av} = \frac{v_e - v_0}{v_c - v_0}$$

ein spezifischer k_{av} -Wert, wobei v_e das spezifische Retentionsvolumen des jeweiligen Proteins, v_0 das geometrische Säulenvolumen (hier 330 ml) und v_c das Leervolumen der Säule (*void volume*, ermittelt mit Blue Dextran; hier 108 ml) darstellen.



Bei halblogarithmischer Auftragung der ermittelten k_{av} -Werte gegen das Molekulargewicht ergibt sich eine lineare Gerade, die der Gleichung

$$k_{av} = -0,179 \ln MW + 2,275$$

folgt. Der für xC-Nap1 mit einem Retentionsvolumen von 137 ml ermittelte k_{av} -Wert von 0,1327 entspricht nach dieser Gleichung einer Größe von ca. 53 kDa. Möglicherweise neigt das hier aufgereinigte xC-Nap1-Fragment unter nativen Bedingungen zur Bildung von tetrameren Komplexen und wird deshalb eher eluiert als die Senp2-Protease. Alternativ könnte durch eine elongierte Konformation des xC-Nap1-Fragments das höhere Molekulargewicht bei der Gelpermeationschromatografie auch nur vorgetäuscht worden sein.

Das nun in ausreichender Reinheit vorliegende xC-Nap1-Fragment konnte im Folgenden zur Herstellung einer Affinitätssäule und Reinigung des *anti*-xC-Nap1-Serums verwendet werden. Hierzu wurde das Proteinfragment an einer Agarosematrix immobilisiert, welche über N-Hydroxysuccinimidgruppen verfügte. Unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung reagierten diese mit den primären Aminogruppen im xC-Nap1-Fragment. Die Aufreinigung der Antiseren erfolgte dann unter Ausnutzung der spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, und gebundene Antikörpermoleküle wurden anschließend unter sauren Bedingungen wieder eluiert. Um zu überprüfen, ob sich der so gewonnene *anti*-xC-Nap1-Antikörper

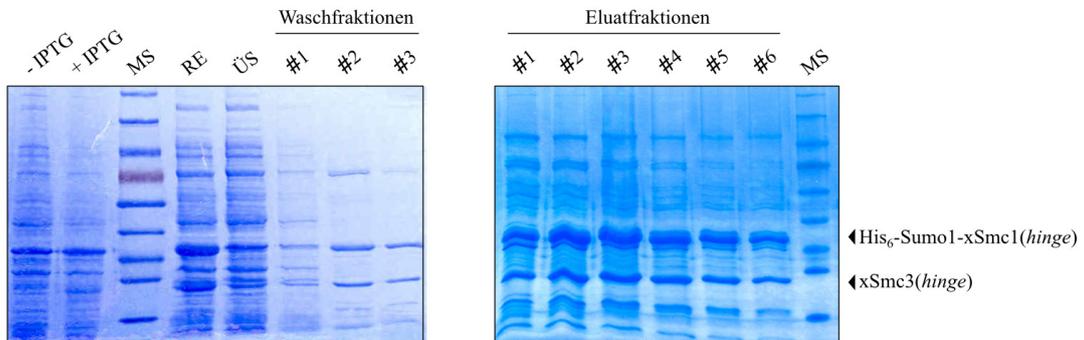
Abb. 9 (vorhergehende Seite): Rekombinante Expression und Affinitätsreinigung eines 12 kDa xC-Nap1-Fragments. A) SDS-PAGE welche die bakterielle Expression und nachfolgende Affinitätsreinigung dokumentiert. Das eigentliche Produkt xC-Nap1 wurde durch die zweimalige Zugabe von Senp2 eluiert. Um die Effizienz der Senp2-Spaltung abschätzen zu können, erfolgte die Elution der an die Glutathion-Sepharose gebundenen GST-Sumo1-Markierung durch zweimalige Zugabe von 50 mM reduziertem Glutathion (GSH). - IPTG: aufgekochte E. coli-Zellen vor IPTG-Induktion; + IPTG: aufgekochte E. coli-Zellen nach IPTG-Induktion; MS: Molekulargewichtsstandard; RE: lösliches Gesamtzelllysate; ÜS: Überstand nach Inkubation mit der Affinitätsmatrix. B) Chromatogramm und SDS-PAGE zur Gelpermeationschromatografie. Von den im Chromatogramm mit * markierten Fraktionen wurden SDS-Proben genommen und gelelektrophoretisch ausgewertet. Es wurden die Fraktionen 16 bis 20 vereinigt und zur Herstellung einer Affinitätssäule verwendet. C) Methanolfixierte X. laevis S3-Zellen wurden mit dem neu hergestellten Antikörper anti-xC-Nap1 sowie anti-hCentrin2 inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

zur Immunfluoreszenzfärbung von centrosomal lokalisiertem xC-Nap1 eignete, wurden auf Deckgläschen angezogene *X. laevis* S3-Zellen fixiert, permeabilisiert und mit geeigneten Verdünnungen des Antikörpers inkubiert. Wie in Abbildung 9C gezeigt, erlaubte die Verwendung des neusynthetisierten *anti*-xC-Nap1-Antikörpers die spezifische Detektion und eine morphologische Unterscheidung von *Xenopus*-Centrosomen. Während C-Nap1 mit dem proximalen Ende von Mutter- und Tochtercentriol assoziiert ist, akkumuliert Centrin im distalen Lumen der Centriolen [157, 263]. Ein Centrosom in der gekoppelten Konfiguration ergibt somit zwei Centrin-Foci und einen C-Nap1-Focus (das Verhältnis von Centrin zu C-Nap1 beträgt folglich 2 : 1), da die eng benachbarten C-Nap1-Signale nicht aufgelöst werden können. Demgegenüber ist nach dem Entkopplungsprozess für jedes Centriol jeweils ein Centrin- bzw. C-Nap1-Focus zu beobachten (woraus ein 1 : 1-Verhältnis von Centrin- zu C-Nap1-Signalen resultiert).

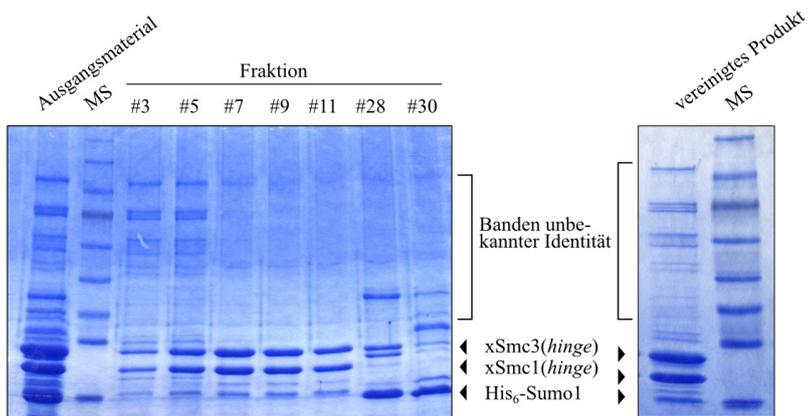
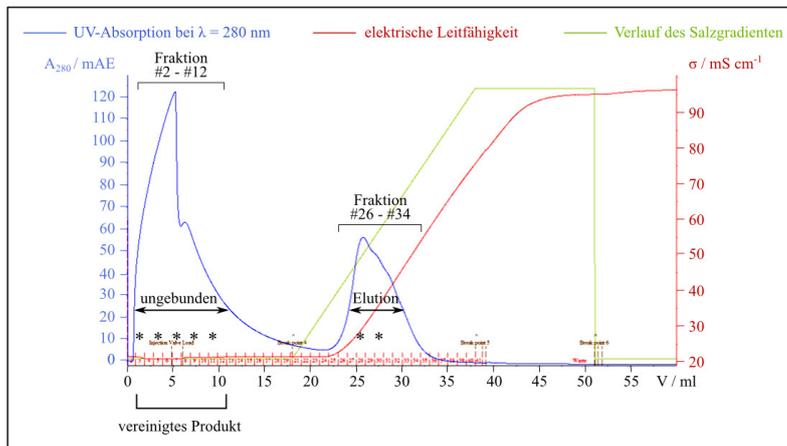
3.1.1.2 Herstellung und Charakterisierung eines gegen xSmc1/xSmc3 gerichteten Antikörpers

Bei den Smc-Komponenten des Cohesinrings handelt es sich um evolutionär streng konservierte Proteine, was erfahrungsgemäß eine erfolgreiche Immunisierung erschweren kann. Da hierbei der *coiled coil*-Bereich noch einmal besonders stark konserviert vorliegt, wurde die Gelenkregion zwischen xSmc1 und xSmc3 als Antigen für die spätere Immunisierung ausgewählt. Unter Zuhilfenahme des modifizierten Vektors pRSF-Duet1 konnten beide Proteinfragmente im nativen Komplex coexprimiert und anschließend über eine N-terminal an xSmc1 angefügte His₆-Sumo1-Markierung aufgereinigt werden (siehe Abb. 10A). Überraschenderweise wurde der Komplex auch nach Abspaltung der Hexahistidinmarkierung sehr stark durch die Nickel-NTA-Agarose gebunden, wobei eine Erhöhung der eingesetzten Imidazolmenge diese Bindung nicht merklich störte (vgl. Anhang Abb. 32). Zur Abtrennung der His₆-Sumo1-Markierung und des Spaltenzyms His₆-Senp2 musste in diesem Fall deshalb auf eine zweite Affinitätschromatografie verzichtet werden und stattdessen sollten die beiden störenden Komponenten im Zuge einer Kationenaustauschchromatografie eliminiert werden (siehe Abb. 10B). Der isoelektrische Punkt des xSmc1/xSmc3-Komplexes beträgt 9,14, während dieser Wert für His₆-Sumo1 mit 6,89 im saureren Bereich liegt. Unter den gewählten Bedingun-

A



B



gen für die Kationenaustauschchromatografie variierte der pH-Wert zwischen 5,75 und 7,50, weshalb der aufzureinigende xSmc1/xSmc3-Komplex zu Beginn deutlich positiver geladen vorliegen und damit besser an die Chromatographiesäule binden sollte als His₆-Sumo1. Durch eine stetige Steigerung der Salzkonzentration sollte anschließend die Elution des gebundenen Komplexes ermöglicht werden. Wie erwartet, zeigt das Chromatogramm zwei Absorptionsmaxima. Mittels SDS-PAGE wurde aber überraschenderweise nachgewiesen, dass es sich bei dem ersten Maximum, welches vor Anstieg des Salzgradienten detektiert worden war und also der ungebundenen Fraktion entsprach, um den gewünschten xSmc1/xSmc3-Komplex handelte, während His₆-Sumo1 erst mit steigender Salzkonzentration eluiert wurde. Möglicherweise war der Salzgehalt in den gewählten Puffern zu hoch, was die Interaktion zwischen dem heterodimären Proteinkomplex und der Affinitätsmatrix beeinträchtigt haben könnte. Zudem gibt der theoretisch ermittelte isoelektrische Punkt der beteiligten Komponenten keine Auskunft über die tatsächliche Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche. Es ist also durchaus denkbar, dass ein insgesamt positiv geladenes Protein über exponierte Domänen verfügt, welche zahlreiche negativ geladene Seitenketten aufweisen und darum einer Bindung an die Chromatografiematrix entgegenwirken. Das eigentliche Ziel der Kationenaustauschchromatografie, nämlich die Trennung von xSmc1/xSmc3 und His₆-Sumo1, war aber erreicht worden, sodass prinzipiell mit den vereinigten Fraktionen weitergearbeitet werden konnte. Diese enthielten jedoch noch immer Verunreinigungen im hochmolekularen Bereich, welche in der SDS-PAGE das charakteristische Muster von Doppelbanden annahmen. Möglicherweise handelte es sich dabei um nicht-denaturierte xSmc1/xSmc3-Komplexe variabler Zusammensetzung. Da dies aber mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht geklärt werden konnte, wurde

Abb. 10 (vorhergehende Seite): Rekombinante Expression und Affinitätsreinigung eines nativen Komplexes gebildet durch die Gelenkregion der zwei Smc-Komponenten Smc1 und Smc3. A) SDS-PAGE welche die Expression und die Nickelchelatchromatografie dokumentiert. MS: Molekulargewichtsstandard; - IPTG: aufgekochte E. coli-Zellen vor IPTG-Induktion; + IPTG: aufgekochte E. coli-Zellen nach IPTG-Induktion; RE: lösliches Gesamtzelllysat; ÜS: Überstand nach Inkubation mit der Affinitätsmatrix. B) Chromatogramm und SDS-PAGE zur Kationenaustauschchromatografie. Von den im Chromatogramm mit * gekennzeichneten Fraktionen wurden SDS-Proben genommen und diese per SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden die Fraktionen 3 bis 12 vereinigt und zur Abtrennung der hochmolekularen Proteinspezies einer größenchromatografischen Auftrennung unterzogen.

das Produkt aus der Kationenaustauschchromatografie noch einmal einer Gelpermeationschromatografie unterzogen. Wie in Abbildung 11 gezeigt, konnten infolge der größenchromatografischen Auftrennung die hochmolekularen Proteinspezies sowie bis dahin verbliebene Spuren der His₆-Sumo1-Markierung vom eigentlichen Produkt entfernt werden. Die so aufgereinigten Fraktionen mit geeigneter Konzentration an xSmc1/xSmc3 wurden anschließend vereinigt und zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet.

Um für die spätere Aufreinigung des gegen den xSmc1/xSmc3-Komplex gerichteten Antikörpers aus dem Antiserum eine geeignete Affinitätssäule zur Hand zu haben, wurde das obige Vorgehen wiederholt. Allerdings wurde dieses Mal auf die Kationenaustauschchromatografie verzichtet und nach Metallchelatchromatografie und Abspaltung der Affinitätsmarkierung His₆-Sumo1 sofort eine größenchromatografische Auftrennung angeschlossen, da diese schon im Zuge der ersten Expression zufriedenstellende Trennergebnisse geliefert hatte. Die Aufreinigung der Antiseren erfolgte dann unter Ausnutzung der hochspezifischen Interaktion zwischen den darin enthaltenen *anti*-xSmc1- und *anti*-xSmc3-Antikörpern und dem kovalent an die Affinitätsmatrix verknüpften xSmc1/xSmc3-Komplex.

Anschließend sollte untersucht werden, ob der so gereinigte, gegen xSmc1 und xSmc3 gerichtete Antikörper es vermag, den Cohesinringkomplex zu immunpräzipitieren. Hierzu wurden 50 µl eines frisch präparierten CSF-Extraktes auf magnetische Protein A-Dynabeads[®] gegeben, welche mit dem *anti*-xSmc1/xSmc3-Antikörper vorinkubiert worden waren. Zur Kontrolle waren unspezifische Immunglobuline an die Protein A-Matrix gekoppelt worden, und erwartungsgemäß wurde hier keine Interaktion mit den Cohesinkomponenten xSmc1 und xSmc3 beobachtet (siehe Bahn 2 und 4 in Abb. 12). Im Gegensatz dazu waren bereits 10 µg des spezifischen Antikörpers ausreichend, um beide Proteine weitgehend aus dem Extrakt zu eliminieren. Nur nach starker Überexposition war auf der entsprechenden Höhe eine schwache Bande detektierbar (siehe Bahn 6 in Abb. 12 unten). Da für die folgenden Experimente eine möglichst quantitative Entfernung des Cohesins von essentieller Bedeutung war, erfolgte die Immundepletion von 50 µl CSF-Extrakt stets unter der Verwendung von 20 µg gekoppeltem Antikörper.

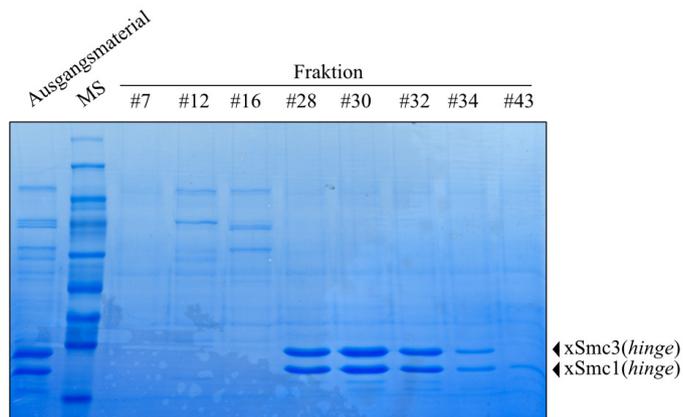
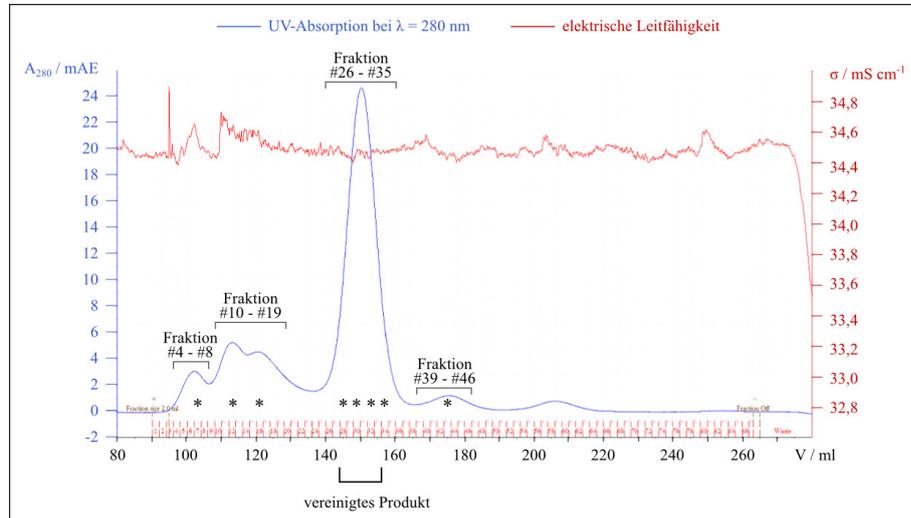


Abb. 11: Weitere Aufreinigung des nativen Komplexes gebildet durch die Gelenkregion der zwei Smc-Komponenten Smc1 und Smc3 per Gelpermeationschromatografie. Von den im obigen Chromatogramm mit * markierten Fraktionen wurden SDS-Proben hergestellt und anschließend per SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen 28 bis 33 mit der höchsten Konzentration an $xSmc1/xSmc3$ wurden vereinigt und später zur Immunisierung verwendet.

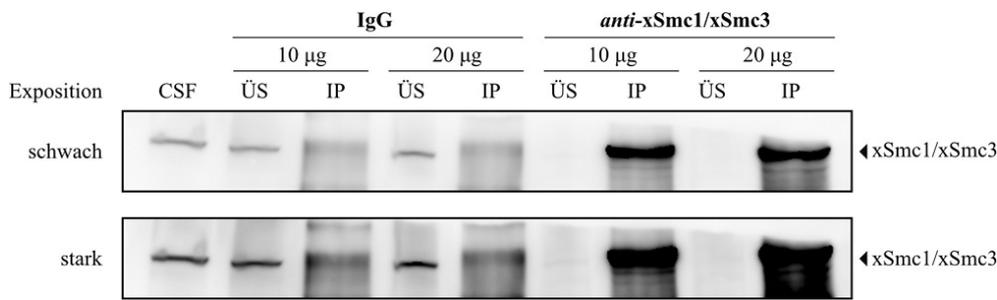
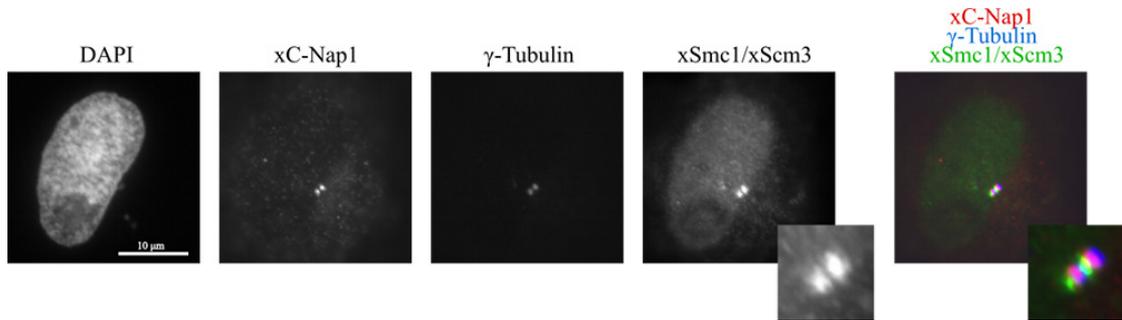


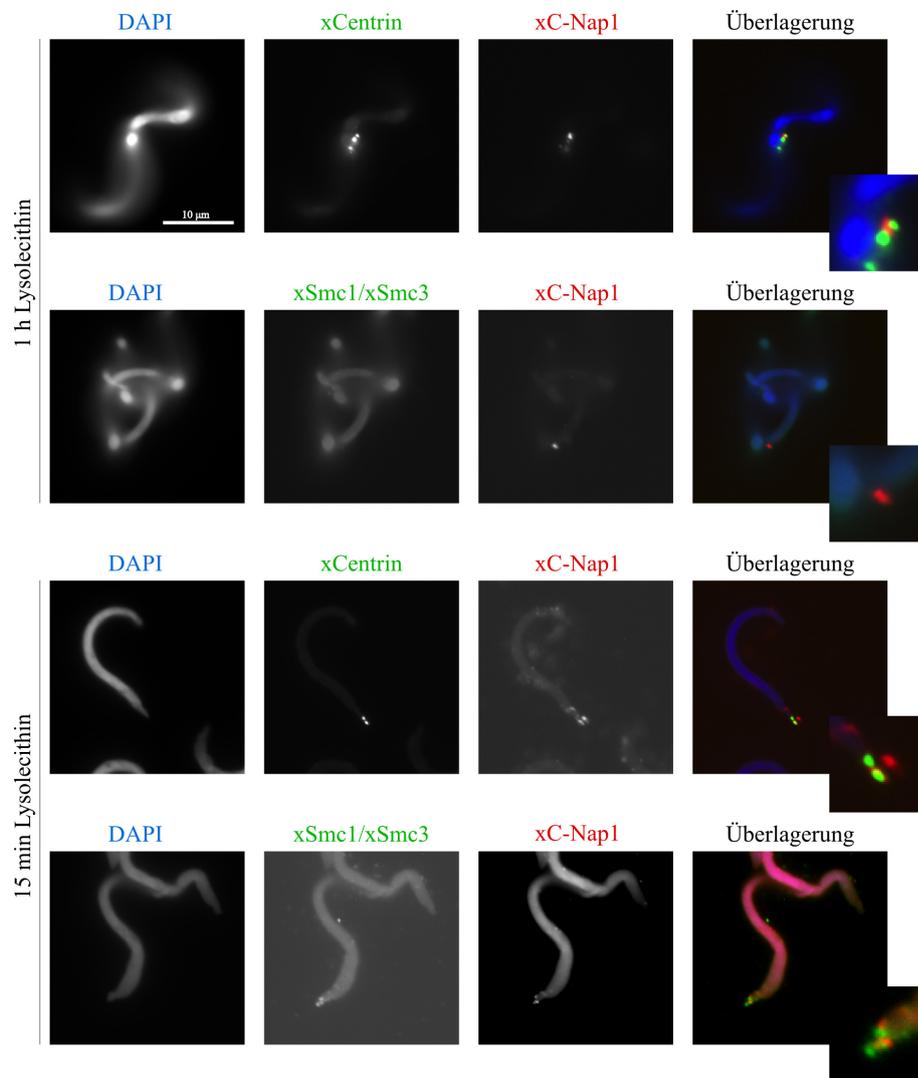
Abb. 12: Der generierte Antikörper *anti-xSmc1/xSmc3* immunpräzipitiert die Cohesinkomponenten *xSmc1* und *xSmc3* aus CSF-Extrakt. Frisch präparierter CSF-Extrakt wurde mit magnetischen Protein A-Dynabeads® inkubiert, welche mit unspezifischen Immunglobulinen bzw. dem neu hergestelltem *anti-xSmc1/xSmc3*-Antikörper vorbehandelt worden waren. Anschließend wurden vom Überstand (ÜS) und der Protein A-Matrix (IP) Proben genommen und per Westernblot analysiert. Die für Immunpräzipitation bzw. Immunblot verwendeten *anti-xSmc1/xSmc3*-Antikörper stammen aus zwei verschiedenen Antiseren.

Zudem wurde geprüft, ob sich der gereinigte Antikörper auch für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen eignete. Hierzu wurden *X. laevis* S3-Zellen auf Deckgläschen angezogen, fixiert und anschließend mit geeigneten Verdünnungen des Antikörpers inkubiert. Dabei zeigte sich, dass mit Hilfe des neu-synthetisierten *anti-xSmc1/xSmc3*-Antikörpers eine deutliche Akkumulierung der Cohesinkomponenten *xSmc1* und *xSmc3* an den Centrosomen zu verzeichnen war (siehe Abb. 13A, vgl. auch [264]). Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass zahlreiche Antikörper auch unspezifisch Centrosomen anfärben, und eine Validierung dieses Ergebnisses durch *knock down*-Experimente steht bislang aus. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob auch in Spermienkernen *xSmc1* und *xSmc3* an den Centrosomen angereichert werden. Charakteristischerweise erhält man nach der Immunfluoreszenzfärbung der beiden centrosomalen Proteine *xCentrin* und *xC-Nap1* ein Signal für *C-Nap1* welches von zwei *Centrinsignalen* flankiert wird. Da das Centrosom in den ausdifferenzierten Spermien für die Geißelbewegung von essentieller Bedeutung ist, finden sich diese Signale an einem Ende des wurmartig geformten Spermiumkerns (welcher das Spermium nahezu vollständig ausfüllt). Die einstündige Lysolecithinbehandlung im Zuge der Spermienpräparation führte zu einem deutlichen Verlust dieses charakteristischen Centrosomensignals, sodass zunächst untersucht wurde, welche Inkubationszeiten eine ausreichende Durchlässigkeit der

A



B



Kernmembran bei gleichzeitig möglichst geringem Verlust des Centrosomensignals gewährleisten. Hierfür wurden bei 15 min die besten Ergebnisse erzielt. Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, konnte das typische Centrosomensignal für xCentrin und xC-Nap1 nach einstündiger Lysolecithinbehandlung nur vereinzelt und dann auch nur in größeren Spermienaggregaten beobachtet werden, während nach einer Inkubationsdauer von 15 min mit jedem Spermium auch ein Centrosom assoziiert war. Auch anhand von *Xenopus*-Spermienkernen konnte im Bereich der Centrosomen mittels IF eine mutmaßliche Anreicherung von xSmc1 und xSmc3 nachgewiesen werden.

3.1.1.3 Immunodepletion von xOrc2

Der hexamere *Origin Recognition Complex* ist für die Initiation der DNA-Replikation von entscheidender Bedeutung, da er ATP-abhängig an DNA bindet und die sog. *Origins of Replication* markiert. Zugleich stellt die Assemblierung präreplikativer Komplexe zumindest im Modellsystem *Xenopus* eine essentielle Voraussetzung für die Rekrutierung von Cohesin an die DNA dar [42–44]. Wie die Veröffentlichungen von Prasanth u. a. [174] und Hemerly u. a. [175] nahelegen, scheinen ORC oder einzelne Untereinheiten dieses Komplexes zudem eine Kontrollfunktion bei der korrekten Centrosomenduplikation inne zu haben, welche möglicherweise durch eine ORC-vermittelte Rekrutierung von Cohesin an die Centrosomen realisiert wird. Um in späteren Versuchen überprüfen zu können, ob die Eliminierung von xOrc2 Einfluss auf die centrosomale Lokalisation von Cohesin nimmt und somit deren Kopplungszustand bestimmt, musste zunächst die Depletion dieses Proteins aus CSF-Extrakt etabliert werden. Hierzu wurden 50 µl eines frisch hergestellten CSF-Extraktes mit magnetischen Protein A-Dynabeads[®] inkubiert, welche zuvor mit

Abb. 13 (vorhergehende Seite): Der generierte Antikörper anti-xSmc1/xSmc3 scheint centrosomales xSmc1 und xSmc3 detektieren zu können. A) Methanol-fixierte *X. laevis* S3-Zellen wurden mit dem neu hergestellten Antikörper anti-xSmc1/xSmc3 sowie mit anti-xC-Nap1 und anti- γ -Tubulin inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier verschiedener Spermienpräparationen mit Lysolecithininkubationszeiten von 1 h bzw. 15 min. Die auf Deckgläschen zentrifugierten und mit Formaldehyd fixierten Spermienkerne wurden mit den Antikörpern anti-xC-Nap1 sowie anti-hCentrin2 bzw. anti-xSmc1/xSmc3 inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

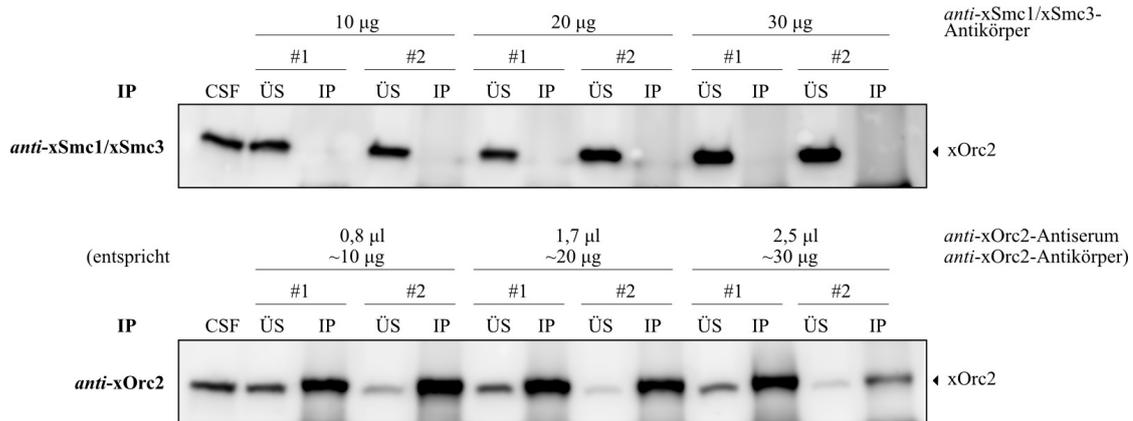


Abb. 14: Der gegen *xOrc2* gerichtete Antikörper immunpräzipitiert *xOrc2* aus CSF-Extrakt. Frisch präparierter CSF-Extrakt wurde mit magnetischen Protein A-Dynabeads[®] inkubiert, welche mit 10, 20 oder 30 µg anti-*xSmc1/xSmc3*-Antikörper bzw. 0,8, 1,7 oder 2,5 µl des anti-*xOrc2*-Serums vorbehandelt worden waren (Runde #1). Nachdem ein Aliquot für die SDS-PAGE entnommen worden war, wurde der Extrakt nochmals auf einer frischen, ebenso gekoppelten Protein A-Matrix inkubiert (Runde #2). Anschließend wurden sowohl vom Überstand (ÜS) als auch von beiden Protein A-Matrizes (IP) Proben genommen und per Westernblot analysiert.

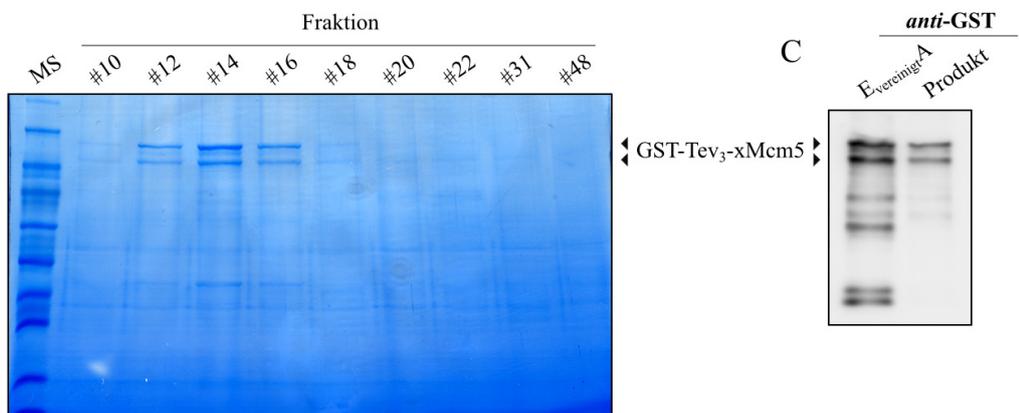
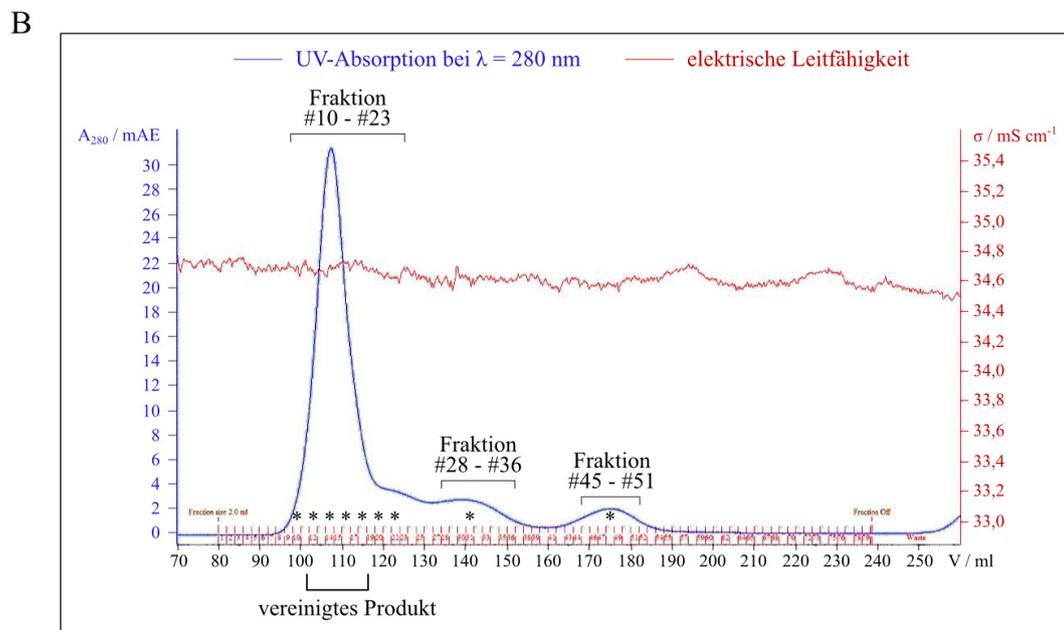
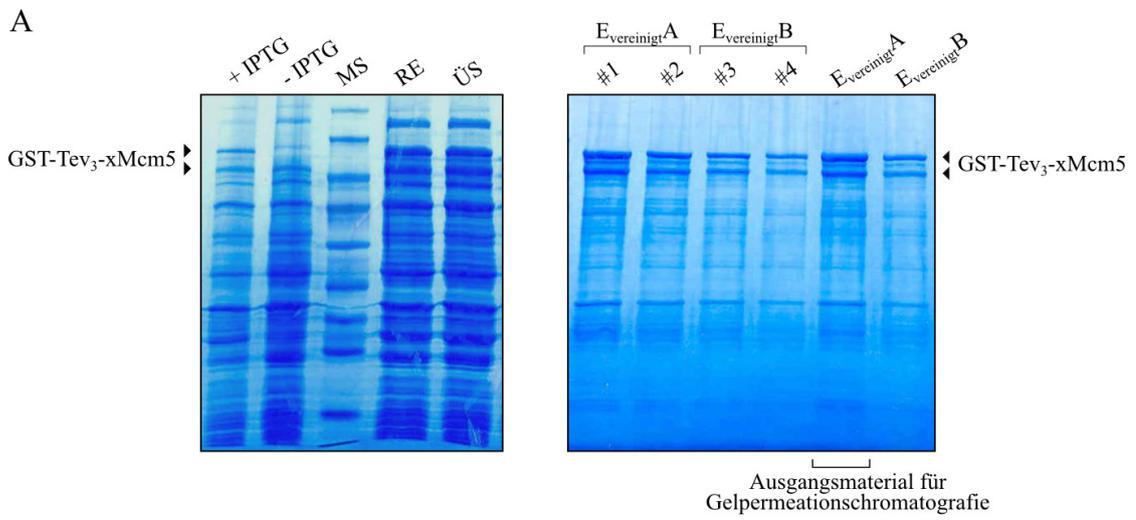
anti-xOrc2-Serum inkubiert worden waren (zur Verfügung gestellt von Johannes Walter, Harvard Medical School, Boston). Zur Spezifitätskontrolle war der bereits etablierte *anti-xSmc1/xSmc3*-Antikörper verwendet worden und erwartungsgemäß konnte *xOrc2* durch diesen nicht gebunden werden, sondern verblieb im Überstand (siehe Abb. 14 oben). Dagegen wurde das Protein spezifisch durch Protein A-gekoppelte *anti-xOrc2*-Antikörper aus dem Extrakt depletiert (siehe Abb. 14 unten). Bei *xOrc2* schien es sich um ein stark abundantes Protein zu handeln, denn selbst eine zweimalige Immunpräzipitation mit jeweils bis zu 1,7 µl des Antiserums (was einer Menge von etwa 20 µg spezifischem Antikörper entsprechen sollte) waren für eine vollständige Depletion nicht ausreichend. Auch nach einer zweimaligen Inkubation mit jeweils 2,5 µl Protein A-gekoppeltem Antiserum waren nach der zweiten Depletionsrunde noch Spuren des Proteins im Überstand nachweisbar, wenngleich die Protein A-Matrix noch nicht gesättigt schien. Da in den späteren Experimenten eine möglichst quantitative Eliminierung von *xOrc2* von entscheidender Bedeutung sein würde, erfolgte die vorausgehende Immundepletion von 50 µl CSF-Extrakt sicherheitshalber stets in zwei Runden, wobei jeweils 3 µl

des Protein A-gekoppelten Antiserums zum Einsatz kamen.

3.1.1.4 Aufreinigung und Charakterisierung eines gegen xMcm5 gerichteten Antikörpers

Als ein weiterer wichtiger Faktor in der Rekrutierungskaskade von Cohesin an Centrosomen wurde Mcm5 angesehen. Dieses Protein stellt ebenfalls eine Unter-einheit eines hexameren und ATP-bindenden Komplexes dar, nämlich des sog. *minichromosome maintenance*-Komplexes. Auch in diesem Fall sollte überprüft werden, ob die Immundepletion von xMcm5 die centrosomale Lokalisation von Cohesin und damit das morphologische Erscheinungsbild der Centrosomen beeinflusst. Hierzu wurde *xMCM5* mittels geeigneter PCR-Primer aus einer cDNA-Bibliothek von *Xenopus laevis* herausamplifiziert und als GST-Fusionsprotein exprimiert. Wie das in Abbildung 15A gezeigte SDS-Gel verdeutlicht, wurden im Zuge der fortschreitenden Affinitätsreinigung zwei hochmolekulare Proteinspezies angereichert, von denen die größere dem Fusionskonstrukt GST-Tev₃-xMcm5 entsprechen sollte und die kleinere zunächst als intrinsisches *E. coli*-Protein angesehen wurde, da bereits in der Probe vor IPTG-Induktion auf gleicher Höhe eine Proteinbande deutlich erkennbar war. Nachdem aber beide Proteine hochaffin an den Glutathion-Liganden der Affinitätsmatrix gebunden hatten und auch per *anti*-GST-Immunblot (vgl. Abb. 15C) der Charakter einer Doppelbande erhalten blieb, konnte davon ausgegangen werden, dass beide Proteinspezies dem Fusionskonstrukt bzw. C-terminalen Degradationsprodukten desselben entsprechen sollten. Nach Abtrennung der niedermolekularen Verunreinigungen per Gelpermeationschromatografie wurden Fraktionen geeigneter Proteinkonzentration vereinigt und zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet.

Schon während des Testens der gewonnenen Antiseren per Westernblot zeigte sich jedoch, dass durch diese keine spezifische Erkennung von xMcm5 möglich war. Sowohl rekombinant exprimiertes His₆-Sumo1-xMcm5 und GST-Tev₃-xMcm5 als auch CSF-Extrakt wurden hierfür als Proben verwendet und lediglich für das GST-Fusionskonstrukt waren sehr schwache Signale detektiert worden (nicht gezeigt), welche mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein von *anti*-GST-Antikörpern im Serum zurückzuführen waren. In den Proben ohne GST-



Markierung waren keine Chemilumineszenzsignale nachweisbar (ebenfalls nicht gezeigt). Über mögliche Ursachen der schlechten Immunisierbarkeit mit xMcm5 kann hier nur spekuliert werden. Da es sich bei den Mcm-Komponenten um im Laufe der Evolutionsgeschichte hochkonservierte Proteine handelt, wurde möglicherweise die Immunantwort im Wirtstier unterdrückt, um eine Autoimmunreaktion zu vermeiden (siehe auch den Aminosäuresequenzvergleich, Anhang Abb. 33). Allerdings stellen auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Smc-Komponenten oder Orc2 evolutionär hoch-konservierte Proteine dar, und hier war es sehr wohl möglich, geeignete Antikörper zu generieren.

In dem erneuten Versuch einen zur Immundepletion von xMcm5 geeigneten Antikörper zu gewinnen, wurde ein gegen die Isoform xMcm5A gerichteter Peptidantikörper hergestellt. Wie in Abbildung 16 gezeigt, war dieser in der Lage, xMcm5 spezifisch im Westernblot zu erkennen. Hierbei wurde die xMcm5-Komponente sowohl im GST-Tev₃-Fusionskonstrukt als auch nach Tev-Protease-vermittelter Abspaltung der Affinitätsmarkierung erkannt (siehe Abb. 16A). Zur Depletion des Proteins dagegen eignete sich der Antikörper nicht, denn nach Inkubation von CSF-Extrakt mit 20 µg Antikörper war im Vergleich zur IgG-Kontrolle keine merkliche Schwächung der xMcm5-Bande im Westernblot beobachtbar (siehe Abb. 16B). Auch eine zweimalige Inkubation des Extraktes mit jeweils frischer, *anti*-xMcm5A-gekoppelter Protein A-Matrix lieferte keine besseren Ergebnisse (Fabian Merkel, Bachelorarbeit). Bei der schwachen Intensität der Proteinbanden im Westernblot

Abb. 15 (vorhergehende Seite): Rekombinante Expression und Affinitätsreinigung von GST-Tev₃-xMcm5. A) SDS-PAGE welche die Expression und die affinitätschromatografische Reinigung dokumentiert. + IPTG: aufgekochte E. coli-Zellen nach IPTG-Induktion; - IPTG: aufgekochte E. coli-Zellen vor IPTG-Induktion; MS: Molekulargewichtsstandard; RE: lösliches Gesamtzelllysat; ÜS: Überstand nach Inkubation mit der Affinitätsmatrix. Die Eluatfraktionen #1 und #2 wurden zu E_{vereinigt}A zusammengefasst und später einer Gelpermeationschromatografie unterzogen, die Eluatfraktionen #3 und #4 bilden E_{vereinigt}B. B) Chromatogramm und SDS-PAGE zur Gelpermeationschromatografie. Von den im Chromatogramm mit * gekennzeichneten Fraktionen wurden SDS-Proben hergestellt und mittels SDS-PAGE ausgewertet. Die im Anschluss vereinigten Fraktionen 12 bis 18 bilden das zur Immunisierung eingesetzte Endprodukt. C) Um zu überprüfen, ob beide hochmolekularen Banden zumindest teilweise dem aufzureinigenden Fusionsprotein GST-Tev₃-xMcm5 entsprechen, wurden sowohl vom Ausgangsmaterial der Gelpermeationschromatografie (E_{vereinigt}A) als auch vom Endprodukt SDS-Proben genommen und per anti-GST-Immunblot analysiert.

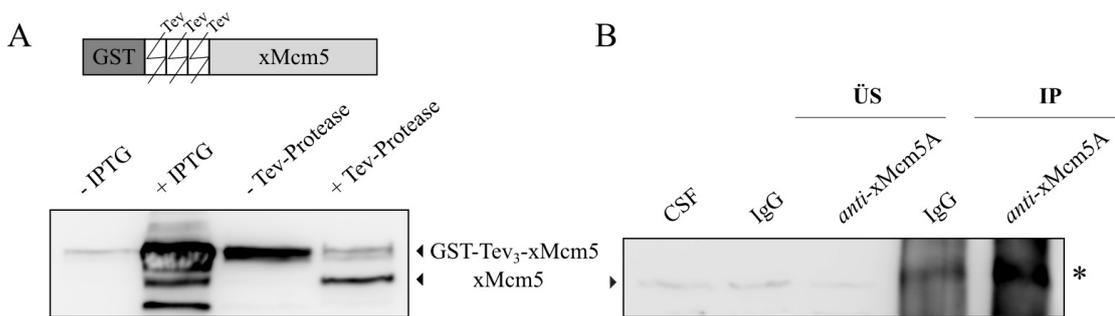


Abb. 16: Der gegen *xMcm5A* gerichtete Peptidantikörper erkennt das Protein zwar im Immunblot, eignet sich aber nicht zu dessen Depletion. A) Das Fusionskonstrukt GST-Tev₃-*xMcm5* war rekombinant exprimiert und nach Zellaufschluss war das Gesamtzelllysat mit Tev-Protease inkubiert worden. Die angefertigten SDS-Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer wurde die Membran mit dem anti-*xMcm5A*-Peptidantikörper inkubiert. -/+ IPTG: aufgekochte *E. coli*-Zellen vor/nach IPTG-Induktion; -/+ Tev-Protease: lösliches Gesamtzelllysat vor/nach Inkubation mit Tev-Protease. B) Frisch präparierter CSF-Extrakt wurde mit magnetischen Protein A-Dynabeads[®] inkubiert, welche mit 20 µg unspezifischen IgG bzw. dem anti-*xMcm5A*-Antikörper vorbehandelt worden waren. Sowohl vom Überstand (ÜS) als auch von beiden Protein A-Matrizes (IP) wurden SDS-Proben hergestellt und per Immunblot analysiert. Unspezifische Interaktionen sind mit * gekennzeichnet.

sollte selbst nach nur partieller *xMcm5*-Depletion ein Unterschied zwischen spezifischer und nicht-spezifischer Depletion sichtbar gemacht werden können. Dies ist hier nicht der Fall, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass der gegen *xMcm5A* gerichtete Peptidantikörper denaturiertes, teilweise linear vorliegendes *xMcm5* (so wie während des Immunisierungsvorgangs auch das Peptidantigen präsentiert worden war) zwar erkennen konnte, die spezifische Interaktion zwischen Antikörper und Hapten im nativen, räumlich strukturierten Protein jedoch nicht möglich war.

Zudem wurde versucht, einen depletionsfähigen Antikörper gegen die Kollerin-komponente *Scs2* zu erzeugen. Da die Herstellung eines solchen mittels rekombinant exprimiertem *Scs2* in anderen Arbeitsgruppen große Probleme bereitet hatte (Olaf Stemmann, persönliche Mitteilung), wurden auch hierfür zwei Peptidantikörper generiert. Leider erweisen sich beide als unbrauchbar sowohl zum Nachweis von *Scs2* im Immunblot als auch zur Immunpräzipitation von *Scs2* (Fabian Merkel, Bachelorarbeit). Die der Immunisierung zugrunde liegenden Peptidsequenzen

waren nach den gängigen Kriterien und unter Zuhilfenahme von Strukturvorhersagen für xMcm5 bzw. xScs2 ausgewählt worden. Da solche Vorhersagen aber in der Regel nur Wechselwirkungen von Aminosäureresten innerhalb kleinerer Bereiche des Proteins berücksichtigen können, besteht immer auch die Gefahr, dass die tatsächliche Tertiärstruktur gerade von sehr großen Proteinen (wie beispielsweise Mcm5 oder Scs2) deutlich von den Vorhersagen abweicht und vermeintlich exponierte, gut für den Antikörper zugängliche Epitope doch im Inneren des Proteins zu liegen kommen. Eine weitere mögliche Ursache für das Versagen eines Peptidantikörpers bei der Immunpräzipitation ist in seiner prinzipiellen Herstellungsweise zu suchen. Das hier zur Immunisierung verwendete, zumeist weniger als 20 Aminosäurereste beinhaltende Peptid kann die korrekte räumliche Struktur innerhalb des Vollängenproteins nicht einnehmen, sodass nur dann präzipitationsfähige Antikörper gebildet werden, wenn der antigene Bereich im Gesamtprotein ebenfalls weitgehend linear und unstrukturiert vorliegt.

3.1.2 Die Eliminierung von Smc1/Smc3 oder Orc2 hat eine moderate Überduplikation von Centrosomen zur Folge

Nach der eingangs bereits erläuterten Arbeitshypothese sollte Cohesin die beiden Centriolen eines Centrosoms während der S-Phase des Zellzyklus eng zusammenhalten und ihrer Überduplikation so entgegenwirken. Eine solche Centrosomenüberduplikation kann sich in zwei möglichen Phänotypen äußern: Zum einen kann es an einem Muttercentriol zur Ausbildung weiterer Procentriolen kommen, die alle in engem Kontakt mit dem Muttercentriol verbleiben und ein verändertes Erscheinungsbild der Centrosomen zur Folge haben (sog. *flower formation*). Zum anderen kann ein verloren gegangener Kontakt zwischen Mutter- und Tochtercentriol in der Bildung neuer Procentriolen sowohl an der Mutter als auch an der Tochter resultieren, sodass sich während späterer Zellteilungen die Anzahl der Centrosomen signifikant erhöht. Erklärtes Ziel dieses Teilprojekts war es also, mögliche Veränderungen der Centrosomenmorphologie oder ihrer Gesamtanzahl infolge eines Fehlens von Cohesin oder seines potenziellen Rekrutierungsfaktors Orc2 zu untersuchen.

Zunächst aber sollte überprüft werden, ob sich eine Centrosomenüberduplikation überhaupt immunfluoreszenzmikroskopisch verfolgen lässt. Hinchcliffe u. a. [135] konnten zeigen, dass es im Aphidicolin-vermittelten S-Phasearrest zur Überduplikation von Centrosomen kommt. Aphidicolin ist ein Inhibitor der α -DNA-Polymerase und die in seiner Gegenwart auftretenden unreplizierten DNA-Abschnitte führen durch Aktivierung des sog. Intra-S-*Checkpoints* zum Zellzyklusarrest. Die Anzahl der Spindelpole aber wird im Zellzyklusverlauf nicht kontrolliert und deshalb werden die Centrosomen im anhaltenden S-Phasearrest Cdk2^{CycE}-vermittelt dupliziert. Frisch präparierter CSF-Extrakt wurde also mit ca. 400 *Xenopus*-Spermienkernen pro μ l Extrakt vorinkubiert, anschließend durch einen zweimaligen Ca²⁺-Puls in die Interphase entlassen und 20 min später mit 10 ng/ μ l Aphidicolin versetzt. Nach einer bis zu sechsständigen Inkubation wurden die Spermienkerne und die damit assoziierten Centrosomen auf Deckgläschen reisoliert und der Immunfluoreszenzfärbung mit *anti*-hCentrin2 und *anti*- γ -Tubulin unterzogen. Wie in Abbildung 17 gezeigt, konnten im anhaltenden S-Phasearrest (4 und 6 h) mehr Kernassoziierte Centrin- und γ -Tubulinsignale detektiert werden als zum Zeitpunkt der Aphidicolinzugabe (0 h) was für die Ausbildung neuer Procentriolen spricht. Dies erlaubte die Schlussfolgerung, dass die Überduplikation von Centrosomen *in vitro* gelingt und sich immunfluoreszenzmikroskopisch auswerten lässt.

Um nun zu untersuchen, ob auch in Abwesenheit von Cohesin oder seines möglichen Rekrutierungsfaktors Orc2 Centrosomen überdupliziert werden, war das in Abbildung 18A skizzierte experimentelle Vorgehen gewählt worden. Zunächst wurde frischer CSF-Extrakt präpariert und dessen Fähigkeit zum Ca²⁺-abhängigen Übergang in die Interphase getestet: Während in Abwesenheit von Calcium-Ionen die Spermien-DNA stark kondensiert vorlag, wurde mit der Zugabe von Calcium der Übertritt in die Interphase forciert, was in der Ausbildung runder, interphasischer Kerne resultierte (Abb. 18B). Anschließend wurde der für gut befundene Extrakt aufgeteilt, um ihm per Immundepletion entweder xSmc1/xSmc3 oder xOrc2 zu entziehen. Ein dritter Ansatz wurde mit unspezifischen IgG behandelt und diente als Kontrolle. Wie Abbildung 18D zeigt, konnten alle drei Proteine nahezu vollständig aus den CSF-Überständen eliminiert werden (xSmc1/xSmc3 in Bahn 3 in Abb. 18D oben; xOrc2 in Bahn 5 in Abb. 18D unten), waren in

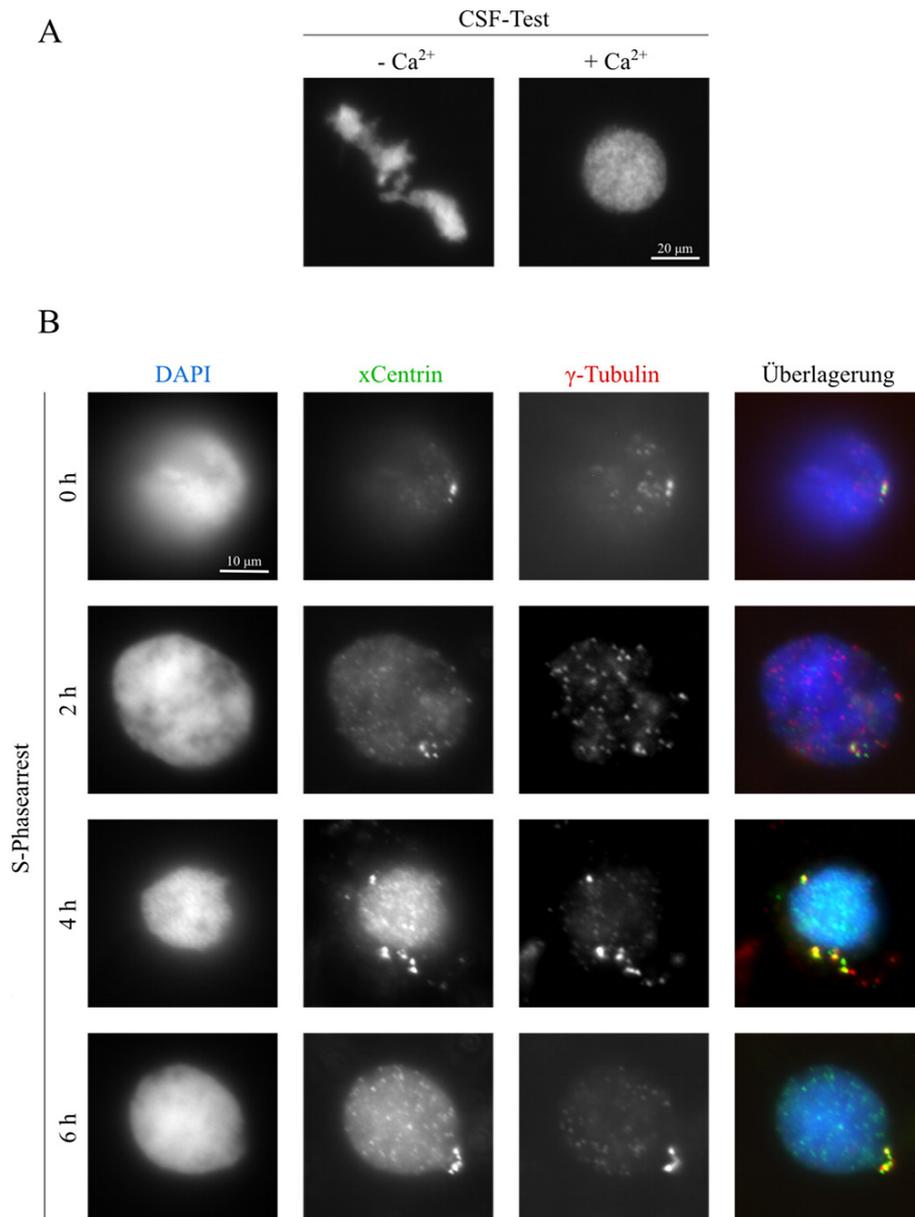
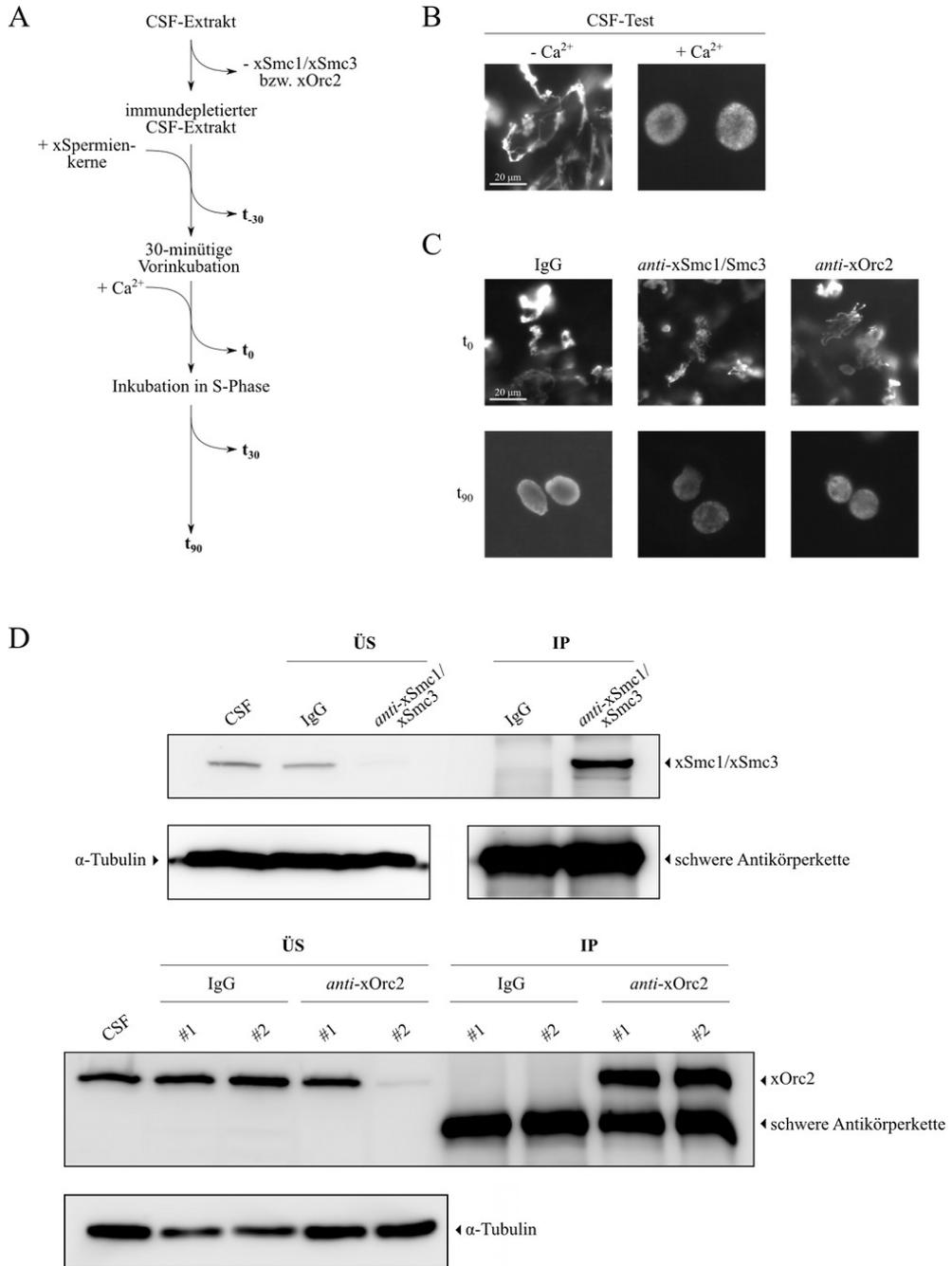


Abb. 17: Im Aphidicolin-vermittelten Interphasearrest werden Centrosomen überdupliziert. A) Der CSF-Extrakt wurde mit Xenopus-Spermienkernen versetzt und in An- ($+ \text{Ca}^{2+}$) bzw. Abwesenheit ($- \text{Ca}^{2+}$) von Calcium-Ionen inkubiert. Die anschließend mittels DAPI sichtbar gemachte Spermien-DNA konnte fluoreszenzmikroskopisch begutachtet werden, woraus eine Aussage über die Güte des Extraktes möglich war: Während die Spermien-DNA im CSF-Arrest ($- \text{Ca}^{2+}$) stark kondensiert vorlag, wurden in Interphase ($+ \text{Ca}^{2+}$) runde Kerne bestehend aus dekondensiertem Chromatin beobachtet. B) Xenopus-Spermienkerne wurden nach 0-, 2-, 4- bzw. 6-stündigem S-Phasearrest auf Deckgläschen zentrifugiert und einer Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung der Antikörper anti- γ -Tubulin und anti-hCentrin2 unterzogen.



der IgG-Kontrolle jedoch ungemindert nachweisbar (xSmc1/xSmc3 in Bahn 2; xOrc2 in Bahn 3). Der depletierte Extrakt wurde in Anwesenheit von *Xenopus*-Spermienkernen und Cycloheximid vorinkubiert und vor Ca^{2+} -induziertem Eintritt in die Interphase wurde die Spermien-DNA erneut fluoreszenzmikroskopisch begutachtet (t_0 in Abb. 18C). Dabei zeugte das noch immer stark kondensiert vorliegende Spermienchromatin von einem anhaltenden CSF-Arrest, und eine Autoaktivierung des Extraktes während der Immundepletion oder der 30-minütigen Vorinkubation konnte somit ausgeschlossen werden. Anschließend wurde der Extrakt durch die Zugabe von Calcium-Ionen in Interphase überführt, wobei die Inkubation in S-Phase so lange wie möglich durchgeführt wurde, um einer Centrosomenüberduplikation genügend Zeit zu verschaffen. Gleichzeitig war jedoch ein möglicher Eintritt in Apoptose auszuschließen, weshalb der Zustand des Extraktes in engen Zeitabständen überwacht werden musste. Dies ist in Abbildung 18C exemplarisch zum Zeitpunkt des Inkubationsendes (t_{90}) gezeigt, die Kerne erschienen noch rund und durchgehend angefärbt und eine beginnende Fragmentierung der Spermien-DNA war nicht beobachtet worden. Nach 30- und 90-minütiger Inkubation (t_{30} und t_{90}) wurde das Spermienchromatin und die damit assoziierten Centrosomen auf Deckgläschen reisoliert und zur Sichtbarmachung der centrosomalen Markerproteine C-Nap1 und Centrin einer Immunfluoreszfärbung unter Ver-

Abb. 18 (vorhergehende Seite): Die Depletion von xSmc1/xSmc3 bzw. Orc2 führt zur Ausbildung überzähliger Procentriolen, welche in engem Kontakt mit dem Muttercentriol verbleiben. A) Experimentelle Vorgehensweise. Zur immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse des centrosomalen Phänotyps wurden zu den markierten Zeitpunkten Proben genommen und die darin enthaltenen Centrosomen reisoliert. B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der *Xenopus*-Spermien-DNA zur Beurteilung der Extraktgüte (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 17). C) Um sicher zu gehen, dass der immundepletierte Extrakt nach halbstündiger Vorinkubation mit *Xenopus*-Spermienkernen und unmittelbar vor Ca^{2+} -Zugabe (t_0) noch immer in Metaphase II arretiert vorlag, erfolgte eine Begutachtung der Spermien-DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie. Um den Eintritt in Apoptose ausschließen zu können, wurde der Extrakt desgleichen nach mind. 90-minütiger Inkubation in S-Phase (t_{90}) analysiert. D) Zur Depletion von xSmc1/xSmc3 (Abb. D oben) bzw. xOrc2 (Abb. D unten) wurde der für gut befundene Extrakt mit einer Protein A-Matrix inkubiert, welche mit den Antikörpern anti-xSmc1/xSmc3 bzw. anti-xOrc2 vorbehandelt worden war. In beiden Fällen dienten Protein A-gekoppelte, unspezifische Antikörper (IgG) als Kontrolle. Zur Begutachtung der Depletionseffizienz wurden sowohl vom später weiter verwendeten CSF-Überstand (ÜS) als auch von der Protein A-Matrix (IP) SDS-Proben hergestellt und per Immunblot analysiert. Als Ladekontrolle für den CSF-Überstand diente α -Tubulin, in der Immunpräzipitation übernahmen die schweren Antikörperketten diese Funktion.

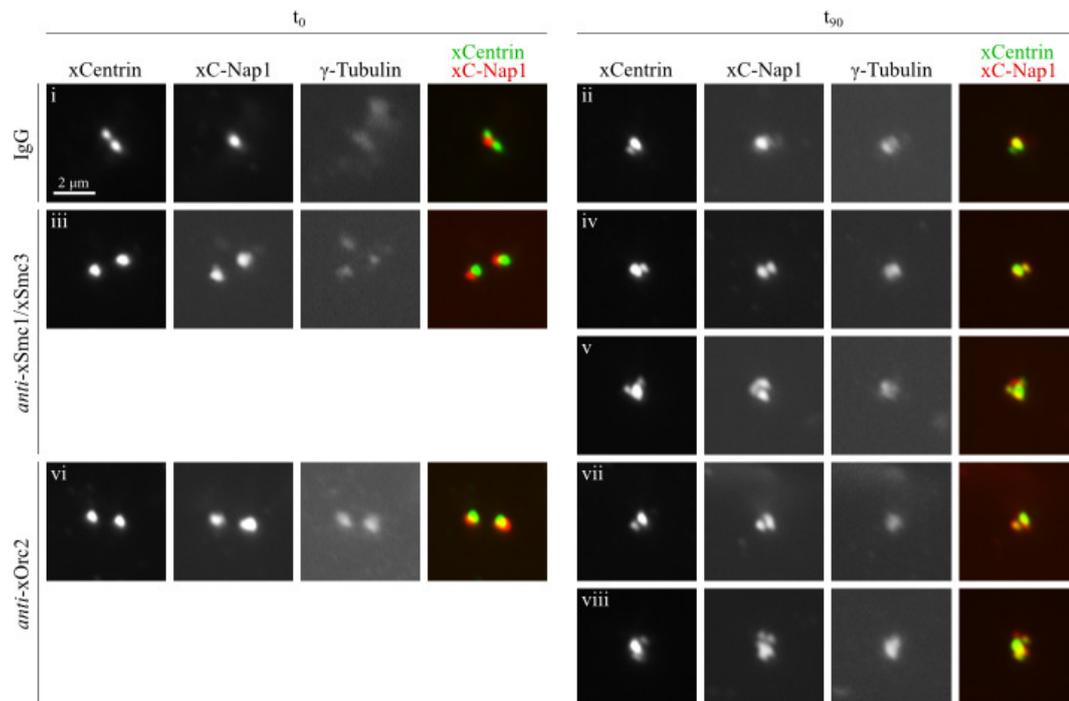


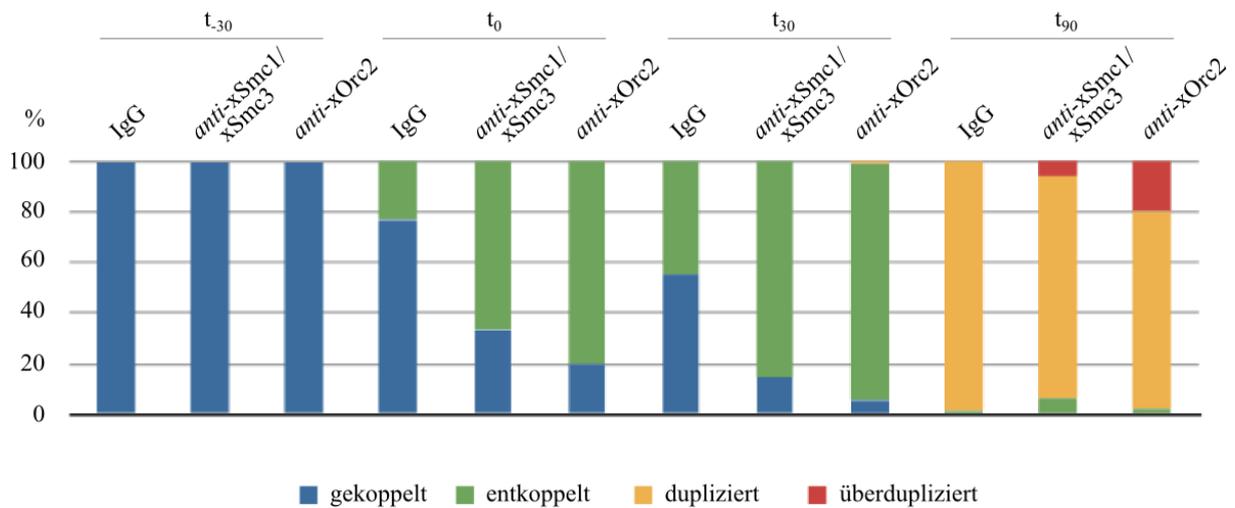
Abb. 19: Die Depletion von *xSmc1/xSmc3* bzw. *Orc2* führt zur Ausbildung überzähliger Procentriolen, welche in engem Kontakt mit dem Muttercentriol verbleiben. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *Xenopus*-Centrosomen, welche zum Zeitpunkt der Ca^{2+} -Zugabe (t_0) und nach Inkubationsende (t_{90}) aus *xSmc1/xSmc3*- bzw. *xOrc2*-depletiertem Extrakt reisoliert und unter Verwendung der Antikörper *anti-xC-Nap1*, *anti-hCentrin2* und *anti- γ -Tubulin* sichtbar gemacht worden waren. Als Kontrolle dienten Centrosomen welche aus IgG-behandeltem Extrakt rückgewonnen worden waren. Beobachtete Phänotypen: i) „gekoppelt“; ii) „dupliziert“; iii) „entkoppelt“; iv) „dupliziert“; v) „überdupliziert“; vi) „entkoppelt“; vii) „dupliziert“; viii) „überdupliziert“.

wendung der beiden Antikörper *anti-xC-Nap1* und *anti-hCentrin2* unterzogen. Als Kontrolle waren sowohl zum Zeitpunkt der Spermienzugabe (t_{-30}) als auch zu dem der Calciumzugabe (t_0) bereits Proben entnommen und für die Immunfluoreszenzanalyse aufbereitet worden. Die sich anschließende fluoreszenzmikroskopische Auswertung der angefertigten Proben erfolgte blind, wobei das Augenmerk zunächst auf dem morphologischen Erscheinungsbild von mindestens 100 willkürlich ausgewählten Centrosomen lag. Die beobachteten centrosomalen Phänotypen wurden vier verschiedenen Kategorien zugeordnet: „gekoppelt“, „entkoppelt“, „dupliziert“ und „überdupliziert“. In der entkoppelten Konfiguration entsprach das Verhältnis

A

		centrosomaler Phänotyp			
		gekoppelt	entkoppelt	dupliziert	überdupliziert
IgG	t ₋₃₀	100 (100)	-	-	-
	t ₀	85 (76,9)	25,5 (23,1)	-	-
	t ₃₀	60 (55,3)	48,5 (44,7)	-	-
	t ₉₀	-	1,5 (1,4)	104 (98,6)	-
<i>anti-xSmc1/xSmc3</i>	t ₋₃₀	100 (100)	-	-	-
	t ₀	48 (33,4)	95,5 (66,6)	-	-
	t ₃₀	19 (14,6)	111,5 (85,4)	-	-
	t ₉₀	-	7,5 (6,3)	104 (87,8)	7 (5,9)
<i>anti-xOrc2</i>	t ₋₃₀	100 (100)	-	-	-
	t ₀	23 (19,9)	92,5 (80,1)	-	-
	t ₃₀	6 (5,5)	101 (93,5)	1 (1,0)	-
	t ₉₀	-	2,5 (2,2)	87 (78,0)	22 (19,7)

B



von Centrinsignalen zu C-Nap1-Signalen 1 : 1, im gekoppelten Zustand hingegen 2 : 1. Auch für den Phänotyp „dupliziert“ können jedem Centrosom zwei Centrinsignale zugeordnet werden, dabei ist eines aber deutlich kleiner als das andere und entspricht dem neu assembliertem Procentriol. Beim Phänotyp „überdupliziert“ werden für das entsprechende Centrosom zwei oder mehrere solcher kleineren Centrinsignale beobachtet, woraus geschlussfolgert werden konnte, das hier mehr als nur ein einziges Procentriol ausgebildet worden war. In Abbildung 19 sind Beispiele der unter den jeweiligen Bedingungen am häufigsten auftretenden centrosomalen Phänotypen zum Zeitpunkt der Calcium-Zugabe (t_0) und nach Inkubationsende (t_{90}) gezeigt, und in Abbildung 20 sind die Ergebnisse der quantitativen Auszählung von ca. 100 Centrosomen für jede Probe zusammengefasst.

Xenopus-Spermienkerne selbst bringen kernmembran-assoziierte Centrosomen mit, welche in der gekoppelten Konfiguration vorliegen und erwartungsgemäß wurden unmittelbar nach Spermienzugabe (t_{-30}) in allen drei Proben auch nur solche Centrosomen gefunden. Nach halbstündiger Inkubation im Extrakt (t_0) befanden sich die Centriolen aus der unspezifischen Depletion noch immer größtenteils im gekoppelten Zustand, ca. 23 % jedoch waren bereits entkoppelt. In den xSmc1/xSmc3- bzw. xOrc2-depletierten Proben stieg der Anteil an Centrosomen, welche dem Phänotyp „entkoppelt“ zugeordnet werden konnten, sogar noch an (67 bzw. 80 %). Dies war so nicht erwartet worden, denn im bestehenden CSF-Arrest sollte die gekoppelte Konfiguration eines Centrosoms aufrecht erhalten bleiben und erst mit dem Eintritt in Interphase sollten sich die beiden Centriolen eines Centrosoms voneinander trennen, um an ihrer Basis die Assemblierung neuer Procentriolen zu ermöglichen. Obwohl die Aufrechterhaltung des CSF-Arrests fluoreszenzmikroskopisch verifiziert werden konnte (vgl. Abbildung 18C), war es möglicherweise

Abb. 20 (vorhergehende Seite): Die Depletion von xSmc1/xSmc3 bzw. Orc2 führt zur Ausbildung überzähliger Procentriolen, welche in engem Kontakt mit dem Muttercentriol verbleiben. A) Zu den jeweiligen Probeentnahmezeitpunkten wurden ca. 100 aus den spezifisch immundepletierten Extrakten reisolierte Centrosomen ihrem Erscheinungsbild nach in die Kategorien „gekoppelt“, „entkoppelt“, „dupliziert“ und „überdupliziert“ eingeteilt (nähere Erläuterungen siehe Text) und sowohl die Absolut- als auch die Prozentualwerte (in Klammern) tabellarisch erfasst. B) Graphische Darstellung der Auszählergebnisse für die verschiedenen immundepletierten Extrakte in Form eines Säulendiagramms.

unmittelbar vorher zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration im Extrakt gekommen, welche zwar auf DNA-Ebene noch keine Effekte gezeigt, im Extrakt aber die räumliche Trennung der Centriolen bewirkt hatte. Da Cohesin erst zu Ende der Mitose und mit Eintritt in die S-Phase an die Centrosomen rekrutiert werden sollte, ist es nur schwer erklärbar, warum durch dessen Fehlen dieser Effekt noch verstärkt wird. Chromosomal gebundenes Cohesin verbleibt nach Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion und vermittelt durch die Acetyltransferase Eco1 während der G2- und zu Beginn der M-Phase stabil an die DNA assoziiert. Möglicherweise verhält sich centrosomal lokalisiertes Cohesin auch während dieser Zellzyklusphasen dynamisch, sodass ein enger Zusammenhalt der beiden Centriolen eines Centrosoms eine stetige Neubeladung von Cohesin erfordert. Dies würde durch die Immundepletion von xSmc1/xSmc3 bzw. seines potenziellen Rekrutierungsfaktors xOrc2 verhindert und der Phänotyp „entkoppelt“ somit forciert. Mit fortschreitender Interphase (t_{30}) gingen dann erwartungsgemäß in allen drei Proben immer mehr Centrosomen von der gekoppelten in die entkoppelte Konfiguration über, und nach 90-minütiger Inkubation konnte beim überwiegenden Teil der Centrosomen die Neuassemblierung eines Tochtercentriols beobachtet werden. Während in der Kontrolle sowohl das größere (welches dem Muttercentriol entsprach) als auch das kleinere Centrin signal (welches das Tochtercentriol widerspiegelte) nur einem einzigen C-Nap1-Signal zugeordnet werden konnten, wurden nach xSmc1/xSmc3- bzw. xOrc2-Depletion zumeist zwei C-Nap1-Signale beobachtet (vgl. Abb. 19 (iv) und (vii)), was für einen geschwächten Zusammenhalt von Mutter- und Tochtercentriol innerhalb eines Centrosoms spricht. Zusätzlich wurden in diesen Proben Centrosomen gefunden, welche mehr als zwei Centrin signale aufwiesen (vgl. Abb. 19 (v) und (viii)), der Anteil dieser überduplizierten Centrosomen entsprach 6 % nach xSmc1/xSmc3- und sogar 22 % nach xOrc2-Depletion. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass nach Eliminierung von Cohesin oder Orc2 eine vorzeitige Trennung von Mutter- und Tochtercentriolen induziert wird, obwohl letztere noch nicht vollständig assembliert worden sind.

Das oben beschriebene Experiment wurde noch zweimal wiederholt (vgl. Abb. 34 bis 37 im Anhang), wobei im Unterschied zum ersten Versuchsablauf eine zweistündige Inkubation in Interphase möglich wurde. In den Wiederholungen wurde

die Entkopplung von Mutter- und Tochtercentriol ebenfalls schon vor dem Ca^{2+} -induzierten Eintritt in die Interphase beobachtet, eine Verstärkung dieses Effekts in Abwesenheit von xSmc1/xSmc3 bzw. xOrc2 ließ sich jedoch nicht bestätigen. Reproduzierbar war hingegen auch in den Wiederholungsexperimenten der Anteil an überduplizierten Centrosomen nach Eliminierung von xSmc1/xSmc3 (22 und 12 %) bzw. xOrc2 (21 und 17 %) deutlich höher als in der Kontrolle, wenngleich in der zweiten Wiederholung immerhin 5 % überduplizierte Centrosomen nach Reisolierung aus unspezifisch depletiertem Extrakt detektiert worden waren. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist in der Tatsache zu sehen, dass sowohl in bestimmten Zelltypen und Modellsystemen als auch unter definierten Versuchsbedingungen eine Trennung von Chromosomen- und Centrosomenzyklus zu verzeichnen ist. Unter gewissen Umständen kann also die Replikation der DNA zum Erliegen kommen, während die Centrosomen unvermindert weiter dupliziert werden. Wie bereits erwähnt, lässt sich eine Entkopplung dieser beiden Prozesse im Aphidicolin-vermittelten S-Phase-Arrest beobachten, und auch für den durch Cycloheximid herbeigeführten Arrest in Interphase wird eine Aufrechterhaltung der Centrosomenduplikation beschrieben (vgl. auch [135, 265]). Da der Anteil an überduplizierten Centrosomen nach Depletion von xSmc1/xSmc3 bzw. xOrc2 aber stets deutlich höher lag als unter Kontrollbedingungen, ließ sich als allen drei Experimenten dennoch die Schlussfolgerung ziehen, dass sowohl die Abwesenheit von Cohesin selbst als auch die seines möglichen Rekrutierungsfaktors Orc2 eine moderate Überduplikation von Centrosomen zur Folge hat.

Wie in Abbildung 19 dargestellt konnten nach Reisolierung von duplizierten und überduplizierten Centrosomen aus xSmc1/xSmc3- bzw. xOrc2-depletiertem Extrakt jedem Centrosom nicht wie erwartet nur ein, sondern zwei oder gar mehrere C-Nap1-Signale zugeordnet werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass sich der Kontakt zwischen Mutter- und Tochtercentriol in Abwesenheit von Cohesin bereits vor oder während der Duplikation gelockert hatte. Bedingt durch die hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten im Zuge der Centrosomenreisolierung waren diese Kontakte möglicherweise vollständig gelöst worden. Unter dieser Annahme sollten in den Proben, welche aus xSmc1/xSmc3- bzw. xOrc2-depletiertem Extrakt gewonnen worden waren, mehr Centrosomen zu finden sein als in denen

aus der unspezifischen Depletion. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde wiederum CSF-Extrakt hergestellt und hinsichtlich seines Ca^{2+} -induzierbaren Übergangs in Interphase getestet: In Gegenwart von Calciumionen dekondensierte das Spermienchromatin und bildete typische Interphasekerne, während gleichzeitig die Disassemblierung der metaphasischen (Pseudo-)Spindeln und die Ausbildung von interphasischen Mikrotubuli beobachtet werden konnte. Die weitere Vorgehensweise entsprach der oben bereits geschilderten für die qualitative Analyse, nur dass dieses Mal nach Centrosomenreisolierung aus Extrakt und Anfärbung der centrosomalen Markerproteine xC-Nap1 und xCentrin die Gesamtzahl der auf einem Sektor definierter Größe befindlichen Centrosomen (egal welchen Phänotyps) ermittelt wurde. In Tabelle 1 sind die bei der quantitativen Auszählung ermittelten Werte zusammengestellt, und die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind den Abbildungen 21 sowie 36 bis 39 (siehe Anhang) zu entnehmen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in allen vier Wiederholungen nach Ende der Inkubationszeit in S-Phase (t_{100}) die absolute Anzahl von Centrosomen nach Eliminierung von xSmc1/xSmc3 bzw.

Abb. 21 (vorhergehende Seite): In Abwesenheit von xSmc1/xSmc3 oder xOrc2 werden mehr Centrosomen detektiert: **Experiment 2.** A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Beurteilung der Extraktgüte, wobei die Spermien-DNA mit DAPI und die Mikrotubuli mit Rhodamin-markiertem Tubulin sichtbar gemacht wurden. In Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen lag das Spermienchromatin stark kondensiert vor und es bildeten sich mitotische (Pseudo-)Spindeln aus. Infolge der Ca^{2+} -Zugabe dekondensierte die Spermien-DNA, was in der Entstehung interphasischer Kerne resultierte. Gleichzeitig wurde eine Disassemblierung der mitotischen (Pseudo-)Spindeln unter Ausbildung des typischen interphasischen Cytoskeletts beobachtet. B) Nach 30-minütiger Vorinkubation mit *Xenopus*-Spermien-DNA und unmittelbar vor Ca^{2+} -induziertem Eintritt in Interphase (t_0) wurde der immundepletierte Extrakt fluoreszenzmikroskopisch untersucht, um den bis dahin bestehenden Arrest in Metaphase II zu garantieren. Ebenso wurde der Extrakt nach 100-minütiger Inkubation in S-Phase (t_{100}) analysiert, wodurch ein apoptotisches Verhalten des Extraktes ausgeschlossen werden konnte. C) Zur Depletion von xSmc1/xSmc3 (Abb. C oben) bzw. xOrc2 (Abb. C unten) wurde der für gut befundene Extrakt mit einer Protein A-Matrix inkubiert, welche mit den Antikörpern anti-xSmc1/xSmc3 bzw. anti-xOrc2 vorbehandelt worden war. Sowohl vom später weiter verwendeten CSF-Überstand (ÜS) als auch von der Protein A-Matrix (IP) wurden SDS-Proben hergestellt und per Immunblot analysiert, um die Depletionseffizienz beurteilen zu können. Als Ladekontrolle für den CSF-Überstand diente α -Tubulin, in der Immunpräzipitation übernahmen die schweren Antikörperketten diese Funktion. D) Graphische Darstellung der quantitativen Analyse in Form eines Säulendiagramms. Hierbei wurden die zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelten Absolutwerte der Centrosomenanzahl nach Kontrolldepletion (siehe Tab. 1) 100 % gleichgesetzt und mit denen nach xSmc1/xSmc3- bzw. xOrc2-Depletion verglichen.

Tab. 1: Zusammenfassung der bei der quantitativen Analyse ermittelten Centrosomengesamtzahlen. Aus *xSmc1/xSmc3*- bzw. *xOrc2*-depletiertem Extrakt wurden Centrosomen auf Deckgläschen reisoliert und nach Fluoreszenzfärbung der centrosomalen Markerproteine *xC-Nap1* und *xCentrin* wurden sämtliche auf einer definierten Fläche dieses Deckgläschens befindlichen Centrosomen gezählt. Als Kontrolle dienten Centrosomen, welche aus unspezifisch depletiertem Extrakt reisoliert worden waren. Die ebenfalls angegebene, relative Centrosomenzahl gibt das Verhältnis aus Centrosomenanzahl zu Experimentende (t_{100}) und der zu Experimentbeginn (t_{-30}) wieder. Für Experiment #1 wurden die Proben aus der zweiten Wiederholung der qualitativen Analyse (vgl. Abb. 36 und 37) noch einmal unter quantitativen Gesichtspunkten ausgewertet, die Einzelexperimente #2, #3 und #4 sind in den Abbildungen 21, 38 und 39 zusammengestellt.

	Gesamtzahl der detektierten Centrosomen			relative Centrosomenzahl		
	IgG-Kontrolle	<i>anti-xSmc1/xSmc3</i>	<i>anti-xOrc2</i>	IgG-Kontrolle	<i>anti-xSmc1/xSmc3</i>	<i>anti-xOrc2</i>
Experiment #1	t_{-30}	3427	3789	0,145	0,248	0,275
	t_{100}	496	938			
Experiment #2	t_{-30}	4576	4402	0,125	0,173	0,207
	t_{100}	571	761			
Experiment #3	t_{-30}	3096	3157	0,132	0,196	0,223
	t_{100}	409	619			
Experiment #4	t_{-30}	2736	2572	0,125	0,171	-
	t_{100}	343	441			

Anmerkung: Erfahrungsgemäß pelletieren Centrosomen unmittelbar nach Spermienzugabe deutlich besser als solche, die zu späteren Zeitpunkten aus dem Extrakt reisoliert werden, da sie noch in engem Kontakt mit dem Chromatin stehen, während bei letzteren der Kontakt zur Spermien-DNA verloren gegangen ist. Deshalb werden nach Inkubationsende ($t_{100/120}$) weniger Centrosomen gezählt als unmittelbar nach Zugabe des Spermienchromatins (t_{-30}), obwohl prinzipiell davon auszugehen ist, dass sich die Centrosomenzahl im Zuge der Centrosomenduplikation während der S-Phase erhöht.

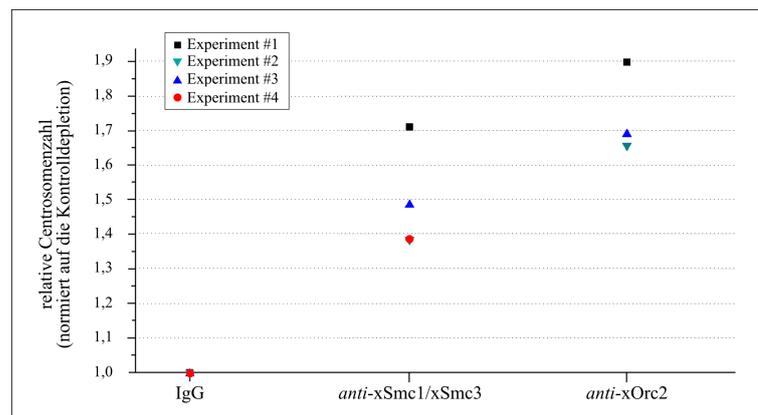


Abb. 22: Graphische Auftragung der in Tabelle 1 zusammengefassten Werte für die aus der *xSmc1/xSmc3*- bzw. *xOrc2*-Depletion erhaltenen relativen Centrosomenzahl nach Normierung auf den für die Kontrolldepletion erhaltenen Wert für alle vier durchgeführten Einzelerperimente.

xOrc2 deutlich höher war als in der Kontrolle. Dahingegen waren zu Experimentbeginn, unmittelbar nach Spermienzugabe (t_{-30}), sowohl in den *xSmc1/xSmc3*- bzw. *xOrc2*-depletierten Proben als auch in der unspezifisch depletierten Kontrolle erwartungsgemäß etwa gleich viele Centrosomen gezählt worden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente wurde zudem für jede Probe die relative Centrosomenzahl bestimmt (siehe auch Tab. 1), welche dem Quotienten aus absoluter Centrosomenzahl bei Inkubationsende und der zu Experimentbeginn entsprach:

$$\text{relative Centrosomenzahl} = \frac{\text{Gesamtzahl detektierter Centrosomen bei } t_{100}}{\text{Gesamtzahl detektierter Centrosomen bei } t_{-30}}$$

Der hierbei ermittelte Wert für die unspezifische Kontrolldepletion gibt den zu erwartenden Verlust von Centrosomen infolge der Inkubations- und Präparationsbedingungen im jeweiligen Experiment wieder (siehe auch Anmerkung in Tab. 1). Wird die erhaltene relative Centrosomenzahl der *anti-xSmc1/xSmc3*- bzw. *anti-xOrc2*-behandelten Proben auf diesen Wert normiert, so ergibt sich die in Abbildung 22 zusammengefasste Darstellung. Hierbei wird deutlich, dass nach Immunodepletion der Cohesinkomponenten *xSmc1* und *xSmc3* etwa 40 bis 70 % mehr

Centrosomen detektierbar waren als unter Kontrollbedingungen. Ebenso war nach Eliminierung von xOrc2 eine deutliche Zunahme der Centrosomenanzahl um etwa 60 bis 90 % zu verzeichnen.

Somit lässt sich sowohl nach qualitativer Analyse unter Berücksichtigung des centrosomalen Phänotyps als auch nach quantitativer Analyse mit Fokus auf der Gesamtanzahl detektierbarer Centrosomen schlussfolgern, dass die Abwesenheit von Cohesin eine Überduplikation von Centrosomen zur Folge hat. Desgleichen resultierte die Eliminierung von xOrc2 in der Beobachtung überduplizierter Centrosomen, was die Vermutung nahe legt, dass der *Origin Recognition Complex* oder zumindest Teile davon im *Xenopus*-System nicht nur für die korrekte chromosomale Lokalisierung von Cohesin vonnöten sind, sondern letzteres auch an die Centrosomen dirigieren und somit einer Überduplikation entgegenwirken.

3.2 Kommt dem Multiproteinkomplex Condensin eine funktionelle Bedeutung bei der Chromatinreorganisation am Übergang von M- zu S-Phase zu?

Wie eingangs bereits ausführlich erläutert, ist schon seit geraumer Zeit bekannt, dass durch die Vorinkubation eines somatischen, ausdifferenzierten Zellkerns in mitotischer Umgebung die Effizienz nachfolgender Kerntransferexperimente maßgeblich verbessert werden kann. Als eine mögliche Ursache hierfür wird vermutet, dass die Chromatinstruktur des Donorzellkerns in der mitotischen Umgebung optimal auf die sich anschließenden schnellen Teilungen der frühen Embryonalentwicklung angepasst wird. Welche Faktoren neben der bereits identifizierten Topoisomerase II α ([247, 260]) an dieser Restrukturierung noch beteiligt sind, ist bislang weitgehend ungeklärt. Der ringförmige Condensinkomplex bietet sich allerdings als möglicher Kandidat geradezu an, spielt er doch bei der strukturellen und funktionellen Organisation des Chromatins eine entscheidende Rolle und arbeitet hierbei eng mit Topoisomerase II zusammen [203, 204]. Deshalb sollte im Rahmen dieses Teilprojekts der Frage nachgegangen werden, ob nach Eliminierung von Condensin die Umstrukturierung des Chromatins, welches der somatische Donorzellkern mitbringt, zumindest teilweise zum Erliegen kommt. Die Depletion von Topoisomerase könnte hierfür als Positivkontrolle fungieren. Darum waren sowohl für den Condensinkomplex als auch für Topoisomerase II α aus *Xenopus laevis* depletionsfähige Antikörper zu generieren. Weiterhin waren zur Klärung dieser Fragestellung zwei Methoden zu etablieren, welche am hiesigen Lehrstuhl bisher nicht zur Anwendung gekommen waren: Mittels molekularem *Combing* sollte der Abstand zwischen einzelnen Replikationsursprüngen ermittelt werden, denn aus dieser Distanz lässt sich auf die Dichte von Verbindungsstellen zwischen DNA und Chromatingerüst und damit indirekt auf den Packungsgrad des Chromatins schließen. Weiterhin war als eine mögliche Methode zur direkten Bestimmung der Größe von DNA-Schleifen die *Maximum Fluorescence Halo Technique* (MFHT) zu etablieren.

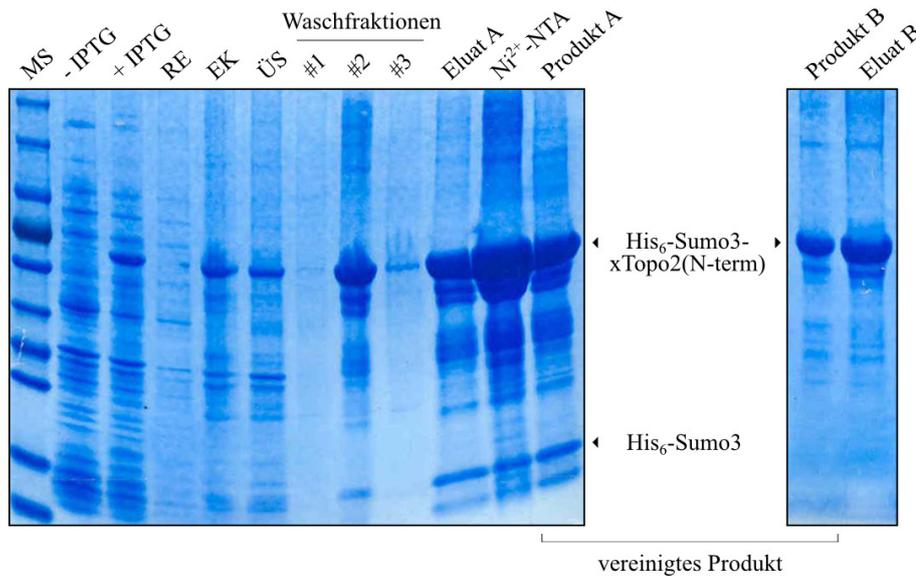


Abb. 23: SDS-PAGE welche die bakterielle Expression und nachfolgende Affinitätsreinigung eines N-terminalen *xTopoisomerase II*-Fragments dokumentiert. Da sich das Fusionsprotein als unlöslich erwies, erfolgte die Ni^{2+} -Chelatchromatografie unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 6 M Guanidiniumhydrochlorid. Der Überstand der Affinitätsreinigung (ÜS) wurde einer weiteren Ni^{2+} -Chelatchromatografie unterzogen, woraus sich Eluat und Produkt B ergaben. Produkt A und B wurden vereinigt und anschließend zur Immunisierung verwendet. MS: Molekulargewichtsstandard; - IPTG: aufgekochte *E. coli*-Zellen vor IPTG-Induktion; + IPTG: aufgekochte *E. coli*-Zellen nach IPTG-Induktion; RE: lösliches Gesamtzelllysate; EK: (unlöslicher) Einschlusskörper; ÜS: Überstand nach Inkubation mit der Affinitätsmatrix; Ni^{2+} -NTA: die im Anschluss an die Affinitätsreinigung aufgekochte Ni^{2+} -NTA-Matrix.

3.2.1 Aufreinigung und Charakterisierung benötigter Antikörper

3.2.1.1 Aufreinigung und Charakterisierung eines gegen *xTopo2* gerichteten Antikörpers

Um einen gegen *Xenopus* Topoisomerase II α gerichteten, polyklonalen Antikörper zu generieren, wurde mit Hilfe geeigneter PCR-Primer ein N-terminales Fragment von *xTOPO2* aus einer cDNA-Bibliothek von *Xenopus laevis* herausamplifiziert und als 60 kDa großes His₆-Sumo3-Fusionsprotein exprimiert (siehe Abb. 23). In vielen Fällen vermittelt die Sumo-Markierung ein verbessertes Löslichkeitsverhalten des anfusionierten Proteins (O. Stemmann, persönliche Mitteilung), was jedoch für His₆-Sumo3-*xTopo2*(N-term) nicht zutraf, denn während im löslichen Rohlysate

nur Spuren nachgewiesen werden konnten, war der überwiegende Teil des exprimierten Proteins im unlöslichen Einschlusskörper angereichert worden. Deshalb erfolgte die Affinitätsreinigung unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 6 M Guanidiniumhydrochlorid, was jedoch die Senp2-vermittelte Abspaltung der Affinitätsmarkierung unmöglich machte. Im fertigen Produkt waren noch zahlreiche Nebenbanden verhältnismäßig starker Intensität nachweisbar. Da jedoch in der Präparation des solubilisierten Einschlusskörpers auf der entsprechenden Höhe keine vergleichbaren Banden detektiert wurden, war davon auszugehen, dass es sich hierbei größtenteils um C-terminale Degradationsprodukte handelte, welche den Erfolg der späteren Immunisierung nicht schmälern sollten. Das vereinigte Produkt wurde in präzipitierter Form zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet. Bereits beim Testen der Immunsereen wurden im Immunblot keine spezifischen Banden auf der erwarteten Höhe für xTopoisomerase II erhalten (nicht gezeigt), doch bestand die Möglichkeit, dass eine Anreicherung der gegen xTopo2 gerichteten Antikörper im Zuge der Affinitätsreinigung in stärkeren Signalen resultieren könnte. Es war zu erwarten, dass während der Immunisierung nicht nur die gewünschten, gegen xTopo2(N-term) gerichteten Antikörper gebildet worden waren, sondern auch solche gegen die His₆-Sumo3-Markierung. Deshalb wurde das N-terminale xTopo2-Fragment zunächst in den Vektor pET28M-His₁₀-FA umkloniert, welcher für His₁₀-markierte Fusionskonstrukte codiert und somit die negative Selektion von *anti*-Sumo3-Antikörpern ermöglichen sollte. Das rekombinant exprimierte Fusionsprotein wurde ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen, diesmal allerdings in Gegenwart von 8 M Harnstoff aufgereinigt und zur Herstellung einer Affinitätssäule an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt (nicht gezeigt). Der Affinitätsreinigung des finalen Serums wurde zudem eine weitere Affinitätssäule vorgeschaltet, welche mit dem Fusionskonstrukt His₆-Sumo1-IBB-EGFP gekoppelt worden war und somit die gegen die Polyhistidinmarkierung gerichteten Antikörper weitgehend aus dem Serum herausfiltern sollte. Doch auch nach Aufreinigung der Immunsereen konnte mit den generierten Antikörperlösungen kein spezifisches Signal für xTopoisomerase II im Immunblot detektiert werden (ebenfalls nicht gezeigt), sodass davon ausgegangen werden musste, dass die Immunisierung mit denaturiertem Protein fehlgeschlagen war. Neben der Tatsache dass hier denaturiertes und damit fehlgefaltetes Protein zur Immunisierung verwendet

worden war, könnte eine weitere Ursache für die schlechte Immunisierbarkeit in der starken Sequenzübereinstimmung des N-terminalen Bereichs von Topoisomerase II α zwischen *X. laevis* und Kaninchen zu suchen sein (siehe auch Abb. 40 im Anhang). Zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen war eine adäquate Immunantwort im Wirtstier deshalb möglicherweise unterdrückt worden. Da für das Enzym Topoisomerase II α gut etablierte und kommerziell erhältliche Inhibitoren (z. B. ICRF193) verfügbar sind, wurde auf einen weiteren Versuch zur Generierung eines depletionsfähigen *anti*-xTopo2-Antikörpers verzichtet.

3.2.1.2 Aufreinigung und Charakterisierung von Antikörpern, welche gegen die Condensin-Untereinheiten xSmc2 und xSmc4 gerichtet sind

Um den aus mehreren Untereinheiten bestehenden Ringkomplex Condensin aus CSF-Extrakt depletieren zu können, waren weiterhin zwei gegen dessen Smc-Komponenten xSmc2 und xSmc4 gerichtete Antikörper zu generieren. Als antigene Determinante wurde hierzu für xSmc2 ein C-terminales und für xSmc4 ein N-terminales Peptid ausgewählt. Zur Steigerung der Immunogenität waren beide synthetischen Peptide an KLH gekoppelt worden, bevor sie bei der anschließenden Immunisierung zum Einsatz kamen. Hierbei konnten zwei *anti*-xSmc2-Antiseren und ein *anti*-xSmc4-Antiserum gewonnen werden. Unter Verwendung derselben Peptide wurden zwei Affinitätssäulen hergestellt, welche es erlaubten, die gewünschten *anti*-xSmc2- bzw. -xSmc4-Antikörper aus diesen Antiseren anzureichern und aufzureinigen (nicht gezeigt). Die Fähigkeit der drei Antikörper zur Immunodepletion ihres jeweiligen Antigens sollte anschließend überprüft werden. Hierzu waren 20 μ g des jeweiligen Antikörpers (Ak1 und Ak2 gerichtet gegen xSmc2 bzw. Ak4 gerichtet gegen xSmc4) an eine magnetische Protein A-Matrix gekoppelt und danach mit 45 μ l frisch präpariertem CSF-Extrakt inkubiert worden. Um eine vollständige Depletion des jeweiligen Antigens zu garantieren, wurde der verbleibende Überstand anschließend unter Verwendung einer frisch gekoppelten Protein A-Matrix einer weiteren Depletionsrunde unterzogen. Wie in Abbildung 24 gezeigt, war im Falle der beiden, gegen xSmc2 gerichteten Antikörper bereits eine einmalige Immunodepletion ausreichend, um die entsprechende Condensinkomponente quantitativ aus dem Extrakt zu entfernen (Bahn 4 und 6 in Abb. 24 oben). Erwartungsgemäß wurde das ebenfalls dem Condensinkomplex zugehörige Protein xSmc4 code-

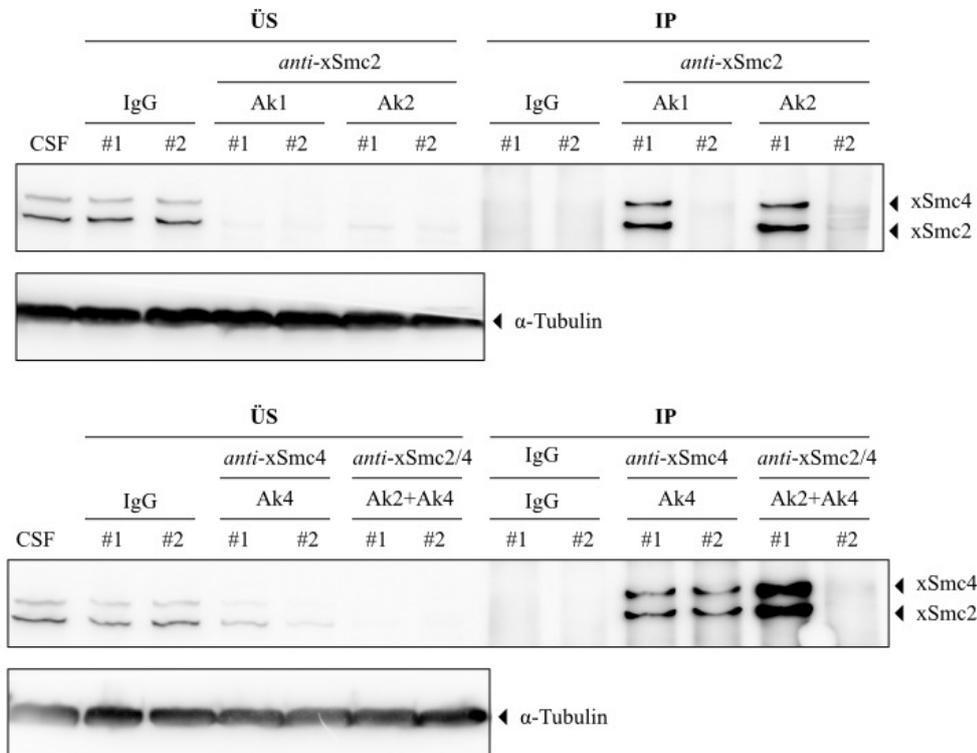


Abb. 24: Die generierten Peptidantikörper immunpräzipitieren die beiden Condensinkomponenten *xSmc2* und *xSmc4* aus CSF-Extrakt. In einer ersten Depletionsrunde (#1) wurde frisch präparierter CSF-Extrakt mit magnetischen Protein A-Dynabeads[®] inkubiert, welche mit jeweils 20 µg der beiden, gegen *xSmc2* gerichteten Antikörper (Ak1 bzw. Ak2) oder aber mit 20 µg des gegen *xSmc4* gerichteten Antikörpers (Ak4) vorbehandelt worden waren. In einem vierten Ansatz (Ak2+Ak4) waren beide, gegen den Condensinkomplex gerichteten Antikörper, anti-*xSmc2* und anti-*xSmc4*, an die Protein A-Matrix gekoppelt worden, wobei 20 µg einer 1 : 1-Mischung beider Antikörper zum Einsatz kamen. Zur vollständigen Eliminierung der beiden Condensinkomponenten wurde der Extrakt einer weiteren Depletionsrunde (#2) mit den jeweiligen frisch gekoppelten Protein A-Matrizes unterzogen. Die mit unspezifischen IgG gekoppelte Protein A-Matrix diente als Negativkontrolle. Anschließend waren sowohl vom Überstand (ÜS) als auch von der Protein A-Matrix (IP) Proben genommen und per Immunblot ausgewertet worden, wobei α-Tubulin als Ladekontrolle fungierte.

pletiiert. Ebenso konnte in der Immundepletion von xSmc4 eine Codepletion von xSmc2 beobachtet werden. Allerdings schien die Effizienz des entsprechenden *anti*-xSmc4-Antikörpers zur Eliminierung beider Condensinkomponenten etwas geringer zu sein, denn nach einmaliger Immundepletion ließen sich im Überstand noch deutliche Smc2- und Smc4-Signale nachweisen, welche auch im Zuge der zweiten Depletionsrunde nicht vollständig verschwanden (Bahn 4 und 5 in Abb. 24 unten). Unterstützt wird diese Vermutung durch die IP-Präparationen, denn während beider Depletionsrunden wurden etwa gleiche Proteinmengen (co-)depletiert (Bahn 10 und 11 in Abb. 24 unten), sodass davon auszugehen ist, das auch nach zweimaliger Immundepletion unter Verwendung des *anti*-xSmc4-Antikörpers noch Reste von Condensin im Extrakt zu verzeichnen waren. Im Gegensatz dazu war bereits die einmalige Immundepletion unter Verwendung einer 1 : 1-Mischung von jeweils 10 µg *anti*-xSmc2 und *anti*-xSmc4 ausreichend, um dem Extrakt beide Condensinkomponenten vollständig zu entziehen, weshalb in zukünftigen Experimenten auf diese Bedingungen zurückgegriffen werden sollte. Weder für Smc2 noch für Smc4 war eine Interaktion mit unspezifischen Immunglobulinen festgestellt worden.

3.2.2 Etablierung des molekularen *Combings*

Bei dieser Methode werden idealerweise komplette DNA-Stränge entlang einer hydrophoben Glasoberfläche aufgespannt, was die direkte Visualisierung und Analyse einzelner DNA-Moleküle erlaubt. In einem ersten Versuch wurden *Xenopus*-Spermienkerne vorsichtig in 1×PBS ($2 \cdot 10^7$ Kerne/ml) aufgenommen und zur Verringerung der auf die chromosomale DNA einwirkenden Scherkräfte in Agarose eingebettet. Nach Proteolyse der Chromatin-assoziierten Proteine (Histone u. a.) und Anfärbung der DNA mit YOYO-1 war die Agarose geschmolzen und die chromosomale DNA wieder in Lösung gebracht worden. In diese Lösung wurden anschließend silanisierte Deckgläschen getaucht und nach kurzer Inkubationszeit mit einer konstanten Geschwindigkeit von 300 µm/s wieder herausgezogen. Vermutlich bedingt durch die Präsenz einer freien und protoniert vorliegenden Phosphatgruppe am 5'-Ende, weisen die Enden der DNA-Moleküle eine hohe Bindungsspezifität zu den endständigen Vinylgruppen der Silanmoleküle auf. Somit werden während der Inkubation die DNA-Enden an die Glasoberfläche gebunden und infolge des

Herausziehens aus der Lösung übt der Meniskus (die Grenzfläche zwischen DNA-Lösung und Luft) eine konstante Zugkraft auf den noch in Lösung befindlichen Teil der DNA-Moleküle aus. Als Ergebnis werden irreversibel an der Glasoberfläche fixierte, einheitlich gedehnte und parallel ausgerichtete DNA-Fasern erhalten (siehe Abb. 25).

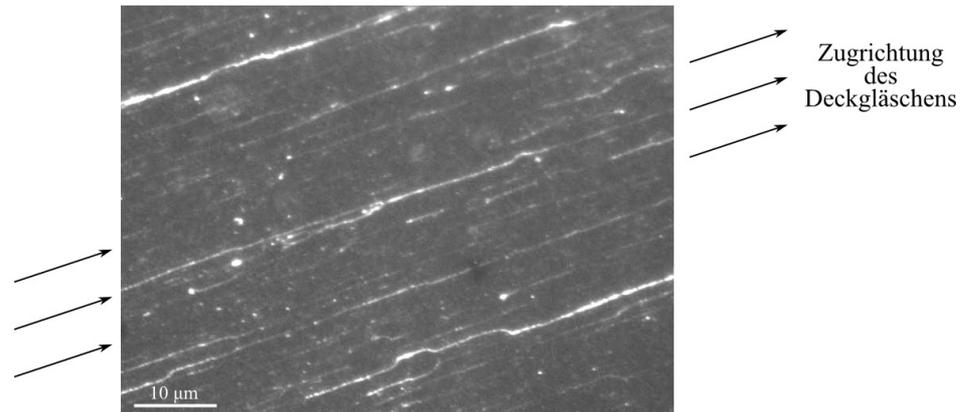
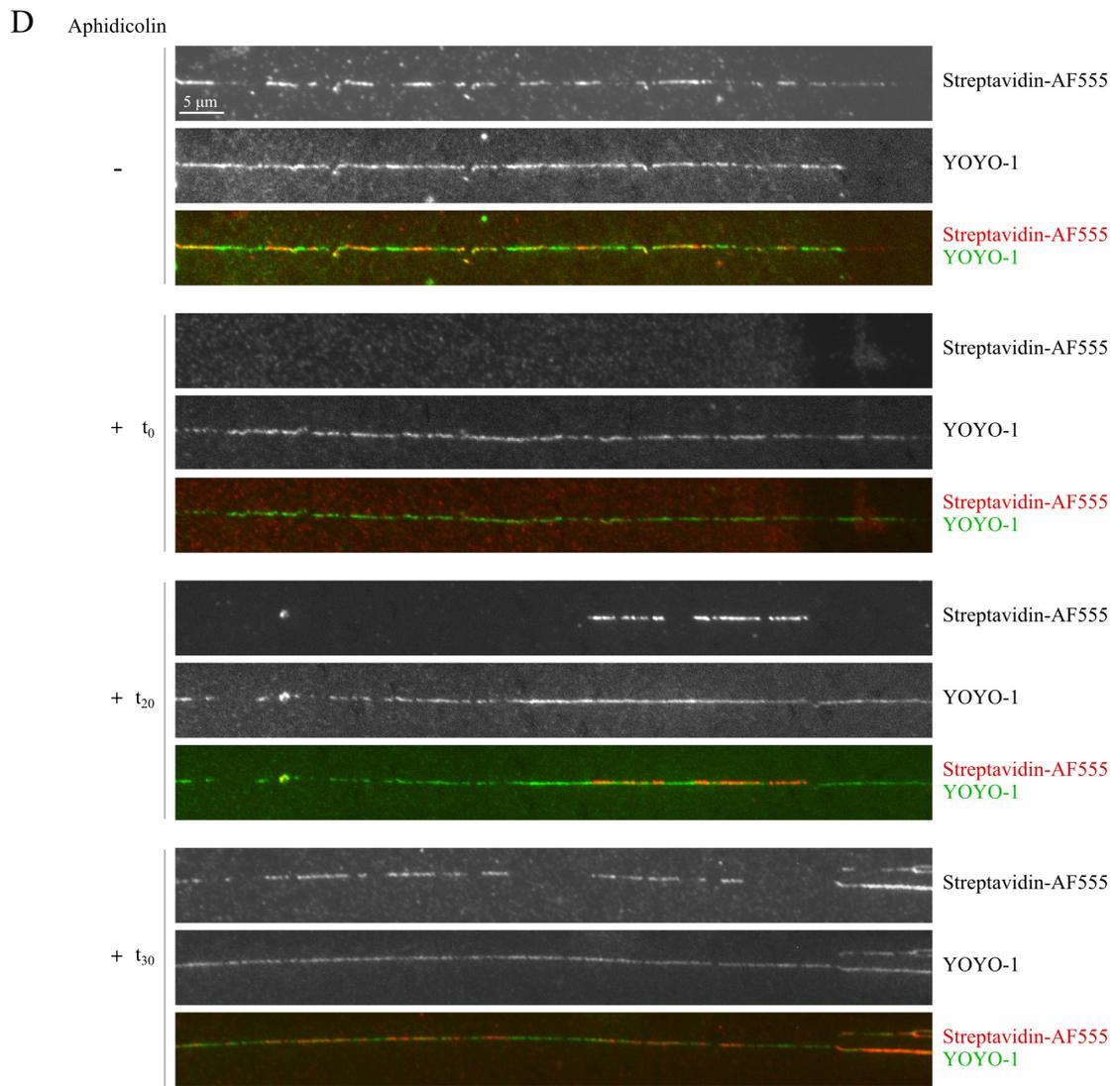
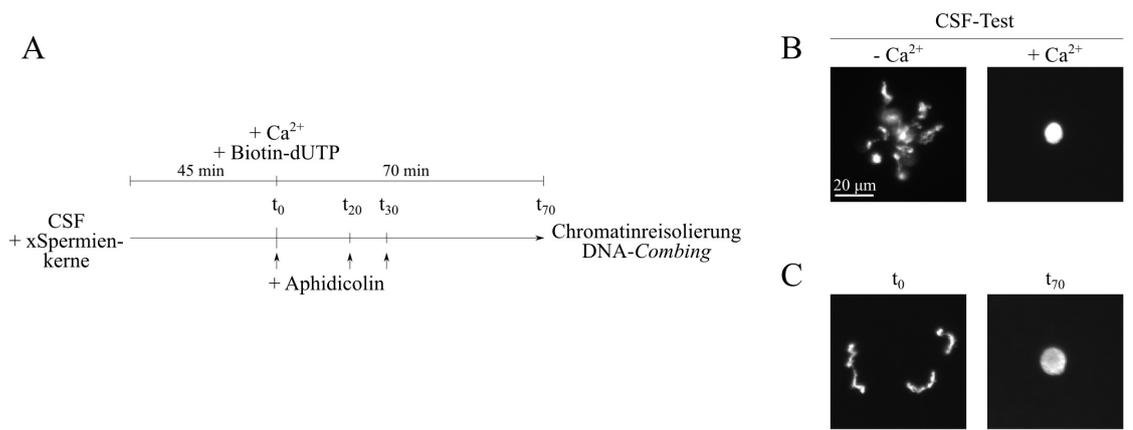


Abb. 25: Molekulares Combing von YOYO-1-gefärbter Spermien-DNA aus *Xenopus laevis*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte molekulares *Combing* verwendet werden, um den Abstand zwischen Replikationsursprüngen bestimmen zu können. Da in der G1-Phase (bzw. während der frühen Embryogenese in Telophase) nur solche Replikationsstartstellen für die DNA-Replikation in der nachfolgenden S-Phase lizenziert werden, welche in engem Kontakt mit dem Chromatingerüst stehen ([253, 254]), lässt sich aus diesem Wert auf den Abstand von Kontaktstellen zwischen chromosomaler DNA und Chromatinerückgrat und damit auf das Ausmaß der DNA-Kompaktierung schließen: Je weniger Replikationsursprünge detektiert werden, um so geringer ist die Anzahl der Kontaktstellen und desto größer müssen folglich die DNA-Schleifen sein, welche an der Gerüstsubstanz des Chromatins verankert sind. Erklärtes Ziel dieser Experimente war es, den Abstand zwischen Replikationsursprüngen für ausdifferenzierte, somatische Erythrocytenkerne zu bestimmen, welche vorher in (Condensin-depletiertem) mitotischem oder aber interphasischem Ex-trakt inkubiert und anschließend reisoliert worden waren. In den ersten Versuchen wurde jedoch mit leichter verfügbaren Spermienkernen gearbeitet, welche zunächst

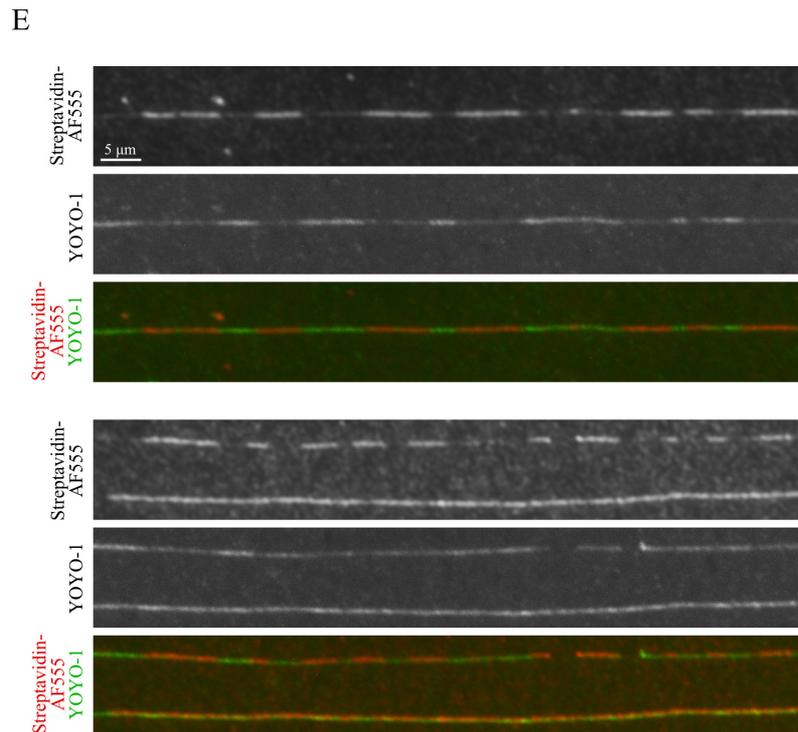
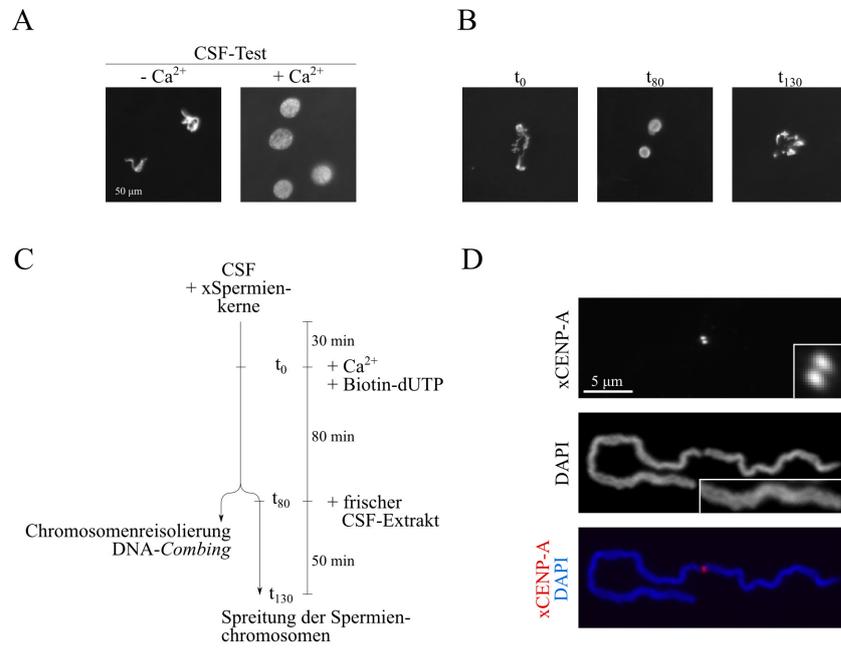
in frisch hergestelltem CSF-Extrakt (siehe Abb. 26B und C) vorinkubiert worden waren. Anschließend erfolgte die initiale DNA-Synthese nach Ca^{2+} -vermitteltem Übergang in S-Phase in Gegenwart von biotinyliertem dUTP, wurde jedoch durch die zeitlich versetzte Zugabe Aphidicolin vorzeitig gestoppt. Für die Aphidicolinzugabe wurde ein Zeitrahmen von 20 bzw. 30 min nach Ca^{2+} -Induktion (t_{20} bzw. t_{30}) gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die DNA-Replikation zwar bereits initiiert, jedoch noch nicht so weit fortgeschritten sein sollte, dass zwei Replisomen benachbarter Replikationsursprünge bereits wieder aufeinander treffen, was eine diskrete Unterscheidung zweier nebeneinander liegender Replikons unmöglich machen würde. Nach Inkubationsende (70 min nach Ca^{2+} -Zugabe) wurde das Spermienchromatin aus dem Extrakt reisoliert und dem molekularen *Combing* unterworfen (siehe Abb. 26D). Wurde der DNA-Polymerase-Inhibitor Aphidicolin gleichzeitig mit den Calciumionen zugesetzt (t_0), fand erwartungsgemäß keine DNA-Replikation und somit kein Einbau von biotinyliertem Desoxyribonukleotid statt. Erfolgte die Aphidicolinzugabe jedoch erst später, war die DNA-Synthese bereits initiiert und biotinyliertes dUTP in die Tochterstränge inkorporiert worden. Dabei wurden um so mehr DNA-Abschnitte repliziert, desto mehr Zeit bis zur Zugabe des Inhibitors verstrichen war (vgl. t_{20} vs. t_{30}). Theoretisch liegt jedem kontinuierlich biotinyliertem Abschnitt entlang des DNA-Moleküls ein einzelner Replikationsursprung zugrunde, welcher etwa in der Mitte des angefärbten DNA-Fragments lokalisiert sein sollte. Demnach wäre die Distanz zwischen den Mittelpunkten zweier benachbarter, biotinylierter DNA-Abschnitte dem Abstand ihrer Replikationsstartstellen gleichzusetzen. Allerdings zeigt auch die ebenfalls durchgeführte Kontrolle, in der nach Calcium-induziertem Übergang in Interphase kein Aphidicolin zugegeben worden war, eine diskontinuierliche Biotinylierung. Möglicherweise wird das biotinylierte Desoxynukleotid nicht regelmäßig und zufällig in den neu-synthetisierten Tochterstrang inkorporiert oder aber das zu dessen Detektion verwendete fluoreszenzmarkierte Streptavidin kann seinen Biotin-Bindungspartner nur unter bestimmten Umständen erkennen.

Eine weitere mögliche Erklärung für den diskontinuierlichen Einbau des Biotin-dUTPs selbst in Abwesenheit von Aphidicolin könnte in einer unvollständigen DNA-Replikation zu suchen sein. Um dies zu überprüfen, sollte das Spermien-



chromatin nach Durchlaufen der Interphase in Mitose zurückgeführt werden. Das aus diesem Zellzyklusstadium reisolierte Chromatin ließe sich als gut analysierbare, metaphasische Chromosomen darstellen und aus dem Vorliegen von Ein- bzw. Zweichromatid-Chromosomen könnte die (Un-)Vollständigkeit der DNA-Replikation während der vorangegangenen S-Phase beurteilt werden. Es wurde also erneut CSF-Extrakt präpariert, mit 800 Spermienkernen pro μl Extrakt versetzt und eine halbe Stunde lang vorinkubiert (vgl. Abb. 27B, t_0). Anschließend wurden dem Extrakt wiederum Ca^{2+} -Ionen und biotinyliertes dUTP zugegeben und es folgte eine weitere, 80 min andauernde Inkubation (t_{80}), welche die vollständige Inkorporation des markierten Desoxynukleotids in die neu-synthetisierten Tochterstränge garantieren sollte. Daraufhin wurde der Versuchsansatz aufgeteilt: Während aus der einen Hälfte des Extraktes das Spermienchromatin reisoliert und dem molekularen *Combing* unterzogen worden war, wurde der restliche Extrakt mit einem halben Volumen frischem, noch im CSF-Arrest befindlichen Extrakt vermischt und weitere 50 min lang inkubiert (t_{130}). Nachdem der Wiedereintritt in Mitose fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden konnte, wurde auch dieses Spermienchromatin reisoliert und anschließend gespreitet, wobei die Chromosomen unter Verwendung von DAPI sowie eines gegen die centromerische Histon H3-Variante CENP-A gerichteten Antikörpers angefärbt worden waren. Zwar lässt sich aufgrund der streng parallelen Anordnung die Gegenwart von Zweichromatid-Chromosomen anhand des DAPI-Signals in Abbildung 27D nur erahnen, das Vorhandensein von zwei (statt nur einem) punktförmigen xCENP-Signalen spricht aber eindeutig für die Präsenz zweier Schwesterchromatiden und impliziert somit eine vollständige DNA-Replikation während der vorangegangenen Interphase. Zwei Beispiele für die aus

Abb. 26 (vorhergehende Seite): Während der DNA-Replikation in Interphase wird biotinyliertes dUTP diskontinuierlich in den neu-synthetisierten Tochterstrang inkorporiert. A) Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise. B) Vor dem eigentlichen Experiment wurde die Qualität des CSF-Extraktes fluoreszenzmikroskopisch überprüft (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 17). C) Im Laufe des Experiments wurde der Extrakt erneut getestet: Nach der 45-minütigen Vorinkubation in CSF-Extrakt und in Abwesenheit von Ca^{2+} (t_0) wurde erwartungsgemäß kondensiertes Spermienchromatin beobachtet, welches 70 min nach Ca^{2+} -Zugabe (t_{70}) dann decondensiert und in Form von Interphasekernen vorlag. D) Nach Inkubationsende wurde das Spermienchromatin reisoliert und dem molekularen Combing unterworfen, wobei neu-eingebautes, biotinyliertes dUTP mit Streptavidin-AF555 und die Gesamt-DNA mit YOYO-1 angefärbt worden war.



demselben, jedoch noch in S-Phase befindlichen Ansatz reisolieren und anschließend gestreckten DNA-Fasern sind in Abbildung 27E gezeigt. Während für einige wenige DNA-Moleküle der erwartungsgemäße, kontinuierliche Einbau von biotinyliertem dUTP beobachtet wurde, konnte für die überwiegende Mehrheit der DNA-Fasern wiederum nur ein mehrfach unterbrochenes Biotin-Signal detektiert werden, obwohl die DNA-Replikation nicht durch die Anwesenheit des Polymeraseinhibitors Aphidicolin gestört worden war. Aufgrund dieser systemimmanenten Unvollständigkeit der Biotinylierung bzw. deren Detektion würden sich in späteren, hierauf basierenden Untersuchungen die Abstände zwischen benachbarten Replikationsursprüngen nicht zweifelsfrei bestimmen lassen. Denn ein biotinyliertes Fragment innerhalb eines DNA-Moleküls könnte entweder tatsächlich einer definierten Replikationsstartstelle entsprechen oder aber müsste zusammen mit benachbarten Segmenten einem gemeinsamen Replikationsursprung zugeordnet werden. Je nach Szenario ergeben sich somit völlig unterschiedliche Positionen für die Initiationsstelle der DNA-Synthese, was eine Bestimmung der zwischen ihnen befindlichen Abstände unmöglich macht.

Des Weiteren wurde versucht, unabhängig von Aphidicolin mit zwei Markierungspulsen zu arbeiten, indem die DNA-Replikation zunächst in Gegenwart von bio-

Abb. 27 (vorhergehende Seite): *Trotz vollständiger DNA-Replikation wird in den neu-synthetisierten Tochterstrang inkorporiertes, biotinyliertes dUTP diskontinuierlich detektiert. A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse des frisch hergestellten und für die späteren Experimente verwendeten CSF-Extraktes zur Beurteilung seiner Qualität (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 17). B) Während des Versuchs wurde der Extrakt ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet: Nach der 30-minütigen Vorinkubation in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen (t_0) lag das Spermienchromatin erwartungsgemäß kondensiert vor, dekondensierte jedoch nach Ca^{2+} -induziertem Übertritt in S-Phase (t_{80}) und nahm dann die Form typischer interphasischer Kerne an. Zur Rückführung in Mitose war einem Teil des Extraktes frischer CSF-Extrakt beigemischt worden, sodass nach einer Inkubationszeit von 50 min (t_{130}) das Spermienchromatin erneut kondensierte und folglich in Form einzelner Chromosomen beobachtet wurde. C) Schematische Darstellung des prinzipiellen Versuchablaufs. D) Das nach Rückführung des Extraktes in Mitose reisolierte Spermienchromatin war gespreizt und anschließend unter Verwendung des Antikörpers anti- α CENP-A sowie DAPI angefärbt worden. E) Nach Ende der Inkubation in S-Phase war das Spermienchromatin reisoliert und dem molekularen Combing unterzogen worden, wobei in den neu-synthetisierten Tochterstrang inkorporiertes, biotinyliertes dUTP mit Streptavidin-AF555 und die GesamtdNA mit YOYO-1 angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert worden war.*

tinyliertem dUTP (erster Puls) initiiert werden und nach zeitlich verzögerter Zugabe von Digoxigenin-dUTP (zweiter Puls) beendet werden sollte. Als Ergebnis wären dann DNA-Fasern zu erwarten gewesen, bei denen die initiale, reine Biotinmarkierung in unmittelbarer Nähe des Replikationsursprungs in eine überlagerte Markierung von Biotin- und Digoxigeninsignalen in weiter distal gelegenen DNA-Abschnitten übergeht. Somit ließe sich aus der Distanz zweier benachbarter DNA-Fragmente, in welche ausschließlich biotinyliertes Desoxynukleotid inkorporiert worden war, auf den Abstand der zugrunde liegenden Replikationsstartstellen schließen. Allerdings waren in diesen Untersuchungen beide markierten Nukleotide ebenfalls nur unregelmäßig und ohne erkennbaren zeitlichen Zusammenhang eingebaut worden (nicht gezeigt), sodass auch diese experimentelle Herangehensweise keine Schlussfolgerung auf die Distanz benachbarter Replikationsursprünge erlaubte.

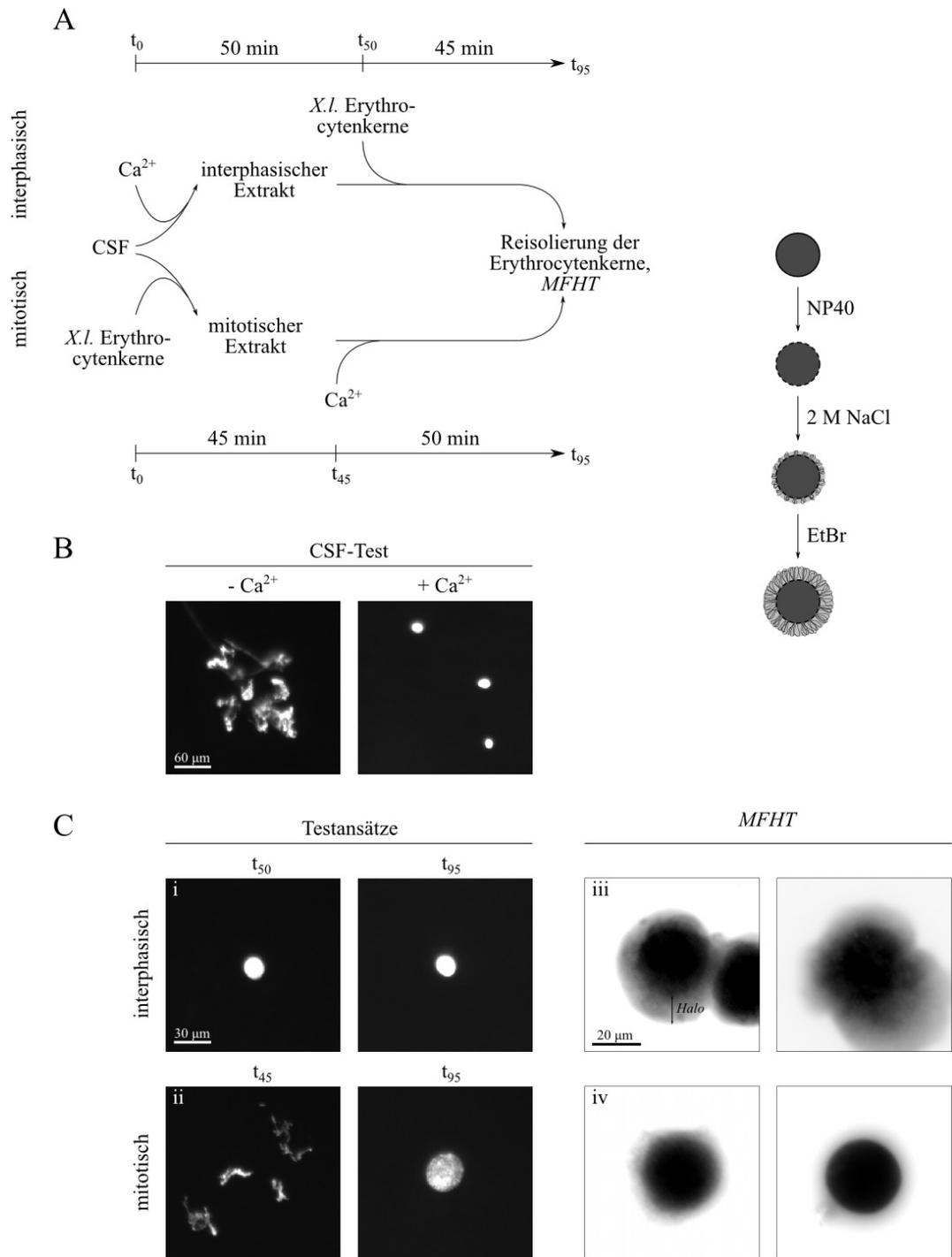
3.2.3 Etablierung der *Maximum Fluorescence Halo Technique*

Eine weitere Möglichkeit den Kompaktierungsgrad chromosomaler DNA abzuschätzen, bietet eine als *Maximum Fluorescence Halo Technique* (MFHT) bezeichnete Methode, welche die direkte Visualisierung und Vermessung der an der Gerüstsubstanz des Chromatins verankerten DNA-Schleifen erlaubt. Die experimentelle Vorgehensweise ist in Abbildung 28A schematisch zusammengefasst. Nach Permeabilisierung der Kernmembran der zu analysierenden Zellkerne werden Chromatin-assoziierte Proteine (Histone u. a.) unter Hochsalzbedingungen extrahiert, was eine beginnende Relaxation der chromosomalen DNA zur Folge hat. Anschließend erfolgt eine Inkubation der so präparierten Zellkerne in Ethidiumbromidhaltiger Lösung, wobei dem Ethidiumbromid zwei Funktionen zukommen: Einerseits soll es als interkalierende Substanz die negativ superspiralisierte DNA maximal entspannen, sodass diese infolge des erhöhten Platzbedarfs durch die während der Permeabilisierung herbeigeführten Membranöffnungen aus dem Kern austritt. Zum anderen dient es natürlich der Sichtbarmachung der resultierenden DNA-*Halos*. Aus der Ausdehnung dieses den Zellkern umgebenden Lichthofs lässt sich auf die Größe der DNA-Schleifen und damit auf den Kompaktierungsgrad des zu analysierenden Zellkerns schließen: Er erscheint um so größer, je länger die an der

Kernmatrix verankerten DNA-Schleifen sind. Um der Transkriptionsmaschinerie gencodierende DNA-Abschnitte leicht zugänglich zu machen, liegen die Chromatinschleifen in den Kernen ausdifferenzierter, somatischer Zellen recht locker gepackt vor, sodass hier typischerweise verhältnismäßig breite *Halos* beobachtet werden. Anders dagegen in den undifferenzierten, sich schnell teilenden Zellen der frühen Embryogenese, wo eine Gentranskription nicht vonnöten ist: Hier sorgt eine dichte Packung der Chromatinschleifen für eine schnelle und effiziente Lizenzierung möglichst vieler Replikationsursprünge, sodass die präparierten DNA-*Halos* einen deutlich geringeren Umfang aufweisen. Wie Lemaitre u. a. [247] zeigen konnten, wird während der Inkubation eines somatischen ausdifferenzierten Zellkerns in mitotischer Umgebung dessen Chromatinstruktur an die Erfordernisse der frühen embryonalen Teilungen adaptiert: Um eine schnelle und effiziente DNA-Replikation in der folgenden S-Phase zu ermöglichen, werden die DNA-Schleifen dichter und enger gepackt, wobei allerdings bislang nicht geklärt werden konnte, welche Faktoren neben der bereits bekannten Topoisomerase II α gleichsam an diesem Prozess beteiligt sind.

Ziel der folgenden Experimente war es zunächst, die Ausdehnung der präparierten DNA-*Halos* von Kernen zu ermitteln, welche entweder in mitotischem Extrakt vorinkubiert oder aber direkt in interphasischen Extrakt gegeben worden waren und somit die Ergebnisse von Lemaitre u. a. [247] zu reproduzieren. Da der Multiproteinkomplex Condensin als ein an der Chromatinrestrukturierung möglicherweise beteiligter Faktor angesehen wurde, sollte nach erfolgreicher Etablierung der MFHT untersucht werden, ob die Immundepletion von Condensin einen Einfluss auf die Größe der *Halos* ausübt und folglich die „reprogrammierende“ Fähigkeit des mitotischen Extraktes beeinträchtigt, woraus geschlossen werden könnte, dass Condensin tatsächlich in die Chromatinneuorganisation am Übergang von Mitose zu Interphase involviert ist.

In den ersten Versuchen zur MFHT wurde frisch präparierter CSF-Extrakt fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich seiner Qualität begutachtet (vgl. Abb. 28B) und anschließend auf vier Ansätze verteilt. Da eine Erythrocytenpopulation in interphasischer Umgebung inkubiert werden sollte, musste zunächst ein interphasischer



Extrakt bereitgestellt werden. Hierzu wurde eine Extraktportion mit Ca^{2+} -Ionen versetzt und einer 50-minütigen Inkubation unterzogen. Desgleichen wurde mit einem Kontrollansatz verfahren, dem jedoch zum Zeitpunkt der Ca^{2+} -Zugabe zusätzlich Spermienzellkerne zugesetzt worden waren, sodass aus der Präsenz typischer interphasischer Kerne in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der erfolgreiche Übertritt in Interphase geschlussfolgert werden konnte (siehe Abb. 28C (i), t_{50}). In den nun interphasischen Extrakt wurden Erythrocytenkerne gegeben und weitere 45 min inkubiert. Da nach Ende der Inkubationszeit im Kontrollansatz noch immer interphasische Kerne beobachtbar waren und sich keine Hinweise auf ein apoptotisches Verhalten des Extraktes ergaben (siehe Abb. 28C (i), t_{95}), konnten die im eigentlichen Versuchsansatz enthaltenen Erythrocytenkerne durch ein vorbereitetes Glycerinkissen auf Deckgläschen zentrifugiert und deren DNA-Halos anschließend präpariert werden. Der zweite Versuchsansatz sollte eine Vorinkubation in mitotischer Umgebung beinhalten. Deshalb wurden die Erythrocytenkerne hier zunächst 45 min lang in CSF-Extrakt inkubiert, bevor letzterer Ca^{2+} -vermittelt in Interphase überführt und weitere 50 min inkubiert worden war. Sowohl der während der Vorinkubation anhaltende CSF-Arrest als auch der Ca^{2+} -induzierte Übergang in Interphase konnten anhand eines zweiten Kontrollansatzes bestätigt werden, dem nicht Erythrocyten- sondern Spermienchromatin zugegeben worden

Abb. 28 (vorhergehende Seite): *Präparation der DNA-Halos somatischer X.l. Erythrocytenzellkerne, welche entweder in mitotischem Extrakt vorinkubiert oder direkt in interphasischen Extrakt gegeben worden waren. A) Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise, alle Inkubationsschritte wurden bei 18°C durchgeführt. B) Um seine Qualität beurteilen zu können, wurde der frisch hergestellte CSF-Extrakt in Gegenwart von Spermienchromatin mit oder ohne Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 17). C) Der für gut befundene Extrakt war auf vier Ansätze verteilt worden, von denen zwei mit Spermienkernen versetzt wurden und als Testansätze fungierten, mit deren Hilfe der Zellzyklusverlauf fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden konnte (i und ii). Den übrigen zwei Ansätzen wurden somatische Erythrocytenkerne zugegeben und verschiedenen Inkubationsschritten unterzogen: Während sich der zur Inkubation der ersten Population (interphasisch) verwendete Extrakt bereits in Interphase befand, sodass eine Vorinkubation in mitotischer Umgebung hier entfiel (iii), war die zweite Population (mitotisch) zunächst in CSF-Extrakt inkubiert und erst anschließend Ca^{2+} -vermittelt in Interphase überführt worden (iv). Nach Inkubationsende wurden die Erythrocytenkerne aus beiden Ansätzen reisoliert und die DNA-Halos präpariert. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurde auf eine konstante Belichtungszeit geachtet.*

war (siehe Abb. 28C (ii)): Dieses lag nach 45-minütiger Inkubation in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen stark kondensiert vor, 50 min nach Ca^{2+} -Zugabe jedoch war es zur Chromatidekondensation und Ausbildung interphasischer Kerne gekommen. Nach Inkubationsende wurden auch die in diesem Versuchsansatz enthaltenen Erythrocytenkerne reisoliert und der MFHT unterzogen. In Abbildung 28C (iii) und (iv) sind Beispiele solcher *Halo*-Präparationen gezeigt. Es wurde deutlich, dass der Radius des Lichthofs um Erythrocytenzellkerne, welche dem interphasischem Extrakt entstammten, deutlich größer ausfiel als bei Kernen, welche zunächst in mitotischer Umgebung vorbehandelt worden waren. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass sich durch Einhaltung einer konstanten Belichtungszeit während der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zwar solche relativen Schlussfolgerungen ziehen lassen, jedoch keine Aussagen zu den exakten Dimensionen der DNA-*Halos* getroffen werden können, da der Radius des Lichthofs in Abhängigkeit von der gewählten Belichtungszeit variierte. Versuche, die Position der Kernhülle durch deren Anfärbung mit dem lipophilen Membranfarbstoff DiO (Invitrogen) exakt zu bestimmen, scheiterten jedoch, da das Emissionsspektrum von DiO das des Ethidiumbromids überlagerte. Infolge der starken Intensität der DiO-Fluoreszenz wurden die DNA-*Halos* komplett überstrahlt (Daten nicht gezeigt).

Da zudem der Anteil der Zellkerne, für welche analysierbare DNA-*Halos* präpariert werden konnten, relativ gering ausfiel, wurde nach Rücksprache mit der Arbeitsgruppe von M. Méchali das Protokoll zur Reisolierung der Erythrocytenzellkerne aus den Extrakten geringfügig modifiziert (vgl. Kapitel 5.5.3). In Abbildung 29 sind die Ergebnisse eines Beispielerperiments zusammengefasst. Zur Bereitstellung eines interphasischen Extraktes wurde wiederum ein in Metaphase II-arretierter Extrakt mit Ca^{2+} -Ionen versetzt und solange inkubiert, bis der entsprechende Spermien-haltige Kontrollansatz eindeutig in Interphase übergegangen war. Nach einer Dauer von 60 min war dies der Fall (Abb. 29C (i), t_{60}); zu diesem Zeitpunkt waren dem nun in Interphase befindlichen Versuchsansatz Erythrocytenzellkerne beigegeben und weitere 45 min inkubiert worden. Nach deren Reisolierung auf Deckgläschen konnten die DNA-*Halos* präpariert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden (Abb. 29C (iii)). Erwartungsgemäß wurde auch hier ein verhältnismäßig großer Lichthof um den eigentlichen Zellkern beobachtet,

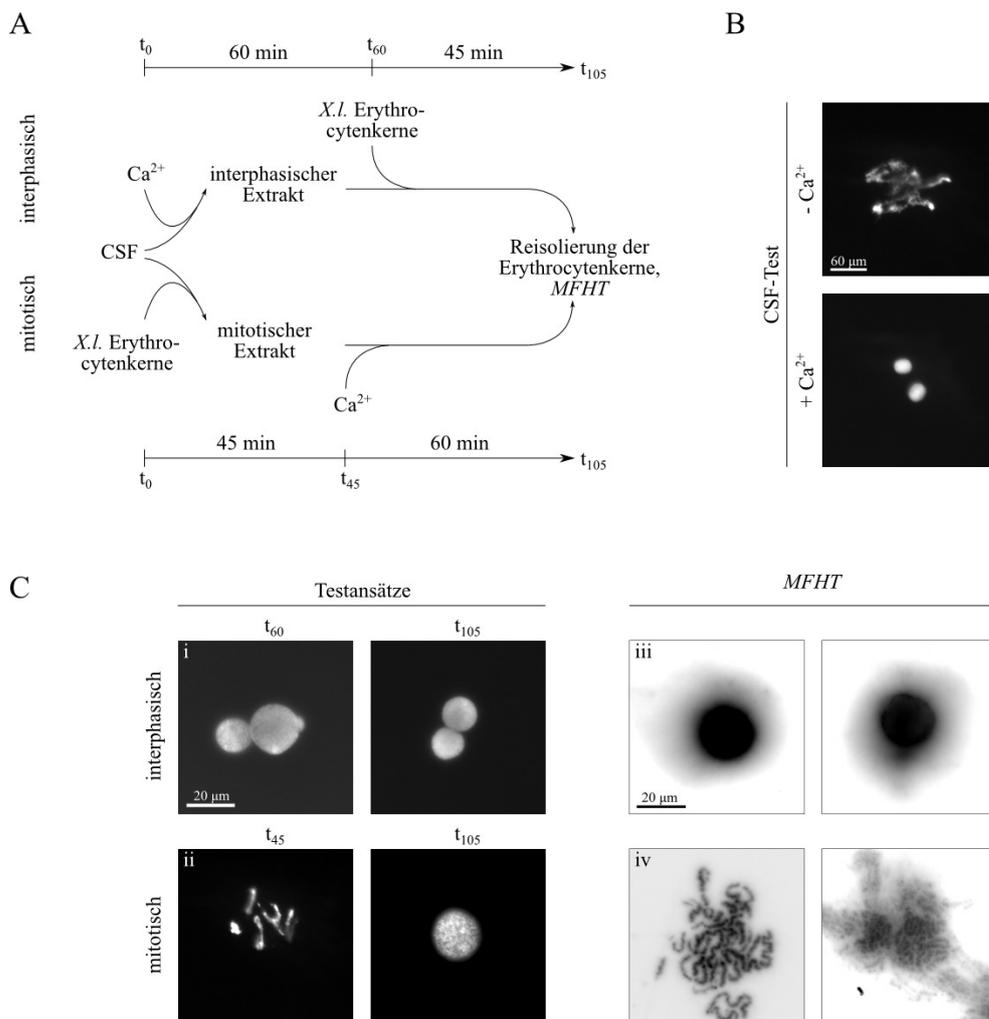
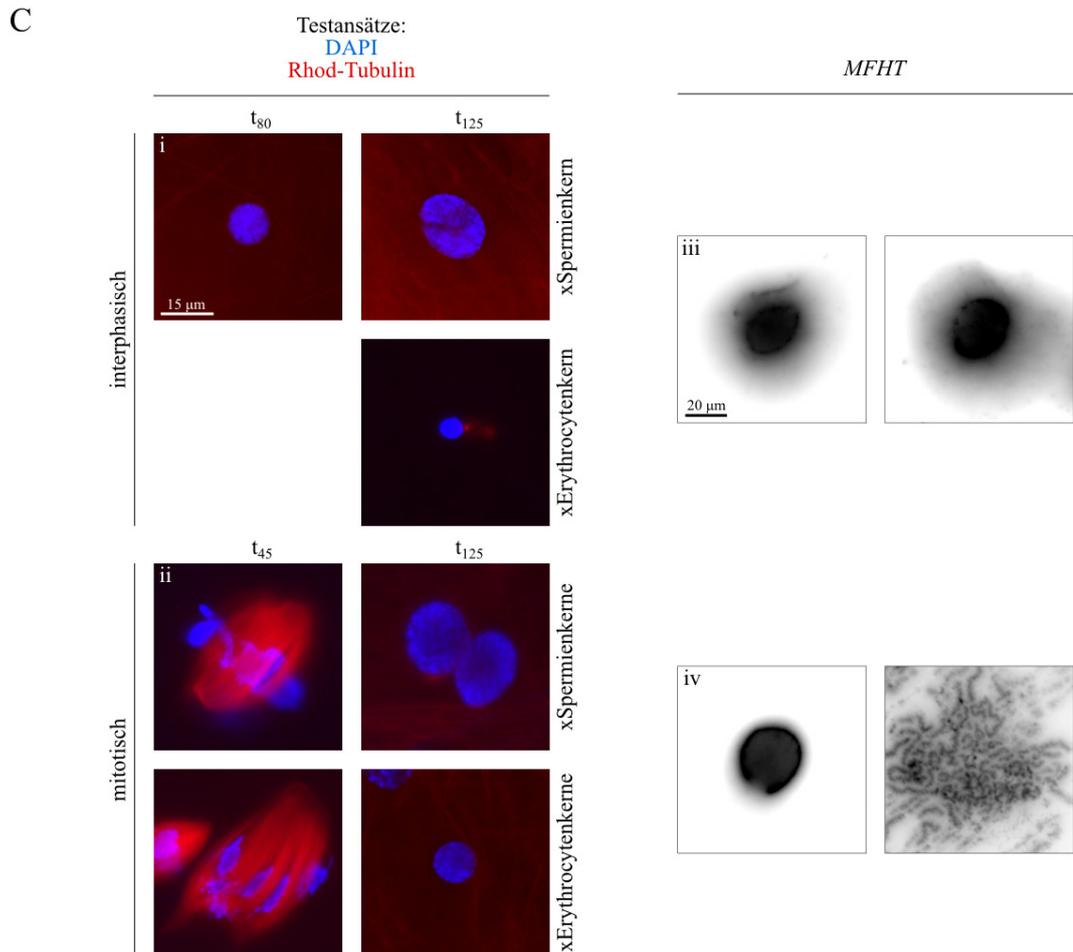
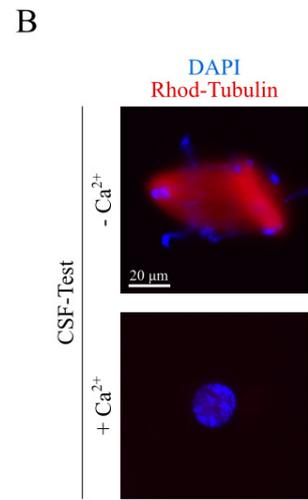
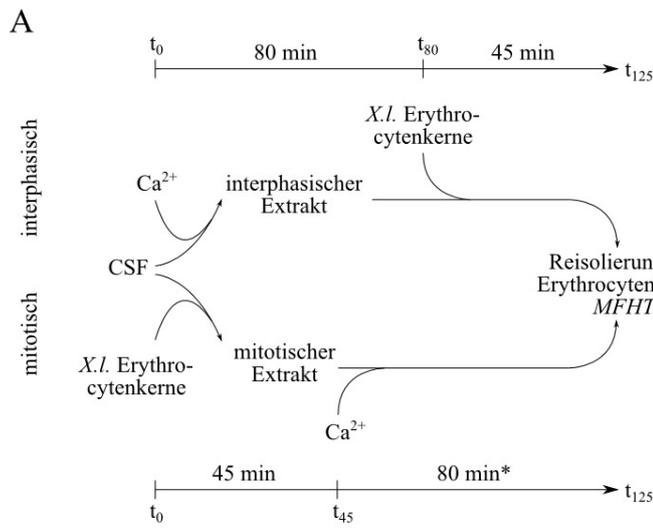


Abb. 29: Die Präparation der DNA-Halos gelingt zwar für *X.l.* Erythrocytenzellkerne welche in interphasischem Extrakt inkubiert worden waren, missglückt jedoch nach deren Vorbehandlung in mitotischem Extrakt. A) Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise, sämtliche Inkubationsschritte erfolgten bei 18°C. B) Der für die späteren Experimente zu verwendende CSF-Extrakt wurde zunächst mit Spermienchromatin versetzt und in Ab- bzw. Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen inkubiert. In der darauffolgenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnte eine Aussage zur Qualität des Extraktes getroffen werden (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 17). C) Der für gut befundene Extrakt war auf vier Ansätze aufgeteilt worden. Zwei dieser Ansätze wurden Spermienkerne zugegeben, was eine fluoreszenzmikroskopische Verlaufskontrolle des Zellzyklus' erlaubte (i und ii). Bevor ein dritter Ansatz mit Erythrocytenzellkernen vermischt werden konnte, war er zunächst Ca^{2+} -abhängig in Interphase überführt worden (iii). Der nun noch verbleibende Ansatz war bereits zu Beginn mit Erythrocytenkernen versetzt und erst nach deren 45-minütiger Vorinkubation in mitotischer Umgebung in Interphase getrieben worden (iv). Anschließend waren die somatischen Zellkerne aus beiden Versuchsansätzen reisoliert und der Halo-Präparation unterzogen worden.

dessen Umgrenzung im Vergleich zu früheren Experimenten (vgl. Abb. 28C (iii)) schärfer und gleichförmiger erschien. Parallel dazu waren Erythrocytenzellkerne 45 min lang in CSF-Extrakt vorinkubiert worden und wie in Abbildung 29C (ii) gezeigt, wurde der Metaphase II-Arrest während dieser Zeit aufrecht erhalten. Anschließend war auch dieser Ansatz Ca^{2+} -vermittelt in Interphase überführt und weitere 60 min inkubiert worden. Während das Spermienchromatin des zugehörigen Kontrollansatzes im Laufe dieser Zeit dekondensierte und eindeutig interphasische Kerne ausbildete (siehe Abb. 29C (ii), t_{105}), ergab sich für die Erythrocytenkerne des eigentlichen Versuchansatzes nach Reisolierung und Anwendung der MFHT ein unerwartetes Erscheinungsbild: Es konnten keine Zellkerne, sondern nur einzelne, stark kondensiert vorliegende Chromosomen beobachtet werden (siehe Abb. 29C (iv)), was entweder auf eine unwirksame Ca^{2+} -Induktion oder aber auf einen Wiedereintritt in Mitose zurückzuführen war. Der die interphasische Inkubationsumgebung reflektierende Versuchsansatz war hingegen schon sehr viel länger in S-Phase inkubiert worden war, ohne dass eine Rückführung in Mitose zu verzeichnen gewesen wäre. Somit musste davon ausgegangen werden, dass zwar der Extrakt erfolgreich in Interphase überführt worden war, die darin enthaltenen Erythrocytenzellkerne jedoch nicht empfänglich für die damit einhergehenden morphologischen und strukturellen Modifikationen waren.

Da dieses Problem bereits in früheren Experimenten aufgetreten war, konnte dessen Ursache nicht im leicht abgewandelten Reisolierungsprotokoll begründet sein. Viel wahrscheinlicher ist es, dass die somatischen Erythrocytenkerne während der Inkubation in mitotischer Umgebung eine sehr viel tiefgreifendere Um- und Neuorganisation erfahren müssen als das Spermienchromatin, welches ja schon im Laufe der Spermiogenese optimal auf die Erfordernisse der auf die Befruchtung folgenden schnellen mitotischen Teilungen adaptiert worden ist. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten darauf geachtet, den Erythrocytenzellkernen nach der mitotischen Vorinkubation noch mehr Zeit für einen erfolgreichen Übergang in Interphase einzuräumen. Um letzteren auch für Erythrocytenkerne fluoreszenzmikroskopisch bestätigen zu können, wurden des Weiteren zwei zusätzliche Kontrollansätze eingeführt: Diese enthielten neben Rhodamin-markiertem Tubulin nicht Spermien- sondern Erythrocytenzellkerne und wurden ansonsten denselben Inku-

bationsschritten unterzogen, welche auch die zur *Halo*-Präparation verwendeten Proben erfahren hatten. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse dieses Experiments zusammengefasst. Um die Inkubationszeiten sowohl für die interphasische als auch die mitotische Versuchsumgebung gleich zu gestalten, wurde der das interphasische Milieu simulierende Ansatz nach Ca^{2+} -Zugabe 80 min lang in S-Phase inkubiert (zu diesem Zeitpunkt war das Chromatin in der Spermien-haltigen Kontrolle de-kondensiert und hatte sich zu interphasischen Kernen umgeformt, vgl. Abb. 30C (i), t_{80}). Anschließend waren sowohl dem eigentlichen Versuchsansatz als auch einem weiteren, nun ebenfalls in Interphase befindlichen Kontrollansatz Erythrocytenzellkerne zugesetzt und weitere 45 min inkubiert worden. Nach Ablauf dieser Zeit erschien das Chromatin beider Kontrollansätze als interphasische, dekondensierte Kerne, wenngleich die in der Erythrocyten-haltigen Kontrolle bisweilen zu beobachtende Reassemblierung der mitotischen Spindel auf einen bevorstehenden Wiedereintritt in Mitose hindeutete (siehe Abb. 30C (i), t_{125}). Wie in Abbildung 30C (iii) gezeigt, lieferte der gleichsam behandelte und zur MFHT herangezogene Versuchsansatz jedoch ausgedehnte DNA-*Halos*, woraus geschlossen werden konnte, dass ein evtl. auf cytosolischer Ebene bereits stattgefundener (partieller) Mitoseeintritt noch keine Konsequenzen auf Chromatinebene gezeitigt hatte. Für den das mitotische Milieu reflektierenden Versuchsansatz wurden wiederum Erythrocytenzellkerne zunächst 45 min lang in CSF-Extrakt vorinkubiert, wobei die Präsenz kondensierten Chromatins und mitotischer (Pseudo-)Spindeln auf einen stabilen CSF-Arrest hindeuteten (siehe Abb. 30C (ii), t_{45}). Anschließend war auch dieser Ansatz Ca^{2+} -vermittelt in Interphase überführt und einer lang andauernden Inkubation bei Raumtemperatur unterzogen worden. Während nach Inkubationsende sowohl im Spermien- als auch im Erythrocytenkern-haltigen Kontrollansatz eine Dekondensation des enthaltenen Chromatins sowie eine Disassemblierung der Spindeln zu beobachten war, wurden im eigentlichen Versuchsansatz zur MFHT auch diesmal wieder nur vereinzelt Kerne gefunden. Zwar wiesen die auch den erwarteten schmalen Lichthof auf, doch der Hauptanteil des enthaltenen Chromatins lag noch immer stark kondensiert in Form mitotischer Chromosomen vor. Hier kann nur spekuliert werden, dass mit einer noch längeren Inkubationsdauer (evtl. in Gegenwart von Cycloheximid) der Anteil an interphasischen Kernen hätte weiter erhöht werden können. Wegen der weiter oben bereits angeführten zusätzlichen



Schwierigkeiten bei der Etablierung des molekularen *Combings* wurden die Experimente an diesem Punkt nicht weiter geführt. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass sich die gewählten Inkubationsbedingungen deutlich in der Ausdehnung der präparierten DNA-*Halos* widerspiegeln. So wurde nach Vorinkubation der somatischen Erythrocytenzellkerne in (quasi-)mitotischer Umgebung die Ausbildung kürzerer DNA-Schleifen beobachtet, was mit einer stärkeren Kompaktierung des Chromatins einher geht. Demgegenüber wurden die großen, locker gepackten DNA-Schleifen des Erythrocytenchromatins beibehalten, wenn diese Vorinkubation im mitotischen Milieu unterblieb. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Erythrocytenzellkerne nur sehr langsam auf die Ca^{2+} -induzierten Modifikationen am Übergang von Mitose zu (erster) Interphase reagieren, sodass im Anschluss an die Ca^{2+} -Zugabe eine genügend lange Inkubationszeitdauer eingeräumt werden sollte.

Abb. 30 (vorhergehende Seite): Die MFHT gelingt zwar an Erythrocytenzellkernen welche in interphasischem Extrakt inkubiert worden waren, missglückt jedoch nach deren Vorbehandlung in mitotischem Extrakt. A) Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise. Alle Inkubationen wurden bei einer Temperatur von 18°C durchgeführt, lediglich der mit *gekennzeichnete Inkubationsschritt erfolgte bei Raumtemperatur. B) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des für die späteren Experimente verwendeten CSF-Extraktes zur Beurteilung seiner Qualität (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 21). C) Der für gut befundene Extrakt war auf sechs Ansätze verteilt worden, von denen vier als Kontrollansätze dienten. Diese Ansätze enthielten entweder X. l. Spermien- oder Erythrocytenzellkerne und erlaubten anhand der fluoreszenzmikroskopischen Analyse eine Kontrolle des Zellzyklusverlaufs (i und ii). Ein erster eigentlicher Versuchsansatz war zunächst mit Ca^{2+} -Ionen versetzt worden und die Zugabe von X.l. Erythrocytenzellkerne erfolgte erst, nachdem in den Kontrollansätzen (i) der Eintritt in Interphase beobachtet werden konnte (iii). Einem zweiten, noch im CSF-Arrest befindlichen Versuchsansatz waren Erythrocytenzellkerne bereits zu Beginn zugegeben und 45 min inkubiert worden, bevor anschließend der Ca^{2+} -vermittelte Übergang in Interphase induziert wurde (iv).

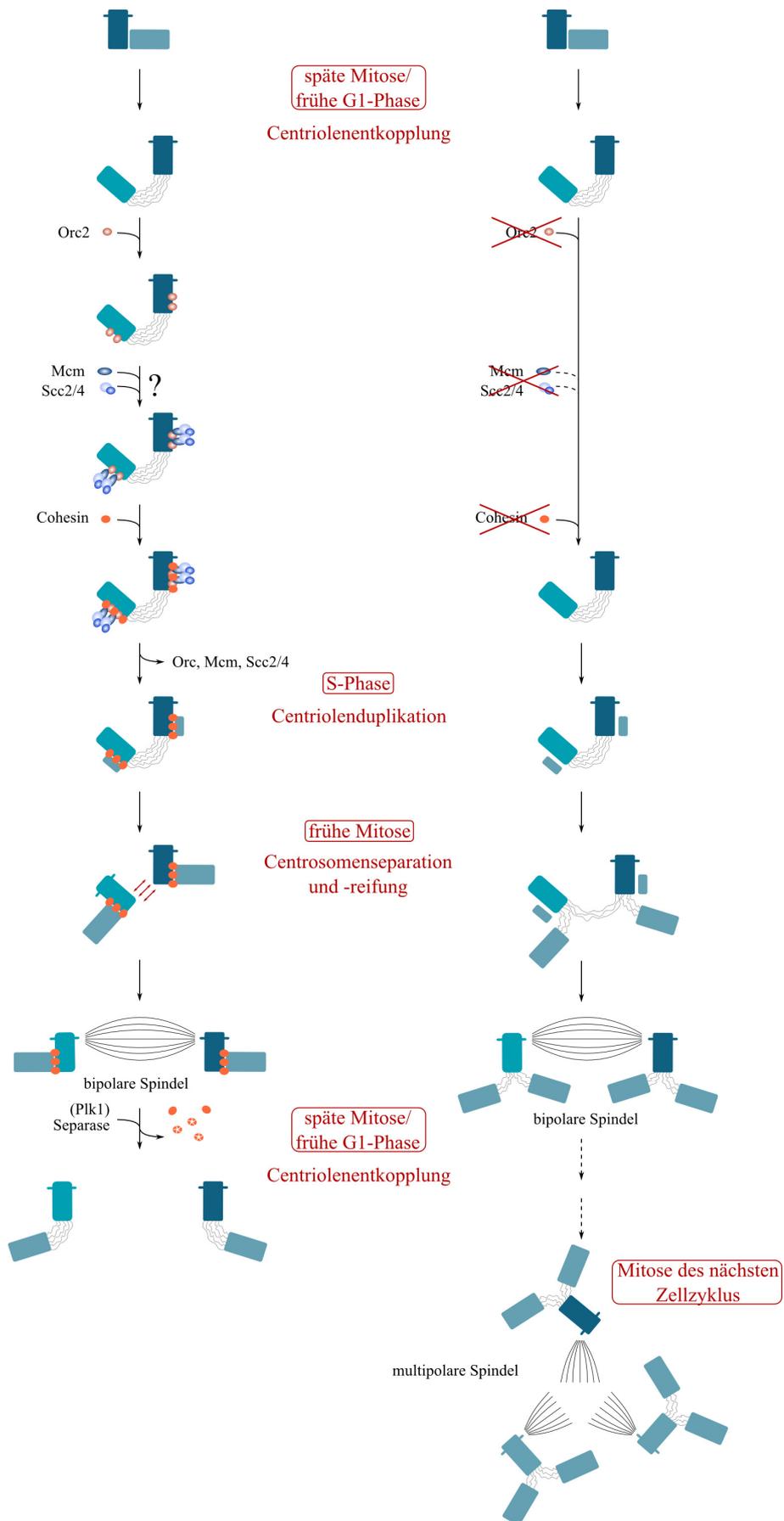
4 Diskussion

4.1 Die centrosomale Überduplikation in Abwesenheit von xCohesin bzw. xOrc2

4.1.1 xOrc2 ist an der centrosomalen Rekrutierung von Cohesin beteiligt und verhindert so die Centrosomenüberduplikation

In Abwesenheit von Cohesin wurden zwei unterschiedliche Beobachtungen gemacht, die beide in engem Zusammenhang mit der Überduplikation von Centrosomen stehen. So waren einerseits vermehrt Centrosomen zu verzeichnen, die mehr als ein Procentriol je Muttercentriol besaßen und an denen also vorzeitig eine erneute Duplikation initiiert worden war. Zudem wiesen diese Centrosomen mehrere C-Nap1-Signale auf, was darauf hindeutet, dass der proximale Kontakt zwischen Mutter- und neu-assembliertem Procentriol bereits gelockert war, wodurch die Überduplikation von Centriolen eingeleitet worden sein könnte. Andererseits wurden unabhängig vom jeweiligen morphologischen Erscheinungsbild nach Cohesindepletion mehr Centrosomen beobachtet als in der kontrollbehandelten Probe, was ebenfalls die Schlussfolgerung erlaubt, dass in Abwesenheit des Kopplungsfaktors Cohesin die Überduplikation von Centrosomen initiiert wird. In leicht stärkerem Ausmaß traten dieselben Effekte nach Depletion von Orc2 zu Tage, woraus geschlossen werden kann, dass Orc2 tatsächlich zumindest während der frühen embryonalen Teilungen in *Xenopus* an der centrosomalen Rekrutierung von Cohesin beteiligt ist (vgl. hierzu auch das in Abb. 31 zusammengefasste Modell).

In Abhängigkeit vom Modellsystem bestehen deutliche Unterschiede hinsichtlich der zeitlichen Assoziation von ORC an das Chromatin. Während der heterohexamere Komplex in *S. cerevisiae*, *S. pombe* und auch in *D. melanogaster* während des gesamten Zellzyklus stabil an den Replikationsursprüngen verbleibt [266–268], scheint er in *X. laevis* in Metaphase aktiv von der DNA entfernt zu werden [269, 270]. Während der frühen embryonalen Teilungen wird ORC bereits in Telophase an den chromosomalen Replikationsstartstellen reassembliert und gleichzeitig könnte eine Lokalisation an die Centrosomen erfolgen. Auf Ebene der chromosomalen Rekrutierung von Cohesin fungieren mit Cdt1, Cdc6 und der MCM-Helikase



weitere pre-RC-Komponenten als zwischengeschaltete Faktoren [42, 43]. Letztere bildet hierbei eine Plattform aus, über welche der Kollerinkomplex Scc2/Scs4 an das Chromatin dirigiert wird. Vermittelt wird diese Interaktion durch die S-Phase-Kinase Cdc7-Drf1 (DDK), welche sowohl mit dem pre-RC als auch mit Scc2/Scs4 stabil interagiert [44, 271]. Ob all diese Faktoren auch bei der centrosomalen Rekrutierung von Cohesin benötigt werden, konnte mangels geeigneter Antikörper im Rahmen dieser Dissertation nicht geklärt werden und bleibt weiterhin fraglich (siehe auch weiter unten im Text). Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass zumindest Orc2 für die Rekrutierung von Cohesin an die Centrosomen benötigt wird. Von Beginn der S-Phase bis zum Ende der M-Phase stellt Cohesin den engen Kontakt zwischen parentalem Centriol und neu-assemblierten Centriol her und verhindert so eine unzeitgemäße Reduplikation während dieser Zellzyklusstadien. Erst infolge der phosphorylierungsabhängigen Eliminierung von Cohesin in Prophase und der proteolytischen Cohesinspaltung am Übergang von Meta- zu Anaphase kommt es während der späten Mitose und frühen G1-Phase schließlich zur Entkopplung von Mutter- und Tochtercentriol, wodurch die Centriolenduplikation in der nachfolgenden S-Phase sicher gestellt wird [164, 165]. Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten an, dass in Abwesenheit von Orc2 auch der Kopplungsfaktor Cohesin nicht centrosomal lokalisiert werden kann, sodass bereits während der Assemblierung des Procentriols eine beginnende Entkopplung beider Centriolen zu verzeichnen ist. Dieser vorzeitige Kontaktverlust zwischen Mutter- und Tochtercentriol resul-

Abb. 31 (vorhergehende Seite): Modell zur centrosomalen Rekrutierung von Cohesin. ORC oder einige seiner Untereinheiten dirigieren, möglicherweise vermittelt über MCM-Komponenten und den Kollerinkomplex Scc2/Scs4, Cohesin am Ende der M-Phase an das Centrosom, wo es den engen Kontakt zwischen Mutter- und Tochtercentriol aufrecht erhält und der verfrühten Entkopplung beider Centriolen sowie einer daraus resultierenden Centrosomenüberduplikation entgegenwirkt. In Abwesenheit von Cohesin und/oder der an seiner Rekrutierung beteiligten Faktoren wird der enge Kontakt zwischen dem Mutter- und dem neu-assemblierten Procentriol vorzeitig gelockert, sodass überzählige Procentriolen gebildet werden. Da die Procentriolen noch nicht als Mikrotubuli-organisierende Zentren fungieren können, hat dies auf die sich unmittelbar anschließende Mitose keine Auswirkungen, in späteren Mitosen können jedoch multipolare Spindeln und hierdurch bedingte Chromosomenfehlverteilungen resultieren. Zur Vereinfachung ist der Kopplungsfaktor Cohesin an der Kontaktstelle zwischen Mutter- und Tochtercentriol wiedergegeben, was jedoch nicht mit den gegenwärtigen Modellen zu dessen tatsächlicher Lokalisation innerhalb des Centrosoms übereinstimmt (siehe auch Text, selbiges trifft für die potenziellen Cohesin-Rekrutierungsfaktoren zu).

tiert in der Ausbildung weiterer, überzähliger Tochtercentriolen. Da Procentriolen erst die Mitose durchlaufen müssen, um als Mikrotubuli-organisierende Zentren fungieren zu können, hat dies für die sich unmittelbar anschließende Zellteilung noch keine Konsequenzen. In späteren Mitosen jedoch wirken auch diese zusätzlichen und mittlerweile voll ausgereiften Centriolen als Spindelpole, sodass es zur Ausbildung eines multipolaren Spindelapparats kommen kann. Zwar werden diese infolge des sog. Centrosomen*clusters* zumeist in eine ordnungsgemäße bipolare Spindel umgeformt, unter Beibehaltung der bestehenden Mikrotubuli-Kinetochor-Kontakte kommt es dabei jedoch zu einer Akkumulation von merotelischen und syntelischen Anheftungen, was wiederum in Chromosomenfehlverteilungen resultieren kann [116].

4.1.2 Wann werden die pre-RC-Faktoren und Cohesin an den Centrosomen lokalisiert?

Für die pre-RC-Komponenten Orc1 und Mcm5 ist eine Cyclin A-abhängige Lokalisierung an Centrosomen beschrieben worden. Während die Interaktion mit der entsprechenden Kinase (Cdk2) hierfür nicht benötigt wird, scheint ein durch Cyclin A codiertes centrosomales Lokalisierungssignal (CLS) jedoch essentiell zu sein [177]. Zumindest Mcm5 kann alternativ auch Cyclin E-vermittelt an die Centrosomen dirigiert werden, wofür ebenfalls ein in Cyclin E vorliegendes CLS, nicht jedoch die Interaktion mit Cdk 2 benötigt wird [176]. Da die Konzentration der entsprechenden Cycline erst mit beginnender S-Phase ansteigt, würde dies jedoch bedeuten, dass die zur Verhinderung einer vorzeitigen Centriolenentkopplung benötigten pre-RC-Komponenten (und damit letztlich auch Cohesin selbst) nicht bereits in Telophase (vgl. das Modell in Abb. 31), sondern erst im Laufe der S-Phase an die Centrosomen lokalisiert werden. Möglicherweise werden also nach Initiation der DNA-Replikation mit voranschreitender S-Phase an den Chromosomen nicht länger benötigte Lizenzierungskomponenten zunächst unter Beteiligung von Cyclin E an das Centrosom dirigiert, eine Aufgabe, die im weiteren Verlauf der S-Phase durch Cyclin A übernommen werden kann. Dort sind sie in den negativen Rückkopplungsmechanismus involviert, welcher die Überduplikation von Centrosomen inhibiert. Dies erfordert eine strikte sowohl zeitliche als auch räumliche Kontrolle

der beteiligten Faktoren, denn während sie auf centrosomaler Ebene im aktiven Zustand benötigt werden, um eine Centrosomenüberduplikation zu verhindern, müssen sie auf chromosomaler Ebene inaktiv gehalten werden, da sonst eine Relizensierung bereits replizierter DNA-Abschnitte resultieren könnte. Zur Auflösung dieses scheinbaren Dilemmas wäre es durchaus denkbar, dass die Zelle zur centrosomalen Cohesin-Rekrutierung nicht auf die gesamte DNA-Lizensierungsmaschinerie zurückgreift. Vielmehr könnten lediglich einzelne, essentielle Komponenten in diesen Prozess involviert sein und als Plattform für Kollerin fungieren, welches letztendlich die centrosomale Beladung mit Cohesin bewerkstelligt. Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass die HU-vermittelte Überduplikation von Centrosomen nicht nur durch Expression von wildtypischem Orc1, sondern auch durch die eines N-terminalen Orc1-Fragments gerettet werden kann, welches jedoch nicht mehr zur Assemblierung eines vollständigen ORC befähigt ist [175]. Auch die Ausbildung des MCM-Holokomplexes scheint zur Inhibition einer neuerlichen Centrosomenduplikation in ein und derselben S-Phase nicht nötig zu sein, denn die HU-induzierte Centrosomenüberduplikation wird in Anwesenheit einer Mcm5-Punktmutante unterbunden, auch wenn diese nicht länger mit weiteren MCM-Untereinheiten interagieren kann [177]. So könnte die Mehrheit der pre-RC-Komponenten in S-, G2- und M-Phase phosphorylierungsabhängig inhibiert werden, während die Aktivität einzelner, für die centrosomale Cohesinrekrutierung benötigter Faktoren erhalten bleibt. Da sich unter diesen Voraussetzungen kein vollständiger pre-RC ausbilden kann, wird eine Relizensierung bereits replizierter DNA-Abschnitte effektiv verhindert. Cohesin kann jedoch ungehindert selbst nach Beginn der S-Phase an die Centrosomen rekrutiert werden, um hier den zur Inhibition einer Überduplikation benötigten engen Kontakt zwischen dem Mutter- und dem sich neu-assemblierendem Procentriol zu vermitteln. Da Centrosomen ihre Fähigkeit zur Duplikation in Zellen beibehalten, welche langanhaltend in späteren Interphasestadien arretiert worden sind, erscheint es durchaus sinnvoll, dass Mechanismen zur Unterbindung einer Überduplikation aktiv aufrecht erhalten werden müssen [135, 265, 272].

Möglicherweise ist hierin auch ein Grund für die evolutionäre Etablierung von Geminin als Inhibitor der DNA-Lizensierung zu suchen. Denn während in *S. ce-*

revisiae die Regulation der DNA-Lizensierung allein über Cdk-abhängige Phosphorylierungsreaktionen erfolgt, werden diese in höheren Eukaryoten durch den spezifischen Cdt1-Inhibitor Geminin ergänzt. Wie eingangs bereits erwähnt, wird Geminin während der S-, G2- und M-Phase exprimiert und ist in der Lage, sowohl die Relizensierung bereits replizierter DNA-Abschnitte zu unterdrücken als auch einer Überduplikation von Centrosomen entgegen zu wirken [178, 273]. Wenn mit Beginn der S-Phase eine Relizensierung von Replikationsursprüngen zwar inhibiert, die Aktivität einzelner pre-RC-Komponenten an den Centrosomen jedoch aufrecht erhalten werden muss, könnte Geminin als Modulator fungieren, der auf chromosomaler Ebene eine Reassemblierung der pre-RCs inhibiert und gleichzeitig auf centrosomaler Ebene die Interaktion der an der Cohesinrekrutierung beteiligten Lizensierungsfaktoren stabilisiert.

Dass Centrosomen zur Aufrechterhaltung der gekoppelten Konfiguration auch außerhalb der Telophase mit Cohesin beladen werden müssen, erscheint im Hinblick auf die chromosomale Cohesindynamik ebenfalls schlüssig. Unter dem Einfluss von Wapl dissoziiert Chromatin-gebundenes Cohesin zunächst immer wieder ab und muss vermittelt über den Kollerinkomplex stetig neu an die DNA dirigiert werden. Erst im Zuge der Esco1/2-katalysierten Acetylierung und der Assoziation von Sororin wird die Bindung von Cohesin an die DNA stabilisiert und der Ringkomplex in die Lage versetzt, die Schwesterchromatidkohäsion stabil aufrecht zu erhalten. Obwohl die entsprechenden Untersuchungen noch ausstehen, ist ein gleichsam dynamisches Verhalten auf centrosomaler Ebene durchaus denkbar. Durch eine bis in S-Phase anhaltende centrosomale Rekrutierung der für die Centrosomenlokalisierung von Cohesin verantwortlichen pre-RC-Komponenten könnte ein aus der Cohesindynamik resultierender Kohäsionsverlust ausgeglichen werden. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant zu untersuchen, ob die Cohesinbindung an Centrosomen ebenfalls durch Acetylierung der Smc3-Kopfdomäne stabilisiert wird. Dies gäbe einen ersten Hinweis darauf, ob die Funktionalität von Cohesin als Kopplungsfaktor auf dem topologischen Umschließen centrosomaler Substrukturen beruht. Eine experimentelle Herangehensweise an diese Fragestellung bietet das FRP-FKBP-System, welches für den humanen Cohesinringkomplex bereits etabliert worden ist [66]. Durch kovalente Fusion der beiden, nur wenige kDa klei-

nen Proteine FKBP (FK506 *Binding Protein* 12) und FRB (FKBP-*Rapamycin Binding Domain* of mTOR) an die verschiedenen Kontaktstellen im Cohesinringkomplex lässt sich dieser Rapamycin-abhängig stabil verschließen. Eine Beladung centrosomaler Substrukturen mit Cohesin könnte in diesem Fall nicht mehr stattfinden, sodass eine vorzeitige Trennung der Centriolen darauf hindeuten würde, dass Cohesin seine centrosomale Kopplungsfunktion tatsächlich durch das topologische Umfassen bestimmter centrosomaler Komponenten ausübt. Ebenso ließe sich mit Hilfe des FRP-FKBP-Systems die Frage beantworten, ob Cohesin auf centrosomaler Ebene ein gleichsam dynamisches Verhalten aufweist wie auf chromosomaler Ebene.

4.1.3 Wie bewerkstelligt Cohesin die Kopplung beider Centriolen?

Bislang kann nur spekuliert werden, wie Cohesin den engen Kontakt beider Centriolen auf molekularer Ebene aufrecht erhalten könnte. Bedingt durch die deutlich kleineren Dimensionen ist es physikalisch unmöglich, dass der ca. 40 nm große Cohesinringkomplex die beiden Centriolen umgreift, die jeweils über einen äußeren Durchmesser von etwa 250 nm verfügen. Erste Hinweise zur ultrastrukturellen Lokalisation an isolierten humanen Centrosomen und unter Verwendung von an kolloidales Gold gekoppelter Antikörper lassen auch eher darauf schließen, dass Cohesin nicht an der Kontaktstelle beider Centriolen angereichert wird, sondern vielmehr eine mehr oder weniger gleichmäßige Verteilung in der PCM aufweist (Michaela Rogowski, persönliche Mitteilung). Demnach könnte Cohesin für die Vernetzung makromolekularer PCM-Komponenten sorgen und somit auf indirekte Art und Weise den festen Zusammenhalt beider Centriolen vermitteln. Als möglicher Kandidat hierfür wäre Pericentrin zu nennen, dessen Separase-abhängige Spaltung ebenso wie die von Cohesin zur Entkopplung beider Centriolen beiträgt. Aus einem möglichen Zusammenwirken beider Separasesubstrate ergeben sich interessante Forschungsansätze für die Zukunft, etwa hinsichtlich einer möglichen direkten oder indirekten Interaktion zwischen Cohesin und Pericentrin oder ob nach deren beider (artifizieller) Spaltung additive Effekte im Prozess der Centriolenentkopplung zu verzeichnen sind. Wie bereits in Kapitel 2.4.1 erwähnt, muss zwischen zwei verschiedenen Fraktionen von PCM-Komponenten unterschieden werden. Während

Mitglieder der einen Fraktion während des gesamten Zellzyklusverlaufs eng mit dem parentalen Centriol assoziiert bleiben, werden Angehörige der zweiten Fraktion erst unmittelbar vor oder nach Eintritt in Mitose stabil in die periphere PCM integriert. Cohesin wird möglicherweise bereits in Telophase, spätestens jedoch in S-Phase stabil an die Centrosomen lokalisiert, um dort die Kopplung zwischen dem Mutter- und dem sich neu assemblierenden Tochtercentriol zu bewerkstelligen, womit der Ringkomplex eher der ersten Gruppe zuzuordnen ist. Viele miteinander interagierende Cohesinkomplexe könnten dabei eine Art Netz um Mutter- und Tochtercentriol ausbilden und so deren engen Zusammenhalt vermitteln. Mit Eintreten in Mitose könnten sich die PCM-Komponenten der zweiten Fraktion außen an das Netz anlagern. Während die PCM-Proteine in Interphase einer strengen hierarchischen Anordnung unterliegen, welche durch Pericentrin koordiniert wird (vgl. Abb. 5, [129, 130]), lagern sie sich im Zuge der PCM-Schwellung mit Eintritt in Mitose völlig chaotisch zusammen [274]. Dennoch übernimmt Pericentrin möglicherweise auch eine zentrale Funktion bei der Stabilisierung dieser peripheren PCM. Durch Separase-abhängige Spaltung von Pericentrin könnten Protein-Protein-Interaktionen verloren gehen und als Folge die äußeren PCM-Schichten „verflüssigt“ werden, wodurch ein Eindringen der Protease in zentralere Bereiche ermöglicht wäre. Die nachfolgende Spaltung des Cohesinnetzwerks sowie des auch in unmittelbarer Nähe der Centriolen vorliegenden, übrigen Pericentrins könnte dann die vollständige Entkopplung beider Centriolen einleiten.

4.1.4 Ist eine pre-RC-abhängige centrosomale Cohesinrekrutierung auch in anderen Modellsystemen denkbar?

Eine pre-RC-abhängige Lokalisation von *Scc2/Scc4* und letztendlich Cohesin an das Chromatin wurde bislang nur in *X. laevis* gezeigt [42–44]. Zumindest in *S. cerevisiae* wird die Ausbildung funktioneller pre-RCs für die chromosomale Rekrutierung von Cohesin nicht benötigt, ein Befund, der sich auch wegen der zeitlichen Diskrepanz beider Prozesse (pre-RC-Assemblierung in Telo- vs. Cohesinlokalisierung in später G1-Phase) erwarten lässt [275]. Demgegenüber wird in allen höheren Eukaryoten die chromosomale Assoziation von *Scc2/Scc4* und Cohesin bereits in Telophase beobachtet, sodass es zumindest möglich wäre, dass pre-RCs auch in

anderen Metazoen an der chromosomalen Cohesinlokalisierung beteiligt sind. Unterstützt wird diese Annahme durch genomweite Untersuchungen an verschiedenen *Drosophila*-Zelllinien, welche zeigen konnten, dass sowohl Scc2 als auch Cohesin präferenziell an solche DNA-Bereiche binden, die transkriptionell aktiv sind und mit den Bindungsstellen von RNA-Polymerase II überlappen [17]. Interessanterweise existieren zudem Studien, welche belegen, dass in *Drosophila*-Zellen Replikationsursprünge zumeist ebenfalls in aktiv transkribierten Genomsequenzen zu finden sind und häufig mit chromosomal gebundener RNA-Polymerase II koloalisieren [276]. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass auch in *Drosophila* ein Zusammenhang zwischen der Assemblierung funktioneller pre-RCs und der chromosomalen Lokalisierung des Kollerin- bzw. des Cohesinringkomplexes besteht.

Eine Kopplung dieser beiden Prozesse erscheint sinnvoll, wird hiermit doch sichergestellt, dass Cohesin einerseits regelmäßig über die Chromosomen verteilt wird und andererseits bereits zu Beginn der G1-Phase Chromatin-gebunden vorliegt und also instantan mit der beginnenden DNA-Replikation die Kohäsion beider Schwesterchromatiden ausbilden und aufrecht erhalten kann. Ebenso wäre es zweckmäßig, einen solchen etablierten Rekrutierungsmechanismus auch auf centrosomaler Ebene beizubehalten, ermöglicht dies doch eine zusätzliche Regulationskomponente, mittels derer die beiden eng zu koordinierenden Prozesse der DNA-Replikation und der Centrosomenduplikation aufeinander abgestimmt werden können. Ob ein solcher Zusammenhang tatsächlich auch in anderen mehrzelligen Modellsystemen besteht, muss durch zukünftige weiterführende Experimente eruiert werden.

4.2 Die Restrukturierung und Neuorganisation des Chromatins während der Mitose

4.2.1 Ist Condensin an der chromosomalen Restrukturierung in Mitose beteiligt?

Es war zu untersuchen, ob Condensin neben der bereits bekannten Topoisomerase II α an der Restrukturierung des Chromatins eines somatischen Donorzellkerns

während der Mitose beteiligt ist und diesen somit für die Erfordernisse einer schnellen und effizienten DNA-Replikation während der S-Phase in den frühen embryonalen Teilungen adaptiert. Diese Fragestellung konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht beantwortet werden. Eine evtl. stattfindende chromosomalen Reorganisation sollte durch zwei unabhängige Versuchsmethoden beurteilt werden. Durch molekulares *Combing* lassen sich die Abstände zwischen zwei benachbarten Replikationsursprüngen bestimmen, und da die Restrukturierung des somatischen Donorchromatins mit einer Zunahme von Replikationsinitiationsstellen einhergeht, könnte hiermit indirekt auf einen zunehmenden Kompaktierungsgrad geschlossen werden. Im Gegensatz dazu erlaubt die MFHT eine direkte Visualisierung und Vermessung der an der nukleären Matrix verankerten Chromatinschleifen. Trotz vielversprechender Anfänge erwiesen sich beide Methoden als wenig robust und schlecht reproduzierbar, was sicherlich nicht zuletzt auch der Unerfahrenheit des Experimentators geschuldet ist. Eine weitere Ursache für die schlechte Reproduzierbarkeit ist wahrscheinlich in der unterschiedlichen Qualität der *Xenopus*-Extrakte zu suchen. Hinsichtlich der Versuche zum molekularen *Combing*s wurden trotz gleicher prinzipieller Vorgehensweise unterschiedliche Ergebnisse erhalten, bisweilen waren weite Teile eines DNA-Moleküls repliziert worden, ein anderes Mal jedoch wurden nur kurze neu-synthetisierte Bereiche detektiert. Dies lässt vermuten, dass je nach Qualität der zugrunde liegenden Eier die Fähigkeit des resultierenden Extraktes zur Initiation und Fortführung der DNA-Replikation deutlich schwankte. Da schon das Fehlen eines einzigen essentiellen Faktors der Replikationsinitiation oder -elongation den gesamten Prozess zum Erliegen bringen kann, könnte eine unzuverlässige DNA-Replikation aus dem vorzeitigen Abbau einer solchen wichtigen Komponente resultieren.

Auch die Ergebnisse zur MFHT werden maßgeblich von der Qualität der Eiextrakte beeinflusst, denn letztere unterschieden sich deutlich hinsichtlich ihrer Fähigkeit, mitotisch vorinkubierte Erythrocytenzellkerne erfolgreich in S-Phase zu überführen. Eine mögliche Erklärung für den ineffizienten Übergang in S-Phase könnte in einem anhaltend aktiven *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) zu suchen sein. In unbefruchteten Eiern von *Xenopus* spielt dieser neben dem spezifischen APC/C-Inhibitor Emi2 (auch bekannt als xErp1) und Cdk2^{CyclinE} eine entschei-

dende Rolle bei der Aufrechterhaltung des CSF-vermittelten Arrests in Metaphase II [277, 278]. Dabei wird induziert durch Progesteron und verknüpft über eine MAPK-Signalkaskade die *Checkpoint*-Kinase Bub1 aktiviert, welche in Komplex mit weiteren SAC-Komponenten den APC/C-Cofaktor Cdc20 sequestriert. Somit bleibt der APC/C inaktiv und ein Übergang in Anaphase unterbleibt. Erst infolge einer Befruchtung und dem damit einher gehenden Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels wird Calmodulinkinase (Camk) II aktiviert und phosphoryliert neben Emi2 auch Effektoren des MAPK-Signalwegs [262, 279, 280]. Somit werden beide Inhibitionsmechanismen abgeschaltet und vermittelt durch den nun aktiven APC/C wird die Meiose beendet und ein Übergang in S-Phase eingeleitet. Bei den Erythrocytenzellkernen handelt es sich um somatische Kerne des G0-Stadiums, d. h. die genetische Information wird hier in Form von Ein-Chromatid-Chromosomen gespeichert. Dies führte möglicherweise zu Problemen bei der Vorinkubation im Metaphase II-arretierten CSF-Extrakt, da sich aufgrund nicht vorhandener Schwesterkinetochore keine funktionellen Spindelapparate ausbilden können und ein anhaltend aktiver SAC den Calcium-induzierten Übertritt in Anaphase gegebenenfalls verhindert. Natürlich haben auch Spermienzellkerne die Meiose vollendet und verfügen somit über Ein-Chromatid-Chromosomen, dennoch waren hier keinerlei Probleme beim Übergang in S-Phase zu verzeichnen. Es wäre jedoch möglich, dass somatische Erythrocytenzellkerne in einer Konfiguration vorliegen, die den SAC stärker herausfordert als dies für Gametenzellkerne der Fall ist. In zukünftigen Experimenten könnte der SAC durch Zugabe von rekombinanten p31^{comet} inaktiviert und ein Übergang in Interphase so forciert werden. Denn indem p31^{comet} an die *Checkpoint*-Komponente Mad2 bindet, wird dessen Interaktion mit weiteren Mad2-Molekülen inhibiert und die Sequestrierung von Cdc20 unterbrochen [281, 282]. Es ist durchaus denkbar, dass in Gegenwart dieses *Checkpoint*-Inhibitors die Empfindlichkeit des Extraktes gegenüber Calciumionen gesteigert wird und so ein Übergang in Interphase schneller und effizienter erfolgen kann.

4.2.2 Wie könnte eine chromosomale Restrukturierung auf molekularer Ebene erfolgen?

Wie bereits erwähnt, besagt das von Lemaitre u. a. [247] favorisierte und in Abbildung 8 zusammengefasste Modell, dass das Chromatin eines somatischen Donorzellkerns während der mitotischen Vorinkubation eine umfassende Neuorganisation erfährt, die bei unmittelbarer Inkubation in S-Phase unterbleibt. Diese chromosomale Restrukturierung beinhaltet eine dichtere Packung der Chromatinschleifen, sodass mehr Kontakte zwischen dem Chromatin und der Kernmatrix geschaffen werden. Doch ob eine solche nukleäre Matrix tatsächlich auch *in vivo* existiert, darüber herrscht bislang Uneinigkeit. Fakt ist nämlich, dass das Chromatingerüst nur nach Präparation unter relativ harschen Bedingungen (z. B. nach Hochsalzextraktion) darstellbar ist und in nativen Chromosomen kein solches zusammenhängendes Proteinstützwerk zu finden ist. Auch die Lokalisation des Condensins als bestimmender Faktor der Chromosomenarchitektur lässt Zweifel an der Existenz einer Kernmatrix aufkommen, denn dessen prominente Anreicherung entlang der Längsachse fixierter Chromosomen wird durch die Lokalisation von fluoreszenzmarkiertem Condensin in lebenden Zellen nicht untermauert [184, 189, 191, 202]. Deshalb wird auch ein alternatives Modell diskutiert, in dem ein breit angelegtes Netzwerk Condensin-vermittelter Interaktionen für eine Kompaktierung der Chromosomen sorgt. Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen und Röntgenstrukturanalysen anhand von menschlichen mitotischen Chromosomen liefern Hinweise darauf, dass der um die Nukleosomen gewundene DNA-Faden nicht, wie in den meisten Lehrbüchern modellhaft dargestellt, hierarchisch weiter aufgefaltet, sondern durch unregelmäßig ausgebildete intramolekulare Kontakte zusammengehalten und komprimiert wird [283]. Eine solche nicht-hierarchische Kompaktierung der Chromosomen würde eine deutlich höhere Dynamik und Flexibilität der Nukleosomenfaser implizieren, da die DNA für Prozesse wie die DNA-Replikation, RNA-Transkription, DNA-Reparatur oder Rekombination leichter zugänglich ist und Zielsequenzen einfacher ausgelesen werden können. Zudem würde die unregelmäßige Faltung des DNA-Stranges eine dynamische Ausbildung von Chromatinschleifen erlauben, wodurch Wechselwirkungen zwischen Promotor- und Enhancelementen leichter verwirklicht und wieder aufgehoben werden können.

Bei der in Mitose stattfindenden Restrukturierung des interphasischen Chromatins würden demnach keine neuen Kontakte zwischen DNA und (möglicherweise nicht-existenter) Kernmatrix ausgebildet. Vielmehr könnte das unregelmäßige Maschenwerk, in dem verschiedene Domänen innerhalb eines DNA-Fadens miteinander interagieren, durch die Ausbildung neuer Wechselwirkungen verdichtet und stabilisiert werden. Auch für eine solcherart gestaltete Neuorganisation des Chromatins bietet sich Condensin in Zusammenarbeit mit Topoisomerase II an, könnte es doch, bedingt durch seine Ringstruktur, verschiedene Bereiche der DNA miteinander verbrücken. Mit einem zunehmend dichteren Maschenwerk könnten die zu replizierenden DNA-Abschnitte verkürzt und im Gegenzug die Anzahl der zu initialisierenden Replikationsstartstellen erhöht werden. Auch über einen solchen Mechanismus würde die chromosomale Restrukturierung während der Mitose die Gegebenheiten für eine schnelle und effiziente DNA-Replikation in der nachfolgenden S-Phase schaffen.

5 Material und Methoden

Hard- und Software

Die im Rahmen dieser Arbeit getätigten Analysen von DNA- und Proteinsequenzen erfolgten mit Hilfe des Programmpakets „DNAS_tar Lasergene“ (GATC Biotech), für Sequenzvergleiche wurde zudem der EMBL-Service „*Pairwise Sequence Alignment*“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) herangezogen. Chemilumineszenzsignale von Westernblots wurden unter Verwendung des „LAS-4000“-Systems (Fuji Film) detektiert, bei der Bildauswertung kam das Programm „MultiGauge“ (Fuji Film) zum Einsatz. Fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden an einem Zeiss Axioplan 2 mit angeschlossener CCD-Kamera durchgeführt, digitale Aufnahmen wurden mit der zugehörigen Software „AxioVision“ (Zeiss) angefertigt und unter Zuhilfenahme der Programme „Adobe Photoshop CS4“ (Adobe Systems Inc.), „Gimp“ (Versionsnr. 2.6) und „Imagination4J“ bearbeitet. Zur Erstellung von Diagrammen wurde auf „Numbers '09“ (Apple Inc.) zurückgegriffen und unter Verwendung von „InkScape“ (Versionnr. 0.48) wurden Abbildungen zusammengestellt. Für Literatur- und Datenbanksuchen wurde der durch das „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bereitgestellte Online-Service genutzt. Unter Verwendung von „T_EX MAKER“ (Version 4.3) wurde diese Dissertation fertiggestellt.

Protokolle

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeitstechniken basieren im wesentlichen auf Standardmethoden, wie sie in Ausubel u. a. [284] und Sambrook und Russell [285] erläutert werden oder folgen den Anweisungen des jeweiligen Herstellers. Es wurde stets auf die Verwendung von deionisiertem sterilen Wasser und - soweit notwendig - sterilen Lösungen und Materialien geachtet.

Chemikalien und Reagenzien

Falls nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biorad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), GE Healthcare (München), Invitrogen (via Fisher Scientific, Schwerte), Merck/Calbiochem (Darmstadt), Mil-

lipore (Schwalbach), New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. M.), Pierce/Fisher Scientific (Schwerte), Promega (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma-Aldrich (Steinheim).

Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit benötigten, gegen xSmc1/xSmc3, xMcm5, xSmc2 und xSmc4 gerichteten, polyklonalen Antikörper wurden aus Kaninchen gewonnen, wie in Kapitel 5.3.7 beschrieben. Ein xC-Nap1-erkennender, polyklonaler Antikörper wurde in Meerschweinchen generiert. Weiterhin kamen die folgenden Primäantikörper zum Einsatz: Kaninchen-*anti-hCentrin2* (zur Verfügung gestellt von Laura Schöckl), Kaninchen-*anti-xOrc2* (Serum, zur Verfügung gestellt von Johannes Walter, Harvard Medical School, Boston, USA), Ziege-*anti-GST* (zur Verfügung gestellt von Dominik Boos), Meerschweinchen-*anti-xCENP-A* (zur Verfügung gestellt von Beata Rymarczyk), Maus-*anti- α -Tubulin* (Hybridomaüberstand E4, Developmental Studies Hybridoma Bank, 12G10) sowie unspezifische Kaninchen-IgG (Sigma-Aldrich, Steinheim).

Als sekundäre Antikörper bei Immunblots dienten Peroxidase-gekoppelte, polyklonale Ziege-*anti-Maus-* und -*anti-Kaninchen-* (Sigma-Aldrich, Steinheim) sowie Rind-*anti-Ziege-IgG* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Zur sekundären Detektion in Immunfluoreszenzanalysen wurden polyklonale Ziege-*anti-Meerschweinchen-Cy3-*, -*anti-Kaninchen-Alexa488-* sowie -*anti-Maus-Cy5-IgG* (Invitrogen/Fisher Scientific, Schwerte) eingesetzt.

DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz
xTopo2_5'	5'-TAA GGC CGG CCC ATG GAG ACC GAA CCT TTG CAG CC-3'
xTopo2_3'	5'-GGC GCG CCT ATA GCT GAG TCT GTG CTT TGA ATT TTA CCC AG-3'
xMcm5_5'Fse1	5'-TTC GGC CGG CCA ATG TCG GGA TTT GAT GAT CTT GG-3'
xMcm5_3'Asc1	5'-GTT GGC GCG CCT ACT TGA TGC GGT ACA GGA CTT T-3'

Plasmide

Plasmid	Insert	Markierung	Vektor
pJUL2899	xC-Nap1	GST-Sumo1	pET28M
pJUL2906	xSmc1(hinge)/xSmc3(hinge)	His ₆ -Sumo1	pRSF-Duet1
pJUL2907	xMcm5	His ₆ -Sumo1	pET28M
pJUL2908	xMcm5	GST	pGEX
pJUL2909	xMcm5	GST-Tev ₃	pGEX
pJUL3402	xTopo2(N-term)	His ₆ -Sumo3	pET28M
pJUL3403	xTopo2(N-term)	His ₁₀	pET28M

5.1 Mikrobiologische Techniken

5.1.1 *E. coli*-Stämme

XL-1 Blue *E. coli supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻*
F'[*proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 Tn10(Tet^R)*] (Stratagene)

BL21(DE3) *E. coli B F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm Tet^r*
 λ (DE3[*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]) *EndA*
The[argU ileY leuW Cam^R] (Stratagene)

Rosetta 2 *E. coli F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ Cam^R* (Novagen)

Rosetta 2 (DE3) *E. coli F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm*
 λ (DE3[*lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5*]) *Cam^R* (Novagen)

5.1.2 *E. coli*-Vektoren

Bei einigen Vektoren war die multiple Klonierungsstelle (MCS) deletiert und durch Restriktionsschnittstellen für die beiden Enzyme *FseI* und *AscI* ersetzt worden.

Vektor	Epitop	Resistenz
pET28	N-His ₆ -SUMO1	Kanamycin
pET28	N-GST-SUMO1	Kanamycin
pRSF-Duet1	N-His ₆ -SUMO1	Kanamycin
pGEX	N-Glutathion-S-Transferase	Ampicillin
pGEX-Tev ₃	N-Glutathion-S-Transferase-Tev ₃	Ampicillin

5.1.3 *E. coli*-Medien

LB-Medium 1 % (w/v) Trypton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 1 % NaCl (w/v)
 in ddH₂O gelöst und autoklaviert

LB-Agar LB-Medium mit 1,5 % Agar

5.1.4 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden in Flüssigkultur unter Schütteln bei 200 U/min und 37°C angezogen, LB-Agarplatten wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterienzellen wurden den Medien Antibiotika mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml für Ampicillin und 30 µg/ml für Kanamycin zugegeben. Die Dichte der Bakterienkultur konnte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt werden. Kulturen auf Agarplatten wurden höchstens zwei Wochen lang bei 4°C gelagert. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Flüssigkulturen mit Glycerin in einer Endkonzentration von 20 % versetzt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.1.5 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Tbf1-Puffer 30 mM KAc
 50 mM MnCl₂
 100 mM KCl
 15 % Glycerin
 auf pH 5,8 eingestellt

Tbf2-Puffer	10 mM MOPS-NaOH 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerin auf pH 7,0 eingestellt
SOB-Medium	0,5 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 2,5 mM KCl auf pH 7,0 eingestellt in ddH ₂ O gelöst und autoklaviert

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 4 ml einer Übernachtskultur (stammend von einer einzelnen Kolonie des jeweiligen *E. coli*-Stammes) in 300 ml SOB-Medium inokuliert und bei 37°C auf eine OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Nach 15-minütiger Abkühlung der Kultur auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (3 000 g, 15 min, 4°C) geerntet. Für alle weiteren Schritte wurden ausschließlich auf 4°C vorgekühlte sterile Materialien und Lösungen verwendet. Nach vorsichtiger Resuspension des Bakterienpellets in 90 ml Tbf1-Puffer wurden die Zellen 15 min (XL1-Blue) bzw. 45 min (BL21 und Rosetta 2) auf Eis inkubiert. Nach einer sich anschließenden zweiten Zentrifugation (1 500 g, 15 min, 4°C) wurden die Bakterienzellen in 15 ml Tbf2-Puffer aufgenommen und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend konnte die Zellsuspension aliquotiert und nach Schockfrieren bei -80°C gelagert werden.

5.1.6 Transformation von *E. coli*

Nachdem kompetente Bakterienzellen auf Eis aufgetaut worden waren, wurden 50 µl der Bakteriensuspension mit 0,5 µl gereinigter Plasmid-DNA bzw. 5 µl eines Ligationsansatzes (vgl. Absatz 5.2.6) versetzt und 30 min lang auf Eis inkubiert. Zur Transformation der Bakterienzellen wurden diese einem 90-sekündigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und eine weitere Minute lang auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zunächst in 1 ml LB (ohne Antibiotikazusatz) aufgenommen

und anschließend mindestens 45 min lang bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Regeneration der Bakterienzellen wurden diese auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.1.7 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 10 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einem transformierten *E. coli*-Klon beimpft und anschließend über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in frisches LB-Medium inokuliert wobei eine OD₆₀₀ von etwa 0,05 eingehalten wurde. Während der weiteren Inkubation bei 37°C wurde in regelmäßigen Zeitabständen die Zelldichte über die Messung der OD₆₀₀ verfolgt und bei Erreichen eines Werts von 0,5 bis 0,7 war die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induziert worden. Zur Expression der meisten rekombinanten Proteine bei 37°C wurde die Kultur hierfür mit 1 mM IPTG versetzt und für weitere zwei Stunden im Schüttler inkubiert. Bei einigen Fusionsproteinen erwies sich eine langsamere Expression über Nacht als günstiger. In diesen Fällen wurden der Kultur 0,1 mM IPTG zugegeben und die weitere Inkubation unter Schütteln erfolgte bei Raumtemperatur. Zur Ernte der Zellen wurden diese 15 min lang bei 5 000 g und 4°C abzentrifugiert und anschließend entweder direkt lysiert oder das Pellet wurde nach Schockfrieren bei -80°C gelagert.

Vor und nach Proteinexpression wurden der Kultur Proben (geeicht auf eine Zelldichte von 0,2 OD₆₀₀/ml) entnommen und für die sich anschließende SDS-PAGE aufbereitet. Hierzu wurde die jeweilige Probe einer 2-minütigen Zentrifugation bei 10 000 g unterzogen, das Baktierienpellet anschließend in 30 µl 1 × SDS-Probenpuffer (vgl. Abschnitt 5.3.1) aufgenommen und 5 min lang bei 95°C inkubiert.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR wurde ein Thermocycler des Typs Techne TC-512 verwendet. Dabei enthielten die Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 μl ca. 50 ng Plasmid-DNA bzw. 2 ng einer *X. laevis*-cDNA-Bibliothek, 0,25 μl der jeweiligen 5'- bzw. 3'-Primer (jeweils 100 μM), 4 μl eines Desoxyribonukleotid-Mixes (2,5 mM), 10 μl des vom Enzymherstellers empfohlenen Reaktionspuffers (5 \times) sowie 0,5 μl an Phusion[®]-DNA-Polymerase (Finnzymes). Das Temperaturprofil wurde in Abhängigkeit von der gewünschten Produktmenge und der zu erwartenden Fragmentlänge den Richtlinien des Herstellers angepasst.

5.2.2 Restriktionshydrolyse von DNA

Das sequenzspezifische Schneiden von DNA mittels geeigneter Restriktionsenzyme erfolgte den Standardprotokollen [285] und den Anweisungen des jeweiligen Enzymherstellers entsprechend. Im Allgemeinen wurden zur Restriktionshydrolyse von 1 μg DNA 5 bis 10 *Units* der Endonuklease verwendet. Dabei wurden Inkubationstemperaturen und -zeiten sowie die Pufferbedingungen auf das jeweilige Restriktionsenzym abgestimmt.

5.2.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Rezirkularisierung des linearisierten Vektorrückgrats zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA durch Zugabe von 4 *Units* Antarktischer Phosphatase (NEB)/ μg Plasmid-DNA 45 min lang bei 37°C dephosphoryliert. Falls darauf nicht unmittelbar eine präparative Gelelektrophorese folgte, wurde die Phosphatase anschließend durch 20-minütige Inkubation bei 72°C inaktiviert.

5.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
TPE-Puffer	90 mM Tris 0,13 % Phosphorsäure (v/v) 2,5 mM EDTA
6×DNA-Ladepuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,6 0,03 % Bromphenolblau (w/v) 0,03 % Xylencyanol (w/v) 60 % Glycerin (v/v) 60 mM EDTA

Mittels Agarosegelelektrophorese konnten DNA-Fragmente entsprechend ihrer jeweiligen Größe aufgetrennt werden. Abhängig von den jeweiligen Fragmentlängen wurden hierzu Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 und 2,0 % (w/v) in TBE- oder TPE-Puffer gewählt. Um die DNA anschließend mittels UV-Bestrahlung sichtbar machen zu können, wurden dem Gel außerdem 1 µg/ml Ethidiumbromid beigegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte nach Anlegen einer Spannung von 10 V/cm Gellänge.

5.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter Verwendung eines Skalpell wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die enthaltene DNA mit Hilfe des GeneJET™ Gel Extraction-Kits (Fermentas) entsprechend den Herstellerangaben aufbereitet.

5.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

T4-DNA-Ligase-Puffer 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM MgCl₂
10 mM DTT
1 mM ATP

Die ungefähren Mengen an *Insert* und linearisiertem Vektor wurden anhand eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels bestimmt. Ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt in der Regel 50 ng Vektor-DNA, den im Vergleich zur Vektormenge dreifachen molaren Überschuss an *Insert* sowie 0,5 µl T4-DNA-Ligase (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Markus Herrmann, AG Stemmann). Die Ansätze wurden entweder eine Stunde lang bei 37°C oder aber über Nacht bei 18°C inkubiert und anschließend wurde die T4-DNA-Ligase durch eine 20-minütige Inkubation bei 72°C inaktiviert.

5.2.7 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli*, welche die gewünschte Plasmid-DNA enthalten sollte, wurde in 3 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37°C expandiert. Die Plasmid-DNA konnte nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen mittels spezieller Silicasäulchen aufgereinigt werden (vgl. auch Produktinformation zum QIAprep[®] Spin Miniprep Kit von Qiagen bzw. zum GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific zur Plasmidpräparation von bis zu 20 µg DNA). Größere DNA-Mengen wurden ausgehend von 50 bzw. 250 ml Kulturvolumen mittels des Plasmid-Midiprep-bzw. -Maxiprep-Kits der Firma Qiagen gewonnen.

5.2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

An einem ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen) wurde die in einer Plasmidpräparation vorliegende Konzentration an DNA durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) ermittelt. Dabei entsprach eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml an doppelsträngiger DNA.

5.2.9 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 700 ng Plasmid-DNA sowie 20 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

4×SDS-Probenpuffer 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
 40 % Glycerin (v/v)
 8 % SDS (w/v)
 0,04 % Bromphenolblau (w/v)
 5 % β-Mercaptoethanol (v/v)

Laemmli-Laufpuffer 193 mM Glycin
 25 mM Tris
 0,1 % SDS (w/v)

	Trenngel		Sammelgel
	8 %	17 %	7 %
1 M Tris-HCl, pH 8,8	13,1 ml	14,0 ml	
1 M Tris-HCl, pH 6,8			4,1 ml
2,5 M Sucrose		2 ml	
H ₂ O	12,4 ml		20,6 ml
30 % Acrylamid/0.8 % Bisacrylamid	9,3 ml	21,3 ml	7,6 ml
20 % SDS (w/v)	20 µl	20 µl	20 µl
10 % APS (w/v)	160 µl	160 µl	160 µl
TEMED	14 µl	11 µl	10 µl

Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurden unter Verwendung eines Gradientenmischers und vorgekühlter Acrylamid-Gellösungen Gradientengele mit einem Acrylamidgehalt rangierend von 8 zu 17 % gegossen. Alternativ wurden kommerziell erhältliche

Gradientengele (Serva Gel™ Neutral pH 7,4 von Serva) verwendet. Vor dem Beladen wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 bis 10 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei einer angelegten Stromstärke von 25 mA je Gel durchgeführt, wobei als Molekulargewichtsstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) zum Einsatz kam.

5.3.2 Kolloidale Coomassie-Blau-Färbung

kolloidale Coomassie-Lösung 0,1 % Coomassie Brillant G-250 (w/v)
 10 % Ammoniumsulfat (w/v)
 12 % Phosphorsäure (v/v)

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden Polyacrylamidgele mit kolloidalem Coomassie angefärbt (siehe auch [286]). Hierzu wurden SDS-Gele mindestens 8 h lang in kolloidaler Coomassie-Lösung inkubiert, der Methanol in einer Endkonzentration von 20 % (v/v) frisch zugesetzt worden war. Zur Entfärbung wurden die Gele über Nacht in deionisiertem Wasser inkubiert. Zur längerfristigen Lagerung der Coomassie-gefärbten SDS-Gele wurden diese unter Verwendung eines GD2000 Slab Gelrockners auf Filterpapier getrocknet.

5.3.3 Detektion von Proteinen mittels Western Blot

Transferpuffer 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 20 % Methanol (v/v)

10×TBS 250 mM Tris
 1,37 M NaCl
 27 mM KCl
 mit HCl eingestellt auf pH 7,5

Basierend auf dem Protokoll nach Baldo und Tovey [287] wurden Proteine nach erfolgter Größentrennung mittels SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Unter Verwendung von Blotapparaturen der Firmen Peqlab oder Bio-rad wurden sie hierzu im *semi dry*-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran (Serva) transferiert, welche zuvor in reinem Methanol inkubiert worden

war. Der Proteintransfer wurde während einer Zeitspanne von 90 bis 120 min bei einer angelegten Spannung von 13 V durchgeführt, anschließend wurde die Membran mindestens eine Stunde lang in 5 %iger Magermilchlösung in 1×TBS, 0,05 % Tween-20 (v/v) inkubiert. Geeignete Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper wurden in 1×TBS mit 1 % BSA, 0,1 % Triton X-100 und 0,1 % NaN₃ hergestellt, die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach mehrmaligem Waschen der Membran in Magermilchlösung wurde die Membran zwei Stunden lang mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert, der zuvor in Magermilchlösung verdünnt worden war. Nachfolgend wurde die Membran zunächst mit Magermilchlösung und anschließend mit 1×TBS, 0,05 % Tween-20 (v/v) gewaschen. Unter Verwendung kommerziell erhältlicher Chemilumineszenzreagenzien (ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit von GE Healthcare) konnten die Westernsignale detektiert werden.

5.3.4 Native Proteinaufreinigung aus *E. coli*

10×PBS 1,37 M NaCl
 27 mM KCl
 100 mM Na₂HPO₄
 18 mM KH₂PO₄
 auf pH 7,4 eingestellt

Lysepuffer 1×PBS
 400 mM NaCl
 5 mM Imidazol
 5 mM β-Mercaptoethanol
 auf pH 7,0 bis 7,5 eingestellt

Nachdem die Bakterienzellen zunächst gründlich in Lysepuffer resuspendiert worden waren (je Gramm Biofeuchtmasse wurden 10 ml Lysepuffer verwendet), wurden die Zellen mittels eines EmulsiFlex C5-Microfluidizers (Avestin Inc.) 10 min lang bei einem angelegten Druck von 1030 bis 1170 bar lysiert. Alternativ erfolgte die Zellyse mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators des Typs Sonopuls HD 2070 (Bandelin). Dabei wurden die resuspendierten Zellen 3 min lang Ultraschallpulsen

(Leistung 35 W, Frequenz 10 kHz) ausgesetzt und anschließend 2 min abkühlen gelassen, dieses Vorgehen wurde 4 bis 5 mal wiederholt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Lysat einer 20-minütigen Zentrifugation (25 000 g, 4°C) unterzogen und mit dem klaren Überstand wurde anschließend weitergearbeitet.

5.3.4.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatografie His₆-markierter Proteine

Waschpuffer 1×PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4)
 400 mM NaCl
 20 mM Imidazol
 5 mM β-Mercaptoethanol
 auf pH 7,0 bis 7,5 eingestellt

Elutionspuffer vgl. Waschpuffer aber mit 250 mM Imidazol

Zur Isolierung von His₆-markierten Proteinen aus *E. coli*-Lysaten wurde Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) als Affinitätsmatrix verwendet, wobei das aus 1 l Expressionskultur gewonnene Lysat mit 500 µl Ni²⁺-NTA-Agarose vermischt und 2 h lang bei 4°C unter Schwenken inkubiert wurde. Für das weitere Vorgehen wurde die Matrix in Biorad-Kunststoffsäulen überführt und anschließend 4 bis 5 mal mit mindestens dem 10-fachen Bettvolumen an Waschpuffer gewaschen. Zur Elution des gebundenen Proteins wurde die Matrix mit 1 ml Elutionspuffer versetzt und nachfolgend 4 min lang unter Schwenken inkubiert. Dies wurde solange wiederholt, wie sich über eine photometrische Absorptionsmessung sinnvolle Proteinmengen in den Elutionsfraktionen nachweisen ließen. Daraufhin wurden Fraktionen mit vergleichbaren Proteinkonzentrationen vereinigt und sequentiell gegen insgesamt 2 l Lysepuffer dialysiert. Enthielt das rekombinant erzeugte Fusionsprotein neben des His₆-Affinitätsanhangs zusätzlich das kleine Protein Sumo1, ermöglichte dies eine Abtrennung der His₆-Sumo1-Markierung unter Dialysebedingungen. Hierzu wurden den vereinigten Elutionsfraktionen geringe Mengen des Enzyms His₆-Senp2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Markus Herrmann, AG Stemmann) zugesetzt, wobei zum Schneiden von 1 mg Fusionsprotein 10 µg His₆-Senp2 zum Einsatz kamen. Die sich anschließende erneute zweistündige Inkubation des Dialysats mit Ni²⁺-NTA-Agarose erlaubte die gleichzeitige Eliminierung der

His₆-Sumo1-Markierung und der His₆-Senp2-Protease. Der gesammelte, das gereinigte Protein enthaltende Durchlauf wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.3.4.2 Glutathion-Sepharose-Affinitätsreinigung GST-markierter Proteine

Waschpuffer 1×PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4)
10 mM DTT

Elutionspuffer 50 mM Tris-HCl
50 mM reduziertes Glutathion
auf pH 8,0 eingestellt

Zur Aufreinigung GST-markierter Proteine wurde Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) als Affinitätsmatrix verwendet, wobei das benötigte Bettvolumen für das aus 1 l Expressionskultur erhaltene Lysat 500 µl betrug. Das Bakterienlysat wurde gründlich mit der Sepharose vermischt und anschließend über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Nachfolgend wurde die Affinitätsmatrix in eine Biorad-Säule transferiert und 4-malig mit dem 10-fachen Bettvolumen an Waschpuffer gewaschen. Um das gebundene Fusionsprotein wieder von der Matrix zu lösen, wurde letztere mit 1 ml Elutionspuffer versetzt und 3 h lang unter Schwenken inkubiert. Dieser Elutionsschritt wurde dann noch einmal über Nacht wiederholt. Nachdem beide Elutionsfraktionen vereinigt worden waren, erfolgte eine mehrstündige Dialyse gegen 2 l Lysepuffer. Sofern der GST-Affinitätsanhang über Sumo1 an das aufzureinigende Protein fusioniert war, ermöglichte dies eine Elution mittels Senp2, wobei zum Schneiden von 1 mg Fusionsprotein 10 µg Senp2 in Waschpuffer zugegeben und über Nacht inkubiert wurden. Im Anschluss wurde das Endprodukt aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.3.4.3 Kationenaustauschchromatografie

Puffer A 1×PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4)
50 mM NaCl
auf pH 5,8 eingestellt

Puffer B 1×PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4)
1 M NaCl
auf pH 7,5 eingestellt

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Ladung erfolgte an einem Flüssigchromatographiesystem des Typs ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare) mit angeschlossener HiTrap SP XL-Säule (Säulenvolumen 1 ml). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Nach Äquilibration der Säule in 8 SV Puffer A wurde die Proteinprobe aufgebracht und die Säule mit 10 SV Puffer A gewaschen. Die Elution des aufzureinigenden Proteins sollte durch eine stetige Zunahme der Salzkonzentration bewerkstelligt werden. Hierzu wurden 20 SV Puffer B durch die Säule laufen gelassen. Anschließend wurde die Säule noch einmal mit Puffer B und ddH₂O nachgewaschen. Während des Säulenlaufs wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml gesammelt. Zur Beurteilung des Reinigungserfolgs wurden den Fraktionen 15 µl entnommen, mit 5 µl 4×SDS-Probenpuffer (vgl. Abschnitt 5.3.1) versetzt und per SDS-PAGE und nachfolgender Coomassiefärbung ausgewertet.

5.3.4.4 Gelpermeationschromatografie

Laufpuffer 1×PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4)
200 mM NaCl

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer ÄKTAprime™ plus, an die hierfür allerdings eine HiLoad 26/60 Supadex 75-Säule (Säulenvolumen 330 ml) angeschlossen worden war. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Nach Äquilibration der Säule in Laufpuffer konnte die Probe aufgebracht und Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml gesammelt werden. Um den Erfolg der chromatografischen Aufreinigung anschließend bewerten zu können, wurde eine SDS-PAGE analog zur Kationenaustauschchromatografie durchgeführt.

5.3.5 Proteinaufreinigung aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen

Entfaltungspuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl 8 M Urea auf pH 8,0 eingestellt	oder	50 mM Tris-HCl 5mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol 6 M GdmCl auf pH 8,0 eingestellt
denaturierender Waschpuffer	s.o aber auf pH 6,3 eingestellt	oder	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol 6 M GdmCl auf pH 8,0 eingestellt
denaturierender Elutionspuffer	s.o. aber auf pH 4,5 eingestellt	oder	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol 6 M GdmCl auf pH 8,0 eingestellt
denaturierender Kopplungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl 8 M Urea auf pH 8,4 eingestellt		

Das Fusionsprotein His₁₀-xTopo2(N-term) erwies sich als unlöslich, sodass dessen Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen musste. Dabei wurde der nach Zellaufschluss und Zentrifugation (vgl. Abschnitt 5.3.4) gewonnene (native) Überstand abgenommen und das denaturierte Pellet mit ca. 20 ml nativem Lysepuffer gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Behandlung mit Ultraschallpulsen und die erneute Zentrifugation bei 15 000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ca. 1 h lang unter Rühren in Entfaltungspuffer gelöst, wobei je Gramm Biofeuchtmasse 10 ml des Puffers zum Einsatz kamen. Nach Zentrifugation (30 min bei 15 000 g) wurde der Überstand auf Ni²⁺-NTA-Agarose (500 µl Bettvolumen für ein ursprüngliches Kulturvolumen von 1 l, äquilibriert in Entfaltungspuffer)

gegeben und mind. 2 h lang rotierend inkubiert. Nach Abnahme des Überstands wurde die Ni²⁺-NTA-Matrix drei- bis viermal mit dem 10fachen Bettvolumen an denaturierendem Waschpuffer gewaschen und danach zur Elution des gebundenen Fusionsproteins mit 0,5 bis 1 ml denaturierendem Elutionspuffer versetzt und 20 min unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Agarosematrix niedertourig abzentrifugiert und der Elutionsvorgang drei- bis viermal wiederholt. Sollte das aufgereinigte Protein zur Immunisierung verwendet werden, wurden die gewonnenen Überstände vereinigt und über Nacht gegen 1×PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4) dialysiert. Das sich hierbei ausbildende Proteinpräzipitat wurde daraufhin in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, kurz abzentrifugiert und anschließend in wenig 1×PBS aufgeschlämmt. Nach Schockgefrieren in Flüssigstickstoff konnte das Produkt bei -80°C gelagert werden. Zur Herstellung einer Affinitätssäule wurden im Gegensatz dazu die vereinigten Eluatfraktionen über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert.

Zur gelelektrophoretischen Analyse wurden GdmCl-haltige Proben folgendermaßen aufbereitet: Zu einem Probenvolumen von 5 µl wurden 200 µl 100 % Ethanol pipettiert und nach kurzem, gründlichen Mischen einer einstündigen Inkubation bei -20°C unterzogen. Nach erneutem Mischen wurde die Probe anschließend 5 min lang bei 16 000 g zentrifugiert, das Pellet in 50 µl 2×SDS-Probenpuffer (vgl. Abschnitt 5.3.1) aufgenommen und 15 min lang bei 65°C inkubiert.

5.3.6 Kopplung von Peptiden an Maleimid-aktiviertes KLH

Kopplungspuffer 100 mM Na-Phosphat
 150 mM NaCl
 auf pH 7,2 eingestellt

Entsalzungspuffer 83 mM Na-Phosphat
 900 mM NaCl
 auf pH 7,2 eingestellt

Zur Generierung von Antikörpern gegen xSmc2 und xSmc4 wurden Peptide als Antigene verwendet, wobei für xSmc2 ein C-terminales Peptid mit der Amino-

säuresequenz NH₂-CQQRSDKSKTKERRNRMEVDK-COOH und für xSmc4 ein N-terminales Peptid der Sequenz NH₂-PPKKTKTSTAVAREATEC-COOH ausgewählt und durch die Firma Thermo/Fisher Scientific (Schwerte) synthetisiert wurde. Um eine effiziente Immunantwort bei der nachfolgenden Immunisierung zu ermöglichen, sollten beide Peptide über die verfügbaren freien Sulfhydrylgruppen an Maleimid-aktiviertes mCKLH gekoppelt werden. Hierzu wurden 2 mg des jeweiligen Peptids in 200 µl Kopplungspuffer gelöst und 2 mg des lyophilisierten mCKLHs in 200 µl ddH₂O rekonstituiert. Anschließend wurden beide Komponenten gründlich miteinander vermischt und einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur unterzogen. Eventuell denaturiertes Protein wurde während einer kurzzeitigen Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C abgetrennt. Um das Antikoagulans EDTA aus dem Überstand zu eliminieren, wurde dieser im Anschluss einer Gelfiltration unterzogen. Hierbei kam eine 5 ml-HiTrap Entsalzungssäule der Firma GE Healthcare zum Einsatz und bei einer angelegten Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min wurden Fraktionen mit einem Volumen von 300 µl gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm wurden vereinigt, aliquotiert und nach Schockfrieren bei -80°C gelagert.

5.3.7 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern

Zur Generierung polyklonaler Antikörper gegen die *X. laevis*-Proteine xSmc2, xSmc4, xSmc1/xSmc3, xMcm5 und xTopo2 wurden Kaninchen viermalig mit den entsprechenden Antigenen immunisiert, wobei je Injektion 0,5 bis 1 mg Antigen verwendet worden waren. Um einen gegen die centrosomale Komponente xC-Nap1 gerichteten, polyklonalen Antikörper zu gewinnen, wurden des gleichen Meerschweinchen mit einem N-terminalen Fragment dieses Proteins immunisiert. Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Injektionen wurden von der Herstellerfirma festgelegt. Schließlich wurden die Tiere narkotisiert und unter tierärztlicher Aufsicht entblutet. Zur Abtrennung des Serums wurde das Gesamtblut eine Stunde lang bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der folgenden halbstündigen Zentrifugation bei 10 000 g und 4°C wurde das Serum als Überstand erhalten, für gewöhnlich konnten ca. 50 ml Serum aus einem Kaninchen und ca. 15 ml aus einem Meerschweinchen gewonnen werden. Zur Aufreinigung der

Antiseren wurden Affinitätssäulen mit dem entsprechenden Antigen gekoppelt.

5.3.7.1 Affinitätsreinigung von Peptidantikörpern

Kopplungspuffer	50 mM Tris 5 mM EDTA auf pH 8,5 eingestellt
Waschpuffer	100 mM L-Glycin·HCl 50 mM NaCl auf pH 2,5 eingestellt
Lagerungspuffer	1×PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4) 50 % Glycerin
Elutionspuffer	100 mM L-Glycin·HCl auf pH 2,7 eingestellt
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl auf pH 9,0 eingestellt

Das verwendete SulfoLink[®]-Kopplungsgel (Pierce) verfügt über Iodoacetylgruppen, die mittels eines 12-atomigen Spacers an Agarose verknüpft sind. Diese Iodoacetylgruppen reagieren mit den freien Sulfhydrylgruppen der zu koppelnden Peptide unter Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung. Es wurden 2 ml Kopplungsgel in eine Bioradsäule überführt und mit 4 ml Kopplungspuffer äquilibriert. Nachdem 2 mg des jeweiligen Peptids in 1,4 ml Kopplungspuffer aufgenommen worden waren, wurde die Peptidlösung auf die vorbereitete Säule appliziert und anschließend bei Raumtemperatur 15 min lang unter Schwenken sowie 30 min lang stehend inkubiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 3 ml Kopplungspuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen im Gel abzusättigen, wurde die Säule mit 50 mM L-Cystein in Kopplungspuffer 15 min lang unter Schwenken und 30 min lang stehend inkubiert, der Durchfluss wurde verworfen. Nachfolgend wurde das Gel zunächst mit 10 ml 1 M NaCl und danach mit 3 ml Waschpuffer sowie 1 ml 1×PBS gewaschen. Nach Aufsetzen der unteren Verschlusskappe wurde die Säule mit Lagerungspuffer überschichtet, oben mit

Parafilm verschlossen und bei -20°C gelagert.

Zur Aufreinigung spezifischer Peptidantikörper aus Serum wurde letzteres zunächst im Verhältnis 1 : 4 in $1\times\text{PBS}$ verdünnt und steril filtriert. Der Lagerungspuffer wurde aus der Affinitätssäule auslaufen gelassen und letztere wurde mit 10ml $1\times\text{PBS}$ äquilibriert. Die Affinitätskopplung der Peptidantikörper erfolgte über Nacht, wobei das verdünnte Serum im Kreislauf (mittels Pumpe bei einer angelegten Flussgeschwindigkeit von ca. 60 ml/h) über die Säule gegeben wurde. Nachdem die Säule dreimalig mit je 5 ml $1\times\text{PBS}$ gewaschen worden war, erfolgte die Elution mit 8 ml Elutionspuffer. Hierbei wurden 1 ml-Fractionen in Reaktionsgefäßen gesammelt, in die bereits 20 μl Neutralisationspuffer vorgelegt worden waren und sofort gründlich durchmischt. Daraufhin wurde die Säule mit 3 ml $1\times\text{PBS}$ gewaschen, wobei zwei weitere Fractionen gesammelt wurden. Die Säule wurde anschließend so lange mit $1\times\text{PBS}$ weitergewaschen, bis wieder ein neutraler pH erreicht worden war. Nachdem die Affinitätssäule dann mit 5 ml Lagerungspuffer äquilibriert worden war, konnte sie mit demselben überschichtet und gut verschlossen bei -20°C gelagert werden. Für die gesammelten Elutionsfractionen wurde die jeweilige Antikörperkonzentration mittels ihrer UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt und Fractionen vergleichbaren Antikörpergehalts wurden vereinigt. Nach nächtlicher Dialyse gegen Lagerungspuffer wurden die Antikörperlösungen aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -20°C gelagert.

5.3.7.2 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper unter nativen Bedingungen

Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO_3 0,5 M NaCl auf pH 8,3 eingestellt
Puffer A	0,5 M Ethanolamin 0,5 M NaCl auf pH 8,3 eingestellt

Puffer B	0,1 M Natriumacetat 0,5 M NaCl auf pH 4,0 eingestellt
Lagerungspuffer	1×PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4) 50 % Glycerin
Waschpuffer	5 mM Tris-HCl 150 mM NaCl auf pH 6,8 eingestellt
Elutionspuffer	100 mM L-Glycin·HCl 100 mM NaCl auf pH 2,5 eingestellt
Neutralisationspuffer	1×PBS 50 mM Tris-HCl auf pH 9,0 eingestellt

Rekombinant erzeugte und anschließend aufgereinigte Proteine wurden an kommerziell erhältliche Säulen des Typs HiTrap NHS-activated Sepharose™ High Performance 1 ml (GE Healthcare) gekoppelt. Als Säulenmatrix fungiert hierbei quervernetzte Agarose, der über einen 10-atomigen Platzhalter reaktive N-Hydroxy-succinimidgruppen angefügt worden sind. Diese reaktiven Ester reagieren mit primären Aminogruppen unter der Ausbildung einer stabilen Amidbindung, wodurch die Immobilisierung des gewünschten Proteins erzielt werden kann. Zunächst wurde das Isopropanol, in dem die Säulenmatrix konserviert worden war, durch das langsame Durchspülen von dreimalig 2 ml eiskalter 1 mM HCl entfernt. Mittels geeigneter Adaptoren wurde die Säule daraufhin an eine Pumpe angeschlossen und die Proteinlösung (dialysiert gegen Kopplungspuffer) mit dem zu koppelnden Antigen wurde 30 min lang bei Raumtemperatur im Kreislauf über die Säule laufen gelassen. Anschließend wurde die Säule sechsmalig alternierend mit jeweils 6 ml Puffer A bzw. B gewaschen, wobei nach dem zweiten Waschschrift mit Puffer A eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte. Abschließend wurde die Säule mit 10 ml Lagerungspuffer äquilibriert, fest verschlossen und in 20 %

EtOH bei -20°C aufbewahrt.

Nachdem die Affinitätssäule mit 10 ml $1\times\text{PBS}$ gespült worden war, erfolgte die Kopplung der im Serum enthaltenen Antikörper über Nacht, wobei das Serum (im Verhältnis 1 : 4 mit $1\times\text{PBS}$ verdünnt und steril filtriert) mittels einer angeschlossenen Pumpe im Kreislauf über die Säule laufen gelassen wurde. Es folgten zwei Waschstreitte mit 20 ml $1\times\text{PBS}$ und 4 ml Waschpuffer. Spezifisch gebundene Antikörpermoleküle wurden unter sauren pH-Bedingungen durch die Zugabe von 10 ml Elutionspuffer von der Affinitätsmatrix gelöst. Hierbei wurden unter sofortigem Durchmischen 900 μl Fraktionen in Reaktionsgefäßen gesammelt, in die 80 μl Neutralisationspuffer vorgelegt worden waren. Anschließend wurde die Säule so lange mit Neutralisationspuffer nachgewaschen, bis wieder ein pH-Wert von 7 erreicht war. Nach Äquibrierung mit Lagerungspuffer konnte die Säule wieder gut verschlossen in 20 % EtOH bei -20°C aufbewahrt werden. Unter Zuhilfenahme ihrer UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm wurden die erhaltenen Antikörperkonzentrationen in den einzelnen Elutionsfraktionen ermittelt. Fraktionen mit vergleichbarem Antikörpergehalt wurden vereinigt und über Nacht gegen Lagerungspuffer dialysiert. Daraufhin wurden die Antikörperlösungen aliquotiert, schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Zusätzlich war versucht worden, ein gegen xMcm5A und zwei gegen xSc2 gerichtete Peptidantikörper zu generieren. Hierbei übernahm Thermo/Fisher Scientific (Schwerte) sowohl die Peptidsynthese und -reinigung als auch die nachfolgende Immunisierung und Antikörperaufreinigung. Als antigene Aminosäuresequenz war für xMcm5A das Peptid $\text{NH}_2\text{-GAREHERETEKRSS-COOH}$ gewählt worden, für xSc2 $\text{NH}_2\text{-KSLLFNGRIAEEV-COOH}$ und $\text{NH}_2\text{-QTLRSLYAAKDGTSS-COOH}$ (vgl. auch Fabian Merkel, Bachelorarbeit).

5.3.7.3 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper unter denaturierenden Bedingungen

Acetatpuffer 0,1 M CH_3COONa
0,5 M NaCl
auf pH 4,0 eingestellt

BBS-Tween	0,1 M Borsäure 0,025 M Na-Tetraborat 1 M NaCl 0,1 % (w/v) Tween auf pH 8,3 eingestellt
Elutionspuffer	2 M Glycin 10 % 1,4-Dioxan auf pH 2,2 eingestellt
Lagerungspuffer	1×PBS 50 % Glycerin

Zur Herstellung einer mit His₁₀-xTopo2(N-term) gekoppelten Affinitätssäule wurden zunächst 0,5 mg CNBr-aktivierte Sepharose (Sigma C9142) mit 40 ml kalter 1 mM HCl versetzt und 30 min lang auf Eis quellen gelassen. Nach Abnahme des Überstands wurde die Sepharose viermal mit 40 ml 1 mM HCl gewaschen, anschließend in 5 ml ddH₂O aufgenommen und in eine Biorad-Säule überführt. Nach Äquilibrierung der Säule in denaturierendem Kopplungspuffer (vgl. 5.3.5) wurde das gegen denselben Puffer dialysierte Protein auf die Säule appliziert und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Durchlauf verworfen und die Säule zweimal mit jeweils 5 ml denaturierendem Kopplungspuffer gewaschen. Daraufhin wurde das Säulenmaterial mit 0,2 M Glycin (pH 8,0) versetzt und 2 h lang bei 4°C inkubiert, um nicht-reagierte, aktive CNBr-Gruppen zu blockieren. Es folgte das alternierende Waschen der Säulenmatrix mit jeweils 5 ml denaturierendem Kopplungs- bzw. Acetatpuffer, was insgesamt fünfmal durchgeführt wurde. Danach wurde die Säule weitere fünf Male mit 1×PBS/0,1 % NaN₃ gewaschen und anschließend gut verschlossen bei 4°C gelagert. Um später die bei der Immunisierung mit dem Fusionsprotein His₁₀-xTopo2(N-term) ebenfalls anfallenden und möglicherweise störenden *anti*-His-Antikörper aus dem finalen Serum abtrennen zu können, wurde desgleichen eine mit His₆-Sumo1-IBB-EGFP gekoppelte Affinitätssäule hergestellt.

Zur Affinitätsreinigung der gegen den N-Terminus von xTopoisomeraseII gerich-

teten Antikörper wurde zunächst die mit His₆-Sumo1-IBB-EGFP-gekoppelte Säule zweimal mit jeweils 5 ml 1×PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml des steril filtrierten finalen Serums auf die Säule appliziert und 6 h lang bei 4°C rotierend inkubiert. Der aufgefangene Säulendurchlauf sollte dann nur noch wenige der gegen die Histidinmarkierung gerichteten Antikörper enthalten und wurde auf die mit His₁₀-xTopo2(N-term)-gekoppelte Affinitätssäule gegeben während die His₆-Sumo1-IBB-EGFP-Säule mit 1×PBS überschichtet wurde. Beide Säulen wurden bei 4°C über Nacht rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Durchlauf beider Säulen verworfen und letztere nacheinander mit 5 ml 1×PBS, 6 ml BBS-Tween und wieder 5 ml 1×PBS gewaschen. Zur Elution der gebundenen Antikörper wurde auf beide Säulen je 1 ml Elutionspuffer sowie anschließend 1×PBS pipettiert und es wurden jeweils 15 1 ml-Fractionen in Eppendorf-Reaktionsgefäße gesammelt, in welche 250 µl 1 M K₂HPO₄ vorgelegt worden waren. Nach gründlichem Mischen waren Fractionen ähnlicher Antikörperkonzentration vereinigt und über Nacht gegen Lagerungspuffer dialysiert worden. Daraufhin wurden die Antikörperlösungen aliquotiert, schockgefroren und bei -20°C gelagert. Die Affinitätssäulen wurden viermal mit je 5 ml 1×PBS sowie zweimal mit 1×PBS/0,1 % NaN₃ gewaschen und konnten anschließend wieder bei 4°C aufbewahrt werden.

5.3.8 Immundepletion von *X. laevis*-Proteinen aus CSF-Extrakten

Zunächst waren magnetische Protein A-Dynabeads[®] (Invitrogen) nicht-kovalent mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper zu koppeln, wobei zur Bindung von 10 µg Antikörper 1,25 mg Dynabeads verwendet wurden. Nachdem sie gründlich mit 1×PBS gewaschen worden waren, wurden die Dynabeads im initialen Volumen an 1×PBS mit 1 % BSA aufgenommen und es wurde die benötigte Menge an Antikörperlösung zugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads 3-malig mit je 1 ml CSF-XB gewaschen und daraufhin 45 bis 50 min lang bei 11°C mit frisch-präpariertem CSF-Extrakt inkubiert. Bisweilen war für eine vollständige Eliminierung des gewünschten Proteins aus der Extraktprobe eine weitere Inkubation mit frischen Antikörper-gekoppelten Dynabeads notwendig. Um die Effizienz der erfolgten Immundepletion beurteilen zu können, wurden sowohl von den Extrakten als auch

von den Dynabeads SDS-Proben hergestellt. Für erstere wurden 2 μl depletierter Extrakt mit 6 μl 1 \times PBS und 12 μl 2 \times SDS-Probenpuffer (vgl. Kapitel 5.3.4 und 5.3.1) versetzt, gründlich gemischt und anschließend 10 min bei 95°C inkubiert. Die Dynabeads wurden zunächst mit CSF-XB, 300 mM NaCl, 0.1 % Triton X-100 gewaschen, anschließend in $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Beadvolumens an 2 \times SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C inkubiert.

5.4 Zellbiologische Methoden

5.4.1 Verwendete Zelllinie

XS3 S3 Neurulazellen aus *X.l.*-Embryonen

5.4.2 Zellkultivierung

L-15 Leibovitz-Medium 1 \times L-15, GlutaMAX™ (Gibco) ergänzt mit
10 % hitzeinaktiviertem (56°C, 30 min) FCS
100 U/ml Penicillin
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin

Xenopus S3-Zellen wurden bei 28°C und 92 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert, wobei das hier verwendete Leibovitz L-15 Medium (gepuffert auf der Basis von Phosphaten und basischen Aminosäuren) den Verzicht auf eine zusätzliche CO₂-Versorgung erlaubte. Etwa ein- bis zweimal wöchentlich mussten die adhäsiv und einschichtig wachsenden Zellen verdünnt werden. Hierzu wurde die Zellkulturschale (Greiner Bio-One) nach Absaugen des Mediums mit 0,7 \times PBS (vgl. Abschnitt 5.3.4) gespült und 5 min lang bei Raumtemperatur in Gegenwart von 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Trypsin/EDTA (PAA) inkubiert. Danach wurden durch sorgfältiges Auf- und Abpipettieren in frisch zugegebenem Medium die Kontakte der Zellen sowohl zueinander als auch zur Kulturschale gelöst, und die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:8 in neuen Kulturschalen ausgebracht. Zur langfristigen Lagerung waren die trypsinierten Zellen 3 min lang bei 300 g abzentrifugiert und in FCS, 10 % DMSO (v/v) vorsichtig resuspendiert worden. Die aliquotierte Zellsuspension konnte anschließend bei -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Sollten die so gelagerten Zellen wieder in Kultur aufgenommen werden,

erfolgte ein zügiges Auftauen der Zellsuspension bei 37°C mit darauffolgender 3-minütiger Zentrifugation bei 300 g. Die pelletierten Zellen wurden in frischem Leibovitz L-15 Medium resuspendiert und in Zellkulturschalen ausgesät.

5.4.3 Immunfluoreszenzfärbung an XS3-Zellen

PBS	vgl. Abschnitt 5.3.4
Fixierungslösung	1×PBS 3,7 % Formaldehyd (v/v) 0,2 % Triton X-100 (v/v)
Stopplösung	1×PBS 100 mM Glycin
Waschlösung	1×PBS 0,1 % Triton X-100 (v/v)
Permeabilisierungslösung	1×PBS 0,5 % Triton X-100 (v/v)
Blockierlösung	1×PBS 1 % BSA (w/v)
Montiermedium	2,33 % Diaza-bicyclo-(2,2,2)-oktan (w/v) 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 78 % Glycerin (v/v)

Immunfluoreszenzfärbungen an XS3-Zellen wurden durchgeführt, um die Spezifität und Sensitivität von Antikörpern bewerten zu können, die gegen *Xenopus*-Proteine gerichtet waren. Hierfür wurden XS3-Zellen auf Deckgläschen in 6-well-Kulturschalen angezogen, welche zuvor 10 min lang unter UV-Licht sterilisiert worden waren. Hatte die Zellpopulation eine geeignete Dichte erreicht, wurden die Deckgläschen mit 1×PBS gewaschen und anschließend 10 min lang bei Raumtemperatur in Fixierungslösung inkubiert. Anschließend wurde der Fixierungsprozess durch zweimaliges Waschen mit Stopplösung beendet, woran sich ein weiterer Waschschrift mit 1×PBS anschloss. Alternativ und präferenziell zur späteren

Anfärbung centrosomaler Proteine wurden die Zellen mindestens 1 h lang in reinem eiskalten Methanol bei -20°C fixiert und anschließend zweimalig mit $1\times\text{PBS}$ gewaschen. Durch 5-minütige Inkubation der Deckgläschen in Permeabilisierungslösung konnten die Zellmembranen für die nachfolgende Antikörperbehandlung durchlässig gemacht werden. Nachdem die Deckgläschen anschließend erneut mit $1\times\text{PBS}$ gewaschen worden waren, erfolgte eine Inkubation in Blockierlösung bei 4°C (mind. eine Stunde lang oder über Nacht). Daraufhin wurden die Deckgläschen auf Parafilm transferiert und in einer feuchten Kammer eine Stunde lang bei 4°C mit geeigneten Verdünnungen des primären Antikörpers inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschlösung folgte eine einstündige Inkubation der Deckgläschen in passenden Verdünnungen des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur, woraufhin die Deckgläschen erneut viermal mit Waschlösung gespült wurden. Zur Anfärbung der DNA wurden die Zellen in $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 (Sigma B-2261) in Waschlösung inkubiert, anschließend viermal mit Waschlösung gewaschen und mit einem kleinen Tropfen Montiermedium auf einem Objektträger aufgebracht. Nach vollständiger Trocknung des Montiermediums wurden die Deckgläschen zusätzlich mittels Nagellack auf den Objektträgern fixiert.

5.5 Zellbiologische *in vitro*-Untersuchungen

5.5.1 DNA-Combing

5.5.1.1 Silanisierung von Deckgläschen

Zunächst mussten die Deckgläschen gründlich gereinigt werden. Hierfür wurden 30 Deckgläschen in einem Becherglas platziert, kurz mit Aceton gespült und in $50\ \text{ml}$ $50\ \%$ MeOH 20 min lang im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in ein frisches Becherglas überführt, in $50\ \text{ml}$ Chloroform 20 min lang sonifiziert und auf einer mit Chloroform gesäuberten Glasplatte trocknen gelassen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Abzug durchgeführt. Die Deckgläschen wurden in ein Chloroform-gereinigtes Becherglas gegeben und letzteres mittels einer Klemme in einem ca. 65°C warmen Wasserbad platziert. In das Becherglas wurden $18\ \text{ml}$ $30\ \%$ H_2O_2 (w/v) vorgelegt und langsam wurden $42\ \text{ml}$ conc. H_2SO_4

hinzugegeben. Die dabei zu beobachtende Gasentwicklung markierte den Startpunkt der stark exothermen Reaktion. In dieser Lösung wurden die Deckgläschen 20 min lang inkubiert, anschließend mittels einer Teflon-beschichteten Pinzette in ein frisches Becherglas überführt und nacheinander 10 min lang in Chloroform sowie jeweils 5 min lang in ddH₂O und wieder Chloroform sonifiziert. Nachdem die Deckgläschen auf einer Chloroform-gereinigten Glasplatte getrocknet waren erfolgte die Silanisierung in einem frischen Becherglas, in welches 100 ml n-Heptan und 100 µl Octenyltrichlorosilan vermischt worden waren. Dieses Becherglas wurde über Nacht in einem Desiccator und unter einem Abzug platziert. Anschließend mussten die Deckgläschen noch einmal durch aufeinanderfolgende 5-minütige Sonifizierung in n-Heptan, ddH₂O und Chloroform gereinigt werden. Daraufhin wurden sie trocknen gelassen und konnten im Desiccator für mind. zwei Monate bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert werden.

5.5.1.2 Reisolierung von chromosomaler DNA aus *X. l.*-Extrakten und DNA-Combing

OMD-Puffer	10 mM HEPES/KOH, pH 7,7
	70 mM KCl
	500 µM MgCl ₂
	1 mM EGTA/KOH, pH 8,0
	250 mM Sucrose
OMF-Puffer	10 mM HEPES/KOH, pH 7,7
	70 mM KCl
	500 µM MgCl ₂
	1 mM EGTA/KOH, pH 8,0
	10 % Glycerin (v/v)
	0,1 % Triton X-100 (v/v)
OMC-Puffer	10 mM HEPES/KOH, pH 7,7
	70 mM KCl
	500 µM MgCl ₂
	1 mM EGTA/KOH, pH 8,0
	40 % Glycerin (v/v)

PBS	vgl. Abschnitt 5.3.4
ESP-Puffer	0,5 M EDTA/NaOH, pH 8,0 1 % L-Sarcosin (w/v) 2 mg/ml Proteinase K
T ₁₀ E ₁ -Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0
T ₄₀ E ₂ -Puffer	40 mM Tris 2 mM EDTA/NaOH, pH 8,0

Zunächst wurde der Extrakt mit Spermien- oder Erythrocytenkernen versetzt, wobei ca. 600 Kerne pro μl Extrakt verwendet worden waren. Nach 30-minütiger Vorinkubation bei 18°C wurden die Extrakte durch die Zugabe von 20 μM Biotin-11-dUTP (Fermentas) und zweimalig 0,6 mM Ca^{2+} supplementiert. Die Ansätze wurden anschließend auf verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt und abhängig von der experimentellen Fragestellung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 5 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ Aphidicolin und/oder 50 μM Digoxigenin-11-dUTP (Roche) hinzupipetiert. Um einen erneuten Eintritt des Extraktes in Mitose zu verhindern wurden außerdem bisweilen 100 ng/ μl Cycloheximid zugegeben. Daraufhin wurden die Extrakte 90 bis 120 min lang bei 18°C oder Raumtemperatur inkubiert.

Zur anschließenden Reisolierung des Chromatins wurden die Extrakte vorsichtig im 4-fachen Volumen an OMD-Puffer verdünnt und 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde mit demselben Volumen an OMF-Puffer versetzt und sorgsam durchmischt. In ein geeignetes Reaktionsgefäß wurden 3,5 ml OMC-Puffer vorgelegt, mit der Extraktverdünnung überschichtet und 20 min lang bei 11 000 g und 4°C zentrifugiert. Zum Schutz der chromosomalen DNA vor mechanischer Beanspruchung bei den darauffolgenden Arbeitsschritten sollte das Chromatin in *low melting point*-Agarose eingebettet werden. Hierzu wurde das DNA-Pellet in 300 μl 1×PBS vorsichtig resuspendiert, mit demselben Volumen an verflüssigter Agarose (1 % (w/v)) vermischt und in den Schaft einer Plastikpasteurpipette aufgezogen. Der abgetrennte Schaft wurde mit Parafilm verschlossen und das darin enthaltene Gelblöckchen 15 min lang bei 4°C erstarren gelassen. Zur Eli-

minierung Chromatin-assoziiierter Proteine wurden die Gelblöckchen, welche ein Volumen von etwa 100 μl besaßen, im 3-fachen Volumen an ESP-Puffer aufgenommen und 2 Tage lang bei 50°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Gelblöckchen 2 bis 3 h lang unter Schwenken in 15 ml T₁₀E₁-Puffer gewaschen. Sollte die DNA mit YOYO-1 gefärbt werden, so wurden die Gelblöckchen an diesem Punkt in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, mit 100 μl T₄₀E₂-Puffer sowie 0,33 nmol YOYO-1 (Invitrogen) versetzt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2-stündiger Inkubation mit 2 U β -Agarase (NEB) bei 40°C war das Gelblöckchen anschließend verflüssigt worden. Als nächstes wurde die chromosomale DNA sehr vorsichtig in 150 mM MES (pH 5,5) verdünnt, wobei eine DNA-Konzentration von etwa 150 ng/ml eingestellt wurde. Die DNA-Lösung wurde 30 min lang bei 75°C erhitzt, wieder auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und anschließend in ein 4 ml-Teflon-Reservoir überführt. Ein silanisiertes Deckgläschen wurde 5 min lang in der DNA-Lösung inkubiert und daraufhin unter Verwendung einer hierfür umgebauten Spritzenpumpe (Landgraf Laborsysteme) mit einer Geschwindigkeit von 300 $\mu\text{m/s}$ herausgezogen. Nach gründlichem Waschen des Deckgläschens in 1 \times PBS erfolgte die Anfärbung der DNA-Fragmente analog zu Abschnitt 5.4.3, wobei zum Nachweis der Biotin-dUTP-Inkorporation Streptavidin-Alexa Fluor 555 (Invitrogen) und zur Detektion des Digoxigenin-dUTP-Einbaus Fluorescein-gekoppelte *anti*-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Roche) verwendet worden waren.

5.5.2 Spreitung von Spermienchromosomen nach Reisolierung aus *Xenopus*-Eiextrakt

Chromosomenverdünnungspuffer	10 mM HEPES/KOH, pH 7,6
	200 mM KCl
	500 μM MgCl ₂
	500 μM EGTA/KOH, pH 8,0
	250 mM Sucrose

Chromosomenfixierungspuffer	1×MMR (vgl. Abschnitt 5.6.1)
	20 % Glycerin (v/v)
	500 µM MgCl ₂
	0,5 % Triton X-100 (v/v)
	2,7 % Formaldehyd (v/v, frisch zugegeben)

Zunächst wurde der Extrakt vorsichtig mit dem vierfachen Volumen an Chromosomenverdünnungspuffer vermischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Extraktgemisch mit dem wiederum vierfachen Volumen an Chromosomenfixierungspuffer versetzt und 5 min lang inkubiert. Unter Verwendung geeigneter Adaptoren wurden Deckgläschen in Corex Glasröhrchen (DuPont Instruments) platziert und mit 5 ml 40 % Glycerin in 1×MMR (v/v; vgl. Abschnitt 5.6.1) überschichtet. Die Extraktmischung wurde vorsichtig auf das so vorbereitete Glycerinkissen aufgebracht und anschließend eine halbe Stunde lang im JS 13.1-Ausschwingrotor (Beckman) bei 10 000 g und 4°C zentrifugiert. Nach sorgsamer Abnahme des Überstands wurden die auf den Deckgläschen fixierten Chromosomen dreimal mit 1×PBS, 0.1 % Triton X-100 (v/v) gewaschen und konnten daraufhin die in Abschnitt 5.4.3 beschriebene Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines gegen xCENP-A gerichteten Antikörpers durchlaufen.

5.5.3 *Maximum Fluorescence Halo Technique (MFHT)*

2×XB-Puffer	200 mM KCl
	2 mM MgCl ₂
	0,2 mM CaCl ₂
	20 mM HEPES/KOH, pH 7,7
	100 mM Sucrose
2×NP40-Puffer	100 mM HEPES, pH 7,8
	20 mM MgCl ₂
	1 mM CaCl ₂
	1 % NP40

<i>Dipping Solution 1</i>	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,2 mM MgCl ₂ 0,5 M NaCl
<i>Dipping Solution 2</i>	vgl. <i>Dipping Solution 1</i> aber mit 1 M NaCl
<i>Dipping Solution 3</i>	vgl. <i>Dipping Solution 1</i> aber mit 1,5 M NaCl
<i>Dipping Solution 4</i>	vgl. <i>Dipping Solution 1</i> aber mit 2 M NaCl
Ethidiumbromidlösung	2 M NaCl 100 µg/ml Ethidiumbromid

Zunächst waren *X. laevis*-Eiextrakte präpariert und hinsichtlich ihrer Qualität überprüft worden. Nach Verteilung des Extraktes auf zwei Versuchsansätze waren letztere den in den Abbildungen 28 bis 30 skizzierten Inkubationsschritten unterzogen worden. Hierbei betrug die Konzentration der Ca²⁺-Ionen 0,6 mM und Erythrocytenzellkerne wurden in einer Konzentration von 200 bis 650 Kernen pro µl Extrakt eingesetzt. Nach Inkubationsende wurden letztere aus den in S-Phase befindlichen Eiextrakten zunächst unter Verwendung der Puffer OMD, OMF und OMC auf Deckgläschen reisoliert (vgl. hierzu auch Abschnitt 5.5.1). Da sich die Versuchsergebnisse nur schwer reproduzieren ließen, wurde der Extrakt in späteren Experimenten und nach Rücksprache mit der Arbeitsgruppe von M. Méchali mit dem 5- bis 10fachen Volumen an XB-Puffer versetzt und die enthaltenen Zellkerne wurden durch ein vorbereitetes Sucrosekissen (0,7 M Sucrose in XB) auf Deckgläschen zentrifugiert. In beiden Fällen waren die Deckgläschen mit den daran anheftenden Zellkernen anschließend viermalig vorsichtig mit 1×PBS (siehe Kapitel 5.3.4) gewaschen und zur Permeabilisierung der Kernmembran eine min lang in NP40-Puffer inkubiert worden. Um das proteinhaltige Chromatingrundgerüst zu extrahieren und die Relaxation der DNA zu ermöglichen, folgten sukzessive, jeweils 30 s dauernde Inkubationsschritte in den *Dipping Solutions* 1, 2, 3 und 4. Daraufhin wurden die Deckgläschen noch einmal 1 min lang in Ethidiumbromidlösung

inkubiert und viermalig in $1\times$ PBS gewaschen. Nach der sich unmittelbar anschließenden einminütigen UV-Bestrahlung konnten die Deckgläschen auf Objektträger montiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

5.5.4 Untersuchungen zur Centrosomenüberduplikation in *Xenopus*-Eiextrakten

5 \times BRB80	400 nM PIPES 5 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA, pH 8,0 mit KOH auf pH 6,8 eingestellt
Centrosomenverdünnungspuffer	1 \times BRB80 20 mM EDTA, pH 8,0 0,01 % Triton X-100

In die xCohesin- bzw. xOrc2-depletierten CSF-Extrakte (vgl. Abschnitt 5.3.8) wurden Spermienkerne in einer Endkonzentration von ca. 400 Kernen pro μ l Extrakt pipettiert und 30 min lang bei 20°C vorinkubiert. Anschließend wurden 100 ng/ μ l Cycloheximid sowie zweimalig 0,6 mM Ca²⁺ zugegeben und um einer Überduplikation der Spermien-assoziierten Centrosomen genügend Zeit zu verschaffen, folgte eine möglichst lange Inkubation (mind. 90 min) bei Raumtemperatur. Hierbei wurden den Extrakten in regelmäßigen Abständen Aliquots entnommen und fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Spermienmorphologie (mitotisch *vs.* interphasisch *vs.* apoptotisch) beurteilt. Abhängig vom jeweiligen Versuchsaufbau waren die Centrosomen zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus den Eiextrakten reisoliert worden. Hierzu wurden 5 μ l des Extraktes mit 200 μ l Centrosomenverdünnungspuffer vorsichtig vermischt. Unter Verwendung geeigneter Adaptoren wurden Deckgläschen in Corex Glasröhrchen (DuPont Instruments) platziert und daraufhin mit 5 ml 40 % Sucrose in Centrosomenverdünnungspuffer (w/v) überschichtet. Auf das so vorbereitete Sucrosekissen wurden die verdünnten Eiextrakte aufgebracht und 25 min lang bei 13 000 g und 4°C im JS 13.1-Ausschwingrotor (Beckman) zentrifugiert. Nach sorgfältiger Abnahme des Überstands wurden die Deckgläschen vorsichtig aus den Corexröhrchen entnommen und sofort in 6-well-Kulturschalen (Greiner Bio-One) überführt, in die eiskaltes Methanol vorgelegt

worden war. Zur Fixierung der pelletierten Centrosomen wurden die Deckgläschen mind. 1 h lang bei -20°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit $1\times\text{PBS}$, 0.1 % Triton X-100 (v/v) erfolgte die Detektion der centrosomalen Markerproteine Centrin, C-Nap und γ -Tubulin mittels geeigneter Antikörper, wobei das experimentelle Vorgehen den in Abschnitt 5.4.3 beschriebenen Arbeitsschritten entsprach.

5.6 Protokolle zu *Xenopus laevis*

Xenopus-Extrakte und *Xenopus*-Spermienkerne wurden weitgehend so hergestellt wie von Murray [288] beschrieben. Die Präparation der Erythrocytenkerne folgte weitestgehend dem Protokoll nach Coppock, Lue und Wagh [289].

5.6.1 Herstellung von *Xenopus laevis*-Eiextrakten

25 \times MMR	2,5 M NaCl 50 mM KCl 25 mM MgCl ₂ 50 mM CaCl ₂ 2,5 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 125 mM HEPES/NaOH, pH 7,8 mit NaOH auf pH 7,8 eingestellt
CSF-XB	100 mM KCl 0,1 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 10 mM Hepes/KOH, pH 7,7 50 mM Sucrose 5 mM EGTA/KOH, pH 8,0 mit KOH auf pH 7,7 eingestellt
20 \times XB-Salze	2 M KCl 2 mM CaCl ₂ 20 mM MgCl ₂

Cystein-Lösung	2 % (w/v) L-Cystein (freie Base) 0,5×XB-Salze mit KOH auf pH 7,8 eingestellt
Spermienverdünnungspuffer	1 mM MgCl ₂ 100 mM KCl 150 mM Sucrose 5 mM HEPES/KOH, pH 7,7
25×Ca ²⁺ -Lösung	15 mM CaCl ₂ in Spermienverdünnungspuffer
DAPI-Fix	48 % Glycerin 11 % Formaldehyd 1×MMR 1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma B-2261)

Die Präparation der *Xenopus*-Eiextrakte erfolgte bei 18°C, die fertigen Extrakte wurden auf Eis gelagert und ausschließlich mit abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert. Einen Tag vor der Extrakterstellung wurden in den dorsalen Lymphsack adulter, weiblicher Frösche 800 µl hCG-Lösung injiziert und die Frösche etwa acht Stunden später in 1×MMR umgesetzt. Die Eiablage erfolgte erfahrungsgemäß etwa 18 bis 24 Stunden nach hCG-Injektion.

Um eine Kontamination mit Calcium zu verhindern, wurden zunächst alle Gefäße mit destilliertem Wasser ausgespült. Stark verschmutzte Gelege wurden mit 1×MMR gewaschen und bereits aktivierte oder apoptotische Eier aussortiert. Zur Entfernung der Glashaut (*Zona pellucida*) wurden die Eier höchstens 10 min lang in Cystein-Lösung inkubiert, anschließend gründlich mit CSF-XB gewaschen und aktivierte oder untypisch erscheinende Eier wurden wiederum entfernt. Anschließend wurden die Eier in ein Zentrifugenröhrchen überführt, in welches 10×Cytochalasin B in CSF-XB vorgelegt worden war. Um eine dichte Packung der Eier zu erzielen, wurden diese zunächst eine min lang bei 200 g und anschließend ebenfalls eine min lang bei 600 g in einem JS 13.1 Ausschringrotor (Beckman) zentrifugiert. Überschüssiges CSF-XB wurde entfernt und die Eier anschließend durch 10-minütige Zentrifugation bei 13 000 g (Beckman-Rotor JS 13.1) lysiert.

Zur Gewinnung der hellbraun erscheinenden cytoplasmatischen Fraktion wurde das Zentrifugenröhrchen mittels einer 18-Gauge Kanüle punktiert. Der Extrakt wurde vorsichtig in die aufgesetzte Spritze aufgezogen und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zur Verhinderung der Aktinpolymerisation wurde dem Extrakt Cytochalasin B in einer Endkonzentration von 10 µg/ml beigemischt.

Um zu überprüfen, ob der Extrakt wie gewünscht in Metaphase von Meiose II arretiert vorlag, wurden einem 30 µl-Aliquot des Extraktes ca. 10 000 Spermienkerne und evtl. 0,8 µg Rhodamin-markiertes Tubulin (Cytoskeleton) zugegeben. Hiervon wurden 25 µl entnommen und mit 1 µl 25×Ca versetzt. Beide Aliquots wurden eine halbe Stunde lang bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden beiden Ansätzen Aliquots von jeweils 2 µl entnommen, mit 3 µl DAPI-Fix vorsichtig vermischt und mittels Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der vorliegenden Chromatin-(und evtl. Spindel-)morphologie beurteilt.

Zur Herstellung von *high-speed*-Extrakten wurden die präparierten CSF-Extrakte einer Ultrazentrifugation (100 000 g, 1 h, 4°C) unterzogen. Die klare, membranfreie Fraktion wurde vorsichtig entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

5.6.2 Präparation von *Xenopus laevis*-Spermienkernen

25×MMR siehe Abschnitt 5.6.1

2×XN 100 mM HEPES/KOH, pH 7,7
 500 mM Sucrose
 150 mM NaCl
 1 mM Spermidin
 0,3 mM Spermin

Um ein größtmögliches Wachstum der Hoden zu gewährleisten, wurden zwei männlichen Fröschen fünf Tage vor der Spermienpräparation 25 U PMSG appliziert, einen Tag vor der Präparation waren noch einmal 50 U hCG injiziert worden. Die Frösche wurden in 0,05 % Benzocain-Lösung getötet, die Hoden herauspräpa-

riert und in eine Petrischale mit 5 ml eiskaltem $1\times\text{XN}$ überführt. Nachdem Reste des Fettkörpers und Blutgefäße weitestgehend entfernt worden waren, wurden die Hoden mittels einer Rasierklinge in frischem $1\times\text{XN}$ bestmöglich zerkleinert. Die entstehende Spermien suspension wurde durch ein Netzchen mit einer Maschenweite von $100\ \mu\text{m}$ (*Cell Strainer*, BD Falcon™) in ein konisches Zentrifugenröhrchen filtriert. An der Petrischale haften gebliebene Spermien wurden mittels $1\times\text{XN}$ heruntergespült und ebenfalls durch das Netzchen in dasselbe Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Spermien 5 min lang bei $3\ 200\ \text{g}$ und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Spermienpellet vorsichtig in 2 ml $1\times\text{XN}$ resuspendiert ohne das darunter liegende Erythrocytenpellet zu verletzen. Die Spermien suspension wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, mit weiteren 8 ml $1\times\text{XN}$ versetzt und erneut zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt bestehend aus vorsichtiger Resuspension der Spermienzellen in XN , Überführung in das inzwischen ausgespülte Zentrifugenröhrchen und erneuter Zentrifugation wurde nun noch mindestens zweimal wiederholt, solange bis sich kein sichtbares Erythrocytenpellet mehr ausgebildet hatte. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Spermien durch Zugabe von $500\ \mu\text{l}$ $2\ \text{mg/ml}$ Lysolecithin (*L- α -Lysophosphatidylcholin*) in $1\times\text{XN}$. Anfangs waren die Spermien eine Stunde lang in der Lysolecithinlösung inkubiert worden. Um die mit dem Spermienkern assoziierten Centrosomen nicht zu verlieren, wurde dies in den späteren Versuchen auf 15 min reduziert. Nach Abstoppen der Permeabilisierung durch Zugabe von $10\ \text{ml}$ $3\ \%$ BSA in $1\times\text{XN}$ wurden die Spermienkerne einmal mit $3\ \%$ BSA in $1\times\text{XN}$ und zweimal mit reinem $1\times\text{XN}$ gewaschen. Nach Abnahme des Überstands wurden die Kerne vorsichtig in $500\ \mu\text{l}$ $50\ \%$ Glycerin in $1\times\text{XN}$ resuspendiert und konnten bei -80°C gelagert werden.

Für die weiteren Versuche war es wichtig, die Dichte der Spermienkerne in der Suspension zu kennen. Hierzu wurde eine Thoma-Zählkammer mit ca. $7\ \mu\text{l}$ einer 100fachen Verdünnung der Suspension in $1\times\text{XN}$ mit $1\ \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 beschickt und die Kerndichte fluoreszenzmikroskopisch ermittelt.

5.6.3 Präparation von Erythrocytenkernen aus *Xenopus laevis*

Barth-Lösung	88 mM NaCl 2,3 mM KCl 820 μ M MgCl ₂ 10 mM Hepes mit KOH auf pH 7,4 eingestellt
20×SSC	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat auf pH 7,0 eingestellt
2×XN	siehe Abschnitt 5.6.2

Zur Hemmung der Blutgerinnung war dem Wasser, in dem die Frösche gehalten wurden, zwei Tage vor der Erythrocytenpräparation Acetylsalicylsäure in einer Konzentration von 200 mg/l zugegeben worden. Um die Pumpleistung des Herzens aufrecht zu erhalten, wurden die zwei verwendeten Frösche in Tricain-haltigem Wasser (0,1 % (w/v)) lediglich betäubt. Anschließend wurde das Herz freigelegt und mittels einer 22G-Kanüle punktiert. Das Blut wurde in einer aufgesetzten Spritze gesammelt und zur Verhinderung der Blutgerinnung sofort mit der darin bereits enthaltenen heparin-haltigen (10 mg/ml) Barth-Lösung vermischt. Daraufhin wurde das Blutgemisch in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit 10 ml kaltem 0,6×SSC + 10 mg/ml Heparin versetzt und mit der Hälfte des Volumens an 28 % Nycodenz in 0,6×SSC vorsichtig unterschichtet. Es folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 180 g und 2°C. Anschließend wurde das rote Erythrocytenpellet in 2 ml 0,6×SSC resuspendiert, mit 1 ml der 28 %igen Nycodenzlösung unterschichtet und erneut zentrifugiert. Nachdem dieser Waschschrift dreimal wiederholt worden war, wurden die Erythrocyten noch einmal in 1×XN gewaschen, abzentrifugiert und vorsichtig in 1×XN resuspendiert. Mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer wurde die Zelldichte der Erythrocytensuspension bestimmt und auf eine Konzentration von $4 \cdot 10^7$ Zellen/ml in 1×XN eingestellt. Der Zellsuspension wurde dasselbe Volumen an 1×XN + 100 μ g/ml Lysolecithin (L- α -Lysophosphatidylcholin) zugesetzt und 15 min lang bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml 1×XN + 3 % BSA wurde die Permeabilisierung der Erythrocyten

beendet und die Zellkerne wurden 10 min lang bei 800 g und 0°C abzentrifugiert. Anschließend wurde das nun weiße Kernpellet noch dreimalig gewaschen: einmal mit 1×XN + 3 % BSA und zweimal mit reinem 1×XN. Die Zellkerne wurden vorsichtig in 500 µl 50 % Glycerin in 1×XN resuspendiert und nachdem ihre Dichte bestimmt worden war (vgl. Abschnitt 5.6.2), konnten sie bei -80°C gelagert werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
conc.	konzentriert
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
C-Nap	Centrosomales Nek2-assoziiertes Protein
CSF	Cytostatischer Faktor
C-terminal	carboxyterminal
C-terminus	Carboxyterminus
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced</i> Grün-fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Histonacetyltransferase
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEAT	Huntingtin, Elongationsfaktor 3, Proteinphosphatase 2A, TOR1
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HU	Hydroxyharnstoff
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin

IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAR	<i>Matrix Attached Region</i>
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MFHR	<i>Maximum Fluorescence Halo Radius</i>
MFHT	<i>Maximum Fluorescence Halo Technique</i>
MMR	Marc's modifizierte Ringerlösung
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	aminoterminal
N-terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNT	Pericentrin
PCR	Polymerasekettenreaktion
Plk	<i>Polo-like kinase</i>
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sgo	Shugoshin
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>

sog.	so genannt(e, en)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tev	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
v/v	<i>volume per volume</i>
Wapl	<i>Wings apart-like</i>
wt	wildtypisch
w/v	<i>weight per volume</i>
<i>X. laevis/X.l.</i>	<i>Xenopus laevis</i>

7 Literatur

- [1] O. Sundin und A. Varshavsky. Arrest of segregation leads to accumulation of highly intercatenated dimers: dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell* 25 (1981), S. 659–669.
- [2] R. T. Surosky, C. S. Newlon und B. K. Tye. The mitotic stability of deletion derivatives of chromosome III in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 (1986), S. 414–418.
- [3] D. Koshland und L.H. Hartwell. The structure of sister minichromosome DNA before anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 238 (1987), S. 1713–1716.
- [4] A. Losada, M. Hirano und T. Hirano. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 12 (1998), S. 1986–1997.
- [5] C. Michaelis, R. Ciosk und K. Nasmyth. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91 (1997), S. 35–45.
- [6] T. Rolef Ben-Shahar u.a. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321 (2008), S. 563–566.
- [7] E. Unal u.a. A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321 (2008), S. 566–569.
- [8] B. D. Rowland u.a. Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol. Cell* 33 (2009), S. 763–774.
- [9] F. Uhlmann, F. Lottspeich und K. Nasmyth. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400 (1999), S. 37–42.
- [10] F. Uhlmann u.a. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103 (2000), S. 375–386.
- [11] L.H. Wang u.a. Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. *J. Cell Sci.* 123 (2010), S. 806–813.
- [12] A. M. Farcas u.a. Cohesin’s concatenation of sister DNAs maintains their intertwining. *Mol. Cell* 44 (2011), S. 97–107.
- [13] S. E. Thomas u.a. Identification of two proteins required for conjunction and regular segregation of achiasmate homologs in *Drosophila* male meiosis. *Cell* 123 (2005), S. 555–568.

-
- [14] T. Sakuno, K. Tada und Y. Watanabe. Kinetochores geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* 458 (2009), S. 852–858.
- [15] W. Lin u.a. Scc2 regulates gene expression by recruiting cohesin to the chromosome as a transcriptional activator during yeast meiosis. *Mol. Biol. Cell* 22 (2011), S. 1985–1996.
- [16] A. Pauli u.a. A direct role for cohesin in gene regulation and ecdysone response in *Drosophila* salivary glands. *Curr. Biol.* 20 (2010), S. 1787–1798.
- [17] Z. Misulovin u.a. Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma* 117 (2008), S. 89–102.
- [18] V. Parelho u.a. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132 (2008), S. 422–433.
- [19] C. Sjögren und K. Nasmyth. Sister chromatid cohesion is required for post-replicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 11 (2001), S. 991–995.
- [20] F. Klein u.a. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98 (1999), S. 91–103.
- [21] K. P. Kim u.a. Sister cohesion and structural axis components mediate homolog bias of meiotic recombination. *Cell* 143 (2010), S. 924–937.
- [22] V. Guacci, D. Koshland und A. Strunnikov. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* 91 (1997), S. 47–57.
- [23] V. C. Seitan u.a. A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature* 476 (2011), S. 467–471.
- [24] A. Losada und T. Hirano. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19 (2005), S. 1269–1287.
- [25] C. H. Haering u.a. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* 9 (2002), S. 773–778.
- [26] T. G. Gligoris u.a. Closing the cohesin ring: Structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science* 346 (2014), S. 963–967.
- [27] K. Shintomi und T. Hirano. Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev.* 23 (2009), S. 2224–2236.
- [28] S. Kueng u.a. Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 127 (2006), S. 955–967.

-
- [29] T. Nishiyama u.a. Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* 143 (2010), S. 737–749.
- [30] T. Nishiyama u.a. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013), S. 13404–13409.
- [31] D. E. Anderson u.a. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J. Cell Biol.* 156 (2002), S. 419–424.
- [32] C. H. Haering u.a. Structure and stability of cohesin’s Smc1-kleisin interaction. *Mol. Cell* 15 (2004), S. 951–964.
- [33] A. Kurze u.a. A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion. *EMBO J.* 30 (2011), S. 364–378.
- [34] D. Ivanov und K. Nasmyth. A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* 122 (2005), S. 849–860.
- [35] C. H. Haering u.a. The cohesin ring concatenates sister DNAs. *Nature* 454 (2008), S. 297–301.
- [36] J. M. Heidinger-Pauli, I. Onn und D. E. Koshland. Genetic evidence that the acetylation of the Smc3p subunit of cohesin modulates its ATP-bound state to promote cohesion establishment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 185 (2010), S. 1249–1256.
- [37] N. Zhang u.a. A handcuff model for the cohesin complex. *J. Cell Biol.* 183 (2008), S. 1019–1031.
- [38] R. Ciosk u.a. Cohesin’s binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol. Cell* 5 (2000), S. 243–254.
- [39] A. Lengronne u.a. Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol. Cell* 23 (2006), S. 787–799.
- [40] J. Liu u.a. Transcriptional dysregulation in NIPBL and cohesin mutant human cells. *PLoS Biol.* 7 (2009), S. 000119.
- [41] S. Remeseiro u.a. Reduction of Nipbl impairs cohesin loading locally and affects transcription but not cohesion-dependent functions in a mouse model of Cornelia de Lange Syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1832 (2013), S. 2097–2102.
- [42] P. J. Gillespie und T. Hirano. Scc2 couples replication licensing to sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. *Curr. Biol.* 14 (2004), S. 1598–1603.

- [43] T. S. Takahashi u. a. Recruitment of *Xenopus* Scc2 and cohesin to chromatin requires the pre-replication complex. *Nat. Cell Biol.* 6 (2004), S. 991–996.
- [44] T. S. Takahashi u. a. Cdc7-Drf1 kinase links chromosome cohesion to the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 22 (2008), S. 1894–1905.
- [45] J. M. Bailis u. a. Hsk1-Dfp1 is required for heterochromatin-mediated cohesion at centromeres. *Nat. Cell Biol.* 5 (2003), S. 1111–1116.
- [46] B. Hu u. a. ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex. *Curr. Biol.* 21 (2011), S. 12–24.
- [47] S. Gruber u. a. Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell* 127 (2006), S. 523–537.
- [48] Y. Murayama und F. Uhlmann. Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature* 505 (2014), S. 367–371.
- [49] R. Ladurner u. a. Cohesin’s ATPase activity couples cohesin loading onto DNA with Smc3 acetylation. *Curr. Biol.* 24 (2014), S. 2228–2237.
- [50] A. Sakai u. a. Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein-protein assembly. *EMBO J.* 22 (2003), S. 2764–2775.
- [51] J. McIntyre u. a. *In vivo* analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 26 (2007), S. 3783–3793.
- [52] T. R. Ben-Shahar u. a. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321 (2008), S. 563–566.
- [53] Y. Blat und N. Kleckner. Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region. *Cell* 98 (1999), S. 249–259.
- [54] T. Tanaka u. a. Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. *Cell* 98 (1999), S. 847–858.
- [55] S. Laloraya, V. Guacci und D. E. Koshland. Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J. Cell Biol.* 151 (2000), S. 1047–1056.
- [56] A. Lengronne u. a. Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* 430 (2004), S. 573–578.
- [57] E. F. Glynn u. a. Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol.* 2 (2004), S. 1325–1339.
- [58] C. D’Ambrosio u. a. Identification of *cis*-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* 22 (2008), S. 2215–2227.

-
- [59] M. H. Kagey u.a. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467 (2010), S. 430–435.
- [60] K. S. Wendt u.a. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451 (2008), S. 796–801.
- [61] S. Hadjir u.a. Cohesins form chromosomal *cis*-interactions at the developmentally regulated *IFNG* locus. *Nature* 460 (2009), S. 410–413.
- [62] R. Nativio u.a. Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted *IGF2-H19* locus. *PLoS Genet.* 5 (2009), e1000739.
- [63] I. Waizenegger u.a. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103 (2000), S. 399–410.
- [64] I. Sumara u.a. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* 9 (2002), S. 515–525.
- [65] C. S. Eichinger u.a. Disengaging the Smc3/kleisin interface releases cohesin from *Drosophila* chromosomes during interphase and mitosis. *EMBO J.* 32 (2013), S. 656–665.
- [66] J. Buheitel und O. Stemmann. Prophase pathway-dependent removal of cohesin from human chromosomes requires opening of the Smc3-Scc1 gate. *EMBO J.* 32 (2013), S. 666–676.
- [67] V. Borges u.a. Hos1 deacetylates Smc3 to close the cohesin acetylation cycle. *Mol. Cell* 39 (2010), S. 677–688.
- [68] J. H. Haarhuis u.a. WAPL-mediated removal of cohesin protects against segregation errors and aneuploidy. *Curr. Biol.* 23 (2013), S. 2071–2077.
- [69] A. Salic, J. C. Waters und T. J. Mitchison. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* 118 (2004), S. 567–578.
- [70] B. E. McGuinness u.a. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* 3 (2005), S. 433–449.
- [71] C. G. Riedel u.a. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441 (2006), S. 53–61.
- [72] Z. Xu u.a. Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Mol. Cell* 35 (2009), S. 426–441.
- [73] M. Ghosh u.a. Transcription factor binding and induced transcription alter chromosomal *c-myc* replicator activity. *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004), S. 10193–10207.

- [74] D. Remus, E. L. Beall und M. R. Botchan. DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *EMBO J.* 23 (2004), S. 897–907.
- [75] P. Müller u.a. The conserved bromo-adjacent homology domain of yeast Orc1 functions in the selection of DNA replication origins within chromatin. *Genes Dev.* 24 (2010), S. 1418–1433.
- [76] M. L. Eaton u.a. Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev.* 24 (2010), S. 748–753.
- [77] D. T. Stinchcomb, K. Struhl und R. W. Davis. Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282 (1979), S. 39–43.
- [78] J. F. Diffley und J. H. Cocker. Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature* 357 (1992), S. 169–172.
- [79] S. P. Bell und B. Stillman. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357 (1992), S. 128–134.
- [80] C. Speck u.a. ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 (2005), S. 965–971.
- [81] M. G. Clarey u.a. Nucleotide-dependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (2006), S. 684–690.
- [82] S. Chen, M. A. de Vries und S. P. Bell. Orc6 is required for dynamic recruitment of Cdt1 during repeated Mcm2-7 loading. *Genes Dev.* 21 (2007), S. 2897–2907.
- [83] J. C. Randell u.a. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol. Cell* 21 (2006), S. 29–39.
- [84] B. K. Tye. MCM proteins in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999), S. 649–686.
- [85] T. Takara und S. P. Bell. Multiple Cdt1 molecules act at each origin to load replication-competent Mcm2-7 helicases. *EMBO J.* 30 (2011), S. 4885–4896.
- [86] Z. Wei u.a. Characterization and structure determination of the Cdt1 binding domain of human minichromosome maintenance (Mcm) 6. *J. Biol. Chem.* 285 (2010), S. 12469–12473.
- [87] M. L. Bochman, S. P. Bell und A. Schwacha. Subunit organization of Mcm2-7 and the unequal role of active sites in ATP hydrolysis and viability. *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008), S. 5865–5873.

- [88] D. Maiorano, J. Moreau und M. Mechali. XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* 404 (2000), S. 622–625.
- [89] S. Donovan u.a. Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997), S. 5611–5616.
- [90] H. Yabuuchi u.a. Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 is distinctly regulated by DDK and CDK for activation of replication. *EMBO J.* 25 (2006), S. 4663–4674.
- [91] L. I. Francis u.a. Incorporation into the prereplicative complex activates the Mcm2-7 helicase for Cdc7-Dbf4 phosphorylation. *Genes Dev.* 23 (2009), S. 643–654.
- [92] L. Krasinska u.a. Cdk1 and Cdk2 activity levels determine the efficiency of replication origin firing in *Xenopus*. *EMBO J.* 27 (2008), S. 758–769.
- [93] M. Kanemaki und K. Labib. Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks. *EMBO J.* 25 (2006), S. 1753–1763.
- [94] A. Gambus u.a. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell Biol.* 8 (2006), S. 358–366.
- [95] M. S. Wold und T. Kelly. Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988), S. 2523–2527.
- [96] E. Alani u.a. Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.* 227 (1992), S. 54–71.
- [97] W. Zhu u.a. Mcm10 and And-1/CTF4 recruit DNA polymerase alpha to chromatin for initiation of DNA replication. *Genes Dev.* 21 (2007), S. 2288–2299.
- [98] R. Bravo u.a. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326 (1987), S. 515–517.
- [99] G. Prelich u.a. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* 326 (1987), S. 517–520.
- [100] G. L. Moldovan, B. Pfander und S. Jentsch. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129 (2007), S. 665–679.

- [101] G. L. Moldovan, B. Pfander und S. Jentsch. PCNA Controls Establishment of Sister Chromatid Cohesion during S Phase. *Mol. Cell* 23 (2006), S. 723–732.
- [102] L. S. Drury, G. Perkins und J. F. Diffley. The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *EMBO J.* 16 (1997), S. 5966–5976.
- [103] T. Moll u.a. The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66 (1991), S. 743–758.
- [104] S. Mimura u.a. Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature* 431 (2004), S. 1118–1123.
- [105] G. M. Wilmes u.a. Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an „RXL“ docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch. *Genes Dev.* 18 (2004), S. 981–991.
- [106] S. Tanaka und J. F. Diffley. Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat. Cell Biol.* 4 (2002), S. 198–207.
- [107] M. Lutzmann, D. Maiorano und M. Mechali. A Cdt1-geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in *Xenopus*. *EMBO J.* 25 (2006), S. 5764–5774.
- [108] C. Lee u.a. Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature* 430 (2004), S. 913–917.
- [109] A. Musch. Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic* 5 (2004), S. 1–9.
- [110] N. M. Wakida u.a. An intact centrosome is required for the maintenance of polarization during directional cell migration. *PLoS One* 5 (2010), S. 315462.
- [111] R. B. Vallee u.a. Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J. Neurobiol.* 58 (2004), S. 189–200.
- [112] S. Hoyer-Fender. Centriole maturation and transformation to basal body. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21 (2010), S. 142–147.
- [113] C. B. O’Connell und A. L. Khodjakov. Cooperative mechanisms of mitotic spindle formation. *J. Cell Sci.* 120 (2007), S. 1717–1722.
- [114] G. A. Pihan u.a. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* 58 (1998), S. 3974–3985.
- [115] P. E. Carroll u.a. Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18 (1999), S. 1935–1944.

- [116] N. J. Ganem, S. A. Godinho und D. Pellman. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460 (2009), S. 278–282.
- [117] E. Bailly u.a. Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *J. Cell Sci.* 101 (1992), S. 529–545.
- [118] A. Paoletti und M. Bornens. Organisation and functional regulation of the centrosome in animal cells. *Prog. Cell Cycle Res.* 3 (1997), S. 285–299.
- [119] G. Piperno und M. T. Fuller. Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J. Cell Biol.* 101 (1985), S. 2085–2094.
- [120] B. Edde u.a. Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* 247 (1990), S. 83–85.
- [121] D. Kitagawa u.a. Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell* 144 (2011), S. 364–375.
- [122] M. van Breugel u.a. Structures of SAS-6 suggest its organization in centrioles. *Science* 331 (2011), S. 1196–1199.
- [123] B. E. Tanos u.a. Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes Dev.* 27 (2013), S. 163–168.
- [124] M. Bornens. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002), S. 25–34.
- [125] R. R. Gould und G. G. Borisy. The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J. Cell Biol.* 73 (1977), S. 601–615.
- [126] M. Piel u.a. The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 149 (2000), S. 317–330.
- [127] J. Lüders und T. Stearns. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007), S. 161–167.
- [128] P. Wang, X. Pinson und V. Archambault. PP2A-twins is antagonized by great-wall and collaborates with polo for cell cycle progression and centrosome attachment to nuclei in *Drosophila* embryos. *PLoS Genet.* 7 (2011), e1002227.
- [129] V. Mennella u.a. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. *Nat. Cell Biol.* 14 (2012), S. 1159–1168.

- [130] S. Lawo u.a. Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat. Cell Biol.* 14 (2012), S. 1148–1158.
- [131] J. M. Kollman u.a. Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature* 466 (2010), S. 879–882.
- [132] M. Kwon u.a. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev.* 22 (2008), S. 2189–2203.
- [133] M.-F. Tsou und T. Stearns. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* 442 (2006), S. 947–951.
- [134] M.-F. Tsou u.a. Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. *Dev. Cell* 17 (2009), S. 344–354.
- [135] E. H. Hinchcliffe u.a. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 283 (1999), S. 851–854.
- [136] K. R. Lacey, P. K. Jackson und T. Stearns. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (1999), S. 2817–2822.
- [137] M. Okuda u.a. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103 (2000), S. 127–140.
- [138] H. A. Fisk, C. P. Mattison und M. Winey. Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003), S. 14875–14880.
- [139] V. M. Stucke u.a. Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J.* 21 (2002), S. 1723–1732.
- [140] A. Krause und I. Hoffmann. Polo-like kinase 2-dependent phosphorylation of NPM/B23 on serine 4 triggers centriole duplication. *PLoS One* 5 (2010), e9849.
- [141] A. J. Holland u.a. Polo-like kinase 4 kinase activity limits centrosome overduplication by autoregulating its own stability. *J. Cell Biol.* 9 (2010), S. 1774–1780.
- [142] K. F. Sonnen u.a. Human Cep192 and Cep152 cooperate in Plk4 recruitment and centriole duplication. *J. Cell Sci.* 126 (2013), S. 3223–3233.
- [143] J. Kleylein-Sohn u.a. Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev. Cell* 13 (2007), S. 190–202.

- [144] A. Puklowski u.a. The SCF-FBXW5 E3-ubiquitin ligase is regulated by PLK4 and targets *HsSAS-6* to control centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* 13 (2011), S. 1004–1009.
- [145] Y. Nakazawa u.a. SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Curr. Biol.* 17 (2007), S. 2169–2174.
- [146] C. S. Fong u.a. SAS-6 assembly templated by the lumen of cartwheel-less centrioles precedes centriole duplication. *Dev. Cell* 30 (2014), S. 238–245.
- [147] M. Kirkham u.a. SAS-4 is a *C. elegans* centriolar protein that controls centrosome size. *Cell* 112 (2003), S. 575–587.
- [148] G. Kohlmaier u.a. Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP. *Curr. Biol.* 19 (2009), S. 1012–1018.
- [149] P. Guichard u.a. Procentriole assembly revealed by cryo-electron tomography. *EMBO J.* 29 (2010), S. 1565–1572.
- [150] P. Dupuis-Williams u.a. Functional role of epsilon-tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J. Cell Biol.* 158 (2002), S. 1183–1193.
- [151] Z. Chen u.a. CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Dev. Cell* 3 (2002), S. 339–350.
- [152] A. Spektor u.a. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell* 130 (2007), S. 678–690.
- [153] D. Berdnik und J. A. Knoblich. *Drosophila* Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr. Biol.* 12 (2002), S. 640–647.
- [154] H. A. Lane und E. A. Nigg. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* 135 (1996), S. 1701–1713.
- [155] L. Macurek u.a. Polo-like kinase-1 is activated by Aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 455 (2008), S. 119–123.
- [156] J. Mi u.a. Protein phosphatase-1alpha regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Res.* 67 (2007), S. 1082–1089.
- [157] A. M. Fry u.a. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J. Cell Biol.* 141 (1998), S. 1563–1574.
- [158] S. Bahe u.a. Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J. Cell Biol.* 171 (2005), S. 27–33.

- [159] M. E. Tanenbaum u. a. Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *EMBO J.* 27 (2008), S. 3235–3245.
- [160] J. Rosenblatt. Spindle assembly: asters part their separate ways. *Nat. Cell Biol.* 7 (2005), S. 219–222.
- [161] M. E. Tanenbaum und R. H. Medema. Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev. Cell* 19 (2010), S. 797–806.
- [162] C. Arquint und E. A. Nigg. STIL microcephaly mutations interfere with APC/C-mediated degradation and cause centriole amplification. *Curr. Biol.* 24 (2014), S. 351–360.
- [163] D. Izquierdo u. a. Stabilization of cartwheel-less centrioles for duplication requires CEP295-mediated centriole-to-centrosome conversion. *Cell Rep.* 8 (2014), S. 957–965.
- [164] A. Nakamura, H. Arai und N. Fujita. Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. *J. Cell Biol.* 187 (2009), S. 607–614.
- [165] L. Schöckel u. a. Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat. Cell Biol.* 13 (2011), S. 966–972.
- [166] H. C. Gregson u. a. A potential role for human cohesin in mitotic spindle aster assembly. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 47575–47582.
- [167] J. Guan u. a. Cohesin protein SMC1 is a centrosomal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 (2008), S. 761–764.
- [168] R. W. Wong und G. Blobel. Cohesin subunit SMC1 associates with mitotic microtubules at the spindle pole. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008), S. 15441–15445.
- [169] X. Kong u. a. Cohesin associates with spindle poles in a mitosis-specific manner and functions in spindle assembly in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* 20 (2009), S. 1289–1301.
- [170] N. A. Beauchene u. a. Rad21 is required for centrosome integrity in human cells independently of its role in chromosome cohesion. *Cell Cycle* 188 (2010), S. 191–198.
- [171] R. A. Oliveira und K. Nasmyth. Cohesin cleavage is insufficient for centriole disengagement in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 23 (2013), R601–R603.
- [172] K. Lee und K. Rhee. Separase-dependent cleavage of pericentrin B is necessary and sufficient for centriole disengagement during mitosis. *Cell Cycle* 11 (2012), S. 2476–2485.

- [173] K. Matsuo u.a. Kendrin is a novel substrate for separase involved in the licensing of centriole duplication. *Curr. Biol.* 22 (2012), S. 915–921.
- [174] S. G. Prasanth u.a. Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *EMBO J.* 23 (2004), S. 2651–2663.
- [175] A. S. Hemerly u.a. Orc1 controls centriole and centrosome copy number in human cells. *Science* 323 (2009), S. 789–793.
- [176] R. L. Ferguson und J. L. Maller. Cyclin E-dependent localization of MCM5 regulates centrosome duplication. *J. Cell Sci.* 121 (2008), S. 3224–3232.
- [177] R. L. Ferguson, G. Pascreau und J. L. Maller. The cyclin A centrosomal localization sequence recruits MCM5 and Orc1 to regulate centrosome re-duplication. *J. Cell Sci.* 123 (2010), S. 2743–2749.
- [178] F. Lu u.a. Geminin is partially localized to the centrosome and plays a role in proper centrosome duplication. *Biol. Cell* 101 (2009), S. 273–285.
- [179] K. E. Tachibana u.a. Depletion of licensing inhibitor geminin causes centrosome overduplication and mitotic defects. *EMBO Rep.* 6 (2005), S. 1052–1057.
- [180] T. Hirano. Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes Dev.* 26 (2012), S. 1659–1678.
- [181] P. L. Graumann und T. Knust. Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair. *Chromosome Res.* 17 (2009), S. 265–275.
- [182] S. Hiraga. Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 34 (2000), S. 21–59.
- [183] A. Lammens, A. Schele und K.-P. Hopfner. Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases. *Curr. Biol.* 14 (2004), S. 1778–1782.
- [184] D. F. Hudson u.a. Molecular and genetic analysis of condensin function in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* 19 (2008), S. 3070–3079.
- [185] F. Bürmann u.a. An asymmetric SMC- kleisin bridge in prokaryotic condensin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (2013), S. 371–379.
- [186] A. F. Neuwald und T. Hirano. HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res.* 10 (2000), S. 1445–1452.
- [187] T. Ono u.a. Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* 115 (2003), S. 109–121.

-
- [188] F. M. Yeong u.a. Identification of a subunit of a novel Kleisin-beta/SMC complex as a potential substrate of protein phosphatase 2A. *Curr. Biol.* 13 (2003), S. 2058–2064.
- [189] T. Hirota u.a. Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J. Cell Sci.* 117 (2004), S. 6435–6445.
- [190] T. Ono u.a. Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol. Biol. Cell* 15 (2004), S. 3296–3308.
- [191] D. Gerlich u.a. Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells. *Curr. Biol.* 16 (2006), S. 333–344.
- [192] K. Shintomi und T. Hirano. The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. *Genes Dev.* 25 (2011), S. 1464–1469.
- [193] L. C. Green u.a. Contrasting roles of condensin I and condensin II in mitotic chromosome formation. *J. Cell Sci.* 125 (2012), S. 1591–1604.
- [194] S. Cuylen und C. H. Haering. Deciphering condensin action during chromosome segregation. *Trends in Cell Biology* 21 (2011), S. 552–559.
- [195] M. Hirano und T. Hirano. Opening closed arms: Long-distance activation of SMC ATPase by hinge-DNA interaction. *Mol. Cell* 21 (2006), S. 175–186.
- [196] Y. Akai u.a. Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing. *Open Biol.* 1 (2011), S. 110023.
- [197] K. Kimura und T. Hirano. Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000), S. 11972–11977.
- [198] J. St-Pierre u.a. Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. *Mol. Cell* 34 (2009), S. 416–426.
- [199] K. A. Hagstrom u.a. *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* 16 (2002), S. 729–742.
- [200] K. Kimura und T. Hirano. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: A biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* 90 (1997), S. 625–634.
- [201] K. Kimura u.a. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: Implications for chromosome condensation. *Cell* 98 (1999), S. 239–248.

- [202] K. Maeshima und U. K. Laemmli. A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev. Cell* 4 (2003), S. 467–480.
- [203] J. Baxter u.a. Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* 331 (2011), S. 1328–1332.
- [204] A. Charbin, C. Bouchoux und F. Uhlmann. Condensin aids sister chromatid decatenation by topoisomerase II. *Nucleic Acids Res.* 42 (2014), S. 340–348.
- [205] K. Johzuka und T. Horiuchi. The *cis* element and factors required for condensin recruitment to chromosomes. *Mol. Cell* 34 (2009), S. 26–35.
- [206] I. Piazza u.a. Association of condensin with chromosomes depends on DNA binding by its HEAT-repeat subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014), S. 560–568.
- [207] K. Tada u.a. Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature* 474 (2011), S. 477–483.
- [208] W. Liu u.a. PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466 (2010), S. 508–512.
- [209] A. Takemoto u.a. Negative regulation of condensin I by CK2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 25 (2006), S. 5339–5348.
- [210] K. Kimura u.a. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 *in vitro*. *Science* 282 (1998), S. 487–490.
- [211] B. D. Lavoie, E. Hogan und D. E. Koshland. *In vivo* requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. *Genes Dev.* 18 (2004), S. 76–87.
- [212] J. J. Lipp u.a. Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J. Cell Sci.* 120 (2007), S. 1245–1255.
- [213] A. Takemoto u.a. Analysis of the role of Aurora B on the chromosomal targeting of condensin I. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007), S. 2403–2412.
- [214] S. Abe u.a. The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 25 (2011), S. 863–874.
- [215] D. F. Hudson, K. M. Marshall und W. C. Earnshaw. Condensin: architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* 17 (2009), S. 131–144.
- [216] D. D’Amours, F. Stegmeier und A. Amon. Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* 117 (2004), S. 455–469.

- [217] E. Varela u.a. Lte1, Cdc14 and MEN-controlled Cdk inactivation in yeast coordinate rDNA decompaction with late telophase progression. *EMBO J.* 28 (2009), S. 1562–1575.
- [218] A. Takemoto u.a. The chromosomal association of condensin II is regulated by a noncatalytic function of PP2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009), S. 1302–1308.
- [219] J. B. Gurdon, T.R. Elsdale und M. Fischberg. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182 (1958), S. 64–65.
- [220] R. Lister und J. R. Ecker. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res.* 19 (2009), S. 959–966.
- [221] R. Meehan, J. D. Lewis und A. P. Bird. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res.* 20 (1992), S. 5085–5092.
- [222] S. Simonsson und J. B. Gurdon. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat. Cell Biol.* 6 (2004), S. 984–990.
- [223] T. S. Mikkelsen u.a. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454 (2008), S. 49–55.
- [224] R. Blelloch u.a. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells* 24 (2006), S. 2007–2013.
- [225] S. Ito u.a. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466 (2010), S. 1129–1133.
- [226] K. Luger u.a. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389 (1997), S. 251–260.
- [227] L. Ho und G. R. Crabtree. Chromatin remodelling during development. *Nature* 463 (2010), S. 474–484.
- [228] J. B. Gurdon. Changes in somatic cell nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 20 (1968), S. 401–414.
- [229] J. Jullien u.a. Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010), S. 5483–5488.
- [230] H. Tamada u.a. Chromatin decondensation and nuclear reprogramming by nucleoplasmin. *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006), S. 1259–1271.

- [231] H. Cho und A. P. Wolffe. *Xenopus laevis* B4, an intron-containing oocyte-specific linker histone-encoding gene. *Gene* 143 (1994), S. 233–238.
- [232] M. Tanaka u.a. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* 128 (2001), S. 655–664.
- [233] A. Biddle, I. Simeoni und J. B. Gurdon. *Xenopus* oocytes reactivate muscle gene transcription in transplanted somatic nuclei independently of myogenic factors. *Development* 136 (2009), S. 2695–2703.
- [234] V. Allfrey, R. Faulkner und A. Mirsky. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51 (1964), S. 786–794.
- [235] S. Kishigami u.a. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (2006), S. 183–189.
- [236] H. T. Bui u.a. Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 83 (2010), S. 454–463.
- [237] A. J. Bannister und T. Kouzarides. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21 (2011), S. 381–395.
- [238] K. Murata u.a. Histone H3 lysine 4 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic nuclei by oocytes. *Epigenetics Chromatin* 3 (2010), S. 4.
- [239] B. Wen u.a. Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 41 (2009), S. 246–250.
- [240] S. Epsztejn-Litman u.a. *De novo* DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (2008), S. 1176–1183.
- [241] L. A. Banaszynski, C. D. Allis und P. W. Lewis. Histone variants in metazoan development. *Dev. Cell* 19 (2010), S. 662–674.
- [242] V. Pasque u.a. Histone variant macroH2A confers resistance to nuclear reprogramming. *EMBO J.* 30 (2011), S. 2373–2387.
- [243] S. Chakravarthy u.a. Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005), S. 7616–7624.
- [244] C. M. Doyen u.a. Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006), S. 1156–1164.

- [245] D. Angelov u.a. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* 11 (2003), S. 1033–1041.
- [246] J. B. Gurdon. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10 (1962), S. 622–640.
- [247] J.-M. Lemaître u.a. Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell* 123 (2005), S. 787–801.
- [248] J. R. Paulson und U. K. Laemmli. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12 (1977), S. 817–828.
- [249] K. W. Adolphs u.a. Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (1977), S. 4937–4941.
- [250] E. Koina und A. Piper. An inactive X specific replication origin associated with a matrix attachment region in the human X linked HPRT gene. *J. Cell. Biochem.* 95 (2005), S. 391–402.
- [251] R. P. Martins und S. A. Krawetz. Decondensing the protamine domain for transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007), S. 8340–8345.
- [252] V. Djeliova, G. Russev und B. Anachkova. Dynamics of association of origins of DNA replication with the nuclear matrix during the cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001), S. 3181–3187.
- [253] S. Kreitz u.a. The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 6337–6342.
- [254] M. Fujita u.a. Cell cycle regulation of human CDC6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), S. 25927–25932.
- [255] P. Hozak u.a. Visualization of replication factories attached to the nucleoskeleton. *Cell* 73 (1993), S. 361–373.
- [256] D. A. Jackson und P. R. Cook. Replication occurs at a nucleoskeleton. *EMBO J.* 5 (1986), S. 1403–1410.
- [257] D. M. Pardoll, B. Vogelstein und D. S. Coffey. A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell* 19 (1980), S. 527–536.
- [258] D. A. Jackson, S. J. McCready und P. R. Cook. RNA is synthesized at the nuclear cage. *Nature* 292 (1981), S. 552–555.
- [259] F. J. Iborra u.a. The topology of transcription by immobilized polymerases. *Exp. Cell Res.* 229 (1996), S. 167–173.

- [260] O. Cuvier u.a. A topoisomerase II-dependent mechanism for resetting replicons at the S-M-phase transition. *Genes Dev.* 22 (2008), S. 860–865.
- [261] A. Schmidt u.a. *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev.* 19 (2005), S. 502–513.
- [262] N. R. Rauh u.a. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 437 (2005), S. 1048–1052.
- [263] A. Paoletti u.a. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell Sci.* 109 (1996), S. 3089–3102.
- [264] L. Schöckl. »The dual use of cohesin and its protector Sgo1 contributes to the choreography of the chromosome and the centrosome cycle«. Diss. Bayreuth: Universität Bayreuth, 2012.
- [265] D. L. Gard u.a. Centrosome duplication continues in Cycloheximide-treated *Xenopus* blastulae in the absence of a detectable cell cycle. *J. Cell Biol.* 110 (1990), S. 2033–2042.
- [266] C. Santocanale und J. F. Diffley. ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15 (1996), S. 6671–6679.
- [267] Y. Ogawa, T. Takahashi und H. Masukata. Association of fission yeast Orp1 and Mem6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999), S. 7228–7236.
- [268] D. T. Pak u.a. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* 91 (1997), S. 311–323.
- [269] P. Romanowski u.a. The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. *Curr. Biol.* 6 (1996), S. 1416–1425.
- [270] P. B. Carpenter, P. R. Mueller und W. G. Dunphy. Role for a *Xenopus* Orc2-related protein in controlling DNA replication. *Nature* 379 (1996), S. 357–360.
- [271] T. S. Takahashi und J.C. Walter. Cdc7-Drf1 is a developmentally regulated protein kinase required for the initiation of vertebrate DNA replication. *Genes Dev.* 19 (2005), S. 2295–2300.
- [272] K. Hanashiro u.a. Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells. *Oncogene* 27 (2008), S. 5288–5302.
- [273] K. Klotz-Noack u.a. Re-replication induced by geminin depletion occurs from G2 and is enhanced by checkpoint activation. *J. Cell Sci.* 125 (2012), S. 2436–2445.

- [274] J. Lüders. The amorphous pericentriolar cloud takes shape. *Nat. Cell Biol.* 14 (2012), S. 1126–1128.
- [275] F. Uhlmann und K. Nasmyth. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr. Biol.* 8 (1998), S. 1095–1101.
- [276] D. M. MacAlpine, H. K. Rodriguez und S. P. Bell. Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome. *Genes Dev.* 18 (2004), S. 3094–3105.
- [277] M. S. Schwab u.a. Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during *Xenopus* oocyte maturation. *Curr. Biol.* 11 (2001), S. 141–150.
- [278] Q. Wu u.a. A role for Cdc2- and PP2A-mediated regulation of Emi2 in the maintenance of CSF arrest. *Curr. Biol.* 17 (2007), S. 213–224.
- [279] N. Sagata u.a. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342 (1989), S. 512–518.
- [280] J. E. Jr. Ferrell u.a. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991), S. 1965–1971.
- [281] R. S. Hagan u.a. p31^{comet} acts to ensure timely spindle checkpoint silencing subsequent to kinetochore attachment. *Mol. Biol. Cell* 22 (2011), S. 4236–4246.
- [282] D. A. Date, A. C. Burrows und M. K. Summers. Phosphorylation Regulates the p31^{Comet}-Mitotic Arrest-deficient 2 (Mad2) Interaction to Promote Spindle Assembly Checkpoint (SAC) Activity. *J. Biol. Chem.* 289 (2014), S. 11367–11373.
- [283] Y. Nishino u.a. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 31 (2012), S. 1644–1653.
- [284] F. M. Ausubel u.a. *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene publishing associates, 1988.
- [285] J. Sambrook und D. W. Russell. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [286] G. Candiano u.a. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25 (2004), S. 1327–1333.
- [287] B. A. Baldo und E. R. Tovey. *Protein blotting: Methodology, research and diagnostic applications*. Basel: Karger, 1989.

-
- [288] A. W. Murray. Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* 36 (1991), S. 581–605.
- [289] D. L. Coppock, R. A. Lue und L. J. Wangh. Replication of *Xenopus* erythrocyte nuclei in a homologous egg extract requires prior proteolytic treatment. *Dev. Biol.* 131 (1989), S. 102–110.
- [290] H. Masai u. a. Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? *Annu. Rev. Biochem.* 79 (2010), S. 89–130.
- [291] S. A. Tammen, S. Friso und S. W. Choi. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol. Aspects Med.* 34 (2013), S. 753–764.
- [292] G. A. Pihan. Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprogramming in cancer. *Front. Oncol.* 3 (2013), Artikel 277.
- [293] G. Wang, Q. Jiang und C. Zhang. The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle. *J. Cell Sci.* 127 (2014), S. 4111–4122.

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In der Zeit zwischen September 2009 und Juni 2015 wurde sie am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth unter Leitung von Prof. Dr. Olaf Stemmann angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die herausfordernde Themenstellung, die fundierte wissenschaftliche Betreuung, die gewährten Freiheiten und sein stetes Interesse am Fortgang der Experimente bedanken. Insbesondere war und bin ich ihm sehr für das von ihm entgegengebrachte Vertrauen dankbar, mir diese Promotion trotz meiner familiären Verpflichtungen ermöglicht zu haben.

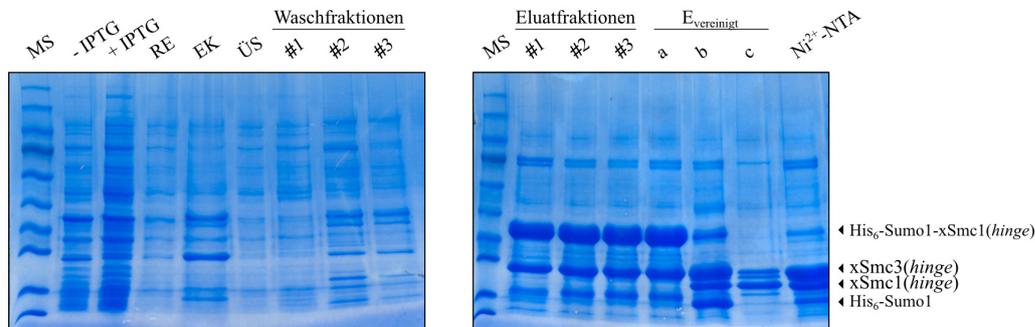
Vielen Dank auch all meinen Laborkollegen für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die nette Laboratmosphäre. Besonders möchte ich mich bei Andreas Brown und Philipp Kahlen bedanken, die des Öfteren das abendliche Umsetzen der Froschweibchen für mich übernommen haben, sowie bei Markus Hermann, der mich geduldig in die Geheimnisse der verschiedenen präparativen Chromatographiesysteme eingeweiht hat. Philipp und Lisa Mohr gebührt zudem großer Dank für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit, mit ihren zahlreichen Anmerkungen haben sie diese noch einmal ein Stück weit vorangebracht.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ihren stetigen Zuspruch und die Unterstützung, die sie mir nicht erst während der Promotionsphase zuteil werden ließen. Milan, Paula und Halina, Euch danke ich für die schöne, trubelige Zeit und dass es Euch immer wieder gelungen ist, mir auch nach einem anstrengenden Arbeitstag oder experimentellen Mißerfolgen ein freudiges Lächeln zu entlocken.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Peter, ohne den es diese Arbeit nicht gäbe.

9 Anhang

A



B

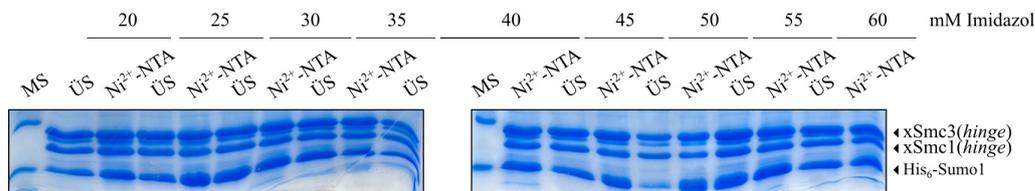


Abb. 32: Expression und Aufreinigung des nativen *xSmc1/xSmc3*-Komplexes. A) Der Komplex, gebildet durch die Gelenkregionen der beiden Interaktionspartner *xSmc1* und *xSmc3*, wurde rekombinant exprimiert und anschließend unter Ausnutzung der an *xSmc1* fusionierten His_6 -Affinitätsmarkierung aufgereinigt. Die *Senp2*-vermittelte Abspaltung dieser Markierung erlaubte keine effiziente Elution des Komplexes ($E_{\text{vereinigt}}$ c), stattdessen wurde letzterer weiterhin durch die Affinitätsmatrix gebunden (Ni^{2+} -NTA). MS: Molekulargewichtsstandard; - IPTG: aufgekochte E. coli-Zellen vor IPTG-Induktion; + IPTG: aufgekochte E. coli-Zellen nach IPTG-Induktion; RE: lösliches Gesamtzelllysate; EK: Einschlusskörper (denaturiertes Protein); ÜS: Überstand nach Inkubation mit Affinitätsmatrix; $E_{\text{vereinigt}}$: vereinigte Eluatfraktionen; a: vor Dialyse, b: nach Dialyse und *Senp2*-Behandlung, c: nach zweiter Affinitätsreinigung; Ni^{2+} -NTA: die im Anschluss an die zweite Affinitätsreinigung aufgekochte Ni^{2+} -NTA-Matrix. B) Im Anschluss an die Dialyse und *Senp2*-Behandlung wurden ca. 30 μ l gepackte Ni^{2+} -Matrix mit unterschiedlichen Imidazolmengen inkubiert. Sowohl vom Überstand (ÜS) als auch von der Affinitätsmatrix (Ni^{2+} -NTA) wurden SDS-Proben hergestellt und gelelektrophoretisch ausgewertet.

<i>X. laevis</i>	MSGFDDLGVYYSDFSGGEGQVGGDDGQAKKSQKRRFREFLRQYRIGTDRT	50
<i>O. cuniculus</i>	MSGFDDPGVFYSDSFGGDP-AADEGQARKSOLQRRFKEFLRQYRVGTDRT	49
<i>X. laevis</i>	GFTFKYRDELKRHYNLGEYWIEVEMEDLASFDEDLADYLYKQPTHEHLQLL	100
<i>O. cuniculus</i>	GFTFKYRDELKRHYNLGEYWIEVEMEDLASFDEDLADYLYKQPAEHLQLL	99
<i>X. laevis</i>	EAAAEVAVDEVTTRPRPAGEETIQEIQVMLRSDANPANIRSLKSEQMSHLV	150
<i>O. cuniculus</i>	EAAAEVAVDEVTTRPRPAGDEALQDIQVMLKSDASPSVSRSLKSDMMSHLV	149
<i>X. laevis</i>	KIPGIIIAATAVRAKATKISIQCRSCRNTIGNIAVRPGLGEGYAMPKRCNT	200
<i>O. cuniculus</i>	KIPGIIIAASAVRAKATRISIQCRSCRNTLNNIAMRPGLEGYALPRKRCNT	199
<i>X. laevis</i>	EQAGRPNCLDPYFIIIPDKCKCVDFQTLKLQESPDVPHGELPRHMQLYC	250
<i>O. cuniculus</i>	DQAGRPNCLDPYFIMPDKCKCVDFQTLKLQELPDVPHGEMPRHMQLYC	249
<i>X. laevis</i>	DRYLCDKVVPGNRVTIMGIYSIRKSGKTSKGRDRVGVGIRSSYIRVVGII	300
<i>O. cuniculus</i>	DRYLCDKVVPGNRVTIMGIYSIKKFGLTSTRGRDRVGVGIRSSYIRVLGI	299
<i>X. laevis</i>	QVDTGTGRSAAGAITPQEEEEFRRLAAKPDIYETVAKSIAPSIYGSSDI	350
<i>O. cuniculus</i>	QVDTDGSGRSFAAGVSPQEEEEFRRLAALPNVYEVISKSIAPSIYGGTDM	349
<i>X. laevis</i>	KKAIACLLFGGSRKRLPDGLTRRGDVNLLMLGDPGTAQSLLKFFVERCSP	400
<i>O. cuniculus</i>	KKAIACLLFGGSRKRLPDGLTRRGDINLLMLGDPGTAQSLLKFFVERCSP	399
<i>X. laevis</i>	IGVYTSGGKSSAAGLTASVMRDPVSRNFIMEGGAMVLADGGVVCIDFDFK	450
<i>O. cuniculus</i>	IGVYTSGGKSSAAGLTASVMRDPSSRNFIMEGGAMVLADGGVVCIDFDFK	449
<i>X. laevis</i>	MREDDRVAIHEAMEQQTISIAKAGITTTLSRCSVLAANSVYGRWDDTK	500
<i>O. cuniculus</i>	MREDDRVAIHEAMEQQTISLAKAGITTTLSRCSVLAANSVYGRWDETK	499
<i>X. laevis</i>	GEENIDFMPTILSRFDMIFIVKDEHNEQRDMTLAKHVMNVHLSARTQSSS	550
<i>O. cuniculus</i>	GEDNIDFMPTILSRFDMIFIVKDEHNEERDVMLAKHVITLHVSALQTQA	549
<i>X. laevis</i>	VEGEVDLNTLKKYIAYCRACKGPRLSAEAAEKLKNRYILMRSGAREHERE	600
<i>O. cuniculus</i>	VEGEIDLAKLKKYIAYCRACKGPRLSAEAAEKLKNRYILMRSGARQHERD	599
<i>X. laevis</i>	TEKRSSIPITVRQLEAIVRISESLGKMKLQPFATETDVEEALRFPQVSTL	650
<i>O. cuniculus</i>	SARRSSIPITVRQLEAIVRISEALSKMKLQPFATEADVEEALRFPQVSTL	649
<i>X. laevis</i>	DAAMSGSLSGVEGFTTQEDQEMLSRIEKQMKRFAIGSQVSEHSIIQDFL	700
<i>O. cuniculus</i>	DAALSGTSLSGVEGFTSQEDQEMLSRIEKQLKRRFAIGSQVSEHSIVQDFI	699
<i>X. laevis</i>	KQKYPEHAHVKVLSLMMRGEIQHRLQRKVLRYIK	735
<i>O. cuniculus</i>	KQKYPEHAVHKVQLMLRRGEIQHRLQRKVLRYLK	734

Abb. 33: Vergleich der Aminosäuresequenzen für *Mcm5* aus *X. laevis* und Kaninchen (*O. cuniculus*, vorhergesagt), welches das Wirtstier bei der Immunisierung darstellte. In der Primärstruktur übereinstimmende Bereiche sind rot gekennzeichnet.

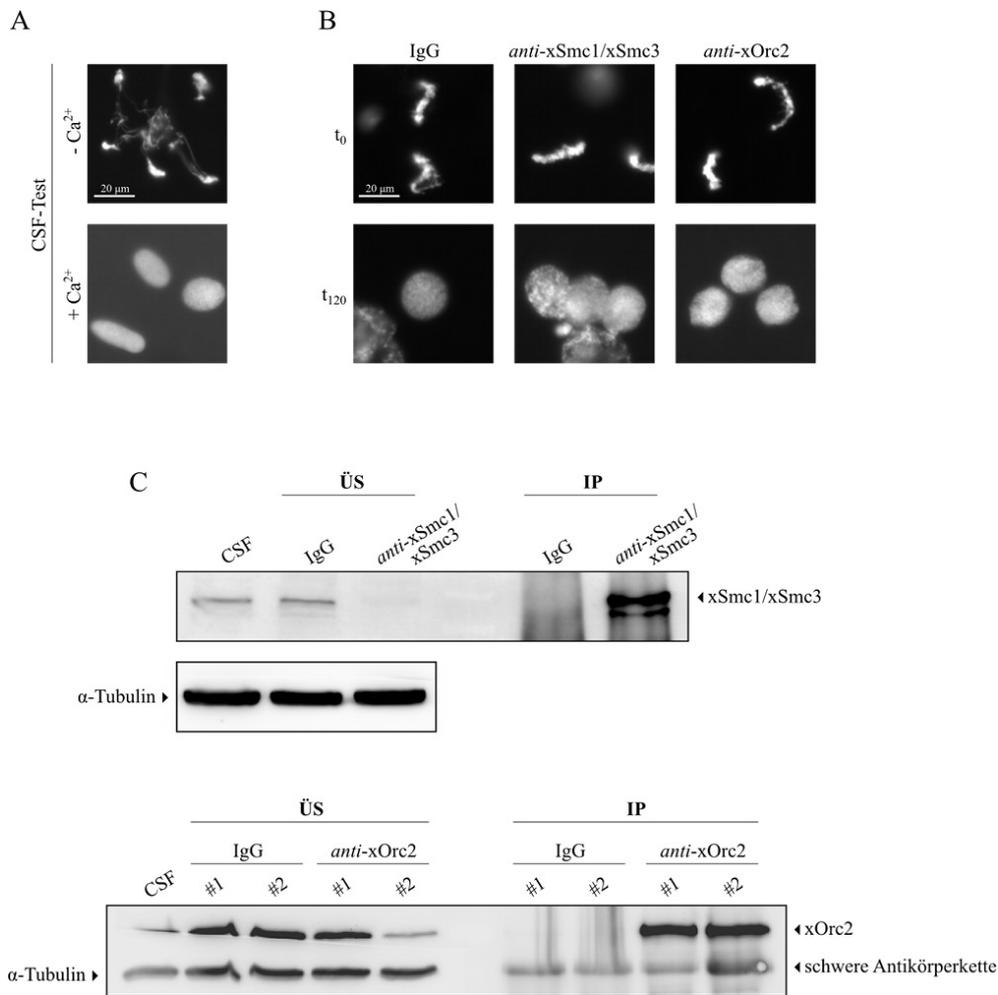


Abb. 34: Die Depletion von *xSmc1/xSmc3* bzw. *Orc2* führt zur Ausbildung überzähliger Procentriolen, welche in engem Kontakt mit dem Muttercentriol verbleiben. A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der *Xenopus*-Spermien-DNA zur Beurteilung der Extrakttüte (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 17). B) Um sicher zu gehen, dass der immundepletier- te Extrakt nach halbstündiger Vorinkubation, unmittelbar vor der Zugabe von Ca-Ionen (t₀) noch immer in Metaphase II arretiert vorlag, erfolgte eine Begutachtung der Spermien-DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zudem wurde der Extrakt nach zweistündiger Inkubation in S-Phase (t₁₂₀) mikroskopiert um einen Eintritt in Apoptose ausschließen zu können. C) Zur Depletion von *xSmc1/xSmc3* (Abb. C oben) bzw. *xOrc2* (Abb. C unten) wurde der Ex- trakt mit einer Protein A-Matrix inkubiert, welche mit den Antikörpern anti-*xSmc1/xSmc3* bzw. anti-*xOrc2* vorbehandelt worden war. Zur Begutachtung der Depletionseffizienz wurden sowohl vom später weiter verwendeten CSF-Überstand (ÜS) als auch von der Protein A- Matrix (IP) SDS-Proben hergestellt und per Immunblot analysiert. Als Ladekontrolle diente α-Tubulin.

A

		centrosomaler Phänotyp			
		gekoppelt	entkoppelt	dupliziert	überdupliziert
IgG	t ₋₃₀	100 (100)	-	-	-
	t ₀	27 (22,0)	96 (78,0)	-	-
	t ₅₀	-	58 (41,4)	82 (58,6)	-
	t ₁₂₀	-	1,5 (1,5)	99 (98,5)	-
anti-xSmc1/xSmc3	t ₋₃₀	100 (100)	-	-	-
	t ₀	36 (29,9)	84,5 (70,1)	-	-
	t ₅₀	-	42 (24,4)	130 (75,6)	-
	t ₁₂₀	-	-	82 (78,1)	23 (21,9)
anti-xOrc2	t ₋₃₀	100 (100)	-	-	-
	t ₀	30 (29,1)	73 (70,9)	-	-
	t ₅₀	-	80 (48,2)	86 (51,8)	-
	t ₁₂₀	-	-	108 (79,4)	28 (20,6)

B

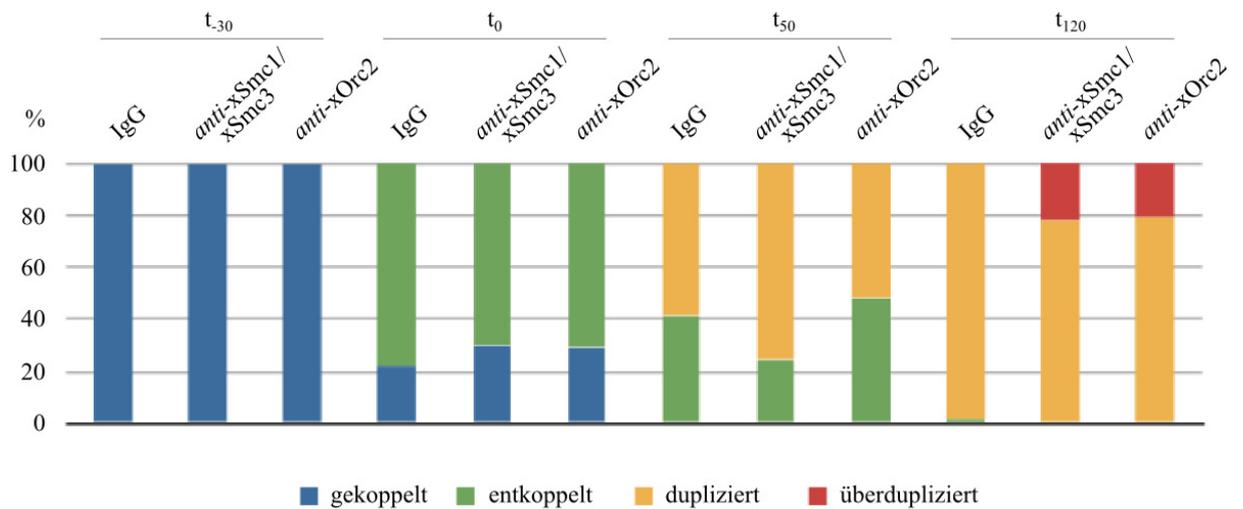


Abb. 35: Die Depletion von *xSmc1/xSmc3* bzw. *Orc2* führt zur Ausbildung überzähliger Procentriolen, welche in engem Kontakt mit dem Muttercentriol verbleiben. A) Zu den jeweiligen Probenentnahmezeitpunkten wurden ca. 100 aus den spezifisch immundepletierten Extrakten reisolierte Centrosomen ihrem Erscheinungsbild nach in die Kategorien „gekoppelt“, „entkoppelt“, „dupliziert“ und „überdupliziert“ eingeteilt und sowohl die Absolut- als auch die Prozentualwerte (in Klammern) tabellarisch erfasst. B) Graphische Darstellung der Auszählergebnisse für die verschiedenen immundepletierten Extrakte in Form eines Säulendiagramms.

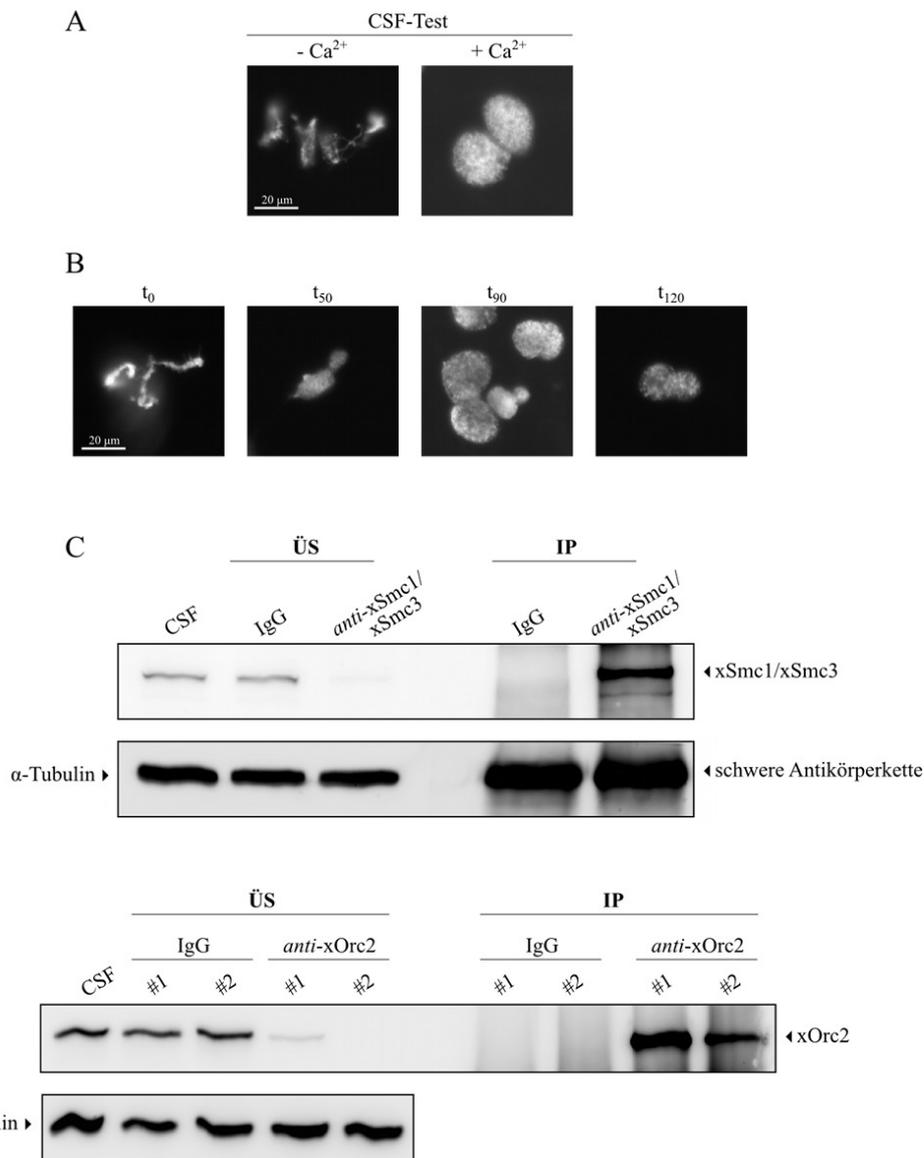


Abb. 36: Die Depletion von *xSmc1/xSmc3* bzw. *Orc2* führt zur Ausbildung überzähliger Procentriolen, welche in engem Kontakt mit dem Muttercentriol verbleiben. A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der *Xenopus*-Spermien-DNA zur Beurteilung der Extraktgüte (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 17). B) Um sicher zu gehen, dass der immundepletierte Extrakt nach halbstündiger Vorinkubation, unmittelbar vor der Zugabe von Ca²⁺-Ionen (t₀) noch immer in Metaphase II arretiert vorlag, erfolgte eine Begutachtung der Spermien-DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie. Auch nach 50-, 90- und 120-minütiger Inkubation in S-Phase wurde der Extrakt mikroskopiert um den Übertritt in die Interphase verfolgen und einen Eintritt in Apoptose ausschließen zu können. C) Zur Depletion von *xSmc1/xSmc3* (Abb. C oben) bzw. *xOrc2* (Abb. C unten) wurde der Extrakt mit einer Protein A-Matrix inkubiert, welche mit den Antikörpern anti-*xSmc1/xSmc3* bzw. anti-*xOrc2* vorbehandelt worden war. Zur Begutachtung der Depletionseffizienz wurden sowohl vom später weiter verwendeten CSF-Überstand (ÜS) als auch von der Protein A-Matrix (IP) SDS-Proben hergestellt und per Immunblot ausgewertet. Wiederum fungierte α-Tubulin im Überstand als Ladekontrolle.

A

		centrosomaler Phänotyp			
		gekoppelt	entkoppelt	dupliziert	überdupliziert
IgG	t ₋₃₀	100 (100)	-	-	-
	t ₀	56 (50,9)	54 (49,1)	-	-
	t ₅₀	-	11,5 (10,9)	92 (87,2)	2 (1,9)
	t ₁₂₀	-	-	470 (94,8)	26 (5,2)
anti-xSmc1/xSmc3	t ₋₃₀	99 (99,0)	1 (1,0)	-	-
	t ₀	48 (44,4)	60 (55,6)	-	-
	t ₅₀	-	8,5 (8,3)	92 (89,8)	2 (1,9)
	t ₁₂₀	-	-	830 (88,5)	108 (11,5)
anti-xOrc2	t ₋₃₀	100 (100)	-	-	-
	t ₀	50 (48,5)	53 (51,5)	-	-
	t ₅₀	-	11,5 (11,0)	87 (83,3)	6 (5,7)
	t ₁₂₀	-	-	884 (83,1)	180 (16,9)

B

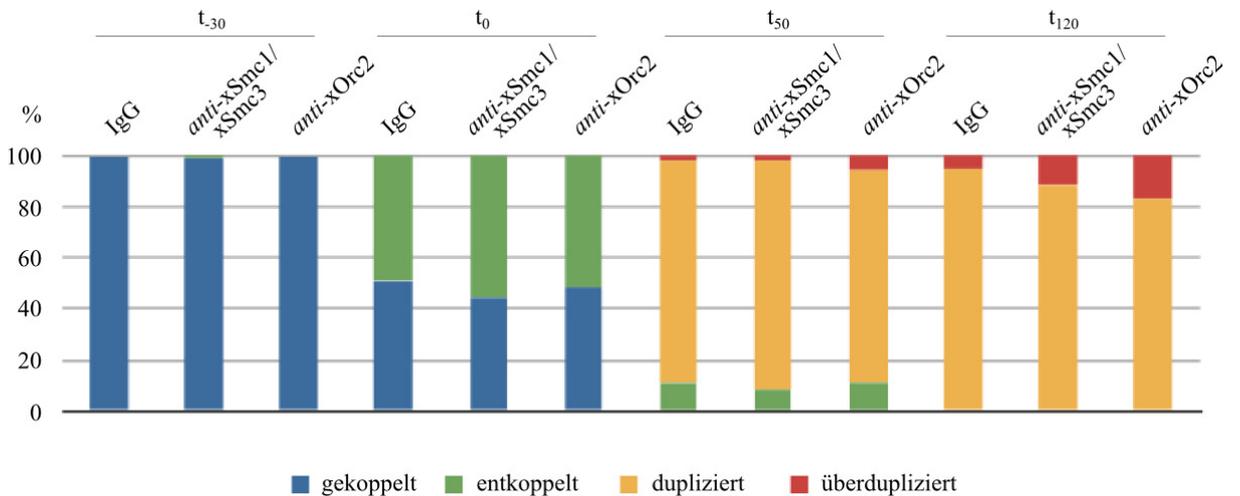


Abb. 37: Die Depletion von *xSmc1/xSmc3* bzw. *Orc2* führt zur Ausbildung überzähliger Procentriolen, welche in engem Kontakt mit dem Muttercentriol verbleiben. A) Zu den jeweiligen Probenentnahmezeitpunkten wurden *Xenopus*-Centrosomen aus den spezifisch immundepletierten Extrakten reisoliert und entsprechend ihres Erscheinungsbilds in die Kategorien „gekoppelt“, „entkoppelt“, „dupliziert“ und „überdupliziert“ eingeteilt. Sowohl die Absolut- als auch die Prozentualwerte (in Klammern) sind tabellarisch erfasst. B) Graphische Darstellung der Auszählergebnisse für die verschiedenen immundepletierten Extrakte in Form eines Säulendiagramms.

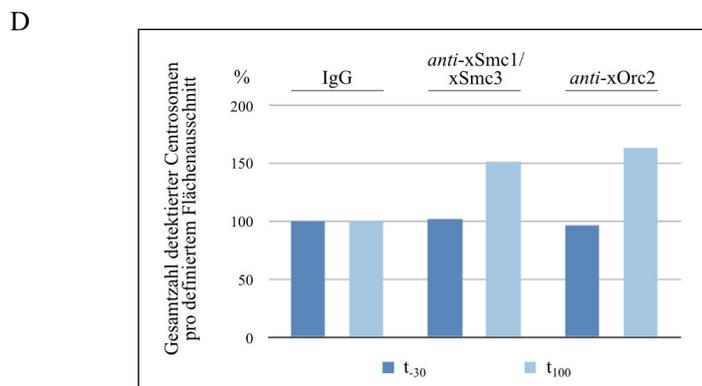
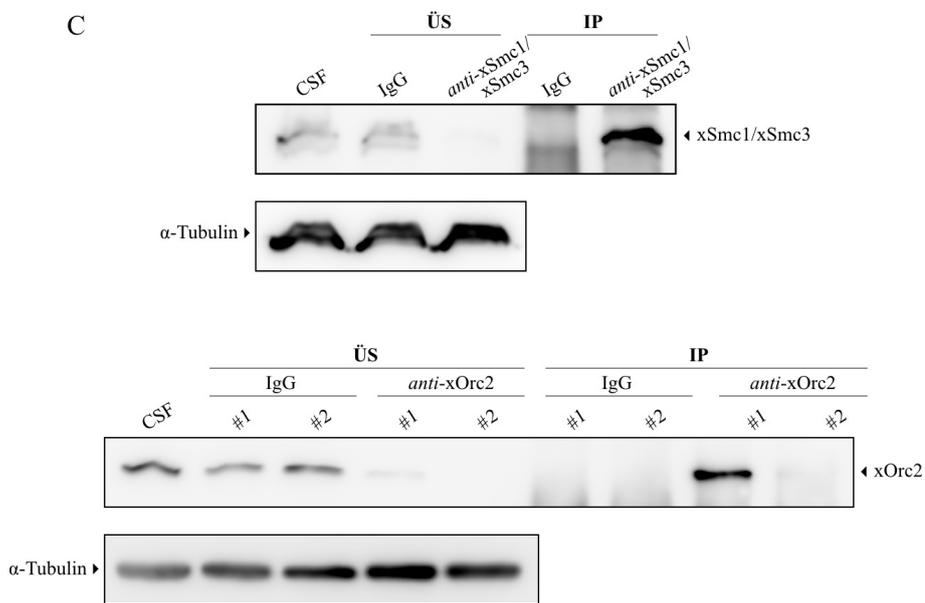
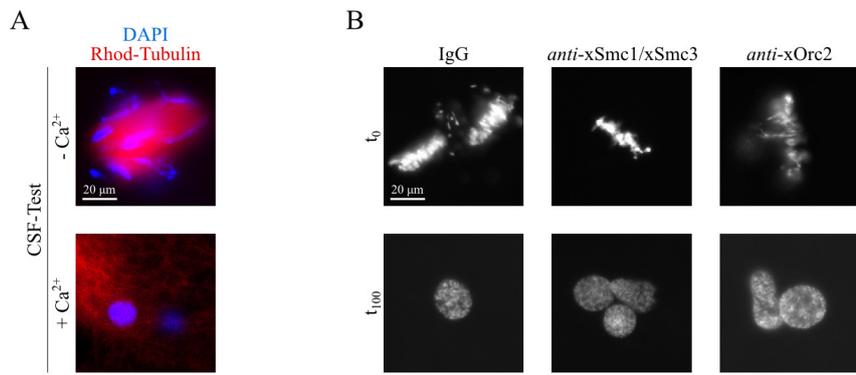


Abb. 38 (vorhergehende Seite): In Abwesenheit von *xSmc1/xSmc3* oder *xOrc2* werden mehr Centrosomen detektiert: **Experiment 3.** A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Beurteilung der Extraktgüte, wobei die Spermien-DNA mit DAPI und die Mikrotubuli mit Rhodamin-markiertem Tubulin sichtbar gemacht wurden (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 21). B) Nach 30-minütiger Vorinkubation mit *Xenopus*-Spermien-DNA und unmittelbar vor Ca^{2+} -induziertem Eintritt in Interphase (t_0) wurde der immundepletierte Extrakt fluoreszenzmikroskopisch untersucht, um den bis dahin bestehenden Arrest in Metaphase II zu garantieren. Ebenso wurde der Extrakt nach 100-minütiger Inkubation in S-Phase (t_{100}) analysiert, wodurch ein apoptotisches Verhalten des Extraktes ausgeschlossen werden konnte. C) Zur Depletion von *xSmc1/xSmc3* (Abb. C oben) bzw. *xOrc2* (Abb. C unten) wurde der für gut befundene Extrakt mit einer Protein A-Matrix inkubiert, welche mit den Antikörpern anti-*xSmc1/xSmc3* bzw. anti-*xOrc2* vorbehandelt worden war. Sowohl vom später weiter verwendeten CSF-Überstand (ÜS) als auch von der Protein A-Matrix (IP) wurden SDS-Proben hergestellt und per Immunblot analysiert, um die Depletionseffizienz beurteilen zu können. Als Ladekontrolle für den CSF-Überstand diente α -Tubulin. D) Graphische Darstellung der quantitativen Analyse in Form eines Säulendiagramms. Hierbei wurden die zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelten Absolutwerte der Centrosomenanzahl nach Kontrolldepletion (siehe Tab. 1) 100 % gleichgesetzt und mit denen nach *xSmc1/xSmc3*- bzw. *xOrc2*-Depletion verglichen.

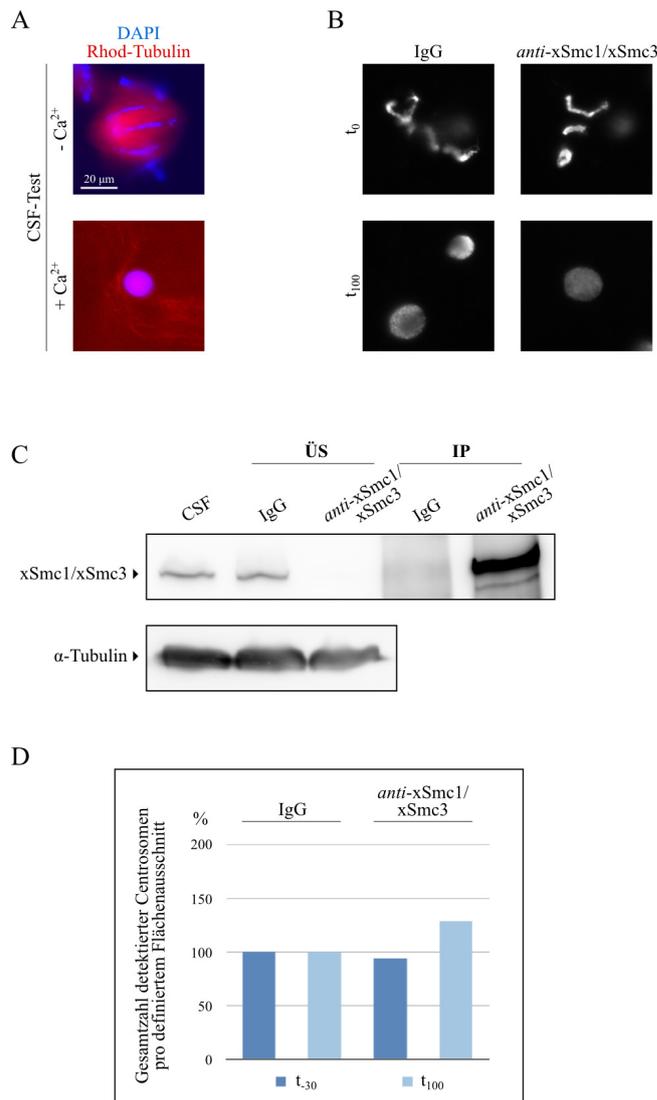


Abb. 39: In Abwesenheit von *xSmc1/xSmc3* werden mehr Centrosomen detektiert: **Experiment 4.** A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Beurteilung der Extraktgüte, wobei das Spermienchromatin mittels DAPI und die Mikrotubuli durch Einbau von Rhodamin-Tubulin angefärbt wurden (für zusätzliche Erklärungen vgl. auch Abb. 21). B) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Extraktes nach 30-minütiger Vorinkubation mit *Xenopus*-Spermien-DNA und unmittelbar vor Ca²⁺-induziertem Eintritt in Interphase (t₀) zur Bestätigung des bis hierhin bestehenden Metaphase II-Arrests. Desgleichen erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse nach 100-minütiger Inkubation in S-Phase (t₁₀₀), um den Eintritt in Apoptose ausschließen zu können. C) Zur Depletion von *xSmc1/xSmc3* wurde der für gut befundene Extrakt mit einer Protein A-Matrix inkubiert, welche mit den Antikörpern anti-*xSmc1/xSmc3* vorbehandelt worden war. Um die Effizienz der Depletion abschätzen zu können, wurden sowohl vom später weiter verwendeten CSF-Überstand (ÜS) als auch von der Protein A-Matrix (IP) SDS-Proben hergestellt und per Immunblot analysiert. Als Ladekontrolle für den CSF-Überstand fungierte α-Tubulin. D) Graphische Darstellung der quantitativen Analyse in Form eines Säulendiagramms. Hierbei wurden die zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelten Absolutwerte der Centrosomenanzahl nach Kontrolldepletion (siehe Tab. 1) 100 % gleichgesetzt und mit denen nach *xSmc1/xSmc3*- bzw. *xOrc2*-Depletion verglichen.

<i>X. laevis</i>	METEPLQPLENKTAVGKVKKSDN--KRLSVERIYQKKTQLEHILLRPDTY	48
<i>O. cuniculus</i>	MEVSPLQPVENMQMKNKIKKNEDAKKRLSIERIYQKKTQLEHILLRPDTY	50
<i>X. laevis</i>	IGSVEPVTQQMWVDFEDELNCRDITFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRDP	98
<i>O. cuniculus</i>	IGSVELVTQHMWVYDEDVGINYREVTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRDP	100
<i>X. laevis</i>	TMSCIKITIDPDNNTISVWNNKGIPVVEHKVVEKVVYPALIFGQLLTSSN	148
<i>O. cuniculus</i>	KMSCIRVTIDPENNLISIWNNKGIPVVEHKVVEKMYVPALIFGQLLTSSN	150
<i>X. laevis</i>	YDDQKVTGGRNGYGAKLCNIFSNTFTVETACREYKKIFKQVTWNNMSN	198
<i>O. cuniculus</i>	YDDDEKVTGGRNGYGAKLCNIFSNTFTVETASREYKKMFKQVTWMDNMR	200
<i>X. laevis</i>	APDPKIKPFEGEDFTCITFQPDLSKFKMQILDKDIVALMSRRAYDVAGSS	248
<i>O. cuniculus</i>	AGEMELKSPSGEDYTCITFQPDLSKFKMQSLDKDIVALMVRRAYDIAGST	250
<i>X. laevis</i>	KGVKVFNLGKRLPVSGFRITYVEMYLKDKLDETGNNPFKVMHEQVNDRWEVC	298
<i>O. cuniculus</i>	KDVKVFNLGNKLPVKGFRSYVDMYLKDKVDETGNNPLKVIHEQVNRWEVC	300
<i>X. laevis</i>	LTMSEKGFQQISFVNSIATTKGGRHVDYVADQIVTKLIDVVKKKNGGKIS	348
<i>O. cuniculus</i>	LTMSEKGFQQISFVNSIATSKGGRHVDYVADQIVAKLVDVVKKKNGGVA	350
<i>X. laevis</i>	VKPFQVKNHMWVFNALIENPTFDSQTKENMTLQSKSPGSKCTLSEKFIK	398
<i>O. cuniculus</i>	VKAHQVKNHMWIFVNALIENPTFDSQTKENMTLQAKSPGSTCQLSEKFIK	400
<i>X. laevis</i>	GATSCGIVESILNWKFKAQVQL	421
<i>O. cuniculus</i>	AAIGCGIVESILNWKFKAQVQL	423

Abb. 40: Vergleich der Aminosäuresequenzen des für die Immunisierung ausgewählten N-terminalen Bereichs von Topoisomerase II α aus *X. laevis* und Kaninchen (*O. cuniculus*, vorhergesagt). Letzteres stellte das Wirtstier bei der Immunisierung dar. In der Primärstruktur übereinstimmende Bereiche sind rot gekennzeichnet.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Bayreuth, den 24. Juni 2015