

**Analyse des meiotischen
Cohesinkomplexes in
Drosophila melanogaster-Weibchen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
-Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)-
an der Bayreuther Graduiertenschule
für Mathematik und
Naturwissenschaften (BayNat)

vorgelegt von
Evelin K. Urban

Bayreuth, März 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2010 bis März 2015 in Bayreuth am Lehrstuhl für Genetik unter Betreuung von PD Dr. Stefan Heidmann angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 18. März 2015

Zulassung durch das Leitungsgremium: 25. März 2015

Wissenschaftliches Kolloquium: 16. Juli 2015

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prüfungsausschuss:

PD. Dr. Stefan Heidmann (Erstgutachter)

Prof. Dr. Benedikt Westermann (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Olaf Stemmann (Vorsitz)

Prof. Dr. Gerrit Begemann

Obstacles don't have to stop you.

If you run into a wall, don't turn around and give up.
Figure out how to climb it, go through it, or work around it.

- Michael Jordan

Zusammenfassung

Für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität ist es von entscheidender Bedeutung, dass die gesamte genetische Information nach einer Zellteilung gleichmäßig auf die entstandenen Tochterzellen aufgeteilt wird. Während der S-Phase wird die DNA repliziert, sodass zwei identische Kopien vorliegen, welche bis zum Ende der Mitose miteinander verbunden bleiben. Hierfür wird der ringförmige Cohesinkomplex benötigt, der die DNA topologisch umschließt. Dieser Multiproteinkomplex setzt sich aus vier Kernuntereinheiten zusammen: SMC1, SMC3 und den zwei nicht-SMC Untereinheiten Scc1/Rad21/Mcd1 und Scc3/SA. In Metazoen wird der Großteil der Cohesinmoleküle während der Prophase vom Chromatin entfernt, während ein kleiner Teil am zentromerischen Chromatin verbleibt und erst beim Metaphase-Anaphase-Übergang durch eine Separase-abhängige Spaltung von Scc1/Rad21/Mcd1 abgelöst wird. Dieser exakt regulierte Mechanismus ist die Grundlage für eine korrekte Segregation und Aufteilung der Schwesterchromatiden auf die entstehenden Tochterzellen.

Die Meiose stellt eine spezielle Art der Zellteilung dar, bei der zwei aufeinanderfolgende Teilungen durchlaufen werden, ohne eine dazwischen stattfindende DNA-Replikation. Dies hat die Reduktion des Chromosomengehalts zur Folge. Zur Aufrechterhaltung der Schwesterchromatidkohäsion wird ein Meiose-spezifischer Cohesinkomplex benötigt, welcher anstatt Scc1 die Meiose-spezifische Untereinheit Rec8 besitzt. Das an den Chromosomenarmen befindliche Cohesin wird in Meiose I durch einen Separase-abhängigen Prozess gespalten und die zentromerische Fraktion wird erst beim Durchlaufen von Meiose II vom Chromatin abgelöst. Dieser genau regulierte Prozess ist die Voraussetzung für die Bildung von Gameten mit einem korrekten Chromosomensatz. Rec8 und Scc1/Rad21/Mcd1 gehören zur Proteinfamilie der Kleisine. Diese Proteine verbrücken die Kopfdomänen der SMC-Proteine und sind bereits in verschiedenen Organismen beschrieben worden, jedoch konnte in *Drosophila* bisher kein Rec8-Homolog identifiziert werden. Daran anknüpfend wurde im ersten Teil der Arbeit untersucht, inwiefern die mitotische Cohesinuntereinheit Rad21 eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion besitzt und welche Folgen der Oogenese-spezifische Abbau dieses Proteins auf die Struktur des Synaptonemalen Komplexes (SC) hat. Dieser Komplex stellt ein Proteingerüst dar, welcher die Paarung und anschließende Rekombination der homologen Chromosomen ermöglicht. Die Oogenese-abhängige Inaktivierung von Rad21 hatte keine Beeinträchtigung der Chromosomensegregation zur Folge, sehr wohl jedoch Auswirkungen auf die Struktur des SCs, indem dessen Stabilität negativ beeinflusst wird. Durch *in vitro* Interaktionsstudien konnte darüber hinaus ein Hinweis für eine direkte Interaktion von Rad21 mit C(2)M, einer

Komponente des lateralen Elements des SCs, erbracht werden. Diese Assoziation ist eventuell auch von entscheidender Bedeutung für die Stabilität des SCs.

Um auszuschließen, dass das Ausbleiben von meiotischen Defekten nach ektopischer Proteolyse von Rad21 nicht auf eine unvollständige Inaktivierung der Cohesinuntereinheit zurückzuführen ist, wurde eine Rad21-Version generiert, bei der die Separaseerkennungssequenzen mutiert waren. Nach Oogenese-spezifischer Expression dieser nicht-spaltbaren Rad21-Variante konnte ebenfalls keine Beeinträchtigung der Chromosomensegregation festgestellt werden, sodass anzunehmen ist, dass Rad21 keine bzw. nur eine untergeordnete kohäsive Funktion in der weiblichen Meiose von *Drosophila melanogaster* innehat.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Funktionsanalysen eines weiteren Proteins (SOLO; *sisters-on-the-loose*) durchgeführt, für das bereits kohäsive Funktionen während der Meiose beschrieben wurden. Um zu testen, ob dieses Protein als funktionelles Rec8-Homolog fungieren könnte, wurden verschiedene Interaktionsstudien durchgeführt. Diese legten jedoch nahe, dass SOLO vermutlich kein integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesin-komplexes ist, sondern vielmehr als regulatorisches Protein fungiert. Auch die Expression einer SOLO-Version, bei der die vermuteten Separase-Spaltstellen modifiziert wurden, hatte keinen Einfluss auf den Verlauf der Meiose, sodass auch dieses Kriterium für ein kohäsives Kleisinprotein nicht erfüllt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass POLO-spezifische Phosphorylierungen im mittleren Teil des Proteins für die Rekrutierung von SOLO entlang der Chromosomen *cores* benötigt werden. Durch den Austausch mutmaßlich phosphorylierter Serin/Threonin-Reste gegen Alanine wurde das Level an SOLO in diesen Bereichen deutlich reduziert, was Auswirkungen auf die Paarung und Synapsis der homologen Chromosomen hatte. Mit Hilfe von 2-Hybridinteraktionsstudien in der Hefe konnten darüber hinaus auch noch Wechselwirkungen von SOLO mit verschiedenen Cohesin-assoziierten Proteinen, wie zum Beispiel dem Cohesinladeprotein Nipped-B/Scs2, Sororin/Dalmatian, SUNN und Pds5 nachgewiesen werden, deren Relevanz in initialen Experimenten in der weiblichen Meiose von *Drosophila melanogaster* bestätigt wurden. Zusammenfassend kann demnach festgehalten werden, dass SOLO vermutlich als regulatorisches Protein im Kontext mit verschiedenen Cohesin-assoziierten Proteinen (Pds5, Sororin, SUNN, Nipped-B) für die Schwesterchromatidkohäsion in der weiblichen Meiose und die Stabilität des SCs benötigt wird, nicht jedoch als Rec8-Homolog fungiert.

Abstract

Analysis of the meiotic cohesin complex in *Drosophila melanogaster* females

Faithful segregation of genetic material and passing all information to each daughter cell after cell division is a prerequisite for the maintenance of genetic stability. During S phase the DNA is replicated. The resulting two identical copies are connected with each other until the end of mitosis. This connection is established by the ring-shaped cohesin complex that appears to embrace DNA in a topological manner. The cohesin complex consists of four subunits: SMC1 and SMC3, and two non-SMC subunits, Scc1/Rad21/Mcd1 and Scc3. In Metazoan the bulk of cohesin is removed during prophase, whereas a small population of cohesin remains at the centromeric regions and is finally released at the metaphase-to-anaphase transition by the protease separase, which cleaves the cohesin subunit Scc1/Rad21/Mcd1. This strictly regulated cleavage of cohesin allows a coordinated segregation of sister chromatids into each daughter cell.

Meiosis is a special type of cell division, where one round of DNA replication is followed by two rounds of cell division. This process leads to a reduction of the DNA content of the gametes. The maintenance of sister chromatid cohesion in meiosis is mediated by a meiotic cohesin complex, which contains a specific cohesin component, called Rec8. Similar to mitosis, the cohesin molecules along the chromosome arms are cleaved in meiosis I by separase and the centromeric cohesin fraction is left intact and keeps sister chromatids paired until anaphase II. At this time point, the remaining cohesin fraction is also removed by a separase-dependent cleavage of Rec8. This precisely regulated process is a prerequisite for the formation of gametes with a correct set of chromosomes. Rec8 and Scc1/Rad21/Mcd1 are members of the kleisin protein family, which are able to form a stable bridge connecting the two head domains of SMC1 and SMC3. Kleisin proteins have been characterized in various organisms. However, in *Drosophila*, no Rec8 homologue has been identified so far. Therefore, I am investigating a putative cohesive role of the mitotic subunit Rad21 in female meiosis. After an oogenesis specific inactivation of Rad21 the chromosome segregation in meiosis appears to be normal. However, its proteolysis results in a precocious disassembly of the synaptonemal complex (SC), which is a protein scaffold that forms between homologous chromosomes and mediates pairing and recombination.

To address how Rad21 influences the integrity of the SC, a multitude of *in vitro* interaction analysis were done, which revealed a direct interaction of Rad21 with the lateral element component C(2)M, potentially explaining why the mitotic cohesin subunit is required for SC maintenance. To confirm that the absence of segregation defects after ectopic proteolysis of Rad21 is not due to residual intact cohesin complexes, a Rad21 version was generated,

where separate consensus cleavage sites have been destroyed by site-directed mutagenesis. However, the expression of this stable Rad21 version does not interfere with chromosome segregation in meiosis. Thus, chromatid cohesion during oogenesis does not depend on Rad21-containing cohesin complexes.

Since Rad21 seems to have no exclusive role in meiotic cohesion, in the second part of my thesis I have assessed whether the cohesive protein SOLO (sisters-on-the-loose) acts as Rec8 homologue. However, the conducted interaction analysis revealed that SOLO probably is no integral component of a meiotic cohesin complex but rather acts as regulatory protein, required for establishment and maintenance of cohesion. The expression of a SOLO variant that contains mutations within putative separase cleavage sites does not perturb the progression of meiosis, which should be another prerequisite for a meiotic kleisin protein. Furthermore, it was shown that POLO-specific phosphorylations in the middle part of the protein are required for the recruitment of SOLO onto chromosome cores. The exchange of putative phosphorylated serine/threonine residues by alanine leads to a reduction of the SOLO level in these regions, which results in an impaired chromosome pairing and synapsis rate. To gain more detailed insight into the function of SOLO, yeast 2 hybrid analysis was performed, which revealed interactions with cohesin-associated proteins, e.g. the cohesin loading protein Nipped-B/Scp2, Sororin/Dalmatian, SUNN and Pds5. Initial experiments in female meiosis in *Drosophila melanogaster* confirmed the relevance of these interactions.

Taken together, the results suggest that SOLO is involved in sister chromatid cohesion during meiosis but it is probably no integral component of a specialized cohesin complex. Instead, SOLO seems to function in cooperation with various cohesin-associated proteins (Pds5, Sororin, SUNN, Nipped-B) to establish sister chromatid cohesion during female meiosis in *Drosophila melanogaster*.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der eukaryontische Zellzyklus.....	1
1.2 Die Schwesterchromatidkohäsion in Mitose.....	4
1.2.1 Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion.....	6
1.2.2 Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Schwesterchromatidkohäsion.....	8
1.2.3 Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion.....	10
1.3 Schwesterchromatidkohäsion in Meiose.....	13
1.3.1 Regulation der meiotischen Kohäsion.....	14
1.3.2 Meiotische Cohesinuntereinheiten.....	16
1.4 Meiose in <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.4.1 Besonderheiten der Spermatogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.4.2 Besonderheiten der Oogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	20
1.4.3 Kohäsive, meiotische Proteine in <i>Drosophila melanogaster</i>	22
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. Ergebnisse	26
2.1 Funktionsanalyse von Rad21 in der weiblichen Meiose.....	26
2.1.1 Oogenese-spezifische Inaktivierung von Rad21 führt zur Dissoziation des Cohesins vom meiotischen Chromatin.....	28
2.1.2 Rad21 Spaltung führt zur frühzeitigen Disassemblierung des Synaptonemalen Komplexes.....	29
2.1.3 Interaktion von Rad21 mit dem N-Terminus der SC-Komponente C(2)M.....	37
2.1.4. Lokalisation von Rad21 am meiotischen Chromatin ist Nipped-B abhängig.....	41
2.1.5 Die Inaktivierung von Rad21 hat keinen Einfluss auf die meiotische Kohäsion.....	43
2.1.6 Die Expression einer nicht Separase-spaltbaren Version von Rad21 hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Meiose.....	45
2.1.7 Die zentromerische Lokalisation von SOLO zeigt keine Rad21-Abhängigkeit.....	48
2.2 Funktionsanalyse von SOLO in der weiblichen Meiose.....	49
2.2.1 Lokalisation von SOLO entlang der Chromosomen cores ist C(2)M-abhängig.....	50
2.2.2 Die zentromerische Akkumulationen von ORD und SOLO weisen eine gegenseitige Abhängigkeit auf.....	51
2.2.3 Kohäsionsverlust der Schwesterzentromere im <i>solo</i> -mutanten Hintergrund.....	53
2.2.4 <i>solo</i> -mutante Oozyten können keinen stabilen Metaphase-I-Arrest aufrechterhalten.....	54
2.2.5 Die RGG- <i>repeats</i> haben keine Funktion auf die Lokalisation von SOLO und die Kohäsion.....	56
2.2.6 SOLO ist kein integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes.....	58
2.2.7 Mutationen der potentiellen Separase-Spaltstellen haben keinen Einfluss auf den Verlauf der Meiose.....	63

2.2.8 POLO-abhängige Phosphorylierung von SOLO ist essentiell für die Stabilität des SCs	66
2.2.9 Eine Arginin-reiche Region im mittleren Teil von SOLO fungiert als NLS	72
2.2.10 Interaktionsstudien von SOLO.....	74
3. Diskussion	86
3.1 Funktion von C(2)M in der weiblichen Meiose von <i>Drosophila melanogaster</i>	86
3.2 Rad21 als Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes?	87
3.3 Gegenüberstellung mit anderen Rad21/Scc1-Cohesinkomplexen	91
3.4 SOLO wirkt als kohäsives Protein in der weiblichen Meiose von <i>Drosophila melanogaster</i>	93
3.5 SOLO ist kein integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesin-komplexes.....	96
3.6 POLO-abhängige Phosphorylierung von SOLO ist essentiell für die Synapsis der homologen Chromosomen	98
3.7 Fungiert ORD als funktionelles Rec8-Homolog?	100
3.8 Welches Protein erfüllt die Funktion eines Rec8-Homologs?.....	101
4. Material und Methoden.....	102
4.1 Methoden im Umgang mit <i>Drosophila melanogaster</i>	102
4.1.1 Standardmethoden.....	102
4.1.2 Balancierchromosomen.....	103
4.1.3 Keimbahntransformation von <i>D. melanogaster</i> -Embryonen durch Mikroinjektion und anschließende Kartierung der Transgeninsertionen	104
4.1.4 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>Drosophila melanogaster</i>	105
4.1.5 Ovarienpräparation und Immunfluoreszenzfärbung	105
4.1.6 Immunfluoreszenz an S14-Oozyten	107
4.1.7 Chromosomenspreads	107
4.1.8 Immunfluoreszenzfärbung von Embryonen	108
4.1.9 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	108
4.1.10 <i>In vivo</i> Mikroskopie an Embryonen.....	109
4.1.11 Konfokale Lasermikroskopie	109
4.2 Allgemeine genetische Methoden in <i>Drosophila melanogaster</i>	110
4.2.1 GAL4/UAS-System	110
4.2.2 TEV-Protease-System.....	110
4.2.3 RNA-Interferenz in <i>Drosophila melanogaster</i>	111
4.2.4 Das DeGradFP (degrade Green Fluorescent Protein)-System.....	111
4.3 Molekularbiologische Methoden	110
4.3.1 Allgemeine Methoden der Klonierung.....	111
4.3.2 Klonierung von pattB-gSororin-6myc/pUASp-Sororin-6myc	115
4.3.3 Klonierung von pWALIUM22-UAS-Sororin-RNAi.....	116
4.3.4 Klonierung von pattB-Pds5-6myc	117
4.3.5 Klonierung der modifizierten SOLO-Versionen.....	118
4.4 Proteinanalytische Methoden	119

4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	119
4.4.2 Western Blot und immunologischer Nachweis (Immunblot)	119
4.4.3 <i>In vitro</i> Transkription und Translation (IVT) und Autoradiographie	120
4.4.4 Kinaseassay und <i>in vitro</i> Separase-Spaltungsassay	121
4.4.5 Koimmunpräzipitationen.....	121
4.4.6 Massenspektrometrische Analysen.....	122
4.4.7 Expression und Reinigung von His ₆ -SMC1 ₁₋₁₃₃	122
4.4.8 Affinitätsreinigung von SMC1 ₁₋₁₃₃ -Antikörpern	122
4.5 Methoden im Umgang mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	123
4.5.1 Herstellung transformationskompetenter Hefen	123
4.5.2 Transformation von Plasmid-DNA in <i>S. cerevisiae</i>	124
4.5.3 Hefe-2-Hybrid System.....	124
4.5.4 Plasmide für Hefe 2-Hybrid-Analysen.....	124
4.5.5 Proteinextraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	125
5. Abkürzungsverzeichnis	127
6. Literaturverzeichnis	130
7. Anhang.....	145
8. Publikationsliste.....	149
9. Danksagung.....	150
10. Lebenslauf	151
11. Eidesstattliche Versicherungen und Erklärungen	152

1. Einleitung

Im 18. und 19. Jahrhundert war der Mittelpunkt der biologischen Untersuchungen dahingehend ausgerichtet die phänotypische Vielfalt verschiedener Organismen zu dokumentieren und zu klassifizieren. Charles Darwin knüpfte 1859 in seiner Theorie zur Evolution der Arten daran an, indem er Kontinuität und Varianz als Grundlagen für die vielseitigen Erscheinungsformen des Lebens beschrieb (Darwin, 1859). Fast zeitgleich konnte Rudolf Virchow in einem Aufsatz über die "Zellularpathologie" festhalten, dass jede Zelle immer aus einer bereits bestehenden Zelle hervorgeht (*omnis cellula e cellula*). Er beschrieb dabei die Zelle als kleinste Einheit der Struktur und Vermehrung und lieferte damit die Grundidee für die heutige Zelltheorie und Zytologie (Virchow, 1858). Mit Hilfe von Anilinfärbungen gelang es Walther Flemming einzelne Zellstrukturen sichtbar zu machen, die er dann als Chromatin (altgriechisch: Chroma=Farbe) bezeichnete. Er untersuchte außerdem den Prozess der Zellteilung, bei dem einzelne fadenförmige Strukturen nachweisbar waren, weshalb er den Grundsatz von Virchow auf *omnis nucleus e nucleo* (zu Deutsch: Jeder Zellkern entsteht aus einem Zellkern) weiter einengen und spezifizieren konnte (Flemming, 1882). Allen drei Forschern ist damit gemein, dass sie Prinzipien zur Aufklärung der Struktur, Speicherung und Weitergabe der genetischen Information aufgegriffen haben und somit einen wichtigen Anstoß zur Erforschung der Grundlagen der genetischen Kontinuität und der Varianz gelegt haben.

1.1 Der eukaryontische Zellzyklus

Die Grundlage für die Generierung und Aufrechterhaltung multizellulärer Organismen ist die exakte Weitergabe der genetischen Information an jede Generation und die Tatsache, dass eine Zelle sich immer aus einer bereits bestehenden Zelle entwickelt. Der Großteil des genetischen Materials befindet sich im Zellkern einer eukaryontischen Zelle. Darüber hinaus ist ein kleiner Teil der Gene auch in den Mitochondrien bzw. bei Pflanzen zusätzlich in den Chloroplasten zu finden. Diese Gene liegen auf ringförmigen, doppelsträngigen DNA-Molekülen im Inneren der entsprechenden Zellorganellen und werden zusammen mit diesen vererbt. Die koordinierte Weitergabe der gesamten DNA bildet die Grundlage für die Etablierung von zwei identischen Tochterzellen. Diesen Prozess bezeichnet man als Zellzyklus. In Abbildung 1 ist eine Übersicht über die einzelnen Zellzyklusphasen dargestellt, die für die koordinierte Weitergabe der Zellkern-lokalisiereten DNA benötigt werden. Grundlage hierfür ist die fehlerfreie Verdopplung der genetischen Information, die dann anschließend gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt wird. Diese zwei Prozesse finden in den zwei Hauptphasen des Zellzyklus, in der S-(Synthese)-Phase und M-Phase (Mitose) statt. Dazwischen liegen Wachstumsphasen, sog. *Gap*-Phasen (G1 und G2), wobei die G1-

Phase zwischen M- und S-Phase liegt, während sich die G₂-Phase zwischen S-Phase und der nachfolgenden M-Phase befindet. Zusammenfassend werden die *Gap*-Phasen und die S-Phase auch als Interphase bezeichnet.

In der G₁-Phase finden verschiedene, essentielle Prozesse statt, wie zum Beispiel die Proteinbiosynthese und die RNA-Synthese, die die Grundlage für die bevorstehende Verdopplung der DNA schaffen. Ein weiteres Merkmal dieser Phase ist die Trennung der Zentriolen, sodass dann in der anstehenden S-Phase nicht nur der DNA-Gehalt verdoppelt wird, sondern auch die Zentrosomen, die später als Organisator der mitotischen Spindel fungieren. Nach der DNA-Replikation in der S-Phase liegen von jedem Chromosom zwei identische Kopien vor, die als Schwesterchromatiden bezeichnet werden.

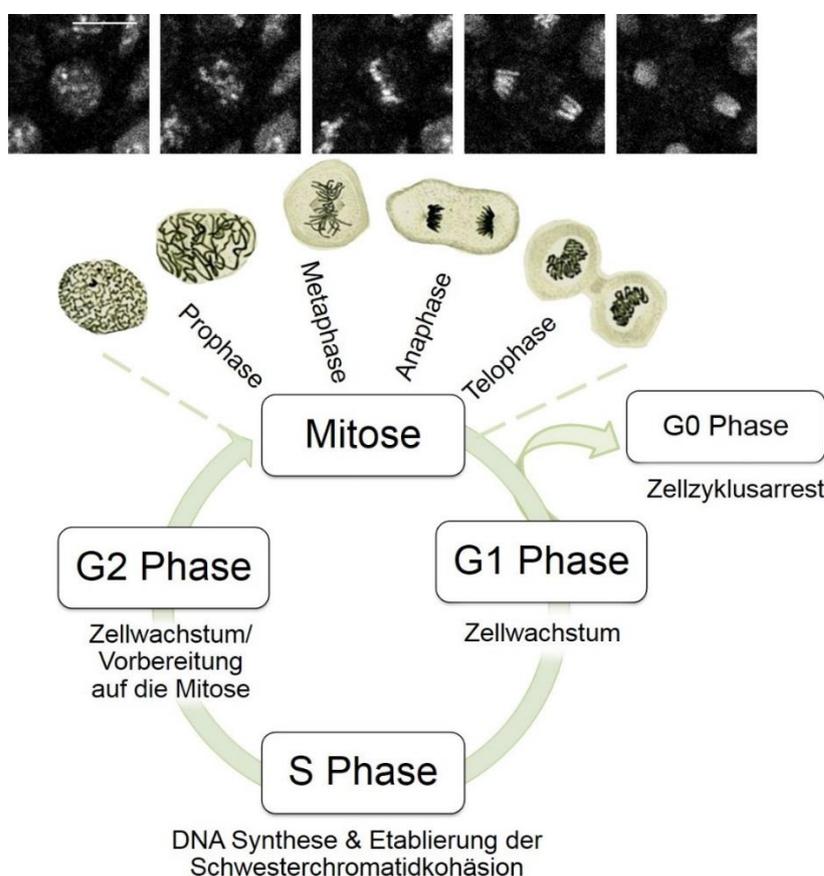


Abbildung 1: Der eukaryontische Zellzyklus. Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der einzelnen Zellzyklusphasen. Die Mitose untergliedert sich dabei in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. In der S-Phase kommt es zur DNA-Synthese und Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion. Diese beiden Zellzyklusphasen sind durch sog. *Gap*-Phasen (G₁ und G₂) voneinander getrennt. Einige Zelltypen gehen in eine Zellzyklusarrestphase über, die als G₀-Phase bezeichnet wird. Die gezeichneten Illustrationen stammen aus Flemming, 1882. Die mikroskopischen Abbildungen zeigen *in vivo*-Aufnahmen aus der Mitose 14 von *Drosophila melanogaster* Embryonen, die eine fluoreszenzmarkierte Version eines Histons tragen (His2Av-mRFP). Der Größenmaßstab beträgt 10 µm.

Eine weitere Besonderheit bestimmter Zelltypen, wie zum Beispiel Nervenzellen, Muskelzellen und Erythrozyten ist der Übertritt in ein Dauerstadium, was auch als G₀-Phase bezeichnet wird. Diese Zellzyklusphase, in der die entsprechenden Zellen über Wochen und Monate verbringen können, zeichnet sich durch einen Proliferationsstillstand aus. Einige Zelltypen verbleiben nach ihrer vollständigen Differenzierung über einen sehr langen Zeitraum in dieser Phase und verlassen diese auch nicht mehr, wohingegen andere Zelltypen wie zum Beispiel Hepatozyten und Lymphozyten wieder in den G₁-Zustand zurückzukehren und weitere Zellteilungen durchführen können. Die G₂-Phase stellt ebenfalls eine Phase des Zellwachstums dar und dient der Zelle zur Vorbereitung auf die bevorstehende Mitose. Die Mitose wiederum ist in mehrere Unterphasen eingeteilt (Alberts *et al.*, 2014). In der Prophase kommt es zum Zusammenbruch der Kernhülle und zur Kondensation der DNA. Dabei wird das Interphasechromatin enorm verdichtet und einzelne Chromosomen ausgebildet. Diese Kompaktierung des Genoms und die damit einhergehende Etablierung der mitotischen Chromosomen ist ein essentieller Vorgang, denn nur so kann die akkurate Verteilung der Schwesterchromatiden gewährleistet werden (zur Übersicht siehe Hirano, 2005). Im Durchschnitt muss für jedes Chromosom ein ca. 4 cm langer DNA-Faden in eine 10 µm lange und etwa 1 µm durchmessende Struktur verpackt werden (Murray, 1998). Ausgehend von den Zentrosomen wird dann die mitotische Spindel assembliert. Dabei handelt es sich um eine Struktur, bestehend aus Mikrotubuli, die durch einen ständigen Wechsel aus Polymerisation und Depolymerisation eine hohe Dynamik aufweist und so die Chromosomen in der Zellmitte anordnet. Die Assoziation der mitotischen Spindel mit den Chromosomen erfolgt über die Kinetochore, welche einen mehrschichtigen Proteinkomplex darstellen, der mit den zentromerischen Regionen der Schwesterchromatiden assoziiert ist. Die Ausrichtung der einzelnen Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle geschieht in der Metaphase. Erst wenn alle Kinetochore richtig an die mitotische Spindel angeheftet und in der sogenannten Metaphaseplatte ausgerichtet sind, setzt die Anaphase ein, die durch die Trennung der Schwesterchromatiden gekennzeichnet ist. Dabei depolymerisieren die Mikrotubuli und die Spindel verkürzt sich, was zur Trennung der Schwesterchromatiden führt, die zu den entgegengesetzten Polen gezogen werden. In der Telophase kommt es zur Dekondensation der Chromosomen, zur kompletten Disassemblierung der mitotischen Spindel und zur Neusynthese der Kernhülle. Abgeschlossen wird die Zellteilung durch die vollständige Abschnürung des Zytoplasmas, was auch als Zytokinese bezeichnet wird.

Die Regulation der einzelnen Zellzyklusprozesse muss genau kontrolliert sein, da nur so der korrekte Ablauf und die richtige Reihenfolge aller Prozesse gewährleistet werden kann. Mit Hilfe von sogenannten Zellzyklus-Kontrollpunkten (*checkpoints*) wird so zum Beispiel sichergestellt, dass die Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen erst stattfindet, wenn in der S-Phase eine Verdopplung der DNA stattgefunden hat. Diese Kontrollpunkte

werden meist durch post-translationale Modifikationen oder durch die Degradation der entsprechenden Proteine gesteuert (Murray und Kirschner, 1989). Als mit die wichtigsten Modifikationen werden dabei die Phosphorylierungen durch Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks) angesehen. Die Aktivierung dieser Proteinfamilie erfolgt durch die Bindung regulatorischer Untereinheiten, den Cyclinen. Diese werden im Verlauf des Zellzyklus spezifisch abgebaut und regulieren damit die Aktivität der entsprechenden Kinase (Murray, 2004). Jede einzelne Phase des Zellzyklus ist durch eine spezifische Zusammensetzung der Cyclin/Cdk-Level charakterisiert. So wird zum Beispiel ein hohes Level an Cyclin B/Cdk am Ende der G2-Phase einerseits für den Eintritt in Mitose benötigt, andererseits inhibiert dieses aber in der G1-Phase die Initiation der Replikation (Fisher und Nurse, 1996). Um einen vollständigen Abschluss der Zellteilung zu erhalten, muss die Cdk-Aktivität im Verlauf der Mitose wieder reduziert werden, da nur so ein Mitoseaustritt stattfinden kann. Um die nachfolgende DNA-Replikation abzuschließen, muss das Level an Cyclin B/Cdk erneut wieder ansteigen (Coudreuse und Nurse, 2010, Noton und Diffley, 2000), damit alle für die S-Phase benötigten Kontrollmechanismen aktiviert werden. Neben diesem Cyclin B/Cdk1-Komplex gibt es für die Regulation des Zellzyklus noch Cyclin A und Cyclin E, welche in Kombination mit Cdk1 und Cdk2 essentiell für den korrekten Ablauf der Interphase sind. Eine genaue Abstimmung all dieser Regulationsfaktoren ist essentiell für den korrekten Ablauf der einzelnen Zellzyklusphasen und gewährleistet so die Entstehung von zwei genetisch-identischen Tochterzellen.

1.2 Die Schwesterchromatidkohäsion in Mitose

Eine weitere Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität ist, dass die Schwesterchromatiden nach Beendigung der S-Phase bis zu ihrer endgültigen Trennung in der Anaphase gepaart vorliegen, da nur so eine gleichmäßige Verteilung des DNA-Gehalts auf die entsprechenden Tochterzellen gewährleistet werden kann. Dieser Zusammenhalt wird durch den konservierten ringförmigen Proteinkomplex Cohesin vermittelt (Guacci *et al.*, 1997, Michaelis *et al.*, 1997, Losada *et al.*, 1998, Sumara *et al.*, 2000, Tomonaga *et al.*, 2000). Dieser besteht aus zwei Proteinen, SMC1 und SMC3, die der Proteinfamilie der *Structural Maintenance of Chromosomes* (SMC)-Proteine angehören, einer α -Kleisin-Untereinheit, die Scc1/Rad21/Mcd1 genannt wird, und weiteren akzessorischen Untereinheiten (Scc3 und Pds5), die für die Beladung und Stabilität des Cohesin-Komplexes benötigt werden (Nasmyth und Haering, 2005, 2009). Die Charakteristika der SMC-Proteine sind globuläre Domänen an N- und C-Termini, die durch lange *coiled-coil*-Regionen voneinander getrennt sind. Diese Proteingeometrie wurde auch bei Rad50 in *S. cerevisiae* beschrieben (Hopfner *et al.*, 2002), welches demnach zusammen mit den entsprechenden SMC-Homologen vom gleichen Vorläuferprotein abstammt. Ein

Unterschied findet sich jedoch in der Struktur des mittleren Teils der Proteine. Bei den SMC-Proteinen befindet sich hier eine weitere globuläre Region, die als Gelenkregion (*hinge region*) fungiert. Diese ermöglicht, dass die *coiled-coil*-Regionen anti-parallel aufeinander zurückfalten können und so N- und C-Terminus zusammenbringen, die dann eine sogenannte *head*-Domäne ausbilden (Hirano und Hirano, 2002). Die räumliche Nähe der Termini ermöglicht die Assoziation der Walker A- und Walker B-Motive, die eine ATP-bindende Kasette in der *head*-Domäne bilden (Melby *et al.* 1998; Haering *et al.* 2002; Abb. 2).

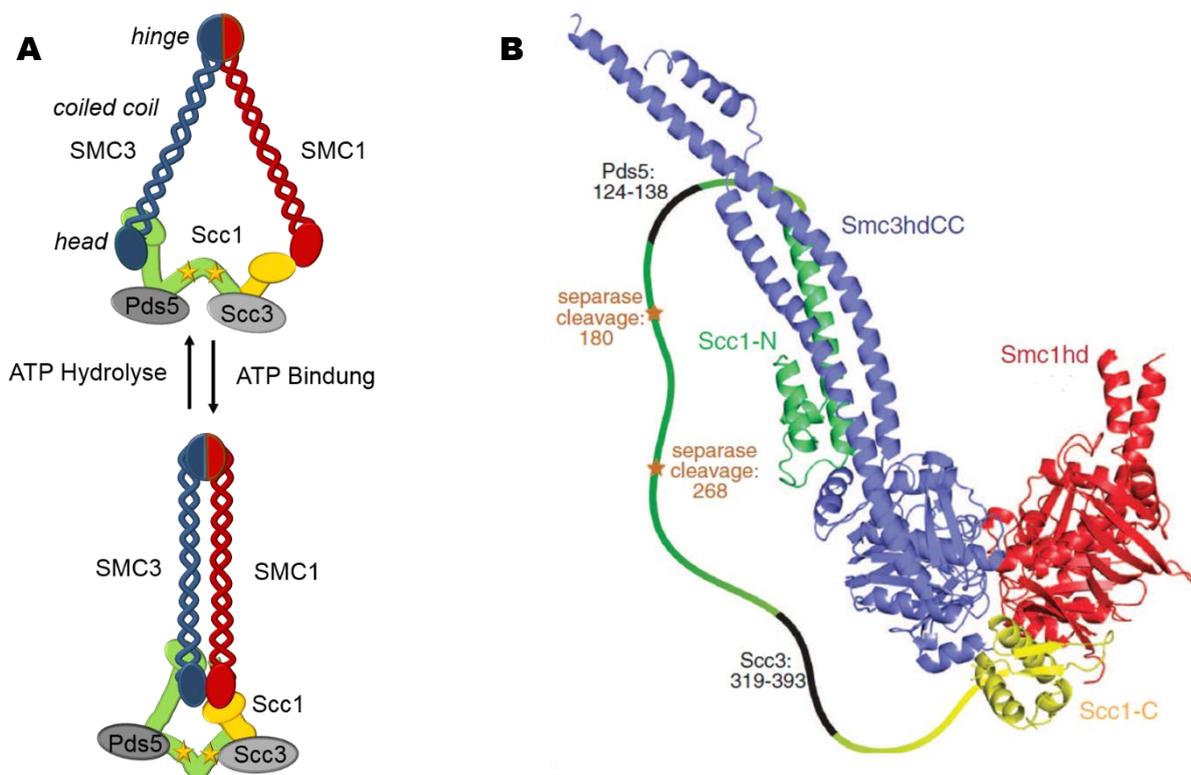


Abbildung 2: Der Cohesinkomplex. (A) Schematische Darstellung des Cohesinkomplexes. Die SMC-Untereinheiten (SMC3: Blau/SMC1: rot) sind durch lange *coiled-coil*-Regionen und eine *hinge*-Region gekennzeichnet. Diese ermöglicht zum einen die Dimerisierung der SMC-Proteine und zum anderen eine anti-parallele Rückfaltung der *coiled-coil*-Regionen, sodass N- und C-Terminus eine sogenannte *head*-Domäne ausbilden können, die eine ATPase-Aktivität aufweist. Der Ringschluss erfolgt über die Bindung des α -Kleisinproteins Scc1 (grün und gelb), welches über den C-Terminus an die *head*-Domäne von SMC1 bindet und über den N-Terminus an die *coiled-coil*-Region von SMC3. An Scc1 binden die akzessorischen Untereinheiten Pds5 und Scc3 (grau), die eine Funktion bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Kohäsion haben. Die ATP-Bindung an die *head*-Domäne führt zur Assoziation einer ATP-Nukleotid-bindenden-Domäne. Die Hydrolyse hingegen führt zur Dissoziation dieser Domäne. Die Erstellung der Abbildung erfolgte auf der Grundlage der in Nasmyth und Haering, 2009 gezeigten Modellvorstellungen des Cohesinkomplexes. Modifiziert wurde hierbei die Scc1/SMC3-Bindestelle und zusätzlich wurden die Proteine Pds5 und Scc3 eingefügt. (B) Kristallstruktur der *head*-Domäne und der *coiled-coil*-Region von SMC3 (SMC3hdCC, blau). Zusätzlich dazu sind die Kristallstrukturen der *head*-Domäne von SMC1 (rot, SMC1hd) und der N- und C-Terminus von Scc1 gezeigt (grün und gelb). Die dazwischenliegende Region ist nur schematisch eingezeichnet, darin befinden sich die Bindestellen für Pds5 und Scc3 (schwarz) sowie die Erkennungssequenzen der Separase (Sterne). Entnommen aus Gligoris *et al.*, 2014.

Die ATP-Bindung bzw. Hydrolyse führt zur Assoziation/Dissoziation dieser ATP-bindenden Kasette, die wiederum essentiell ist für die Bindung von Cohesin ans Chromatin (Arumugam *et al.*, 2003). Durch das Dimerisierungsmotiv der *hinge*-Region, kommt es zur Zusammenlagerung von SMC1 und SMC3, durch welche ein V-förmiges Proteingerüst entsteht (Haering *et al.*, 2002, Melby *et al.*, 1998). Die Verknüpfung der *head*-Domänen erfolgt durch die Bindung von Scc1, welches zur Ausbildung eines ringförmigen Moleküls führt, was einen Durchmesser von ca. 35 nm aufweist (Haering *et al.*, 2002, Gruber *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist die im C-Terminus befindliche *winged-helix*-Domäne von Scc1 auch noch essentiell für die Stimulation der ATPase-Aktivität des SMC1/SMC3-Heterodimers (Arumugam *et al.*, 2006). Der N-Terminus des α -Kleisinproteins hingegen hat keine regulatorische Funktion und dient lediglich der Verknüpfung des Cohesinrings. Scc1 ermöglicht darüber hinaus noch die Assoziation weiterer akzessorischer Cohesinuntereinheiten, wie zum Beispiel Scc3/SA (Losada *et al.*, 2000, Sumara *et al.*, 2000, Haering *et al.*, 2002) oder Pds5 (Gandhi *et al.*, 2006), die eine wichtige Funktion bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Kohäsion haben (Losada *et al.*, 2005, Nishiyama *et al.*, 2010). In höheren Eukaryonten konnten zwei SA Proteine, SA1 und SA2, nachgewiesen werden, die in zwei verschiedenen Cohesinkomplexen vorkommen und auch unterschiedliche Spezifizierungen aufweisen (Losada *et al.*, 2000, Sumara *et al.*, 2000). SA1 hat zum Beispiel eine wichtige Funktion bei der Schwesterchromatidkohäsion an den Telomerregionen (Canudas *et al.*, 2007, Canudas und Smith, 2009). Ein weiteres Merkmal der Cohesinuntereinheiten Scc3/SA und Pds5 ist das Vorhandensein von *HEAT* (*Huntingtin*, *Elongation factor 3*, *A subunit of protein phosphatase 2A*, *TOR lipid kinase*)-Repeat-Motiven, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Neuwald und Hirano, 2000).

1.2.1 Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion

Für die Generierung einer stabilen Schwesterchromatidkohäsion müssen verschiedene Faktoren gegeben sein. Zum einen ist die ATPase-Aktivität der *head*-Domäne essentiell, da Mutationen in den entsprechenden Walker-Motiven, die zur Folge haben, dass ATP zwar gebunden wird, jedoch keine Hydrolyse mehr stattfinden kann, zu starken Beeinträchtigungen der Chromatinassoziation führen (Arumugam *et al.*, 2003, Arumugam *et al.*, 2006). Weiterhin wird die *hinge*-Domäne zwischen SMC1 und SMC3 für die Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion benötigt. Hinweise lassen darauf schließen, dass der Cohesinring an dieser Stelle geöffnet wird, um die DNA zu umschließen (Gruber *et al.*, 2006). Vorstellbar wäre aber auch, dass die *hinge*-Domäne den initialen Kontakt zwischen Cohesin und dem Chromatin vermittelt, so wie es bereits für die SMC-Proteine in *Bacillus subtilis* gezeigt wurde (Hirano und Hirano, 2006). Neben diesen Besonderheiten des Cohesins werden weitere Faktoren für die Assoziation von Cohesin mit dem Chromatin

benötigt. Einer der wichtigsten Proteinkomplexe hierfür ist der Cohesinladekomplex, bestehend aus Scc2 und Scc4 (Abb. 3). Dieser Komplex ist evolutionär konserviert (Ciosk *et al.*, 2000, Gillespie und Hirano, 2004, Seitan *et al.*, 2006) und ermöglicht die Beladung von Cohesin bereits vor der DNA-Replikation (in G1-Phase in *S. cerevisiae*, und in höheren Eukaryonten bereits in der Telophase von Mitose; Ciosk *et al.*, 2000). Cohesin weist eine Akkumulation am perizentromerischen Heterochromatin auf. Diese wird in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* und in humanen Zellen durch das Heterochromatinprotein Swi6/HP1 ermöglicht (Gartenberg, 2009). In der Bäckerhefe hingegen wird der Ctf19-Kinetochorkomplex benötigt, um den Scc2-Scc4-Komplex ans Zentromer zu rekrutieren (Eckert *et al.*, 2007, Fernius und Marston, 2009, Ng *et al.*, 2009). In anderen Modellsystemen, wie zum Beispiel dem *Xenopus laevis*-Eiextrakt, werden hierfür Faktoren des Pre-Replikationskomplexes verwendet (Gillespie und Hirano, 2004, Takahashi *et al.*, 2004).

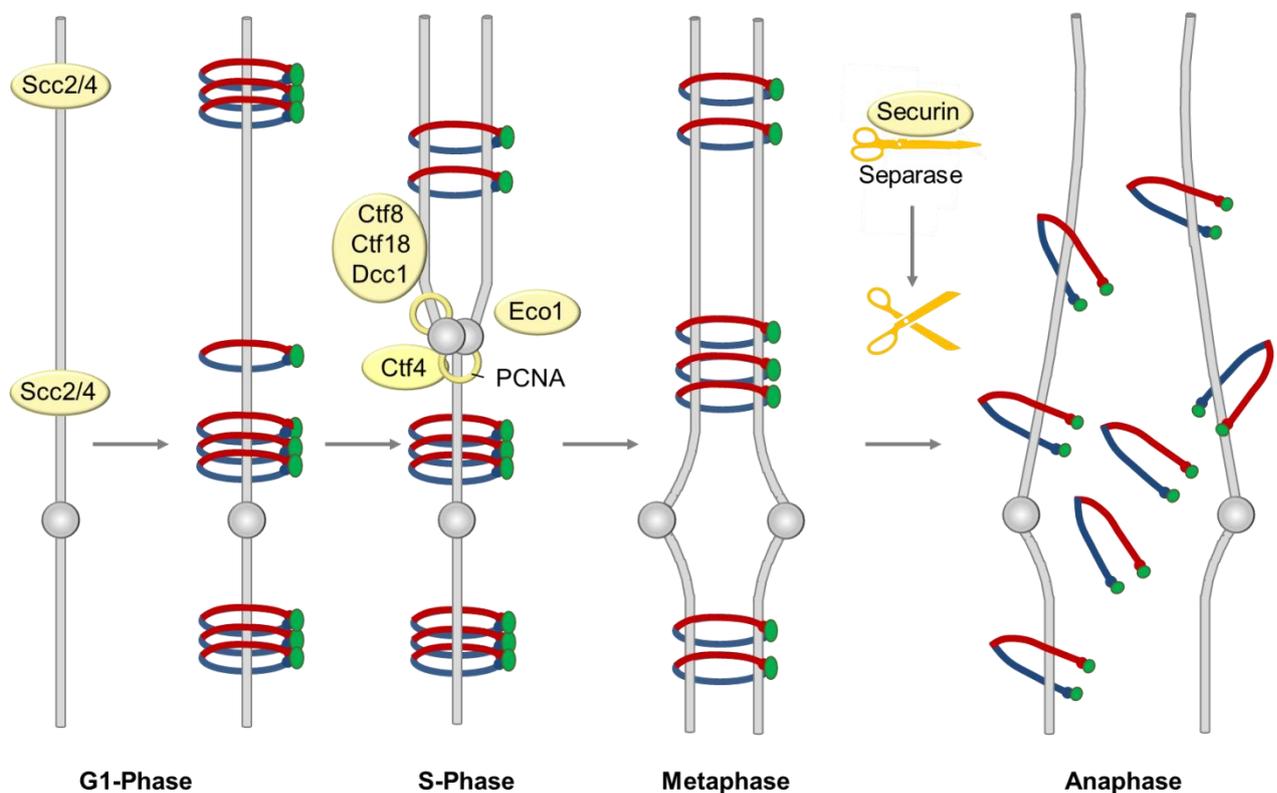


Abbildung 3: Mitotischer Cohesinzyklus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Der Scc2/Scc4-Proteinkomplex ist essentiell für die Beladung des Cohesins (ringförmiges Molekül in blau, rot und grün) an die DNA. Durch die Assoziation mit verschiedenen Proteinen, wie zum Beispiel der Acetyltransferase Eco1, dem RFC^{Ctf8/Ctf18/Dcc1}-Komplex, dem Polymerase-assoziierten Protein Ctf4 und dem Prozessivitätsfaktor PCNA kommt es in der S-Phase zur Etablierung der Kohäsion. In der Metaphase der Mitose wird durch die Assoziation der mitotischen Spindel an die Kinetochore und dem Entgegenwirken der Kohäsion eine Zugkraft auf die entsprechenden Schwesterchromatiden aufgebaut. Mit dem Übergang zur Anaphase wird Securin abgebaut, welches die Separase bis zu diesem Zeitpunkt in einem inaktiven Zustand gehalten hat. Die Aktivierung der Separase führt zur Spaltung der Cohesinuntereinheit Scc1 und zu Dissoziation des Cohesins vom Chromatin. Die Erstellung der Abbildung erfolgte ohne weitere Modifikationen nach der in Nasmyth und Haering, 2005 gezeigten Modellvorstellung zum Ablauf des mitotischen Cohesinkomplexes.

Die eigentliche Etablierung der Kohäsion findet zeitgleich mit der DNA-Replikation in der S-Phase statt (Uhlmann und Nasmyth, 1998). Für diesen Prozess wird die Acetyltransferase Eco1/Ctf7 benötigt (Abb. 3), welche SMC3 an den Lysinresten 112 und 113 (in der Bäckerhefe) acetyliert (Skibbens *et al.*, 1999, Toth *et al.*, 1999, Unal *et al.*, 2008, Rolef Ben-Shahar *et al.*, 2008). Wie genau diese Modifikation zur Etablierung der Kohäsion beiträgt, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. In ersten Untersuchungen ging man davon aus, dass diese Modifizierung zur Dissoziation von Wapl/Wpl1/Rad61 führt (Rowland *et al.*, 2009, Sutani *et al.*, 2009, Chan *et al.*, 2012). Dabei handelt es sich um ein Protein, das zur Destabilisierung der Kohäsion beiträgt und demnach auch als „Anti-Etablierungsfaktor“ für die Kohäsion bezeichnet wird (Rankin *et al.*, 2005, Lafont *et al.*, 2010, Nishiyama *et al.*, 2010). Neuere Studien gehen jedoch von keiner direkten Abhängigkeit zwischen der SMC3-Acetylierung und der Dissoziation von Wapl aus. Eher vorstellbar ist eine Regulation durch andere Eco1-Substrate, wie zum Beispiel Scc3, Pds5 oder Eco1 selbst (Guacci *et al.*, 2015). Darüber hinaus sind weitere Faktoren wie zum Beispiel der Replikations-Faktor C-Komplex (RFC) mit den Untereinheiten Ctf18, Ctf8 und Dcc1 wichtig für die Etablierung der Kohäsion (Hanna *et al.*, 2001, Mayer *et al.*, 2001, Kenna und Skibbens, 2003, Abb. 3) und verschiedene Komponenten der DNA-Replikationsgabel, wie zum Beispiel der DNA-Polymerase-Prozessivitätsfaktor PCNA (Skibbens *et al.*, 1999, Moldovan *et al.*, 2006). All diese Faktoren und Wirkmechanismen tragen zur korrekten Ausbildung der Kohäsion bei und sollte es mal zu Abweichungen kommen, hat dies meist dramatische Auswirkungen. So führen erbliche Defekte in Scc2 und Esco2 (eines der beiden humanen Eco1-Orthologe) zur Ausprägung des Cornelia de Lange-Syndroms (Strachan, 2005, Tonkin *et al.*, 2004) oder des Roberts-Syndroms (Schule *et al.*, 2005, Vega *et al.*, 2005). Beide Krankheiten sind durch Mikrozephalie, Gaumenspalten, Verformung der Gliedmaßen, schwere geistige Retardation und anderen Beeinträchtigungen gekennzeichnet.

1.2.2 Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Schwesterchromatidkohäsion

Da Cohesin als ein ringförmiger Komplex vorliegt, waren die ersten Überlegungen über die Wirkungsweise dahingehend, dass es die DNA topologisch umschließt und damit den Zusammenhalt der einzelnen Schwesterchromatiden ermöglicht (Gruber *et al.*, 2003, Haering *et al.*, 2002, Ivanov und Nasmyth, 2007). Der Nachweis dieses Wirkungsmechanismus erfolgte durch die artifizielle Spaltung von Scc1 und durch Nukleasebehandlung der DNA. Diese Prozesse hatten beide eine verminderte Assoziation von Cohesin mit der DNA zur Folge (Uhlmann *et al.*, 2000, Gruber *et al.*, 2003, Pauli *et al.*, 2008). Ausgehend von diesen Ergebnissen sind drei verschiedene Modelle vorstellbar. Beim einfachen Cohesinring-Modell (Abb. 4A) umschließt ein Cohesinring (Durchmesser 35 nm) beide Schwesterchromatiden (Haering *et al.*, 2002), die als gestreckte Chromatinfasern

jeweils einen Durchmesser von 10 nm aufweisen. Beim sogenannten *handcuff*-Modell (Handschellenmodell) hingegen müssen zwei Cohesinmoleküle miteinander interagieren um die Schwesterchromatidkohäsion auszubilden (Milutinovich und Koshland, 2003; Abb. 4B). Die Verknüpfung der beiden Cohesinringe erfolgt hierbei über Scc3. Ein Nachweis dieser Inter-Cohesinwechselwirkungen konnte jedoch nur mit Hilfe von Koimmunpräzipitationsexperimenten erbracht werden, wenn die hierfür benötigten Cohesinuntereinheiten deutlich über dem endogenen Level exprimiert wurden (Zhang *et al.*, 2008). Eine über Scc3 vermittelte Assoziation zweier Cohesinringkomplexe konnte mittels FRET (Mc Intyre *et al.*, 2007) bzw. durch Immunpräzipitationen von Proteinen, deren Expression unter physiologischen Bedingungen erfolgte (Haering *et al.*, 2002), nicht erbracht werden. Somit ist fraglich, ob diese Inter-Cohesinwechselwirkungen in der Zelle unter physiologischen Bedingungen stattfinden. Ein weiteres Modell ist das *bracelet*-Modell (Kettenmodell), bei dem es zur Scc1-abhängigen Oligomerisierung der einzelnen Cohesinmoleküle kommt, die dann als Filament um die Schwesterchromatide angeordnet sind (Abb. 4C; Huang *et al.*, 2005, Nasmyth und Schleiffer, 2004). Ob diese Strukturen unter physiologischen Bedingungen in der Zelle ausgebildet werden können, ist jedoch bislang völlig unklar.

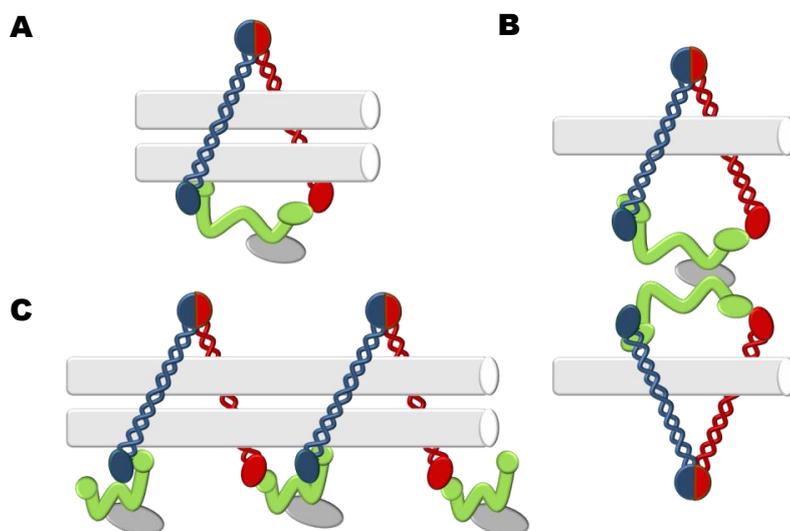


Abbildung 4: Modellvorstellungen der Schwesterchromatidkohäsion. (A) Einfaches Cohesinringmodell, bei dem ein Cohesinmolekül die beiden Schwesterchromatiden topologisch umschließt. (B) Das *handcuff*-Modell (Handschellenmodell). Durch die Scc3-abhängige Interaktion zweier Cohesinmoleküle wird die Schwesterchromatidkohäsion ermöglicht. Jedes Chromatid wird dabei von einem Cohesinring umschlossen. (C) Das *bracelet*-Modell (Kettenmodell). Die Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion erfolgt hierbei durch eine Scc1-abhängige Oligomerisierung der Cohesinuntereinheiten. SMC3 ist dabei in blau gezeigt, SMC1 in rot, Scc1 in grün und Scc3 in dunkelgrau. Als hellgraue Zylinder sind die Nukleosomen-assoziierten Chromatinstränge dargestellt. Die Erstellung der Abbildung erfolgte mit Hilfe der in Huang *et al.*, 2005 diskutierten Modellvorstellungen zur Ausprägung der Schwesterchromatidkohäsion. Modifiziert wurde hierbei nur die farbliche Kodierung der Cohesinuntereinheiten bzw. die Scc1/SMC3-Bindestelle.

1.2.3 Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion

Die in der S-Phase etablierte Schwesterchromatidkohäsion muss bis zum Ende der Mitose gewährleistet werden und dann vollständig aufgelöst werden, da nur so eine gleichmäßige Verteilung des DNA-Gehalts auf die Tochterzellen stattfinden kann. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird das gesamte Cohesin beim Metaphase-Anaphase-Übergang durch Proteolyse der α -Kleisinuntereinheit vom Chromatin entfernt und die Schwesterchromatidkohäsion aufgelöst (Michaelis *et al.*, 1997, Uhlmann *et al.*, 1999; Abb. 3). In Metazoen hingegen erfolgt die Dissoziation des Cohesins in zwei Phasen (Losada *et al.*, 1998, Sumara *et al.*, 2000, Waizenegger *et al.*, 2000). Der Großteil der an den Chromosomenarmen befindlichen Cohesinmoleküle dissoziiert bereits in der der Prophase ab, wohingegen die Zentromer-assoziierte Fraktion bis zum Übergang von Metaphase zur Anaphase am Chromatin verbleibt. Die vollständige Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion erfolgt dann durch eine Separase-abhängige Spaltung der α -Kleisinuntereinheit Scc1 (Hauf *et al.*, 2001, Uhlmann *et al.*, 1999, Uhlmann *et al.*, 2000, Waizenegger *et al.*, 2000). Der Prozess der Cohesinablösung zu Beginn der Mitose wird als Prophase-Weg (Abb. 5) bezeichnet und erfolgt durch ein nicht-proteolytisches Öffnen des Cohesinrings zwischen Scc1 und SMC3 (Sumara *et al.*, 2000, Buheitel und Stemmann, 2013, Eichinger *et al.*, 2013). Darüber hinaus erfordert der Prophase-Weg die Phosphorylierung von Sororin und Scc3/SA sowie die Wirkung des Anti-Etablierungsfaktors Wapl (Dreier *et al.*, 2011, Nishiyama *et al.*, 2013, Hauf *et al.*, 2005, Sumara *et al.*, 2002, Gandhi *et al.*, 2006). Sororin, welches als Wapl-Antagonist wirkt, ist über die Bindung mit Pds5 mit dem Cohesinkomplex assoziiert und trägt so zur Aufrechterhaltung der mitotischen Kohäsion bei (Rankin *et al.*, 2005 Nishiyama *et al.*, 2010). In der S-Phase führt die Eco1-abhängige Acetylierung von SMC3 zur Bindung von Sororin und inhibiert damit die Interaktion zwischen dem N-Terminus von Wapl und Pds5 (Lafont *et al.*, 2010, Nishiyama *et al.*, 2010). Durch die C-terminale Assoziation von Wapl mit dem Cohesinkomplex wird eine stabile Kohäsion der Schwesterchromatiden ermöglicht (Abb. 5, links). In der Prophase der Mitose kommt es zur Cdk1-abhängigen Phosphorylierung von Sororin, welche die Bindung des N-Terminus von Wapl mit Pds5 fördert und stabilisiert (Nishiyama *et al.*, 2010, Dreier *et al.*, 2011, Rankin *et al.*, 2005). Die Plk1-vermittelte Phosphorylierung von SA1/SA2 ermöglicht dann die Dissoziation des Cohesinrings von den Chromosomenarmen (Hauf *et al.*, 2005). Das zentromerische Cohesin wird hingegen durch das Protein Shugoshin 1 (Sgo1) vor der Dissoziation im Verlauf der Prophase geschützt. Sgo1 rekrutiert die Proteinphosphatase 2A (PP2A) an diese Region, die dann eine konstante Dephosphorylierung von Sororin am Zentromer bewirkt. Dieser hypophosphorylierte Zustand führt zur stabilen Bindung von Sororin an Pds5 und verhindert damit die Bindung von Wapl (Liu *et al.*, 2013 Abb. 5 rechts, Nummer 1). Darüber hinaus kompetiert Sgo1 auch mit Wapl um die Bindung an SA2-Scc1

(Hara *et al.*, 2014; Abb. 5 rechts, Nummer 2), sodass die Bindung von Wapl an die zentromerische Region und eine damit einhergehende Dissoziation von Cohesin durch zwei Mechanismen verhindert wird (Abb. 5, rechts).

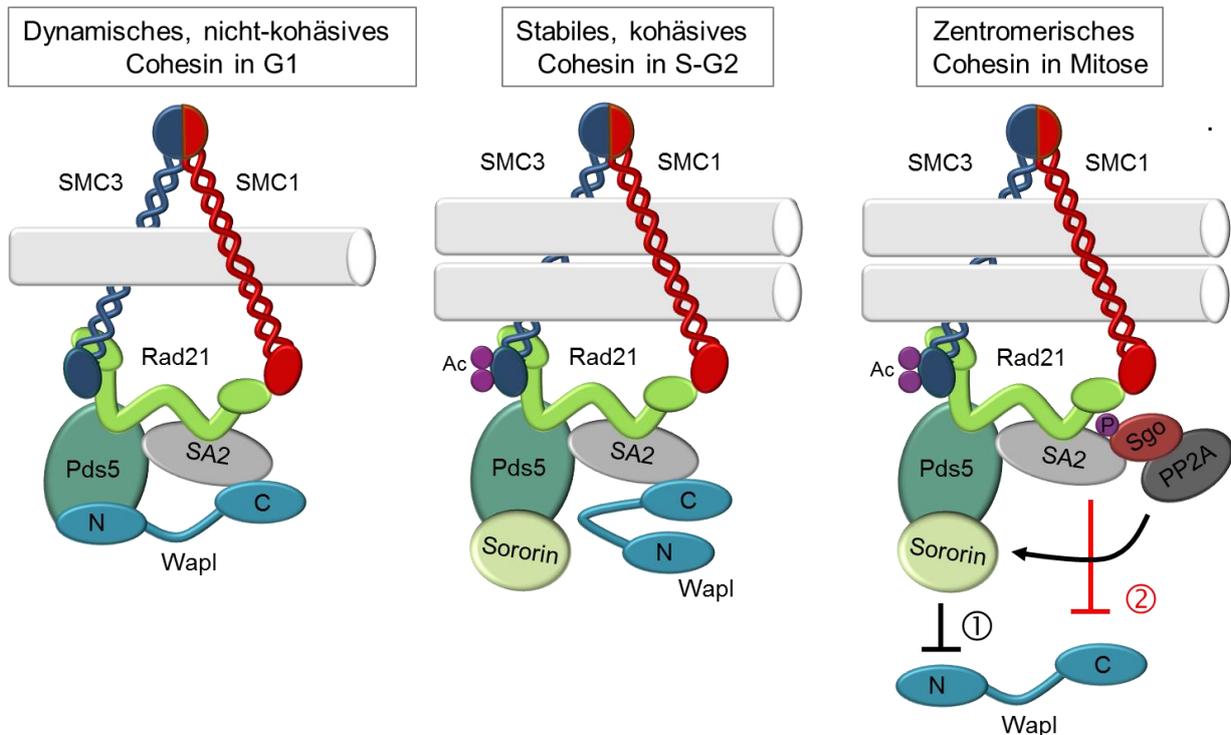


Abbildung 5: Der Cohesinkomplex und die Regulation während des Prophase-Wegs. In der G1-Phase vorhandenes nicht-kohäsives Cohesin (links). Kohäsives Cohesin in der S- bzw. G2-Phase sowie an den Chromosomenarmen in Mitose (Mitte). Durch die Eco1-abhängige Phosphorylierung von SMC3 (Ac=Acetyl-Gruppen) kommt es zur stabilen Assoziation von Sororin mit Pds5, die dann den N-Terminus von Wapl verdrängt. Beim zentromerischen Cohesin (rechts) bindet Sgo1 phosphorylierungsabhängig an Cohesin und schützt die zentromerische Kohäsion durch Dephosphorylierung von Sororin (1) und inhibiert die Bindung von Wapl an SA2-Sccl (2). Die Erstellung der Abbildung erfolgte mit Hilfe der in Hara *et al.*, 2014 diskutierten Modellvorstellungen zur Regulation des Prophase-Wegs. Modifiziert wurde hierbei die farbliche Kodierung der Cohesinuntereinheiten bzw. die Sccl/SMC3-Bindestelle.

Anders als bei höheren Eukaryonten, findet in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* kein Prophase-Weg statt. Hier wird das gesamte Cohesin beim Metaphase-Anaphase-Übergang durch die Spaltung der α -Kleisinuntereinheit Sccl vom Chromatin entfernt und die Schwesterchromatidkohäsion aufgelöst (Michaelis *et al.*, 1997, Uhlmann *et al.*, 1999, Abb. 3). In höheren Organismen hingegen erfolgt nur die Dissoziation der zentromerischen Cohesinfraktion durch einen Proteolyse-abhängigen Prozess. Bis zum Übergang von Metaphase zur Anaphase wird die Endopeptidase Separase durch den inhibitorischen Cofaktor Securin in einem inaktiven Zustand gehalten (Uhlmann *et al.*, 2000, Yamamoto *et al.*, 1996, Zou *et al.*, 1999). Dieser wird dann in einem Ubiquitin/Proteasom-abhängigen Prozess abgebaut (Cohen-Fix *et al.*, 1996, Ciosk *et al.*, 1998)

Die Initiation dieses Securin-Abbauprozesses erfolgt durch die Aktivierung des *anaphase-promoting Complex/Cyclosome* (APC/C), welcher eine Ubiquitin-E3-Ligase darstellt, die eine Vielzahl an mitotischen Proteinen für den proteasomalen Abbau vorbereitet (Übersicht in Peters, 1999). Als Erkennungssequenz für die Separase wurde das Aminosäuremotiv E(D)XXR nachgewiesen (Uhlmann *et al.*, 1999). Da dieses Motiv in fast allen Proteinen vorkommt, muss es noch andere Faktoren geben, die für die Separase-abhängige Spaltung benötigt werden, da bisher nur einige, wenige Separase-Substrate beschrieben wurden, darunter die Cohesinuntereinheiten Scc1/Rad21 und Rec8 (Uhlmann *et al.*, 1999; Petronczki *et al.*, 2003), Slk19 (Sullivan *et al.*, 2001) und Pericentrin (Matsuo *et al.*, 2012; Lee und Rhee, 2012). Weiterhin kommt es zur Erhöhung der Spalteffizienz von Scc1, wenn zuvor in räumlicher Nähe zur Separaseerkenntnissequenz eine Plk1 (*polo like kinase*)-abhängige Phosphorylierung an Scc1 stattgefunden hat (Alexandru *et al.*, 2001).

Ein weiterer Mechanismus zur Regulation von Separase beruht auf der phosphorylierungsabhängigen Assoziation des CyclinB1/Cdk1-Komplexes mit Separase (Stemmann *et al.*, 2001, Gorr *et al.*, 2005). Diese Interaktion führt dann genau wie die Assoziation mit Securin zur Inhibition von Separase. Beide Inhibitionsmechanismen schließen sich jedoch gegenseitig aus (Gorr *et al.*, 2005).

Die vollständige Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion zum Metaphase-Anaphase-Übergang muss genau reguliert sein. Denn eine frühzeitige Trennung der Schwesterchromatiden, zum Beispiel zu einem Zeitpunkt, wenn noch nicht alle Chromosomen vollständig und korrekt an die Spindel angeheftet sind, hätte die Entstehung von Aneuploidien und Chromosomenbrüchen zur Folge. Um dies zu verhindern, gibt es in der Zelle den sogenannten *spindle assembly checkpoint* (SAC), mit dessen Hilfe der Verlauf der Mitose gestoppt werden kann, bis alle Kinetochore bipolar mit den Mikrotubuli der Spindel assoziiert sind (Musacchio und Salmon, 2007). Als Signale für die Aktivierung des SACs dienen dabei Kinetochore ohne Mikrotubuli-Assoziation und fehlende oder falsch-ausgerichtete Spannungskräfte an den einzelnen Schwesterchromatiden. Diese Signale werden von dem SAC detektiert, welcher dann die APC/C-Aktivität inhibiert, sodass diese unter anderem nicht mehr für den Abbau von Securin zur Verfügung steht. Die Inhibition des APC/Cs erfolgt dabei durch einen Proteinkomplex bestehend aus den Proteinen Mad2, Bub3 und BubR1 (Sudakin *et al.*, 2001), welcher als Konsequenz von fehlerhaften Kinetochor/Mikrotubuli-Assoziationen den APC/C-Aktivator Cdc20 bindet und somit keine weitere Aktivierung des APC/C mehr möglich ist (Hwang *et al.*, 1998). Erst wenn alle Chromosomen korrekt an die mitotische Spindel angeheftet sind, kommt es zur Inaktivierung des SACs und damit einhergehend auch zur Aktivierung des APC/Cs, welcher dann die Degradation von Securin und anderer mitotischer Zielproteine initiiert und die Mitose abschließen kann (Clute und Pines, 1999, Musacchio und Salmon, 2007).

1.3 Schwesterchromatidkohäsion in Meiose

Die Meiose ist eine spezielle Form der Zellteilung, die eine wichtige Voraussetzung für die sexuelle Reproduktion darstellt. Dabei wird der DNA-Gehalt von Keimbahnzellen halbiert und es werden haploide Gameten gebildet. (Übersicht in Schwarzstein *et al.*, 2010, Sakuno und Watanabe, 2009, Abb. 6). Anders als bei der Mitose, kommt es bei der Meiose zu zwei aufeinanderfolgenden Chromosomensegregationsphasen (Meiose I und II), denen nur eine Runde der DNA-Replikation vorausgeht (in der prämeiotischen S-Phase). Der erste Teil der Chromosomensegregation wird auch als Reduktionsteilung bezeichnet und weist in der Prophase einige Besonderheiten auf, sodass diese Phase der Meiose noch weiter unterteilt wird. Im Leptotän, beginnen die Chromosomen langsam zu kondensieren und liegen noch vollkommen ungepaart vor. Die Initiation der meiotischen Rekombination erfolgt durch die Ausbildung sogenannter axialer Elemente, die aus zusammengelagerten Schwesterchromatidenpaaren bestehen. Im Zygotän, kommt es zur Paarung/Konjugation der Homologen, die auch als Synapsis bezeichnet wird. Diese wird dann im nächsten Stadium der Prophase I, dem Pachytän, vollständig abgeschlossen. Ausgehend von den axialen Elementen bildet sich in dieser Phase der Prophase der Synaptonemale Komplex (SC) aus, der als ein Proteingerüst fungiert, welches die Paarung und anschließende Rekombination der homologen Chromosomen ermöglicht (Fawcett, 1956, Moses, 1956). Die Initiation der homologen Rekombination erfolgt durch eine SPO11-abhängige Generierung von Doppelstrangbrüchen (Keeney *et al.*, 1997), die mit Hilfe von Rekombinationsereignissen der entsprechenden homologen Chromosomen repariert werden. Dabei entstehen verschiedene Intermediate, die unter anderem durch die Ausbildung sogenannter *crossover* wieder aufgelöst werden können. Im Diplotän kommt es dann zur Trennung der homologen Chromosomen, die an den rekombinierten Stellen über sogenannte Chiasmata noch miteinander verbunden sind. Parallel dazu beginnt im Diplotän die Disassemblierung des SCs. Abgeschlossen wird die Prophase I durch die Diakinese, bei der es zur vollständigen Kondensation der Chromosomen kommt und die Kernhülle sich auflöst. Im Verlauf der Meiose I orientieren sich die homologen Chromosomen zu den gegenüberliegenden Polen, wohingegen die Schwesterkinetochore an die Mikrotubuli eines Spindelpols geheftet werden und so zu einem Zellpol gezogen werden (Mono-Orientierung). Weiterhin muss gewährleistet sein, dass die Schwesterchromatidkohäsion schrittweise entfernt wird. In der Anaphase der Meiose I wird nur das Cohesin an den Chromosomenarmen entfernt, während die perizentromerische Kohäsion erhalten bleibt (Watanabe, 2004, Abb.6). Dies ist notwendig um die Chiasmata gegen die Chromosomenende zu verschieben, was man auch als Terminalisierung der Chiasmata bezeichnet. All diese Faktoren müssen gegeben sein, damit in Meiose I lediglich die homologen Chromosomen getrennt werden und die Schwesterchromatiden zusammenbleiben. Erst in Meiose II werden diese dann getrennt. Dieser

Prozess wird auch als Äquationsteilung bezeichnet und ist ähnlich zur bereits beschriebenen Mitose, da sich nun die Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten Polen orientieren (Bi-Orientierung, Abb. 6).

1.3.1 Regulation der meiotischen Kohäsion

Eine wichtige Voraussetzung für den korrekten Ablauf der Meiose ist das Entfernen der Armkohäsion in Meiose I, wohingegen die zentromerische Cohesinfraktion bis zum Erreichen von Anaphase II erhalten bleibt (Watanabe, 2004, Abb.6). In beiden meiotischen Teilungen erfolgt die Dissoziation des Cohesinkomplexes Separase-abhängig. Durch eine kontrollierte APC/C-abhängige Ubiquitinierung von Securin (und Cyclin B) kommt es zur Degradation der beiden Proteine, was die Aktivierung der Separase zur Folge hat (Buonomo *et al.*, 2000, Kitajima *et al.*, 2003, Kudo *et al.*, 2006). Die Protease spaltet dann analog zur Mitose die α -Kleisinuntereinheit des Cohesinrings, was zu dessen Dissoziation führt. In der Meiose ist die regulatorische Cohesinuntereinheit Scc1/Rad21 durch die Meiose-spezifische Untereinheit Rec8 ersetzt (Klein *et al.*, 1999, Parisi *et al.*, 1999, Watanabe und Nurse, 1999, Pasierbek *et al.*, 2001, Eijpe *et al.*, 2003). Da die Dissoziation des Cohesins in beiden meiotischen Teilungen Separase-abhängig stattfindet, muss gewährleistet werden, dass das zentromerische Cohesin im Verlauf von Meiose I vor der Proteolyse geschützt wird (Kitajima *et al.*, 2004). Dies erfolgt durch die Rekrutierung eines Proteinkomplexes bestehend aus Sgo/MEI-S332 und PP2A (Kitajima *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2009, Abb. 6). In der Bäckerhefe und in *Drosophila melanogaster* gibt es jeweils nur eine Sgo-Variante (Sgo1/MEI-S332), welche für die Aufrechterhaltung der zentromerischen Kohäsion verantwortlich ist (Kerrebrock *et al.*, 1995, Kitajima *et al.*, 2004), wohingegen in anderen Organismen, wie zum Beispiel in der Spaltheife, in Pflanzen und bei Säugetieren zwei Sgo-Varianten vorkommen (Sgo1 und Sgo2). Dabei schützt in der Spaltheife und in Pflanzen Sgo1 die zentromerische Cohesinfraktion während der ersten meiotischen Teilung vor der Separase-abhängigen Degradation (Kitajima *et al.*, 2004, Hamant *et al.*, 2005) und bei den Säugetieren übernimmt Sgo2 vorrangig diese Aufgabe (Lee *et al.*, 2008, Llano *et al.*, 2008). Die zentromerische Rekrutierung von Sgo/PP2A wird unter anderem durch eine Bub1-vermittelte Phosphorylierung des Histons H2A bewerkstelligt (Bernard *et al.*, 2001, Kitajima *et al.*, 2005, Riedel *et al.*, 2006, Kawashima *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurden in verschiedenen Organismen noch weitere Mechanismen zur Regulation der Sgo-Lokalisation beschrieben. In *Drosophila melanogaster* zum Beispiel hat das Fehlen von Komponenten des *chromosomal passenger*-Komplexes (CPC) einen Einfluss auf die zentromerische Lokalisation von MEI-S332 (Resnick *et al.*, 2006), wohingegen entsprechende Deletionen in der Bäckerhefe kaum eine Beeinträchtigung der Sgo-Lokalisation zur Folge haben (Yu und Koshland, 2007).

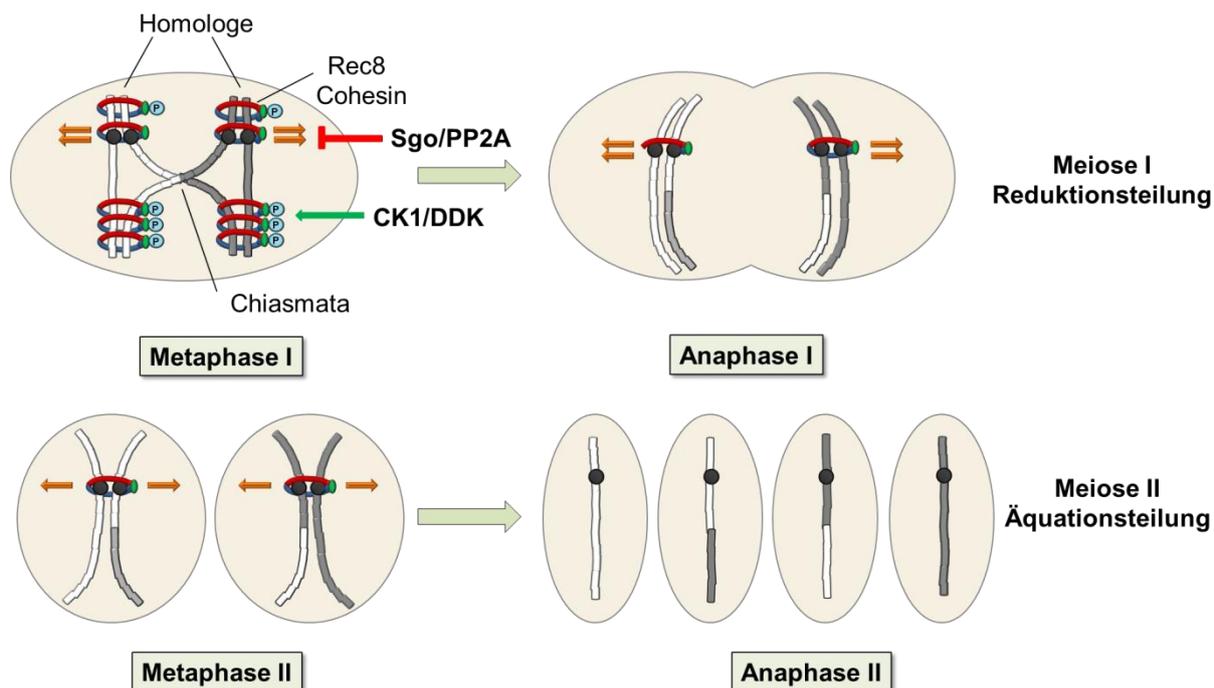


Abbildung 6: Chromosomensegregation in Meiose. Der Meiose-spezifische Cohesinkomplex wird durch CK1/DDK an der α -Kleinsubeinheit Rec8 phosphoryliert (hellblau). Diese Phosphorylierung erhöht die Spezifität des Separase-abhängigen Abbaus in Anaphase I. In der Prophase von Meiose I finden außerdem noch Rekombinationsereignisse statt, die zur Ausbildung von Chiasmata führen. Die Schwesterkinetochore eines homologen Chromosomenpaares werden von Mikrotubuli eines Spindelpols angeheftet und so im Verlauf von Meiose I zu einem Zellpol gezogen (orange Pfeile). Die zentromerische Kohäsion wird dabei durch die Sgo/MEI-S332-abhängige Rekrutierung der Phosphatase PP2A geschützt. Erst in Meiose II kommt es zur vollständigen Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion, sodass vier haploide Gameten ausgebildet werden. Die Generierung der Abbildung erfolgte mit Hilfe der in Sakuno und Watanabe, 2009 gezeigten Modellvorstellungen zur Chromosomensegregation in Meiose. Modifiziert wurde hierbei die farbliche Kodierung der Cohesinuntereinheiten bzw. wurde die phosphorylierungsabhängige Regulation der Cohesin-dissoziation eingefügt.

Die Effektivität der Separase-abhängigen Spaltung wird durch eine zuvor stattfindende Phosphorylierung von Rec8 deutlich gesteigert (Brar *et al.*, 2006). Dem entgegen wirkt die Sgo/MEI-S332-abhängige Rekrutierung der Phosphatase PP2A ans Zentromer. PP2A dephosphoryliert die meiotische Cohesinuntereinheit Rec8 (Abb. 6), wodurch die Effektivität der Separase-abhängigen Spaltung an den Zentromeren vermindert wird, was zur Stabilisierung dieser Cohesinfraktion führt. Die Phosphorylierung von Rec8 an den Chromosomenarmen wird durch zwei Kinasen vermittelt. Die Casein Kinase 1 δ/ϵ (CK1) und die Dbf4-abhängige Cdc7-Kinase (DDK, Abb. 6) sind ab dem Beginn der Prophase mit Rec8 assoziiert. Die Inhibition beider Kinasen führt zur deutlichen Reduktion des Phosphorylierungsgrads von Rec8 und damit einhergehend zur Inhibition der Rec8-Spaltung (Katis *et al.*, 2010). Die Auflösung der zentromerischen Kohäsion in Meiose II erfolgt ebenfalls durch eine Separase-abhängige Spaltung der α -Kleinsubeinheit. Hierzu muss die schützende Funktion von Sgo aufgehoben werden. Ein möglicher Mechanismus wäre

hierbei durch eine Relokalisation von Sgo (Gomez *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2008). Durch die Bi-Orientierung der Schwesterchromatiden wird eine Zugspannung auf die Kinetochore ausgeübt, die dann zur räumlichen Trennung von Rec8 und Sgo/PP2A führt, die zur Folge hat, dass keine Dephosphorylierung mehr an der meiotischen Cohesinuntereinheit stattfindet und es somit als Separase-Substrat zur Verfügung steht. Die Spaltung der perizentromerischen Cohesinfraktion in Meiose II führt dann zur vollständigen Auflösung der verbleibenden Kohäsion.

1.3.2 Meiotische Cohesinuntereinheiten

Neben der bereits beschriebenen α -Kleisinuntereinheit Rec8 gibt es in verschiedenen Organismen noch weitere Meiose-spezifische Cohesinuntereinheiten bzw. Cohesin-assoziierte Proteine, die für den korrekten Ablauf der Meiose essentielle Funktionen erfüllen (Prieto *et al.*, 2001, Revenkova *et al.*, 2004, Severson *et al.*, 2009, Herran *et al.*, 2011, Ishiguro *et al.*, 2011, Lee und Hirano, 2011). STAG3/SA3 fungiert dabei als ein Meiose-spezifisches SA-Protein, was neben der Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion auch essentiell für die Zusammenlagerung (Clusterbildung) des perizentromerischen Heterochromatins ist, welches eine Voraussetzung für die Paarung und Synapsis der homologen Chromosomen ist (Hopkins *et al.*, 2014). Initial wurde STAG3 als ein Spermatozyten-spezifisches Protein beschrieben, was in der Prophase von Meiose I mit dem SC assoziiert ist (Pezzi *et al.*, 2000). Nach Beendigung der meiotischen Rekombination, kommt es zur Disassemblierung des SCs und damit verbunden auch zur Dissoziation von STAG3. Beim Übergang von Metaphase I zur Anaphase I bleibt nur noch eine Zentromer-assoziierte Fraktion von STAG3 am Chromatin, die dann im Verlauf der Meiose II ebenfalls von den Chromosomen dissoziiert (Page *et al.*, 2006, Garcia-Cruz *et al.*, 2010). *Stag3*-mutante Mäuse sind steril, da das Fehlen dieser regulatorischen Cohesinuntereinheit die Stabilität des meiotischen Cohesins beeinträchtigt, was zum Zellzyklusarrest im Zygotän führt (Hopkins *et al.*, 2014).

Neben dieser Meiose-spezifischen Cohesinuntereinheit, weisen die Meiozyten (meiotischen Zellen) von Säugetieren noch weitere Besonderheiten auf. So ist eine weitere SMC1-Version, SMC1 β (Revenkova *et al.*, 2001), beschrieben worden und neben Rec8 und Rad21 noch ein weiteres α -Kleisin-Protein (Rad21L (Rad21-*like*); Ishiguro *et al.*, 2011, Lee und Hirano, 2011). Kombiniert man nun alle Cohesinuntereinheiten, SMC1 α/β , SMC3, die Kleisine Rad21, Rad21L und Rec8 und die regulatorischen Untereinheiten SA1/SA2/SA3 könnten insgesamt 18 verschiedene Cohesinkomplexe ausgebildet werden (Jessberger, 2011), von denen jedoch nur eine handvoll unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen wurden. So findet man Rad21L nur im Komplex mit SMC3, STAG3 und SMC1 α bzw. SMC1 β (Lee und Hirano, 2011, Gutierrez-Caballero *et al.*, 2011, Llano *et al.*,

2012). Es lokalisiert entlang des axialen Elements und wird für die Aufrechterhaltung des SCs benötigt (Herran *et al.*, 2011, Llano *et al.*, 2012). Außerdem ist Rad21L essentiell für die Fertilität in männlichen Mäusen, wohingegen *rad21*-mutante Weibchen fertil sind, jedoch eine frühzeitige Alters-abhängige Sterilität aufweisen (Herran *et al.*, 2011). Ein weiteres Merkmal von *rad21*-mutanten Mäusen ist, dass die Chromosomenpaarung und Synapsis auch zwischen nicht-homologen Chromosomen stattfinden kann und dass es zu Fehlern bei der Reparatur von DSBs kommt (Herran *et al.*, 2011). Ähnliche Phänotypen sind auch nach Inaktivierung von *Smc1 β* zu finden. Das Fehlen dieser Untereinheit führt zur unvollständigen Synapsis und zur Beeinträchtigung der Schwesterchromatidkohäsion und zur verminderten Rekombinationsrate in Prophase I. Darüber hinaus weist SMC1 β eine spezifische Funktion bei der Aufrechterhaltung der Telomerstruktur auf (Adelfalk *et al.*, 2009). Fehlt diese Cohesinuntereinheit, kommt es unter anderem zur Ausbildung von Telomerbrücken zwischen dem SC, ringförmigen Chromosomen und intrachromosomalen Telomerwiederholungen (Adelfalk *et al.*, 2009).

Weitere meiotische Cohesinuntereinheiten sind auch in Invertebraten beschrieben worden. In dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* gibt es neben Rec8 und Rad21 noch zwei weitere funktionell redundante α -Kleisine, COH-3 und COH-4 (Severson *et al.*, 2009). Aufgrund der unterschiedlichen Phänotypen der entsprechenden Mutanten geht man davon aus, dass Rec8 und COH-3/4 verschiedene Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Kohäsion ausüben. In *rec8*-Mutanten wird der Zusammenhalt der Schwesterchromatiden durch eine COH-3/4-vermittelte Kohäsion bis zur Anaphase I gewährleistet und erst dann findet eine frühzeitige Segregation der Schwesterchromatiden zu den entsprechenden Zellpolen statt. In *coh-3/4*-Mutanten hingegen bleiben die Schwesterchromatiden miteinander assoziiert, wohingegen die homologen Chromosomen in Anaphase I zufällig verteilt werden (Severson *et al.*, 2009).

Darüber hinaus gibt es auch Organismen, die für den korrekten Ablauf der Meiose keine spezialisierten Cohesinuntereinheiten benötigen, wie es zum Beispiel in *Tetrahymena thermophila* der Fall ist. In diesem Protisten wurde nur ein α -Kleisinprotein beschrieben, welches sowohl in Mitose als auch in Meiose für die Aufrechterhaltung der Kohäsion benötigt wird (Howard-Till *et al.*, 2013). Darauf aufbauend stellt sich die Frage, warum es in anderen Organismen weitere Untereinheiten gibt, wenn zum Beispiel in *S. cerevisiae* Rec8 die meisten mitotischen Cohesinfunktionen übernehmen kann (Buonomo *et al.*, 2000, Kitajima *et al.*, 2004). Eine klare Antwort auf diese Frage gibt es nicht. Man weiß jedoch, dass Scc1/Rad21 DSB-abhängig Kohäsion vermitteln kann, wohingegen Rec8 dazu nicht in der Lage ist (Heidinger-Pauli *et al.*, 2008). Weiterhin sind für die mitotische Cohesinuntereinheit Scc1 auch noch Funktionen bei der Genregulation beschrieben worden, die für die entsprechenden meiotischen Äquivalente nicht gezeigt werden konnten (Übersicht in

Nasmyth und Haering, 2009, Dorsett und Strom, 2012). Somit haben sich im Laufe der Evolution spezialisierte Cohesinkomplexe ausgebildet, die neben der mitotischen Kohäsion noch weitere Funktionen ausüben, die in *Tetrahymena* vermutlich eher eine untergeordnete Rolle spielen.

1.4 Meiose in *Drosophila melanogaster*

Vor rund 100 Jahren wurden die ersten Untersuchungen zum Ablauf der Meiose in *Drosophila melanogaster* durchgeführt (Bridges, 1916) und seitdem stetig ausgebaut. Meilensteine waren dabei die von Sandler *et al.*, 1968 und Baker und Carpenter, 1972 durchgeführten Screens zur Identifizierung Meiose-relevanter Proteine und die in den siebziger Jahren durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen des SCs sowie die ersten Beschreibungen der meiotischen Rekombination (Carpenter, 1975, 1979). Mit der Einführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und der Verwendung von konfokaler Mikroskopie konnten dann weitere Erkenntnisse über die Chromosomenpaarung, die Spindelassemblierung und den Verlauf der Meiose gewonnen werden (Dernburg *et al.*, 1996b, Theurkauf und Hawley, 1992). In den meisten Eukaryonten (und auch in *Drosophila* Weibchen) erfolgt die Segregation der Schwesterchromatiden in Meiose in einem rekombinationsabhängigen Prozess. Dabei kommt es mit Hilfe des SCs zur Paarung der homologen Chromosomen und zur Ausbildung von *crossovers* (Chiasmata), die ein Zusammenbleiben der homologen Chromosomen bis zur Anaphase I ermöglichen. In *Drosophila melanogaster* gibt es jedoch neben diesem Chiasmata-abhängigen Prozess noch einen weiteren achiasmatischen Weg zur korrekten Segregation der Schwesterchromatiden. Dieser tritt nur bei der Segregation des 4. Chromosoms und manchmal auch bei der Trennung des X-Chromosoms in der weiblichen Meiose auf, sowie bei allen Bivalenten in der männlichen Meiose (Hawley und Theurkauf, 1993, McKee, 1996). Darüber hinaus wird dieser auch noch als Hilfsmechanismus herangezogen, falls in den Weibchen das X-Chromosom oder die Autosomen keine Rekombination vollführen (Hawley und Theurkauf, 1993). Wie genau dieser Segregationsmechanismus abläuft, ist noch nicht vollständig geklärt. Man weiß jedoch, dass die Anlagerung der homologen Chromosomen durch Paarung heterochromatischer Regionen ermöglicht wird (Hawley und Theurkauf, 1993, Dernburg *et al.*, 1996b, Karpen *et al.*, 1996) und dass in der männlichen Meiose keine Synapsis, keine Chiasmata und auch kein SC ausgebildet werden, sondern ein sogenannter Homologen-Konjugations-Komplex diese Aufgabe übernimmt (McKee, 2004).

1.4.1 Besonderheiten der Spermatogenese in *Drosophila melanogaster*

Die Spermatogenese von *D. melanogaster* erfolgt in zwei paarweise im hinteren Teil des Abdomens befindlichen Hoden. Diese liegen als lange gewundene, schlauchförmige Gebilde vor, an deren apikalem Ende das Keimzentrum mit den Stammzellen zu finden ist. Distal davon werden die sogenannten Zysten ausgebildet, in denen die meiotischen Teilungen ablaufen. Im Inneren der Zyste befinden sich 16 miteinander verbundene Spermatogonien, die alle nachfolgenden Schritte synchron durchlaufen. Dies wird ermöglicht durch die Verknüpfung der einzelnen Spermatogonien über Ringkanäle, die sich durch eine unvollständige Zytokinese ausgebildet haben. Nach der prämeiotischen S-Phase schließt sich eine längere G2-Phase an, in der die für die spätere Spermatogenese benötigten RNAs und Proteine akkumulieren (Lindsley und Tokuyasu, 1980, Oliveri und Oliveri, 1965). Ein weiteres Merkmal dieser Phase ist der gepaarte Zustand der einzelnen Chromosomen, obwohl die DNA zu diesem Zeitpunkt dekondensiert vorliegt und auch sonst keine weiteren Merkmale einer konventionellen Prophase I der Meiose aufweist. Dieser Paarungszustand wird ermöglicht durch die Ausbildung sogenannter Chromosomenterritorien, wobei jede der Chromatinmassen einem der Bivalenten entspricht, die sich nahe der Kernhülle anlagern (Cooper, 1965). Die Ausbildung dieser Chromosomenterritorien dient als Grundlage für die achiasmatische Chromosomensegregation (Cooper, 1965). Als Paarungsregionen fungieren hierbei unter anderem die ribosomalen RNA-Gene auf den Geschlechtschromosomen (McKee, 1996). An diese Regionen binden zwei Proteine, SNM (*Stromalin in Meiosis*) und MNM (*Modifier of Mdg4 in Meiosis*), welche essentiell für die Paarung und Segregation des X-Y Paares in der männlichen Meiose sind (Thomas *et al.*, 2005). Da diese Proteine zeitgleich mit der Segregation der homologen Chromosomen vom Chromatin dissoziieren, wird angenommen, dass SNM und MNM die Funktionen der Chiasmata bei der Aufrechterhaltung der Chromosomenpaarung übernehmen (Tsai *et al.*, 2011). Bei den Autosomen hingegen sind bis jetzt keine spezifischen Paarungsregionen nachgewiesen worden, jedoch führt das Fehlen von *teflon* (*tef*) zu ungepaarten Autosomen, wohingegen die Geschlechtschromosomen eine intakte Konjugation aufweisen (Tomkiel *et al.*, 2001). Neben der Funktion von SNM und MNM bei der Assoziation der Geschlechtschromosomen sind diese Proteine auch noch essentiell bei der Aufrechterhaltung der Territorien. Das Fehlen von SNM und MNM führt zur Destabilisierung der einzelnen Territorien und zur Beeinträchtigung der Chromosomenpaarung (Thomas *et al.*, 2005). Es ist demnach anzunehmen, dass Tef spezifisch für die Paarung und Segregation der Autosomen ist und die Wirkungsweise von SNM und MNM universell auf alle vier Homologenpaare wirkt. Jedoch ist noch nicht klar, wie diese Proteine wirken. Vorstellbar wäre jedoch ein sogenannter Homologen-Konjugations-Komplex, bei dem alle drei Faktoren zusammen agieren und analog zum SC die homologen Chromosomen zusammenhalten und deren

bipolare Orientierung in Meiose I ermöglichen (McKee *et al.*, 2012). Nach der Kompaktierung der einzelnen Bivalenten in die Chromosomenterritorien schließen sich zwei meiotische Teilungen an, die dann zur Ausbildung einzelner Zysten mit jeweils 64 haploiden Spermatiden führen. Nach dem korrekten Ablaufen der beiden meiotischen Teilungen erfolgen verschiedene Differenzierungsschritte, die dazu führen, dass aus den runden Kernen der miteinander verknüpften Spermatiden lange nadelförmige DNA-Massen gebildet werden und die Ausbildung der Flagelle, sowie die Individualisierung der reifen Spermien stattfindet (Fuller, 1993).

1.4.2 Besonderheiten der Oogenese in *Drosophila melanogaster*

Jedes Ovar besteht aus 14 bis 16 Ovariolen, in denen eine unabhängige Eiproduktion stattfindet (King, 1970, Spradling, 1993). Aufgrund morphologischer Kriterien wird die Oogenese in 14 Entwicklungsstadien aufgeteilt. Stadium 1 beschreibt dabei den Bereich des Germariums, in dem die Oogenese beginnt und Stadium 14 das reife Ei (Lin und Spradling, 1993, Abb. 7A). Da im Germarium viele verschiedene Prozesse ablaufen, unterteilt man dieses noch einmal in vier Regionen (Abb. 7B). In Region 1 befinden sich Stammzellen, die sich asymmetrisch in eine Tochterstammzelle und einen Zystoblasten teilen. Nach vier weiteren Teilungen bildet sich daraus eine Zyste, bestehend aus 16 über Zytoplasmabrücken miteinander verbundenen Keimbahnzellen. Mehrere von diesen Zellen beginnen in Region 2A mit der Initiation der Meiose und der Assemblierung der Chromosomen *cores*, die durch Verkürzungen entlang der Längsachse eines jeden Schwesterchromatidenpaares etabliert werden und die Grundvoraussetzung für die Assemblierung des axialen und lateralen Elements des SCs bilden (Revenkova und Jessberger, 2006, Stack und Anderson, 2001). Die Region 2A ist neben der vollständigen Assemblierung des SCs auch noch durch die Ausbildung von DSBs gekennzeichnet und die Initiation der meiotischen Rekombination. Abgeschlossen wird diese dann in Region 2B (im mittleren Pachytän). Grundlage für die korrekte Paarung der homologen Chromosomen und die anschließende Rekombination ist der SC. Dieser besteht aus drei Teilen: Den lateralen Elementen, den transversalen Filamenten und einer zentralen Region, die das zentrale Element beinhaltet (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1999). Die transversalen Filamente verlaufen senkrecht zu den lateralen Elementen und verknüpfen diese in einer etwa 140 nm umfassenden Struktur (Collins *et al.*, 2014). Die Hauptkomponente des transversalen Filaments in *D. melanogaster* ist C(3)G (*crossover suppressor on 3 of Goben*; Page und Hawley, 2001, Abb. 7C), welches durch lange *coiled-coil*-Regionen gekennzeichnet ist, die sich zu parallelen Homodimeren zusammenlagern können. Die N-Termini zweier Dimere assoziieren miteinander und bilden tetramere Strukturen aus, wo die N-Termini mit dem zentralen Element kolokalisieren und die C-Termini mit dem lateralen Element interagieren (Anderson *et al.*, 2005). Das laterale

Element weist eine Kolokalisation mit den meiotischen Cohesinuntereinheiten auf und ist selbst durch eine Vielzahl an Proteinen charakterisiert, von denen man bis jetzt zwei genauer charakterisiert hat: C(2)M (*crossover suppressor on 2 of Manheim*; Manheim und McKim, 2003) und ORD (*Orientation disruptor*; Webber *et al.*, 2004, Abb. 7C). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von C(2)M an der Innenseite des lateralen Elements lokalisiert, wohingegen der C-Terminus nach außen orientiert ist (Anderson *et al.*, 2005; Abb. 7C). Es hat eine Funktion bei der initialen Assemblierung des SCs (Khetani und Bickel, 2007) und bei der Entscheidung, ob DSBs SC-abhängig repariert werden und ist somit für den normalen Ablauf der meiotischen Rekombination essentiell (Page und Hawley, 2004, Manheim und McKim, 2003).

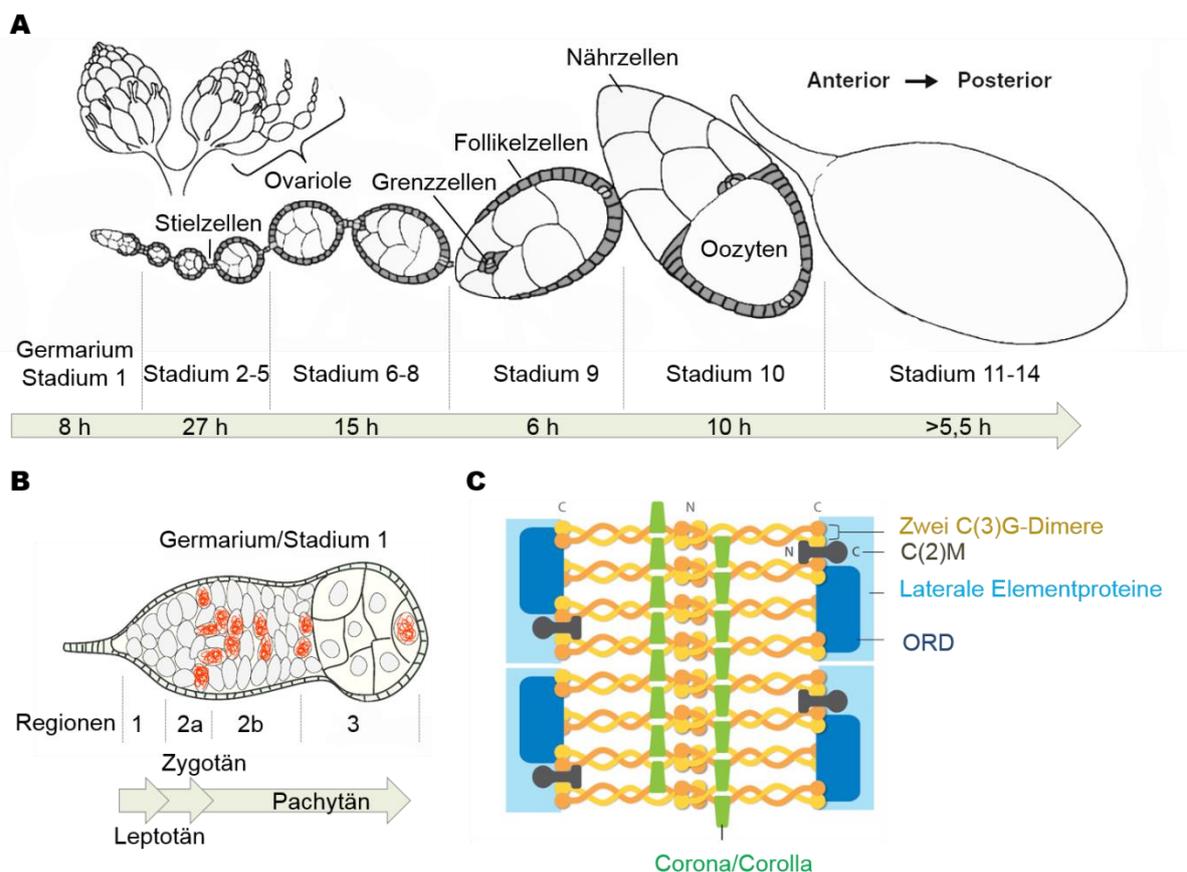


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Oogenese und des SCs in *Drosophila melanogaster*. (A) Gezeigt sind die Stadien der Oogenese beginnend mit dem Germarium (Stadium 1) bis zum Stadium 14. Die Follikelzellen und die Grenz- und Nährzellen sind dabei etwas dunkler dargestellt. Unten ist jeweils die Dauer der einzelnen Stadien bei 25°C angegeben (King, 1970). Entnommen aus He *et al.*, 2011. (B) Schematische Darstellung des Germariums/Stadium 1. Zellen, in denen der SC ausgebildet wird, sind in rot gezeichnet und die zugehörigen Stadien der Meiose sind im unteren Teil aufgeführt. Entnommen aus Takeo *et al.*, 2011. (C) Aufbau des SCs aus *D. melanogaster*. Die lateralen Elemente (blau) werden über die transversalen Filamente (gelb, orange C(3)G) mit dem zentralen Element (grün, Corona/Corolla) verbunden. Entnommen aus Lake und Hawley, 2012.

ORD hingegen wirkt als Suppressor für die Reparatur der DSBs durch die homologe Rekombination mit den entsprechenden Schwesterchromatiden (Webber *et al.*, 2004) und ist außerdem noch für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion und die normale Verteilung der Chromosomen essentiell (Bickel *et al.*, 1997, Webber *et al.*, 2004, Bickel *et al.*, 1996). Das zentrale Element dient als übergeordnete Struktur, bei der verschiedene Proteine mit stützender Funktion die einzelnen Schichten der zentralen Region zusammenhalten (Anderson *et al.*, 2005, Schmekel und Daneholt, 1995). In *Drosophila melanogaster* konnten bis jetzt zwei Proteine nachgewiesen werden, die in dieser Region lokalisieren und miteinander interagieren, Corona und Corolla (Page *et al.*, 2008, Lake und Hawley, 2012, Collins *et al.*, 2014; Abb. 7C). Beide Proteine sind essentiell für die Stabilisierung des SCs und damit verbunden auch für die korrekte Paarung und die meiotische Rekombination, die dann in Region 3 des Germariums vollständig abgeschlossen ist. Insgesamt benötigt das Durchlaufen des erstens Stadiums der Oogenese eine Dauer von ungefähr acht Stunden (Abb. 7A). Im weiteren Verlauf der Oogenese werden die Keimbahnzellen von somatischen Follikelzellen umwandert (Margolis und Spradling, 1995), was zur Ausbildung sogenannter Eikammern führt, die das Germarium weiter in posteriore Richtung durchwandern. Die so erzeugten Eikammern sind noch über spezialisierte Follikelzellen, den so genannten Stielzellen, an den Polen miteinander verbunden (Abb. 7A). In den frühen Eikammern (Stadium 2-5) bildet sich das Karyosom aus und die Polytänie des Nährzellenchromatins wird etabliert. Dieser Entwicklungsprozess benötigt insgesamt eine Dauer von 27 Stunden (Abb. 7A). Nach der Disassemblierung des SCs wird die Prophase I der Meiose beendet und die Oozyte geht in ein post-pachytänes Stadium über. Während dieses Stadiums produzieren die Nährzellen Dotterproteine, die Oozyte vergrößert sich und die Follikelzellen breiten sich weiter aus und beginnen mit der Produktion der Vitellinmembran und des Chorions. Anschließend kommt es zum Zusammenbruch der Kernhülle und zum Eintritt in die Prometaphase, die dann im letzten Stadium der Oogenese in einem Metaphase I-Arrest resultiert bis die Befruchtung der Oozyten stattgefunden hat. Die reifen Eier werden dann zum Eileiter transportiert und bis zur Eiablage im Uterus gelagert.

1.4.3 Kohäsive, meiotische Proteine in *Drosophila melanogaster*

Eine Grundvoraussetzung für die korrekte Chromosomensegregation während der Meiose ist, dass in der prämeiotischen S-Phase Kohäsion etabliert wird, die dann schrittweise im Verlauf der Meiose Separase-abhängig aufgehoben wird (Watanabe, 2004). In den meisten Organismen erfolgt dies durch Meiose-spezifische Cohesinkomplexe. In der prämeiotischen S-Phase wird die mitotische Kleisinuntereinheit Scc1/Rad21 gegen Rec8 ausgetauscht (Klein *et al.*, 1999, Watanabe und Nurse, 1999, Pasierbek *et al.*, 2001, Eijpe *et al.*, 2003,

Manheim und McKim, 2003, Cai *et al.*, 2003), welche dann bereits an kurzen Fragmenten des axialen Elements nachzuweisen ist, wohingegen die übrigen Cohesinuntereinheiten erst im Leptotän am axialen Element zu finden sind (Eijpe *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist Rec8 essentiell für die initiale Rekrutierung und Assemblierung des lateralen Elements (Klein *et al.*, 1999).

In *Drosophila melanogaster* hingegen konnten bis jetzt nur SMC1 und SMC3 an den Chromosomenarmen und an den Zentromeren von Meiozyten nachgewiesen werden (Khetani und Bickel, 2007). Der Nachweis von nicht-SMC-Untereinheiten konnte bis jetzt nicht erbracht werden. Weiterhin scheint es so, als ob im *Drosophila*-Genom kein Rec8-Ortholog zu finden ist. Jedoch wurde mit C(2)M ein weiteres α -Kleisinprotein gefunden, was mit SMC3 wechselwirkt und mit dem SC assoziiert ist (Schleiffer *et al.*, 2003, Heidmann *et al.*, 2004), sodass zunächst vorstellbar war, dass dieses Protein die Funktion eines meiotischen Kleisins übernimmt. C(2)M wird jedoch erst nach der prämeiotischen S-Phase ans Chromatin rekrutiert und dissoziiert bereits vor Metaphase I wieder ab (Heidmann *et al.*, 2004), zu einem Zeitpunkt, zu dem die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion noch gewährleistet sein sollte. Beim Durchlaufen der Meiose konnte darüber hinaus kein Separase-spezifisches Spaltprodukt von C(2)M nachgewiesen werden, jedoch eine deutliche Spaltung von THR (*three rows*). Dieses Protein fungiert in *Drosophila* als regulatorische Untereinheit der Separase und wird am Metaphase-Anaphase-Übergang Separase-abhängig gespalten (Herzig *et al.*, 2002, Heidmann *et al.*, 2004). Die Spaltung von THR in Meiose liefert demnach einen Hinweis darauf, dass in *Drosophila* Separase auch in Meiose aktiv ist und die entsprechende α -Kleisinuntereinheit des meiotischen Cohesinkomplexes spaltet, um so die Segregation der homologen Chromosomen und der Schwesterchromatiden zu ermöglichen. Eine weitere Voraussetzung eines meiotischen α -Kleisins ist daher das Vorhandensein einer Separaseerkennungsequenz. Neben der frühzeitigen Dissoziation von C(2)M, liefert die Tatsache, dass keine spezifischen Spaltprodukte von C(2)M nachgewiesen werden konnten und die Mutation mutmaßlicher Separase-Schnittstellen keinen Einfluss auf die Chromosomensegregation hat (Heidmann *et al.*, 2004), weitere Hinweise, dass C(2)M die funktionellen Anforderungen nicht erfüllt, um als meiotisches Rec8-Homolog in *Drosophila* angesehen zu werden.

Neben diesem Protein gibt es noch weitere Kandidaten, die die Funktion einer meiotischen Cohesinuntereinheit erfüllen könnten, jedoch aufgrund von Strukturvorhersagen keine Ähnlichkeiten zu anderen α -Kleisinproteinen aufweisen. ORD besitzt einige Eigenschaften, die dafür sprechen, dass dieses Protein als Cohesinuntereinheit fungieren könnte (Mason, 1976, Miyazaki und Orr-Weaver, 1992, Bickel *et al.*, 1996). Zum Beispiel führt das Fehlen von *ord* zur Aufhebung der meiotischen Kohäsion sowohl in Weibchen als auch in männlichen Fliegen (Bickel *et al.*, 1997). Darüber hinaus zeigt es eine Kollokalisierung

mit SMC1 und C(3)G in frühen Phasen der weiblichen Meiose, und in Männchen weist es eine zentromerische Akkumulation auf, die bis zum Erreichen der Anaphase II der Meiose bestehen bleibt und vom *Drosophila* Sgo Ortholog Mei-S332 abhängig ist (Balicky *et al.*, 2002, Khetani und Bickel, 2007). Neben dieser kohäsiven Funktion ist ORD auch noch ein essentieller Faktor für die homologe Rekombination und die stabile Assemblierung des SCs (Bickel *et al.*, 1997, Webber *et al.*, 2004). Mit einer Gesamtgröße von nur 479 Aminosäuren ist es aber im Vergleich zu anderen Kleisinproteinen relativ klein zum Verbrücken der *head*-Domänen der SMCs und bisher konnten auch keine Hinweise erbracht werden, die eine Separase-abhängige Spaltung nahelegen würden.

Ein funktionell ähnliches Protein ist SOLO (*Sisters on the Loose*), was mit 1031 Aminosäuren mehr als doppelt so groß ist wie ORD und damit aufgrund der Größe als Kleisinprotein eher vorstellbar wäre. *solo*-Mutanten zeichnen sich ebenfalls durch einen meiotischen Kohäsionsverlust in beiden Geschlechtern aus (Yan *et al.*, 2010, Yan und McKee, 2013). In Weibchen hat darüber hinaus das Fehlen von SOLO eine reduzierte Rekombinationsrate und eine erhöhte Instabilität des SCs zur Folge (Yan und McKee, 2013). In der Prophase der weiblichen Meiose zeigt SOLO eine Kolo-kalisation mit SMC1 und C(3)G und eine zentromerische Akkumulation, die in der männlichen Meiose ebenfalls zu verzeichnen ist und, genau wie bei ORD, Mei-S332 abhängig ist (Yan *et al.*, 2010). Weiterhin wiesen Koimmunpräzipitationsexperimente mit Proteinextrakten aus Ovarien darauf hin, dass SOLO mit SMC1 assoziiert ist und demnach viele Eigenschaften mitbringt, um als funktionelles Rec8-Homolog in Frage zu kommen.

In neueren Studien wurde noch ein weiteres kohäsives Protein beschrieben, SUNN (*Sister unbound*), was ebenfalls für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion benötigt wird und mit SMC1 und SOLO kolokalisiert (Krishnan *et al.*, 2014). Erste bioinformatische Analysen legen jedoch nahe, dass SUNN keine Homologien zu Kleisinproteinen besitzt, sondern entfernte Strukturähnlichkeiten zur akzessorischen Cohesinuntereinheit Scc3/SA aufweist, sodass es möglicherweise ähnlich wie STAG3 als Meiose-spezifische Cohesinuntereinheit fungieren könnte (Krishnan *et al.*, 2014).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits dargelegt wurde, gibt es in den verschiedenen Organismen spezifische Cohesinkomplexe, die für den korrekten Ablauf der Meiose benötigt werden (Prieto *et al.*, 2001, Revenkova *et al.*, 2004, Severson *et al.*, 2009, Herran *et al.*, 2011, Ishiguro *et al.*, 2011, Lee und Hirano, 2011). In *Drosophila* hingegen konnten bisher nur SMC1 und SMC3 am meiotischen Chromatin nachgewiesen werden (Khetani und Bickel, 2007) und Nipped-B, das Scc2-Ortholog der Fliege, welches an den Chromosomenarmen zu finden ist, jedoch nicht am Zentromer lokalisiert ist (Gause *et al.*, 2008). Weiterhin scheint im *Drosophila*-

Genom kein Rec8-Ortholog vorhanden zu sein, sodass sich nun daran anknüpfend die Frage stellt, welches Protein die Funktion dieser regulatorischen Cohesinuntereinheit in der Meiose von *Drosophila melanogaster* übernimmt. Vorstellbare Kandidaten wären die mitotische Cohesinuntereinheit Rad21 oder SOLO, für welches bereits eine kohäsive Funktion und eine Assoziation mit SMC1 nachgewiesen werden konnte (Yan *et al.*, 2010, Yan und McKee, 2013). Ziel dieser Arbeit war es demnach zu untersuchen, inwiefern diese beiden Proteine möglicherweise Teil eines Meiose-spezifischen Cohesinkomplexes sind.

Hierzu sollten verschiedene Herangehensweisen verwendet werden. Im ersten Teil der Arbeit sollte durch eine Oogenese-spezifische Inaktivierung von Rad21 untersucht werden, ob es zu Abnormalitäten im Verlauf der Meiose kommt. Dabei sollte untersucht werden, inwiefern die Kohäsion durch das Fehlen der mitotischen Cohesinuntereinheit beeinträchtigt ist und ob dies eventuell einen Einfluss auf die Stabilität des SCs hat. Im zweiten Teil der Arbeit soll untersucht werden, inwiefern SOLO als Teil eines meiotischen Cohesinkomplexes fungiert und ob die bereits beschriebenen Kohäsionsdefekte nach Inaktivierung von SOLO darauf zurückzuführen sind, dass SOLO als funktionelles Rec8-Homolog wirkt.

2. Ergebnisse

Um weitere Erkenntnisse über den Aufbau und die Funktionsweise eines meiotischen Cohesinkomplexes in *Drosophila melanogaster* zu gewinnen, wurden zwei Proteine und deren Funktion in der weiblichen Meiose genauer untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde analysiert, inwiefern die mitotische Cohesinuntereinheit Rad21 eine Funktion während der meiotischen Kohäsion besitzt und welche Folgen die Oogenese-spezifische Inaktivierung dieses Proteins auf die Schwesterchromatidkohäsion und auf die Struktur des SC hat. Im zweiten Teil der Arbeit wurden Funktionsanalysen des Proteins SOLO durchgeführt, für das bereits kohäsive Funktionen während der Meiose bekannt sind (Yan *et al.*, 2010, Yan und McKee, 2013). Darauf aufbauend wurde die Funktion von SOLO im Kontext mit verschiedenen SC-Untereinheiten und Cohesinproteinen untersucht, um anschließend Rückschlüsse auf dessen Wirkungsweise zu ziehen.

2.1 Funktionsanalyse von Rad21 in der weiblichen Meiose

Um mögliche kohäsive Funktionen von Rad21 während der Oogenese zu untersuchen, musste zunächst eine Situation geschaffen werden, bei der es zu einer konditionellen Inaktivierung der Cohesinuntereinheit kommt. Da es sich bei Rad21 um ein essentielles Gen handelt, ist es nicht möglich hierfür mutante Allele heranzuziehen, da diese bereits zur embryonalen Letalität führen und somit keine Phänotypen in der Oogenese untersucht werden können. Um dennoch die Funktion der mitotischen Cohesinuntereinheit in der weiblichen Meiose zu analysieren, wurde ein von Pauli *et al.*, 2008 etabliertes System herangezogen. Grundlage dieses Systems ist eine Fliegenlinie, die als einzige Rad21-Quelle eine TEV-Protease-spaltbare Version der Kleisinuntereinheit enthält. Diese Version übernimmt alle Funktionen des endogenen Rad21, da die entsprechenden Fliegen eine normale Vitalität und Fertilität aufweisen (Pauli *et al.*, 2008). Die gezielte Inaktivierung von Rad21 erfolgte anschließend durch eine Oogenese-spezifische Expression von TEV-Protease und eine damit verbundene Spaltung von Rad21^{TEV}-10myc im *rad21*-mutanten Hintergrund. Demnach wird mit Hilfe dieses Systems eine Situation geschaffen, bei der es nur in der Oogenese zur Inaktivierung von Rad21 kommt. Im übrigen Organismus dagegen findet keine Spaltung statt und es ist eine normale Funktionalität des Rad21-Konstrukts gegeben. Zur Inaktivierung von Rad21 wurde das in Abb. 8A dargestellte Kreuzungsschema herangezogen. Die Expression der TEV-Protease erfolgte dabei unter Kontrolle des maternalen α Tubulin-Promotors (*mat-Gal4*), welcher einen Expressionsbeginn ab Stadium 4 bis 5 der Oogenese ermöglicht (Nagarkar, 2010). Zu diesem Zeitpunkt wurden bereits DSBs ausgebildet und meiotische Rekombinationsereignisse initiiert.

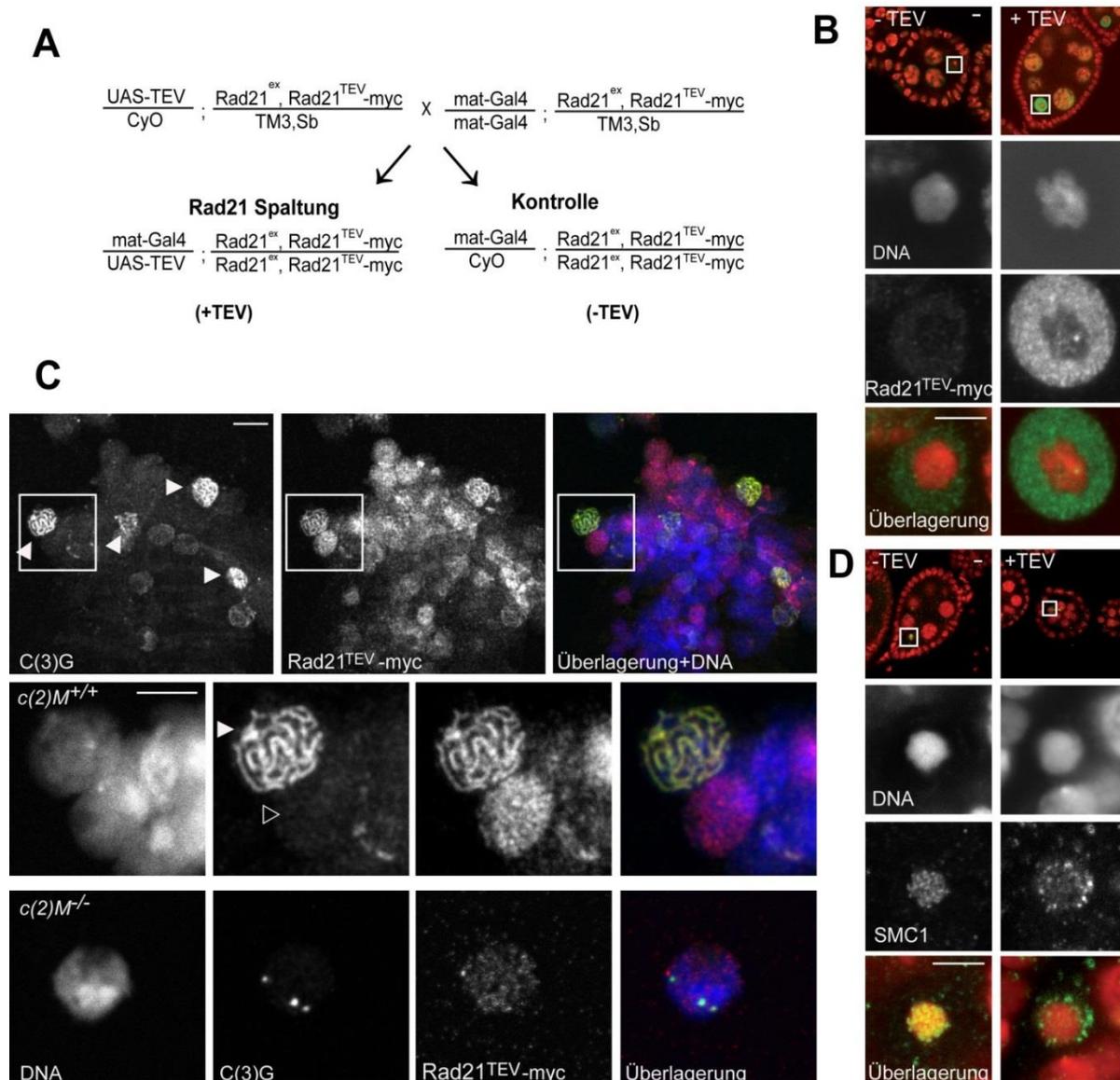


Abbildung 8: Oogenese-spezifische Spaltung von Rad21 führt zur Cohesin-Dissoziation vom meiotischen Chromatin. (A) Kreuzungsschema zur Generierung von Fliegen, bei denen es zur Oogenese-spezifischen Spaltung von Rad21 kommt (+TEV) und von Kontrollindividuen (-TEV). Die Expression von Rad21^{TEV}-10myc erfolgt im mutanten Hintergrund (*Rad21^{ex}*). (B) Immunfluoreszenzanalysen von Eikammern des Stadiums 4-5 von *rad21*-mutanten Fliegen (+TEV) und Kontrollindividuen (-TEV). Der Nachweis von Rad21^{TEV}-myc erfolgte mit anti-myc-Antikörpern. In den Überlagerungen ist die DNA in rot und anti-myc in grün gezeigt. (C) Chromosomenspreads von Germarien. Einige Kerne zeigen SC-typische C(3)G-Färbungen (weiße Dreiecke). Mit einem leeren Dreieck markiert ist ein Pro-Nährzellkern, bei dem keine C(3)G-Färbung nachweisbar ist. Die DNA ist in blau gezeigt, anti-myc in rot und C(3)G in grün. (D) Immunfluoreszenzanalysen wie in (B) bereits beschrieben. In den Überlagerungen ist die DNA in rot und anti-SMC1 in grün gezeigt. Die in den Übersichtsaufnahmen eingerahmten Bereiche sind im rechten Teil der Abbildung (in B und D) bzw. im mittleren Teil der Abbildung C vergrößert dargestellt. Die Färbung der DNA erfolgte in allen Abbildungen mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258. Der Größenmaßstab beträgt 5 µm.

Neben den Individuen, bei denen es zur Spaltung von Rad21 kommt, entstand in dieser Kreuzung auch ein Genotyp, der in den Abb. 8A, 8B und 8D mit -TEV bezeichnet wurde, da es hier nicht zur Spaltung von Rad21 kommt. Darüber hinaus gab es noch weitere

Kombinationen, die entweder keine TEV-Protease-Expression aufwiesen oder aber durch Spaltung von Rad21 in Anwesenheit eines wildtypischen Allels gekennzeichnet waren (*mat-Gal4/UAS-TEV;Rad21^{ex},Rad21^{TEV}-myc/TM3,Sb*). Wie bereits in Nagarkar, 2010 gezeigt wurde, eignet sich dieses System zur effizienten Inaktivierung von Rad21, da die Spalteffizienz von Rad21^{TEV}-10myc nach mat-Gal4-gesteuerter Expression der TEV-Protease bei mehr als 95% lag. Es ist demnach von einer nahezu vollständigen Inaktivierung von Rad21 auszugehen.

2.1.1 Oogenese-spezifische Inaktivierung von Rad21 führt zur Dissoziation des Cohesins vom meiotischen Chromatin

Um mögliche Auswirkungen von Rad21 auf den Verlauf der Meiose zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen zur Lokalisation dieser mitotischen Cohesinuntereinheit durchgeführt. Hierzu wurden Ovarien präpariert und mit Hilfe von myc-spezifischen Immunfärbungen Rad21^{TEV}-10myc nachgewiesen. In Abwesenheit von TEV-Protease konnte lediglich ein schwaches ringförmiges Signal innerhalb des Nukleoplasmas beobachtet werden (Abb. 8B, -TEV). Nach TEV-Protease-Expression hingegen wird dieses Signal deutlich stärker, was vermutlich durch die Dissoziation der Spaltprodukte vom Chromatin und eine bessere Antikörper-Zugänglichkeit der Epitope verursacht wurde (Abb. 8B, +TEV). Durch die starke Kompaktierung des meiotischen Chromatins ist es möglich, dass das ungeschnittene Rad21 für Antikörper nicht zugänglich ist und erst die Spaltung und eine damit einhergehende Diffusion der entstandenen Produkte in das umgebende Nukleoplasma einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis ermöglichen. Um die Problematik der Antikörperzugänglichkeit zu minimieren, wurden Chromosomenspreads durchgeführt. Hierbei werden die Germarien und Eikammern in Einzelzellen dissoziiert und diese auf einem Objektträger immobilisiert, sodass die Zugänglichkeit der entsprechenden Antikörper deutlich erhöht wird. In der Abb. 8C (oberer Reihe) ist ein Ausschnitt der immobilisierten Kerne nach Generierung der Chromosomenspreads zu sehen und in der darunterliegenden Zeile eine Vergrößerung des ausgewählten Bereichs. Dabei zeigt die Vergrößerung besonders deutlich, dass Rad21 in den Pro-Oozyten mit dem SC kolokalisiert (Abb. 8C Mitte, weiße Dreiecke). Direkt neben dieser Pro-Oozyte ist eine C(3)G-negative Zelle zu sehen, bei der es sich um eine Pro-Nährzelle handelt, da hier keine fadenförmigen C(3)G-Signale des SCs nachweisbar sind, sondern lediglich eine diffuse Kernlokalisierung von Rad21^{TEV}-myc zu sehen ist (leeres Dreieck). Im *c(2)M*-mutanten Hintergrund kommt es zur Destabilisierung des SCs, was ebenfalls zum verminderten Rad21-Level entlang der Chromosomen cores führt (Abb. 8C, untere Reihe). Im Gegensatz zu den am Zentromer verbleibenden Signalen von C(3)G zeigt sich für Rad21 lediglich ein diffuses Signal, welches gleichmäßig über den gesamten Kern verteilt ist.

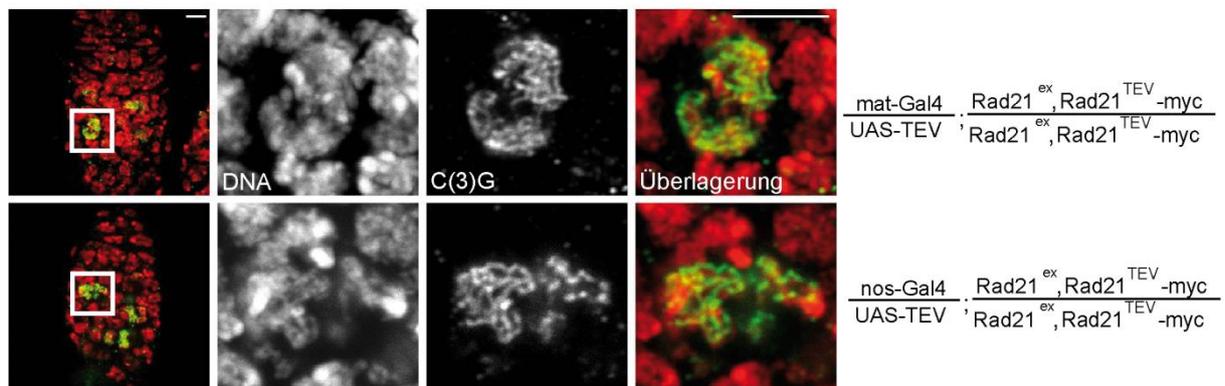
Zur Verifizierung der Beobachtungen wurden Chromosomen-spreads durchgeführt mit Ovarien aus Fliegen, die Rad21-EGFP exprimieren. Auch mit diesen Untersuchungen konnte eine Assoziation von Rad21 mit Komponenten des SCs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da die TEV-Protease-abhängige Spaltung von Rad21 zur Dissoziation der Spaltprodukte führte, wurde anschließend untersucht, inwiefern die Lokalisation einer anderen Komponente des Cohesinkomplexes (SMC1) ebenfalls beeinträchtigt wird. Hierzu wurden Antikörper gegen den N-terminalen Bereich von SMC1 generiert. Die Spezifität dieser Antikörper wurde zunächst mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen und Western Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). SMC1 und SMC3 sind mit dem lateralen Element des SCs assoziiert (Khetani und Bickel, 2007) und weisen ein charakteristisches Lokalisationsmuster innerhalb des Karyosoms auf. Dieses Muster konnte in Abwesenheit von TEV-Protease-Expression mit Hilfe der anti-SMC1-Färbungen nachgewiesen werden (Abb. 8D, -TEV). Nach Induktion der Rad21 Spaltung kommt es zum Verlust der Chromatin-assoziierten Lokalisation von SMC1, welches dann lediglich als punktförmiges Signal um den Oozytenkern nachweisbar ist (Abb. 8D, +TEV). Mit Hilfe der Immunfluoreszenzuntersuchungen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass noch geringe Mengen von SMC1 (bzw. eines meiotischen Cohesinrings) am Chromatin assoziiert sind, die für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion ausreichend sind. Jedoch führt die Spaltung von Rad21 zur Aufhebung der SC-typischen Lokalisierung von SMC1 und demnach zu Destabilisierung der Chromosomen cores. Mit Hilfe des verwendeten Systems zur Inaktivierung von Rad21 konnte demnach eine essentielle Funktion der mitotischen Cohesinuntereinheit in Bezug auf die Chromatin-assoziierte Lokalisation von meiotischen Cohesinkomplexen in der Oogenese aufgezeigt werden.

2.1.2 Rad21 Spaltung führt zur frühzeitigen Disassemblierung des Synaptonemalen Komplexes

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen Rad21 und der Stabilität des SCs abzuklären, wurde die Lokalisation der SC-Komponente C(3)G im *rad21*-mutanten Hintergrund untersucht. Da die Expression der TEV-Protease, welche durch *mat-Gal4* aktiviert wurde, zu einem Zeitpunkt in der Entwicklung der Oogenese stattfindet, zu dem der SC schon vollständig ausgebildet wurde (Vergleich Abb. 12A und Page und Hawley, 2001) und die meiotischen Rekombinationsereignisse bereits stattgefunden haben, kann lediglich eine Aussage über die Funktion von Rad21 bei der Aufrechterhaltung des SCs getroffen werden, nicht jedoch über die Assemblierung. Wie in Abb. 9A gezeigt ist, bildet sich in den entsprechenden Germarien ein intakter SC aus.

A



B

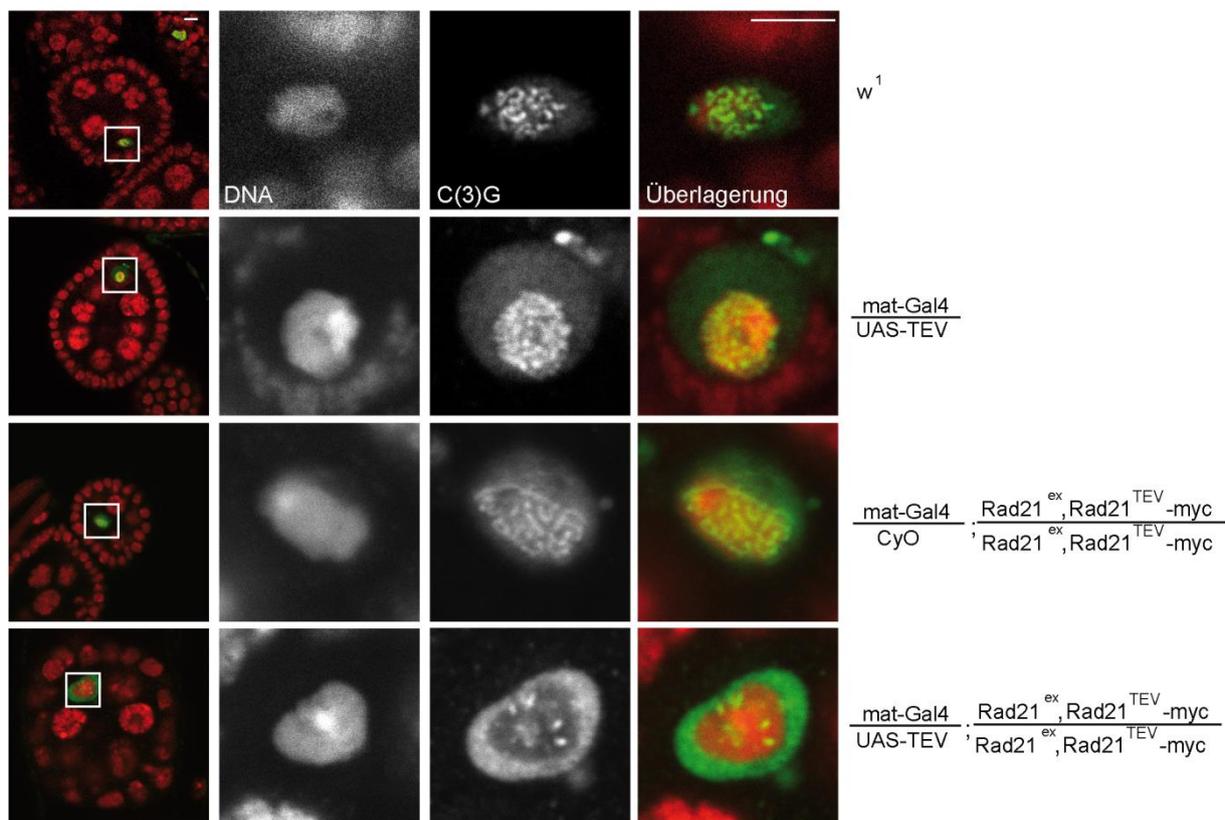


Abbildung 9: Spaltung von Rad21^{TEV}-10myc führt zur frühzeitigen Disassemblierung des SCs.

(A) Immunfluoreszenzanalysen von Germarien von Fliegen mit den rechts angegebenen Genotypen. (B) Immunfluoreszenzanalysen von Eikammern des Stadiums 4 bis 5. Der Genotyp der entsprechenden Fliegen ist angegeben. Die DNA ist mit Hoechst 33258 gefärbt (rot) und anti-C(3)G ist in grün dargestellt. Die links eingerahmten Bereiche sind im rechten Teil der Abbildung vergrößert dargestellt. Der Größenmaßstab beträgt in allen Abbildungen 5 µm.

In wildtypischen Oozyten und auch nach Expression von TEV-Protease ohne Rad21^{TEV}-myc bleibt der SC auch in Eikammern des Stadiums 4/5 stabil und ist in einem fadenförmigen Muster nachweisbar (Abb. 9B, erste und zweite Zeile). Weiterhin wirkte sich die Kombination von Rad21^{TEV}-myc und den mutanten *rad21*-Allelen, ohne TEV-Protease-Expression, nicht störend auf die Stabilität des SCs aus (Abb. 9B, dritte Zeile). Die

Inaktivierung von Rad21 durch Induktion der TEV-Protease-Expression hingegen führt zu einer frühzeitigen Destabilisierung und einer damit einhergehenden Disassemblierung des SCs. Das SC-typische fadenförmige Muster geht vollständig verloren. C(3)G ist nur noch im Nukleoplasma angereichert und lediglich einzelne punktförmige Signale zeigen eine Kolokalisation mit dem meiotischen Chromatin (Abb. 9B, unten).

Um zu untersuchen, ob es sich bei diesen punktförmigen Signalen um C(3)G-Akkumulationen in Zentromerbereichen handelt, wurde eine Co-Färbung mit CID durchgeführt. CID ist eine Zentromer-spezifische Histon H3 Variante in *D. melanogaster*, die homolog zum CENP-A Protein von Vertebraten ist (Henikoff *et al.*, 2000). Wie in Abb. 10 zu sehen ist, zeigt sich eine Kolokalisation der verbleibenden C(3)G-Signale mit diesem Zentromermarker. Demnach weist die Zentromer-spezifische Assoziation des SCs keine Rad21-Abhängigkeit auf.

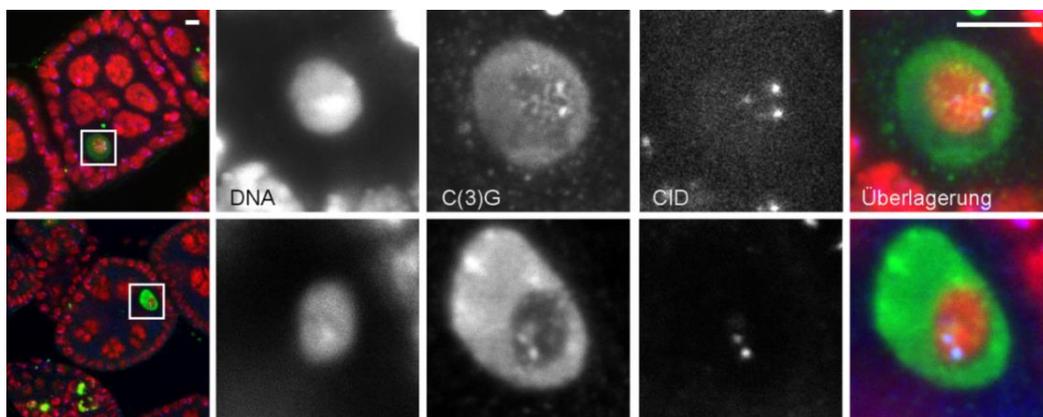


Abbildung 10: Kolokalisation der nach Rad21 Inaktivierung am Chromatin verbleibenden C(3)G-Signale mit dem Zentromer. Repräsentative Darstellungen von Eikammern des Stadiums 6. Eingerahmt sind die im rechten Teil gezeigten Bereiche, dabei ist die DNA in rot gezeigt (gefärbt mit Höchst 33258), C(3)G in grün und CID in blau. Der Genotyp der entsprechenden Fliegen lautet *UAS-TEV/mat-Gal4; Rad21^{ex3}, Rad21^{TEV}-10myc/Rad21^{ex3}, Rad21^{TEV}-10myc*. Der Größenmaßstab beträgt in allen Abbildungen 5 μ m.

Um zu testen, ob die Rad21-Inaktivierung neben der Destabilisierung des transversalen Filaments (C(3)G-Disassemblierung; Abb. 9) auch noch Auswirkungen auf einzelne Komponenten des lateralen Elements hat, wurde untersucht, inwiefern die Lokalisation von C(2)M nach Spaltung von Rad21 beeinträchtigt ist. Hierzu wurden Fliegen generiert, die eine HA-markierte Version von C(2)M im *rad21*-mutanten Hintergrund exprimieren, bei dem Rad21^{TEV}-10myc die einzige Rad21-Quelle darstellt. Die *mat-Gal4*-abhängige Induktion der TEV-Protease-Expression hatte auch hier zur Folge, dass das SC-spezifische Lokalisationsmuster von C(2)M-HA verloren geht und dass das verbleibende C(2)M-HA-Signal gleichmäßig im gesamten Kern nachgewiesen werden kann (Abb. 11). Es ist somit festzuhalten, dass Rad21 sowohl einen Einfluss auf die chromosomale Lokalisation von SMC1 am Chromatin des Oozytenkerns ausübt (Abb. 8), als auch für die Aufrechterhaltung des SCs im Pachytän benötigt wird (Abb. 9 und 11).

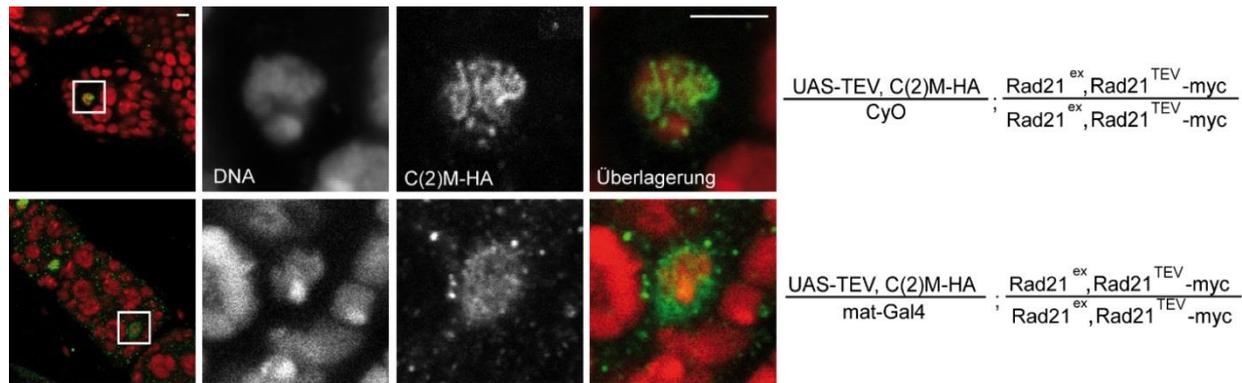


Abbildung 11: Fröhzeitige Dissoziation der lateralen SC-Komponente C(2)M nach Spaltung von Rad21^{TEV}-10myc. Repräsentative Darstellungen von Eikammern des 4. Stadiums. Eingerahmt sind die im rechten Teil gezeigten Bereiche, dabei ist die DNA in rot gezeigt (gefärbt mit Höchst 33258), C(2)M-HA in grün. Der Genotyp der entsprechenden Fliegen ist rechts angegeben. Der Größenmaßstab beträgt in allen Abbildungen 5 μ m.

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente ist jedoch nicht auszuschließen, dass die beobachteten Phänotypen aufgrund dominant-negativer Effekte der entstandenen Rad21-Spaltprodukte zustande kommen oder sich durch andere Effekte des genetischen Hintergrunds, wie zum Beispiel durch verschiedene Allelkombinationen erklären lassen. Um die Wahrscheinlichkeit dieser Interpretationsmöglichkeiten auf ein Minimum zu reduzieren, wurden weitere Methoden zur Oogenese-spezifischen Inaktivierung von Rad21 angewendet. Als erstes wurde analysiert, ob der genetische Hintergrund des verwendeten Gal4-Treibers einen Einfluss auf die beobachteten Phänotypen hat. Hierzu wurden die Spaltungsexperimente mit einem anderen Gal4-Treiber wiederholt. Die Expression des nanos (nos)-Gal4 Treibers setzt deutlich eher ein als die des bisher verwendeten mat-Gal4 Treibers (Abb. 12A). Bereits in Region 2a des Germariums zeigt sich die erste deutliche Expression, wohingegen die erste schwache Aktivität von mat-Gal4 erst in Region 3 sichtbar ist (Abb. 12A). Mit Hilfe der nos-Gal4 gesteuerten, früheren Expression der TEV-Protease konnte ebenfalls eine verfrühte Disassemblierung des SCs nach Spaltung von Rad21 erreicht werden. Der Zerfall des SCs findet hier durchschnittlich im Stadium $3,4 \pm 0,6$ ($n=34$) statt und liegt damit auch deutlich vor dem Zeitpunkt der SC-Disassemblierung nach mat-Gal4 induzierter Expression von TEV-Protease. Hier ist der Zerfall durchschnittlich im Stadium $5,3 \pm 0,6$ abgeschlossen ($n=30$; $P=0,0001$; Mann-Whitney U-Test, Abb. 12D). Darüber hinaus wurde noch ein weiteres Rad21^{TEV}-10myc-Konstrukt verwendet, bei dem die TEV-Proteaseerkennungssequenz an der Aminosäureposition 550 eingefügt wurde. Auch bei Verwendungen dieses Konstrukts konnte eine frühzeitige Disassemblierung des SCs festgestellt werden, jedoch war der Zeitpunkt deutlich später als bei Verwendung von Rad21^{TEV}-10myc, welches an der Position 271 drei TEV-Proteaseerkennungssequenzen trägt (Abb. 12D, Rad21^{271TEV}-10myc: Stadium $3,4 \pm 0,6$; Rad21^{550TEV}-10myc: Stadium $5,4 \pm 0,5$).

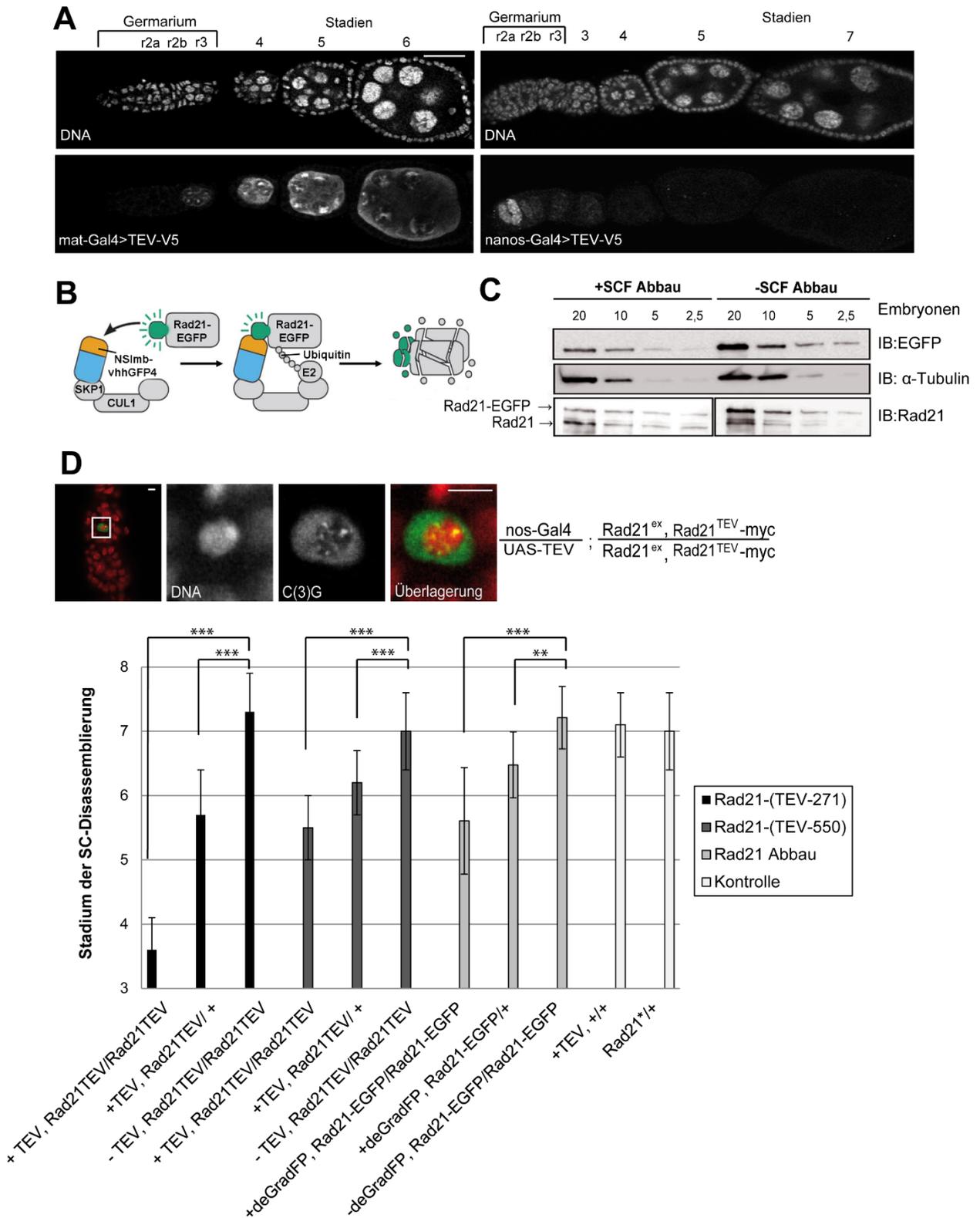


Abbildung 12: Die frühzeitige Disassemblierung des SCs ist auch nach Verwendung verschiedener Treiber-/Transgenkombinationen zur Inaktivierung von Rad21 nachweisbar. (A) Expressionsprofil der TEV-Protease in der frühen Oogenese. Dargestellt ist jeweils der anteriore Teil einer Ovarioline nach Expression von TEV-Protease durch Induktion mit mat-Gal4 (links) und nach nos-Gal4-abhängiger Expression (rechts). Die einzelnen Regionen des Germariums sind mit r2a, r2b und r3 entsprechend beschriftet. Die DNA ist mit Hoechst 33258 gefärbt und die Expression der TEV-Protease wurde mit anti-V5-Antikörpern nachgewiesen. Der Größenmaßstab beträgt: 10 µm. (B) Funktionsprinzip des deGradFP-Systems zum induzierten Abbau von GFP-fusionierten Proteinen. Modifiziert nach Caussinus *et al.*, 2012.

Da bei den verwendeten Rad21-Versionen unterschiedliche Spaltprodukte gebildet werden, jedoch bei beiden Genotypen die gleichen Effekte nach TEV-Protease-abhängiger Spaltung aufgetreten sind, ist anzunehmen, dass der frühzeitige Zerfall des SCs nicht aufgrund dominant-negativer Effekte der Spaltprodukte auftritt.

Um diese Erklärungsmöglichkeit jedoch gänzlich auszuschließen, wurde eine alternative Methode herangezogen, um Rad21 zu inaktivieren. Das hierfür verwendete System (deGradFP-System) basiert auf dem gezielten Abbau von EGFP-markierten Fusionsproteinen durch den SCF-Komplex (Abb. 12B). Dieser Proteinkomplex gehört genau wie der APC/C zur Ubiquitin-E3-Ligase-Proteinfamilie, die hauptsächlich verschiedene Zellzyklus- und Apoptose-relevante Proteine für den proteasomalen Abbau vorbereitet (Skowrya *et al.*, 1997; Yen und Elledge, 2008). Beim deGradFP-System werden EGFP-markierte Proteine durch eine modifizierte Form von slmb (F-Box Protein des SCFs in *D. melanogaster*), welche mit einer GFP-spezifischen Antikörperdomäne fusioniert ist, an den SCF rekrutiert und schließlich durch das Proteasom abgebaut (Causinus *et al.*, 2012). Die Expression von *UAS-Nslmb-vhh4GFP* erfolgte ebenfalls durch nos-Gal4. Als EGFP-markierte Variante von Rad21 wurde ein Fusionskonstrukt verwendet, welches permanent durch den α -Tubulin-Promotor exprimiert wird (Urban *et al.*, 2014). Dieses Konstrukt erwies sich als funktionsfähig, da Fliegen generiert werden konnten, die diese Rad21-Version als einzige Rad21-Quelle besaßen. Mit Hilfe eines EGFP-spezifischen Immunblots konnte jedoch nach deGradFP-abhängigem Abbau keine eindeutige Reduktion des Rad21-EGFP-Levels in Ovarien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was damit begründet sein kann, dass der verwendete nos-Gal4 Treiber lediglich in einem kurzen Zeitfenster im Bereich des Germariums exprimiert (Abb. 12A).

Fortsetzung Abbildung 12:

(C) Rad21-EGFP-Abbau nach *mat-GAL4* getriebener Expression von *NSlmb-vhhGFP4*. Proteinextrakte aus 3-8 h alten Embryonen, die Rad21-EGFP und *UAS-NSlmb-vhhGFP4* unter *mat-Gal4*-Kontrolle exprimieren (+SCF Abbau) und aus Kontrollembryonen, die kein *UAS-NSlmb-vhhGFP4*-Gen tragen (-SCF Abbau). Aufgetragen wurden jeweils 20, 10, 5 und 2,5 Embryonen-äquivalente pro Bahn. Die Detektion erfolgte mit anti-EGFP-Antikörpern, anti-Rad21-Antikörpern und anti- α Tubulin als Ladekontrolle. (D) Immunfluoreszenzanalysen von Eikammern des Stadiums 4 aus Weibchen mit dem rechts angegebenen Genotyp. Die DNA ist mit Hoechst 33258 gefärbt und in rot gezeigt. C(3)G ist in grün gezeigt. Der Größenmaßstab beträgt in allen Abbildungen 5 μ m. Unten: Quantifizierung des Stadiums der vollständigen SC-Disassemblierung. +TEV: Expression der TEV-Protease mit nos-GAL4, -TEV: entsprechende Kontrolleovarien ohne TEV-Protease-Expression. Rad21TEV: *Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-10myc*, Rad21-EGFP: *Rad21^{ex}, Rad21-EGFP*; +deGradFP: nos-Gal4 getriebene Expression von *NSlmb-vhhGFP4*. Schwarze Balken: Expression von *Rad21^{TEV}-10myc* mit TEV-Proteaseschnittstellen an Position 271, Dunkelgraue Balken: *Rad21^{TEV}-10myc* mit TEV-Proteaseschnittstellen an Position 550, mittelgraue Balken: Expression von *Rad21^{ex}, Rad21-EGFP*, hellgraue Balken: Kontrolleovarien, mit Expression von TEV-Protease im wildtypischen Hintergrund (+TEV, +/+ bzw. *Rad21^{ex}*-heterozygot-mutante Individuen (*Rad21^{*/+}*). Ausgezählt wurden jeweils 33 bzw. 34 Ovariolen außer bei +*deGradFP, Rad21-EGFP*/+ da waren es nur 21 Ovariolen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. ***: $p < 0.0001$; **: $p = 0.0002$; bestimmt mit einem paarweisen Vergleich des Mann-Whitney U-Tests.

Um dennoch einen Hinweis auf die Abbaurate von Rad21-EGFP zu bekommen, wurde *UAS-NsImb-vhh4GFP* unter Kontrolle des *mat-GAL4*-Promotors in *Drosophila* Embryonen exprimiert und anschließend mittels Immunblot die Rad21-Proteinmenge bestimmt (Abb. 12C). Für den immunologischen Nachweis wurden Embryonenkollektionen von 3 bis 8 h durchgeführt und anschließend das Level an Rad21-EGFP bestimmt. Wie in Abb. 12C zu sehen ist, kommt es nach der *mat-Gal4*-abhängigen Induktion des Degradationssystems zum deutlichen Abbau von Rad21-EGFP. Dieses System ist demnach dazu geeignet, Rad21 abzubauen und die Funktion der mitotischen Cohesinuntereinheit in Bezug auf die Stabilität des SCs zu untersuchen. Trotz des Fehlens eines *nos-Gal4*-abhängigen Nachweises zur Reduktion des Rad21-EGFP-Levels, wurde für die Aktivierung des deGradFP-Systems auf diesen *Gal4*-Treiber zurückgegriffen, da dieser zeitgleich zur SC-Etablierung aktiv ist. Nach *nos-Gal4*-abhängiger Expression von *NSImb-vhhGFP4* konnte ebenfalls der Phänotyp der frühzeitigen SC Disassemblierung nachgewiesen werden (Abb. 12C,D). Das durchschnittliche Stadium des vollständigen SC-Zerfalls lag hier bei $5,6 \pm 0,8$ und ist demnach deutlich früher im Vergleich zu Individuen, die Rad21-EGFP exprimieren aber keinen SCF-abhängigen Abbau induzieren. Hier erfolgte die Disassemblierung im Durchschnitt erst im Stadium $7,2 \pm 0,5$ (Abb. 12D).

Allen verwendeten Methoden ist jedoch gemein, dass die ersten Phänotypen erst Mitte des Pachytäns auftreten, das heißt zu einem Zeitpunkt, bei dem der SC bereits vollständig assembliert ist und somit lediglich eine Aussage über die Funktion von Rad21 bei der Aufrechterhaltung des SCs getroffen werden kann. Um dennoch eine genauere Vorstellung der gegenseitigen Abhängigkeit zu bekommen, wurden Strukturanalysen des SCs innerhalb des Germariums vorgenommen, da der Beginn der *nos-GAL4*-abhängigen Expression der TEV-Protease bereits in Region 2a einsetzt (Abb. 12A). In Chromosomenspreads wurden mittels Immunfluoreszenzanalysen Rad21^{TEV}-10myc und C(3)G in isolierten Zellen des Germariums nachgewiesen (Abb. 13). Nachteil dieser Methode ist, dass man durch die Vereinzelung der Kerne nicht mehr eindeutig zuordnen kann, welchen Teilbereichen des Germariums (Stadium der Oogenese) diese Kerne entstammen. Durch die beobachteten Phänotypen lassen sich jedoch Rückschlüsse auf die entsprechende Lage im Germarium ziehen. So sind in Abbildung 13 zwei Beispiele gezeigt, die sich deutlich in Bezug auf den Phänotyp des SCs unterscheiden. In der oberen Reihe liegen zwei C(3)G-positive Kerne direkt nebeneinander. Die räumliche Nähe dieser beiden Kerne lässt vermuten, dass sie aus der Region 2a bzw. 2b stammen, denn nur in diesen Regionen sind vollständig ausgebildete SCs zu finden, die derart nah beieinander liegen. Die Struktur des SCs entspricht der einer wildtypischen Pro-Oozyte (Vergleich mit Abb. 8C), jedoch ist das Signal für Rad21 nicht mehr als durchgängiges Signal innerhalb des Oozytenkerns erkennbar, sondern als einzelne punktförmige Signale. Im unteren Teil der Abb. 13 ist ein einzelner Kern gezeigt, der

vermutlich der Region 3 oder auch den ersten Eikammern zugeordnet werden kann, da das myc-Signal noch schwächer ist und die C(3)G-Färbung ebenfalls deutlich fragmentierter erscheint im Vergleich zu den oben dargestellten Pro-Oozyten. Es ist somit davon auszugehen, dass die ersten Spaltungsereignisse von Rad21 bereits im Germarium stattfinden, also zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine Disassemblierung des SCs nachweisbar ist und erst eine deutlich fortschreitende Spaltungsrate zur Destabilisierung des SCs führt.

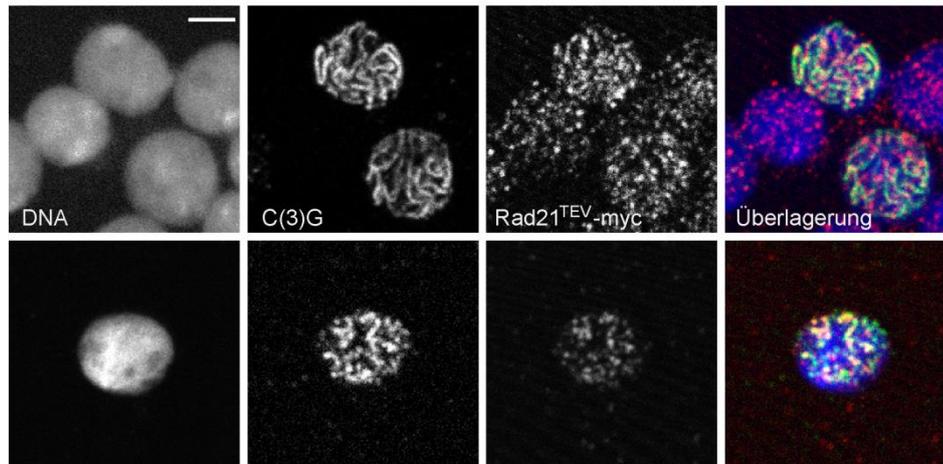


Abbildung 13: Initiale Disassemblierung des SCs nach Rad21^{TEV}-10myc-Spaltung bereits im Germarium. Chromosomenspreads von Ovariolen von Fliegen mit folgendem Genotyp: *nos-GAL4/UAS-TEV; Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-10myc/Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-10myc*. Die DNA ist mit Hoechst 33258 gefärbt (blau), Rad21^{TEV}-10myc mit Hilfe von myc-Antikörpern nachgewiesen (rot) und C(3)G in grün gezeigt. Der Größenmaßstab entspricht 5 µm.

Um eine genaue Aussage über die Abhängigkeit der Stabilität des SCs in Bezug auf die Funktion von Rad21 zubekommen, wurden weitere Kontrollexperimente im heterozygot-mutanten Hintergrund durchgeführt. In einem solchen genetischen Hintergrund führt die Spaltung von Rad21^{TEV}-10myc ebenfalls zu einer frühzeitigen Disassemblierung des SCs (Abb. 14). Diese ist jedoch nicht allein durch die Reduktion des Rad21-Levels auf 50% zurückzuführen, da Fliegen mit einem mutanten *rad21*-Allel keine Änderungen in Bezug auf die Morphologie des SCs und die Dynamik der Disassemblierung aufweisen (Abb. 14 oberste Reihe, Abb. 12D letzter Balken). Eine Quantifizierung der beobachteten Phänotypen im heterozygot-mutanten Hintergrund zeigt außerdem, dass der SC über einen deutlich längeren Zeitraum als fadenförmiges Gebilde nachweisbar ist, als in entsprechenden Ovarien von Fliegen, bei denen die Rad21-Inaktivierung im homozygot-mutanten Hintergrund erfolgte (Abb. 12D). Diese Beobachtung tritt sowohl bei den Rad21-Spaltungsexperimenten nach TEV-Protease-Expression auf, als auch bei der Inaktivierung durch den SCF-abhängigen Abbau von Rad21-EGFP.

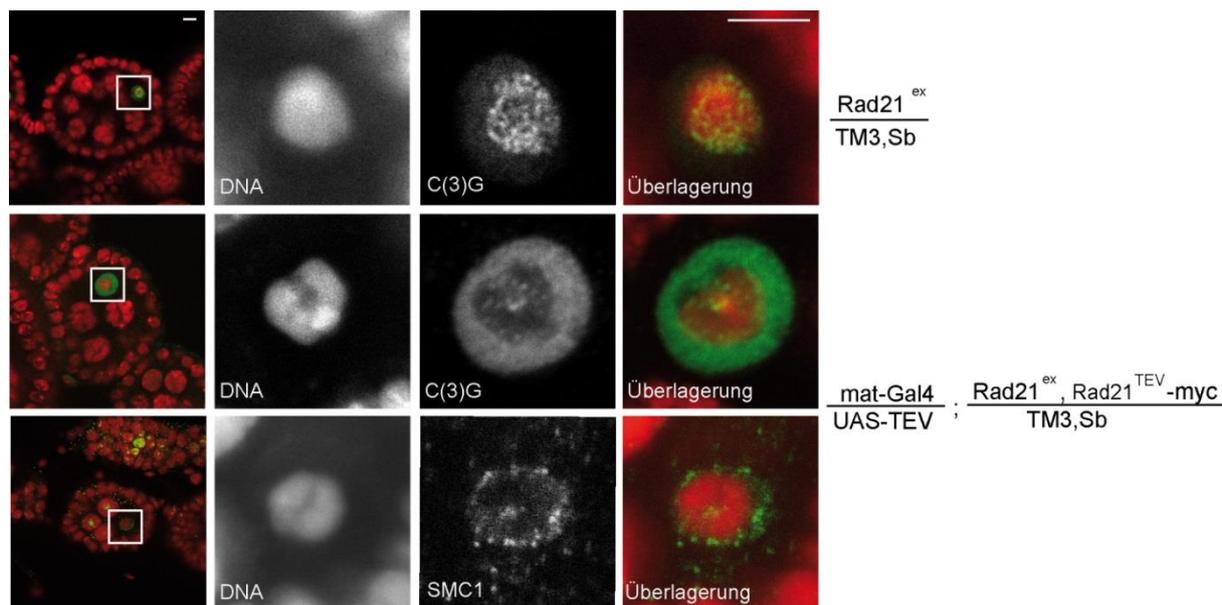


Abbildung 14: Inaktivierung von Rad21^{TEV}-10myc im heterozygot-mutanten Hintergrund führt zur frühzeitigen Disassemblierung des SCs und zur fehlerhaften Lokalisation von SMC1. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von Eikammern des Stadiums 4 bis 5 von Weibchen, die TEV-Protease unter Kontrolle von mat-Gal4 im *Rad21^{ex},Rad21^{TEV}-10myc* heterozygot-mutanten Hintergrund exprimieren (unterer Reihe) oder von Kontroll ovarien aus Weibchen mit einem *Rad21^{ex}/TM3,Sb*-Hintergrund. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 (rot) gefärbt und C(3)G und SMC1 mit entsprechenden Antikörpern (grün). Eingerahmt sind die im rechten Teil vergrößert gezeigten Bereiche. Der Größenmaßstab beträgt in allen Abbildungen 5 µm.

Durch das zusätzliche Einbringen einer wildtypischen Rad21-Kopie wird demnach die Stabilität des SCs verbessert, jedoch kommt es dennoch zu einer verfrühten Disassemblierung im Vergleich zum wildtypischen Hintergrund. Neben der Auswirkung auf die Struktur des SCs, zeigt sich nach Inaktivierung von Rad21 im heterozygot-mutanten Hintergrund ebenfalls eine Fehllokalisierung von SMC1 (Abb. 14, unterste Reihe). Eine wildtypische Kopie von Rad21 im Hintergrund der Rad21-Spaltung ist demnach nicht ausreichend für eine normale Lokalisation dieser Cohesinuntereinheit.

Mit verschiedenen Methoden zur Inaktivierung von Rad21 konnte demnach eine Abhängigkeit der Stabilität des SCs von der mitotischen Cohesinuntereinheit Rad21 nachgewiesen werden. Über eine mögliche Funktion von Rad21 bei der Assemblierung des SCs kann keine Aussage getroffen werden, da die Inaktivierung der Cohesinuntereinheit erst zu einem Zeitpunkt einsetzt, bei dem der SC bereits vollständig ausgebildet ist.

2.1.3 Interaktion von Rad21 mit dem N-Terminus der SC-Komponente C(2)M

Um im nächsten Schritt genauer zu untersuchen, wie die Wechselwirkung von Rad21 mit dem SC zustande kommt, wurde analysiert, ob es direkte Interaktionen mit den bereits beschriebenen SC-Komponenten gibt. Hierzu wurden die kodierenden Sequenzen der SC-Komponenten (C(2)M, C(3)G, ORD und Corona) in den pCS2-Flag₃-Vektor kloniert und die entsprechenden Proteine mit Hilfe des *rabbit reticulocyte systems* (Promega) *in vitro*

synthetisiert. Parallel dazu erfolgte eine Kotranskription/Kotranslation von Rad21. Die Synthese aller Proteine erfolgte in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin. Zum Nachweis potentieller Interaktionen wurden Flag-spezifische Immunpräzipitationen der Fusionsproteine durchgeführt und anschließend mittels autoradiographischer Analyse die kopräzipitierten Proteine nachgewiesen. Wie in Abbildung 15A zu sehen ist, konnte eine direkte Interaktion zwischen Rad21 und C(2)M gezeigt werden. Mit den übrigen SC-Untereinheiten konnten keine Wechselwirkungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestätigung dieser *in vitro* nachgewiesenen Interaktion wurde anschließend überprüft, ob diese Interaktion auch durch Immunpräzipitationen mit Proteinextrakten aus Ovarien nachvollzogen werden kann. Es konnte jedoch kein Hinweis auf eine Assoziation beider Proteine erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der relativ geringen Menge an löslichen Proteinen begründet sein, da die Komponenten der meiotischen Chromosomen *cores* eine hohe Stabilität aufweisen und auch nach DNase I-Behandlung miteinander assoziiert bleiben (Khetani und Bickel, 2007). Um auf einen höheren Anteil an solubilisierten Proteinen zurückzugreifen, wurden Immunpräzipitationen mit Proteinextrakten aus Embryonen durchgeführt. Erfolgt in Embryonen eine gleichzeitige Expression von Rad21^{TEV}-10myc und C(2)M-HA kommt es zur spezifischen Kopräzipitation der mitotischen Cohesinuntereinheit (Abb. 15B). Bei den durchgeführten Kontroll-experimenten, für die Proteinextrakte verwendet wurden, die kein C(2)M-HA exprimieren, konnte Rad21^{TEV}-10myc nicht in den Immunpräzipitaten nachgewiesen werden. Demnach kann ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Koimmunpräzipitation aufgrund unspezifischer Interaktionen von Rad21^{TEV}-10myc mit den Antikörpern oder der Säulenmatrix zustande kommt. Mit Hilfe der durchgeführten Interaktionsstudien konnte demnach eine Wechselwirkung zwischen der mitotischen Cohesinuntereinheit Rad21 und C(2)M gezeigt werden.

Um die Interaktionsfläche zwischen beiden Proteinen genauer zu charakterisieren, wurden verkürzte Proteinvarianten von C(2)M und Rad21 erstellt und deren Interaktion untereinander getestet (Abb. 15C). Mit Hilfe von *in vitro* transkribierten und translatierten Proteinfragmenten wurde der C-terminale Bereich von Rad21 (AS: 478-715) als Interaktionsfläche ausgemacht, welcher mit dem N-terminalen Bereich von C(2)M (AS: 1-191) interagiert (Abb. 15C).

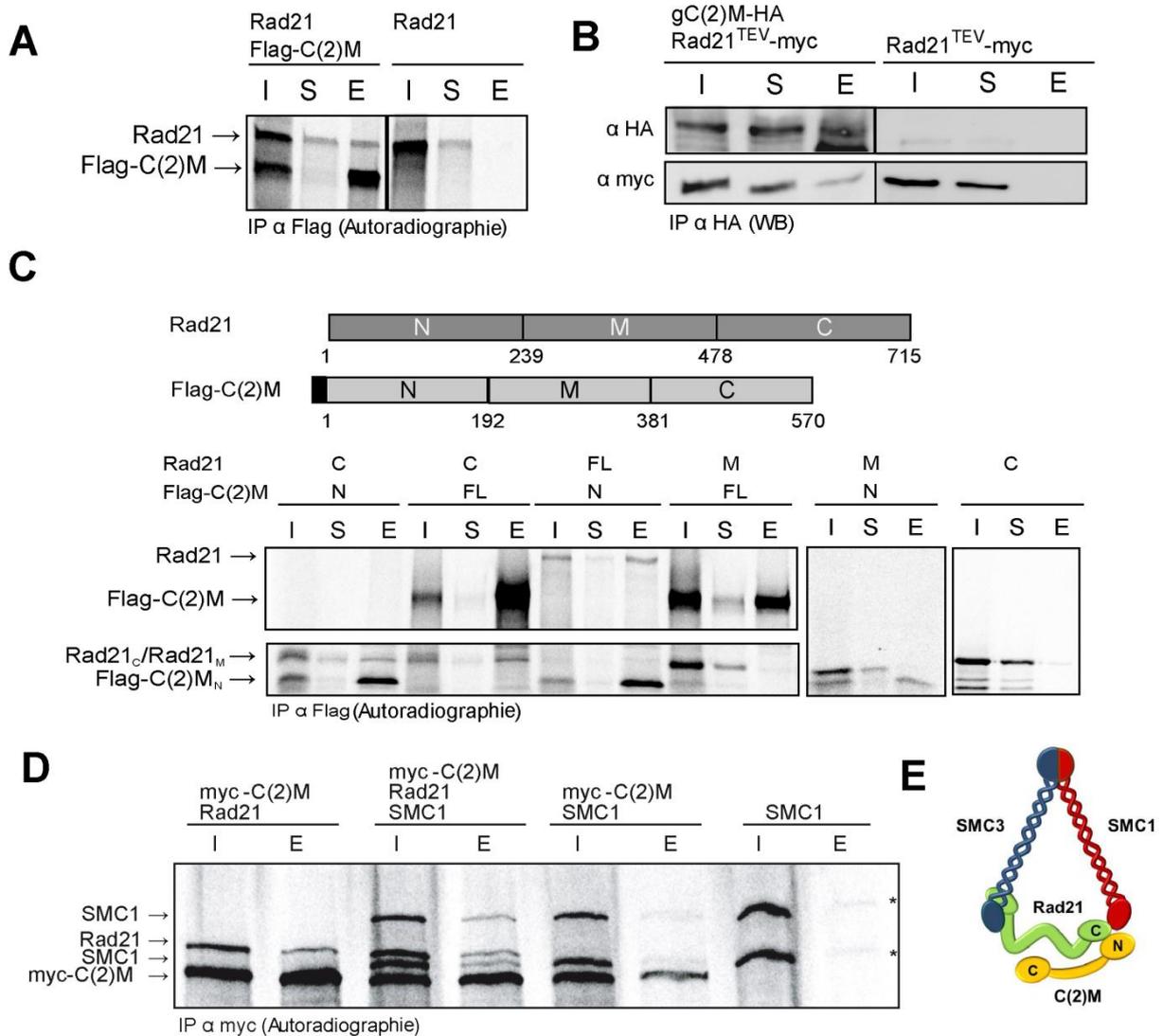


Abbildung 15: Direkte Interaktion des C-Terminus von Rad21 mit dem N-terminalen Bereich von C(2)M. (A) Immunpräzipitationen von *in vitro* transkribierten und translatierten Proteinen. Die Synthese der Proteine erfolgte in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin. Durchgeführt wurden Präzipitationen mit Flag-spezifischen Antikörpern (B) Immunpräzipitationen (IP αHA) von Proteinextrakten aus 0-1,5 h alten Embryonen. Westernblot zum Nachweis der Proteinlevel von C(2)M-HA (αHA) und Rad21-TEV-myc (αmyc). Genotypen der verwendeten Fliegen lauten wie folgt: *gC(2)M-HA,pTEV;Rad21*,Rad21-TEV-myc* (links) und *Rad21*,Rad21-TEV-myc* (rechts). (C),(D) Immunpräzipitationen von *in vitro* transkribierten und translatierten Proteinen. Durchgeführt wurden Präzipitationen mit Flag-spezifischen Antikörpern (C) bzw. myc-spezifischen Antikörpern (D). Die Proteinlevel wurden mittels Autoradiographie ausgewertet. Für die in C verwendeten Immunpräzipitationen wurden die im oberen Teil von (C) gezeigten Proteinfragmente herangezogen. Mit FL wurde das gesamte Protein beschrieben. I: Input, S: Überstand und E: Eluat. (E) Modell zum Aufbau eines möglichen Cohesinmoleküls in der weiblichen Meiose. Eine Interaktion von Rad21 mit SMC3 konnte mit Hilfe von *in vitro* synthetisierten Proteinen nicht nachgewiesen werden, jedoch mit den in Abbildung 28 gezeigten 2-Hybridanalysen.

In den ursprünglichen Untersuchungen zur Charakterisierung von C(2)M wurde von Heidmann *et al.*, 2004 erstmals eine Assoziation dieses Proteins mit SMC3 beschrieben. Durch Immunpräzipitationsanalysen von Proteinextrakten aus Ovarien konnte eine eindeutige Kopräzipitation von C(2)M mit dieser Cohesinuntereinheit gezeigt werden. Ob es sich bei der Assoziation zwischen SMC3 und C(2)M um eine direkte Interaktion handelt,

konnte jedoch mit den durchgeführten Experimenten nicht geklärt werden (Heidmann *et al.*, 2004). Demnach stellt sich nun die Frage, ob die Interaktion von C(2)M mit den SMC-Proteinen über Rad21 verbrückt wird oder ob die Bindung von Rad21 und C(2)M an die SMCs unabhängig voneinander stattfindet. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen von *in vitro* synthetisierten Proteinen durchgeführt, die es erlauben Rückschlüsse auf direkte Proteininteraktionen zu ziehen. Nach Präzipitation von myc-C(2)M konnten nur sehr geringe Mengen SMC1 eluiert werden, welche durch gleichzeitige Zugabe von Rad21 deutlich erhöht werden konnten (Abb. 15D). Dies spricht dafür, dass eine direkte Interaktion von C(2)M mit SMC1 nicht vorhanden ist bzw. nur sehr schwach ist und erst durch die Interaktion mit Rad21 eine Assoziation von C(2)M mit SMC1 stattfinden kann. Analoge Untersuchungen zur Interaktion von Rad21 und C(2)M mit SMC3 konnten nicht durchgeführt werden, da mit Hilfe dieses *in vitro* Systems es nicht möglich war eine Interaktion von Rad21 mit SMC3 nachzuweisen. Aus den Interaktionsstudien mit SMC1, Rad21 und C(2)M kann jedoch ein mögliches Modell eines Meiose-spezifischen Cohesinkomplexes erstellt werden, bei dem C(2)M mit Rad21 assoziiert vorliegt und dieses dann an die SMCs bindet (Abb. 15E).

Die N-terminalen 191 Aminosäuren von C(2)M interagieren mit dem C-Terminus von Rad21. Da in diesem Bereich eventuell noch weitere wichtige regulatorische Bereiche vorliegen, sollte als nächstes das kleinstmögliche C(2)M_N-Fragment gefunden werden, das noch mit Rad21 interagieren kann. Hierzu wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von S. Herberg verschiedene N-terminale C(2)M-Fragmente kloniert, als Proteinfragmente exprimiert und anschließend auf ihre Fähigkeit hin untersucht mit Rad21 interagieren zu können. Hierbei stellte sich heraus, dass C(2)M₁₋₁₅₀ mit Rad21 interagieren kann, C(2)M₁₋₁₀₀ jedoch nicht mehr (Herberg, 2012; Abb. 16B). Um zu testen, ob die Aminosäuren 101-150 ausreichend sind, um die Interaktion zu vermitteln, wurde überprüft, ob das N-terminal-verkürzte C(2)M₁₀₁₋₅₇₀-Fragment mit der Cohesinuntereinheit interagieren kann. Dieses C(2)M-Fragment war jedoch nicht in der Lage mit Rad21 zu präzipitieren (Abb. 16A). Im Rahmen der Auflösung des durchgeführten Experiments scheinen demnach die Aminosäuren 101-150 von C(2)M zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Interaktion mit Rad21 zu sein.

Mit Hilfe der durchgeführten Immunpräzipitationen konnte demnach der erste Hinweis für eine direkte Interaktion zweier α -Kleisine erbracht werden. Diese Assoziation wird dabei über den N-Terminus von C(2)M und den C-Terminus von Rad21 vermittelt (Abb. 15C,E) und könnte einen ersten Hinweis für eine Verknüpfung des Cohesinrings mit dem SC in Meiose von *Drosophila melanogaster* darstellen. Die Kollokalisierung beider Proteine entlang der Chromosomen *cores* und eine gegenseitige Abhängigkeit in Bezug auf das Lokalisations-

verhalten (Abb. 8D und 12) liefern dabei einen weiteren Hinweis für eine direkte Interaktion beider Proteine und damit verbunden eine mögliche Assoziation von Cohesin mit dem SC.

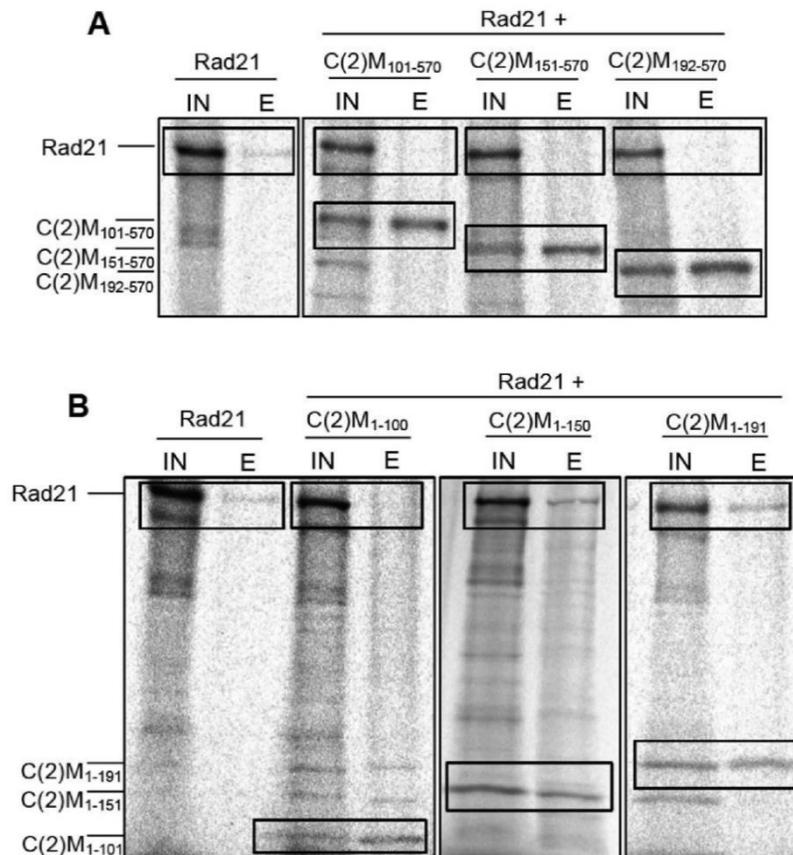


Abbildung 16: Die N-terminalen Aminosäuren 100–150 von C(2)M sind für eine Interaktion mit Rad21 notwendig aber nicht ausreichend. (A) C(2)M₁₀₁₋₅₇₀ ist nicht in der Lage mit Rad21 zu interagieren, C(2)M₁₋₁₅₀ hingegen schon (B). Beide Teilabbildungen zeigen Immunpräzipitationen (IP α Flag) von *in vitro* transkribierten und translatierten Proteinen. Die Synthese der Proteine erfolgte in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin. Die verwendeten C(2)M-Konstrukte wurden als Fusionskonstrukt mit einer N-terminalen Flag₃-Markierung exprimiert und anschließend präzipitiert. Die Proteinlevel wurden mittels Autoradiographie ausgewertet. Eingerahmt sind in beiden Teilabbildungen die Rad21-spezifischen Banden (oberer Gelbereich) bzw. die Flag₃-C(2)M-Fragmente (unterer Gelbereich). Aufgetragen wurden jeweils der Input (IN) bzw. die entsprechenden Eluate (E). Durchgeführt von S. Herberg im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.

2.1.4. Lokalisation von Rad21 am meiotischen Chromatin ist Nipped-B abhängig

Die Ladung des Cohesinrings ans Chromatin erfolgt durch ein einfaches Umschließen des Proteinkomplexes um die DNA (Haering *et al.*, 2008). Dieser Schritt erfolgt bereits nach Beendigung der Mitose (Ciosk *et al.*, 2000), also zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine Kohäsion zweier Schwesterchromatiden etabliert wird. Für diesen Lade-Prozess wird der Scc2/Scc4-Komplex benötigt (Ciosk *et al.*, 2000, Gillespie und Hirano, 2004, Watrin *et al.*, 2006). In *Drosophila* führen Mutationen im *nipped-B*-Gen, welches das entsprechende Scc2-Homolog darstellt (Rollins *et al.*, 1999) zu Defekten bei der Schwesterchromatidkohäsion

(Rollins *et al.*, 2004). Eine RNAi-vermittelte Inaktivierung von *nipped-B* in Prophase I resultiert darüber hinaus in einer frühzeitigen Disassemblierung des SCs. Demnach ist eine in Prophase I stattfindende Neubeladung von Cohesin ans meiotische Chromatin essentiell für den korrekten Ablauf der Meiose (Weng *et al.*, 2014). Darauf aufbauend stellt sich nun die Frage, inwiefern die Lokalisation und die damit einhergehende Funktion von Rad21 ebenfalls eine Nipped-B-Abhängigkeit aufweist. Um dies zu untersuchen, wurde das Level an *nipped-B* über RNAi herunterreguliert. Hierzu erfolgte eine nos-Gal4-abhängige Synthese von *nipped-B* spezifischer doppelsträngiger RNA. Die Aktivierung des nos-Gal4-Treibers und damit verbunden die RNAi-vermittelte mRNA-Degradation setzt zu einem Zeitpunkt ein, zu dem bereits die meiotische S-Phase abgeschlossen ist und die meiotische Kohäsion etabliert ist. Die Inaktivierung von Nipped-B in der Prophase von Meiose I führt zur Destabilisierung des SCs, der nur noch als kurze fadenförmige oder punktförmige C(3)G-Signale nachzuweisen ist (Weng *et al.*, 2014). Diese frühzeitige Disassemblierung des SCs geht einher mit einer gestörten Lokalisation von Rad21 in Form von einzelnen, fragmentierten Signalen (Abb. 17). Somit hat die Inaktivierung des Cohesinladeproteins Nipped-B nach der meiotischen S-Phase sowohl einen Einfluss auf die Stabilität des SCs als auch auf die Lokalisation von Rad21 am meiotischen Cohesin.

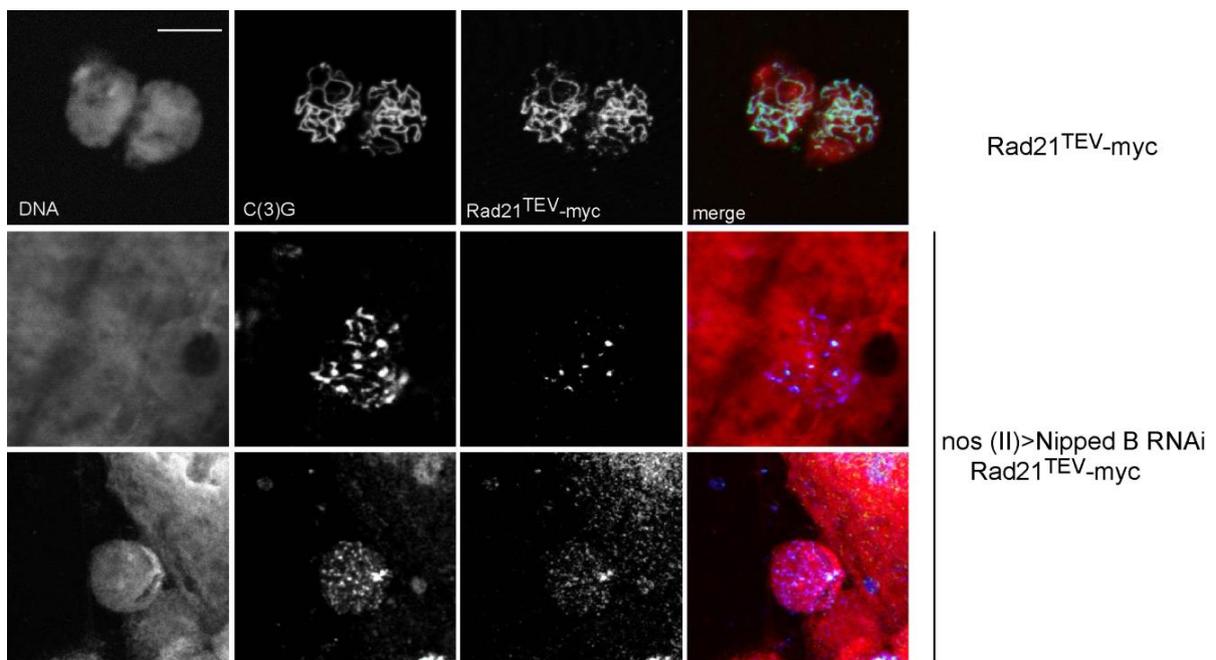


Abbildung 17: Inaktivierung von Nipped-B führt zur Reduktion des Rad21-Niveaus in Prophase I. Chromosomenspreads von Ovariolen von Fliegen mit folgendem Genotyp: *nos-GAL4/+;UAS-nipped-B RNAi/Rad21^{ex}, Rad21^{TEV-10myc}* (unteren beiden Reihen). Als Kontrolle dienten Pro-Oozytenkerne von Fliegen, die nur Rad21^{TEV-10myc} exprimieren (*nos-GAL4;Rad21^{ex}, Rad21^{TEV-10myc}*, obere Reihe). Die DNA ist mit Hoechst 33258 gefärbt (rot), Rad21^{TEV-10myc} mit Hilfe von myc-Antikörpern nachgewiesen (grün) und C(3)G in blau gezeigt. Der Größenmaßstab entspricht 5 µm.

2.1.5 Die Inaktivierung von Rad21 hat keinen Einfluss auf die meiotische Kohäsion

Da die Inaktivierung von Rad21 nicht nur eine frühzeitige Disassemblierung des SCs zur Folge hat (Abb. 9), sondern auch die meiotische Lokalisation von SMC1 beeinträchtigt (Abb. 8B), wurde im nächsten Schritt untersucht, inwiefern Rad21 auch einen Einfluss auf die meiotische Kohäsion hat. Der klassische Nachweis von Chromosomenfehlsegregationen, die durch frühzeitige Trennungen der Schwesterchromatiden entstehen, erfolgt durch sogenannte *non-disjunction assays*. Diese Methode, bei der Fehler der meiotischen Chromosomenpaarung und -trennung anhand von Phänotypen in der nächsten Generation ausgewertet werden, kann jedoch mit dem verwendeten System zur Oogenese-spezifischen Inaktivierung von Rad21 nicht kombiniert werden, da die entsprechenden Embryonen bereits nach dem Durchlaufen der ersten Teilungen absterben. Ursache hierfür ist die maternale Kontribution der TEV-Protease, die zur Spaltung von Rad21 während der frühen Embryogenese führt. Unter maternaler Kontribution versteht man die Bereitstellung aller benötigten Komponenten von der Mutterzelle an den Embryo. Die ersten Teilungen der Embryogenese sind durch schnelle, aufeinander folgende Kernteilungen charakterisiert, die alle in einem gemeinsamen Zytoplasma ablaufen (Synzytium). Ein weiteres Merkmal dieser Entwicklungsphase ist eine reduzierte zygotische Expression, sodass alle für die synzytialen Teilungen benötigten Komponenten zuvor von der Mutterzelle im Embryo deponiert werden müssen. Da in der Mutterzelle Oogenese-abhängig Rad21 durch TEV-Protease gespalten wird, wird diese auch an die entsprechenden Embryonen weitergegeben, die dann aufgrund des mitotischen Kohäsionsverlusts in den ersten Teilungen absterben und somit keine adulten Individuen ausbilden, die mit Hilfe eines *non-disjunction assays* ausgewertet werden können. Um dieses Problem zu umgehen, wurden alternativ Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-experimente (FISH) durchgeführt, die eine Visualisierung einzelner genomischer Bereiche während der Meiose ermöglichen. Für diese Analysen wurde eine X-Chromosomen-spezifische Sonde (359 bp *repeat*) verwendet und eine Sonde, die spezifisch an die perizentromerische Region des vierten Chromosoms hybridisiert (AATAT)₆ (Abb. 18A). Um eine Aussage über mögliche Kohäsionsverluste zu treffen, wurden Metaphase-I-arretierte Oozyten untersucht und die dabei auftretenden Phänotypen in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt: (1) eine normale Lokalisation der FISH-Signale, die durch eine symmetrische 2+2-Verteilung charakterisiert ist und (2) das Vorhandensein von überzähligen FISH-Signalen, wobei mindestens eines der erwarteten vier Signale eine frühzeitige Trennung aufweist, sodass mindestens fünf Signale nachweisbar sind (Abb. 18A). Im wildtypischen Hintergrund sind 98% (n=45) der analysierten Meiose I-Figuren der ersten Kategorie zuzuordnen und nur in lediglich 2% der Fälle sind mehr als vier Signale nachweisbar (Abb. 18B). Nach TEV-Protease vermittelter Spaltung von Rad21^{TEV}-10myc

ändert sich dieses Verhältnis kaum. Hier findet man bei 95% (n=40) der untersuchten Oozyten eine normale Anordnung der FISH-Signale und bei den übrigen 5% treten mehr als die erwarteten vier Signale auf, was für eine frühzeitige Trennung der entsprechenden Chromosomen spricht. Darüber hinaus wurde auch noch ein möglicher Einfluss von C(2)M untersucht, für welches bekannt ist, dass die entsprechenden Mutanten ein hohes Level an Chromosomenfehlverteilungen aufweisen, aber keinen Einfluss auf die Kohäsion haben (Manheim und McKim, 2003, Heidmann *et al.*, 2004). Erwartungsgemäß führte das Fehlen dieser SC-Komponente ebenfalls zu keiner signifikanten Steigerung des Anteils mit mehr als vier FISH-Signalen (Abb. 18B).

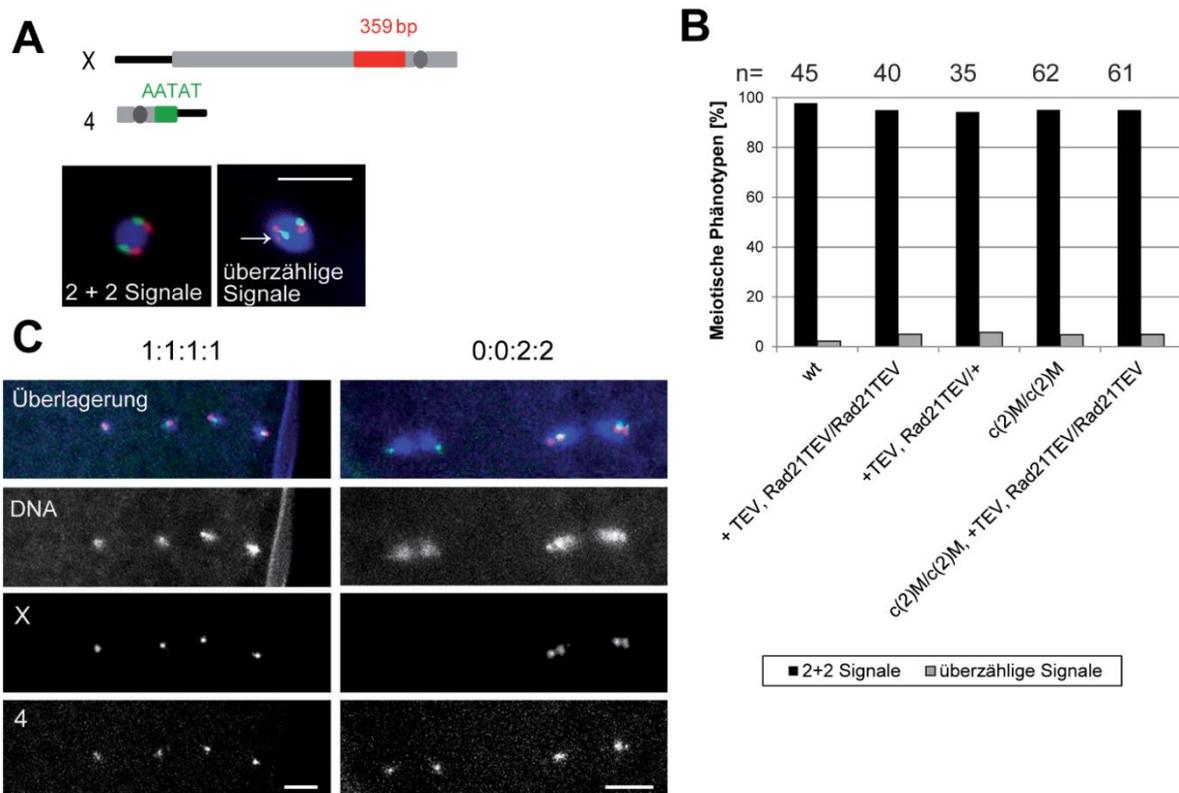


Abbildung 18: Die Inaktivierung von Rad21 hat keinen Einfluss auf die meiotische Kohäsion.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Sonden zur Markierung des 4. bzw. des X-Chromosoms. Die Zentromerregionen sind als dunkelgraue Kreise gezeigt. Die zentromernahen repetitiven Bereiche wurde mit den Farbstoffen Alexa555 (359 bp, X-Chromosom) bzw. Alexa648 (AATAT-Sonde, 4. Chromosom) gekoppelt. Im unteren Bereich sind zwei repräsentative Aufnahmen gezeigt zur Veranschaulichung der beobachteten Phänotypen, die in (B) für die verschiedenen Genotypen quantifiziert wurden. Der Pfeil markiert ein überzähliges Signal für die X-chromosomale Sonde. Die DNA ist mit Hoechst 33258 gefärbt (blau), die X-chromosomale Sonde ist in rot gezeigt und die 4. chromosomale Sonde in grün. Der Größenmaßstab beträgt 5 µm. (B) Quantifizierung der beobachteten Phänotypen. Die verwendeten Genotypen wurden wie folgt abgekürzt: w^1 (wt), *mat-GAL4/UAS-TEV; Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-myc/Rad21^{ex}*, *Rad21TEV-myc (+TEV, Rad21TEV/Rad21TEV)*, *mat-GAL4/UAS-TEV; Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-myc/TM3, Sb (+TEV, Rad21TEV/+)*, *c(2)M^{EP2115}/c(2)M^{EP2115}* (*c(2)M/c(2)M*) und *c(2)M^{EP2115}, mat-GAL4/c(2)M^{EP2115}, UAS-TEV; Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-myc/Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-myc* (*c(2)M/c(2)M, +TEV, Rad21TEV/Rad21TEV*) (C) FISH-Analyse von Meiose II-Figuren von befruchteten Embryonen von Weibchen mit dem Genotyp: *mat-GAL4/UAS-TEV; Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-myc/Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-myc*.

Nach Kombination der Oogenese-abhängigen Spaltung von Rad21 mit dem C(2)M-mutanten Hintergrund konnte keine Änderung der Anzahl der Oozyten mit Kohäsionsdefekten nachgewiesen werden. Auch hier wurde lediglich bei 5% (n=61) der untersuchten meiotischen Figuren eine erhöhte Anzahl an FISH-Signalen nachgewiesen (Abb. 18B), sodass zusammenzufassen ist, dass Rad21 vermutlich keine kohäsiven Funktionen besitzt, die zur Aufrechterhaltung eines stabilen Meiose-I-Arrests beitragen.

Um den Verlauf der meiotischen Teilungen genauer zu beurteilen, wurden FISH-Analysen von Embryonen durchgeführt, die die Meiose II gerade vollendet haben. Hierzu wurden Embryonen in einem 20-minütigem Intervall gesammelt und anschließend die Verteilung des X-Chromosoms bzw. des 4. Chromosoms auf die entstandenen vier Meioseprodukte untersucht (Abb. 18C). Insgesamt wurden 83 Meiose II-Figuren von Fliegen untersucht, bei denen es zur Spaltung von Rad21 kommt (*mat-GAL4/UAS-TEV; Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-myc/Rad21^{ex}, Rad21^{TEV}-myc*). Von diesen meiotischen Figuren wiesen 82 eine normale 1:1:1:1 Verteilung der entsprechenden FISH-Signale auf. Lediglich in einem Fall konnte eine Fehlverteilung der entsprechenden Chromosomen nachgewiesen werden, die dann zu einer 0:0:2:2 Verteilung führte (Abb. 18C). Diese Art der Verteilung lässt sich durch *non-disjunction* in Meiose I erklären. Zusammenfassend ist jedoch zu sagen, dass die Oogenese-spezifische Inaktivierung von Rad21 keine bzw. nur sehr milde Segregationsdefekte in Meiose zur Folge hat. Es ist demnach davon auszugehen, dass die mitotische Cohesinuntereinheit Rad21 keine bzw. nur eine untergeordnete kohäsive Funktion in der Meiose ausübt.

2.1.6 Die Expression einer nicht Separase-spaltbaren Version von Rad21 hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Meiose

Eine weitere mögliche Erklärung für das Fehlen von Segregationsdefekten nach artifizierlicher Spaltung von Rad21 wäre, dass noch geringe Mengen an intaktem Cohesin vorhanden sind, und diese ausreichend sind für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion. Da eine quantitative Spaltung kaum realisierbar ist, wurde in einem komplementären Ansatz auf eine mutmaßlich Separase-resistente Rad21-Version zurückgegriffen, von der ein dominanter Effekt zu erwarten ist, weil die Kohäsion nicht mehr Separase-abhängig aufgelöst werden kann. Als Erkennungssequenz für die Separase wurde das Aminosäuremotiv EXXR nachgewiesen, was aber allein nicht ausreichend für eine Separase-abhängige Spaltung ist (Uhlmann *et al.*, 1999). Die Aminosäuresequenz von Rad21 weist drei potentielle Separasespaltstellen auf, wobei die erste Sequenz (EGHR 101-104) sich vermutlich in der globulären Domäne von Rad21 befindet, die ein typisches Merkmal für Kleisinproteine ist und eine Interaktionsfläche mit den SMCs darstellt (Schleiffer *et al.*, 2003). Diese Sequenz scheint demnach nicht als Separase-Substrat erkannt zu werden. Die anderen beiden potentiellen Spaltstellen liegen an den Aminosäurepositionen 172-175 bzw. an 471-474 und damit deutlich außerhalb dieser globulären Domäne. Um eine

Resistenz von Rad21 gegen eine Separase-abhängige Spaltung zu erreichen, wurden in diesen Sequenzbereichen die entsprechenden Arginine zu Alaninen mutiert (Abb. 19A). Die Generierung eines potentiell nicht-spaltbaren Rad21 (Rad21^{NC}) wurde von M. Jordan im Rahmen ihres Forschungspraktikums vorgenommen (Urban *et al.*, 2014). Die Expression einer Separase-resistenten Version von Rad21 sollte erwartungsgemäß eine hohe Toxizität in proliferierenden Geweben aufweisen, da keine korrekte Trennung der Schwesterchromatiden mehr stattfinden kann. Um eine Abschätzung der Toxizität dieses Konstrukts zu erhalten, wurde Rad21^{NC} mittels *ey*-Gal4 während der Augenentwicklung in der Augenimaginalscheibe exprimiert. In den adulten Fliegen, bei denen es zur Expression von Rad21^{NC} kam, waren deutlich reduzierte Augen als Phänotyp zu verzeichnen (Abb. 19B). Diese Beobachtung ist konsistent mit der Hypothese, dass die Mutationen der potentiellen Separasespaltstellen zu den erwarteten Segregationsdefekten in proliferierenden Geweben führen.

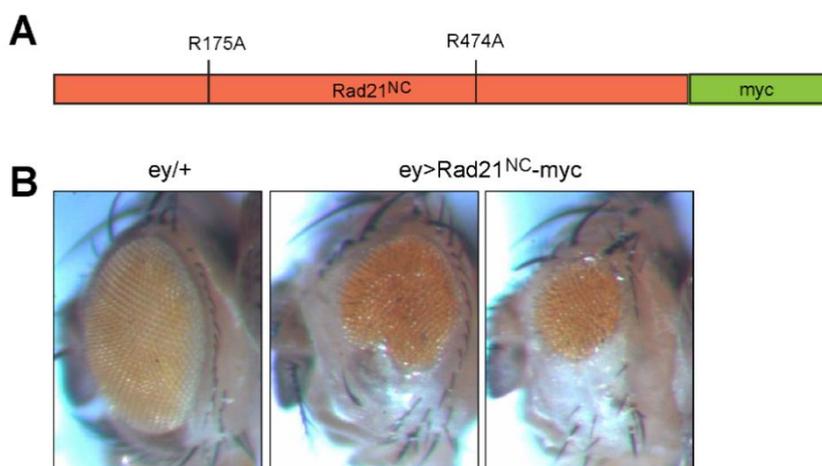


Abbildung 19: Expression einer nicht-spaltbaren Version von Rad21 während der Augenentwicklung führt zur Ausbildung reduzierter Augen (A) Schematische Darstellung von Rad21^{NC}-9myc mit den Mutationen R175A und R474A. (B) Augenphänotypen von Fliegen mit folgenden Genotypen: *ey-Gal4/+* (links) und *ey-Gal4/+; UAS-Rad21^{NC}-9myc/+*. Die Anzucht der Fliegen erfolgte bei 28°C.

Um einen Einfluss der Rad21^{NC}-Expression auf den Verlauf der Meiose zu untersuchen, erfolgte eine MTD-Gal4-abhängige Expression der nicht-spaltbaren Rad21-Version. Diese Treiberlinie kombiniert drei verschiedene Gal4-Konstrukte miteinander (siehe Material und Methoden) und ermöglicht somit eine sehr starke Expression in der Oogenese. Nach MTD-abhängiger Expression wies die Lokalisation des nicht-spaltbaren Rad21s keine merklichen Änderungen zu den bereits beschriebenen TEV-Protease-spaltbaren Varianten auf (Abb. 20A; Vergleich Abb. 8C), jedoch führte die Expression von Rad21^{NC} zur nahezu kompletten Sterilität der entsprechenden Weibchen. Demnach hat die Einführung der modifizierten Separasespaltstellen keinen Einfluss auf die Assoziation der Cohesinuntereinheit mit dem meiotischen Chromatin, jedoch führt die Oogenese-spezifische Expression von Rad21^{NC} zur Sterilität der entsprechenden Weibchen, welche entweder durch Defekte in der Meiose oder in den anschließenden synzytialen Teilungen hervorgerufen wird.

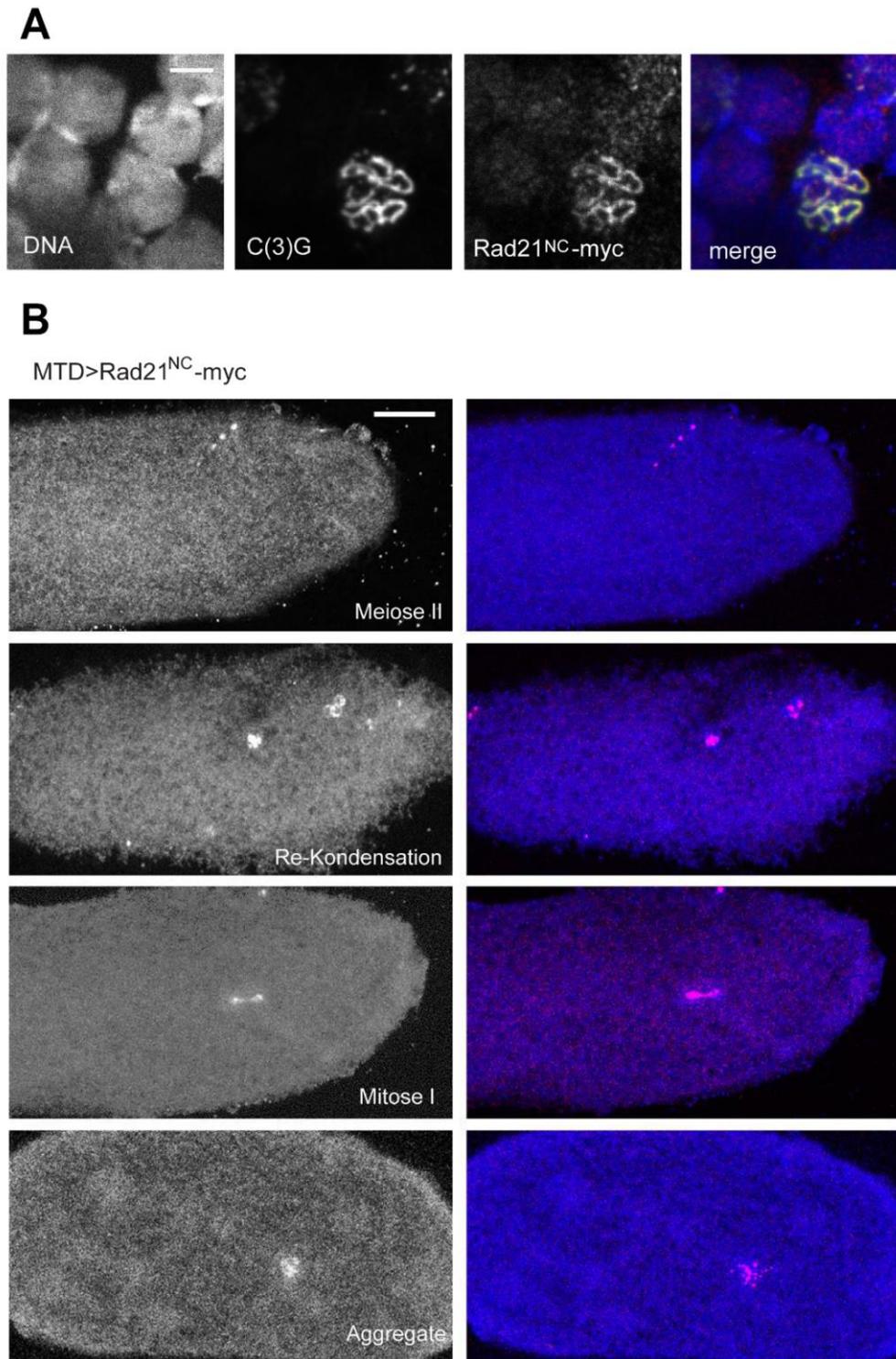


Abbildung 20: Die Expression einer nicht Separase-spaltbaren Version von Rad21 hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Meiose. (A) Chromosomenspreads von Germarien von Weibchen, die Rad21^{NC}-9myc unter Kontrolle von MTD-GAL4 exprimieren. C(3)G ist mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (grün) und das myc-Signal (Rad21^{NC}-9myc) ist in rot gezeigt. Der Größenmaßstab beträgt 5 µm. (B) Repräsentative Darstellungen von überlagerten Z-Ebenen von Embryonen, die von Müttern gelegt wurden, die Rad21^{NC}-9myc unter Kontrolle von MTD-GAL4 exprimieren. X-chromosomale Sonde (359 bp) ist in rot gezeigt. Der Größenmaßstab beträgt 50 µm. In allen Abbildungen ist die DNA mit Hoechst 33258 gefärbt (blau).

Um zu untersuchen, wie die beobachtete Sterilität zustande kommt, wurden FISH-Analysen von 20 Minuten alten Embryonen durchgeführt. Von den insgesamt 230 ausgewerteten Embryonen durchliefen 13 die zweite meiotische Teilung, bei der vier DNA-Massen ausgebildet werden, die von der Peripherie ausgehend ins Innere der Oozyte reichen. Bei keiner der 13 Meiose II-Figuren konnten jedoch Fehlverteilungen des X-Chromosoms oder andere Abnormalitäten, wie zum Beispiel Chromatinbrücken oder ungleichmäßig große DNA-Massen beobachtet werden (Abb. 20B).

In Embryonen, die die Meiose bereits abgeschlossen haben, wiesen die degenerierten Polkörper ebenfalls eine normale Morphologie auf und drei X-Chromosomen-spezifische FISH-Signale, wie im wildtypischen Hintergrund. Durch die maternale Kontribution von Rad21^{NC} kommt es jedoch zu einer deutlichen Beeinträchtigung der ersten mitotischen Teilungen in den betroffenen Embryonen. Bereits in der ersten Mitose waren in einer Vielzahl der Embryonen deutlich ausgeprägte Chromatinbrücken in der Anaphase nachzuweisen, die dann beim Durchlaufen weiterer Teilungen zum Teil auch in großen aggregierten DNA-Massen resultierten (Abb. 20B unten). Diese mitotischen Phänotypen sind konsistent mit der Annahme, dass diese Rad21-Variante tatsächlich resistent gegenüber der Spaltung durch Separase ist. Die Tatsache, dass durch die Expression von nicht-spaltbarem Rad21 derart massive Defekte in den ersten synzytialen Mitosen aufgetreten sind, während der Verlauf von Meiose in keiner Weise eine Beeinträchtigung erfahren hat, bestätigt die Annahme, dass die Separase-abhängige Spaltung von Rad21 keinen Einfluss auf die Chromosomen-segregation in Meiose hat.

2.1.7 Die zentromerische Lokalisation von SOLO zeigt keine Rad21-Abhängigkeit

Ein weiterer Kandidat für ein Protein, welches die Funktion eines meiotischen Kleisins übernehmen könnte, ist SOLO. SOLO wurde erstmals 2010 als ein Protein identifiziert, welches eine kohäsive Funktion in der männlichen Meiose innehat (Yan *et al.*, 2010). In der Oogenese führt das Fehlen von SOLO darüber hinaus zur frühzeitigen Destabilisierung des SCs (Yan und McKee, 2013). Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Rad21, welches ebenfalls zur Stabilität des SCs beiträgt, auch eine Funktion auf die Lokalisation von SOLO ausübt. Hierzu wurde untersucht, wie sich das Lokalisationsverhalten von Venus-SOLO (Yan *et al.*, 2010) nach TEV-Protease-abhängiger Inaktivierung von Rad21 verhält. Im wildtypischen Hintergrund weist SOLO eine deutliche Anreicherung an den Zentromeren auf, was durch eine Kolo-kalisation mit dem Zentromermarkerprotein CID gezeigt werden kann (Abb. 21. oberer Reihe). Dieses Muster ändert sich auch nach Inaktivierung von Rad21 nicht. Wie bereits in Abb. 9 dargestellt ist, führt die Spaltung von Rad21 zur frühzeitigen Disassemblierung des SCs. Die SC-Komponente C(3)G war nur noch in Form von einzelnen an den Zentromeren verbleibenden Signalen nachweisbar (Abb. 10).

Diese rudimentären SC-Signale lokalisieren zusammen mit Venus-SOLO (Abb. 21). Es ist demnach davon auszugehen, dass Rad21 für die zentromerische Lokalisation von SOLO nicht benötigt wird, sondern lediglich einen Einfluss auf die Stabilität des SCs entlang der Chromosomen *cores* besitzt.

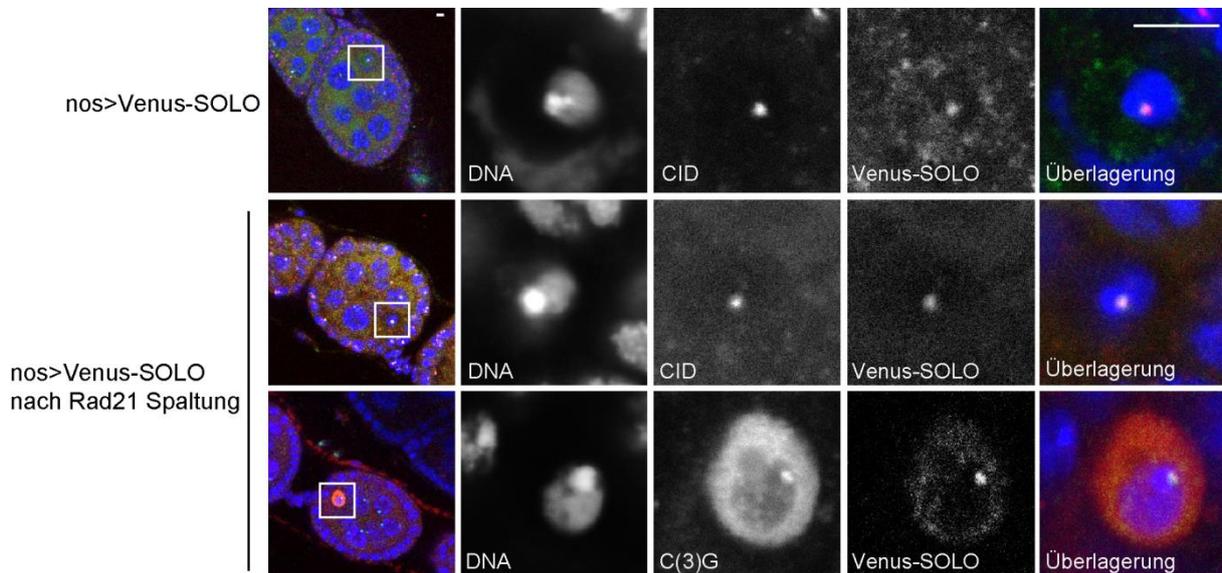


Abbildung 21: Die zentromerische Lokalisation von SOLO wird nach Spaltung von Rad21^{TEV-10myc} nicht beeinflusst. Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen von Eikammern des Stadiums 4 bis 5 von Weibchen, die Venus-SOLO unter Kontrolle von nos-GAL4 im *rad21*-mutanten Hintergrund exprimieren (untere 2 Reihen) oder von Kontrollovarien aus Weibchen, die Venus-SOLO im wildtypischen Hintergrund exprimieren (obere Reihe). Die DNA wurde mit Hoechst 33258 (blau) gefärbt, C(3)G und CID mit entsprechenden Antikörpern (rot) und der immunologische Nachweis von Venus-SOLO erfolgte mit EGFP-spezifischen Antikörpern (grün). Eingerahmt sind die im rechten Teil vergrößert gezeigten Bereiche. Der Größenmaßstab beträgt 5 µm.

2.2 Funktionsanalyse von SOLO in der weiblichen Meiose

In *solo*-mutanten Männchen findet eine frühzeitige Trennung der Schwesterzentromere statt, *non-disjunction*-Ereignisse treten auf und die Lokalisation von SMC1 am meiotischen Chromatin ist ebenfalls gestört (Yan *et al.*, 2010). Darüber hinaus weist SOLO eine Kolo-kalisation mit SMC1 im Verlauf der Meiose auf, die durch das Einbringen von *mei-S332* Mutationen (*Drosophila* Homolog von Shugoshin) beeinträchtigt wird (Yan *et al.*, 2010). All diese Beobachtungen liefern den ersten Hinweis auf eine kohäsive Funktion von SOLO in Assoziation mit den übrigen Cohesinuntereinheiten. Um nun zu untersuchen, ob SOLO als funktionelles Homolog von Rec8 fungiert, wurden verschiedene Eigenschaften dieses Proteins charakterisiert und anschließend mit denen von Rec8 bzw. Rad21 verglichen, um dann Rückschlüsse ziehen zu können, ob es sich bei SOLO möglicherweise um einen integralen Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes handelt.

2.2.1 Lokalisation von SOLO entlang der Chromosomen cores ist C(2)M-abhängig

Um einen Überblick über die Lokalisation von SOLO während der Oogenese zu erhalten, wurden transgene Fliegen generiert, die EGFP-SOLO unter UAS-Kontrolle exprimieren. Nach *nos-Gal4* abhängiger Expression zeigt sich eine deutliche zentromerische Anreicherung dieses Fusionsproteins, welches sowohl in Pro-Oozyten als auch in den Pro-Nährzellen nachweisbar ist (Abb. 22A). Diese zentromerische Akkumulation bleibt auch in den späteren Oozytenkernen und in den Nährzellen erhalten. Mit dem Ende der Prophase I setzt dann eine kontinuierliche Dissoziation des zentromerischen Signals ein (Abb. 22A, Daten nicht gezeigt).

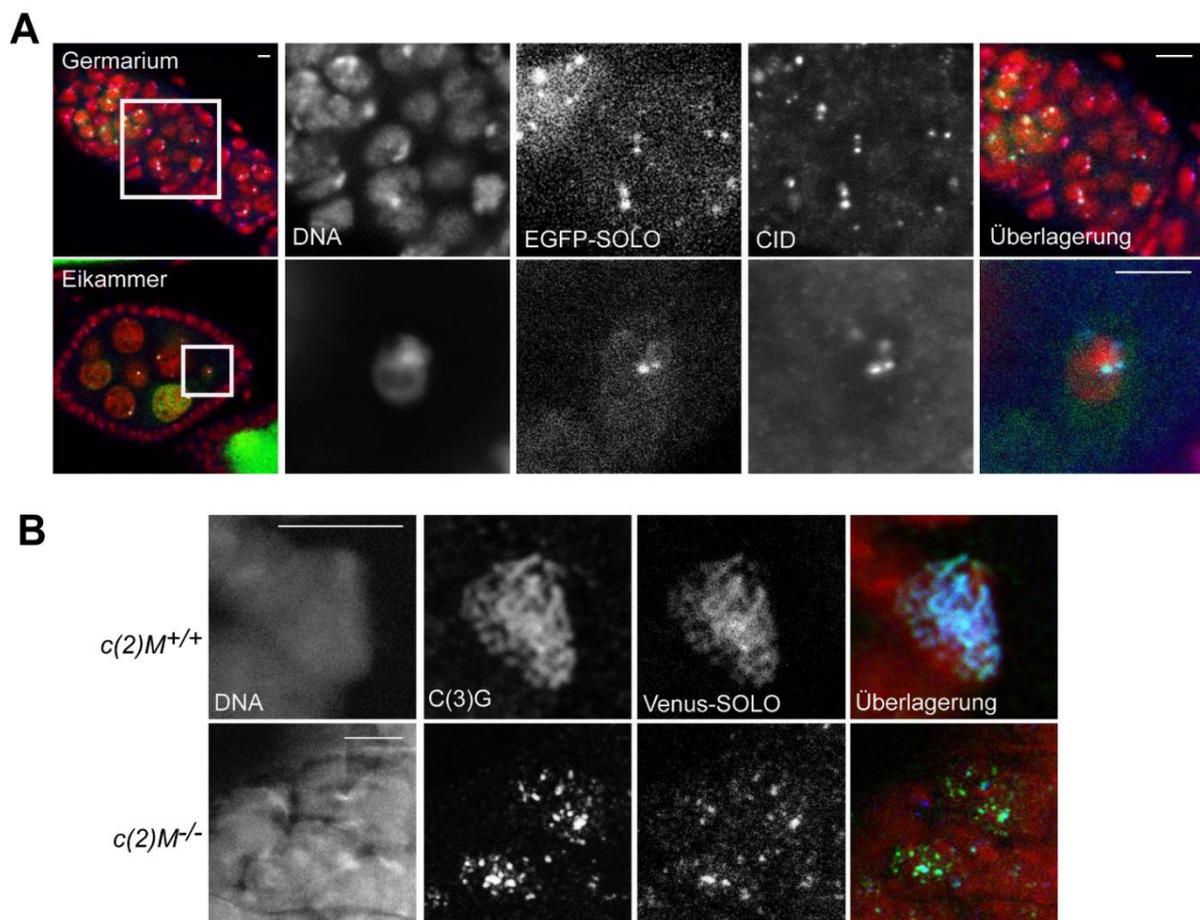


Abbildung 22: Lokalisation von SOLO an die Chromosomen cores ist C(2)M-abhängig. (A) Zentromerische Akkumulation von EGFP-SOLO nach *nos-Gal4*-getriebener Expression. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 (rot) gefärbt, CID mit entsprechenden Antikörpern (blau) und der immunologische Nachweis von EGFP-SOLO erfolgte mit EGFP-spezifischen Antikörpern (grün). Eingerahmt sind die im rechten Teil vergrößert gezeigten Bereiche. (B) Immunfluoreszenzanalysen an Chromosomenspreads. Gezeigt ist die DNA in rot (gefärbt mit Hoechst 33258), C(3)G in grün und Venus-SOLO (anti-EGFP) in blau. Der Genotyp der entsprechenden Fliegen lautet: (obere Reihe) *nos-Gal4/+; Venus-SOLO/+*, (untere Reihe) *nos-Gal4, C(2)M^{EP}/nos-Gal4, C(2)M^{EP}; UAS-Venus-SOLO/TM3, Ser*. Der Größenmaßstab beträgt 5 μm .

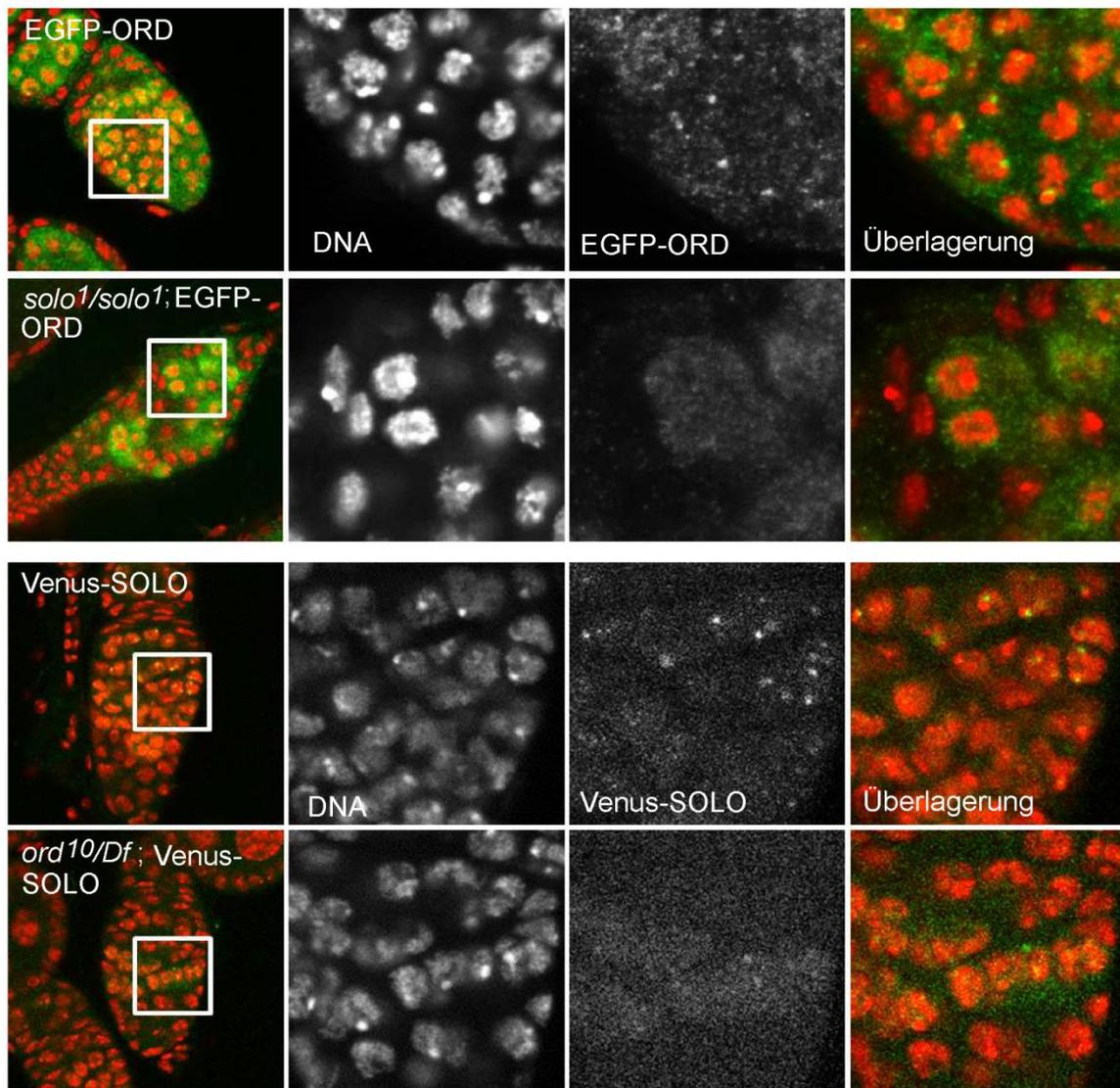
Dieses Lokalisationsverhalten deckt sich mit dem bereits beschriebenen Verhalten von Venus-SOLO (Yan und McKee, 2013), sodass in den folgenden Experimenten mit beiden transgenen Linien weiter gearbeitet wurde. Beide SOLO-Versionen sind vollständig funktionell, da beide Transgenprodukte (Venus-SOLO und EGFP-SOLO) in der Lage sind den Kohäsionsdefekt aufzuheben, der im *solo*-mutanten Hintergrund auftritt (Daten nicht gezeigt, Abbildung 25E). Eine C-terminale Fusion mit EGFP hingegen verhinderte die zentromerische Akkumulation von SOLO-EGFP (Daten nicht gezeigt). Vorstellbar wäre hier, dass möglicherweise bestimmte regulatorische Bereiche oder Interaktionsflächen in dieser C-terminalen Region essentiell für die Lokalisation sind und durch die Fusion mit EGFP maskiert werden.

Mit Hilfe von Chromosomenspreads konnte eine SC-spezifische Lokalisation von SOLO an den Chromosomen *cores* nachgewiesen werden (Yan und McKee, 2013), die im *c(2)M*-mutanten Hintergrund vollständig verloren geht (Abb. 22B). Das Fehlen von C(2)M führt zur vollständigen Fragmentierung des C(3)G-Signals (Manheim und McKim, 2003) und damit einhergehend auch zur Fragmentierung des SOLO-Signals. Die stärksten sichtbaren C(3)G-Fluoreszenzsignale im *c(2)M*-mutanten Hintergrund sind zentromerische Regionen (Khetani und Bickel, 2007). Diese Bereiche sind auch durch eine deutliche Kollokalisation mit Venus-SOLO gekennzeichnet (Abb. 22B). Somit besitzt die Lokalisation von SOLO an die Chromosomen *cores* eine C(2)M-Abhängigkeit, wohingegen die zentromerische Akkumulation nicht von C(2)M abhängt.

2.2.2 Die zentromerische Akkumulationen von ORD und SOLO weisen eine gegenseitige Abhängigkeit auf

Die Proteine SOLO und ORD weisen Ähnlichkeiten in Bezug auf ihre Lokalisation und Funktion während der Oogenese auf (Yan und McKee, 2013, Webber *et al.*, 2004). Deshalb wurde untersucht, inwiefern sich beide Proteine in ihrer Lokalisation gegenseitig beeinflussen. Da für beide Proteine kein Antikörper verfügbar war, wurde auf fluoreszenzmarkierte Versionen zurückgegriffen, die in der Oogenese ektopisch exprimiert wurden. Diese Versionen weisen eine vollständige Funktionalität auf (Balicky *et al.*, 2002, Yan *et al.*, 2010), sodass ein identisches Lokalisationsverhalten der endogenen Proteine angenommen wird. In Yan *et al.*, 2010 konnte in Männchen bereits eine ORD-Abhängigkeit der zentromerischen Lokalisation von SOLO beschrieben werden.

A



B

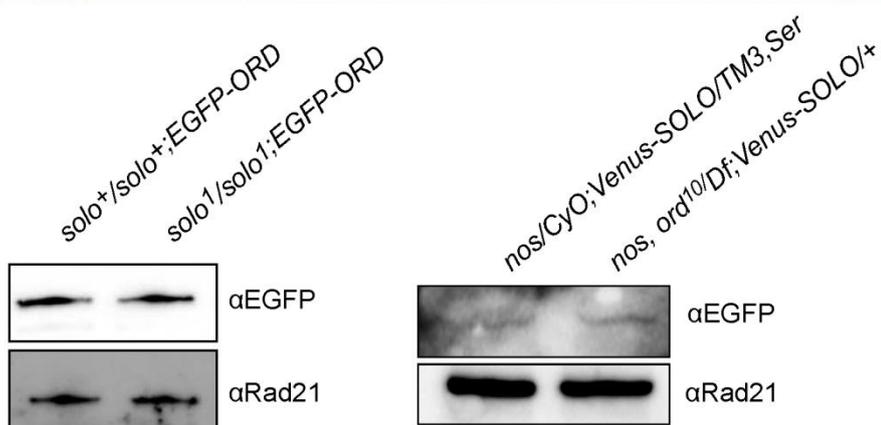


Abbildung 23: Gegenseitige Abhängigkeit der zentromerischen Lokalisation von SOLO und ORD (A) Repräsentative Darstellungen von Germarien. Eingerahmt sind die im rechten Teil gezeigten Bereiche, dabei ist die DNA in rot gezeigt (gefärbt mit Hoechst 33258) und Venus-SOLO bzw. EGFP-ORD in grün gezeigt. Der Größenmaßstab beträgt jeweils 5 μ m. (B) Immunblot zur Quantifizierung der ORD- und SOLO-Menge bei Fehlen des entsprechenden anderen Proteins. Der Nachweis von Venus-SOLO und EGFP-ORD erfolgte mit EGFP-spezifischen Antikörpern. Geladen wurden jeweils 2 Ovarienäquivalente von Fliegenweibchen mit den angegebenen Genotypen. Die Sondierung von Rad21 dient als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen, ob in Weibchen diese Abhängigkeit ebenfalls gegeben ist, wurden *ord*-mutante Fliegen generiert, die gleichzeitig Venus-SOLO exprimieren. Darüber hinaus wurde analysiert, wie ORD im *solo*-mutanten Hintergrund lokalisiert. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, verhindert die Abwesenheit eines der beiden Proteine die zentromerische Lokalisation des jeweiligen anderen. Das Gesamtlevel beider Proteine in den Ovarien ändert sich jedoch nicht, was eine Degradation ausschließt (Abb. 23B). Die Tatsache, dass SOLO und ORD sich gegenseitig in ihrer Lokalisation während der Meiose in Weibchen beeinflussen, liefert nun einen weiteren Beweis für eine Interaktion dieser beiden Proteine.

2.2.3 Kohäsionsverlust der Schwesterzentromere im *solo*-mutanten Hintergrund

Das Fehlen von SOLO führt in der männlichen Meiose zu einem deutlich ausgeprägtem Kohäsionsverlust der Schwesterzentromere (Yan *et al.*, 2010). Dabei kommt es bereits in der späten Prophase I zur Aufspaltung der CID-Signale. Erwartet wären zu diesem Zeitpunkt der Meiose 8 Signale, jedoch lassen sich im *solo*-mutanten Hintergrund bis zu 16 CID-Signale nachweisen, was auf einen vollständigen Kohäsionsverlust zurückzuführen ist. In wildtypischen Oozytenkernen sind in Prophase I aufgrund der Homologenpaarung maximal vier CID-Signale erwartet, wobei jedes Signal einem der vier Bivalenten entspricht. In den meisten Fällen sind jedoch weniger als vier Signale nachweisbar, da die Zentromere der Kerne, die im späteren Verlauf der Meiose einen SC ausbilden, geclustert vorliegen (Khetani und Bickel, 2007, Tanneti *et al.*, 2011). Diese Zentromercluster bilden dann die Grundlage für die in diesem Bereich ausgehende Initiation der Synapsis (Takeo *et al.*, 2011). Eine Erhöhung der Anzahl der CID-Signale auf 4 ist demnach nur auf den Verlust der Zentromerassoziation zurückzuführen, nicht jedoch auf einen Kohäsionsverlust.

Die Analyse der kohäsiven Funktion von SOLO erfolgt durch Kreuzen von Fliegen, welche heterozygot für die beiden *solo*-Allele *solo*¹ und *solo*² sind. Diese Allele sind Punktmutationen, welche jeweils ein vorzeitiges Stoppkodon an Stelle der Tripletts der Aminosäuren 387 (*solo*¹) und 1010 (*solo*²) einführen (Abb. 24A). In den daraus resultierenden trans-heterozygoten *solo*¹/*solo*²-Weibchen waren in den Eikammern der Stadien 4 bis 7 hauptsächlich fünf bis sieben CID-Signale nachweisbar (Abb. 24B,C), was auf einen Kohäsionsverlust in Prophase I hindeutet. Eine Anzahl von 16 Zentromersignalen würde einen kompletten Verlust der Kohäsion andeuten. Da jedoch nur in einigen wenigen Fällen eine maximale Anzahl von 9 Signalen nachweisbar ist, ist davon auszugehen, dass in der Prophase I entweder keine vollständige Auflösung der zentromerischen Kohäsion der Schwesterchromatiden stattgefunden hat oder dass die einzelnen Signale aufgrund ihrer relativen Nähe zueinander nicht voneinander getrennt werden konnten.

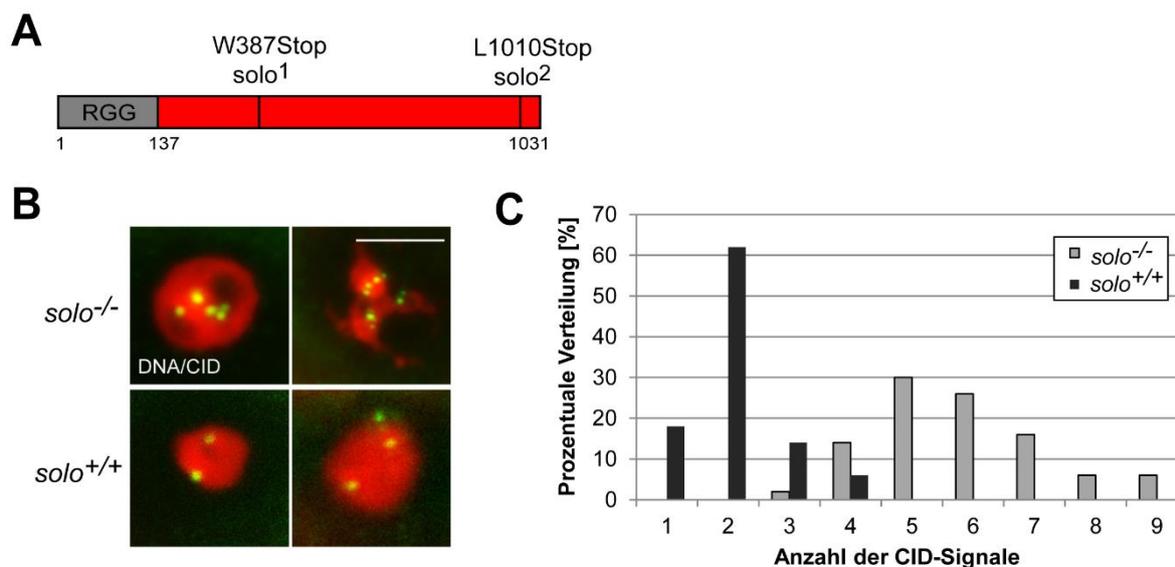


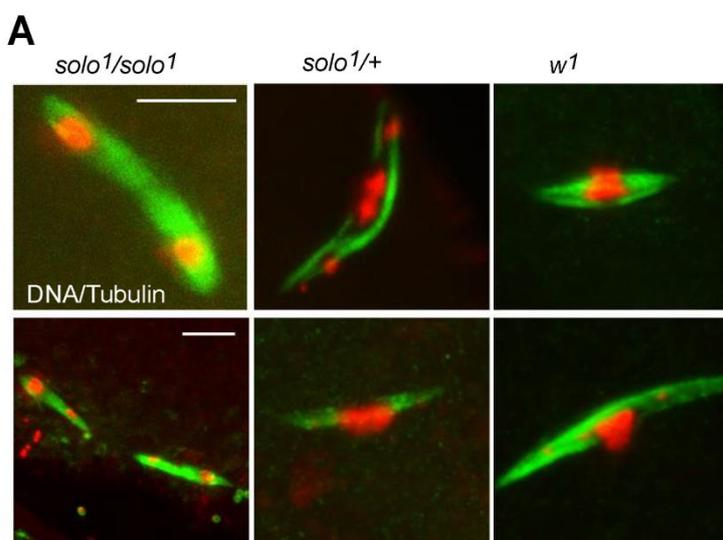
Abbildung 24: Kohäsionsverlust der Schwesterzentromere im *solo*-mutanten Hintergrund. (A) Schematische Darstellung von SOLO (AS: 1-1031). Markiert sind die RGG-repeats (grau, AS: 1-137) und die entsprechenden Mutationen der Allele *solo*¹ (W387Stop) und *solo*² (L1010Stop). (B) Repräsentative Darstellungen von Oozytenkernen aus Eikammern des 6. Stadiums von *solo*¹/*solo*²-Weibchen (*solo*^{-/-}) und von *w*¹-Weibchen (*solo*^{+/+}). Die DNA ist in rot gezeigt (gefärbt mit Hoechst 33258) und CID in grün. Der Größenmaßstab beträgt 5 µm. (C) Quantifizierung der prozentualen Verteilung der Anzahl der CID-Signale in den ausgewerteten Oozytenkernen (n=51). Die Genotypen sind die in (B) beschriebenen.

Ähnliche Daten wurden in parallel-durchgeführten Untersuchungen der Arbeitsgruppe von B. McKee erhalten, die darüber hinaus noch eine Zunahme der Kohäsionsdefekte im Verlauf der Meiose nachgewiesen haben (Yan und McKee, 2013). Hier waren in frühen Stadien der Oogenese kaum mehr als 8 CID-Signale zu finden, wohingegen zum Ende des Pachytäns auch häufig 9-12 CID-Signale aufgetreten sind.

2.2.4 *solo*-mutante Oozyten können keinen stabilen Metaphase-I-Arrest aufrechterhalten

solo-mutante Oozyten sind durch einen massiven Kohäsionsverlust (siehe 2.2.3) und eine reduzierte Rekombinationsrate gekennzeichnet (Yan und McKee, 2013). Daran anknüpfend wurde im nächsten Schritt getestet, inwiefern diese Oozyten noch in der Lage sind einen Meiose I-Arrest aufrechtzuerhalten. In Weibchen, bei denen es zu einer Beeinträchtigung der meiotischen Rekombination kommt, steigt auch immer der Anteil an Oozyten in denen keine *crossover* ausgebildet werden. Diese Oozyten sind dann nicht mehr in der Lage einen stabilen Metaphase I-Arrest aufrechtzuerhalten (McKim *et al.*, 1993). In *ord*-mutanten Oozyten ist die *crossover*-Anzahl etwa um das 6-fache reduziert (Mason, 1976), jedoch konnte in keiner der untersuchten *ord*-mutanten Oozyten eine normale Metaphase I-Spindel nachgewiesen werden, obwohl in etwa 16,7% der Oozyten *crossover* ausgebildet werden (Bickel *et al.*, 2002). Demnach wird ORD für die Aufrechterhaltung und Stabilisierung der Chiasmata benötigt, was wiederum essentiell für die Etablierung eines stabilen Metaphase I-

Arrests ist (Bickel *et al.*, 2002). *solo*-mutante Oozyten sind ebenfalls durch eine reduzierte Rekombinationsrate gekennzeichnet (Yan und McKee, 2013). Die Reduktion der *crossover*-Anzahl liegt dabei in einer vergleichbaren Größenordnung wie die der *ord*-mutanten Oozyten (10-fache für SOLO bzw. 6-fache Reduktion für ORD; Yan und McKee, 2013, Mason, 1976). Um zu überprüfen, ob SOLO ebenfalls eine Funktion bei der Aufrechterhaltung des Metaphase I-Arrests erfüllt, wurden Oozyten isoliert, mit Ultraschallimpulsen aufgeschlossen und zur Visualisierung der der Meiose-Spindel mit Tubulin-spezifischen Antikörpern gefärbt. Ein Großteil der *solo*-mutanten Oozyten wies deutlich fragmentierte DNA-Massen auf (Abb. 25A). In einigen Fällen zeigten sich sogar zwei Spindeln mit insgesamt vier DNA-Massen, welche typisch für Meiose II-Figuren sind (Abb. 25 A, untere Reihe, links).



B

	Meiotische Figuren (n)	Prometaphase I	Metaphase I	Anaphase I oder später
<i>solo1/solo1</i>	72	44,4	1,4	54,2
<i>solo1/+</i>	41	29,3	53,7	17,1
<i>w1</i>	41	14,6	85,4	0,0

Abbildung 25: *solo*-mutante Oozyten können keinen stabilen Metaphase I-Arrest aufrechterhalten. Repräsentative Darstellung von überlagerten Z-Stapeln einzelner Oozyten. Die DNA ist in rot gezeigt (gefärbt mit Hoechst 33258) und Tubulin in Grün. Der Genotyp der entsprechenden Weibchen ist angegeben. Der Längenmaßstab beträgt in allen Bildern 10 μ m. Im Bild unten links ist eine andere Vergrößerung gewählt. Der eingetragene Maßstab entspricht jedoch ebenfalls 10 μ m. (B) Tabellarische Auflistung der prozentualen Verteilung der meiotischen Figuren.

In einem Großteil der untersuchten Oozyten konnten deutliche Meiose-I-Spindeln nachgewiesen werden. Jedoch lagen die Chromosomen nicht als eine bzw. zwei eng beieinanderliegende DNA-Massen zentral in der Spindel positioniert, wie es charakteristisch für Metaphase-arretierte Oozyten ist (Abb. 25, obere Reihe rechts), sondern waren deutlich weiter voneinander getrennt. Dieser Phänotyp ist charakteristisch für die Segregation der Chromosomen während der Anaphase. Geht man nun von einer Reduktion der

Rekombinationsfrequenz auf etwa 10% aus (entspricht einer reduzierten Rekombinationsrate um das 10-fache), sollte man auch einen solchen Anteil an Metaphase I-arretierte Oozyten nachweisen können. Von den untersuchten 72 Oozyten zeigte sich jedoch nur einmal ein stabiler Metaphase I-Arrest (Abb. 25B), bei dem das einzige Chromatinsignal innerhalb der Metaphaseplatte angeordnet war. Da die Anzahl der beobachteten Metaphase I-Arreste deutlich unterhalb des erwarteten Wertes liegt, scheint SOLO, genau wie ORD, eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Chiasmata bzw. auf deren Stabilität zu haben. Bei den heterozygot-mutanten Oozyten waren bei 17% der untersuchten Fälle meiotische Figuren zu finden, die keinen stabilen Metaphasearrest aufrechterhalten konnten. Somit ist auch bei diesen Individuen die Rekombination vermutlich deutlich eingeschränkt, was sich auch darin äußert, dass sich bei einer Vielzahl der Metaphase I-Figuren einzelne Chromosomen außerhalb der kompaktierten DNA-Masse befinden (Abb. 25A, obere Reihe Mitte). Im Normalfall liegen nur die 4. Chromosomen außerhalb der Metaphaseplatte, da diese Chromosomen keine Chiasmata ausbilden (Übersichtsartikel: Hochman, 1976).

Das Fehlen von SOLO und ORD hat demnach ähnliche Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung des Metaphase I-Arrests. Beide Proteine wirken somit nicht nur im selben *pathway* auf die meiotische Rekombination (Yan und McKee, 2013, Mason, 1976) und den *Homolog Bias* (Reparatur der DSBs mit Hilfe der homologen Chromosomen, Yan und McKee, 2013, Webber *et al.*, 2004), sondern fungieren eventuell auch bei der Stabilisierung der Chiasmata zusammen in einem Komplex.

2.2.5 Die RGG-repeats haben keine Funktion auf die Lokalisation von SOLO und die Kohäsion

Im N-terminalen Bereich von SOLO (AS: 1-137) liegen RGG-*repeats*, die typischerweise in RNA-bindenden Proteinen zu finden sind (Alex und Lee, 2005). Um zu untersuchen, ob dieses Motiv eine essentielle Funktion bei der Cohesinassoziation, der SC-Assemblierung oder der Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion hat, wurden Fliegen generiert, die eine verkürzte SOLO-Version exprimieren, bei der die ersten 137 Aminosäuren deletiert sind (Abb. 26A). Die Expression erfolgte mit nos-Gal4. Das Proteinlevel wies lediglich eine geringe Reduktion gegenüber dem entsprechenden EGFP-fusioniertem SOLO-Konstrukt voller Länge auf (Abb. 26B). Darüber hinaus konnte mit Hilfe der durchgeführten Chromosomenspreads keine signifikante Änderung im Lokalisationsverhalten des verkürzten Proteins festgestellt werden (Abb. 26C). Somit wird das RNA-Bindemotiv von SOLO für eine SC- bzw. Chromatin-assoziierte Lokalisation nicht benötigt.

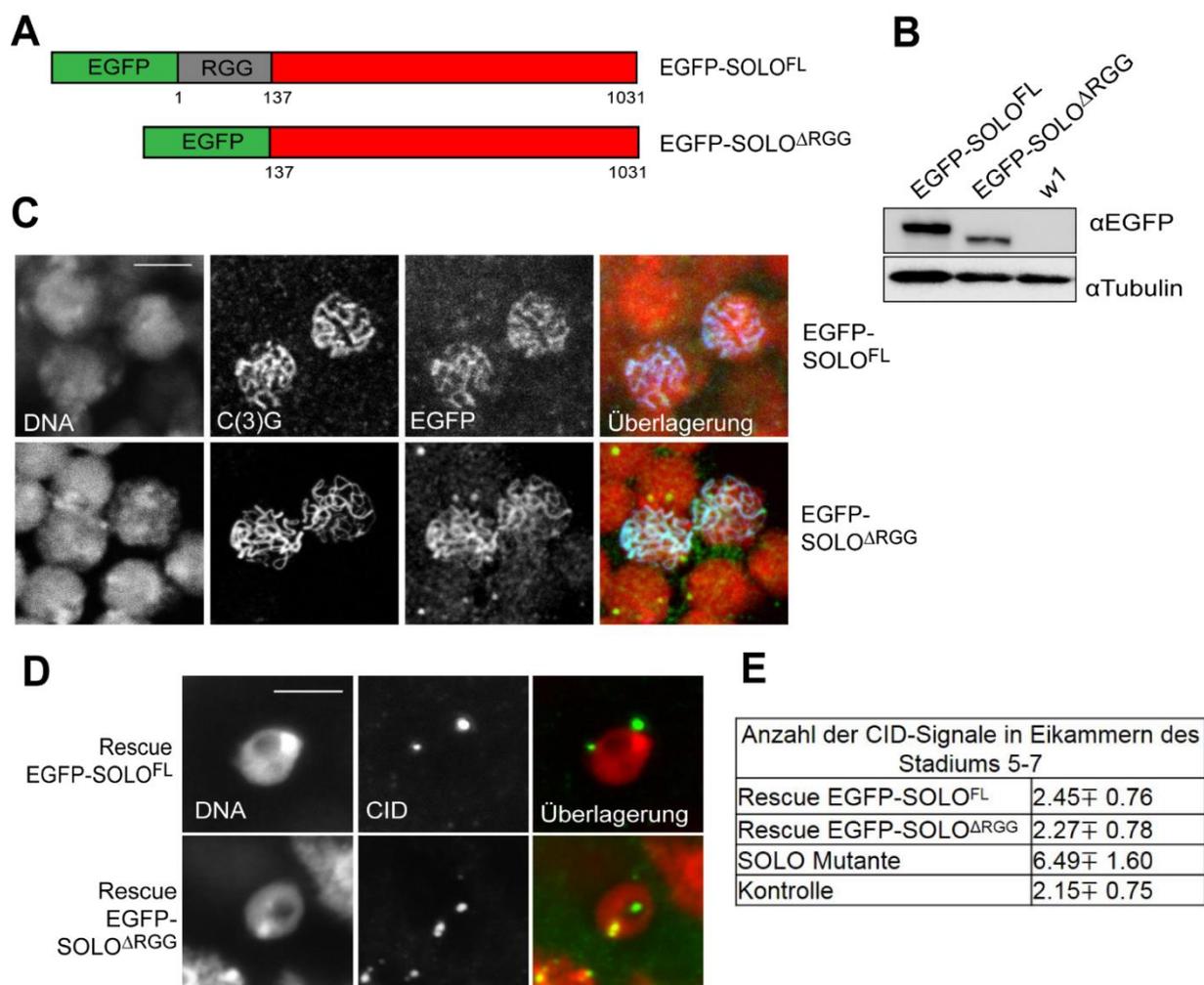


Abbildung 26: Die RGG-repeats haben keine Funktion auf die Lokalisation von SOLO und die Kohäsion. (A) Schematische Darstellung von SOLO. Die Zahlen unterhalb der Grafik geben die entsprechenden AS-Positionen innerhalb des Proteins an. Markiert sind die RGG-repeats (grau) und EGFP in grün. (B) Immunblot zur Abschätzung der Proteinlevel nach nos-GAL4 getriebener Expression von EGFP-SOLO^{FL} und EGFP-SOLO^{ΔRGG}. Der Nachweis der fluoreszenzmarkierten Konstrukte erfolgte mittels EGFP-spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde anti-Tubulin sondiert. Geladen wurden jeweils zwei Ovarienäquivalente. (C) Immunfluoreszenzanalysen an Chromosomenspreads. Gefärbt ist die DNA in rot (gefärbt mit Hoechst 33258), C(3)G in blau und EGFP-SOLO^{FL/ΔRGG} (anti-EGFP) in grün. (D) Repräsentative Darstellungen von Oozytenkernen von Eikammern des 6. Stadiums. Die DNA ist in rot gezeigt (gefärbt mit Hoechst 33258) und CID in grün. Der Genotyp der entsprechenden Fliegen lautet: *solo*¹/*solo*²; *nos-GAL4/UASp-EGFP-SOLO*^{FL/ΔRGG}. Der Längenmaßstab beträgt 5 μm. (E) Durchschnittliche Anzahl der CID-Signale in den Oozytenkernen von Eikammern des Stadiums 5-7. Genotypen der verwendeten Fliegen: *solo*¹/*solo*²; *nos-GAL4/UASp-EGFP-SOLO*^{FL/ΔRGG} (Rescue EGFP-SOLO^{FL/ΔRGG}), *solo*¹/*solo*² (SOLO Mutante), *w*¹ (Kontrolle). Ausgezählt wurden jeweils 20 Eikammern.

Um Rückschlüsse auf die Funktionalität dieses verkürzten Konstrukts zu ziehen, erfolgte eine Expression im *solo*-mutanten Hintergrund. Mit Hilfe von CID-Färbungen wurde untersucht, inwiefern es zu einer möglichen Beeinträchtigung der Kohäsion in der weiblichen Meiose kommt. Im wildtypischen Hintergrund findet man an den Oozytenkernen von Eikammern des Stadiums 5 bis 7 im Durchschnitt $2,07 \pm 0,74$ CID-Signale. Diese Zahl ist bei Expression von EGFP-SOLO^{FL} im *solo*-mutanten Hintergrund nur unwesentlich erhöht

($2,45 \pm 0,76$) und auch die Expression von EGFP-SOLO^{ΔRGG} hatte kaum einen Einfluss auf die Kohäsion der Schwesterzentromere ($2,27 \pm 0,78$; Abb. 26D,E). Weiterhin wurde mit Hilfe von 2-Hybridanalysen untersucht, inwiefern das N-terminal-verkürzte SOLO-Konstrukt noch in der Lage ist mit SMC1 zu interagieren. Hierbei konnten keine Unterschiede zur nicht-trunkierten SOLO-Version festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Demnach haben die RGG-*repeats* keine Funktion für die Rekrutierung von SOLO ans meiotische Chromatin und auch nicht für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion.

2.2.6 SOLO ist kein integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes

SOLO ist essentiell für die meiotische Kohäsion, die homologe Rekombination und die Synapsis. Weiterhin weist es eine Assoziation mit SMC1 auf (Yan und McKee, 2013). Daher waren die ersten Überlegungen über die Funktionsweise dieses Proteins dahingehend, dass es als Rec8-Homolog fungiert und die Funktionen eines meiotischen α -Kleisinproteins übernimmt (Yan und McKee, 2013). Würde man erwarten, dass SOLO eine integrale Komponente eines meiotischen Cohesinkomplexes ist, dann sollte die Interaktion mit SMC1 über die *head*-Domäne vermittelt werden und außerdem eine Assoziation mit SMC3 vorhanden sein. Weiterhin interagieren α -Kleisine auch noch mit der akzessorischen Untereinheit Scc3. Um abzuklären, ob SOLO als integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes in Frage kommt, wurden verschiedene Hefe 2-Hybridanalysen durchgeführt, die zeigen sollten, ob die Bindestellen von Rad21 und SOLO an SMC1 identisch sind und ob eine Assoziation von SOLO mit SMC3 und Scc3 nachweisbar ist.

2.2.6.1 SOLO und Rad21 binden an unterschiedliche Bindestellen an SMC1

Die von Yan und McKee, 2013 durchgeführten Immunpräzitationen weisen auf eine Assoziation von SOLO und SMC1 hin. Darauf aufbauend wurde mit Hilfe von 2-Hybridanalysen zunächst untersucht, an welchen Bereich von SMC1 SOLO bindet. Hierzu wurde ein 2-Hybrid-Konstrukt der *head*-Domäne von SMC1 generiert, bei dem der N-Terminus von SMC1 (AS: 1-213) direkt mit dem C-Terminus (AS: 1082-1238) fusioniert wurde. Als Linker zwischen beiden Domänen wurden 5 Glycine eingebaut. Dieses Konstrukt (SMC1_{head}) zeigte eine deutliche Interaktion mit SOLO (Abb. 27A, unten). Darüber hinaus wurde getestet, ob SOLO eventuell auch an die *hinge*-Domäne von SMC1 (AS: 535-654) bindet. Hier konnte kein Wachstum auf den entsprechenden Selektivplatten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

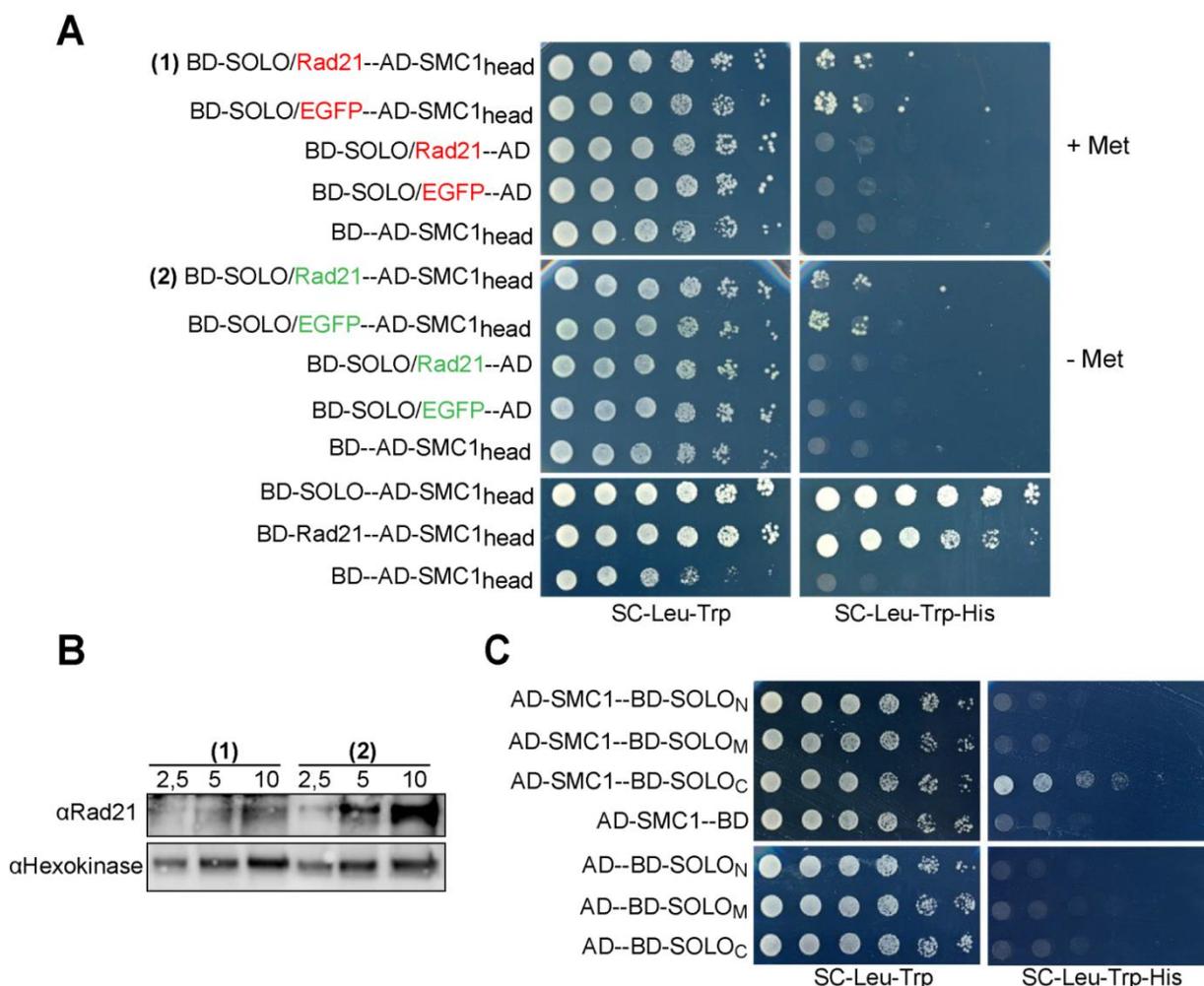


Abbildung 27: Die Expression von Rad21 hat keinen Einfluss auf die Interaktion von SMC1 und SOLO. Hefe 2-Hybridassay. Es wurden Fusionen der entsprechenden Proteine mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und der Bindungsdomäne (BD) exprimiert. Die Hefen wurden suspendiert, auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und dann unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 und 1:3125 aufgetragen. Verwendet wurden SC-Leu-Trp(-Met)- sowie SC-Leu-Trp-His(-Met)-Platten. Die grüne bzw. rote Beschriftung zeigt an, ob eine Methionin-abhängige Genexpression von Rad21 bzw. EGFP induziert ist oder nicht. Für die oberen beiden Platten wurde der Hefestamm AH109 (nicht Methionin-auxotroph) verwendet. Für die auf der unteren Platte gezeigten Interaktionen der Stamm PJ69-7A (Methionin auxotroph). (B) Immunblot zum Nachweis der Methionin-abhängigen Induktion von Rad21. Gewählt wurden hierbei die in Abb. A mit (1) und (2) gekennzeichneten Hefetransformatanten. Der Nachweis des Rad21-Proteinlevels erfolgte mit Rad21-spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde anti-Hexokinase sondiert. Aufgetragen wurde eine Verdünnungsreihe. Hierzu wurde eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt, die entsprechenden Proteine isoliert und dann 2,5, 5 bzw. 10 µl des Lysats aufgetragen. (C) Hefe 2-Hybridassay (PJ69-7A) zur Analyse, welcher Bereich von SOLO für eine Interaktion mit SMC1 ausreichend ist. Die Durchführung des Assays erfolgte wie in (A) beschrieben. SOLO_N entspricht den AS: 1-362, SOLO_M: AS 363-735, SOLO_C: AS 736-1031.

Um die SMC1-Bindungsstelle in SOLO genauer zu charakterisieren, wurden verkürzte Proteinfragmente von SOLO generiert und jeweils untersucht, ob die Interaktion mit SMC1 weiterhin vermittelt werden kann. Nach Expression eines C-terminalen Fragments von SOLO (AS: 736-1031) konnte Wachstum auf den entsprechenden Selektivplatten nachgewiesen werden (Abb. 27C). Somit interagiert der C-Terminus von SOLO mit der *head*-Domäne von SMC1, welche gleichzeitig als Interaktionsfläche für die mitotische Cohesinuntereinheit Rad21 dient.

Um zu testen, ob beide Proteine an die gleiche Stelle innerhalb der *head*-Domäne von SMC1 binden, und ob SOLO Rad21 eventuell aus einem bestehenden Cohesinkomplex verdrängen kann, wurden die 2-Hybridinteraktionsstudien erweitert, indem neben SOLO gleichzeitig Rad21 exprimiert wurde. Hierfür wurde auf den Vektor pBridge zurückgegriffen, der die Expression von zwei Genen ermöglicht. Dabei erfolgte die Expression von SOLO, welches mit der Gal4-Bindedomäne fusioniert wurde, unter Kontrolle des konstitutiven ADH1-Promotors und die Rad21- bzw. EGFP-Expression durch den MET25-Promotor bei Abwesenheit von Methionin in den entsprechenden Medien. Da für dieses erweiterte 2-Hybridexperiment mit Selektivplatten ohne Methionin gearbeitet wurde, musste auf einen anderen Hefestamm zurückgegriffen werden, da der für die bisherigen Interaktionsstudien verwendete Stamm Methionin auxotroph war und so ohne die Zugabe dieser Aminosäure nicht lebensfähig ist. Wie in Abbildung 27A zu sehen ist, führt die Induktion von Rad21 bzw. von EGFP (grün markiert) zu keiner Änderung des Wachstumsverhaltens der Hefetransformanten. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion von SOLO mit SMC1 durch das gleichzeitige Vorhandensein von Rad21 nicht beeinflusst/unterdrückt wird. Die Expression von Rad21 auf Medien ohne Methionin wurde über Immunblots nachgewiesen (Abb. 27B). Somit konnte mit diesem Interaktionsassays in Hefe kein Hinweis dafür erbracht werden, dass Rad21 und SOLO an dieselbe Stelle der *head*-Domäne von SMC1 binden.

Da in Hefe 2-Hybridexperimenten häufig Artefakte auftreten können, wurde ein alternativer Ansatz in *Drosophila* verfolgt, mit dessen Hilfe ebenfalls nachgewiesen werden sollte, ob die SMC1-Bindestellen von Rad21 und SOLO identisch sind. Hierzu wurde mittels *in vivo* Mikroskopie die Rekrutierung von Rad21 ans Chromatin im Verlauf mehrerer Kernteilungen untersucht. Anschließend wurde überprüft, ob die gleichzeitige ektopische Überexpression von SOLO einen Einfluss auf die Rad21-EGFP Lokalisation im Verlauf der synzytialen Teilungen hat.

In der Interphase kommt es zu einer Chromatin-assoziierten Lokalisation von Rad21-EGFP, die zu Beginn der Mitose abnimmt und nur noch als diffuses Signal erkennbar ist (Abb. 28A oben). Durch phosphorylierungsabhängige Prozesse in der Prophase der Mitose wird der Großteil des an den Chromosomenarmen befindlichen Cohesins abgelöst (Prophase Weg). Nur noch die zentromerische Fraktion verbleibt bis zum Metaphase-Anaphase-Übergang mit dem Chromatin assoziiert. Diese ist jedoch aufgrund des hohen Hintergrundsignals nur sehr schwer auszumachen. Nach etwa 504 s kommt es zum Ende der Mitose wieder zur deutlichen Anreicherung des Chromatin-assoziierten Rad21-EGFP-Signals (Abb. 28A oben). Würde SOLO an die gleiche Bindestelle wie Rad21 binden, wäre es vorstellbar, dass SOLO Rad21 aus dem Cohesinkomplex verdrängt und somit die Chromatin-assoziierte Fluoreszenzintensität von Rad21-EGFP deutlich abnimmt. Die artifizielle Expression von Flag-HA(FH)-SOLO erfolgte mat-GAL4 abhängig (Abb. 28B). Zur

Analyse der Rekrutierung von Rad21 wurde der Verlauf mehrerer synzytialer Teilungen ausgewertet. Durch die zusätzliche Expression von FH-SOLO waren jedoch keine signifikanten Änderungen der Fluoreszenzintensität und der Rad21-Rekrutierung ans mitotische Chromatin festzustellen (Abb. 28A unten). Auch nach zusätzlicher SOLO-Expression konnte immer noch eine Chromatinassoziation in der Interphase nachgewiesen werden, die beim Eintreten in die Mitose deutlich abnimmt. Somit konnte auch mit Hilfe des zweiten assays kein Hinweis erbracht werden, der für eine identische Bindestelle von SOLO und Rad21 an die *head*-Domäne von SMC1 spräche.

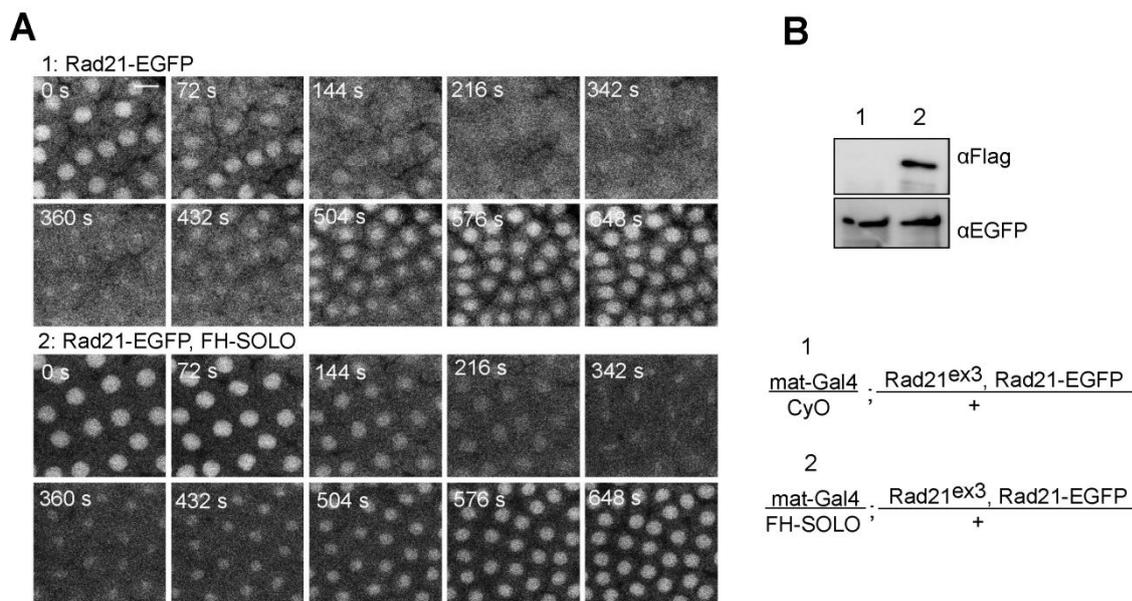


Abbildung 28: Ektopische Expression von FH-SOLO hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Rad21-EGFP ans Chromatin. (A) Repräsentative Aufnahmen der *in vivo*-Mikroskopie von synzytialen Embryonen beim Durchlaufen einer Mitose. Gezeigt ist die Autofluoreszenz von Rad21-EGFP. Die Genotypen der verwendeten Mütter sind in (B) angegeben. Die Embryonen (0,5-1,5 h) wurden gesammelt, dechorionisiert und anschließend für die *in vivo*-Mikroskopie vorbereitet. Der Größenmaßstab beträgt 10 μ m. (B) Immunblot zum Nachweis der Expression von FH-SOLO. Die Sondierung des Immunblots erfolgte mit Hilfe von Flag-spezifischen Antikörpern und als Ladekontrolle wurde anti-EGFP (Rad21-EGFP) sondiert. Geladen wurden jeweils zwei Ovarienäquivalente. Der Genotyp der entsprechenden Weibchen ist unten angegeben.

2.2.6.2 SOLO zeigt keine Interaktion mit SMC3 und Scc3/SA

Neben der Interaktion mit der *head*-Domäne von SMC1 ist ein weiteres charakteristisches Merkmal von α -Kleisinproteinen die Assoziation mit SMC3. Um zu untersuchen, ob SOLO auch mit dieser Cohesinuntereinheit direkt interagiert, wurden verschiedene Hefe 2-Hybridanalysen durchgeführt. Hierzu wurde ein verkürztes SMC3-Konstrukt generiert, bei dem die ersten 395 Aminosäuren mit den Aminosäuren 835-1200 (SMC3hdCC) fusioniert wurden. Dies entspricht der *head*-Domäne und einem kurzen Bereich der *coiled-coil* Region von SMC3. Grundlage hierfür ist die Assoziation verschiedener Kleisinmoleküle über den *coiled coil*-Bereich, der sich direkt an die entsprechende *head*-Domäne anschließt (Bürmann

et al., 2013, Gligoris *et al.*, 2014). Um eine korrekte Assemblierung der *coiled-coil*-Regionen zu ermöglichen, wurde zwischen den einzelnen Fragmenten ein flexibler Linker integriert, der das Rückfalten des N- und C-Terminus erleichtern soll. Mit diesem Konstrukt konnte eine Assoziation mit Rad21 nachvollzogen werden (Abb. 29A).

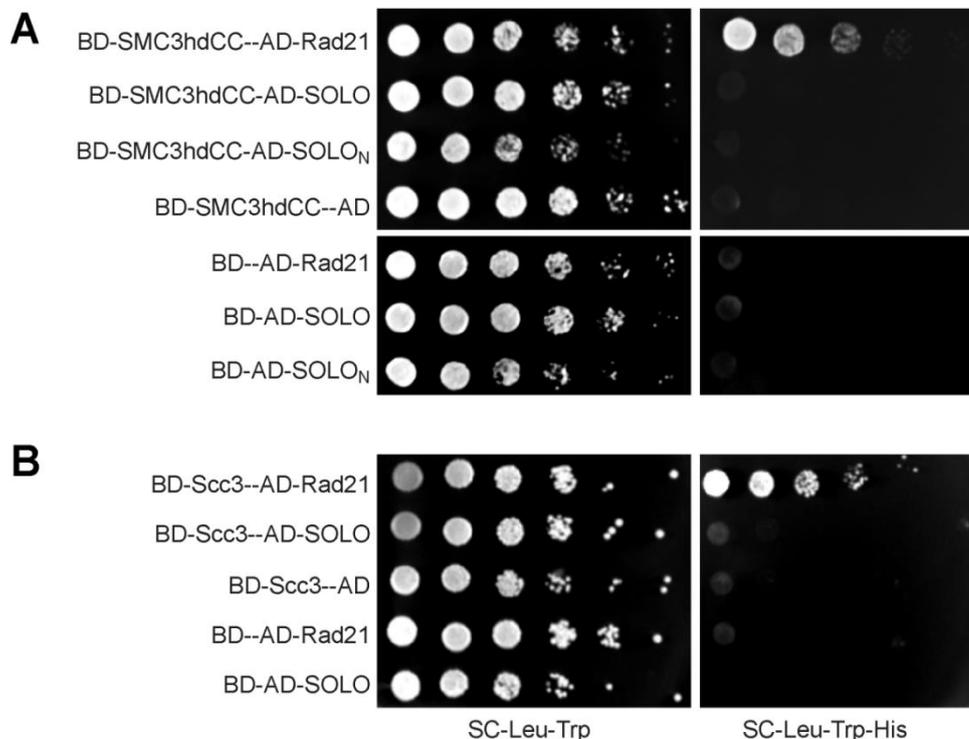


Abbildung 29: SOLO interagiert nicht mit SMC3 oder Scc3. In einem Hefe 2-Hybridassay wurden Fusionen der entsprechenden Proteine mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und der Bindungsdomäne (BD) exprimiert. Die Hefen wurden suspendiert, auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und dann unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 und 1:3125 aufgetragen. Verwendet wurden SC-Leu-Trp- sowie SC-Leu-Trp-His-Platten. SOLO_N entspricht dabei den AS: 1-362.

Demnach ist die verkürzte SMC3-Version in der Lage eine korrekte dreidimensionale Struktur einzunehmen, die die Assoziation mit Rad21 ermöglicht. Für SOLO und auch für SOLO_N hingegen konnte sowohl für das verkürzte SMC3-Konstrukt als auch für eine Vollängen-Version des SMC3-Proteins keine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 29A, und Daten nicht gezeigt), obwohl von einer korrekten Faltung von SOLO auszugehen ist, da die Interaktion von SOLO und SMC1 gezeigt werden konnte (Abb. 27A,C).

Kleisinproteine verbrücken nicht nur die *head*-Domänen der SMCs, sondern bilden auch eine Plattform für die Assoziation mit der Cohesinuntereinheit Scc3/SA. Dieses Protein weist mehrere Wiederholungen des *HEAT*-Motivs auf und kann dadurch an die α -Kleisin-Untereinheit Scc1/Mcd1/Rad21 binden (Neuwald und Hirano, 2000). Über die genaue Funktion dieser Untereinheit ist noch nicht viel bekannt. Jedoch weisen erste Funktionsanalysen in *S. pombe* auf eine spezifische Interaktion mit dem Scc2/Scc4-Lade-

komplex (Mis4/Ssl3) hin, welche essentiell für die Ladung des Cohesinkomplexes an die DNA ist (Murayama und Uhlmann, 2014).

Nimmt man nun an, SOLO fungiere als funktionelles Homolog für Rec8, würde man auch eine direkte Interaktion mit dieser akzessorischen Cohesinuntereinheit erwarten. Jedoch konnte mit Hilfe der durchgeführten 2-Hybridanalysen lediglich eine Assoziation von Scc3 mit Rad21 bestätigt werden, nicht jedoch mit SOLO (Abb. 29B). Somit ist zusammenzufassen, dass die durchgeführten Interaktionsstudien keine Hinweise für eine direkte Interaktion von SOLO mit SMC3 oder Scc3 liefern (Abb. 29) und die Bindestelle von SOLO an die *head*-Domäne von SMC1 nicht identisch ist zur Interaktionsfläche von SMC1 mit Rad21 (Abb. 27, 28). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Hypothese, dass SOLO nicht zum Ringschluss zwischen den SMC-Proteinen befähigt ist und somit kein integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesin-komplexes ist.

2.2.7 Mutationen der potentiellen Separase-Spaltstellen haben keinen Einfluss auf den Verlauf der Meiose

Beim Übergang von Metaphase zur Anaphase wird die Kleisinuntereinheit des mitotischen Cohesinkomplexes durch die Protease Separase erkannt und an der spezifischen Erkennungssequenz D/EXXR gespalten (Uhlmann *et al.*, 1999). Diese Spaltung führt zur Dissoziation des Cohesinrings und damit verbunden auch zur Trennung der Schwesterchromatiden zum Ende der Mitose. Dieser genau regulierte Prozess ermöglicht eine gleichmäßige Verteilung des DNA-Gehalts auf die entstehenden Tochterzellen. Um nun zu überprüfen, ob SOLO als ein meiotisches Separasesubstrat fungiert, wurde zunächst in einem *in vitro* assay untersucht, ob eine Separase-abhängige Spaltung nachzuweisen ist. Hierzu wurde SOLO in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin synthetisiert und anschließend mit humaner Plk1 (*POLO-like kinase 1*) und zusätzlichem ATP inkubiert. Grundlage hierfür ist die Tatsache, dass eine zuvor stattfindende Phosphorylierung der Separasesubstrate deren Spalteffizienz deutlich erhöht (Sumara *et al.*, 2002). Mit Hilfe autoradiographischer Auswertungen konnte jedoch kein spezifisches Spaltprodukt nach Zugabe von aktiver humaner Separase nachgewiesen werden (Abb. 30A). Jedoch war mit Hilfe dieses assays auch die Spaltung von *Drosophila*-Rad21 durch Zugabe von humaner Separase nicht möglich (Daten nicht gezeigt), was damit begründet sein kann, dass die humane Separase und das entsprechende *Drosophila*-Homolog eine hohe Divergenz aufweisen. In *Drosophila* gibt es lediglich ein Separase-Homolog (SSE), was dem C-Terminus der humanen Separase entspricht. Die N-terminale Region findet man nicht. Durch verschiedene Analysen konnte jedoch das Heterodimer, bestehend aus SSE und THR (Three rows) als möglicher Ersatz für diese Protease identifiziert werden (Jäger *et al.*, 2001). Dabei bindet THR an den N-Terminus von SSE und fungiert dann analog zum N-terminalen und mittleren Bereich der Separase anderer Organismen (Jäger *et al.*, 2004). Da die Sequenzhomologie der humanen

Separase und der beiden Proteine THR und SSE (Jäger *et al.*, 2001) nicht besonders hoch ist, wurde trotz des fehlenden *in vitro* Nachweises einer Separase-abhängigen Spaltung untersucht, ob *in vivo* eine Proteolyse stattfindet. Unter der Annahme, SOLO fungiere als Cohesinuntereinheit, die im Verlauf der Meiose Separase-abhängig gespalten werden muss, würde eine Modifikation der entsprechenden Separase-Erkennungssequenzen dominant-negative Auswirkungen auf die Kohäsion zur Folge haben. Durch die permanente Kohäsion würde die Trennung der homologen Chromosomen in Meiose I unterbunden sein und auch die Segregation der Schwesterchromatiden in Meiose II wäre beeinträchtigt. Um zu untersuchen, ob SOLO als meiotisches Separase-Substrat in Frage kommt, wurden Fliegen generiert, bei denen insgesamt fünf mögliche Separaseschnittstellen in SOLO (DXXR, EXXR) mutiert waren (Abb. 30B). Nach nos-Gal4-kontrollierter Expression dieses Konstrukts (SOLO^{5Sep}), konnte keine Änderung der Lokalisation im Vergleich zum wildtypischen SOLO nachgewiesen werden (Abb. 30C,D). Demnach hat die Mutation der potentiellen Separase-Schnittstellen keinen Einfluss auf die Rekrutierung von SOLO ans Chromatin. Um zu beurteilen, ob die Expression dieses Konstrukts den Verlauf der Meiose beeinträchtigt, wurden Embryonenkollektionen in kurzen Intervallen durchgeführt und die Morphologie und eventuell auftretende Chromatinbrücken des meiotischen Chromatins analysiert. Hierbei waren nur bei einem geringen Anteil an Meiose II-Figuren Anaphasebrücken nachweisbar (Abb. 30E), die vermutlich durch die Überexpression von SOLO zustande kamen, da ungefähr im gleichen Größenordnungsbereich auch Defekte nach Expression von wildtypischem SOLO auftraten. Im Gegensatz zu den analog für Rad21^{NC} durchgeführten Experimente (siehe 2.1.6), hat die Expression einer potentiell nicht-spaltbaren Version von SOLO keine Auswirkungen auf die ersten synzytialen Mitosen (Abb. 30E). Zusammenfassend hat die Expression einer SOLO-Version, bei der alle potentiellen Separase-Spaltstellen mutiert sind keine dominant-negativen Auswirkungen auf den Verlauf der Meiose.

In der Spalthefe *S. pombe* hingegen führte die Expression einer nicht-spaltbaren Version von Rec8 zur deutlichen Beeinträchtigung der Meiose, da sowohl die Trennung der homologen Chromosomen als auch die Segregation der Schwesterchromatiden blockiert waren (Kitajima *et al.*, 2003). Da in analogen Experimenten in *Drosophila* die Expression einer potentiell nicht-spaltbaren Version von SOLO den Ablauf der Meiose nicht beeinträchtigt, scheint SOLO kein meiotisches Separase-Substrat zu sein.

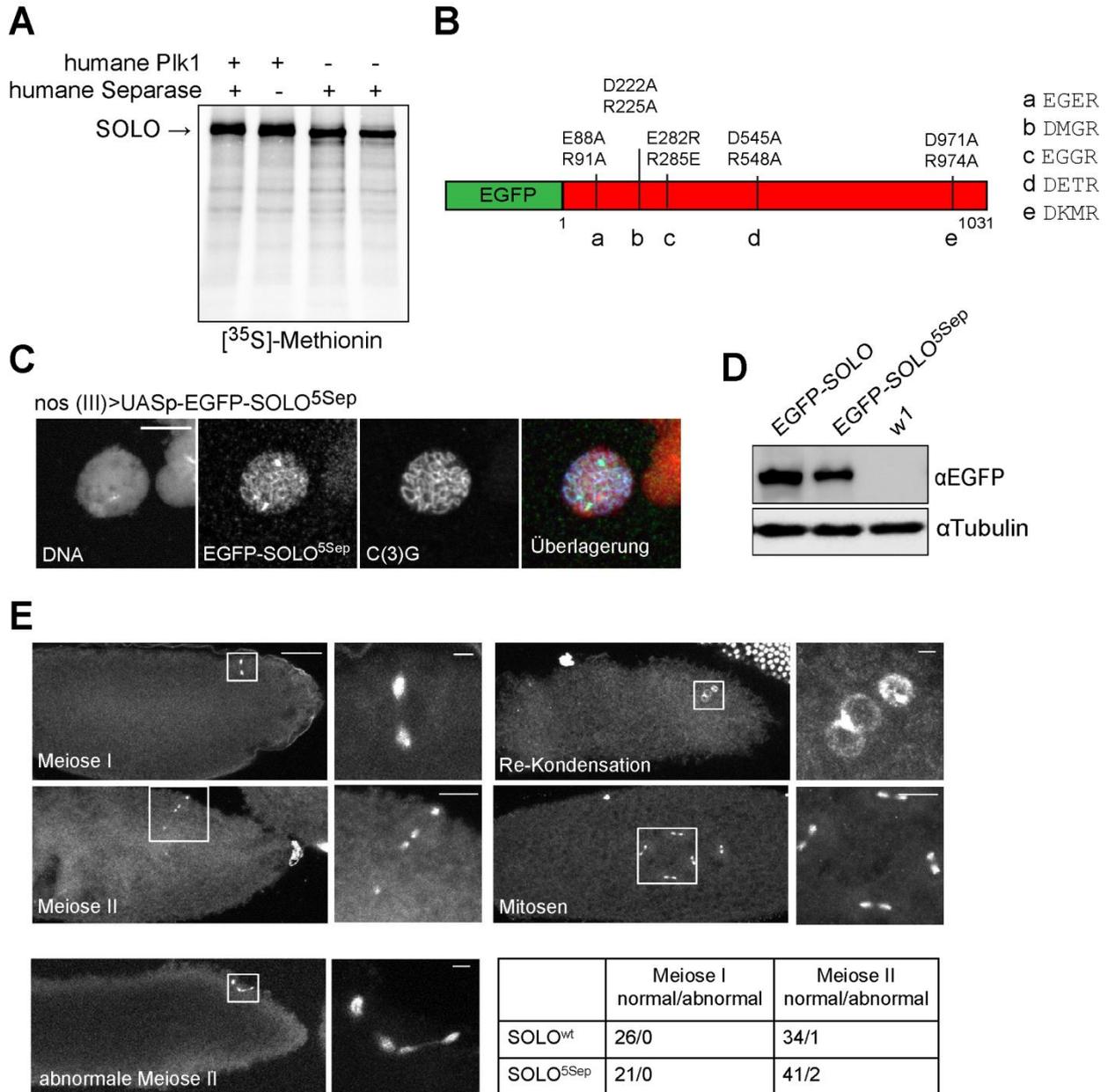


Abbildung 30: Mutation der potentiellen Separase-Spaltstellen von SOLO hat keinen Einfluss auf den Verlauf von Meiose. (A) *In vitro* Separase-Spaltungsassay. Die Synthese von SOLO erfolgte in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin. Nach Inkubation mit humaner Plk1 (+ATP) und humaner Separase erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung und autoradiographische Auswertung. (B) Schematische Darstellung der eingeführten Mutationen in die potentiellen Separase-Erkennungssequenzen. Die AS-Positionen geben die eingefügten Mutationen an. Im rechten Teil sind alle E/DXXR-Motive aufgelistet. (C) Immunfluoreszenzanalysen an Chromosomenspreads. Gefärbt ist die DNA in rot (gefärbt mit Hoechst 33258), C(3)G in blau und EGFP-SOLO^{5Sep} (anti EGFP) in grün. Der Größenmaßstab beträgt 5 µm. (D) Immunblot zum Nachweis der Expression von UAS-EGFP-SOLO^{5Sep}. Die Sondierung des Immunblots erfolgte mit Hilfe von EGFP-spezifischen Antikörpern und als Ladekontrolle wurde anti-Tubulin sondiert. Die Expression von UAS-EGFP-SOLO^{5Sep} und UAS-EGFP-SOLO erfolgte nos-Gal4-abhängig. Geladen wurden jeweils zwei Ovarienäquivalente. (E) Repräsentative Darstellungen von überlagerten Z-Ebenen von Embryonen, die von Müttern gelegt wurden, die EGFP-SOLO^{5Sep} unter Kontrolle von nos-GAL4 exprimieren. Dabei ist die DNA mit Hoechst 33258 gefärbt. Der Größenmaßstab beträgt in den Übersichtsaufnahmen 50 µm und in den Vergrößerungen 5 µm (oben, unten) bzw. 20 µm (Mitte). Unten rechts: Tabellarische Zusammenfassung der beobachteten Phänotypen der meiotischen Figuren.

2.2.8 POLO-abhängige Phosphorylierung von SOLO ist essentiell für die Stabilität des SCs

Bei dem in Punkt 2.2.7 beschriebenen *in vitro* assays zum Nachweis einer möglichen Separase-abhängigen Spaltung von SOLO, konnte nach der zuvor stattfindende Inkubation mit humaner Plk1 eine höher-migrierende Bande von SOLO nachgewiesen werden (Abb. 30A). Dieses veränderte Laufverhalten lässt sich durch ein höheres Molekulargewicht als Folge einer Plk1-abhängigen Phosphorylierung erklären. Zur genaueren Charakterisierung der Phosphorylierungsstelle wurde SOLO in drei etwa gleich große Fragmente zerlegt, die anschließend als Fusionskonstrukt mit einer N-terminalen myc-Markierung *in vitro* synthetisiert wurden. Nach ATP-Zugabe und Inkubation mit humaner Plk1 konnte nur nach Expression des mittleren Fragments von SOLO (AS: 363-735) erneut eine deutlich höher migrierende Bande detektiert werden, welche auf eine Plk1-abhängige Phosphorylierung in diesem Bereich des Proteins schließen lässt (Abb. 31A). Um nun zu untersuchen, ob diese *in vitro* nachweisbare Phosphorylierung in der Oogenese von *Drosophila* ebenfalls stattfindet bzw. welche Funktion diese Modifikation auf die Kohäsion oder die Stabilität des SCs hat, wurden SOLO-Versionen generiert, bei denen potentielle POLO (Plk1 Ortholog in *Drosophila melanogaster*)-abhängige Phosphorylierungsstellen mutiert waren.

In den meisten Fällen erfolgen Plk1-spezifische Phosphorylierungen nach einer Cdk1-abhängigen Phosphorylierung (Abb. 31B). Diese Prolin-gerichtete Kinase erkennt spezifisch SSP bzw. STP und modifiziert die vor dem Prolin-liegende Aminosäure (Nigg, 2001). Diese Modifikation stimuliert dann die Rekrutierung von Plk1, die anschließend mit Hilfe der POLO-Box-Domäne (PBD) an die entsprechenden Substrate bindet (Elia *et al.*, 2003). Die so gewährleistete räumliche Nähe zu den entsprechenden Phosphorylierungsstellen ermöglicht dann eine spezifische Modifizierung des Serins bzw. Threonins in der Konsensussequenz D/E-X-S/T- Φ -X-D/E (Φ entspricht dabei einer hydrophoben AS; Nakajima *et al.*, 2003).

Um zu testen, ob *in vivo* eine POLO-abhängige Phosphorylierung von SOLO vorliegt und ob diese eine relevante Funktion erfüllt, soll sie über verschiedene Methoden inhibiert werden, um dann anschließend zu untersuchen, ob der Verlauf der Meiose beeinträchtigt ist. In einem ersten Ansatz sollen alle potentiellen Cdk1-Phosphorylierungsstellen mutiert werden, um so eine spezifische Rekrutierung von POLO zu verhindern. In der AS-Sequenz von SOLO finden sich insgesamt vier STP-Motive, von denen drei im mittleren Fragment liegen. Diese liegen zum einen nahe beieinander (AS-Position: 482-484; 516-518; 568-570) und zum anderen in dem Bereich, in dem auch potentielle Plk1-Phosphorylierungsstellen vermutet werden. Zur Analyse einer möglichen Funktion dieser POLO-Bindestellen (PBS) wurden in diesen drei Regionen jeweils die Threonine durch Alanine ersetzt (SOLO^{PBS-A}), sodass keine Cdk1-abhängige Phosphorylierung mehr stattfinden kann.

In zwei weiteren Ansätzen wurden jeweils Fliegen generiert, die eine SOLO-Version exprimieren, bei der potentielle POLO-spezifische Phosphorylierungsstellen mutiert wurden. In der AS-Sequenz von SOLO gibt es nur einen Bereich (AS: 606-ETTLSE-611, Phosphorylierung von T608), welcher der bekannten Plk-Konsensussequenz entspricht. Da aber in direkter Nachbarschaft zu T608 ein weiteres Threonin vorliegt, wurde in der EGFP-SOLO^{1POLO}-Mutante auch dieses mutiert, um die Phosphorylierung in dieser Region vollständig zu unterbinden. Da nicht ausgeschlossen ist, dass auch Bereiche von POLO phosphoryliert werden, die nicht hundertprozentig der Konsensussequenz entsprechen, wurde eine weitere Mutante generiert (EGFP-SOLO^{5POLO}), bei der insgesamt fünf durch computergestützte Analysen (<http://polo.biocuckoo.org/>, Liu *et al.*, 2013) vorhergesagte POLO-Phosphorylierungsstellen mutiert wurden. Um die Funktionalität dieser potentiellen phosphorylierungsdefizienten Konstrukte zu testen, wurden die entsprechenden EGFP-Fusionskonstrukte unter UAS-Kontrolle im *so/o*-mutanten Hintergrund exprimiert. Die Expression von EGFP-SOLO^{1POLO} und EGFP-SOLO^{5POLO} hatte dabei deutliche Auswirkungen auf die Morphologie des SCs. Die Struktur des SCs wirkte fragmentierter und war zum Teil auch als ein riesiges Geflecht zu erkennen, welches dem Phänotyp der *so/o*-mutanten Pro-Oozyten entsprach (Vergleich Abb. 33E). Im Gegensatz dazu hatte die Expression von EGFP-SOLO^{PBS-A} fast keine Auswirkungen auf die Struktur des SCs. Allen Konstrukten war jedoch gemein, dass die SOLO-Lokalisation entlang der Chromosomen *cores* deutlich abgeschwächt war bzw. nur noch als punktförmige Signale in den entsprechenden Pro-Oozyten nachweisbar war (Abb. 31C). Für EGFP-SOLO^{PBS-A} konnte neben der punktförmigen Lokalisation noch ein schwaches aber durchgängiges Signal entlang der Chromosomen *cores* verzeichnet werden.

Um zu testen, ob es sich bei den punktförmigen EGFP-Signalen um Zentromere handelt, wurden Kofärbungen mit CID durchgeführt (Abb. 31D). EGFP-SOLO^{5POLO} und das Zentromerprotein CID wiesen dabei eine deutliche Kolo-kalisation auf. Folglich ist die POLO-abhängige Phosphorylierung von SOLO an den Aminosäuren 607/608 (eventuell an noch weiteren Positionen) essentiell für die Lokalisation von SOLO entlang der Chromosomen *cores* und damit verbunden auch strukturgebend auf den SC.

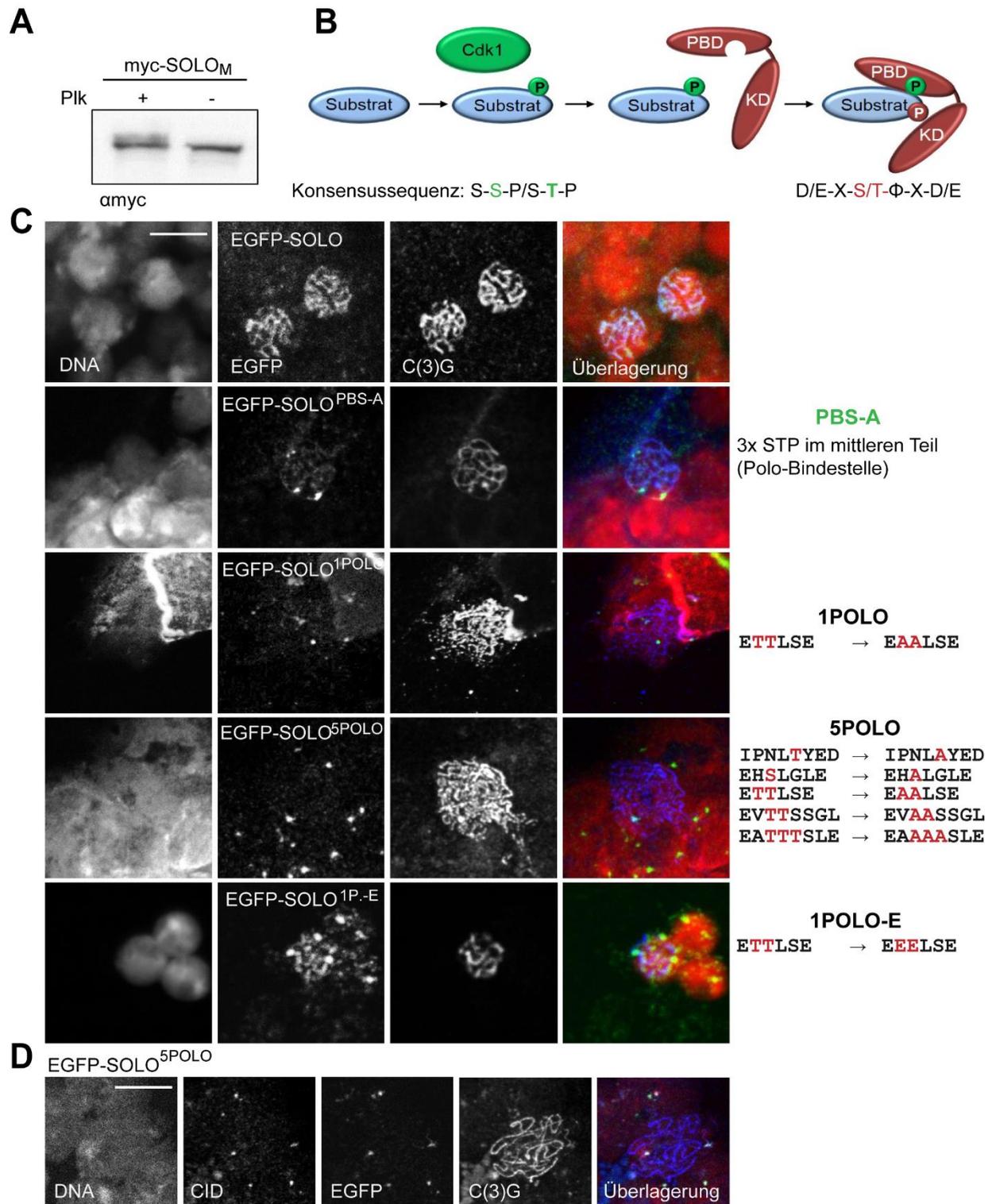


Abbildung 31: POLO-abhängige Phosphorylierung von SOLO ist essentiell für die Struktur des SCs. (A) *In vitro* Phosphorylierung durch humane Plk1 des mittleren SOLO-Fragments (AS: 363-735). Immunblot von *in vitro*-synthetisiertem myc-SOLO_M nach einem Plk1-Kinase-Assay. Der Nachweis erfolgte mit myc-spezifischen Antikörpern. (B) Funktionsprinzip der Cdk1/Plk1-abhängigen Phosphorylierung. Im unteren Teil der Abbildung sind die jeweiligen Konsensussequenzen der beiden Kinasen aufgeführt. P: Phosphorylierungen der entsprechenden Kinasen (grün: Cdk1; braun: POLO), KD: Kinase-Domäne, PBD: POLO-Binde-Box-Domäne (C) Immunfluoreszenzanalysen an Chromosomenspreads. Die nos-Gal4-abhängige Expression der entsprechenden Transgenprodukte erfolgt im *solo*-mutanten Hintergrund. Gefärbt ist die DNA in rot (gefärbt mit Hoechst 33258), C(3)G in blau (anti-C(3)G) und die verschiedenen EGFP-SOLO-Konstrukte (anti-EGFP) in grün. Im rechten Teil der Abbildung sind die jeweiligen Konsensussequenzen angegeben, bei denen die rot markierten Serine

Nach Expression von EGFP-SOLO^{5POLO} wies der SC ebenfalls netzartige Strukturen auf, die zum Teil größer waren als nach Expression der Einzelmutante (EGFP-SOLO^{1POLO}). Es ist daher nicht auszuschließen, dass neben der Position 607/608 noch weitere Stellen phosphoryliert werden müssen, um die Struktur des SCs vollständig aufrechtzuerhalten. Durch die Mutation potentieller POLO-Bindestellen (SOLO^{PBS-A}) ist die Lokalisation von EGFP-SOLO entlang der Chromosomen *cores* ebenfalls beeinträchtigt, jedoch nicht vollständig inhibiert. Demnach trägt auch die Cdk1-abhängige Lokalisation von POLO zu einem bestimmten Grad zur effizienten Rekrutierung von SOLO entlang der Chromosomen *cores* bei.

Die Mutationen von Phosphorylierungsstellen kann die Struktur eines Proteins auch dahingehend verändern, dass die beobachteten Phänotypen nicht aufgrund einer fehlenden Modifikation zustande kommen, sondern durch eine veränderte Proteinstruktur, die die Lokalisation des entsprechenden Proteins phosphorylierungsunabhängig beeinträchtigt. Um dies auszuschließen, wurde eine SOLO-Version generiert, bei der die Aminosäuren 607/608 zu Glutamat mutiert wurden (EGFP-SOLO^{1POLO-E}). Diese Modifikation soll eine dauerhafte POLO-abhängige Phosphorylierung imitieren.

Die Expression von EGFP-SOLO^{1POLO-E} erfolgte nos-Gal4-abhängig im *solo*-mutanten Hintergrund und hatte eine normale Lokalisation entlang der Chromosomen *cores* und der Zentromere zur Folge (Abb. 31C, untere Reihe). Die Struktur des SCs wies ebenfalls keine Veränderungen auf, sodass die dauerhafte Imitierung der Phosphorylierung an der Aminosäureposition 607/608 einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp wiederherstellen kann. Demnach ist es relativ unwahrscheinlich, dass durch die Modifikation dieser Aminosäuren eine Änderung der Proteinstruktur hervorgerufen wurde, die die beobachteten Phänotypen phosphorylierungs-unabhängig verursacht.

Um weitere Hinweise für eine POLO-abhängige Lokalisation von SOLO zu finden, wurde zunächst untersucht, inwiefern POLO am meiotischen Chromatin lokalisiert ist oder ob es Hinweise auf eine direkte Interaktion beider Proteine gibt. GFP-POLO lokalisiert in Region 1 des Germariums in allen Keimbahnzellen in einem punktförmigen Muster (Mirouse *et al.*, 2006). In den späteren Stadien des Germariums treten nur noch vereinzelte Signale auf, die hauptsächlich im Zytoplasma an der Peripherie der Kernhülle zu finden sind und im Verlauf der Oogenese immer schwächer werden und ab Stadium 4 nicht mehr nachweisbar sind (Mirouse *et al.*, 2006).

Fortsetzung Abbildung 31:

und Threonine durch Alanine ersetzt wurden. In der untersten Reihe erfolgte die Expression von EGFP-SOLO^{608E}, bei der die AS 607/608 durch zwei Glutamate ersetzt wurden, welche eine dauerhafte Phosphorylierung imitieren sollen. (D) Punktförmige Signale von EGFP-SOLO^{5POLO} zeigen eine Kolo-kalisation mit CID. Die nos-Gal4-abhängige Expression erfolgte im wildtypischen Hintergrund. Immunfluoreszenzanalysen an Chromosomenspreads. Die DNA ist in rot dargestellt (gefärbt mit Hoechst 33258), C(3)G in blau und die verschiedenen EGFP-SOLO-Konstrukte (anti EGFP) in grün, CID ist in der Überlagerung in weiß gezeigt. Der Größenmaßstab beträgt in allen Abbildungen 5 µm.

Um speziell die Lokalisation von POLO bezüglich des SCs genauer zu analysieren und um mögliche Zugänglichkeitsprobleme von Antikörpern zu minimieren, wurden Chromosomenspreads von Germarien angefertigt und anschließend die Lokalisation von POLO mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachgewiesen. So konnte neben den bereits beschriebenen punktförmigen Signalen für POLO auch eine Kolo­kalisierung der Kinase mit dem SC nachgewiesen werden (Abb. 32A). Da auch SOLO entlang der Chromosomen *cores* zu finden ist, liefert diese Beobachtung den ersten Hinweis für eine potentielle Wechselwirkung beider Proteine, die ausschlaggebend ist für die Modifikation von SOLO, durch die dann eine Rekrutierung entlang der Chromosomen *cores* hervorgerufen wird.

Zum Nachweis einer möglichen direkten Assoziation beider Proteine, wurden zwei Ansätze verfolgt. Im ersten Ansatz wurden Immunpräzipitationen von EGFP-SOLO mit Hilfe von Massenspektrometrie ausgewertet. Um von der Vielzahl der hierbei nachgewiesenen Interaktoren unspezifisch-bindende Peptide heraus zu filtern, wurden massenspektrometrische Analysen eines EGFP-markierten Kontrollproteins (CapH₂-EGFP, Condensin II-Untereinheit) analysiert. Alle in beiden Proben vorhandenen Peptide wurden anschließend subtrahiert, da diese durch unspezifische Assoziationen mit den verwendeten Antikörpern oder der Säulenmatrix zustande kamen. Nach dieser Auswertung zeigte sich eine klare Kopräzipitation von POLO mit einem *score* von 91 (siehe Anhang, Tab. 1). Dieser Wert gibt Aufschluss darüber, dass die Interaktion zwar signifikant ist, jedoch ungefähr 100 andere Proteine mit einem höheren *score* in den SOLO-Präzipitaten nachzuweisen sind. Da Kinasen allgemein nur in einem relativ kurzen Zeitfenster mit dem entsprechenden Substrat assoziiert sind, ist es nachvollziehbar, dass die Interaktion nicht mit höchster Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Ein weiterer Grund ist, dass die POLO-abhängige Phosphorylierung auch nur nach einer zuvor stattfindenden Cdk1-abhängigen Modifikation des Substrats auftritt, welche ebenfalls nicht in der gesamten Oogenese gegeben ist.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein zweiter Ansatz verfolgt, bei dem die Threonine der drei potentiellen Cdk1-Phosphorylierungsstellen zu Glutamat mutiert wurden (SOLO^{PBS-E}), um so einen Status einer dauerhaften Phosphorylierung zu imitieren. Die so modifizierte SOLO-Version wurde anschließend als Fusionskonstrukt mit einer N-terminalen myc-Markierung *in vitro* synthetisiert und Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Bei der Präzipitation von myc-SOLO^{PBS-E} konnte eine schwache Kopräzipitation von POLO nachgewiesen werden, die bei Fehlen dieser Modifikation deutlich schwächer ausgeprägt ist (Abb. 32B). Das Level der kopräzipitierten Flag-POLO-Bande liegt nach Elution von myc-SOLO^{PBS-E} deutlich über dem Level der unspezifischen Präzipitation und der Intensität der Banden, die durch Abbauprodukte von myc-SOLO hervorgerufen werden (Abb. 32B). Demnach konnte durch die Modifikation der potentiellen Cdk1-Phosphorylierungsstellen eine schwache Assoziation von SOLO und POLO nachgewiesen werden.

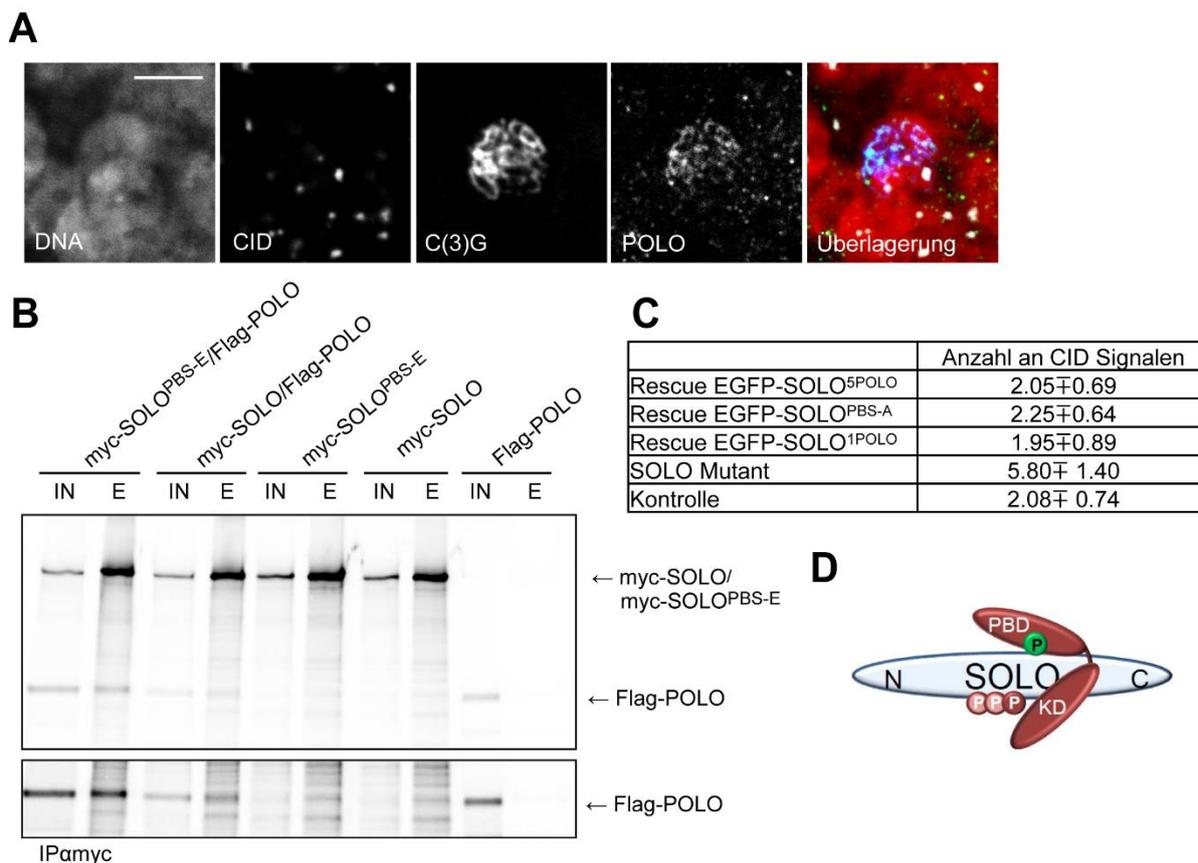


Abbildung 32: Kolokalisation von POLO mit dem SC und Nachweis einer direkten Interaktion von SOLO und POLO. (A) Immunfluoreszenzanalysen an Chromosomenspreads. Gefärbt ist die DNA mit Hoechst 33258 (rot), C(3)G in blau, POLO in grün und CID in weiß. Der Größenmaßstab beträgt 5 μ m. (B) Immunpräzipitationen von *in vitro* transkribierten und translatierten Proteinen. Die Synthese der Proteine erfolgte in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin. Durchgeführt wurden Präzipitationen mit myc-spezifischen Antikörpern. myc-SOLO^{PBS-E} entspricht dabei einer Version von SOLO, bei der die Threonine der drei im mittleren Fragment liegenden STP-Motive zu Glutamat ersetzt worden sind. Im unteren Teil der Abbildung ist der untere Teil des Gels nach längerer Exposition gezeigt. (C) Durchschnittliche Anzahl der CID-Signale in den Oozytenkernen von Eikammern des Stadiums 5-7. Genotypen der verwendeten Fliegen: *solo¹/solo²;nos-GAL4/UASp-EGFP-SOLO^{5POLO/ΔPBS/608A}* (Rescue EGFP-SOLO^{5POLO/ΔPBS/608A}), *solo¹/solo²* (SOLO Mutant), *w¹* (Kontrolle). Ausgezählt wurden jeweils 20 Eikammern. (D) Modell zur Verdeutlichung der Wirkungsweise von POLO. POLO bindet an die zuvor phosphorylierten Cdk1-Stellen (grünes P) und phosphoryliert dann mit seiner Kinase-Domäne (KD) in räumlicher Nähe an der AS-Position 607/608 von SOLO (braunes P). Eventuell gibt es noch weitere Phosphorylierungsstellen, diese sind in hellbraun gezeigt.

Im nächsten Schritt wurde dann untersucht, ob das Fehlen von SOLO an den Chromosomen *cores* einen Einfluss auf die Kohäsion hat. Hierzu wurden CID-spezifische Immunfluoreszenzanalysen an Oozytenkernen von Eikammern des Stadiums 5 bis 7 durchgeführt und dahingehend ausgewertet, ob die Anzahl der CID-Signale durch Paarungsdefekte oder Kohäsionsdefekte zunimmt. Im wildtypischen Hintergrund (Abb. 32C, Kontrolle) sind im Durchschnitt 2,08±0,74 CID-Signale pro Kern nachweisbar. In *solo*-mutanten Weibchen kommt es wie in Punkt 2.2.3 dargestellt, zum deutlich ausgeprägten Kohäsionsverlust der zentromerischen Regionen. Die durchschnittliche Anzahl liegt hier bei 5,80±1,40 CID-Signalen. Diese Zahl ist bei Expression der modifizierten SOLO-Konstrukte

im *so/o*-mutanten Hintergrund deutlich verringert und im gleichen Größenordnungsbereich wie im wildtypischen Hintergrund (Rescue EGFP-SOLO^{5POLO}: 2,05±0,69; Rescue EGFP-SOLO^{PBS-A}: 2,25±0,64; Rescue EGFP-SOLO^{1POLO}: 1,95±0,89). Somit hat die Expression von phosphorylierungsdefizienten SOLO-Versionen keinen Einfluss auf die Kohäsion, sondern lediglich auf das Lokalisationsverhalten von SOLO und damit einhergehend eine Funktion auf die Ausbildung der Chromosomen *cores* des SCs.

2.2.9 Eine Arginin-reiche Region im mittleren Teil von SOLO fungiert als NLS

Im mittleren Teil von SOLO befindet sich eine Arginin-reiche Region, bei der 10 Arginine innerhalb eines 14 Aminosäure umfassenden Bereichs liegen (Abb. 33A, AS: 639-652). Solche Anreicherungen basischer Aminosäuren dienen oft als Kern-Lokalisationssignal (NLS; Dingwall und Laskey, 1991, Nigg, 1997). Durch computergestützte Strukturanalysen (SBC; Stockholm Bioinformatics Center, <http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/cgi-bin/single.cgi>) wurde diese Region in SOLO auch als eine mögliche NLS vorhergesagt. Um zu überprüfen, ob diese Arginin-reiche Sequenz als NLS dient und somit die Voraussetzung für eine Chromatinlokalisierung liefert, wurde eine SOLO-Version hergestellt, bei der alle in diesem Bereich befindlichen Arginine gegen Alanine ausgetauscht wurden (Abb. 33A, EGFP-SOLO^{ΔArg}). Im Vergleich zu wildtypischem EGFP-SOLO führte das Fehlen dieser Arginin-reichen Region zur deutlichen Reduktion der Zentromer-assoziierten Signale von SOLO (Abb. 33C). Auch in den Nährzellen nahm die Intensität des Chromatin-assoziierten EGFP-Signals deutlich ab und es kam zu einer Anreicherung von EGFP-SOLO^{ΔArg} im Zytoplasma der entsprechenden Zellen (Abb. 33C, rote Sterne). Ausgehend davon, dass die Assoziation von SOLO mit dem Chromatin durch das Fehlen der NLS nicht mehr gegeben ist, ist auch zu erwarten, dass die Funktion von SOLO bei der Aufrechterhaltung der Kohäsion und der Struktur des SCs beeinträchtigt ist. Tatsächlich kann die Expression von EGFP-SOLO^{ΔArg} die im *so/o*-mutanten Hintergrund auftretenden Kohäsionsdefekte nicht retten. Im Durchschnitt wurden 4,90±1,02 CID-Signale nachgewiesen. Im *so/o*-mutanten Hintergrund ohne Transgenexpression sind es durchschnittlich 5,80±1,40 Signale (Abb. 33D). Dieser Wert ist damit etwas höher als bei gleichzeitiger Expression von EGFP-SOLO^{ΔArg}. Möglicherweise können noch geringe Mengen an SOLO^{ΔArg} an die Zentromere rekrutiert werden, die unter der Nachweisgrenze der Mikroskopie liegen und ausreichend sind, um einen gewissen Grad an Kohäsion aufrechterhalten zu können. Neben der beeinträchtigten Kohäsion führt die Expression von EGFP-SOLO^{ΔArg} zur Ausprägung eines deutlich fragmentierten SCs, dessen Morphologie dem des SCs im *so/o*-mutanten Hintergrund entspricht (Abb. 33E).

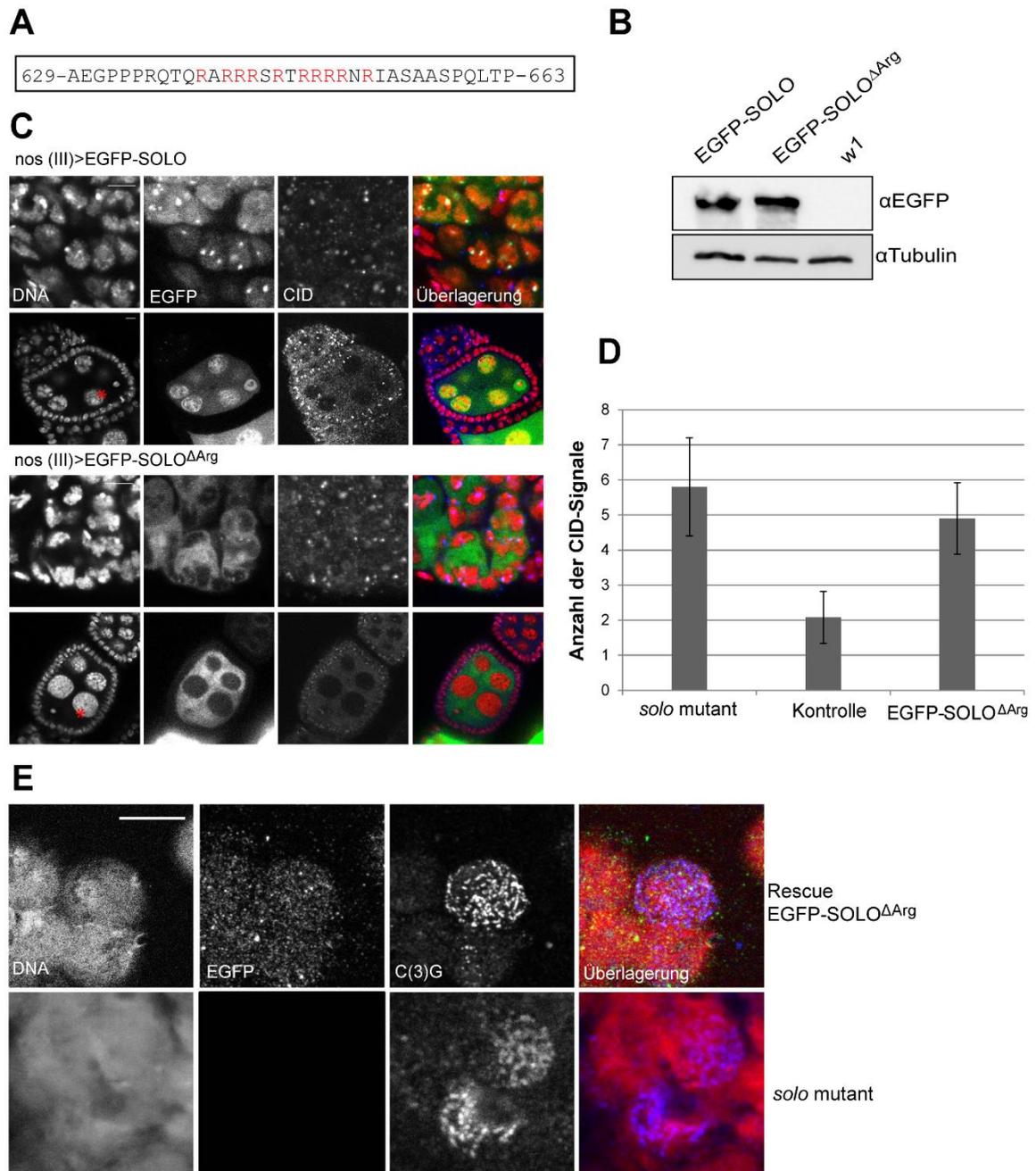


Abbildung 33: Ein Arginin-reicher Bereich im mittleren Teil von SOLO fungiert als NLS. (A) Übersicht über den AS-Bereich von 629-663. Rot-markiert sind die Arginine, die in der Variante SOLO^{ΔArg} gegen Alanine ausgetauscht sind. (B) Immunblot zum Nachweis der Expression von UASp-EGFP-SOLO^{ΔArg} und UASp-EGFP-SOLO. Die Sondierung des Immunblots erfolgte mit Hilfe von EGFP-spezifischen Antikörpern und als Ladekontrolle wurde anti-Tubulin sondiert. Die Expression erfolgte nos-Gal4-abhängig. Geladen wurden jeweils 2 Ovarienäquivalente. (C) Repräsentative Darstellungen von Germarien (oben) und Eikammern des Stadiums 6 (unten). Die DNA ist in rot gezeigt (gefärbt mit Hoechst 33258), die EGFP-SOLO-Konstrukte (anti-EGFP) in grün und CID in blau. Die roten Sterne markieren die Nährzellkerne. Der Längenmaßstab beträgt jeweils 5 μm. (D) Durchschnittliche Anzahl der CID-Signale in Oozytenkernen von Eikammern des Stadiums 5-7. Genotypen der verwendeten Fliegen: *solo*¹/*solo*² (SOLO mutant), *w*¹ (Kontrolle), *solo*¹/*solo*²; *nos-GAL4/UASp-EGFP-SOLO*^{ΔArg} (EGFP-SOLO^{ΔArg}). Ausgezählt wurden jeweils 20 Eikammern. (E) Immunfluoreszenzanalysen an Chromosomenspreads. Gefärbt ist die DNA mit Hoechst 33258 (rot), C(3)G in blau und EGFP in grün. Der Größenmaßstab beträgt 5 μm. Der Genotyp der entsprechenden Fliegen entspricht den in (D) beschriebenen.

Die fehlende Komplementation des *solo*-mutanten Phänotyps und das veränderte Lokalisationsverhalten von EGFP-SOLO^{ΔArg} kann nicht durch eine zu niedrige Transgenexpressionsrate erklärt werden, da diese vergleichbar ist mit EGFP-SOLO (Abb. 33 B). Demnach lassen sich die beobachteten Phänotypen nur auf die Modifikation der Argininreichen Region im mittleren Teil des Proteins zurückführen, die vermutlich als Kernlokalisierungssignal von SOLO fungiert. Ist es mutiert, kommt es zu einer deutlichen Reduktion des Chromatin-assoziierten Proteinlevels, welche wiederum Auswirkungen auf die zentromerische Kohäsion und die Aufrechterhaltung des SCs hat.

2.2.10 Interaktionsstudien von SOLO

Ein weiteres Merkmal für kohäsive Kleisinproteine ist die Assoziation mit den akzessorischen Cohesinuntereinheiten Pds5 und Scc3/SA, die eine Funktion bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Kohäsion haben (Hartman *et al.*, 2000, Panizza *et al.*, 2000). Mit Hilfe von rekombinant in *E. coli* exprimierten Versionen der entsprechenden Hefeproteine wurde bereits eine direkte Interaktion des Pds5-Wpl1-Heterodimers mit dem N-Terminus von Scc1 nachgewiesen (Kulemzina *et al.*, 2012). Über die akzessorische Cohesinuntereinheit Pds5 bindet außerdem Sororin an Cohesin und fungiert als Gegenspieler von Wapl, welches als „Anti-Etablierungsfaktor“ für die Kohäsion wirkt (Rankin *et al.*, 2005, Lafont *et al.*, 2010, Nishiyama *et al.*, 2010). Um zu testen, ob ähnliche Interaktionen auch für SOLO als mögliches Kleisinprotein nachvollzogen werden können, wurden EGFP-SOLO-spezifische Immunpräzipitationen von löslichen Proteinextrakten aus Ovarien durchgeführt und anschließend die gesamten kopräzipitierten Proteine massenspektrometrisch ausgewertet (siehe Anhang, Tab. 1). Jedoch konnte keines der Cohesin-assoziierten Proteine Scc3, Pds5, Sororin, Nipped-B oder Wapl nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der relativ geringen Menge an löslichen Proteinen begründet sein, da die Komponenten der meiotischen Chromosomen *cores*, einschließlich des SCs und des Cohesinkomplexes eine hohe Stabilität aufweisen und auch nach DNase I-Behandlung miteinander assoziiert bleiben und nicht im löslichen Überstand zu finden sind (Khetani und Bickel, 2007). Um dieses Problem zu umgehen, wurden verschiedene 2-Hybridinteraktionsstudien in der Hefe durchgeführt, die zeigen sollen, ob es eine Assoziation von SOLO mit den akzessorischen Cohesinuntereinheiten gibt. Zuvor wurde jedoch untersucht, inwiefern die bereits beschriebenen Interaktionen von Scc3, Pds5, Sororin (Peters *et al.*, 2008) mit den entsprechenden *Drosophila*-Homologen nachvollzogen werden können. Hierzu wurden der N-Terminus von Pds5, Sororin und Scc3 mit der Gal4-Aktivierungsdomäne bzw. der Gal4-DNA-Bindedomäne fusioniert und die entsprechenden Plasmide in geeignete Hefestämme transformiert. Über das Wachstum auf Selektivplatten ohne Histidin konnten anschließend Rückschlüsse auf die gegenseitigen Assoziationen der Proteine gezogen werden. So konnte die Interaktion von Sororin mit Scc3 und Pds5_N

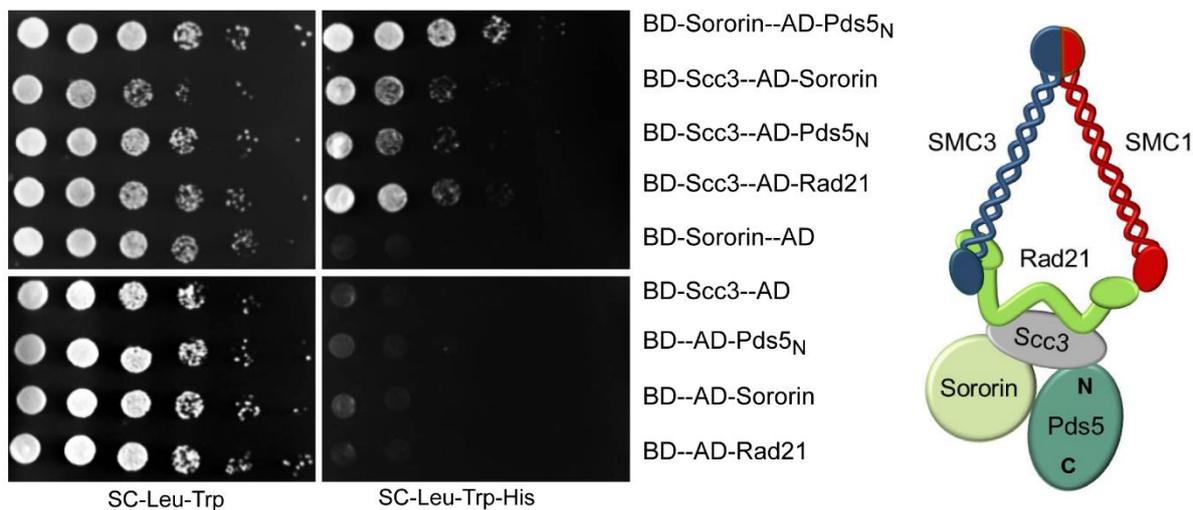
nachvollzogen werden und ein Hinweis für die Assoziation von Scc3 mit Rad21 und Pds5_N erbracht werden (Abb. 34A). Die beschriebenen Proteine verfügen demnach über alle Modifikationen und dreidimensionalen Strukturen, die benötigt werden, um die bereits beschriebenen Interaktionen einzugehen. Daran anknüpfend wurde dann im nächsten Schritt untersucht, inwiefern ähnliche Interaktionen mit SOLO nachgewiesen werden können. Hierzu wurden Hefe 2-Hybridanalysen mit SOLO und den Cohesin-assoziierten Proteinen durchgeführt. Nach Fusion von *Pds5* und *Sororin* mit der kodierenden Region der Gal4-Aktivierungsdomäne bzw. der Gal4-DNA-Bindedomäne wurden die entsprechenden Plasmide zusammen mit Plasmiden, die für SOLO-Fusionskonstrukte kodieren in geeignete Hefestämme transformiert. Mit Hilfe des Wachstums auf den entsprechenden Selektivplatten konnten anschließend Rückschlüsse auf eine Interaktion der Proteinfragmente gezogen werden. So wurde eine Interaktion des N-Terminus von Pds5 (AS: 1-289) mit dem C-Terminus von SOLO (AS: 736-1031) aufgezeigt (Abb. 34B).

Über Sororin ist in *Drosophila* noch nicht viel bekannt. In ersten Untersuchungen wurde Dalmatian als das Sororin-Ortholog der Fliege charakterisiert, für welches bereits kohäsive Funktionen in proliferierenden Geweben beschrieben werden konnten (Nishiyama *et al.*, 2010). Eine weitere Besonderheit des *Drosophila*-Sororins ist die Größe des Proteins, welches etwa viermal so groß ist wie die entsprechenden orthologen Sororin-Versionen in der Maus und im Menschen (Nishiyama *et al.*, 2010). Genauere Funktionsanalysen von *Drosophila*-Sororin sind noch nicht durchgeführt wurden, sodass man auch noch keine Informationen über eine mögliche meiotische Funktion dieses Proteins hat. Um herauszufinden, ob Sororin eine Assoziation mit SOLO eingeht, wurde untersucht, ob eine Interaktion beider Proteine mittels 2-Hybridanalysen nachgewiesen werden kann. Hierbei zeigte sich eine Interaktion zwischen Sororin und dem N-Terminus von SOLO (AS: 1-362, Abb. 34A), wobei eine weitere Aufschlüsselung der Interaktionsfläche in den Bereich, der die RGG-repeats umfasst (AS: 1-137) und in einen Bereich, der die übrigen AS (138-362) beinhaltet, eine deutliche Schwächung des beobachteten Wachstums zu Folge hatte (Daten nicht gezeigt).

Neben den akzessorischen Untereinheiten Scc3, Pds5 und Sororin ist auch der Scc2/Scc4-Ladekomplex mit dem Cohesinkomplex assoziiert. In der Spaltheefe *S. pombe* wurde eine direkte Interaktion der entsprechenden Hefe-Homologen Mis4 und Ssl3 mit allen Cohesinuntereinheiten nachgewiesen (Murayama und Uhlmann, 2014). Jedoch wurde bis jetzt noch nicht beschrieben, inwiefern eine biologische Relevanz für die Interaktion von Scc1 und SMC1 mit dem Cohesinladekomplex gegeben ist. Um genauere Analysen über die Interaktionspartner des *Drosophila*-Orthologs Nipped-B zu erhalten, wurde zunächst untersucht, ob die bereits in *S. pombe* beschriebenen Interaktionen mit Hilfe von 2-Hybridanalysen nachvollzogen werden können. Mittels der durchgeführten 2-Hybridanalysen

konnte jedoch kein Hinweis auf eine direkte Interaktion von Nipped-B (Scc2-Homolog) mit den Cohesinuntereinheiten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), allerdings zeigte sich auf den entsprechenden Selektivplatten nach Transformation der *Nipped-B_N* und *SOLO_C*-kodierenden Plasmide ein deutliches Wachstum, was für eine direkte Interaktion beider Proteinfragmente spricht (Abb. 34B).

A



B

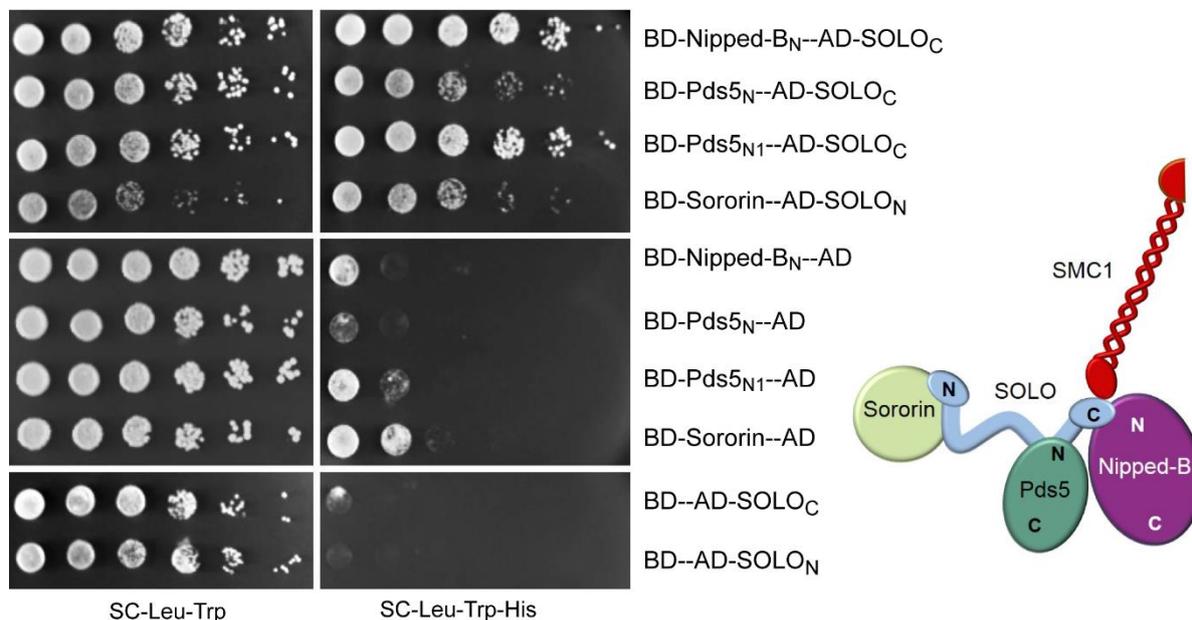


Abbildung 34: Interaktion von SOLO mit Sororin/Dalmatian, Pds5 und Scc2/Nipped-B. Hefe 2-Hybridassay. Fusion der entsprechenden Proteine an Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und an die Bindungsdomäne (BD). Die Hefen wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und dann unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 und 1:3125 verdünnt auf SC-Leu-Trp- sowie SC-Leu-Trp-His-Platten aufgetragen. (A) Nachweis der bereits beschriebenen Interaktionen von Rad21, Scc3, Sororin und Pds5. (B) Interaktion von SOLO mit Sororin, Pds5 und Nipped-B. Nipped-B_N entspricht dabei den AS 1-1043, Pds5_N: AS 1-613, Pds5_{N1}: AS 1-289, SOLO_N: AS 1-362 SOLO_C: AS 736-1031. Die Interaktion zwischen SMC1 und SOLO wurde aus Abb. 26A übernommen. Im rechten Teil der Abbildungen sind die entsprechenden Modelle für die gezeigten Interaktionen zusammengefasst.

Mit Hilfe der durchgeführten 2-Hybridanalysen konnte demnach ein erster Hinweis erbracht werden, dass SOLO mit Nipped-B, Pds5 und Sororin interagiert. Darüber hinaus wurde getestet, ob es eine Assoziation von SOLO mit Wapl gibt. Hier wurden jedoch keine Hinweise auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine gefunden (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde dann überprüft, ob die mittels der 2-Hybridanalysen beobachteten Interaktionen auch so in der Oogenese von *Drosophila melanogaster* nachvollzogen werden können.

2.2.10.1 Assoziation von SOLO und Pds5

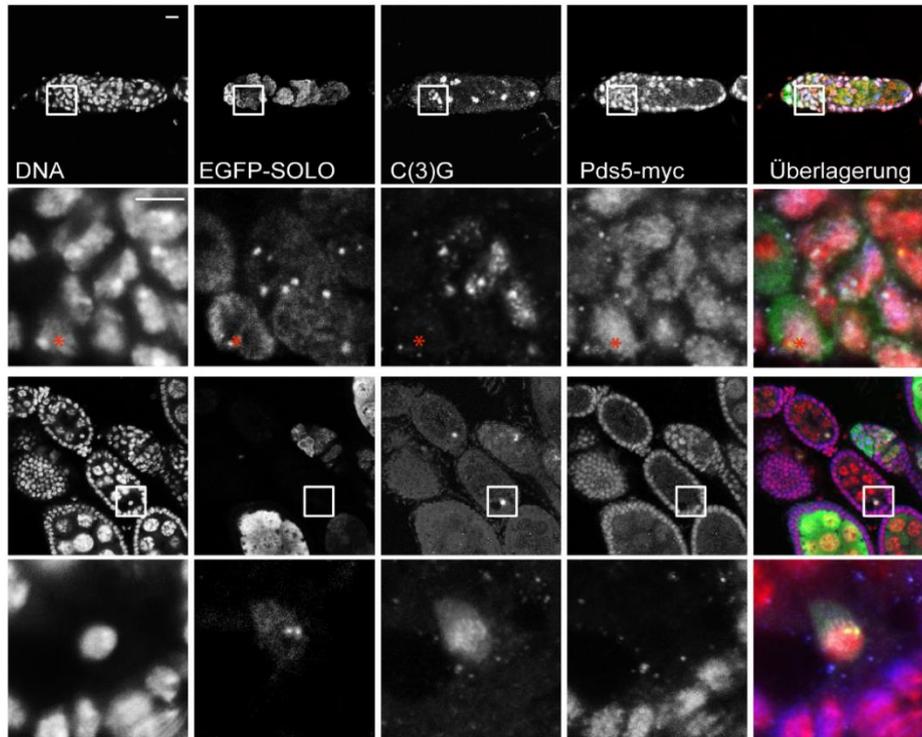
Um erste Rückschlüsse über eine biologische Relevanz der nachgewiesenen Interaktionen in *Drosophila* zu erhalten, wurden Fliegen generiert, die eine Epitop-markierte Variante von Pds5 unter genomischer Kontrolle exprimieren. Da bisher nur sehr wenig über eine Funktion von Pds5 in der weiblichen Meiose von *Drosophila* bekannt ist, wurde in initialen Experimenten zunächst untersucht, wo dieses Protein im Ovar lokalisiert. Hierbei zeigte sich, dass es eine deutliche Anreicherung dieser Cohesinuntereinheit im anterioren Bereich des Germariums gibt. Die Signalintensität wird jedoch im posterioren Bereich des Germariums deutlich schwächer (Abb. 35A). Bei genauerer Betrachtung zeigt sich keine Kolo-kalisation von Pds5-myc mit der SC-Untereinheit C(3)G, sondern lediglich ein kern-lokalisiertes, diffuses Signal, was auch in Nicht-Pro-Oozyten nachweisbar ist (Abb. 35A, rote Sterne). In den späteren Eikammern sieht man keine Assoziation von Pds5-myc mit dem Oozytenkern, allerdings kommt es zu einer deutlichen Anreicherung in den Follikelzellen (Abb. 35A, untere beiden Reihen).

In parallel dazu durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Pds5-spezifischen Antikörpern konnte dieses Lokalisationsmuster im Wesentlichen bestätigt werden (Kusch, 2015). Zu Beginn des Pachytäns kommt es zu einer gleichmäßigen Verteilung der Fluoreszenzsignale im Kerninneren, wohingegen im weiteren Verlauf der Prophase sich dieses kernlokalisierte Signal auflöst und hauptsächlich an der Kernhülle zu finden ist. Pds5 wirkt dann dort zusammen mit Brca2 und Lamin an der Immobilisierung und Reparatur der *crossover* (Kusch, 2015). Diese Kernmembran-assoziierte Lokalisation von Pds5 konnte hier mit Hilfe des myc-Epitop-markierten Transgens nicht nachgewiesen werden. Ein im Vergleich zum endogenen Protein abweichendes Expressionslevel oder eine schlechtere Antikörperzugänglichkeit könnten hierfür zugrunde liegen. Somit ist festzuhalten, dass Pds5-myc in den Pro-Oozyten des Germariums lokalisiert, jedoch kein SC-spezifisches Muster aufweist. Aufgrund der Expression und Lokalisation in diesen Zellen, ist es jedoch vorstellbar, dass es in diesen Zellen eine Assoziation mit SOLO gibt.

Um erste Hinweise auf die Funktionalität der Epitop-markierten Pds5-Variante zu erhalten, wurde zunächst untersucht, inwiefern die für andere Organismen beschriebene Lokalisation im Verlauf des mitotischen Zellzyklus für das *Drosophila*-Pds5 nachvollzogen werden kann.

In HeLa-Zellen weist Pds5 eine Chromatin-Assoziation in der Interphase auf, welche zu Beginn der Mitose deutlich reduziert wird und erst am Ende der Telophase wieder an der DNA nachweisbar ist (Losada *et al.*, 2005).

A



B

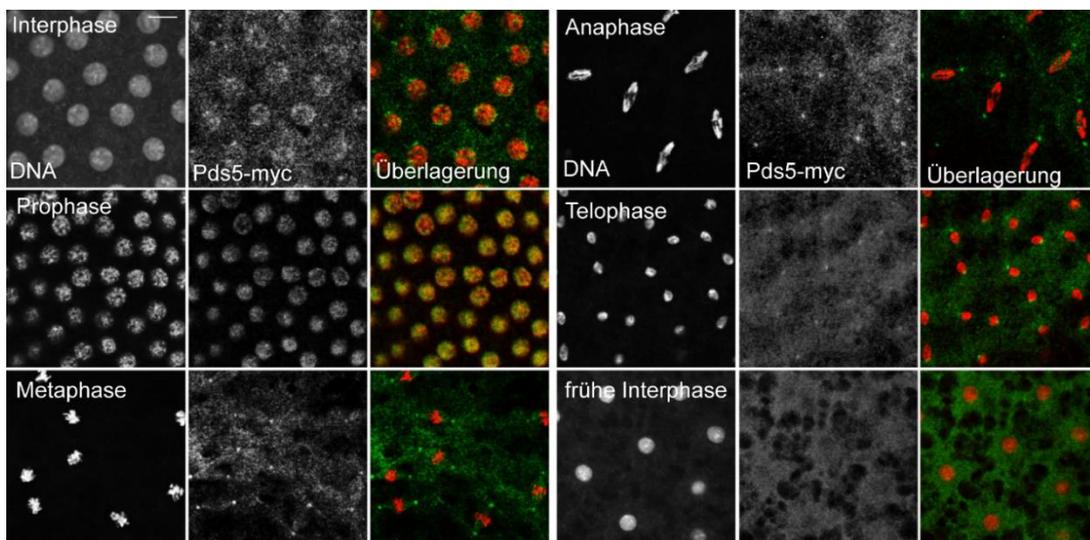


Abbildung 35: Lokalisation von Pds5-myc in Pro-Oozyten (A) und in den synzytialen Teilungen der Embryogenese (B). (A) Immunfluoreszenzanalysen von Germarien (oberen zwei Reihen) und einer Eikammer des Stadiums 4 (unteren zwei Reihen) von Fliegen, die Pds5-myc unter genomischer Kontrolle exprimieren. Die DNA ist mit Hoechst 33258 gefärbt (rot), anti-C(3)G ist in weiß dargestellt, EGFP-SOLO ist in grün gezeigt und Pds5-myc (anti myc) in blau. Die roten Sterne zeigen eine Nicht-Pro-Oozyte, die durch Fehlen eines C(3)G-Signals gekennzeichnet ist. Die oben eingerahmten Bereiche sind in der zweiten bzw. vierten Reihe der Abbildung vergrößert dargestellt. Der Größenmaßstab beträgt 5 μ m. (B) Immunfluoreszenzanalysen von 1-2 h alten Embryonen, dabei ist die DNA in rot gezeigt (gefärbt mit Hoechst 33258) und Pds5-myc mit myc-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (grün). Der Größenmaßstab beträgt 10 μ m.

Die Lokalisation des *Drosophila*-Orthologs weist in den synzytialen Teilungen ein ähnliches Muster auf. In der Interphase bzw. zu Beginn der Mitose ist eine deutliche Assoziation mit dem Chromatin zu verzeichnen, die zu Beginn der Metaphase verschwindet und erst nach Beendigung der Mitose wieder zu sehen ist (Abb. 35B). Neben diesem erwarteten Lokalisationsverhalten wurde in Mitose auch eine Lokalisation am Zentrosom bzw. der mitotischen Spindel nachgewiesen. Dies wird als punktförmiges Signal im Bereich der Spindelpole sichtbar. Hinweise für eine Assoziation des Cohesinproteins mit dem Zentrosom wurden bisher in keinem Organismus beschrieben. Es ist jedoch vorstellbar, dass Pds5 ebenfalls dort lokalisiert, da auch Scc1 bzw. der gesamte Cohesinkomplex als sogenannter „centriole-engagement factor“ am Zentrosom fungiert (Schöckel *et al.*, 2011). Eine weitere Erklärung für die zentrosomale Lokalisation in den synzytialen Teilungen könnte auch darin begründet sein, dass die Lokalisation an den Zentrosomen ein Artefakt ist, da das generierte Pds5-myc-Konstrukt nicht in der Lage ist den *pds5*-mutanten (*pds5^{e6}/pds5^{EY06473}*) Phänotyp zu komplementieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die fehlende Komplementation allein aufgrund eines nicht funktionellen Transgens zustande kommt. Weiterhin denkbar wären sekundäre Letalmutationen auf den mutanten *pds5*-Allelen, die die Ausbildung von trans-heterozygoten Individuen unterbinden. Nichtsdestotrotz deckt sich das mitotische Lokalisationsverhalten von Pds5-myc im Wesentlichen mit dem, was bereits in anderen Organismen beschrieben wurde (Losada *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte sowohl durch Immunfluoreszenzanalysen mit Pds5-spezifischen Antikörpern (Kusch, 2015) als auch durch eine Epitop-markierte Version von Pds5 eine Lokalisation in frühen Stadien der Oogenese nachgewiesen werden, also zu einem Zeitpunkt, zu dem auch SOLO im Germarium nachweisbar ist.

Um nun Hinweise für eine mögliche Interaktion beider Proteine zu erhalten, wurden Untersuchungen mit mutanten Allelen durchgeführt. *Pds5*-mutante Fliegenweibchen weisen Fehler bei der Restriktion der C(3)G-positiven Kerne auf. So hat das Fehlen von Pds5 zur Folge, dass in Region 3 des Germariums und in Eikammern des Stadiums 2 noch mindestens 2 Kerne einen SC aufweisen (Barbosa *et al.*, 2007), wohingegen in wildtypischen Ovarien zu diesem Zeitpunkt der Oogenese nur noch ein Kern mit einem ausgebildeten SC zu finden ist. Daran anknüpfend wurde untersucht, inwiefern das zusätzliche Einbringen eines mutanten *so/o*-Allels diesen Phänotyp beeinflusst. Wird das Level an Pds5 durch ein mutantes Allel auf ca. 50% reduziert, hat dies keine oder nur sehr geringe Auswirkungen auf die Restriktion des SCs (Abb. 36B). In den meisten Fällen ist in Eikammern des 2. Stadiums nur noch ein Kern zu finden, der einen SC aufweist. Kombiniert man verschiedene mutante *pds5*-Allele im heterozygoten Zustand mit einem mutanten *so/o*-Allel, so führt dies zum deutlichen Anstieg an Eikammern mit 2 Pro-Oozyten (Abb. 36). Durch diesen additiven Effekt konnte demnach der erste Hinweis dafür erbracht werden, dass die *in vitro* nachgewiesene

Interaktion zwischen Pds5 und SOLO in *Drosophila* während der Oogenese ebenfalls stattfindet und eine essentielle Funktion für die Regulation der SC-Restriktion hat.

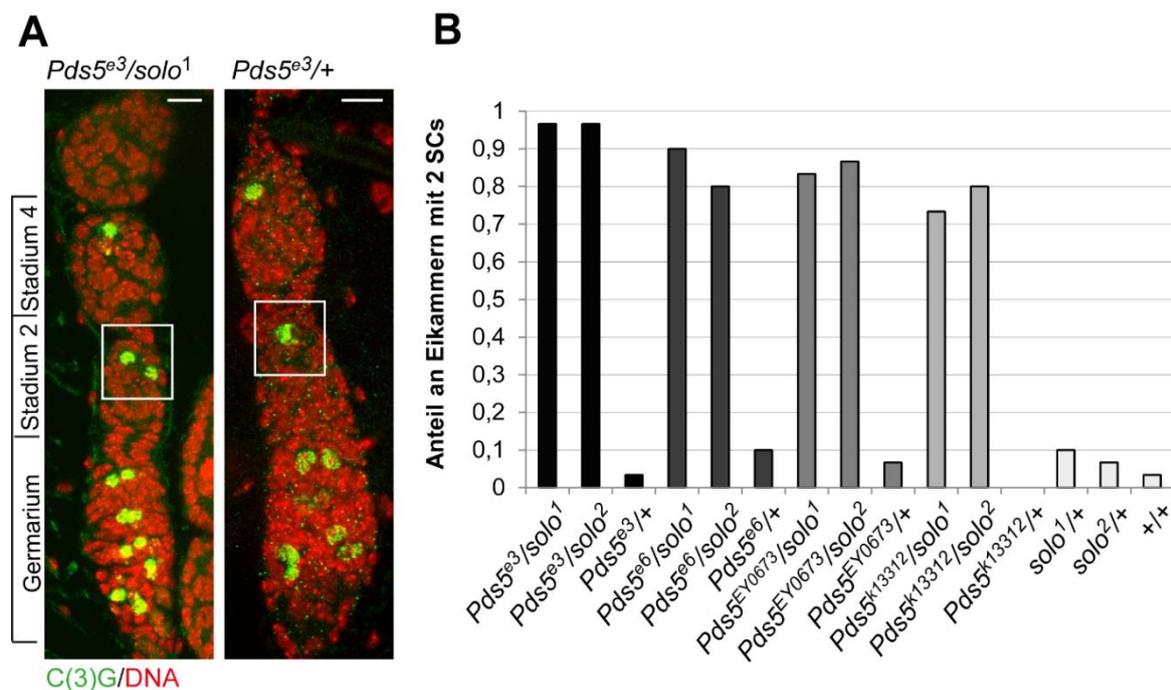


Abbildung 36: Genetische Interaktion zwischen SOLO und Pds5. (A) Repräsentative Darstellung von überlagerten Z-Stapeln einzelner Ovariolen. Die DNA ist in rot gezeigt (gefärbt mit Hoechst 33258) und C(3)G in grün. Der Genotyp der entsprechenden Weibchen ist angegeben. Der Längenmaßstab beträgt 10 µm. Eingerahmt sind die Oozytenkerne in Eikammern des Stadiums 2. (B) Quantifizierung des Anteils an Ovariolen, bei denen in den frühen Eikammern (Stadium 2-4) noch 2 SCs nachweisbar sind. Die Genotypen der verwendeten Fliegenweibchen sind angegeben. Ausgewertet wurden jeweils 30 Ovariolen.

2.2.10.2 Assoziation von SOLO und Sororin

Um analog für Sororin zu testen, ob die mit Hilfe der 2-Hybridanalysen nachgewiesenen Interaktion mit SOLO auch in der Oogenese der *Drosophila*-Weibchen stattfindet, wurden zwei verschiedene Fliegenlinien generiert, die myc-markierte Versionen von Sororin exprimieren. Zum einen erfolgte die Expression unter genomischer Kontrolle und zum anderen wurden UAS-Konstrukte generiert, welche eine Gal4-abhängige-Überexpression dieser akzessorischen Cohesinuntereinheit ermöglichen. Nach nos-Gal4 getriebener Überexpression sind drei verschiedene Lokalisationsmuster von Sororin-myc im Germarium zu verzeichnen (Abb. 37A): (1) In einigen, wenigen Pro-Oozyten der Region 2a zeigte sich eine deutliche Akkumulation in Teilregionen des meiotischen Chromatins, jedoch keine Kolokalisation mit dem SC. In diesen Bereichen des Germariums kommt es zur vollständigen Assemblierung des SCs und anschließend zur Initiation der meiotischen Rekombination, die durch Ausbildung von Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur mit Hilfe der homologen Chromosomen gekennzeichnet ist (Übersicht in Lake und Hawley, 2012).

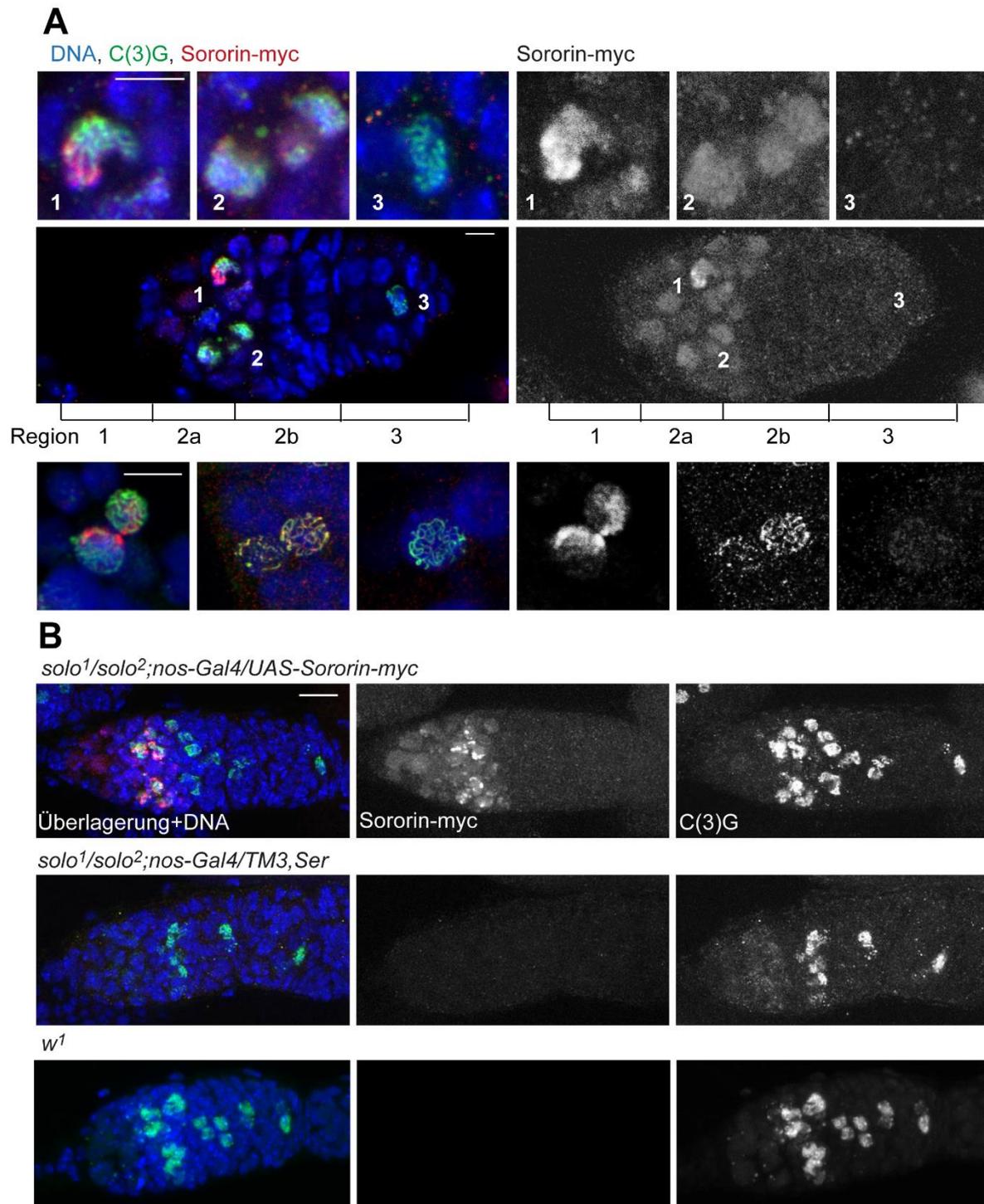


Abbildung 37: nos-Gal4-abhängige Expression von UAS-Sororin-myc komplementiert das Fehlen von SOLO in Bezug auf die Morphologie des SCs. (A) Immunfluoreszenzanalysen von Germarien (oberen zwei Reihen) und von Chromosomenspreads (untere Reihe). Die in der oberen Reihe gezeigten Ausschnitte sind im mittleren Teil der Abbildung mit den entsprechenden Ziffern markiert. Die einzelnen Regionen des Germariums sind unterhalb der Übersichtsaufnahme angegeben. Der Größenmaßstab beträgt 5 μm . (B) Immunfluoreszenzanalysen von überlagerten Z-Stapeln von Germarien *solo*-mutanter Weibchen mit oder ohne zusätzliche Überexpression von Sororin-myc. Die DNA ist mit Hoechst 33258 gefärbt (blau), anti-C(3)G ist in grün dargestellt und Sororin-myc (anti-myc) ist in rot gezeigt. Bei dem dargestellten *w*-Beispiel erfolgte keine myc-spezifische Färbung. Der Größenmaßstab beträgt 20 μm .

(2) Im mittleren Bereich des Germariums (Region 2a/2b) gab es eine Vielzahl an Zellen mit einem schwachen myc-Signal. Dieses myc-Signal deckt sich mit dem von C(3)G, wie mit Hilfe von Chromosomenspreads gezeigt werden konnte (Abb. 37A unten). (3) Im posterioren Teil des Germariums (Region 3) konnte in den Oozytenkernen kein spezifisches Signal für Sororin nachgewiesen werden und auch zu späteren Stadien der Oogenese konnte keine Kolokalisation mit dem meiotischen Chromatin gezeigt werden. Zusammenzufassen ist demnach, dass Sororin in Bereichen des Germariums (Region 2a) zu finden ist, in denen die Initiation der meiotischen Rekombination stattfindet, jedoch im weiteren Verlauf der Meiose nicht mehr am Oozytenkern zu finden ist.

In Vertebraten führt die Erhöhung des Sororinlevels zu einer verstärkten Rekrutierung von Cohesin ans mitotische Chromatin (Rankin *et al.*, 2005). Deshalb wurde untersucht, ob eine gegenseitige Abhängigkeit von Sororin und SOLO auch in der Meiose von *Drosophila* gegeben ist und ob eventuell mehr SOLO bzw. Rad21 ans meiotische Chromatin geladen werden kann. Jedoch konnte durch die UAS/Gal4-abhängige Überexpression von Sororin keine veränderte Lokalisation von Rad21 oder SOLO festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Das Fehlen von SOLO während der Oogenese hat nicht nur kohäsive Defekte zur Folge, sondern auch eine gestörte SC-Assemblierung (Yan und McKee, 2013). Diese Beeinträchtigung lässt sich in zwei distinkte Phänotypen aufschlüsseln. Zum einen ist die Anzahl der SC-etablierenden Zellen innerhalb des Germariums deutlich reduziert und zum anderen weisen die vorhandenen C(3)G-Färbungen deutliche Abnormalitäten auf, die sich durch fragmentierte oder zum Teil nur noch punktförmige SC-Reste äußern (Yan und McKee, 2013). Der letztgenannte Phänotyp ist bei den einzelnen *solo*-mutanten Ovarien unterschiedlich stark ausgeprägt. In einigen Ovariolen finden sich wildtypische C(3)G-Signale, in anderen wiederum deutlich fragmentierte SCs. Aufgrund der hohen Variabilität dieses Phänotyps wurde die Struktur des SCs nicht weiter untersucht, sondern nur die Anzahl der SC-positiven Zellen im Germarium bestimmt. Nach *nos*-Gal4 gesteuerter Überexpression von Sororin-myc kommt es zur deutlichen Suppression des *solo*-mutanten Phänotyps (Abb. 37B, obere Reihe). Innerhalb des Germariums werden erheblich mehr Keimzellzysten gebildet, die im Laufe der Entwicklung einen normalen SC assemblieren. Dabei erfolgt die Etablierung des SCs in dem gleichen Zeitfenster, zu dem es auch die Akkumulation von Sororin-myc festzustellen ist.

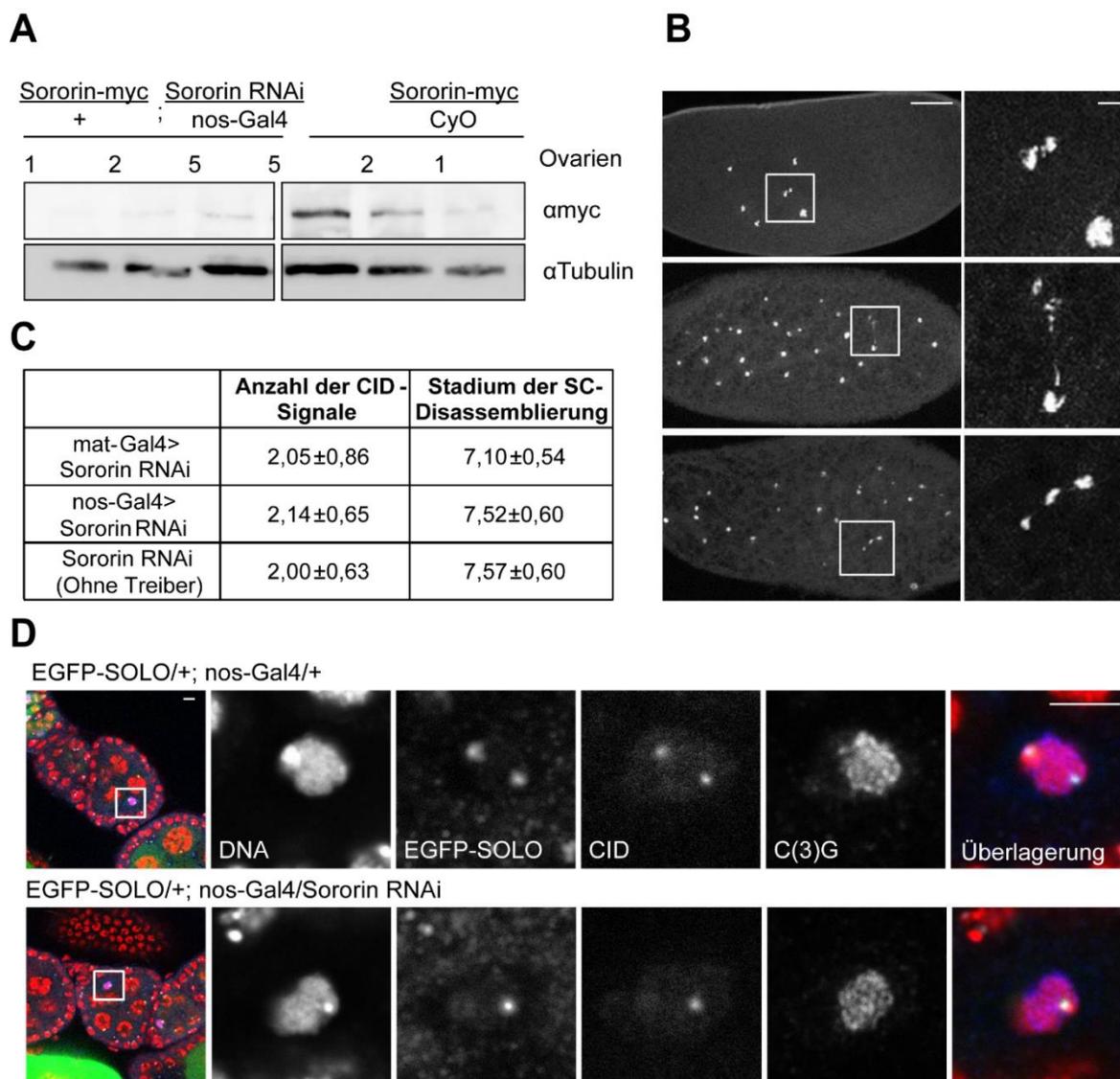


Abbildung 38: RNAi-vermittelte Inaktivierung von Sororin führt zu Kohäsionsdefekten in synzytialen Embryonen und hat keine Effekte auf den Verlauf der Oogenese (Kohäsion, SC-Stabilität und SOLO-Lokalisation). (A) Immunblot zum Nachweis der RNAi-abhängigen Reduktion des Sororin-myc-Proteinlevels, welches unter genomischer Kontrolle exprimiert wird. Der *knockdown* erfolgte nos-Gal4 (III)-abhängig durch Synthese einer Sororin-spezifischen shRNA (Sororin II, hybridisiert an Basenpaarposition 1775). Geladen wurden jeweils 5, 2 und 1 Ovarienäquivalente. Die Sondierung erfolgte mit anti-myc- und anti-Tubulin-spezifischen Antikörpern. (B) Synzytiale Embryonen, die von Müttern abgelegt wurden, die den Genotyp *nos-Gal4/Sororin RNAi II* hatten. Gefärbt wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258. Eingerahmt sind die im rechten Teil gezeigten Bereiche. Der Größenmaßstab beträgt 50 μ m (links) bzw. 10 μ m (rechts). (C) Tabellarische Zusammenstellung der durchschnittlichen Anzahl der CID-Signale in Oozytenkernen von Eikammern des Stadiums 5-7 und Stadium der durchschnittlichen SC-Disassemblierung. Genotypen der verwendeten Fliegen: *mat-Gal4/+; UAS-Sororin RNAi/+*; *nos-GAL4/UAS-Sororin RNAi*, *UAS-Sororin RNAi/UAS-Sororin RNAi*. Ausgezählt wurden jeweils 20 Eikammern bzw. 20 Ovariolen. (D) Repräsentative Darstellungen von Oozytenkernen von Eikammern des 5. Stadiums. Die DNA ist in rot gezeigt (gefärbt mit Hoechst 33258) EGFP-SOLO (anti-EGFP) in grün, C(3)G in blau und CID in weiß. Eingerahmt sind die im rechten Teil der Abbildung gezeigten Bereiche. Der Längenmaßstab beträgt 5 μ m.

Durch die zusätzliche Überexpression von Sororin-myc konnte demnach das Fehlen von SOLO bei der Initiation der SC-Assemblierung komplementiert werden. Somit konnte ein weiterer Hinweis erbracht werden, dass SOLO und Sororin gemeinsam eine Funktion bei der

Assemblierung des SCs erfüllen. Vorstellbar wäre aber auch eine gemeinsame Funktion bei anderen essentiellen Vorgängen während der Initiation der meiotischen Rekombination, die wiederum die Ausbildung des SCs begünstigen.

In einem weiteren Experiment wurde anschließend untersucht, ob die Herunterregulation des Sororinlevels einen Einfluss auf den Verlauf der Meiose hat und ob hierbei die Lokalisation von SOLO beeinträchtigt wird. Die Fliegenlinien zur RNAi-vermittelten Inaktivierung von Sororin führten zur deutlichen Reduktion (ca. 80%) des Proteinlevels, was mit Hilfe von Immunblots nachgewiesen wurde (Abb. 38A). Auch konnte in synzytialen Embryonen gezeigt werden, dass das Fehlen von Sororin einen frühzeitigen Kohäsionsverlust zur Folge hat (Abb. 38B), der die Letalität der entsprechenden Embryonen zur Folge hat. Um einen Einfluss von Sororin auf den Verlauf der Meiose zu beurteilen, erfolgten *nos-Gal4* und *mat-Gal4* abhängige Herunterregulationen des Proteinlevels. Jedoch konnten keine Beeinträchtigungen der Oogenese in Bezug auf die Kohäsion, SC-Stabilität oder die zentromerische SOLO-Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 38C,D). Die Anzahl der CID-Signale in Eikammern des Stadiums 5-7 wiesen auch nach Oogenese-spezifischer Inaktivierung von Sororin durchschnittlich 2 Signale auf, was im gleichen Größenordnungsbereich ist wie in wildtypischen Oozytenkernen (Abb. 38C). Die Disassemblierung des SCs fand ebenfalls mit einer ähnlichen Kinetik wie in Kontroll ovariole statt (Abb. 38D).

Es ist somit anzunehmen, dass Sororin in Meiose keine oder nur eine untergeordnete stimulierende Funktion auf die Kohäsion ausübt. Jedoch ist es vorstellbar, dass es aufgrund der Akkumulation in den Bereichen, in denen die meiotische Rekombination stattfindet auch eine regulatorische Funktion bei diesem Prozess besitzt und dabei eventuell mit SOLO assoziiert ist. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass die Überexpression von Sororin den abnormalen Phänotyp des SCs, der mit dem *solo*-mutanten Hintergrund assoziiert ist, komplementieren kann.

2.2.10.3 Assoziation von SOLO und SUNN

Vor kurzem wurde das Protein SUNN identifiziert, das sowohl in der weiblichen Meiose als auch in der Spermatogenese mit SMC1 und SOLO an den Zentromeren kolokalisiert und für deren zentromerische Lokalisation essentiell ist (Krishnan *et al.*, 2014). Darüber hinaus sind *sunn*-Mutanten durch eine hohe Rate an *non-disjunction* und den Verlust der zentromerischen Kohäsion gekennzeichnet (Krishnan *et al.*, 2014). Erste bioinformatische Analysen legen nahe, dass SUNN anhand verschiedener Strukturübereinstimmungen eine hohe Ähnlichkeit zur Proteinfamilie der Exportine/Importine aufweist, die durch einen hohen Grad an *HEAT-repeats* gekennzeichnet sind. SA/Scc3 besitzt ebenfalls *HEAT-repeats* und weist Strukturhomologien zu Exportin/Importin-Proteinfamilie auf, sodass vermutet wird, dass SUNN eventuell als strukturelles Homolog zu SA/Scc3 fungiert (Krishnan *et al.*, 2014). Um zu

analysieren, ob die gegenseitige Abhängigkeit der zentromerischen Lokalisation von SUNN und SOLO durch eine direkte Interaktion vermittelt wird, wurden Koimmunpräzitations-experimente und 2-Hybridanalysen durchgeführt. Hierbei konnte in der Tat gezeigt werden, dass es eine Assoziation der beiden Proteine gibt, die hauptsächlich über die ersten 362 Aminosäuren vermittelt wird (Abb. 39 B). Darüber hinaus interagiert SUNN auch mit dem mittleren Teil von SOLO (AS: 363-735), jedoch in einem deutlich schwächeren Umfang. Diese beiden Interaktionen sind vermutlich auch für die gegenseitige Abhängigkeit der Lokalisation von SUNN und SOLO verantwortlich.

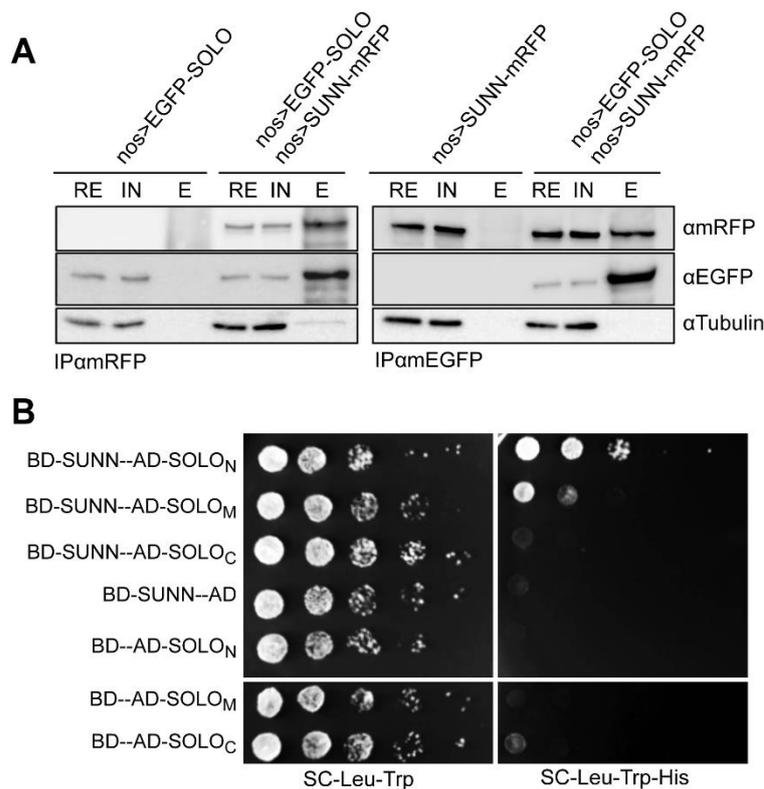


Abbildung 39: Interaktion von SUNN und SOLO. Immunpräzitationen (IPαEGFP und IPαmRFP) von Proteinextrakten aus Ovarien, die EGFP-SOLO und SUNN-mRFP unter nos-Gal4-Kontrolle exprimieren. Westernblot zum Nachweis der Proteinlevel von SUNN-mRFP (αmRFP), EGFP-SOLO (αEGFP) und αTubulin. (B) 2-Hybridassay. Fusion der entsprechenden Proteine an Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und an die Bindungsdomäne (BD). Die Hefen wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und dann unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125 und 1:625 aufgetragen. SOLO_N entspricht den AS 1-362, SOLO_M: AS 363-735, SOLO_C: AS 736-1031. Verwendet wurden SC-Leu-Trp- sowie SC-Leu-Trp-His-Platten.

Es ist somit zusammenzufassen, dass SOLO mit einer Vielzahl an Proteinen interagiert, die für die Etablierung (Nipped-B; Ciosk *et al.*, 2000) und Aufrechterhaltung der Kohäsion (Pds5 und Sororin, Losada *et al.*, 2005, Nishiyama *et al.*, 2010) beschrieben wurden sind. Darüber hinaus konnte außerdem gezeigt werden, dass es eine Assoziation von SOLO und SUNN gibt, für welches der genaue Wirkungsmechanismus zur Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion in *Drosophila melanogaster* noch nicht genau bekannt ist.

3. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Analysen zum Aufbau des meiotischen Cohesinkomplexes in *Drosophila melanogaster*-Weibchen durchgeführt. Da in diesem Modellorganismus bisher kein Rec8-Homolog gefunden werden konnte, wurde die grundlegende Frage nach der Identität der α -Kleisinuntereinheit dieses Komplexes aufgegriffen. In einer Vielzahl anderer Eukaryonten, von der Hefe bis zum Menschen, wurden Homologe für Rec8 beschrieben, welche essentiell für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion sind und für die initiale Rekrutierung und Assemblierung des lateralen Elements des SCs benötigt werden (Pasierbek *et al.*, 2001, Cai *et al.*, 2003, Chelysheva *et al.*, 2005, Klein *et al.*, 1999). In *Drosophila melanogaster* hingegen sind bislang drei verschiedene Kandidatenproteine (C(2)M, ORD und SOLO) vorgeschlagen worden, die aufgrund von Strukturvorhersagen, der entsprechenden mutanten Phänotypen oder biochemisch/genetischer Eigenschaften als funktionelles Rec8-Homolog in Frage kommen könnten (Manheim und McKim, 2003, Heidmann *et al.*, 2004, Miyazaki und Orr-Weaver, 1992, Yan *et al.*, 2010, Yan und McKee, 2013). Allerdings erfüllt keines dieser Proteine sämtliche Anforderungen an ein meiotisches α -Kleisin.

3.1 Funktion von C(2)M in der weiblichen Meiose von *Drosophila melanogaster*

In initialen Experimenten vor ca. 10 Jahren wurde C(2)M als ein Protein identifiziert, das zur Proteinfamilie der α -Kleisine gehört (Schleiffer *et al.*, 2003) und im Verlauf der Prophase I am meiotischen Chromatin nachweisbar ist (Manheim und McKim, 2003). Jedoch wurde relativ schnell ausgeschlossen, dass dieses Protein als Rec8 Homolog in Frage kommt, da C(2)M erst nach Beendigung der prämeiotischen S-Phase ans Chromatin geladen wird und bereits im späten Pachytän, also vor den meiotischen Teilungen, nicht mehr am Oozytenkern nachweisbar ist (Heidmann *et al.*, 2004). Das Fehlen von C(2)M hat darüber hinaus keine Auswirkungen auf die meiotische Kohäsion und durch das Einbringen von Mutationen potentieller Separase-Spaltstellen findet ebenfalls keine Beeinträchtigung der Meiose statt (Heidmann *et al.*, 2004). Nach dem heutigen Wissensstand scheint C(2)M daher lediglich eine Komponente des lateralen Elements des SCs zu sein, welches mit Cohesin assoziiert ist und an der Chromosomenverteilung in Meiose I beteiligt ist (Heidmann *et al.*, 2004). Weiterhin ist C(2)M essentiell für die Ausbildung der Chromosomen *cores* (Khetani und Bickel, 2007). Diese werden durch Verkürzungen entlang der Längsachse eines jeden Schwesterchromatidenpaares etabliert und bilden die Grundvoraussetzung für die Assemblierung des axialen und lateralen Elements des SCs (Revenkova und Jessberger,

2006, Stack und Anderson, 2001). Fehlt C(2)M, werden keine Chromosomen *cores* mehr ausgebildet und SMC1 und SMC3 sind lediglich als diffuses Signal in allen Kernen einer Zyste nachzuweisen. Da C(2)M mit SMC3 assoziiert ist (Heidmann *et al.*, 2004), wäre ein möglicher Wirkungsmechanismus von C(2)M dahingehend, dass es die Rekrutierung des meiotischen Cohesinkomplexes ermöglicht und so zur Etablierung der Chromosomen *cores* und zur der Assemblierung des SCs beiträgt (Khetani und Bickel, 2007). Daran anknüpfend wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben, dass C(2)M keine direkte Assoziation mit den SMCs eingeht, sondern mit dem C-Terminus von Rad21 interagiert und so die Verknüpfung zwischen dem lateralen Element des SCs und Cohesin herstellt. Diese Assoziation liefert somit den ersten Hinweis auf eine Interaktion zwischen zwei verschiedenen α -Kleisinen. Mit Hilfe von 2-Hybridanalysen und Immunpräzipitationsanalysen konnte bisher nur eine Homodimerisierung von humanem Rad21 gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2008), nicht jedoch die Assoziation zweier unterschiedlicher Kleisine. Ausgehend von den publizierten elektronenmikroskopischen Analysen, die eine Lokalisation des N-Terminus von C(2)M an der inneren Grenzfläche zwischen dem lateralen Element und den transversalen Filamenten nahelegen (Anderson *et al.*, 2005), scheint der C-Terminus von Rad21 ebenfalls in diesem Bereich des SCs zu finden zu sein.

3.2 Rad21 als Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes?

Die Interaktion von Rad21 und C(2)M liefert einen ersten Hinweis darauf, dass Rad21 auch in der Meiose von *Drosophila melanogaster* eine essentielle Funktion übernehmen könnte. Um weitere Hinweise für diese Annahme zu erhalten, wurden Chromosomenspreads durchgeführt, die eine klare Kolokalisation der mitotischen Cohesinuntereinheit mit der SC-Komponente C(3)G aufzeigen. Aufgrund der Auflösungsgrenze des verwendeten Lichtmikroskops konnte jedoch keine genauere Aussage über die exakte Lokalisation von Rad21 innerhalb des SCs getroffen werden. Hierzu müssten höherauflösende Mikroskopietechniken, wie zum Beispiel Immun-Elektronenmikroskopie oder 3D-SIM-Mikroskopie (*3D Structured Illumination Microscope*) verwendet werden. Mit Hilfe der letztgenannten Methode konnte unter anderem Corolla als eine Komponente des zentralen Elements charakterisiert werden (Collins *et al.*, 2014), da das Immunfluoreszenzsignal dieses Proteins als ein einzelnes Signal innerhalb der beiden Signale des C-terminalgerichteten C(3)G-Signals sichtbar war.

In Immunfluoreszenzanalysen von intakten Ovarien konnte Rad21 nicht am meiotischen Chromatin nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine Maskierung der von den Antikörpern erkannten Epitope sein, welche durch die intensiven Waschschriffe mit Detergenzien bei der Durchführung der Chromosomenspreads entfernt wird und so die Antikörperzugänglichkeit deutlich erhöht.

Um die Frage eindeutig zu klären, ob Rad21 als ausschließliches kohäsives Kleisinprotein in der weiblichen Meiose von *Drosophila melanogaster* fungiert, wurde eine Situation geschaffen, bei der es zu einer Oogenese-spezifischen Inaktivierung der Cohesinuntereinheit kommt. Hierzu erfolgte eine TEV-Protease-abhängige Spaltung von Rad21 im Pachytän der Prophase I. Geht man von einer kohäsiven Funktion der mitotischen Cohesinuntereinheit in Meiose aus, würde man eine frühzeitige Dissoziation der homologen Chromosomen und der Schwesterchromatiden erwarten, die dann zu Fehlverteilungen in beiden meiotischen Teilungen führt. Mit Hilfe der durchgeführten FISH-Analysen und weiterer Immunfluoreszenzuntersuchungen mit zentromerischen Markerproteinen konnten jedoch keine Segregationsdefekte in Meiose nachgewiesen werden. Da dieses System bereits in mitotisch-proliferierenden Geweben dazu verwendet wurde Rad21 effizient zu inaktivieren und massive Segregationsdefekte zu induzieren (Pauli *et al.*, 2008), wären auch Segregationsdefekte in der Meiose nach effizienter ektopischer Rad21-Hydrolyse zu erwarten gewesen, sofern dieses Protein eine signifikante kohäsive Funktion erfüllt. In der Oogenese der Fruchtfliege können jedoch Mechanismen vorliegen, die die Rad21-Zugänglichkeit der Protease deutlich beeinträchtigen. In Mausoozyten sind jedoch keine Meiose-spezifischen Abschirmungen der α -Kleisinproteine vorhanden, da die TEV-Protease vermittelte Spaltung des Rec8-Orthologs eine effiziente Inaktivierung der Cohesinuntereinheit und eine Zerstörung der meiotischen Schwesterchromatidkohäsion zur Folge hatte (Tachibana-Konwalski *et al.*, 2010, Tachibana-Konwalski *et al.*, 2013). Ist die Rad21-Spaltung in den Ovarien von *Drosophila* ebenfalls effizient genug, um potentiell die Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion hervorzurufen, die dann zur Ausbildung massiver Segregationsdefekte führt? Diese Frage lässt sich nicht eindeutig beantworten. Jedoch weisen Studien in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* darauf hin, dass eine Reduktion des Rad21-Levels auf 13% der ursprünglichen Menge keinen Einfluss auf die Schwesterchromatidkohäsion oder die Segregation der Chromosomen hat (Heidinger-Pauli *et al.*, 2010). Unter der Annahme, dass dieser Zusammenhang in der Meiose von *Drosophila melanogaster* ebenfalls gegeben ist, ist nicht auszuschließen, dass bei einer nicht-gespaltenen Restmenge von 5-10% (Nagarkar, 2010, Urban *et al.*, 2014) noch genügend intaktes Rad21 übrig ist, welches die Aufrechterhaltung der Kohäsion in Meiose ermöglicht. Wenn diese Restmengen an ungeschnittenem Rad21 ausreichen sollten eine ungestörte Progression durch die Meiose zu unterstützen, sollten auch die frühen mitotischen Teilungen im Zytoplasma des Embryos weitestgehend ungestört verlaufen. In der anschließenden Embryogenese kam es aber zur Ausprägung massiver mitotischer Defekte schon während der ersten Teilungen, was zur Letalität der entsprechenden Embryonen führte. Also kann daher davon ausgegangen werden, dass schon unmittelbar nach Beendigung der Meiose nicht genug intaktes Rad21 vorhanden ist um Schwesterchromatidkohäsion zu vermitteln.

Um diesen Erklärungsansatz für das Ausbleiben der meiotischen Phänotypen jedoch gänzlich auszuschließen, wurde in einem reziproken Ansatz untersucht, welche Konsequenzen das Vorhandensein einer Rad21-Version hervorruft, die nicht mehr durch Separase gespalten werden kann. Hierzu erfolgte die Oogenese-spezifische Expression einer Rad21-Variante (Rad21^{NC}), bei der zwei potentielle Separase-Spaltstellen dahingehend mutiert waren, dass eine gezielte Proteolyse nicht mehr erwartet wird. Da es in *Drosophila* bislang nicht gelungen ist einen biochemischen assay zu etablieren, der eine Separase-abhängige Spaltung der Kleisinuntereinheit Rad21 beim Übergang von Metaphase zur Anaphase *in vitro* nachvollzieht, konnte die Funktionalität diese Konstrukts nicht biochemisch nachgewiesen werden. Aufgrund der beobachteten Phänotypen nach Expression von Rad21^{NC} in mitotisch-proliferierenden Geweben ist jedoch davon auszugehen, dass die gezielte Mutagenese der Separase-Spaltstellen zur Stabilisierung der Schwesterchromatidkohäsion führt. Die Kohäsion kann somit zum Ende der Mitose nicht mehr aufgelöst werden und deshalb kommt es zu massiven Defekten bei der Zellteilung und zur Ausbildung von Anaphasebrücken. Da diese Abnormalitäten jedoch nur bei mitotischen Zellteilungen auftreten und der Verlauf der Meiose nach Expression von Rad21^{NC} keinerlei Beeinträchtigungen aufweist, konnte ein weiterer Hinweis dafür erbracht werden, dass Rad21 kein essentieller Bestandteil eines kohäsiven, meiotischen Cohesinkomplexes ist.

Da jedoch durch die gezielte Proteolyse von Rad21 eine frühzeitige Destabilisierung des SCs hervorgerufen wird, ist davon auszugehen, dass die mitotische Cohesinuntereinheit Rad21 doch eine Funktion während der Oogenese erfüllt, die sich von der Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion unterscheidet. Unter Berücksichtigung aller Daten scheint es demnach keine einfache Antwort auf die Frage zu geben, ob Rad21 Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes ist. Einerseits konnten keine Kohäsionsdefekte nach Inaktivierung von Rad21 festgestellt werden, andererseits scheint es so, als ob Rad21-enthaltende Cohesinkomplexe zur Aufrechterhaltung des SCs benötigt werden. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine mitotische Kleisinuntereinheit essentiell für die Stabilität des SCs ist. In anderen Organismen übernehmen diese Funktionen die entsprechenden meiotischen Äquivalente Rad21L und Rec8 (Llano *et al.*, 2012, Murdoch *et al.*, 2013) und in *C. elegans* die drei beschriebenen Kleisine Rec8, COH-3 und COH-4 (Severson *et al.*, 2009).

Der SC stellt ein Proteingerüst dar, welches die Paarung und anschließende Rekombination der homologen Chromosomen ermöglicht (Fawcett, 1956, Moses, 1956). Die Rad21-abhängige Destabilisierung des SCs setzt erst ab Region 3 im Germarium ein und die vollständige Disassemblierung ist erst im Stadium 3 bis 4 nachweisbar, also zu einem Zeitpunkt zu dem die meiotischen Rekombinationsereignisse bereits stattgefunden haben. Dadurch sollte es auch zur korrekten Ausbildung der Chiasmata kommen, die wiederum zur

Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion beitragen. Durch die TEV-Protease-vermittelte Inaktivierung von Rad21 wurde lediglich eine Beteiligung der mitotischen Cohesinuntereinheit in Bezug auf die Erhaltung der SCs nachgewiesen. Jedoch konnte mit keiner der verwendeten Methoden zur Inaktivierung von Rad21 ein Effekt in Bezug auf die SC-Etablierung festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der verwendete Treiber entweder nicht rechtzeitig einsetzt, oder dass es eine gewisse Zeit dauert, bis genügend TEV-Protease exprimiert wird, um eine nahezu vollständige Spaltung der α -Kleisinuntereinheit herbeizuführen.

Der Phänotyp der frühzeitigen Disassemblierung des SCs konnte nicht nur nach TEV-Protease-vermittelter Inaktivierung von Rad21^{TEV}-myc im mutanten Hintergrund nachgewiesen werden, sondern auch in Anwesenheit eines wildtypischen Allels. Um zu testen, ob diese Beobachtung auf eine Reduktion der Rad21-Gendosis auf 50% zurückzuführen ist, wurde die Kinetik des SC-Zerfalls in heterozygot-mutanten Weibchen untersucht. Hierbei wurde jedoch keine frühzeitige Destabilisierung des SCs nachgewiesen. Weiterhin kann nahezu ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Disassemblierung aufgrund dominant-negativer Effekte der entstandenen Spaltprodukte zustande kommt, da diese Beobachtung bei allen spaltbaren Rad21-Versionen zu verzeichnen ist und auch nach Induktion des SCF-abhängigen Abbaus von Rad21-EGFP. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnten mehrere miteinander verknüpfte Cohesinringe sein, die benötigt werden um eine Assoziation des lateralen Elements mit den Chromosomen *cores* aufzubauen. Vorstellbar wäre hier eine Assoziation, ähnlich dem bereits beschriebenen *handcuff*-Modell oder dem *bracelet*-Modell (siehe Abb. 4). Würde man von einer solchen Rad21-abhängigen Verknüpfung des Cohesins mit dem SC ausgehen, könnte man auch erklären, weshalb eine frühzeitige Disassemblierung des SCs stattfindet, wenn ca. 50% der vorhandenen Rad21-Menge durch TEV-Protease-abhängige Spaltung inaktiviert werden. Bereits 2007 lieferten Khetani und Bickel die ersten Überlegungen dahingehend, dass für die Assoziation des Cohesins mit dem axialen Element vermutlich miteinander-verknüpfte Cohesinketten benötigt werden. Da in jeder der 16 Zellen einer Zyste SMC1 und SMC3 entlang der Chromosomenarme nachweisbar waren, jedoch nur in den späteren Pro-Oozytenkernen fadenförmige Strukturen ausgebildet werden, welche sich durch Verkettungen der Cohesinmoleküle erklären lassen. Sie gingen weiterhin davon aus, dass in den Zellen, die später die Nährzellen ausbilden, das Chromatin in einem Interphase-ähnlichen Zustand vorliegt, bei dem die Cohesinkomplexe entlang der Chromosomenarme lokalisiert sind, jedoch nicht zur Assemblierung komplexerer Strukturen befähigt sind. In den Pro-Oozytenkernen hingegen kommt es zur Ausbildung der Chromosomen *cores*, die wiederum nur gebildet werden können, wenn eine Vielzahl an Cohesinmolekülen miteinander verbunden werden und so eine Verkürzung entlang der Längsachse eines jeden

Schwesterchromatidenpaares ermöglicht. Wie genau bestimmt wird, in welcher der 16 Zellen die Etablierung einer Pro-Oozyte vonstattengeht, ist noch nicht vollständig geklärt. Entscheidend ist hierbei jedoch, dass die zwei Zellen gewählt werden, die über vier Ringkanäle mit den entsprechenden Nachbarzellen verbunden sind, da nur so eine bestmögliche Versorgung der heranreifenden Oozyte gewährleistet werden kann. Ein weiteres Merkmal der frühen Oogenese ist das Vorhandensein von C(2)M, welches nach dem Durchlaufen der prämeiotischen S-Phase zunächst in allen 16 Zellen der Zyste nachzuweisen ist und später nur noch in den zwei Zellen zu finden ist, die auch einen SC ausbilden (Manheim und McKim, 2003, Heidmann *et al.*, 2004). Fehlt dieses Protein, können keine Chromosomen *cores* ausgebildet werden und SMC1 und SMC3 sind nur noch als diffuses Signal am Chromatin zu finden, was jedoch für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion ausreichend ist. Geht man nun davon aus, dass Rad21 mit C(2)M assoziiert vorliegt und C(2)M für die Verkürzung entlang der Längsachsen der Schwesterchromatidenpaare benötigt wird, dann ist es denkbar, dass durch die direkte Interaktion der beiden Kleisine die Grundvoraussetzung für die Ausbildung vernetzter Cohesinkomplexes geschaffen wird. Vorstellbar wäre hierbei eine Verknüpfung der einzelnen SMC-Moleküle über eine C(2)M-Rad21-abhängige Oligomerisierung, die dann zur Ausbildung von längeren Filamenten führt. Diese Filamente bewerkstelligen dann die Verknüpfung zwischen Cohesin und dem SC. Auch eine Variante des *handcuff*-Modells wäre denkbar, bei dem es zur C(2)M-abhängigen Dimerisierung der einzelnen Cohesinmoleküle kommt. Zusammenfassend ist jedoch festzuhalten, dass in der Oogenese von *Drosophila melanogaster* mindestens zwei verschiedene Cohesinkomplexe generiert werden müssen. Der erste besitzt kaum kohäsive Eigenschaften und dient der Verknüpfung der Chromosomen mit dem SC, was einen Einfluss auf die Rekombination hat. Als Kleisine würde dieser Komplex Rad21 und C(2)M besitzen, welche eventuell für die Generierung komplexerer Strukturen benötigt werden. Als zweiten Komplex gäbe es dann noch mindestens einen kohäsiven Cohesinkomplex, der für die Etablierung und Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion benötigt wird. Ob dieser Komplex in *Drosophila* eine Separase-schneidbare Kleisin-Untereinheit enthält, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten. Allerdings entspräche dies der Erwartung, da Separase während der beiden meiotischen Teilungen in *Drosophila*-Weibchen aktiviert wird (Heidmann *et al.*, 2004).

3.3 Gegenüberstellung mit anderen Rad21/Scc1-Cohesinkomplexen

Bisher konnte in keinem weiteren Modellsystem eine Funktion der mitotischen Kleisin-Cohesinuntereinheit in Bezug auf die Stabilität des SCs beschrieben werden. Jedoch ist Rad21/Scc1 in der Bäckerhefe und in Meiozyten der Maus mit dem meiotischen Chromatin assoziiert (Klein *et al.*, 1999, Xu *et al.*, 2004, Ishiguro *et al.*, 2011, Lee und Hirano, 2011).

Über eine genaue Funktion dieser Assoziation kann jedoch nur spekuliert werden, da die Analyse sich meist als schwierig erweist, da auf hypomorphe Allele zurückgegriffen werden muss, um die kohäsive Funktion der mitotischen Proliferation nicht zu beeinträchtigen. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist das Rad54-Paralog, Tid1, was zur SWI2/SNF2-Chromatin-Remodeling-Protein-Familie gehört, essentiell für die Auflösung der Scc1-verknüpften Kohäsionsverbindungen im Verlauf der Meiose (Kateneva *et al.*, 2005). Diese Beobachtung liefert demnach den ersten Hinweis für eine Scc1-abhängige Verknüpfung der Schwesterchromatiden in Meiose.

In den Meiozyten von Mäusen ist die Ausgangssituation komplexer, da hier neben Rec8 noch ein weiteres Meiose-spezifisches Kleisin (Rad21L) vorhanden ist. Dieses ist jedoch nur von Beginn des Leptotäns bis zur Mitte des Pachytäns mit dem meiotischen Chromatin assoziiert (Lee und Hirano, 2011). Später wird es dann gegen Rad21/Scc1 ausgetauscht, das zusammen mit Rec8-Cohesin im restlichen Verlauf am meiotischen Chromatin zu finden ist. Auch hier ist nicht ganz geklärt, welche Funktion die mitotische Cohesinuntereinheit innehat. Vermutet wird jedoch, dass Rad21/Scc1 benötigt wird um die bi-polare Orientierung der Schwesterchromatiden in Meiose II zu gewährleisten. In der Spaltheife *S. pombe* unterbindet nämlich ein zentromerischer Austausch von Rec8 zu Rad21/Scc1 eine monopolare Anheftung der Schwesterchromatiden an die Mikrotubuli in Meiose I. Das Vorhandensein der mitotischen Cohesinuntereinheit hingegen ist wiederum essentiell für die bi-polare Anheftung in Meiose II (Yokobayashi *et al.*, 2003). Die Annahme, dass Rad21 für die bi-polare Orientierung der Schwesterchromatiden benötigt wird, deckt sich mit der von Morrison *et al.*, 2003 gefundenen Tatsache, dass Rad21/Scc1 in Säugetieren essentiell ist für die Assoziation der Kinetochore mit den Mikrotubuli und der Rekrutierung zentromerischer Proteine, wie zum Beispiel der CPC-Untereinheiten INCENP und Survivin.

Auch im Fadenwurm *C. elegans* wurden in jüngeren Untersuchungen eine Funktion der mitotischen Cohesinuntereinheit SCC-1 in Meiose beschrieben (Severson und Meyer, 2014). So konnte gezeigt werden, dass Einzelmutationen der drei beschriebenen meiotischen Kleisine, Rec8, COH-3 und COH-4, kaum Auswirkungen auf die Trennung der Schwesterchromatiden im Pachytän der Meiose I haben. Führt man jedoch alle drei Mutanten zusammen, treten in 55% der Fälle frühzeitige Segregationen auf. In den übrigen 45% der Pachytänkerne müssen demnach weitere Mechanismen vorhanden sein, die die Schwesterchromatiden miteinander verknüpfen (Severson und Meyer, 2014). Diese weisen eine SCC-1-Abhängigkeit auf, da die zusätzliche Depletion der mitotischen Cohesinuntereinheit im Kleisin-mutanten Hintergrund (Rec8, COH-3, COH-4) den Anteil der kohäsiven Kerne auf 12% reduziert. Demnach hat auch in diesem Fall die mitotische Kleisinuntereinheit eine verknüpfende Funktion auf die Schwesterchromatiden in Meiose, obwohl SCC-1 nicht notwendig ist für die Aufrechterhaltung der Kohäsion, da das Fehlen von SCC-1 im

wildtypischen Hintergrund keine Auswirkungen auf die Chromosomensegregation in Meiose hat. Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass auch in anderen Modellsystemen verschiedene Cohesinkomplexe vorhanden sind, die jeweils spezialisierte Funktionen ausüben, um so einen korrekten Ablauf der Meiose zu gewährleisten. Dabei trägt die mitotische Cohesinuntereinheit Scc1/Rad21 zu einem gewissen Grad zur Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion bei und lokalisiert entlang des meiotischen Chromatins (Klein *et al.*, 1999, Xu *et al.*, 2004, Ishiguro *et al.*, 2011, Lee und Hirano, 2011, Severson und Meyer, 2014).

Daran anknüpfend stellt sich nun die Frage, ob in *Drosophila* eine Beteiligung von Rad21 bei der meiotischen Kohäsion gänzlich ausgeschlossen werden kann, da nach Spaltung von Rad21^{TEV}-myc keine Segregationsdefekte nachgewiesen werden konnten. Um diese Frage zu beantworten, müsste man zunächst untersuchen, wie hoch der Beitrag der anderen kohäsiven Proteine (SOLO, SUNN, ORD) auf die meiotische Kohäsion ist. In Prophase der Meiose I führt das Fehlen von SOLO zur erhöhten Anzahl an CID-Signalen in den Oozytenkernen (siehe 2.2.3, Yan und McKee, 2013). Eine Anzahl von 16 Zentromersignalen würde einen kompletten Verlust der Kohäsion andeuten. Da jedoch nur in einigen wenigen Fällen eine maximale Anzahl von 9 Signalen nachweisbar war, kommt es in dieser frühen Phase der Meiose nicht zur vollständigen Auflösung der zentromerischen Kohäsion. Ähnliche Kohäsionsdefekte konnten auch für SUNN beschrieben werden. Im Stadium 2 wiesen 56% Pro-Oozyten mehr als 8 Signale auf (Krishnan *et al.*, 2014). Demnach löst sich in den entsprechenden *solo*- und *sun*-Mutanten die Kohäsion in der frühen Prophase nicht vollständig auf, sodass denkbar wäre, dass für die verbleibende Kohäsion Rad21 bzw. Rad21-beinhaltendes Cohesin benötigt wird. Um dies zu testen, müsste man Fliegen generieren, die *solo*-mutant sind und gleichzeitig eine Oogenese-spezifische Inaktivierung von Rad21 ermöglichen. Kommt es dann zum Anstieg des kohäsiven Defekts in Prophase I, wäre der erste Hinweis für eine Beteiligung von Rad21 bei der Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion in *Drosophila melanogaster* erbracht.

3.4 SOLO wirkt als kohäsives Protein in der weiblichen Meiose von *Drosophila melanogaster*

Als vielversprechendster Kandidat eines funktionellen Rec8-Homologs schien SOLO, da es mit dem Zentromeren und entlang der Chromosomen *cores* assoziiert ist und für die Aufrechterhaltung der Kohäsion benötigt wird. Darüber hinaus ist es auch essentiell für die Ausbildung der Zentromercluster, die die Grundlage für die Initiation der Synapsis bilden (Takeo *et al.*, 2011), für die Mono-Orientierung der Schwesterchromatiden und die Stabilität des SCs (Yan und McKee, 2013). In der männlichen Meiose von *mei-S332*-Mutanten gehen außerdem die zentromerischen SOLO-Signale frühzeitig in der Anaphase der Meiose I verloren, was konsistent mit einer schützenden Funktion von Mei-S332 in Bezug auf die

meiotische Kohäsion ist (Yan *et al.*, 2010; Kitajima *et al.*, 2004). Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen von SOLO und SMC1 konnte noch ein weiterer Hinweis erbracht werden, dass SOLO als funktionelles Rec8-Homolog fungieren könnte (Yan und McKee, 2013). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von SOLO im Verlauf der weiblichen Meiose weiter charakterisiert und Untersuchungen angestellt, die prüfen sollten, ob SOLO als integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes fungiert. SOLO lokalisiert entlang der Chromosomen *cores* und weist eine Akkumulation an den Zentromeren auf. Beide Lokalisationen zeigen jedoch eine unterschiedliche Abhängigkeit in Bezug auf das Cohesinprotein ORD und das laterale Elementprotein C(2)M. ORD weist ebenfalls wie SOLO eine zentromerische Akkumulation auf und ist essentiell für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion und die Stabilität des SCs (Webber *et al.*, 2004). Generell betrachtet, besitzen beide Proteine funktionelle Ähnlichkeiten (Webber *et al.*, 2004, Yan und McKee, 2013), sodass es auch nicht unerwartet war, dass die zentromerische Lokalisation von SOLO und ORD vom jeweils anderen Protein abhängig ist.

Die Ausbildung der Chromosomen *cores* hingegen ist C(2)M-abhängig (Manheim und McKim, 2003). Eine mögliche Verknüpfung dieser Komponente mit Cohesin und die damit verbundene Ausbildung komplexer Strukturen wurden bereits im Abschnitt 3.2 diskutiert. Fakt jedoch ist, dass das Vorhandensein von C(2)M essentiell ist für die korrekte Ausbildung des SCs und damit verbunden auch für das typische Auftreten eines fadenförmigen C(3)G- und SMC1-Signals (Manheim und McKim, 2003). Fehlt C(2)M können diese beiden Proteine noch an die Zentromere und Chromosomenarme rekrutiert werden, aber keine Etablierung der Chromosomen *cores* mehr stattfinden (Webber *et al.*, 2004). Gekennzeichnet ist dieses Lokalisationsverhalten durch starke zentromerische Signale und diffuse chromosomale Signale, die auch in den Nährzellkernen zu finden sind. Ähnlich zu den bereits beschriebenen Abhängigkeiten, weist SOLO im *c(2)M*-mutanten Hintergrund ein diffuses Signal mit einzelnen stärkeren Akkumulationen auf, die mit den stärksten C(3)G-Signalen kolokalisieren und folglich zentromerische Regionen sind (Khetani und Bickel, 2007). Somit ist die zentromerische Lokalisation von SOLO ORD abhängig und die Assemblierung an den Chromosomen *cores* weist eine C(2)M-Abhängigkeit auf.

SOLO wird weiterhin auch für die Aufrechterhaltung der Homologenpaarung und der Zentromerkohäsion in Prophase der Meiose I benötigt. In wildtypischen Keimbahnzellen liegen die Zentromere meist gepaart vor, sodass nur 1-3 Zentromercluster nachweisbar sind, die essentiell für die Initiation der SC-Assemblierung sind (Khetani und Bickel, 2007, Tanneti *et al.*, 2011, Takeo *et al.*, 2011, Dernburg *et al.*, 1996b). Im weiteren Verlauf der Prophase bleiben die Zentromere miteinander assoziiert, was vermutlich eine Funktion bei der achiasmatischen Segregation in *Drosophila* hat (Dernburg *et al.*, 1996b, Karpen *et al.*, 1996,

Hawley *et al.*, 1992, Hughes *et al.*, 2009). In *ord*-Mutanten ist sowohl die Paarung der Zentromere gestört, als auch die Kohäsion beeinträchtigt (Khetani und Bickel, 2007). Für SOLO konnte mit Hilfe der durchgeführten CID-Färbungen ähnliches festgestellt werden, was sich auch mit den parallel dazu veröffentlichten Daten von Yan und McKee, 2013 deckt. Im Laufe der Prophase nehmen die beobachteten Kohäsionsdefekte weiter zu, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass SOLO eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Chromosomen *cores* hat und zusätzlich kohäsive Funktionen hat. In *solo*-mutanten Ovarien werden zunächst Chromosomen *cores* und der SC assembliert, die dann aber im Laufe der Prophase frühzeitig wieder disassemblieren, da vermutlich wichtige Strukturen fehlen, die die Stabilität und Flexibilität des SCs erhöhen (Yan und McKee, 2013). Das Fehlen des SCs führt dann zur graduellen Dissoziation der Zentromere, sodass die Anzahl der CID-Signale im Verlauf der Prophase ansteigt. Eine weitere Erklärung könnte auch eine Rad21-Beteiligung bei der meiotischen Kohäsion sein, die zu Beginn des Pachytäns noch erhalten bleibt und dann durch das Fehlen von SOLO ebenfalls beeinträchtigt ist (siehe 3.3).

Neben der Funktion zur Aufrechterhaltung der zentromeren Kohäsion ist SOLO auch noch essentiell für die Armkohäsion in Meiose. Fehlt SOLO kann kein stabiler Metaphase I-Arrest etabliert werden und die ausgebildeten Chiasmata können nicht länger aufrechterhalten werden. Diese Beobachtung ist jedoch kein direkter Beweis für eine SOLO-abhängige Armkohäsion. Eine Möglichkeit dies abzuklären, wären jedoch FISH-Analysen mit spezifischen Sonden für Zentromer-distale Bereiche. Solche FISH-Experimente wurden initiiert, waren jedoch nicht auswertbar, da vermutlich die Kompaktierung des Oozytenchromatins keine spezifische Sondierung ermöglichte (Daten nicht gezeigt). Der indirekte Nachweis einer kohäsiven Funktion auch entlang der Chromosomenarme, deckt sich auch mit der Lokalisation von SOLO, welches neben einer zentromeren Lokalisation auch an den Chromosomen *cores* zu finden ist.

Ein weiteres Charakteristikum von SOLO sind die im N-terminalen Bereich befindlichen RGG-*repeats*, welche in RNA-bindenden Proteinen zu finden sind (Alex und Lee, 2005). Die Expression einer verkürzten Version von SOLO, bei der die ersten 137 Aminosäuren inklusive der RGG-*repeats* fehlen, hat weder eine Auswirkungen auf die Lokalisation von SOLO noch auf die kohäsive Funktion dieses Proteins. Es ist demnach anzunehmen, dass SOLO keine Assoziation mit der RNA benötigt um die meiotische Kohäsion aufrechtzuerhalten. Weiterhin kann damit auch ausgeschlossen werden, dass SOLO eventuell als regulatorisches Protein die Transkription bzw. Translation beeinflusst und die beobachteten Kohäsionsdefekte in *solo*-mutanten Ovarien nur indirekt aufgrund einer veränderten Expressionsrate kohäsiver Proteine zustande kommen.

Da nun offensichtlich den RGG-*repeats* in SOLO keine essentiellen Funktionen zugeordnet werden können, kann auch nur spekuliert werden, warum in einem kohäsiven

Protein RNA-Bindemotive vorkommen. Diese ersten 137 Aminosäuren von SOLO sind ebenfalls in VASA vorhanden. VASA ist eine RNA-Helikase, die an der Keimbahnetablierung und der Achsenspezifizierung in Oozyten und Embryonen beteiligt ist (Styhler *et al.*, 1998, Tinker *et al.*, 1998) und daher ein RNA-bindendes Motiv für dessen Funktion benötigt. SOLO und VASA werden aus der gleichen prä-mRNA gespleißt und weisen beide eine keimbahnspezifische Lokalisation auf. Somit ist vorstellbar, dass die RGG-*repeats* in SOLO nur ein evolutionäres Relikt sind und für die eigentliche, kohäsive Funktion von SOLO keine Rolle spielen, außer für die Gewährleistung des VASA/Keimbahn-spezifischen Expressionsprofils. In den durchgeführten Experimenten zur Charakterisierung von EGFP-SOLO^{ΔRGG} erfolgte keine Expression unter Kontrolle der VASA-spezifischen, genomischen Regionen, sondern eine UAS-Gal4-abhängige Expression. Durch diese ektopische Expression von SOLO^{ΔRGG} ist eine hohe Syntheserate zu Beginn der Oogenese gewährleistet, die ausreichend ist für die Aufrechterhaltung der meiotischen Funktionen von SOLO.

3.5 SOLO ist kein integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesin-komplexes

Alle bereits beschriebenen und publizierten Daten (Yan und McKee, 2013) bezüglich der kohäsiven Funktion von SOLO, sowie Funktionen bei der Aufrechterhaltung des SCs und der Mono-Orientierung der Schwesterchromatiden in Meiose I, lassen vermuten, dass dieses Protein eventuell als Rec8-Homolog fungieren könnte. Zusätzlich wurde durch spezifische Immunpräzipitationen noch eine Assoziation von SOLO mit SMC1 nachgewiesen (Yan und McKee, 2013), welche nahelegt, dass SOLO ein Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes ist. Um dies weiter abzuklären, wurden verschiedene Interaktionsstudien durchgeführt, die zunächst zeigen sollten, ob Rad21 und SOLO mit der gleichen Interaktionsfläche von SMC1 assoziiert sind und ob es eine Interaktion von SOLO mit SMC3 und SA/Scc3 gibt. Mit Hilfe der durchgeführten 2-Hybridanalysen konnten jedoch keine Hinweise erbracht werden, die eine Interaktion von SOLO mit SMC3 und SA/Scc3 vermuten lassen. Da diese Interaktion für die mitotische Cohesinuntereinheit Rad21 gezeigt wurde, ist anzunehmen, dass SOLO nicht mit diesen Proteinen interagiert oder, dass die hierfür eventuell benötigten posttranslationalen Modifikationen nicht vorhanden sind. Ist zum Beispiel ein Linkerprotein notwendig, welches die Interaktion zwischen SMC3 und SOLO verbrückt und so den Ringschluss des Cohesinkomplexes ermöglicht, hätte man dieses mit den durchgeführten Untersuchungen auch nicht nachweisen können. Jedoch gibt es neben den Interaktionsstudien mit SMC3 und Scc3 noch weitere Analysen, die nahe legen, dass SOLO nicht als Cohesinuntereinheit fungiert. So zum Beispiel, dass die Interaktion von SOLO mit SMC1 durch die gleichzeitige Expression von Rad21 nicht geschwächt wird. Demnach findet die Assoziation von Rad21 an SMC1 unabhängig von der SOLO-Bindung

statt, was eine unterschiedliche Bindungsstelle an SMC1 vermuten lässt. Ähnliche Analysen sind für Scc1 und Rec8 in anderen Organismen noch nicht durchgeführt wurden. Da jedoch beide Proteine strukturell ähnlich sind und eine hohe Homologie auf Ebene der Primärstruktur aufweisen, ist auch anzunehmen, dass beide Proteine mit der gleichen Interaktionsoberfläche von SMC1 assoziiert sind. Weiterhin konnte nach artifizieller Überexpression von SOLO auch keine Beeinflussung der Rad21-Lokalisation in synzytialen Embryonen beobachtet werden. Darüber hinaus fungiert SOLO nicht als meiotisches Separasesubstrat, da die Expression einer SOLO-Version, bei der alle potentiellen Separase-Schnittstellen mutiert waren, keinen Einfluss auf den Verlauf der Meiose hatte. All diese Erkenntnisse zusammengefasst sprechen dafür, dass SOLO kein integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes ist, sondern die Kohäsion auf andere Weise indirekt reguliert. Vermutlich fungiert es als regulatorisches Protein, welches für die Rekrutierung von Cohesin ans Zentromer benötigt wird oder dessen Stabilität beeinflusst. Denkbar wäre hier eine Wirkungsweise, ähnlich den Proteinen Nipped-B oder Eco1, die essentiell für die Etablierung der Kohäsion sind (Petronczki *et al.*, 2003, Uhlmann, 2004). SOLO scheint jedoch an mehr Prozessen beteiligt zu sein, als die oben genannten Proteine, da das Fehlen von SOLO sowohl Auswirkungen auf die Cohesinladung, die Kohäsions-etablierung und auch auf die Kohäsionsaufrechterhaltung hat (Yan *et al.*, 2010, Yan und McKee, 2013). Darüber hinaus lokalisieren sowohl SOLO als auch Nipped-B entlang der Chromosomen *cores* (Yan und McKee, 2013, Gause *et al.*, 2008) und mit Hilfe der durchgeführten 2-Hybridanalysen konnte ein erster Hinweis für eine direkte Interaktion der beiden Proteine erbracht werden (siehe 2.2.10). Nipped-B lokalisiert entlang der Chromosomenarme jedoch nicht an den Zentromeren (Gause *et al.*, 2008), an denen SOLO eine deutliche Akkumulation aufweist. An diesen zentromerischen Regionen muss jedoch ebenfalls eine Kohäsion etabliert werden, da nur so eine korrekte Trennung der homologen Chromosomen und der Schwesterchromatiden gewährleistet werden kann. Vorstellbar wäre demnach, dass SOLO speziell für die Rekrutierung und Etablierung von zentromerischer Kohäsion benötigt wird und die Lokalisation an den Armen Nipped-B- und SOLO-abhängig ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern außerdem auch Hinweise, dass SOLO zusammen mit Pds5 und Sororin Funktionen zur Aufrechterhaltung der Kohäsion und des SCs übernehmen könnte. Pds5 ist in der Bäckerhefe essentiell für die Paarung der homologen Chromosomen sowie deren Synapsis und weist eine Kollokalisierung mit dem meiotischen Cohesin auf (Jin *et al.*, 2009). Fehlt Pds5, führt dies dazu, dass die Synapsis nicht zwischen den homologen Chromosomen stattfindet, sondern mit Hilfe der Schwesterchromatiden vollzogen wird. Weiterhin hat das Fehlen von Pds5 kaum Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion jedoch auf den Kompaktierungsgrad des meiotischen Chromatins (Jin *et al.*, 2009). Für *Drosophila* konnte bisher nur eine Funktion

von Pds5 auf die Restriktion des SCs und auf die meiotische Rekombination nachgewiesen werden (Barbosa *et al.*, 2007; Kusch, 2015). Geht man jedoch davon aus, dass das entsprechende *Drosophila*-Ortholog ebenfalls essentiell für die Paarung und Synapsis der homologen Chromosomen ist, wäre es auch vorstellbar, dass dies in Assoziation mit SOLO vonstattengeht, da SOLO ebenfalls für den korrekten Ablauf beider Prozesse benötigt wird.

Für Sororin wurde bisher noch in keinem Organismus eine Funktion in Meiose beschrieben. In den durchgeführten Analysen mit den entsprechenden *Drosophila*-Orthologen konnte eine Interaktion von Sororin mit SOLO gezeigt werden und eine Akkumulation in bestimmten Zellen in Region 2A/2B des Germariums, in denen meiotische Rekombinationsereignisse stattfinden. Da die Inaktivierung von Sororin keinen Einfluss auf die meiotische Kohäsion hat, und die Struktur des SCs auch nicht beeinträchtigt ist, wird angenommen, dass dieses Protein für diese Prozesse entbehrlich ist, eventuell jedoch eine Funktion bei der meiotischen Rekombination innehat. Da jedoch nach Überexpression von Sororin eine Rettung des *solo*-mutanten SC-Phänotyps festzustellen ist, ist es auch vorstellbar, dass Sororin und SOLO zusammen an der Initiation der SC-Assemblierung beteiligt sind oder durch ein gemeinsames Mitwirken bei essentiellen Vorgängen während der meiotischen Rekombination die Ausbildung des SCs begünstigen.

3.6 POLO-abhängige Phosphorylierung von SOLO ist essentiell für die Synapsis der homologen Chromosomen

SOLO kann *in vitro* durch humane Plk1-phosphoryliert werden. Die dabei phosphorylierte(n) Aminosäure(n) liegt/liegen im mittleren Bereich des Proteins. Um die Phosphorylierungsstelle genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene Fliegenlinien generiert, bei denen ein oder mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen mutiert wurden oder aber die Bindestellen für die Kinase modifiziert waren. Nach der Expression dieser Konstrukte im *solo*-mutanten Hintergrund zeigte sich eine deutliche Beeinträchtigung der Struktur des SCs. Diese Defekte waren am stärksten ausgeprägt wenn fünf potentielle Phosphorylierungsstellen mutiert waren, jedoch traten diese Effekte auch bereits nach Expression der 607/608Ala-Mutante (EGFP-SOLO^{1^{POLO}}) auf. Das Fehlen der POLO-abhängigen Phosphorylierung an diesen beiden Aminosäurepositionen und eventuell weiterer Positionen hatte zur Folge, dass SOLO nur noch an den Zentromeren lokalisiert, nicht jedoch entlang der Chromosomen *cores* zu finden ist. Nach Expression der SOLO-Version, bei der potentielle POLO-Bindestellen (SOLO^{PBS-A}) mutiert waren, konnte noch eine gewisse Restmenge an SOLO an den Chromosomen *cores* nachgewiesen werden. Auch die Struktur des SCs blieb weitestgehend normal erhalten, da vermutlich das Level an SOLO in diesen Regionen ausreichend ist, um die Funktion in Bezug auf die Struktur des SCs aufrechtzuerhalten. Bei Mutation der Phosphorylierungsstellen hingegen konnte kein SOLO-

Signal mehr an den Chromosomen *cores* nachgewiesen werden und der SC wies deutlich größere, fragmentierte Strukturen auf. Die Ausbildung von großen SC-Netzwerken könnte auf Fehler bei der Synapsis hindeuten. In *solo*-mutanten Oozyten kommt es zur initialen Etablierung des SCs, welcher dann aufgrund einer höheren Instabilität frühzeitig disassembliert (Yan und McKee, 2013). Bisher sind noch keine höherauflösenden mikroskopischen Untersuchungen durchgeführt wurden, die aufzeigen, inwiefern die Struktur des SCs in der frühen Meiose beeinträchtigt wird. Vorstellbar wäre aber eine C(3)G-Beladung an individualisierten, homologen Chromosomen, die keine Synapsis mehr vollführen können und dann die Destabilisierung der C(3)G-Lokalisation zur Folge haben. Passend dazu müsste die Anzahl an einzelnen C(3)G-Fäden doppelt so hoch sein, wie in wildtypischen Oozyten, da die entsprechenden Immunfluoreszenzsignale von C(3)G nicht mehr miteinander verknüpfte Homologe repräsentieren. Es wäre demnach anzunehmen, dass die POLO-abhängige Phosphorylierung an der Aminosäureposition 607/608 (oder weiterer) für die Rekrutierung von SOLO an die Chromosomen *cores* benötigt wird, welche essentiell für die Paarung und die Synapsis der homologen Chromosomen ist. Da es bereits bei der Inaktivierung der potentiellen POLO-Bindestellen zu einer deutlichen Reduktion des SOLO-Gehalts entlang der Chromosomen *cores* kommt, scheint auch eine zuvor stattfindende Cdk1-abhängige Phosphorylierung an diesen Bereichen die Rekrutierung und Bindung von POLO zu fördern. Diese beeinflusst dann die Phosphorylierung von SOLO und damit verbunden die Synapsis der homologen Chromosomen.

Um in nachfolgenden Studien eine genauere Charakterisierung der POLO-abhängigen Phosphorylierungsstellen von SOLO zu erhalten, wären sensitive massenspektrometrische Analysen hilfreich. Vorstellbar wären hier SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*)-Analysen zur genauen Charakterisierung phosphorylierter Peptide. Grundlage dieser Methode sind zwei Zellkulturen, die auf unterschiedlichen Nährmedien gehalten werden. Zu einer der Kulturen werden Aminosäuren gegeben, die ein schweres Isotop tragen, zum Beispiel Arginine oder Lysine mit ^{13}C oder ^{15}N . Zur anderen Kultur werden unmarkierte Aminosäuren gegeben. Nach einer über mehrere Tage andauernden Kultivierung in den entsprechenden Medien, werden die Proteine der Zellkulturen vereint und mittels Massenspektrometrie ausgewertet. Durch die Inkorporation der verschiedenmarkierten Aminosäuren entstehen unterschiedliche schwere Peptide, die bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse genau charakterisiert und zugeordnet werden können. Variiert man nicht nur das Kulturmedium dieser zwei Populationen, sondern auch POLO-abhängige Parameter (z.B. durch Überexpression oder Inaktivierung der Kinase), können durch die unterschiedlichen Massen der Peptide Rückschlüsse auf die entsprechenden Modifikationen gezogen werden und somit die Phosphorylierungsstellen genau beschrieben werden. So könnte man mit dieser Methode zeigen, ob neben der

Aminosäureposition 607/608 noch weitere Reste phosphoryliert werden müssen um einen Rekrutierung von SOLO entlang der Chromosomen *cores* zu gewährleisten.

3.7 Fungiert ORD als funktionelles Rec8-Homolog?

Rad21 wird für die Aufrechterhaltung der SC-Stabilität in Prophase I benötigt. Weiterhin interagiert es mit C(2)M, mit dessen Hilfe eventuell miteinander vernetzte Cohesinkomplexe ausgebildet werden, die eine untergeordnete kohäsive Funktion innehaben aber für die Aufrechterhaltung der Chromosomen *cores* benötigt werden. SOLO hingegen scheint ebenfalls kein integraler Bestandteil eines meiotischen Cohesinkomplexes zu sein, sondern vielmehr ein regulatorisches Protein, welches die Kohäsion aufrechterhält. Daher soll nun diskutiert werden, ob ORD als funktionelles Rec8-Homolog in Frage käme. ORD ist sowohl essentiell für die Aufrechterhaltung der meiotischen Kohäsion als auch für die normale Verteilung der Chromosomen im Verlauf der Meiose (Bickel *et al.*, 1997, Webber *et al.*, 2004, Bickel *et al.*, 1996). Darüber hinaus zeigt es eine Kolo-kalisation mit SMC1 und C(3)G in frühen Phasen der weiblichen Meiose und in Männchen weist es eine zentromerische Akkumulation auf, die bis zum Erreichen der Anaphase II der Meiose bestehen bleibt und vom *Drosophila* Sgo Ortholog Mei-S332 abhängig ist (Balicky *et al.*, 2002, Khetani und Bickel, 2007). Weiterhin ist es ein essentieller Faktor für die homologe Rekombination und die stabile Assemblierung des SCs (Bickel *et al.*, 1997, Webber *et al.*, 2004). Mit einer Größe von 479 AS ist ORD zwar vergleichsweise klein, aber zum Verbrücken der *head*-Domänen der SMCs sollte es ausreichen, da gezeigt werden konnte, dass das Scc1/Rad21-Ortholog im parasitären Einzeller *E. cuniculi* nur 360 Aminosäuren umfasst (Katinka *et al.*, 2001) und ebenfalls in der Lage ist einen Ringschluss zwischen den SMCs zu bewerkstelligen.

Neben den Analysen potentieller Separase-Schnittstellen in Rad21 (siehe 2.1.6) und SOLO (siehe 2.2.7) wurde außerdem untersucht, inwiefern analoge Mutationen in ORD den Verlauf der Meiose beeinträchtigen. Auch im Falle von ORD konnten, ähnlich wie bei SOLO, keine dominant-negativen Effekte nach Expression der modifizierten ORD-Version festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), sodass angenommen werden muss, dass auch dieses Protein kein meiotisches Separasesubstrat darstellt und somit eines der wichtigsten Kriterien für ein kohäsives Rec8-Homolog nicht erfüllt.

Weiterhin weist ORD Strukturhomologien zu Rad50 auf (C. Lehner, unveröffentlichte Daten), welches ein Protein ist, das an der Reparatur der DSBs im Rahmen der homologen Rekombination beteiligt ist (Bressan *et al.*, 1999) und zur Proteinfamilie der SMCs gehört (Kinoshita *et al.*, 2009). Auch diese Beobachtung spricht dafür, dass ORD nicht als Kleisinprotein fungiert.

3.8 Welches Protein erfüllt die Funktion eines Rec8-Homologs?

Aufgrund der hier beschriebenen Daten muss davon ausgegangen werden, dass alle bisher beschriebenen Kandidaten nicht als funktionelles Rec8-Homolog fungieren. Somit stellt sich weiterhin die Frage, welches Protein diese Funktion in der Meiose von *Drosophila melanogaster* übernimmt. Die Antwort darauf scheint vermutlich nicht ganz einfach zu sein, da anzunehmen ist, dass es wahrscheinlich eine Vielzahl an meiotischen Cohesinkomplexen gibt, die alle spezialisierte Funktionen übernehmen. Einer davon ist vermutlich ein Rad21/C(2)M-beinhaltender Komplex, der die Aufgabe hat, die Stabilität des SCs und die der Chromosomen *cores* aufrechtzuerhalten. Ähnlich wie in *C. elegans* kann es auch möglich sein, dass es zwei kohäsive Komplexe gibt, wobei einer die Kohäsion in Meiose I bewerkstelligt und der zweite für die Kohäsionsetablierung in Meiose II verantwortlich ist (Severson und Meyer, 2014). Das Vorhandensein mehrerer Cohesinkomplexe erschwert es auch, die einzelnen Untereinheiten und deren Funktion zu charakterisieren, da die resultierenden Phänotypen allesamt sehr ähnlich erscheinen und daher schwierig voneinander zu trennen sind.

Generell muss jedoch in initialen Experimenten zunächst untersucht werden, ob für die Etablierung der meiotischen Kohäsion in *Drosophila* überhaupt ein weiterer kohäsiver Cohesinkomplex benötigt wird oder ob hierfür ein anderer Mechanismus zum Tragen kommt. Um dies zu testen, müsste man die bereits beschriebenen meiotischen Cohesinuntereinheiten SMC1/SMC3 Oogenese-spezifisch inaktivieren und dann die resultierenden Kohäsionsdefekte analysieren. Als Methode zur Inaktivierung der SMC-Untereinheiten würde sich ebenfalls eine TEV-Protease-abhängige Inaktivierung der entsprechenden Proteine anbieten. Treten auch hier Segregationsdefekte in beiden meiotischen Teilungen auf, kann auch in *Drosophila* von einem klassischen Cohesinkomplex in der weiblichen Meiose ausgegangen werden. Im nächsten Schritt sollte dann genauer untersucht werden, welche Funktionen SOLO, ORD und SUNN ausüben, um dann in fortführenden Experimenten weiter aufklären zu können, wie der Aufbau der Cohesinkomplexe in der weiblichen Meiose von *Drosophila melanogaster* aussieht.

4. Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien wurden von Carl Roth, Sigma Aldrich, VWR, AppliChem oder von Merck bezogen. Die eingesetzten Enzyme stammten von Fermentas und New England Biolabs. Für die Zentrifugationen bei 16,000x g (13.200 rpm) wurden Eppendorf Tischzentrifugen vom Typ 5415 D verwendet.

4.1 Methoden im Umgang mit *Drosophila melanogaster*

4.1.1 Standardmethoden

Die Haltung von *Drosophila melanogaster* sowie Kreuzungsexperimente erfolgten wie bei Greenspan, 1997, Roberts, 1998 und Sullivan *et al.*, 2000 beschrieben. Angaben zur genetischen Nomenklatur finden sich bei Lindsley und Zimm, 1992 oder bei FlyBase (Flybase, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit herangezogenen Fliegenstämme sind in Tabelle 1 bis 4 aufgelistet.

Tabelle 1: Gal4-Treiber- und Balancierstämme

Genotyp	Referenz/Quelle
<i>w</i> ¹	Lindsley und Zimm, 1992
<i>w</i> [*] ; <i>α4 tub-GAL4-VP16</i>	Micklem <i>et al.</i> , 1997
<i>w</i> [*] ; <i>ey-GAL4</i>	Hazelett <i>et al.</i> , 1998
<i>w</i> [*] ; <i>GAL4-nos.NGT</i> (II-chromosomal)	Tracey <i>et al.</i> , 2000
<i>w</i> [*] ; <i>nos-GAL4-VP16</i> (III-chromosomal)	Van Doren <i>et al.</i> , 1998
MTD-Gal4, kombiniert <i>GAL4-nos.NGT</i> ; <i>COG-GAL4:VP16</i> und <i>nos-GAL4-VP16</i>	Petrella <i>et al.</i> , 2007
<i>w</i> [*] ; <i>Sco/CyO,P[ry⁺,ftz lacZ]</i>	Lindsley und Zimm, 1992
<i>w</i> [*] ; <i>Sb/TM3,Ser</i>	Lindsley und Zimm, 1992
<i>w</i> [*] ; <i>Sco/CyO,P[ry⁺,ftz lacZ]; D/TM3, Sb,P[w⁺,Ubx-lacZ]</i>	Lindsley und Zimm, 1992
<i>w</i> [*] ; <i>Kr^{lf-1}/CyO; D/TM3,Ser</i>	Bloomington

Tabelle 2: Transgene Fliegenstämme

Genotyp	Referenz/Quelle
<i>Rad21^{ex8}, tubpr<Rad21 (3TEV-271) myc10></i>	Pauli <i>et al.</i> , 2008
<i>Rad21^{ex8}, tubpr<Rad21 (3TEV-550) myc10></i>	Pauli <i>et al.</i> , 2008
<i>w</i> [*] ; <i>UASP1-TEV^{S219V}</i>	Urban <i>et al.</i> , 2014
<i>w</i> [*] ; <i>pattB[gC(2)M-HA]</i>	Urban <i>et al.</i> , 2014
<i>w</i> [*] ; <i>UASP-NSImb-vhh-GFP4</i>	Urban <i>et al.</i> , 2014
<i>w</i> [*] ; <i>Rad21^{ex3}, tubpr<Rad21-EGFP></i>	Urban <i>et al.</i> , 2014
<i>w</i> [*] ; <i>UASP1-Rad21^{NC}-9myc</i>	Urban <i>et al.</i> , 2014
<i>y</i> ¹ <i>sc</i> [*] <i>v</i> ¹ ; <i>P[TRiP.HMS00401]attP2</i> (Nipped-B RNAi)	Bloomington
<i>w</i> [*] ; <i>M[Sororin II]attPZH-86Fb</i> (hybridisiert an bp 1775-1796)	Rotheneder, 2014
<i>w</i> [*] ; <i>UASp-SOLO::Venus</i>	Yan <i>et al.</i> , 2010
<i>w</i> [*] ; <i>UASp-SOLO::FH</i>	Yan und McKee, 2013
<i>yw/yw; GFP::ord</i>	Balicky <i>et al.</i> , 2002

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Fliegenstämme wurden zum Teil in der angegebenen Form verwendet. Darüber hinaus wurden auch mehrere Transgene über verschiedene Kreuzungsschritte kombiniert. Aus Gründen der Übersicht sind hier jedoch nur die einzelnen Transgene aufgeführt.

Tabelle 3: Mutante Fliegenstämme

Genotyp	Referenz/Quelle
w^* ; $C(2)M^{EP2115}$	Manheim und McKim, 2003
w^* ; $Rad21^{ex3}/TM3, Ser$	Pauli <i>et al.</i> , 2008
yw/yw ; $ord^{10} bw$	Bickel <i>et al.</i> , 1996
$Df(2R)W1370$	Bickel <i>et al.</i> , 1996
$solo^{Z2-0198}/CyO (solo^1)$	Yan <i>et al.</i> , 2010
$solo^{Z2-3534}/CyO (solo^2)$	Yan <i>et al.</i> , 2010
$y^1 w^{67623}$; $P[EPgy2]dmt^{EY04280}/TM3, Sb Ser$	Bloomington
$y^1 w^{67623}$; $P[lacW]pds5^{k13312}/CyO$	Bloomington
$y^1 w^*$; $pds5^{e6}/CyO-Df(2R)B80, y^+$	Bloomington
$y^1 w^{67623}$; $P[EPgy2]pds5^{EY06473}$	Bloomington
$y^1 w^*$; $pds5^{e3}/CyO, P[GAL4-Kr.C]DC3, P[UAS-GFP.S65T] DC7$	Bloomington

In Tabelle 4 finden sich alle während der Arbeit hergestellten Fliegenstämme. Auch hier wurden zur besseren Übersicht jeweils nur die ursprünglichen Transgene aufgelistet. Diese wurden für die entsprechenden Experimente mit einigen Fliegenstämmen der Tabellen 1-3 kombiniert.

Tabelle 4: Hergestellte Fliegenstämme

Genotyp	Besonderheit/Modifikation
w^* ; $UASp-EGFP-SOLO$	
w^* ; $UASp-SOLO-EGFP$	keine Chromatin-assoziierte Lokalisation, nicht funktionell
w^* ; $UASp-EGFP-SOLO^{\Delta RGG}$	SOLO (AS:138-1031)
w^* ; $UASp-EGFP-SOLO^{5Sep}$	E88A, R91A, D222A, R225A, E282R, R285E, D545A, R548A, D971A, R974A
w^* ; $UASp-EGFP-SOLO^{PBS-A}$	T483A, T517A, T569A,
w^* ; $UASp-EGFP-SOLO^{1POLO}$	T607A, T608A
w^* ; $UASp-EGFP-SOLO^{1POLO-E}$	T607E, T608E
w^* ; $UASp-EGFP-SOLO^{5POLO}$	T500A, S528A, T607A, T608A, T696A, T697A, T732A, T733A, T734A
w^* ; $UASp-EGFP-SOLO^{\Delta Arg}$	R641A, R642A, R643A, R645A, R647A, R648A, R649A, R650A, R652A
w^* ; $UASp-Sororin-6myc$	
w^* ; $pattB[gPds5-6myc]$	Insertion an Position 86Fa, nicht funktionell
w^* ; $pattB[gSororin-6myc]$	Insertion an Position 51D, funktionell
w^* ; $UASp-EGFP-ORD$	
w^* ; $UASp-EGFP-ORD^{2Sep}$	E262A, D304R, R265A, R307D

4.1.2 Balancierchromosomen

Balancierchromosomen verhindern eine Rekombination der homologen Chromosomen während der weiblichen Meiose. Durch invertierte Sequenzbereiche sind sie nicht mehr in der Lage homologe Rekombinationen einzugehen bzw. entstehen nicht-funktionelle Gameten, falls es zu Rekombinationsereignissen kommt. Mit Hilfe dieser Chromosomen ist

es somit möglich, dass Fliegen mit rezessiven Letalmutationen als stabile Stocks gehalten werden können. Weiterhin zeichnen sich Balancierchromosomen durch eine oder mehrere Letalmutationen aus, die verhindern, dass diese homozygot werden. Außerdem sind Balancierchromosomen durch dominante Markermutationen, wie zum Beispiel *Stubble* (*Sb*; Stoppelborsten), *Serrate* (*Ser*; ausgefranzte Flügelränder) oder *Curly* (*Cy*; gebogenen Flügel) gekennzeichnet, mit deren Hilfe auf die Anwesenheit eines Balancierchromosoms geschlossen werden kann. Einige Balancierchromosomen tragen außerdem Transgene, wie zum Beispiel das *lacZ*-Gen unter Kontrolle des *ftz*-Promotors, mit dessen Hilfe Organismen, die Balancierchromosomen tragen ebenfalls identifiziert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Balancierchromosomen *CyO* (*Curly of Oster*), *TM3,Ser* und *TM3,Sb* für die Generierung stabiler Fliegenstocks herangezogen.

4.1.3 Keimbahntransformation von *D. melanogaster*-Embryonen durch Mikroinjektion und anschließende Kartierung der Transgeninsertionen

Die Generierung transgener Fliegen erfolgte durch zwei verschiedene Methoden.

1. P-Element vermittelte Keimbahntransformation (Spradling und Rubin, 1982).

Bei dieser Art der Keimbahntransformation werden zwei Plasmide injiziert. Eines der Plasmide enthält das Gen für die Transposase ($\Delta 2-3$). Auf dem anderen befindet sich zwischen den P-Element-Enden eine Multiple Klonierungsstelle (MCS), in welche für die Fusionsproteine kodierenden Gene kloniert wurden. Zusätzlich liegt in dieser Region ein Markergen (z. B. *white*⁺), mit dessen Hilfe sich transgene Individuen identifizieren lassen. Ein solches Plasmidgemisch wird in den posterioren Bereich synzytialer *Drosophila*-Embryonen injiziert, wo sich Vorläufer der späteren Keimbahnzellen befinden. Die Transposase mobilisiert das rekombinante P-Element auf dem zweiten Plasmid, was zu dessen Transposition führt. Der Integrationsort des P-Elements ist hierbei jedoch mehr oder weniger zufällig. Zur genauen Lokalisation wurden Kartierungsexperimente durchgeführt. Die Injektion wurde wie in Herzig, 1999 beschrieben, durchgeführt. Als Injektionsapparatur wurde der Druckerzeuger „FemtoJet“ der Firma Eppendorf verwendet. Die Kartierung und Etablierung der transgenen Fliegenstämme erfolgte wie bei (Kramer, 1999) beschrieben.

2. Φ C31-spezifische Integration (Groth *et al.*, 2004, Bischof *et al.*, 2007).

Dieses System ermöglicht eine ortsspezifische Integration in das Fliegen genom, sodass die resultierenden Expressionslevel der Transgene identisch sind (Groth *et al.*, 2004, Bischof *et al.*, 2007). Grundlage für diese Art der Integration ist ein aus dem Bakteriophagen Φ C31 stammendes System, welches eine sequenzspezifische Rekombination zwischen der im Phagengenom befindlichen *attachment-site* (*attP*) und der im Bakteriengenom vorkommenden bakteriellen *attachment-site* (*attB*) ermöglicht (Thorpe *et al.*, 2000). Um dieses System zur Generierung transgener Fliegen heranzuziehen, werden Plasmide verwendet, die eine *attB-site* besitzen und so die Rekombination zwischen der *attP*-Sequenz ermöglichen. Diese wurde an definierten Positionen im Genom von *Drosophila* integriert. Darüber hinaus exprimieren diese Fliegen unter Kontrolle des *vasa*-Promotors das Gen für die Integrase, wodurch eine keimzellspezifische Expression stattfinden kann (Bischof *et al.*, 2007). Die Selektion potentieller transgener Individuen erfolgt mit Hilfe des *white*-Markergens, welches eine Rotfärbung der Augen in den transgenen Fliegen zur Folge hat (Bischof *et al.*, 2007).

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei transgene Fliegenstämme mit dieser Methode hergestellt. Dabei erfolgte die Integration von Pds5-myc an Position 86Fa (y^1 M[vas-int.Dm]ZH-2A w^1 ; M[3xP3-RFP.attP']ZH-86Fa, Bloomington-Stocknummer: 130434), was auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms liegt und die Integration von Sororin-myc an Position 51D (y^1 w M[eGFP.vas-int.Dm]ZH-2A; M[RFP.attP']ZH-51D, Bloomington-Stocknummer: 24483), was sich auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms befindet.

4.1.4 Herstellung von Proteinextrakten aus *Drosophila melanogaster*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Embryonen wurden zunächst zeitlich definierte Embryonenkollektionen durchgeführt und anschließend erfolgte eine Aufarbeitung der Embryonen zur Extraktion der Proteine. Für die Embryonenkollektionen wurden adulte Fliegen in entsprechenden Flugkäfigen bei einer Inkubationstemperatur von 25°C gehalten. Die Flugkäfige wurden mit Apfelsaftagarplatten verschlossen, die mit etwas Hefesuspension bestrichen waren. Vor einer Embryonenkollektion wurde eine einstündige Vorkollektion durchgeführt. Diese diente dem Ablegen von zurückgehaltenen Embryonen, die sich im Weibchen bereits vor der Eiablage entwickeln und so deren Entwicklungszustand mit den anderen nicht synchron ist. Für die eigentliche Kollektion wurden die Platten nach definierten Zeiträumen gewechselt und die Embryonen bei 25°C bzw. bei 18°C zur Alterung inkubiert und anschließend mit NaCl-Tx (0,7% (w/v) NaCl, 0,07% (w/v) Triton-X-100) von der Apfelsaftagarplatte gewaschen. Nach einer 3-minütigen Dechorionisierung mit 50% Klorix (w/v; Colgate Palmolive GmbH) wurden die Embryonen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend wurde mit Hilfe einer geeichten Kapillare die Embryonenanzahl bestimmt. Nach Zugabe einer definierten Menge Gelauftragungspuffer (0,15 M Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS, 0,3 M β -Mercaptoethanol, 30% Glycerin, 0,3% Bromphenolblau) wurden die Embryonen homogenisiert und 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Menge an Gelauftragungspuffer wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von 2 Embryonen/ μ l erhalten wurde. Um freigesetzte Proteasen zu inhibieren, enthielt der Gelauftragungspuffer neben den oben aufgelisteten Bestandteilen die Proteaseinhibitoren Pefablock (2 mM), Benzamidin (2 mM), Aprotinin (10 μ g/ml), Leupeptin (10 μ g/ml) und Pepstatin A (2 μ g/ml). Nach einer 1-minütigen Zentrifugation wurden die Extrakte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Neben der Herstellung von Proteinextrakten aus Embryonen wurden auch Ovarien adulter Fliegen präpariert, um Proteine daraus zu extrahieren. Hierzu wurden die Ovarien wie unter 4.1.5 beschrieben aus dem Abdomen weiblicher Fliegen präpariert und in 1x PBS überführt. Nach 1-minütiger Zentrifugation wurde der überstehende Puffer vollständig entfernt und die Ovarien in Gelauftragungspuffer mit Proteaseinhibitoren homogenisiert. Dabei wurde das Volumen des Gelauftragungspuffers so gewählt, dass eine Endkonzentration von 2 Ovarien/10 μ l eingestellt wurde.

4.1.5 Ovarienpräparation und Immunfluoreszenzfärbung

Für die Präparation wurden weibliche Fliegen mit CO₂ betäubt und in 1x PBS überführt. Mittels zweier Pinzetten wurde das Abdomen geöffnet und die Ovarien herauspräpariert. Anschließend wurden diese in ein Gemisch aus Fixierungslösung (0,5% Nonidet P40 und 2% Paraformaldehyd in 1x PBS) und Heptan transferiert und 20 min unter Rotation inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit 0,1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS (PBS-Tw) wurden unspezifische Antikörperbindestellen durch eine einstündige Inkubation mit PBS-Tw/10% *normal goat serum* (NGS) blockiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte

über Nacht bei 4°C. Die hierzu benötigten Antikörperlösungen wurden mit PBS-Tw/10% NGS hergestellt und sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Referenz/Quelle
anti-EGFP(IS28) (rb)	1:3000	Herzog <i>et al.</i> , 2014
anti-C(3)G (rb)	1:3000	Hong <i>et al.</i> , 2003
anti-C(3)G (IS01) (gp)	1:3000	Urban <i>et al.</i> , 2014
anti-myc (9E10) (m)	1:10	Evan <i>et al.</i> , 1985
anti-SMC1 (IS29) (rb)	1:200	Eigene Herstellung siehe 4.4.8
anti-CID (IS1) (rb)	1:500	Jager <i>et al.</i> , 2005
anti-CID (r)	1:250	Padeken <i>et al.</i> , 2013
anti-HA (12CA5) (m)	1:10	Niman <i>et al.</i> , 1983
Anti-V5 (m)	1:500	Invitrogen
anti- α -Tubulin (m)	1:8000	Sigma Aldrich
anti-POLO (m)	1:80	Llamazares <i>et al.</i> , 1991
Sekundäre Antikörper		
Cy3-Ziege-anti-Maus	1:600	Jackson Immunoresearch
Cy3- Ziege-anti-Kaninchen	1:600	Jackson Immunoresearch
Cy3- Ziege-anti-Meerschweinchen	1:600	Jackson Immunoresearch
Cy3- Ziege-anti-Ratte	1:600	Jackson Immunoresearch
Alexa 488-Ziege-anti-Maus	1:600	Molecular probes
Alexa 488-Ziege-anti-Kaninchen	1:600	Molecular probes
Alexa 488-Ziege-anti-Meerschweinchen	1:600	Molecular probes
Alexa 488-Ziege-anti-Ratte	1:600	Molecular probes
Cy5-Ziege-anti-Maus	1:600	Jackson Immunoresearch
Cy5- Ziege-anti-Kaninchen	1:600	Jackson Immunoresearch

Die Spezies der entsprechenden primären Antikörper sind wie folgt abgekürzt: rb: Kaninchen, gp: Meerschweinchen, m: Maus, r: Ratte

Anschließend wurden die überschüssigen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tw entfernt und die sekundären Antikörper 2 h mit den Ovarien unter Rotation inkubiert. Die hierfür benötigten Antikörperlösungen wurden mit PBS-Tw/10% NGS hergestellt. Nach der Antikörperinkubation wurde dreimal mit PBS-Tw gespült und einmal mit PBS-Tw 5 min unter Rotation gewaschen. Die benötigten Antikörperlösungen und die entsprechenden Verdünnungen sind ebenfalls in Tab. 5 aufgelistet. Anschließend erfolgte die Färbung der DNA durch den interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258. Hierzu wurden die Ovarien 5 min lang unter Rotation mit 500 μ l des Farbstoffs Hoechst (1 μ g/ml Hoechst 33258 in 1x PBS) inkubiert. Nach Abziehen der Färbelösung wurden die Ovarien einmal mit 1x PBS gespült und 5 min in 1x PBS unter Rotation gewaschen. Anschließend wurden die Ovarien auf einen Objektträger überführt und die überschüssige Flüssigkeit unter leichtem Wasserstrahlvakuum abgezogen. Die Präparate wurden in 30 μ l Montiermedium (70% (v/v) Glycerin; 50 mM Tris-HCl pH 9,5; 10 mg/ml Propylgallat; 0,5 mg/ml p-Phenylendiamin in 0,5x PBS) montiert und mit einem Deckglas fixiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde wie unter 4.1.11 beschrieben, durchgeführt.

4.1.6 Immunfluoreszenz an S14-Oozyten

Ab dem Stadium 10 werden von den Follikelzellen Chorionproteine segregiert, die dazu führen, dass in den späteren Stadien eine schützenden Hülle um die entsprechenden Oozyten ausgebildet wird, die die Zugänglichkeit für Antikörper nicht mehr ermöglicht. Um dennoch Färbungen an Metaphase I-arretierten Oozyten durchzuführen, muss das Chorion entfernt werden. Hierzu wurde eine von Tivosanis *et al.*, 1997 beschriebene Methode herangezogen. Die dafür verwendeten Ovarien stammten aus Fliegen, die zuvor ein paar Tage auf Hefe gehalten wurden. Diese wurden in 2 ml Methanol überführt und durch mehrere Ultraschallimpulse am Sonopuls HD 2200 (Bandelin) aufgeschlossen, um so die neu gebildete Vitellinmembran bzw. das Chorion abzulösen. Hierfür wurde die Intensität für wenige Impulse auf 100% gestellt und die übrigen Impulse erfolgten bei 60% Intensität insgesamt über einen Zeitraum von 15 s. Anschließend wurden die Oozyten in neues Methanol überführt und 2 h lang bei RT inkubiert um dann wie unter 4.1.5 beschrieben mit der Immunfluoreszenzfärbung fortzufahren.

4.1.7 Chromosomenspreads

Die Herstellung von Chromosomenspreads erfolgte wie bei Webber *et al.*, 2004 beschrieben. Hierzu wurden Ovarien von 2 bis 3 Tage alten Weibchen in PBS isoliert und anschließend in frischem Hypo-Extraktionspuffer (50 mM Saccharose, 17 mM Trinatrium-Zitratdihydrat, 5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 30 mM Tris, pH 8.2, 0,1 mM Pefablock) überführt und 30 min lang bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ovarien mit Hilfe von zwei Pinzetten auf einem Objektträger mit Hypo-Extraktionspuffer in einzelne Ovariolen zerlegt und die Eikammern der Stadien 10 bis 14 entfernt. Die anterioren Spitzen der Ovarien wurden in 40 µl 100 mM Saccharose überführt und durch Auf- und Abpipettieren einer P10-Pipette in einzelne Eikammern weiter zerlegt und anschließend mit Hilfe einer BSA-beschichteten Spitze auf einem Objektträger (Superfrost Plus slide) immobilisiert und fixiert. Hierzu wurden die Objektträger zuvor 15 s lang mit einem Fixativ (0.25 g PFA in 22.5 ml Wasser gelöst, 80 µl 1 N NaOH zugegeben, pH Einstellung auf 9,2 durch 50 mM Borsäure, 350 µl 10% Triton-X 100) beschichtet. Die Lösung mit den einzelnen Eikammern wurde dann in die Mitte dieser Objektträger aufgebracht. Durch kreisende Bewegungen der Objektträger in verschiedenen Winkeln wurden die einzelnen Kerne aus den Zellen gelöst und anschließend über Nacht in einer Kammer bei RT inkubiert. Um eine vollständige Trocknung der einzelnen Kerne zu ermöglichen, wurde am nächsten Tag die Kammer geöffnet und weitere 2 Stunden getrocknet. Nach einer 2-minütigen Inkubation in 0,4% Kodak Photo-Flo 200 wurden die Objektträger erneut 2 h getrocknet. Die Rehydrierung der Präparate erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation in PBS. Anschließend wurden alle unspezifischen Antikörperbindestellen durch eine 1-stündige Inkubation mit Blockingpuffer (5% FBS, 2% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS) gebunden. Nach drei Waschschritten von jeweils 10 min mit PBTx (1x PBS; 0.1% (w/v) Triton-X-100) wurden die Antikörperlösungen in 0,1% BSA/0,1% Triton-X 100 in PBS zugegeben. Nach 3-stündiger Inkubation mit den Antikörperlösungen erfolgte erneut ein dreimaliges 10-minütiges Waschen mit PBTx. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde anschließend ebenfalls in 0,1% BSA/0,1% Triton-X 100 in PBS durchgeführt. Zur Färbung der DNA wurden 500 µl des Farbstoffs Hoechst (1 µg/ml Hoechst 33258 in 1x PBS) zugegeben und 10 min inkubiert. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Objektträger zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die immobilisierten Zellen mit 30 µl ProLong-Goldantifade-Montiermedium (Life

Technologies) versetzt, mit einem Deckglas fixiert und min. 24 h lang in einem geschlossenen Behälter mit Silikagel getrocknet.

4.1.8 Immunfluoreszenzfärbung von Embryonen

Die Kollektion und Dechorionisierung der Embryonen erfolgte wie unter 4.1.4 beschrieben. Anschließend wurden die Embryonen in ein Gemisch aus jeweils 700 µl Methanol und Heptan überführt. Die Fixierung erfolgte durch eine fünfminütige Inkubation unter Rotation, wonach dreimal mit Methanol und dreimal mit PBTx (1x PBS; 0.1% (w/v) Triton-X-100) gespült und anschließend dreimal jeweils 10 min lang unter Rotation mit PBTx gewaschen wurde. Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschriffe erfolgen jeweils unter Rotation. Um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren, erfolgte eine einstündige Inkubation in 1 ml PBTx, welches mit 10% NGS oder 10% FBS (*fetal bovine serum*) versetzt wurde. Anschließend wurden entsprechende Verdünnungen der primären Antikörperlösungen (Tab. 5) in PBTx+10% NGS oder 10% FBS zugegeben und 1,5 h lang bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch dreimaliges Spülen und zweimaliges 10-minütiges Waschen mit PBTx wurden die überschüssigen Antikörper entfernt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Embryonen mit dem sekundären Antikörper in PBTx+5% NGS oder 5% FBS, der dann durch dreimaliges Spülen mit PBTx und einer fünfminütigen Inkubation mit PBTx entfernt wurde. Die Färbung der DNA erfolgte durch Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Hoechst 33258 (1 µg/ml Hoechst 33258 in PBS), welcher nach fünfminütiger Inkubation durch Waschen mit PBS entfernt wurde. Nach Überführung der Embryonen auf einen Objektträger, wurde das überschüssige PBS abgezogen, 30 µl Montiermedium zugegeben und die Proben mit einem Deckglas fixiert.

4.1.9 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Für die Generierung der X-chromosomalen 359 bp-Sonde wurde ein spezifischer Teil der genomischen DNA mit den Oligonukleotiden CGGTCATCAAATAATCATTTATTTGC und CGAAATTTGGAAAAACAGACTCTGC amplifiziert (Hsieh und Brutlag, 1979). Das entstandene PCR-Produkt wurde über Nacht mit den Enzymen AluI, HaeIII, TruI, MspI, RsaI, und Sau3AI hydrolysiert und die Spaltfragmente anschließend präzipitiert und in Wasser gelöst. Nach einem 1-minütigen Denaturierungsschritt bei 100°C wurde die DNA-Lösung auf Eis inkubiert, sodass möglichst viele einzelsträngige DNA-Moleküle entstehen, die dann für die Kopplung mit den Farbstoffen zur Verfügung stehen. Die AATAT-spezifische Sonde für das 4. Chromosom wurde als einzelsträngiges (AATAT)₆-Oligonukleotid von der Firma Metabion international AG synthetisiert. Nach einer Präzipitation von insgesamt 10 µg und der Resuspension in Wasser wurde auch hier mit der Kopplung der Farbstoffe weiterverfahren. Hierzu musste an die freien Enden der DNA-Fragmente zunächst Aminoallyl-dUTP angehängt werden. Diese Reaktion erfolgte bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h in einer Reaktionsmischung bestehend aus 200 mM Na-Cacodylat (pH 7.2), 100 mM DTT, 1 mM CoCl₂, 50 mM 5-(3-aminoallyl)-dUTP (ARES DNA Alexa Fluor 555/647 *labeling kit*, Molecular probes), 5 mM unmarkiertem dTTP und 400 U Terminale Desoxyribonukleotid-Transferase (Roche). Zum Stoppen der Reaktion wurden 5 mM EDTA zugegeben und anschließend wurde die markierte DNA präzipitiert und in Wasser resuspendiert. Die eigentliche Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa555 und Alexa647 erfolgte durch eine zweistündige Inkubation in Reaktionspuffer D (DNA Alexa Fluor 555/647 *labeling kit*, Molecular probes), welche dann durch Zugabe von 150 mM Hydroxylamin gequencht wurde. Nach der Präzipitation der entsprechenden FISH-Sonden und der

Resuspendierung in Elutionspuffer (aus dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific) wurden diese dann bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Der eigentliche Prozess der *in situ*-Hybridisierung wurde wie bei Dernburg *et al.*, 1996a beschrieben durchgeführt, jedoch wurden einige Modifikationen in diesem Protokoll eingeführt. Nach der Fixierung der Oozyten mit einem Gemisch aus Heptan und Fixierungslösung (0,5% Nonidet P40 und 2% Paraformaldehyd in 1x PBS) wurden die Oozyten dann 3x mit 2x SSCT (0,3 M Natriumchlorid, 30 mM Natriumcitrat, 0,1% Tween-20) gewaschen. Anschließend erfolgten sequentielle Waschschrte, bei denen die Konzentration an Formamid von 20% über 40% bis hin zu einer Konzentration von 50% erhöht wurde. Jeder dieser Waschschrte erfolgte über einen Zeitraum von 10 min. Nach einer zweistündigen finalen Inkubation in 2x SSCT-50% Formamid wurden die Oozyten bzw. Embryonen in 36 µl Hybridisierungslösung (20% Dextransulfat, 15% Formamid in 2x SSCT) überführt und jeweils 100 ng der entsprechenden Fluoreszenzsonden in 4 µl H₂O zugegeben. Die Denaturierung der Proben erfolgte durch eine zweiminütige Inkubation bei 91°C und die eigentliche Hybridisierung über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Proben dreimal mit vorgewärmtem 2x SSCT-50% Formamid jeweils 20 min lang gewaschen und mit Hilfe von sequentiellen Waschschrten wurde die Formamidkonzentration anschließend von 50% auf 20% reduziert. Nach dreimaligem Waschen mit 2x SSCT erfolgte anschließend die Färbung der DNA mit dem interkalierendem Farbstoff Hoechst 33258 (1 µg/ml Hoechst 33258 in PBS), welcher nach 5 minütiger Inkubation durch Waschen mit PBS entfernt wurde. Die Montierung der Proben erfolgte wie bereits unter 4.1.5 beschrieben.

Zur FISH-Analyse von Meiose II wurden ungefähr je 300 Weibchen der untersuchten Genotypen für ca. 2-3 Tage auf Hefe gehalten und anschließend in ein Kollektionsgefäß überführt. Nach einer einstündigen Vorkollektion bei 25°C wurden in Zeitabständen von 20 bis 40 min die abgelegten Eier gesammelt, dechorionisiert und mit Methanol fixiert. Dieser Vorgang wurde über mehrere Stunden wiederholt, die entsprechenden Embryonen wurden im Anschluss in einem Gefäß vereinigt und anschließend mit dem oben beschriebenen Protokoll zur Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung fortgefahren.

4.1.10 *In vivo* Mikroskopie an Embryonen

Für die *in vivo*-Mikroskopie synzytialer Embryonen wurden Fliegen der untersuchten Genotypen in Flugkäfigen gehalten und die Embryonen nach einem definierten Zeitraum gesammelt und dechorionisiert (siehe 4.1.4). Diese wurden anschließend auf ein Apfelsaftagar-Blöckchen (ca. 1 cm²) transferiert und mit Hilfe einer Nadel in der Mitte symmetrisch aufgereiht. Nachdem die Embryonen auf ein mit Embryonenkleber (Heptanextrakt von Paketklebeband) bestrichenes Deckglas (24 x 32 mm) übertragen worden waren, wurden sie noch mit einem sauerstoffdurchlässigen, hochviskosen Öl (Volex 10 S, elf atochem) beschichtet, welches zum Schutz vor Austrocknung dient. Das Deckglas wurde in die passende Aussparung eines Objektträger-großen Metallrahmens gelegt und für die mikroskopische Analyse am inversen Laser-Scanning-Mikroskop eingespannt (4.1.11).

4.1.11 Konfokale Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie erfolgte am Laser-Scanning-Mikroskop von Leica (Leica Confocal TCS SP5) mit der LAS-Software. Für die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe Cy5, EGFP, Alexa488, Venus, mRFP, Alexa 555, Alexa647 und Hoechst 33258 wurden folgende Laser verwendet:

- UV-Laser Diode 405 (Anregungswellenlänge 405 nm)
- Argonlaser (Anregungswellenlänge 458-514 nm)
- DPSS561-Laser (Anregungswellenlänge 561 nm)
- Helium/Neon-Laser (Anregungswellenlänge 633 nm)

Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde das 40x1.25 Öl-Objektiv und das 63x1,4 Öl-Objektiv verwendet. Die Bildaufnahmeparameter und die Einstellung der Photomultiplier wurden den entsprechenden Präparaten bzw. der experimentellen Zielsetzung angepasst. Bei hohem Hintergrundsignal, wurden die Fluoreszenzbilder mit einer vierfachen Abrasterung aufgenommen. Anschließend wurden alle Aufnahmen mit Hilfe der Software ImageJ v1.41 (National Institutes of Health, USA) überlagert und bearbeitet.

Um den genauen Zeitpunkt der Disassemblierung des SCs festzulegen, wurde das Stadium bestimmt, bei dem die C(3)G-Färbungen nur noch als einzelne punktförmige Signale sichtbar waren. Um die einzelnen Stadien der Oogenese zuzuordnen, wurden die Beschreibungen von King, 1970 zugrunde gelegt. Hierbei war die Größe der entsprechenden Eikammern, die Polytänie des Nährzellchromatins und die Lokalisation der Grenzzellen (*border cells*) von entscheidender Bedeutung (siehe Abb. 7A). In einigen Abbildungen (als Beispiel Abb. 9B) erscheinen die gewählten Eikammern etwas kleiner. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die entsprechenden Oozytenkerne sich nicht immer in der äquatorialen Ebene befinden, in der man die gesamte Größe der Eikammer einschätzen kann.

4.2 Allgemeine genetische Methoden in *Drosophila melanogaster*

4.2.1 GAL4/UAS-System

Mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems (Brand und Perrimon, 1993) ist es möglich gewebes- und stadienspezifische Genexpressionen in *Drosophila melanogaster* durchzuführen. Die Aktivierung dieses Systems erfolgt nach Kreuzungen von Fliegen einer sogenannten Treiberlinie, welche für einen GAL4-Transkriptionsaktivator kodiert, mit einem Stamm, der die UAS-Sequenz (*upstream activating sequences*) enthält (Responderlinie). Der hefespezifische Transkriptionsfaktor Gal4 wird unter Kontrolle eines gewebes- oder stadienspezifischen Promotors gestellt. Im UAS-Transgen befindet sich hinter den Gal4-Bindungsstellen (UAS-Sequenzen) ein beliebiges Zielgen, dessen Expression durch Bindung des Transkriptionsfaktors Gal4 an UAS aktiviert wird. In wildtypischen *Drosophila*-Stämmen finden sich keine Zielgene für Gal4 sowie keine weiteren Transkriptionsfaktoren, welche zur Aktivierung der UAS-Transgene führen können, somit haben die Einzelkomponenten allein keinen Einfluss auf die Genexpression. Erst durch Kreuzen beider Linien kommt es zur Gal4-abhängigen Expression des UAS-Transgens und somit zur stadien- und gewebsspezifischen Expression des Zielgens.

4.2.2 TEV-Protease-System

Das TEV-Protease-System stellt eine *in vivo*-Technik dar, die für den spezifischen Abbau von Proteinen herangezogen werden kann. Die gezielte Proteolyse bietet die Möglichkeit Proteine direkt zu spalten und somit deren Funktion zu inhibieren. TEV-Protease stammt aus dem Tabakäzvirus (*tobacco etch virus*) und entspricht der katalytischen Domäne des *nuclear inclusion a-Proteins* (Nla-Protein) (Dougherty und Parks, 1991). Dieses 27 kDa Protein gehört zu den Cysteinproteasen und erkennt die Aminosäuresequenz Glu-Xaa-Xaa-

Tyr-Xaa-Gln-Gly/Ser und schneidet zwischen Gln und Gly/Ser. Fügt man nun diese Erkennungssequenz in eine oberflächenexponierte Region eines Proteins ein, sollte es zur gezielten Spaltung und somit zur Inaktivierung des Proteins kommen. Wie bereits in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden konnten, eignet sich diese Protease als Werkzeug um *in vivo* spezifische Proteine zu inaktivieren, da im Proteom keine endogenen Schnittstellen für die TEV-Protease vorhanden sind und somit keine unspezifischen Kreuzreaktionen zu erwarten sind (Dougherty und Parks, 1991).

Die verwendete TEV-Proteaseversion (TEV-Protease^{S219V}) zeichnet sich aufgrund der modifizierten Autoproteolysestelle an Aminosäureposition 219 durch eine höhere Aktivität und Stabilität im Vergleich zu wildtypischer TEV-Protease aus (Kapust *et al.*, 2001). Wie bereits in Nagarkar, 2010 gezeigt werden konnte, eignet sich dieses System zur Oogenese-abhängigen Spaltung von Rad21.

4.2.3 RNA-Interferenz in *Drosophila melanogaster*

RNA-Interferenz ermöglicht eine Herunterregulation bzw. vollständige Inaktivierung von Genen auf posttranskriptionaler Ebene. Grundlage hierfür ist die Generierung von ssRNA-Transkripten, die einen kurzen doppelsträngigen *hairpin* (shRNA) ausbilden. Dieser wird in der Zelle von der RNA-Endonuklease Dicer erkannt und prozessiert. Die so entstandenen 21 bp langen miRNAs werden in den miRISC (miRNA-induced silencing complex) integriert (Zamore *et al.*, 2000) und sind dann in der Lage an die entsprechenden mRNAs des Zielgens zu binden und dieses abzubauen.

Um eine gewebsspezifische Inaktivierung bestimmter Gene zu erzielen, erfolgte die Expression der shRNA unter Kontrolle des Gal4/UAS-Systems. Hierzu wurden die verwendeten UAS-RNAi-Linien mit verschiedenen Gal4-Treiberlinien gekreuzt. Die in dieser Arbeit herangezogenen UAS-RNAi-Konstrukte zur Inaktivierung von Sororin wurden von M. Rotheneder im Rahmen seiner Bachelorarbeit generiert oder im Falle des Nipped-B *knockdowns* der *Drosophila melanogaster*-Stammsammlung in Bloomington bezogen.

4.2.4 Das DeGradFP (degrade Green Fluorescent Protein)-System

Das DeGradFP-System basiert auf dem gezielten Abbau von EGFP-markierten Fusionsproteinen (Caussin *et al.*, 2012). Diese werden durch einen anti-GFP *nanobody* spezifisch zum SCF-Komplex rekrutiert. Dies wird ermöglicht durch eine N-terminale Fusion von slmb, dem *Drosophila melanogaster* F-Box-Bindeprotein des SCFs (Jiang und Struhl, 1998) mit dem anti-GFP *nanobody* vhhGFP4. Dieser Antikörper erkennt GFP, Venus, das gelb-fluoreszierende Protein (YFP) und diverse Derivate dieser Proteine. Durch die Bindung mit dem Antikörper vhhGFP4 werden die verschiedenen fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine zum SCF rekrutiert, was schließlich die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau der entsprechenden Proteine zur Folge hat.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Allgemeine Methoden der Klonierung

4.3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Reaktionsansätze der PCR wurden entsprechend der verwendeten Oligonukleotide, den erwarteten Fragmentgrößen und der eingesetzten Matrizen-DNA-Menge angepasst. Für die PCR-Reaktionen wurden folgende Polymerasen verwendet:

- Phusion-Polymerase (Thermo Scientific)
- Expand Long Range dNTPack (Roche)
- Taq-Polymerase (Eigenpräparation)

Diese unterscheiden sich in der Replikationsrate und in der Genauigkeit mit der die Nukleotide eingebaut werden. Die Parameter wurden den Herstellerangaben entsprechend angepasst. Als Matrizen-DNA wurden 50-200 ng Plasmid-DNA eingesetzt bzw. 0,3 µl bis 1 µl genomischer oder cDNA aus Fliegen (siehe 4.3.1.8 bzw. 4.3.1.9) zugegeben. Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurde eine 1-fache Endkonzentration der entsprechenden Reaktionspuffer, dNTP-Mix und Oligonukleotiden nach Angaben der entsprechenden Hersteller verwendet. Bei PCR-Ansätzen mit Taq-Polymerase wurde zusätzlich noch 1,5 mM MgCl₂ zugegeben. Die PCR-Reaktionen wurden in den PCR-Maschinen Personal Thermocycler (Biometra), RoboCycler Gradient 96 Hot Top Combo (Stratagene) und Perkin Elmer Cetus Gene Amp PCR System 9600 durchgeführt. Die Entsalzung und Reinigung der entsprechenden PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kits“ von QIAGEN bzw. mit dem „GeneJET PCR Purification Kit“ von Thermo Scientific gemäß den Herstellerangaben. Es erfolgte eine Elution des gereinigten Produkts in 30 µl EB. Für die Amplifikationen von kodierenden DNA-Sequenzen wurde auf folgende kommerzielle cDNA-Klone des *Drosophila Genomics Resource Centers* (<https://dgrc.cgb.indiana.edu/Home>) zurückgegriffen (Tab. 6).

Tabelle 6: cDNA-Klone

Klon	enthaltene cDNA
AT08465	SOLO
SD02122	SMC1
RE14758	SMC3
LD34181	SA/Scs3
LD40216	Sororin/Dalmatian
RE40483	Pds5
RE10295	Wapl
RE31579	Nipped-B/Scs2
LD33081	Mei-S332/Sgo
LD11851	POLO

Die für die Amplifikationen verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Microsynth, Balgach oder Sigma-Aldrich, Taufkirchen hergestellt. Zum Zwecke der Klonierung besitzen die Oligonukleotide auch noch Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme. Für die Klonierung der kodierenden Sequenzen in die 2-Hybridvektoren (pAS2 und pACT2, Clontech) und in pCS2-Vektoren (Rupp *et al.*, 1994, Turner und Weintraub, 1994) wurden hauptsächlich PCR-Ansätze gewählt, bei denen das erwartete Produkt von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme FseI und AscI flankiert waren. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide wurden nach folgendem Prinzip generiert:

ATAAGGCCGGCCXATGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX Oligonukleotid 1 (*forward*)

ATAAGGCGCGCCTCAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX Oligonukleotid 2 (*reverse*)

Dabei dienen die ersten 4 Nukleotide (blau) als Überhang um eine effiziente Hydrolyse der entsprechenden PCR-Produkte zu gewährleisten. Daran anschließend folgt die Erkennungsstelle der Restriktionsenzyme FseI (rot) und AscI (grün). Um im entsprechenden Leserahmen mit der im Plasmid vorhandenen Sequenz für eine N-terminale Markierung zu sein, muss im Oligonukleotid 1 noch ein beliebiges Nukleotid eingefügt werden. Weiterhin zeichnen sich die Oligonukleotide durch das Vorhandensein eines Startkodons (orange) im

Oligonukleotid 1 und einem Stoppkodon (violett) im entsprechenden Oligonukleotid 2 aus. Für die Amplifikation der Genbereiche wurde die Sequenz der hybridisierenden Region so gewählt, dass etwa 18 bis 22 Nukleotide zur Matrizen-DNA komplementär sind.

4.3.1.2 Restriktionshydrolyse

Die Restriktionshydrolysen erfolgten mit Enzymen der Firmen New England Biolabs, Roche und Fermentas. Die Enzyme wurden nach Angaben der Hersteller verwendet. Dabei wurden jeweils 0,2 bis 2 µg Plasmid-DNA mit jeweils 2 bis 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym hydrolysiert. Bei einigen Doppelrestriktionen war es nicht möglich, den gleichen Restriktionspuffer zu verwenden, da keine 100%ige Aktivität beider Enzyme gewährleistet wäre. Hier wurde eine sequentielle Hydrolyse durchgeführt. Zunächst erfolgte die Restriktion mit dem ersten Enzym, welches anschließend durch eine 15-minütige Hitzebehandlung inaktiviert und anschließend mittels Spin-Dialyse (Herzig, 1999) gereinigt wurde. Die zweite Hydrolyse erfolgte analog, unter Berücksichtigung der angegebenen Herstellerparameter. Im Anschluss an jede Restriktion wurden die im Hydrolyseansatz vorhandenen Enzyme durch eine 15-minütige Inkubation bei 65°C bzw. 80°C inaktiviert und jeder Ansatz durch Spin-Dialyse entsalzt.

4.3.1.3 Dephosphorylierung und Ligation

Zur Unterbindung der Religation der hydrolysierten DNA wurden die endständigen Phosphatgruppen der Vektoren oder der Fragmente durch Behandlung mit antarktischer Phosphatase (New England Biolabs) entfernt. Hierzu wurden den Herstellerangaben entsprechend 10x Dephosphorylierungspuffer und Enzym zugegeben und anschließend 1 h lang bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase erfolgte eine 5-minütige Hitzebehandlung bei 65°C

Die Ligation wurde mit T4 DNA-Ligase und Ligase-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT) durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug bei Raumtemperatur (25°C) 2 Stunden. Für die Ligation wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Fragment von 1:7 bis 1:15 gewählt. Zur Realisierung dieser Verhältnisse wurden zuvor die DNA-Konzentrationen von Vektor und Fragment bestimmt. Nach erfolgter Ligation wurde das zugegebene Enzym mittels einer 15-minütigen Hitzebehandlung bei 65°C inaktiviert.

4.3.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden zwei Methoden verwendet.

1. Chemische Transformation

Hierzu wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (DH10B, DH5α oder XL1Blue; Tab.7) mit dem gesamten Ligationsansatz gemischt bzw. ca. 10 ng Plasmid-DNA zugegeben und 20 min lang auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung (90 s bei 42°C) folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium (1% (w/v) Bacto Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl) zugegeben und die Bakteriensuspension 30-45 min lang (nur bei LB/Kanamycin) in einem 37°C Schüttler inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicilin: 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Tabelle 7: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH10B	<i>F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻</i>
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^f Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)plys	<i>F ompT hsdS_B(R_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam^R)</i>

2. Elektrotransformation (Elektroporation)

Zu elektrokompentenen *E. coli* DH10B-Bakterienzellen (50 µl), wurde 1 µl des Ligationsansatzes hinzupipettiert. Anschließend wurde diese Suspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und mit Hilfe des Gerätes „Pulse Controller“ von BioRad eine Elektroporation durchgeführt. Hierbei wurde die Suspension einem Elektroimpuls von 2,5 kV, 200 Ω und einer elektrischen Kapazität von 30 µF_d ausgesetzt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der gesamte Inhalt der Küvette in ein Eppendorfgefäß überführt und etwa 30-45 min lang in einem 37°C Schüttler inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht inkubiert.

4.3.1.5 Plasmid-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific) oder dem „QIAGEN® Plasmid (Plus)-Midi Kit“. Zunächst wurden einzelnen Kolonien in jeweils 5 ml bzw. 50 ml LB-Medium (+Antibiotika) inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach 5-minütiger Pelletierung der Bakterien bei 16,000x g (Miniprep) bzw. bei 6,000x g (Midiprep) (Varifuge, Heraeus) erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA. Die präparierte DNA wurde in 30 µl EB-Puffer (Mini) bzw. in 200 µl 1x TE-Puffer (Midi) eluiert.

4.3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese und Gelelution

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Restriktionen bzw. Amplifikationen der Plasmide/Fragmente überprüft. Die Herstellung der Agarosegele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Angaben von Sambrook *et al.*, 1989. Zur Detektion der DNA wurde der Gellösung Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) hinzugegeben. Die Konzentration der Agarose betrug 0,7% (w/v) bis 1% (w/v). Die angelegte Spannung wurde entsprechend des Elektrodenabstands gewählt. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 60-180 V (5 V/cm) in 1 x TBE-Puffer (1 M Tris, pH 8,0, 0,9 M Borsäure, 10 mM EDTA). Zur Größenabschätzung der Fragmente wurden die 100 bp-DNA-Leiter bzw. die 1 kb-DNA-Leiter von New England Biolabs verwendet. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 312 nm nachgewiesen und fotografiert. Für die Gelelution wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend mit dem „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers extrahiert.

4.3.1.7 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Sequencing Laboratories Göttingen durchgeführt. Hierzu wurden die zu sequenzierenden Proben nach Firmenstandards vorbereitet. Mit Hilfe der Software „Chromas“ wurden die Daten der Sequenzierungen dargestellt und anschließend mit den theoretischen Sequenzen, welche mit dem Programm „SeqBuilder (DNA Star Software)“ erstellt worden sind, verglichen. Der Sequenzvergleich erfolgte unter Verwendung des Multialign-Algorithmus (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

4.3.1.8 Isolierung von genomischer DNA aus adulten Fliegen

Für die Präparation der genomischen DNA aus *Drosophila melanogaster* wurden 4 bzw. 30 mit CO₂-betäubte adulte Fliegen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und etwa 20 min lang bei -20°C eingefroren. Nach Zugabe von 50 µl bzw. 400 µl Puffer A (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 M EDTA; 0,1 M NaCl, 0,5% SDS) wurden die Fliegen homogenisiert und 30 min lang bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 120 µl bzw. 900 µl einer Lithiumchlorid/Kaliumacetat-Lösung (1,4 M KAc; 4,3 M LiCl) zum Homogenisat hinzugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die DNA durch Zugabe von 72 µl bzw. 540 µl Isopropanol gefällt und durch 15-minütige Zentrifugation bei 16,000x g sedimentiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem entsprechenden Volumen von 20 bis 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

4.3.1.9 Isolierung von RNA und Reverse Transkription

Die Präparation der RNA aus Ovarien erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit[®] (QIAGEN) nach dem Protokoll „Purification of Total RNA from Animal Tissues“ bzw. mit dem „innuPREP RNA Mini Kit“ von Analytik Jena. Als Ausgangsmaterial wurden jeweils 30 Ovarien verwendet. Zur reversen Transkription wurde der „Omniscript RT Kit“ (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Es wurde je 1 µl (300-400 ng) der präparierten RNA-Proben pro Transkriptionsreaktion verwendet. Für die Generierung der cDNA wurden sowohl Oligo-dT-, Hexamerprimer oder genspezifische Oligonukleotide zu je 10 µM pro Transkriptionsreaktion eingesetzt.

4.3.2 Klonierung von pattB-gSororin-6myc/pUASp-Sororin-6myc

Für die Generierung eines genomischen Sororin-Konstrukts, wurde zunächst die kodierende Region, die 3'-UTR und die 5'-UTR, sowie weitere flankierende Regionen aus genomischer DNA amplifiziert. Da es jedoch nicht möglich war mit den Oligonukleotiden EU239 und EU240 diesen insgesamt 5,4 kb umfassenden genomischen Bereich zu amplifizieren, wurde die entsprechende Region halbiert, sodass zwei etwa 2,7 kb große PCR-Produkte entstehen sollten, die sich in der Mitte des zu amplifizierenden Bereichs überlagerten. Diese mit den Oligonukleotiden (EU239, EU240, EU245, EU246) amplifizierten Produkte wurden als Matrize für die anschließende PCR des 5,4 kb großen Fragments eingesetzt. Anschließend wurde dieses Fragment über FseI und AscI in den Vektor pattB-FA (modifizierte MCS; Bischof *et al.*, 2007) kloniert.

Tabelle 8: Oligonukleotide für die Klonierung von pattB-Sororin-6myc und pUASP-Sororin-6myc

Name	Sequenz (5'-3')	Besonderheit
EU239	ataaGGCCGGCCtggtttatgcgcgaggagccggcc	mit Fsel-Erkennungsstelle
EU240	ataaGGCGCGCCgcgattggaagtctttcccatc	mit Ascl-Erkennungsstelle
EU245	cgaggaagattatagcaacgattcggagcacg	
EU246	cgtgctccgaatcggttgetataaatcttcctcg	
EU138	ataaGGCCGGCCtatggtaagaacacggccggtgc	mit Fsel-Erkennungsstelle
EU139	ataaGGCGCGCCttattcaatgatcactgggaact	mit Ascl-Erkennungsstelle
EU140	gcctgagccagtcagggtcgttc	
EU141	cgtccaatggcgacgtcatc	
EU241	gtagGCGGCCGCTtcaatgatcactgggaacttctc	mit NotI-Erkennungsstelle
EU242	gtagCGGCCGCCtaatcgcaattgctgtttattatt t	mit NotI-Erkennungsstelle
EU76	ataaGCGGCCGCTcgattttaagctatggagcaaaa gc	mit NotI-Erkennungsstelle
EU77	ataaGCGGCCGCTtagggccggcctgaattcaagt	mit NotI-Erkennungsstelle
EU283	ataaGGCGCGCCttagccccggcctgaattcaagtC	mit Ascl-Erkennungsstelle und mutierter Fsel-Stelle

Die großgeschriebenen Buchstaben stellen Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme dar.

Nach Sequenzierung dieses Konstrukts mit den Oligonukleotiden EU239, EU138, EU139, EU140, EU141 und EU240 wurde dann ein Teilfragment von Sororin mit den Restriktionsenzymen PstI und Acc65I ausgeschnitten und in den Vektor pUC19 kloniert. Mit Hilfe einer inversen PCR mit den Oligonukleotiden EU241 und EU242 wurde vor dem Stoppkodon die Erkennungsstelle für NotI eingefügt, in die die Gensequenz für 6myc eingesetzt wurde. Die hierfür notwendige PCR wurde mit den Oligonukleotiden EU76 und EU77 durchgeführt. Als Matrize wurde der Vektor pCS2-6myc (Rupp *et al.*, 1994, Turner und Weintraub, 1994) verwendet. Abschließend wurde das Sororin-6myc-Teilfragment mit den Restriktionsenzymen PstI und Acc65I hydrolysiert und wieder in den pattB-Sororin-Vektor zurückgesetzt. Dieses Konstrukt wurde anschließend in Embryonen injiziert, die eine *attB-site* an Position 51D tragen. Alle für die Klonierung benötigten Oligonukleotide finden sich in Tabelle 8.

Für die Generierung von pUASp-Sororin-6myc wurde der kodierende Bereich von *Sororin-myc* aus dem Plasmid pattB-gSororin-6myc mit Hilfe der Oligonukleotide EU138 und EU283 amplifiziert und in den Vektor pUASp-FA (modifizierte MCS; Rorth, 1998) kloniert. Da sich am Ende des amplifizierten Bereichs von 6myc eine Erkennungssequenz von Fsel befindet, die in der nachfolgenden Klonierung stört, wurde diese durch einen einzelnen Basenaustausch im Oligonukleotid EU283 mutiert. Anschließend an die Klonierung wurde eine Injektionsmischung wie bereits bei Herzig, 1999 beschrieben, vorbereitet. Die Zusammensetzung sowie die Konzentration wurden gelelektrophoretisch überprüft. Diese Injektionsmischung wurde anschließend in *w**-Embryonen injiziert.

4.3.3 Klonierung von pWALIUM22-UAS-Sororin-RNAi

Für die Generierung von Fliegenlinien, die die Suppression der Expression von *Sororin* durch RNA-Interferenz (RNAi) erlauben, wurden zunächst drei Plasmide generiert, die spezifische Sequenzbereiche von Sororin tragen. Die ssRNA-Transkripte dieser Regionen können einen *hairpin* bilden, welcher die Aktivierung des RNAi-Mechanismus zur Folge hat. Diese spezifischen Bereiche wurden mit Hilfe von *DSIR-Designer of small interfering RNA* (<http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/>) ausgewählt. Die so erhaltenen komplementären Oligo-

nukleotide (Tab. 9) wurden hybridisiert und mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und NheI in den Vektor pWALIUM22 (Ni *et al.*, 2008) kloniert um anschließend mit Hilfe des Φ C31-Systems transgene Fliegen zu generieren. Die Generierung dieser Fliegen wurde von M. Rotheneder im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

Tabelle 9: Oligonukleotide zur Erzeugung von *Sororin*-RNAi Linien.

Name	Sequenz (5'-3')	Besonderheit
EU257	ctagcagtTCCCACGAAACTATCAAACAAtagttat attcaagcataTTGTTTGATAGTTTCGTGGGAgcg	Position 237, komplementär zu EU258
EU258	aattcgcTCCCACGAAACTATCAAACAAtatgcttg aatataactaTTGTTTGATAGTTTCGTGGGAactg	Position 237, komplementär zu EU257
EU259	ctagcagtAAGATATACCTAGAAAGTCAAtagttat attcaagcataTTGACTTTCTAGGTATATCTTgcg	Position 1775, komplementär zu EU260
EU260	aattcgcAAGATATACCTAGAAAGTCAAtatgcttg aatataactaTTGACTTTCTAGGTATATCTTactg	Position 1775, komplementär zu EU259
EU261	ctagcagtAAGGTACAGAAATCAACGCAAtagttat attcaagcataTTGCGTTGATTTCTGTACCTTgcg	Position 433, komplementär zu EU262
EU262	aattcgcAAGGTACAGAAATCAACGCAAtatgcttg aatataactaTTGCGTTGATTTCTGTACCTTactg	Position 433, komplementär zu EU262

4.3.4 Klonierung von pattB-Pds5-6myc

Die Klonierung von pattB-Pds5-6myc wurde mit meiner Hilfe von M. Rotheneder im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt. Die benötigten Oligonukleotide finden sich in Tab. 10.

Tabelle 10: Oligonukleotide für die Klonierung und Sequenzierung von pattB-Pds5-6myc

Name	Sequenz (5'-3')	Besonderheit
EU250	ataaACGCGTaatcccggctatgcccgcacggtttgg	mit MluI-Erkennungsstelle
EU251	ataaGCGGCCGCTgatttggctgaagcggctcctg	mit NotI-Erkennungsstelle
EU252	ataaACCGGTtttagggccggcctgaattcaagtcc	mit AgeI-Erkennungsstelle
EU253	ataaACCGGTgggctgggatggcgcagattggagg	mit AgeI-Erkennungsstelle
EU254	GTCGACctgcaaagagaacgcccaggctcgt	mit SalI-Erkennungsstelle
EU255	ccaccctcctccactttttcaatg	
EU265	ggatactacaaagtgggcttgagg	
EU131	gctgtccacggacgatgctg	
EU132	ctacgatgcattaacattgtc	
EU133	gacactctatgtaagctggatg	
EU134	cacgatccacgcttcacgaatc	

Die großgeschriebenen Buchstaben stellen Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme dar.

Zunächst wurde die 3'-flankierende Region von Pds5 (2,5 kb) mit den Oligonukleotiden EU253 und EU254 amplifiziert und Hilfe der Restriktionsenzyme AgeI und SalI in den Vektor pSLfa1180fa (Horn und Wimmer, 2000) kloniert. Anschließend wurde der kodierende Bereich von Pds5 und die 5'-flankierende Region (5,7 kb) mit den Oligonukleotiden EU250 und EU251 amplifiziert und unter Zuhilfenahme der Restriktionsenzyme MluI und NotI in den oben bereits beschriebenen Vektor kloniert. Die Amplifikation von 6-myc erfolgte mit den Oligonukleotiden EU76 und EU252. Als Matrize wurde der Vektor pCS2-6myc (Rupp *et al.*, 1994, Turner und Weintraub, 1994) verwendet. Das resultierende Produkt wurde

anschließend mit NotI und AgeI hydrolysiert und in den Vektor gesetzt, der bereits die kodierende Region und die entsprechenden flankierenden Bereiche von Pds5 enthielten. Die Korrektheit der entsprechenden Produkte wurde durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden EU255, EU265, EU131, EU132, EU133 und EU134 überprüft. Anschließend wurde das gesamte *Pds5-myc* Konstrukt, inklusive der flankierenden Regionen mit Ascl ausgeschnitten und in den Vektor pattB-FA kloniert. Dieses Konstrukt wurde anschließend in Embryonen injiziert, die eine *attB-site* an Position 86Fa tragen.

4.3.5 Klonierung der modifizierten SOLO-Versionen

Die Klonierung aller pUASp-EGFP-SOLO-Konstrukte erfolgte nach demselben Prinzip. Als erstes wurde die kodierende Sequenz von SOLO amplifiziert (EU52/EU53). Hierzu wurde als Matrizen-DNA der cDNA-Klon von SOLO (Tab. 6) verwendet. Sollten Mutationen in SOLO eingefügt werden, geschah dies durch PCRs von Teilfragmenten. Die dafür benötigten Oligonukleotide wiesen die gewünschten Nukleotidaustausche (Tab. 11) auf. Diese Teilfragmente wurden dann wiederum als Matrize für die Amplifikation des gesamten SOLO-Fragments verwendet. Dieses wurde mit FseI und Ascl hydrolysiert und in den Vektor pUASp-FA kloniert. Im zweiten Schritt wurde EGFP eingefügt, welches mit den Oligonukleotiden EU170/EU171 bzw. EU74/EU171 amplifiziert und unter Zuhilfenahme der Restriktionsenzyme FseI bzw. NotI/FseI in den Vektor pUASp-SOLO kloniert wurde. Anschließend wurde ein Injektionsmix nach Herzig, 1999 hergestellt und diesen in *w**-Embryonen injiziert.

Tabelle 11: Oligonukleotide für die Klonierung der SOLO-Konstrukte

Name	Sequenz (5'-3')	Besonderheit
EU52	ataaGGCCGGCCtatgtctgacgactgggatgatga	mit FseI-Erkennungsstelle
EU53	ataGGCGCGCCttagagcagcccgaaaaatc	mit Ascl-Erkennungsstelle
EU172	ataaGGCCGGCCtgctaaggaactgccgccgatc	SOLO ^{ΔRGG} : mit FseI-Erkenn.
EU99	agaggcagcactaagcgagcaac	SOLO ^{1POLO} : Mutation 607/608
EU100	gttgctcgcttagtgctgcctct	SOLO ^{1POLO} : Mutation 607/608
EU93	agtccgcttctcccctgcgacgt	SOLO ^{5Sep} : Mutation EXXR
EU94	gctcgcaggggagaagcggact	SOLO ^{5Sep} : Mutation EXXR
EU84	acctcctgattcaccgcccctagtagc	SOLO ^{5Sep} : Mutation EXXR
EU85	ggtactagggcggtgaatcaggag	SOLO ^{5Sep} : Mutation EXXR
EU202	gccttatggaggccatgggcgcatcgattcgtg	SOLO ^{5Sep} : Mutation DXXR
EU203	cacgaatcaatgcgcccatggcctccataaggc	SOLO ^{5Sep} : Mutation DXXR
EU204	gctgatgcggctgaaaccgccttagtcggacat	SOLO ^{5Sep} : Mutation DXXR
EU205	gatgtccgactaaggcggtttcagccgcatcagc	SOLO ^{5Sep} : Mutation DXXR
EU206	acattcagaaggctaagatggcagtagttcatg	SOLO ^{5Sep} : Mutation DXXR
EU207	catgaactactgccatccttagccttctgaaatgt	SOLO ^{5Sep} : Mutation DXXR
EU214	gctgtagccgaggcagcagccgccctttgtgtttggcga	SOLO ^{ΔArg} : Mutation des Arg-reichen Bereichs
EU215	gctgcctcggtacagccgcagcagctaataatgctatcgcttcagctgcca	SOLO ^{ΔArg} : Mutation des Arg-reichen Bereichs
EU216	gtgcttcgagcgccccaaatg	SOLO ^{PBS-A} : Mutation 1. PBS
EU217	catttggggcgctcgaagcac	SOLO ^{PBS-A} : Mutation 1. PBS

Fortsetzung Tab.11

EU218	cgctgcatcggcaccggttg	SOLO ^{PBS-A} : Mutation 2. PBS
EU219	ccaacgggtgccgatgcagcg	SOLO ^{PBS-A} : Mutation 2. PBS
EU220	ctccagcatcagcacctttac	SOLO ^{PBS-A} : Mutation 3. PBS
EU221	gtaaaggtgctgatgctggag	SOLO ^{PBS-A} : Mutation 3. PBS
EU224	ataagctcagcagtatggtaaac	SOLO ^{5POLO} : mit BlnI-Erkenn.
EU225	ttatctgcagattgcatacaagc	SOLO ^{5POLO} : mit PstI-Erkenn.
EU289	ccgccggaagaggaagaactaagcgag	SOLO ^{PBS-E} : Mutation 607/608
EU290	ctcgcttagttcttcttcccgcg	SOLO ^{PBS-E} : Mutation 607/608
EU170	ataaGGCCGGCCatggtgagcaagggcgaggag	mit FseI-Erkennungsstelle
EU171	ataaGGCCGGCCcttgatagctcgtccatgccg	mit FseI-Erkennungsstelle
EU74	ataaGCGGCCGCaatggtgagcaagggcgag	mit NotI-Erkennungsstelle

Die großgeschriebenen Buchstaben stellen Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme dar.

Für die Generierung von *pUASp-EGFP-SOLO^{5POLO}* wurde eine andere Strategie verwendet. Hierfür wurde zunächst ein DNA-Bereich von SOLO (974 bp) von Invitrogen synthetisiert, welcher die entsprechenden Mutationen aufweist. Dieses Konstrukt besaß an den jeweiligen Enden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme BlnI und PstI mit deren Hilfe das mutierte SOLO-Fragment gegen die mutierte Sequenz im Vektor pCS2-SOLO ausgetauscht wurde. Anschließend wurde das gesamte SOLO-Fragment unter Zuhilfenahme der Restriktionsenzyme FseI und Ascl in den Vektor pUASp-EGFP umgesetzt.

4.4 Proteinanalytische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse der Expressionslevel wurden Proteinextrakte aus Ovarien auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Hierfür wurden 8-17%ige SDS-Polyacrylamid-Gradientengele verwendet. Die Elektrophorese fand bei 140 bis 170 V in 1x Laufpuffer (2,5 mM Tris; 19,1 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS) statt. Als Molekulargewichtsstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) von Thermo Scientific.

4.4.2 Western Blot und immunologischer Nachweis (Immunblot)

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Hybond-ECL-Nitrozellulose Membran (GE Healthcare) erfolgte durch Elektroblotting. Das Blotting wurde 1 h lang bei 100 V in Transferpuffer (25 mM Tris; 200 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol) durchgeführt. Nach Färbung der Proteine mit Ponceau S wurden die Proteinbindungsstellen der Membran durch einstündiges Schwenken in Milchpuffer (5% (w/v) Magermilchpulver (Sucofin) in PBS-Tw) bei Raumtemperatur blockiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Hierzu wurden Antikörperlösungen in Milchpuffer mit 0,02% (w/v) Natriumazid versetzt und über Nacht bei 4°C oder 1,5 h lang bei RT mit der Nitrozellulose-Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal kurz und dreimal 15 min unter Schütteln mit Milchpuffer gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte eine zweistündige Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper. Dieser wurde dann durch dreimaliges Spülen mit Milchpuffer und zweimaligem 30-minütigem Waschen entfernt. Zuletzt wurden die Membranen dreimal kurz und zweimal 15 min mit PBS-Tw gespült. Eine Auflistung der verwendeten Antikörperlösungen sowie die entsprechenden Verdünnungsstufen finden sich in Tabelle 12.

Der Nachweis der Proteine erfolgte durch das ECL-Detektionssystem (ECL Western-Blotting Detection Reagents, GE Healthcare) oder mit Hilfe der *Two Bottle Substrate* von p.j.k. Hierzu wurden die entsprechenden Komponenten nach Angabe des Herstellers gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einminütiger Inkubation wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Detektion des Signals mit dem Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm) mit der dazugehörigen Software Image Reader LAS-4000 v2.0 durchgeführt. Zur weiteren Bearbeitung wurde Multi Gauge (Fujifilm) und Adobe Photoshop CS4 verwendet.

Tabelle 12: Primäre Antikörper und sekundäre Antikörper für immunologische Nachweise. Die Verdünnung erfolgte für primäre Antikörper in Milchpuffer mit 0,02% (w/v) Azid und für sekundäre Antikörper in Milchpuffer ohne Azid.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Referenz/Quelle
anti-EGFP(IS28) (rb)	1:3000	Herzog <i>et al.</i> , 2013
anti- α -Tubulin (m)	1:20000	Sigma Aldrich
anti-Rad21 (gp)	1:10000	Heidmann <i>et al.</i> , 2004
anti myc (9E10) (m)	1:100	Evan <i>et al.</i> , 1985
anti-HA (12CA5) (m)	1:200	Niman <i>et al.</i> , 1983
anti-Flag (rb)	1:2000	Sigma Aldrich
anti-Hexokinase (rb)	1:15000	B. Westermann, Pers. Mitteilung
Sekundäre Antikörper		
POD-Ziege-anti-Maus	1:3000	Jackson Immunoresearch
POD-Ziege-anti-Kaninchen	1:3000	Jackson Immunoresearch
POD-Ziege-anti-Meerschweinchen	1:1000	Jackson Immunoresearch

Die Spezies der entsprechenden primären Antikörper sind wie folgt abgekürzt: rb: Kaninchen, gp: Meerschweinchen, m: Maus, r: Ratte

4.4.3 *In vitro* Transkription und Translation (IVT) und Autoradiographie

Für die *in vitro* Synthese von Proteinen wurde das „TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Grundlage dieser Systeme ist ein Lysat aus Kaninchen-Retikulozyten, dem SP6 RNA-Polymerase für die Synthese der mRNA zugesetzt wurde. Ein Vorteil dieses Systems ist, dass die Transkription und die Translation direkt miteinander gekoppelt werden können. Zur radioaktiven Markierung von Proteinen wurde dem Reaktionsmix 1 mM [³⁵S]-markiertes Methionin (Hartmann Analytics; 1,000 Ci/mmol) zugesetzt. Sollten die synthetisierten Proteine in einer anschließenden Koimmunpräzipitation (siehe 4.4.4) eingesetzt werden, erfolgte eine Kotranskription bzw. Kotranslation der Proteine durch Zugabe zweier Plasmidmatrizen. Hierzu wurden jeweils 500 ng von jedem Plasmid in einen 25 μ l Ansatz gegeben.

Die Analyse der *in vitro* synthetisierten Proteine bzw. der durchgeführten Koimmunpräzipitationen erfolgte durch eine gelelektrophoretische Trennung und eine anschließende autoradiographische Auswertung. Hierzu wurden Phosphoimager-Schirme (Fuji Corp.) über Nacht auf die fixierten (30 min in 40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) und getrockneten Gele gelegt und mit Hilfe des FLA 7.000 Phosphoimager (Fuji Corp.) die radioaktiven Proteinbanden nachgewiesen. Die Weiterbearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop CS4.

4.4.4 Kinaseassay und *in vitro* Separase-Spaltungsassay

Für den *in vitro* Nachweis einer möglichen Separase-abhängigen Spaltung von SOLO wurde dieses zunächst in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin synthetisiert (siehe 4.4.3) und anschließend mit humaner Plk1 (zur Verfügung gestellt von O. Stemmann) und zusätzlichem ATP inkubiert. Hierzu wurde folgender Ansatz gewählt: 3,2 µl des IVT-Ansatzes, 0,4 µl MgCl₂ (100 mM), 0,4 µl ATP (100 mM) und 1,2 µl humane Plk1. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30°C wurde der Ansatz aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit 4 µl humaner Separase (zur Verfügung gestellt von O. Stemmann) versetzt und zur anderen Hälfte wurden entsprechende Mengen an Puffer hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30°C wurde die Spaltungsreaktion durch Zugabe von Gelauftragungspuffer abgestoppt und die Proben anschließend durch ein fünfminütiges Aufkochen bei 95°C denaturiert. Die Auswertung möglicher Spaltprodukte erfolgte durch eine gelelektrophoretische Auftrennung und anschließender Autoradiographie (siehe 4.4.2 und 4.4.3)

4.4.5 Koimmunpräzipitationen

Zum Nachweis möglicher Proteininteraktionen wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurden entweder *in vitro* synthetisierte Proteine herangezogen oder Proteinextrakte aus Embryonen bzw. Ovarien verwendet. Bei den letztgenannten Experimenten wurden jeweils 100 µl Embryonen bzw. 250 Ovarien in 400 µl Lysepuffer (50 mM HEPES, 60 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,2% (w/v) Triton-X-100, 0,2% (w/v) Nonidet NP40, 10% (v/v) Glycerin pH 7,5 und den Proteaseinhibitoren Pefablock (2 mM), Benzamidin (2 mM), Aprotinin (10 µg/ml), Leupeptin (10 µg/ml), Pepstatin A (2 µg/ml)) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 16,000x g), um die löslichen Bestandteile zu erhalten. Hiervon wurden 10 µl als Input-Probe entnommen und mit 90 µl Gelauftragungspuffer gemischt. Der restliche Ansatz wurde dann mit einer Antikörpergekoppelten Affinitätsmatrix 4 h lang bei 4°C unter Rotation inkubiert. Im Rahmen der Arbeit wurden Flag-, myc- bzw. HA-gekoppelte Affinitätsmatrizen verwendet. Diese stammten von Sigma Aldrich bzw. von Roche. Für jeden Ansatz wurden etwa 20 µl der entsprechenden Matrix zugegeben, die zuvor dreimal mit jeweils 1 ml Lysepuffer äquilibriert wurde. Nach der Inkubation wurde der Überstand durch Zentrifugation abgetrennt und auch davon wurde eine Probe (10 µl) entnommen und mit 90 µl Gelauftragungspuffer versetzt (Probe: S; Überstand). Wurden als Ausgangsmaterial für eine Koimmunpräzipitation *in vitro* synthetisierte Proteine verwendet, wurde von dem insgesamt 25 µl umfassenden Ansatz für die Input- bzw. Überstandprobe jeweils 3 µl entnommen und mit 27 µl Gelauftragungspuffer versetzt. Um unspezifische Interaktionen an die Affinitätsmatrix zu unterbinden, wurde diese 5x mit jeweils 1 ml Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Affinitätsmatrix in Mobicol-Säulen (Mobictec) überführt und durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, VWR, Galax mini, 20 sek) vom Lysepuffer getrennt. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 36 µl Gelauftragungspuffer ohne β-Mercaptoethanol und einer 5-minütigen Inkubation bei 95°C. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt wurde das Eluat dann von der Affinitätsmatrix getrennt und nach Zugabe von 4 µl β-Mercaptoethanol (14,4 M) erneut 10 min lang aufgekocht. Von den Proben wurden jeweils 10 µl gelelektrophoretisch analysiert.

4.4.6 Massenspektrometrische Analysen

Zur Analyse der Interaktionspartner von EGFP-SOLO wurde eine EGFP-spezifische Immunpräzipitation aus Ovarien (siehe 4.4.5) durchgeführt und die kopräzipitierten Proteine mittels Massenspektrometrie ausgewertet. Als Kontrolle erfolgte eine Immunpräzipitation von CapH2-EGFP, um unspezifische Interaktionspartner nachzuweisen und diese dann in den SOLO-Proben nicht zu berücksichtigen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Eluate erfolgte mit kommerziellen Gradientengelen (6-16% Precise ProteinGel (Thermo Scientific)) auf Tris-HEPES-Basis (Thermo Scientific). Nach der Färbung der SDS-Gele mit *GelCode Blue Stain Reagent* (Thermo Scientific) wurden die einzelnen Laufspuren mit einem sterilen Skalpell in je drei Stücke geschnitten und zur massenspektrometrischen Untersuchung an das Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg geschickt (Arbeitsgruppe: Johannes Lechner). Als signifikante Koimmunpräzipitation wurden diejenigen Proteine/Peptide angesehen, die einen *score* aufwiesen, der höher als 75 war. Alle so erhaltenen Informationen wurden anschließend mit FlyBase (Flybase, 2003) abgeglichen. Eine Liste mit den nachgewiesenen Interaktionspartnern von EGFP-SOLO findet sich im Anhang Tab.1.

4.4.7 Expression und Reinigung von His₆-SMC1₁₋₁₃₃

Für die heterologe Expression erfolgte eine Transformation des Plasmids pQE80-His-SMC1₁₋₁₃₃ (zur Verfügung gestellt von B. Jaunich) in *E. coli* Rosetta-Zellen (Tab.7). Von diesen wurde eine 5 ml Vorkultur (LB/Amp) angesetzt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Ausgehend davon wurde am nächsten Tag eine 200 ml-umfassende Expressionskultur beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Messung der Zelldichte erfolgte am Photometer OD600 DiluPhotometer von IMPLLEN. Zur Induktion der Expression wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Expression über einen Zeitraum von 4 Stunden bei 37°C durchgeführt. Nach Sedimentation der Bakterien durch Zentrifugation (Heraeus; 6,000x g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet in 40 ml steril filtriertem Puffer A (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; pH 8,0) resuspendiert. Durch Druckluft mit dem Zellcrusher (Emulsi Flex-C5 von Avestin) wurde das Bakterienpellet aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte über einen Zeitraum von 20 min. Mit Hilfe von Löslichkeitstests konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Fusionskonstrukt fast ausschließlich als unlösliches Protein in den *inclusion bodies* der Bakterien vorlag (Daten nicht gezeigt), sodass eine denaturierende Ni-NTA-Affinitätschromatographie angeschlossen wurde.

Das SMC1₁₋₁₃₃-enthaltene Proteinpellet wurden in 8 ml Puffer B resuspendiert (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-Cl; 8 M Harnstoff; pH 8,0) und mit 2 ml äquilibrierter Ni-NTA-Agarose (Macherey Nagel) versetzt und über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Proteinlösung in eine Poly-Prep Chromatography Säule von BioRad gegeben und der Durchlauf separat aufgefangen. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 7 ml Puffer C (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-Cl; 8 M Harnstoff; pH 6,3) gewaschen und das His₆-markierte Protein in 1 ml-Fractionen durch die Zugabe von 5 ml Puffer E (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-Cl; 8 M Harnstoff; pH 4,5) eluiert.

4.4.8 Affinitätsreinigung von SMC1₁₋₁₃₃-Antikörpern

Die Expression einer His₆-SUMO-markierten Version von SMC1₁₋₁₃₃ wurde von K. Seel im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (Seel, 2010) durchführt. Dieses Fusionskonstrukt wurde anschließend unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und als Antigen für die

Generierung polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet. Zur Affinitätsreinigung der entsprechenden Immunsereen erfolgten die Expression von His-SMC1₁₋₁₃₃ (ohne SUMO) und eine anschließende Ni-NTA-Affinitätschromatographie analog dem unter 4.4.7 beschriebenen Protokoll. Die entsprechenden Elutionsfraktionen mit der höchsten Proteinmenge wurden gegen denaturierenden Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; 6 M Harnstoff; pH 8,3-8,5) dialysiert und an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Hierzu wurden 0,5 g CNBr-aktivierte Sepharose (Sigma Aldrich) in 1 mM HCl 30 min lang auf Eis gequollen und anschließend in 5 ml H₂O wieder aufgenommen und in eine Chromatographiesäule überführt. Nach Äquilibrierung mit Kopplungspuffer wurden die dialysierten Proteinpools zugeben und über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Proteinlösung wurde anschließend auslaufen gelassen und die Säule mit Kopplungspuffer gewaschen. Zum Blockieren der aktiven Gruppen wurde das Säulenmaterial mit 5 ml 0,3 M Glycin (pH 8,0) 2 h lang bei 4°C unter Rotation inkubiert und anschließend erneut mit Kopplungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgten fünf Wiederholungen von Waschschrritten mit jeweils 5 ml Kopplungspuffer bzw. 5 ml Acetatpuffer (0,1 M Na-Acetat; 0,5 M NaCl; pH 4,0). Nach Zugabe von 5x 5 ml PBS/0,1% Na-Azid wurden 5 ml der anti-SMC1 Immunsereen IS27 bzw. IS29 auf die Säule aufgetragen und 1 h lang bei 4°C unter Rotation inkubiert. Der Durchlauf wurde separat aufgefangen und das Säulenmaterial mit PBS und BBS-Tween (0,1 M Borsäure, 0,025 M Na-Tetraborat, 1 M NaCl, 0,1% (w/v) Tween, pH 8,3) gewaschen. Für die Elution wurden entsprechende Reaktionsgefäße mit 250 µl 1 M K₂HPO₄ vorbereitet und durch Zugabe von zunächst 1 ml Elutionspuffer (2 M Glycin; 10 % 1,4-Dioxan, pH 2,2) und anschließendem PBS wurde der Antikörper eluiert. Alle so aufgefangenen 15 Elutionsfraktionen wurden mit je 100 µl NGS versetzt und in initialen Immunblotanalysen charakterisiert. Die geeigneten Fraktionen wurden anschließend gegen PBS dialysiert und mit 0,1 % (w/v) Na-Azid versetzt.

Für den polyklonalen SMC1₁₋₁₃₃-Antikörper zeigte sich, dass der affinitätsgereinigte Antikörper aus dem Immunsereum 27 für den Immunblot besser geeignet ist, da er eine höhere Sensitivität aufweist. Nichtsdestotrotz erkennt dieser Antikörper noch zwei weitere Proteine, die jedoch ein deutlich geringeres Molekulargewicht aufweisen als SMC1. Eine 1:2000-Verdünnung erwies sich dabei als besonders geeignet. Für die Immunfluoreszenzanalysen eignen sich die Antikörper aus dem Immunsereum 29 besser. Hier ist die beste Verdünnungsstufe 1:200.

4.5 Methoden im Umgang mit *Saccharomyces cerevisiae*

4.5.1 Herstellung transformationskompetenter Hefen

Die Herstellung transformationskompetenter Hefen wurde wie bereits bei Knop *et al.*, 1999 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden 500 ml YPD-Medium (1 % Bacto Hefeextrakt (Difco) (w/v), 2 % Bacto Pepton (Difco) (w/v), 2 % Glukose (w/v)) mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 unter Schütteln inkubiert. Nach dem Pelletieren (1,000x g, 5 min, Heraeus) von Aliquots zu je 50 ml wurden die Zellen anschließend mit sterilem Wasser und mit SORB-Puffer (100 mM LiOAc, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0, 1 M Sorbitol) gewaschen. Danach wurde das Pellet mit 40 µl einzelsträngiger Lachsspermien-DNA (2 mg/ml, Invitrogen; Denaturierung: 5 min. bei 95°C) und 360 µl SORB-Puffer versetzt und die Hefezellen resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.5.2 Transformation von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae*

Für die Transformation wurden 105 µl PEG-Puffer (100 mM Lithium Acetat, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA/NaOH pH 8,0, 40 % (w/v) Polyethylen Glycol PEG-3350), 15 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNA (2 mg/ml), 20 µl kompetente Hefen (siehe 4.5.1) und jeweils 500 ng der beiden Plasmide zugegeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Nach 25-minütiger Hitzchockbehandlung bei 42°C wurden die Hefezellen pelletiert (1 min, 1000 g) und in 100 µl sterilen Wasser resuspendiert und auf SC-Leu-Trp-Platten (0,67 % (w/v) *Yeast nitrogen base*, 2 % (w/v) Glucose, 2% Agar, 0,5% Ammoniumsulfat, 0,083 % (w/v) Aminosäure-Mix, pH 5,6) ausplattiert.

4.5.3 Hefe-2-Hybrid System

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde das Hefe-2-Hybrid-System verwendet. Grundlage hierfür ist, dass zwei Vektoren (pACT2 und pAS2-1, Clontech) kotransformiert werden, die jeweils Gensequenzen für Proteine enthalten, deren Wechselwirkung untersucht werden sollen. Die entsprechenden Proteine werden als Fusionskonstrukt exprimiert, die entweder mit der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 fusioniert sind oder mit der Aktivierungsdomäne von Gal4 verknüpft sind. Interagieren die zu untersuchenden Proteine, führt dies dazu, dass die Gal4-Fragmente in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und so an die Promotorregion von Reportergenen binden können und deren Expression aktivieren. Als Reportergen wird hier das *HIS3*-Gen herangezogen, sodass anschließend untersucht werden kann, ob die Hefen in der Lage sind Histidin zu synthetisieren und auf den entsprechenden Minimalmedien (-His) zu wachsen.

Nach der Transformation der beiden Vektoren pACT2 und pAS2-1, welche die entsprechenden Genregionen der zu untersuchenden Proteine kodieren, wurden die SC-Leu-Trp-Platten mindestens 3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden mehrere Kolonien von der Platte abgenommen und in sterilem Wasser resuspendiert und eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Ausgehend davon wurden dann Verdünnungsstufen von 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 und 1:3125 hergestellt und jeweils 5 µl der entsprechenden Verdünnung auf SC-Leu-Trp-Platten bzw. auf SC-Leu-Trp-His-Platten aufgebracht und mindestens 3 Tage bei 30°C inkubiert. Für die durchgeführten 2-Hybridanalysen wurden zwei verschiedene Hefestämme verwendet. Der Hefestamm PJ69-7A (modifizierte Version von PJ69-4A: *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::Gal7-lacZ* (James *et al.*, 1996)) wurde für die meisten 2-Hybridanalysen herangezogen. Der Stamm AH109 (*MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*, Clontech) wurde nur für die in Abbildung 27A gezeigten Interaktionsstudien herangezogen.

4.5.4 Plasmide für Hefe 2-Hybrid-Analysen

Für die durchgeführten 2-Hybrid-Analysen wurden die Vektoren pACT2 und pAS2-1 (Clontech) verwendet. Deren MCS so modifiziert sind, dass sie die entsprechenden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme FseI und AseI tragen (Orth *et al.*, 2011). Die kodierenden Bereiche der zu untersuchenden Interaktionspartner wurden dann unter Zuhilfenahme dieser beiden Enzyme in die Vektoren pAS2-1 und pACT2 kloniert. Dabei wurden die benötigten Gensequenzen entweder aus Ovarien-cDNA amplifiziert oder mit Hilfe kommerzieller cDNA-Klone (siehe Tab. 6) generiert. Die hierfür benötigten Oligonukleotide wurden so generiert, dass sie die Erkennungssequenz der Enzyme FseI bzw. AseI tragen und zwischen dem Startkodon und der entsprechenden Schnittstelle ein weiteres Nukleotid

vorhanden war, da nur so die N-terminale Fusion mit der Bindedomäne/Aktivierungsdomäne gewährleistet ist.

Tabelle 13: Oligonukleotide für die Klonierung von SMC1_{head} und SMC3hdCC

Name	Sequenz von 5'-3'	Besonderheiten
EU28	ataGGCGCGCCtcgtgtcctcgaacgttgtca	SMC1 _{head} , <i>reverse</i> , C-Term. Mit Ascl-Erkennungsseq.
EU30	ataaGGCCGGCCtatgaccgaagaggacgacga tgt	SMC1 _{head} , <i>forward</i> , N-Term. Mit Fsel-Erkennungsseq.
EU142	ataaGGCGCGCCaccaccaccgcccttcttctt ttggta	SMC1 _{head} , <i>reverse</i> , N-Term. Mit Ascl-Erkennungsseq.
EU143	ataaGGCGCGCCtcgattcgttgctgtttgc	SMC1 _{head} , <i>forward</i> , C-Term. Mit Ascl-Erkennungsseq.
EU48	ataaGGCCGGCCtatgcacatcaagcagattat tat	SMC3hdCC, <i>forward</i> , Mit Fsel-Erkennungsseq.
EU49	ataGGCGCGCCctaggcgtgggtgctgtcgtc	SMC3hdCC, <i>reverse</i> Mit Ascl-Erkennungsseq.
SH322	gtaGGATCCatttgtcgcgatcct	SMC3hdCC, <i>forward</i> , Mit BamHI-Erkennungsseq.
SH323	gtaGGATCCcaggcggaaatctgttccggcgtc gc	SMC3hdCC, <i>reverse</i> , Mit BamHI-Erkennungsseq.
EU179	ctcGGAATTCatgtctgacgactgggatgatga	SOLO, <i>forward</i> , Mit EcoRI-Erkennungsseq.
EU180	gccGGATCCcttagagcagcccgaaaaatc	SOLO, <i>reverse</i> Mit BamHI-Erkennungsseq.
EU181	ataaGCGGCCGCaatgttctatgagcacattat tt	Rad21, <i>forward</i> , Mit NotI-Erkennungsseq.
EU182	ataaGCGGCCGCTaaatttttgggttttcgaac g	Rad21, <i>reverse</i> , Mit NotI-Erkennungsseq
EU74	ataaGCGGCCGCaatggtgagcaagggcgag	EGFP, <i>forward</i> , Mit NotI-Erkennungsseq.
EU75	ataaGCGGCCGCTtacttgtacagctcgtccat g	EGFP, <i>reverse</i> , Mit NotI-Erkennungsseq.
EU196	aattcccggtattggccttggccatgggccggc cag	hybridisiert mit EU197, bildet EcoRI-Überhänge
EU197	aattctggccggcccatggccaaagccaatacc ggg	hybridisiert mit EU196, bildet EcoRI-Überhänge

Die großgeschriebenen Buchstaben stellen Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme dar.

Für die Klonierung von SMC1_{head} und SMC3hdCC wurden die in Tab. 13 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet, die neben der Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme und dem entsprechendem Genbereich auch noch die kodierende Sequenz für eine Linkerregion enthalten. Für die in Abbildung 27A oben gezeigte Interaktion wurde der Vektor pBridge (Clontech) verwendet, der die Expression von zwei Genen ermöglicht. Die kodierende Sequenz von SOLO wurde zunächst mittels PCR amplifiziert (EU179/EU180, Tab.13) und anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI in den Vektor pBridge kloniert. Zwischen der Sequenz, die für die Gal4-Bindedomäne kodiert und der SOLO-Sequenz wurde eine Linkerregion eingefügt, um die Interaktion von SOLO und SMC1 zu ermöglichen. Die hierfür benötigten Oligonukleotide EU196/EU197 sind in Tab. 13 aufgelistet. Diese komplementären Oligonukleotide wurden zuvor durch ein kurzes Erhitzen und eine anschließende Abkühlung in 2x Duplex-Puffer (200 mM Kaliumacetat, 60 mM

HEPES, pH7,5) miteinander hybridisiert. Dabei entstanden kompatible Enden, mit deren Hilfe in den EcoRI-hydrolysierten pBridge-SOLO kloniert wurde. In die zweite Multiple-Klonierungsstelle wurde unter Zuhilfenahme von NotI die kodierende Sequenz von *Rad21* bzw. von *EGFP* gesetzt. Die hierfür benötigten Oligonukleotide finden sich in Tab.8

4.5.5 Proteinextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zum Nachweis der Methionin-abhängigen Proteinsynthese wurde aus den entsprechenden Hefen die Gesamtproteinmenge mit Hilfe einer TCA-Fällung isoliert. Hierzu wurde 1 ml Hefekultur mit einer OD_{600} von 1 pelletiert, dann 150 μ l 1,85 M NaOH/7,5% β -Mercaptoethanol zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 μ l 55% TCA wurde erneut 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min lang bei 4°C zentrifugiert (16,000x g) und das so generierte Pellet in 100 μ l HU-Puffer (8 M Harnstoff, 5% SDS, 1 mM EDTA, 100 mM DTT und 0,01% Bromphenolblau) aufgenommen und bei 95°C aufgeköcht.

5. Abkürzungsverzeichnis

AD	Gal4-Aktivierungsdomäne
APC/C	<i>Anaphase-promoting Complex/Cyclosome</i>
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BD	Gal4-DNA-Bindedomäne
BSA	Rinderserumalbumin
C(2)M	<i>Crossover suppressor on 2 of Manheim</i>
C(3)G	<i>Crossover suppressor on 3 of Gowen</i>
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CID	<i>Centromere identifier</i> , CENP-A-Homolog in <i>Drosophila</i>
CK1	Casein Kinase 1 δ/ϵ
CPC	<i>Chromosomal passenger</i> -Komplex
CyO	Curly of Oster, zweitchromosomales Balancierchromosom mit der Markermutation Curly
DDK	Dbf4-abhängige Cdc7-Kinase
DeGradFP	<i>Degrade Green Fluorescent Protein</i>
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(E)GFP	<i>(Enhanced) green fluorescent protein</i>
FBS	Fötale Kälberserum
FH	Flag-Hämagglutinin
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
gp	Meerschweinchen
HEAT	<i>Helical repeat protein domain (Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A, TOR lipid kinase)</i>
IP	Immunpräzipitation
IVT	<i>In vitro</i> Transkription und Translation
kB/kDa	Kilobasenpaar/Kilodalton
KD	Kinasedomäne
LB	<i>Lysogeny broth</i>
m	Maus
mat-Gal4	maternaler α Tubulin-Promotor

MCS	Multiple Klonierungsstelle
MNM	<i>Modifier of Mdg4 in Meiosis</i>
mRFP	monomeres rotfluoreszierendes Protein
MTD	<i>Maternal triple driver</i> (Maternaler Dreifachtreiber)
NC	<i>Non-cleavable</i> (Nicht spaltbar)
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
nos	nanos
ORD	<i>Orientation disruptor</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBD	POLO-Box-Domäne
PBS	POLO-Bindestellen
PEG	Polyethylenglykol
Plk1	<i>Polo-like kinase 1</i>
PP2A	Proteinphosphatase 2A
r	Ratte
r2a, r2b, r3	Region 2a, 2b oder 3 des Germariums
Rad21L	<i>Rad21-like</i>
rb	Kaninchen
RFC	Replikations-Faktor C Komplex
RISC	<i>RNA-induced silencing</i> Komplex
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SA	Stromalin Antigen
SAC	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
SC	Synaptonemaler Komplex
SC-Medium	<i>Synthetic Complete-Medium</i>
SCF	Skp, Cullin, F-box
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sgo	<i>Shugoshin</i>
shRNA	<i>short hairpin</i> Ribonukleinsäure
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i>
SIM	<i>Structured Illumination Microscope</i>
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
SNM	<i>Stromalin in meiosis</i>
SOLO	<i>Sisters on the loose</i>
SSE	<i>Drosophila</i> Separase-Homolog

SUNN	<i>Sisters unbound</i>
TCA	Tri-Chlor-Essigsäure
Tef	Teflon
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
THR	<i>Three rows</i>
TM3, Ser/Sb	Drittchromosomale Markermutation <i>Serrate/Stubble</i> auf dem Balancierchromosom <i>TM3</i>
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
Wapl	<i>Wings apart-like</i>
wt	Wildtyp
w/v	<i>Weight per volume</i>
YFP	Gelbfluoreszierendes Protein
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Glucose</i>

6. Literaturverzeichnis

- Adelfalk, C., Janschek, J., Revenkova, E., Blei, C., Liebe, B., Gob, E., Alsheimer, M., Benavente, R., De Boer, E., Novak, I., Hoog, C., Scherthan, H. & Jessberger, R. 2009. Cohesin SMC1beta protects telomeres in meiocytes. *J Cell Biol*, 187, 185-99.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2014. *Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing; Auflage: 6th Revised edition. Revised.*
- Alex, D. & Lee, K. A. 2005. RGG-boxes of the EWS oncoprotein repress a range of transcriptional activation domains. *Nucleic Acids Res*, 33, 1323-31.
- Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupard, M. A. & Nasmyth, K. 2001. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell*, 105, 459-72.
- Anderson, L. K., Royer, S. M., Page, S. L., McKim, K. S., Lai, A., Lilly, M. A. & Hawley, R. S. 2005. Juxtaposition of C(2)M and the transverse filament protein C(3)G within the central region of Drosophila synaptonemal complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4482-7.
- Arumugam, P., Gruber, S., Tanaka, K., Haering, C. H., Mechtler, K. & Nasmyth, K. 2003. ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol*, 13, 1941-53.
- Arumugam, P., Nishino, T., Haering, C. H., Gruber, S. & Nasmyth, K. 2006. Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminal Winged-Helix domain of its kleisin subunit. *Curr Biol*, 16, 1998-2008.
- Baker, B. S. & Carpenter, A. T. 1972. Genetic analysis of sex chromosomal meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 71, 255-86.
- Balicky, E. M., Endres, M. W., Lai, C. & Bickel, S. E. 2002. Meiotic cohesion requires accumulation of ORD on chromosomes before condensation. *Mol Biol Cell*, 13, 3890-900.
- Barbosa, V., Kimm, N. & Lehmann, R. 2007. A maternal screen for genes regulating *Drosophila* oocyte polarity uncovers new steps in meiotic progression. *Genetics*, 176, 1967-77.
- Bernard, P., Maure, J. F. & Javerzat, J. P. 2001. Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nat Cell Biol*, 3, 522-6.
- Bickel, S. E., Orr-Weaver, T. L. & Balicky, E. M. 2002. The sister-chromatid cohesion protein ORD is required for chiasma maintenance in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol*, 12, 925-9.
- Bickel, S. E., Wyman, D. W., Miyazaki, W. Y., Moore, D. P. & Orr-Weaver, T. L. 1996. Identification of ORD, a *Drosophila* protein essential for sister chromatid cohesion. *EMBO J*, 15, 1451-9.
- Bickel, S. E., Wyman, D. W. & Orr-Weaver, T. L. 1997. Mutational analysis of the *Drosophila* sister-chromatid cohesion protein ORD and its role in the maintenance of centromeric cohesion. *Genetics*, 146, 1319-31.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. & Basler, K. 2007. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3312-7.
- Brar, G. A., Kiburz, B. M., Zhang, Y., Kim, J. E., White, F. & Amon, A. 2006. Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. *Nature*, 441, 532-6.
- Bressan, D. A., Baxter, B. K. & Petrini, J. H. 1999. The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19, 7681-7.
- Bridges, C. B. 1916. Non-Disjunction as Proof of the Chromosome Theory of Heredity (Concluded). *Genetics*, 1, 107-63.

- Buheitel, J. & Stemmann, O. 2013. Prophase pathway-dependent removal of cohesin from human chromosomes requires opening of the Smc3-Scc1 gate. *EMBO J*, 32, 666-76.
- Buonomo, S. B., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F. & Nasmyth, K. 2000. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell*, 103, 387-98.
- Bürmann, F., Shin, H. C., Basquin, J., Soh, Y. M., Gimenez-Oya, V., Kim, Y. G., Oh, B. H. & Gruber, S. 2013. An asymmetric SMC-kleisin bridge in prokaryotic condensin. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 371-9.
- Cai, X., Dong, F., Edelmann, R. E. & Makaroff, C. A. 2003. The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *J Cell Sci*, 116, 2999-3007.
- Canudas, S., Houghtaling, B. R., Kim, J. Y., Dynek, J. N., Chang, W. G. & Smith, S. 2007. Protein requirements for sister telomere association in human cells. *EMBO J*, 26, 4867-78.
- Canudas, S. & Smith, S. 2009. Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *J Cell Biol*, 187, 165-73.
- Carpenter, A. T. 1975. Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females. I. Structure, arrangement, and temporal change of the synaptonemal complex in wild-type. *Chromosoma*, 51, 157-82.
- Carpenter, A. T. 1979. Synaptonemal complex and recombination nodules in wild-type *Drosophila melanogaster* females. *Genetics*, 92, 511-41.
- Caussinus, E., Kanca, O. & Affolter, M. 2012. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 117-21.
- Cenci, G., Bonaccorsi, S., Pisano, C., Verni, F. & Gatti, M. 1994. Chromatin and microtubule organization during premeiotic, meiotic and early postmeiotic stages of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *J Cell Sci*, 107 (Pt 12), 3521-34.
- Chan, K. L., Roig, M. B., Hu, B., Beckouet, F., Metson, J. & Nasmyth, K. 2012. Cohesin's DNA exit gate is distinct from its entrance gate and is regulated by acetylation. *Cell*, 150, 961-74.
- Chelysheva, L., Diallo, S., Vezon, D., Gendrot, G., Vrielynck, N., Belcram, K., Rocques, N., Marquez-Lema, A., Bhatt, A. M., Horlow, C., Mercier, R., Mezard, C. & Grelon, M. 2005. AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *J Cell Sci*, 118, 4621-32.
- Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A. & Nasmyth, K. 2000. Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell*, 5, 243-54.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M. & Nasmyth, K. 1998. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*, 93, 1067-76.
- Clute, P. & Pines, J. 1999. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol*, 1, 82-7.
- Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W. & Koshland, D. 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev*, 10, 3081-93.
- Collins, K. A., Unruh, J. R., Slaughter, B. D., Yu, Z., Lake, C. M., Nielsen, R. J., Box, K. S., Miller, D. E., Blumenstiel, J. P., Perera, A. G., Malanowski, K. E. & Hawley, R. S. 2014. Corolla is a novel protein that contributes to the architecture of the synaptonemal complex of *Drosophila*. *Genetics*, 198, 219-28.
- Cooper, K. W. 1965. Normal Spermatogenesis in *Drosophila*. *Biology of Drosophila*, Hafner Publishing, New York, 1-61.
- Coudreuse, D. & Nurse, P. 2010. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature*, 468, 1074-9.

- Darwin, C. R. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. *London: John Murray. [1st edition]*.
- Dernburg, A. F., Broman, K. W., Fung, J. C., Marshall, W. F., Philips, J., Agard, D. A. & Sedat, J. W. 1996a. Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*, 85, 745-59.
- Dernburg, A. F., Sedat, J. W. & Hawley, R. S. 1996b. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell*, 86, 135-46.
- Dingwall, C. & Laskey, R. A. 1991. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, 16, 478-81.
- Dorsett, D. & Strom, L. 2012. The ancient and evolving roles of cohesin in gene expression and DNA repair. *Curr Biol*, 22, R240-50.
- Dougherty, W. G. & Parks, T. D. 1991. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*, 183, 449-56.
- Dreier, M. R., Bekier, M. E., 2nd & Taylor, W. R. 2011. Regulation of sororin by Cdk1-mediated phosphorylation. *J Cell Sci*, 124, 2976-87.
- Dürr, J. 2004. Biochemische Charakterisierung der Kinetochorkomponente CID aus *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik*, Universität Bayreuth.
- Eckert, C. A., Gravidahl, D. J. & Megee, P. C. 2007. The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubule-based tension. *Genes Dev*, 21, 278-91.
- Eichinger, S. C., Kurze, A., Oliveira, R.A. & Nasmyth, K. 2013. Disengaging the Smc3/kleisin interface releases cohesin from *Drosophila* chromosomes during interphase and mitosis. *EMBO J*. 32, 656-65.
- Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E. & Heyting, C. 2003. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol*, 160, 657-70.
- Elia, A. E., Cantley, L. C. & Yaffe, M. B. 2003. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science*, 299, 1228-31.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. & Bishop, J. M. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*, 5, 3610-6.
- Fawcett, D. W. 1956. The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol*, 2, 403-6.
- Fernius, J. & Marston, A. L. 2009. Establishment of cohesion at the pericentromere by the Ctf19 kinetochore subcomplex and the replication fork-associated factor, Csm3. *PLoS Genet*, 5, e1000629.
- Fisher, D. L. & Nurse, P. 1996. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J*, 15, 850-60.
- Flemming, W. 1882. Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. *Leipzig Verlag von F.C.W. Vogel*.
- Flybase 2003. The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Research*, 31, 172-175.
- Fuller, M. T. 1993. The Development of *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Gandhi, R., Gillespie, P. J. & Hirano, T. 2006. Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol*, 16, 2406-17.
- Garcia-Cruz, R., Brieno, M. A., Roig, I., Grossmann, M., Velilla, E., Pujol, A., Cabero, L., Pessarrodona, A., Barbero, J. L. & Garcia Caldes, M. 2010. Dynamics of cohesin proteins REC8, STAG3, SMC1 beta and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes. *Hum Reprod*, 25, 2316-27.
- Gartenberg, M. 2009. Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids. *Chromosome Res*, 17, 229-38.

- Gause, M., Webber, H. A., Misulovin, Z., Haller, G., Rollins, R. A., Eissenberg, J. C., Bickel, S. E. & Dorsett, D. 2008. Functional links between *Drosophila* Nipped-B and cohesin in somatic and meiotic cells. *Chromosoma*, 117, 51-66.
- Gillespie, P. J. & Hirano, T. 2004. Scc2 couples replication licensing to sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol*, 14, 1598-603.
- Gligoris, T. G., Scheinost, J. C., Bürmann, F., Petela, N., Chan, K. L., Uluocak, P., Beckouët, F., Gruber, S., Nasmyth, K. & Löwe, J. 2014. Closing the cohesin ring: structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science*, 346, 963-7.
- Gomez, R., Valdeolmillos, A., Parra, M. T., Viera, A., Carreiro, C., Roncal, F., Rufas, J. S., Barbero, J. L. & Suja, J. A. 2007. Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep*, 8, 173-80.
- Gorr, I. H., Boos, D. & Stemmann, O. 2005. Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell*, 19, 135-41.
- Greenspan, R. J. 1997. Fly Pushing. The theory and practice of *Drosophila* genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. & Calos, M. P. 2004. Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics*, 166, 1775-82.
- Gruber, S., Arumugam, P., Katou, Y., Kuglitsch, D., Helmhart, W., Shirahige, K. & Nasmyth, K. 2006. Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell*, 127, 523-37.
- Gruber, S., Haering, C. H. & Nasmyth, K. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell*, 112, 765-77.
- Guacci, V., Koshland, D. & Strunnikov, A. 1997. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell*, 91, 47-57.
- Guacci, V., Stricklin, J., Bloom, M. S., Guo, X., Bhattar, M. & Koshland, D. 2015. A novel mechanism for the establishment of sister chromatid cohesion by the ECO1 acetyltransferase. *Mol Biol Cell*. 26, 117-33.
- Gutierrez-Caballero, C., Herran, Y., Sanchez-Martin, M., Suja, J. A., Barbero, J. L., Llano, E. & Pendas, A. M. 2011. Identification and molecular characterization of the mammalian alpha-kleisin RAD21L. *Cell Cycle*, 10, 1477-87.
- Haering, C. H., Farcas, A. M., Arumugam, P., Metson, J. & Nasmyth, K. 2008. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature*, 454, 297-301.
- Haering, C. H., Löwe, J., Hochwagen, A. & Nasmyth, K. 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell*, 9, 773-88.
- Hamant, O., Golubovskaya, I., Meeley, R., Fiume, E., Timofejeva, L., Schleiffer, A., Nasmyth, K. & Cande, W. Z. 2005. A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Curr Biol*, 15, 948-54.
- Hanna, J. S., Kroll, E. S., Lundblad, V. & Spencer, F. A. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol*, 21, 3144-58.
- Hara, K., Zheng, G., Qu, Q., Liu, H., Ouyang, Z., Chen, Z., Tomchick, D. R. & Yu, H. 2014. Structure of cohesin subcomplex pinpoints direct shugoshin-Wapl antagonism in centromeric cohesion. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 864-70.
- Hartman, T., Stead, K., Koshland, D. & Guacci, V. 2000. Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 151, 613-26.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C. M., Mechtler, K. & Peters, J. M. 2005. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol*, 3, e69.
- Hauf, S., Waizenegger, I. C. & Peters, J. M. 2001. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science*, 293, 1320-3.

- Hawley, R. S., Irick, H., Zitron, A. E., Haddox, D. A., Lohe, A., New, C., Whitley, M. D., Arbel, T., Jang, J., McKim, K. & Et Al. 1992. There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila* females, one of which requires heterochromatic homology. *Dev Genet*, 13, 440-67.
- Hawley, R. S. & Theurkauf, W. E. 1993. Requiem for distributive segregation: achiasmate segregation in *Drosophila* females. *Trends Genet*, 9, 310-7.
- Hazelett, D. J., Bourouis, M., Walldorf, U. & Treisman, J. E. 1998. decapentaplegic and wingless are regulated by eyes absent and eyegone and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development*, 125, 3741-51.
- He, L., Wang, X. & Montell, D. J. 2011. Shining light on *Drosophila* oogenesis: live imaging of egg development, *Curr Opin Genet Dev*, 21, 612-19.
- Heidinger-Pauli, J. M., Mert, O., Davenport, C., Guacci, V. & Koshland, D. 2010. Systematic reduction of cohesin differentially affects chromosome segregation, condensation, and DNA repair. *Curr Biol*, 20, 957-63.
- Heidinger-Pauli, J. M., Unal, E., Guacci, V. & Koshland, D. 2008. The kleisin subunit of cohesin dictates damage-induced cohesion. *Mol Cell*, 31, 47-56.
- Heidmann, D., Horn, S., Heidmann, S., Schleiffer, A., Nasmyth, K. & Lehner, C. F. 2004. The *Drosophila* meiotic kleisin C(2)M functions before the meiotic divisions. *Chromosoma*, 113, 177-87.
- Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J. S. & Van Steensel, B. 2000. Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 716-21.
- Herberg, S. 2012. Charakterisierung der Interaktion der α -Kleisin Proteine Rad21 und C(2)M aus *Drosophila melanogaster*. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik Universität Bayreuth*.
- Herran, Y., Gutierrez-Caballero, C., Sanchez-Martin, M., Hernandez, T., Viera, A., Barbero, J. L., De Alava, E., De Rooij, D. G., Suja, J. A., Llano, E. & Pendas, A. M. 2011. The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J*, 30, 3091-105.
- Herzig, A. 1999. Untersuchungen zur Wechselwirkungen der *Drosophila melanogaster* Proteine Pimples und Three rows. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth*.
- Herzig, A., Lehner, C. F., Heidmann, S. 2002. Proteolytic cleavage of the THR subunit during anaphase limits *Drosophila* separase function. *Genes Dev*. 18, 2443-54.
- Herzog, S., Nagarkar-Jaiswal, S., Urban, E., Riemer, A., Fischer, S., Heidmann, S. K. 2013. Functional dissection of the *Drosophila melanogaster* condensin subunit Cap-G reveals its exclusive association with condensin I. *PLoS Genet*, 9, e1003463.
- Hirano, M. & Hirano, T. 2002. Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *EMBO J*, 21, 5733-44.
- Hirano, M. & Hirano, T. 2006. Opening closed arms: long-distance activation of SMC ATPase by hinge-DNA interactions. *Mol Cell*, 21, 175-86.
- Hirano, T. 2005. Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol*, 15, R265-75.
- Hochman, B. 1976. The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster* Chapter 22, London, Academic Press, London.
- Hong, A., Lee-Kong, S., Iida, T., Sugimura, I., Lilly, M. A. (2003) The p27cip/kip ortholog dacapo maintains the *Drosophila* oocyte in prophase of meiosis I. *Development*, 130, 1235-42.
- Hopfner, K. P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R. A., Usui, T., Owen, B. A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J. L., McMurray, C. T., Carney, J. P., Petrini, J. H. & Tainer, J. A. 2002. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*, 418, 562-6.
- Hopkins, J., Hwang, G., Jacob, J., Sapp, N., Bedigian, R., Oka, K., Overbeek, P., Murray, S. & Jordan, P. W. 2014. Meiosis-specific cohesin component, Stag3 is essential for maintaining centromere chromatid cohesion, and required for DNA repair and synapsis between homologous chromosomes. *PLoS Genet*, 10, e1004413.

- Horn, C. & Wimmer, E. A. 2000. A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol*, 210, 630-7.
- Howard-Till, R. A., Lukaszewicz, A., Novatchkova, M. & Loidl, J. 2013. A single cohesin complex performs mitotic and meiotic functions in the protist tetrahymena. *PLoS Genet*, 9, e1003418.
- Hsieh, T. & Brutlag, D. 1979. Sequence and sequence variation within the 1.688 g/cm³ satellite DNA of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol*, 135, 465-81.
- Huang, C. E., Milutinovich, M. & Koshland, D. 2005. Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360, 537-42.
- Hughes, S. E., Gilliland, W. D., Cotitta, J. L., Takeo, S., Collins, K. A. & Hawley, R. S. 2009. Heterochromatic threads connect oscillating chromosomes during prometaphase I in *Drosophila* oocytes. *PLoS Genet*, 5, e1000348.
- Hwang, L. H., Lau, L. F., Smith, D. L., Mistrot, C. A., Hardwick, K. G., Hwang, E. S., Amon, A. & Murray, A. W. 1998. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science*, 279, 1041-4.
- Ishiguro, K., Kim, J., Fujiyama-Nakamura, S., Kato, S. & Watanabe, Y. 2011. A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep*, 12, 267-75.
- Ivanov, D. & Nasmyth, K. 2007. A physical assay for sister chromatid cohesion in vitro. *Mol Cell*, 27, 300-10.
- Jäger, H., Herzig, A., Lehner, C. F. & Heidmann, S. 2001. *Drosophila* separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR. *Genes Dev*, 15, 2572-84.
- Jäger, H., Herzig, B., Herzig, A., Sticht, H., Lehner, C. F., Heidmann, S. 2004. Structure Predictions and Interaction Studies Indicate Homology of Separase N-Terminal Regulatory Domains and *Drosophila* THR. *Cell Cycle* 3, 182-8.
- Jäger, H., Rauch, M. & Heidmann, S. 2005. The *Drosophila melanogaster* condensin subunit Cap-G interacts with the centromere-specific histone H3 variant CID. *Chromosoma*, 113, 350-61.
- James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144, 1425-36.
- Jessberger, R. 2011. Cohesin complexes get more complex: the novel kleisin RAD21L. *Cell Cycle*, 10, 2053-4.
- Jiang, J. & Struhl, G. 1998. Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature*, 391, 493-6.
- Jin, H., Guacci, V. & Yu, H. G. 2009. Pds5 is required for homologue pairing and inhibits synapsis of sister chromatids during yeast meiosis. *J Cell Biol*, 186, 713-25.
- Kapust, R. B., Tozser, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. 2001. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng*, 14, 993-1000.
- Karpen, G. H., Le, M. H. & Le, H. 1996. Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmate disjunction in *Drosophila* female meiosis. *Science*, 273, 118-22.
- Kateneva, A. V., Konovchenko, A. A., Guacci, V. & Dresser, M. E. 2005. Recombination protein Tid1p controls resolution of cohesin-dependent linkages in meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 171, 241-53.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J. & Vivares, C. P. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414, 450-3.
- Katis, V. L., Lipp, J. J., Imre, R., Bogdanova, A., Okaz, E., Habermann, B., Mechtler, K., Nasmyth, K. & Zachariae, W. 2010. Rec8 phosphorylation by casein kinase 1 and Cdc7-Dbf4 kinase regulates cohesin cleavage by separase during meiosis. *Dev Cell*, 18, 397-409.

- Kawashima, S. A., Yamagishi, Y., Honda, T., Ishiguro, K. & Watanabe, Y. 2010. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science*, 327, 172-7.
- Keeney, S., Giroux, C. N., & Kleckner, N. 1997. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, 88, 375-84.
- Kenna, M. A. & Skibbens, R. V. 2003. Mechanical link between cohesion establishment and DNA replication: Ctf7p/Eco1p, a cohesion establishment factor, associates with three different replication factor C complexes. *Mol Cell Biol*, 23, 2999-3007.
- Kerrebrock, A. W., Moore, D. P., Wu, J. S. & Orr-Weaver, T. L. 1995. Mei-S332, a Drosophila protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. *Cell*, 83, 247-56.
- Khetani, R. S. & Bickel, S. E. 2007. Regulation of meiotic cohesion and chromosome core morphogenesis during pachytene in Drosophila oocytes. *J Cell Sci*, 120, 3123-37.
- King, R. C. 1970. Ovarien Development ind Drosophila melanogaster. *Academic Press*, New York.
- Kinoshita, E., Van Der Linden, E., Sanchez, H. & Wyman, C. 2009. RAD50, an SMC family member with multiple roles in DNA break repair: how does ATP affect function? *Chromosome Res*, 17, 277-88.
- Kitajima, T. S., Hauf, S., Ohsugi, M., Yamamoto, T. & Watanabe, Y. 2005. Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr Biol*, 15, 353-9.
- Kitajima, T. S., Kawashima, S. A. & Watanabe, Y. 2004. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature*, 427, 510-7.
- Kitajima, T. S., Miyazaki, Y., Yamamoto, M. & Watanabe, Y. 2003. Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *EMBO J*, 22, 5643-53.
- Kitajima, T. S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S. A. & Watanabe, Y. 2006. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature*, 441, 46-52.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S. B., Michaelis, C., Nairz, K. & Nasmyth, K. 1999. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell*, 98, 91-103.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. & Schiebel, E. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, 15, 963-72.
- Kramer 1999. Untersuchungen zur Regulation der dacapo-Expression in Drosophila melanogaster. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik*, Universität Bayreuth.
- Krishnan, B., Thomas, S. E., Yan, R., Yamada, H., Zhulin, I. B. & McKee, B. D. 2014. Sisters Unbound Is Required for Meiotic Centromeric Cohesion in Drosophila melanogaster. *Genetics*.
- Kudo, N. R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K. G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., Mckay, M., Maro, B., Ellenberg, J., De Boer, P. & Nasmyth, K. 2006. Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell*, 126, 135-46.
- Kulemzina, I., Schumacher, M. R., Verma, V., Reiter, J., Metzler, J., Failla, A. V., Lanz, C., Sreedharan, V. T., Ratsch, G. & Ivanov, D. 2012. Cohesin rings devoid of Scc3 and Pds5 maintain their stable association with the DNA. *PLoS Genet*, 8, e1002856.
- Kusch, T. 2015. Brca2/Pds5 complexes mobilize persistent meiotic recombination sites to the nuclear envelope. *J Cell Sci*. 128, 717-27.
- Lafont, A. L., Song, J. & Rankin, S. 2010. Sororin cooperates with the acetyltransferase Eco2 to ensure DNA replication-dependent sister chromatid cohesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20364-9.
- Lake, C. M. & Hawley, R. S. 2012. The molecular control of meiotic chromosomal behavior: events in early meiotic prophase in Drosophila oocytes. *Annu Rev Physiol*, 74, 425-51.

- Lee, J. & Hirano, T. 2011. RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J Cell Biol*, 192, 263-76.
- Lee, J., Kitajima, T. S., Tanno, Y., Yoshida, K., Morita, T., Miyano, T., Miyake, M. & Watanabe, Y. 2008. Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat Cell Biol*, 10, 42-52.
- Lee, K., Rhee, K. 2012. Separase-dependent cleavage of pericentrin B is necessary and sufficient for centriole disengagement during mitosis. *Cell Cycle*, 13, 2476-85.
- Lin, H. & Spradling, A. C. 1993. Germline stem cell division and egg chamber development in transplanted *Drosophila* germaria. *Dev Biol*, 159, 140-52.
- Lindsley, D. L. & Tokuyasu, K. T. 1980. Genetics and biology of *Drosophila*. *Academic Press, New York*.
- Lindsley, D. L. & Zimm, G. G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press, New York*.
- Liu, H., Rankin, S. & Yu, H. 2013. Phosphorylation-enabled binding of SGO1-PP2A to cohesin protects sororin and centromeric cohesion during mitosis. *Nat Cell Biol*, 15, 40-9.
- Liu, Z., Ren, J., Cao, J., He, J., Yao, X., Jin, C., & Xu, Y. 2013. Systematic analysis of the Plk-mediated phosphoregulation in eukaryotes. *Brief Bioinform*, 14, 344-60.
- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B. A., Gonzalez, C., Karess, R. E., Glover, D. M. & Sunkel, C. E. 1991. polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev*, 5, 2153-65.
- Llano, E., Gomez, R., Gutierrez-Caballero, C., Herran, Y., Sanchez-Martin, M., Vazquez-Quinones, L., Hernandez, T., De Alava, E., Cuadrado, A., Barbero, J. L., Suja, J. A. & Pendas, A. M. 2008. Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev*, 22, 2400-13.
- Llano, E., Herran, Y., Garcia-Tunon, I., Gutierrez-Caballero, C., De Alava, E., Barbero, J. L., Schimenti, J., De Rooij, D. G., Sanchez-Martin, M. & Pendas, A. M. 2012. Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice. *J Cell Biol*, 197, 877-85.
- Losada, A., Hirano, M. & Hirano, T. 1998. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev*, 12, 1986-97.
- Losada, A., Yokochi, T. & Hirano, T. 2005. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci*, 118, 2133-41.
- Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R. & Hirano, T. 2000. Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol*, 150, 405-16.
- Manheim, E. A. & McKim, K. S. 2003. The Synaptonemal complex component C(2)M regulates meiotic crossing over in *Drosophila*. *Curr Biol*, 13, 276-85.
- Margolis, J. & Spradling, A. 1995. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 121, 3797-807.
- Mason, J. M. 1976. Orientation disruptor (ord): a recombination-defective and disjunction-defective meiotic mutant in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 84, 545-72.
- Matsuo, K., Ohsumi, K., Iwabuchi, M., Kawamat, T., Ono, Y., Takahashi, M. 2012. Kendrin is a novel substrate for separase involved in the licensing of centriole duplication. *Curr Biol*, 22, 915-21.
- Mayer, M. L., Gygi, S. P., Aebersold, R. & Hieter, P. 2001. Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*, 7, 959-70.
- McIntyre, J., Muller, E. G., Weitzer, S., Snyderman, B. E., Davis, T. N. & Uhlmann, F. 2007. In vivo analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 26, 3783-93.
- McKee, B. D. 1996. The license to pair: identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. *Chromosoma*, 105, 135-41.

- McKee, B. D. 2004. Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochim Biophys Acta*, 1677, 165-80.
- McKee, B. D., Yan, R. & Tsai, J. H. 2012. Meiosis in male *Drosophila*. *Spermatogenesis*, 2, 167-184.
- McKim, K. S., Jang, J. K., Theurkauf, W. E. & Hawley, R. S. 1993. Mechanical basis of meiotic metaphase arrest. *Nature*, 362, 364-6.
- Melby, T. E., Ciampaglio, C. N., Briscoe, G. & Erickson, H. P. 1998. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol*, 142, 1595-604.
- Michaelis, C., Ciosk, R. & Nasmyth, K. 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91, 35-45.
- Micklem, D. R., Dasgupta, R., Elliott, H., Gergely, F., Davidson, C., Brand, A., Gonzalez-Reyes, A. & St Johnston, D. 1997. The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila*. *Curr Biol*, 7, 468-78.
- Milutinovich, M. & Koshland, D. E. 2003. Molecular biology. SMC complexes--wrapped up in controversy. *Science*, 300, 1101-2.
- Mirouse, V., Formstecher, E. & Couderc, J. L. 2006. Interaction between Polo and BicD proteins links oocyte determination and meiosis control in *Drosophila*. *Development*, 133, 4005-13.
- Miyazaki, W. Y. & Orr-Weaver, T. L. 1992. Sister-chromatid misbehavior in *Drosophila* ord mutants. *Genetics*, 132, 1047-61.
- Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S. 2006. PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell*, 23, 723-32.
- Morrison, C., Vagnarelli, P., Sonoda, E., Takeda, S. & Earnshaw, W. C. 2003. Sister chromatid cohesion and genome stability in vertebrate cells. *Biochem Soc Trans*, 31, 263-5.
- Moses, M. J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol*, 2, 215-8.
- Murayama, Y. & Uhlmann, F. 2014. Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature*, 505, 367-71.
- Murdoch, B., Owen, N., Stevense, M., Smith, H., Nagaoka, S., Hassold, T., McKay, M., Xu, H., Fu, J., Revenkova, E., Jessberger, R. & Hunt, P. 2013. Altered cohesin gene dosage affects Mammalian meiotic chromosome structure and behavior. *PLoS Genet*, 9, e1003241.
- Murray, A. W. 1998. How to compact DNA. *Science*, 282, 425, 427.
- Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116, 221-34.
- Murray, A. W. & Kirschner, M. W. 1989. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science*, 246, 614-21.
- Musacchio, A. & Salmon, E. D. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 379-93.
- Nagarkar, S. 2010. Chromosome dynamics during cell divisions in *Drosophila melanogaster*: The role of Rad21 in meiotic cohesion and dynamic analysis of the condensin subunit CapG in early embryonic mitotic divisions. *Doktorarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth*.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. & Nishida, E. 2003. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J Biol Chem*, 278, 25277-80.
- Nasmyth, K. & Haering, C. H. 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem*, 74, 595-648.
- Nasmyth, K. & Haering, C. H. 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet*, 43, 525-58.
- Nasmyth, K. & Schleiffer, A. 2004. From a single double helix to paired double helices and back. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359, 99-108.

- Neuwald, A. F. & Hirano, T. 2000. HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res*, 10, 1445-52.
- Ng, T. M., Waples, W. G., Lavoie, B. D. & Biggins, S. 2009. Pericentromeric sister chromatid cohesion promotes kinetochore biorientation. *Mol Biol Cell*, 20, 3818-27.
- Ni, J. Q., Markstein, M., Binari, R., Pfeiffer, B., Liu, L. P., Villalta, C., Booker, M., Perkins, L. & Perrimon, N. 2008. Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods*, 5, 49-51.
- Nigg, E. A. 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 386, 779-87.
- Nigg, E. A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 21-32.
- Niman, H. L., Houghten, R. A., Walker, L. E., Reisfeld, R. A., Wilson, I. A., Hogle, J. M. & Lerner, R. A. 1983. Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 4949-53.
- Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A. A., Mechtler, K. & Peters, J. M. 2010. Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell*, 143, 737-49.
- Nishiyama, T., Sykora, M. M., Huis in 't Veld, P. J., Mechtler, K. & Peters, J. M. 2013. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 13404-9.
- Noton, E. & Diffley, J. F. 2000. CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. *Mol Cell*, 5, 85-95.
- Oliveri, G. & Oliveri, A. 1965. Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 2, 366-380.
- Orth, M., Mayer, B., Rehm, K., Rothweiler, U., Heidmann, D., Holak, T. A., Stemmann, O. 2011. Shugoshin is a Mad1/Cdc20-like interactor of Mad2. *EMBO J*. 30, 2868-80.
- Padeken, J., Mendiburo, M. J., Chlamydas, S., Schwarz, H. J., Kremmer, E., Heun, P. 2013. The nucleoplasmin homolog NLP mediates centromere clustering and anchoring to the nucleolus. *Mol Cell*, 50, 236-49.
- Page, J., Viera, A., Parra, M. T., De La Fuente, R., Suja, J. A., Prieto, I., Barbero, J. L., Rufas, J. S., Berrios, S. & Fernandez-Donoso, R. 2006. Involvement of synaptonemal complex proteins in sex chromosome segregation during marsupial male meiosis. *PLoS Genet*, 2, e136.
- Page, S. L. & Hawley, R. S. 2001. c(3)G encodes a *Drosophila* synaptonemal complex protein. *Genes Dev*, 15, 3130-43.
- Page, S. L. & Hawley, R. S. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 525-58.
- Page, S. L., Khetani, R. S., Lake, C. M., Nielsen, R. J., Jeffress, J. K., Warren, W. D., Bickel, S. E. & Hawley, R. S. 2008. Corona is required for higher-order assembly of transverse filaments into full-length synaptonemal complex in *Drosophila* oocytes. *PLoS Genet*, 4, e1000194.
- Panizza, S., Tanaka, T., Hochwagen, A., Eisenhaber, F. & Nasmyth, K. 2000. Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr Biol*, 10, 1557-64.
- Parisi, S., McKay, M. J., Molnar, M., Thompson, M. A., Van Der Spek, P. J., Van Drunen-Schoenmaker, E., Kanaar, R., Lehmann, E., Hoeijmakers, J. H. & Kohli, J. 1999. Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol*, 19, 3515-28.
- Pasierbek, P., Jantsch, M., Melcher, M., Schleiffer, A., Schweizer, D. & Loidl, J. 2001. A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev*, 15, 1349-60.

- Pauli, A., Althoff, F., Oliveira, R. A., Heidmann, S., Schuldiner, O., Lehner, C. F., Dickson, B. J. & Nasmyth, K. 2008. Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. *Dev Cell*, 14, 239-51.
- Peters, J. M. 1999. Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res*, 248, 339-49.
- Peters, J. M., Tedeschi, A. & Schmitz, J. 2008. The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev*, 22, 3089-114.
- Petrella, L. N., Smith-Leiker, T. & Cooley, L. 2007. The Ovhts polyprotein is cleaved to produce fusome and ring canal proteins required for *Drosophila* oogenesis. *Development*, 134, 703-12.
- Petronczki, M., Siomos, M. F. & Nasmyth, K. 2003. Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, 112, 423-40.
- Pezzi, N., Prieto, I., Kremer, L., Perez Jurado, L. A., Valero, C., Del Mazo, J., Martinez, A. C. & Barbero, J. L. 2000. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J*, 14, 581-92.
- Prieto, I., Suja, J. A., Pezzi, N., Kremer, L., Martinez, A. C., Rufas, J. S. & Barbero, J. L. 2001. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol*, 3, 761-6.
- Rankin, S., Ayad, N. G. & Kirschner, M. W. 2005. Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates. *Mol Cell*, 18, 185-200.
- Resnick, T. D., Satinover, D. L., Macisaac, F., Stukenberg, P. T., Earnshaw, W. C., Orr-Weaver, T. L. & Carmena, M. 2006. INCENP and Aurora B promote meiotic sister chromatid cohesion through localization of the Shugoshin MEI-S332 in *Drosophila*. *Dev Cell*, 11, 57-68.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B. & Jessberger, R. 2001. Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol*, 21, 6984-98.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., Scherthan, H. & Jessberger, R. 2004. Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol*, 6, 555-62.
- Revenkova, E. & Jessberger, R. 2006. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma*, 115, 235-40.
- Riedel, C. G., Katis, V. L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., Mudrak, I., Ogris, E., Mechtler, K., Pelletier, L., Buchholz, F., Shirahige, K. & Nasmyth, K. 2006. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature*, 441, 53-61.
- Roberts, D. B. 1998. *Drosophila - A practical approach*. Oxford university press, Oxford.
- Rolf Ben-Shahar, T., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M. & Uhlmann, F. 2008. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science*, 321, 563-6.
- Rollins, R. A., Korom, M., Aulner, N., Martens, A. & Dorsett, D. 2004. *Drosophila* nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Scs3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene. *Mol Cell Biol*, 24, 3100-11.
- Rollins, R. A., Morcillo, P. & Dorsett, D. 1999. Nipped-B, a *Drosophila* homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics*, 152, 577-93.
- Rorth, P. 1998. Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev*, 78, 113-8.
- Rotheneder, M. 2014. Erzeugung transgener Fliegenstämme zur Charakterisierung der Interaktion des meiosespezifischen Proteins SOLO mit den Kohäsin-assoziierten Proteinen Sororin und Pds5. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik*, Universität Bayreuth.
- Rowland, B. D., Roig, M. B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouet, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R., Mechtler, K., Katis, V. L. & Nasmyth, K. 2009.

- Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell*, 33, 763-74.
- Rupp, R. A., Snider, L. & Weintraub, H. 1994. Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev*, 8, 1311-23.
- Sakuno, T. & Watanabe, Y. 2009. Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. *Chromosome Res*, 17, 239-49.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning-A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor.
- Sandler, L., Lindsley, D. L., Nicoletti, B. & Trippa, G. 1968. Mutants affecting meiosis in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 60, 525-58.
- Schleiffer, A., Kaitna, S., Maurer-Stroh, S., Glotzer, M., Nasmyth, K. & Eisenhaber, F. 2003. Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol Cell*, 11, 571-5.
- Schmekel, K. & Daneholt, B. 1995. The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol*, 5, 239-42.
- Schöckel, L., Möckel, M., Mayer, B., Boos, D. & Stemmann, O. 2011. Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat Cell Biol*, 13, 966-72.
- Schule, B., Oviedo, A., Johnston, K., Pai, S. & Francke, U. 2005. Inactivating mutations in ESCO2 cause SC phocomelia and Roberts syndrome: no phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet*, 77, 1117-28.
- Schwarzstein, M., Wignall, S. M. & Villeneuve, A. M. 2010. Coordinating cohesion, co-orientation, and congression during meiosis: lessons from holocentric chromosomes. *Genes Dev*, 24, 219-28.
- Seel, K. 2010. Erzeugung und Affinitätsreinigung von Antikörpern zur Untersuchung von Kohäsin- und Kondensinkomplexen aus *Drosophila melanogaster*. *Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik*, Universität Bayreuth.
- Seitan, V. C., Banks, P., Laval, S., Majid, N. A., Dorsett, D., Rana, A., Smith, J., Bateman, A., Krpic, S., Hostert, A., Rollins, R. A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Benard, C. Y., Hekimi, S., Newbury, S. F. & Strachan, T. 2006. Metazoan Scc4 homologs link sister chromatid cohesion to cell and axon migration guidance. *PLoS Biol*, 4, e242.
- Severson, A. F., Ling, L., Van Zuylen, V. & Meyer, B. J. 2009. The axial element protein HTP-3 promotes cohesin loading and meiotic axis assembly in *C. elegans* to implement the meiotic program of chromosome segregation. *Genes Dev*, 23, 1763-78.
- Severson, A. F. & Meyer, B. J. 2014. Divergent kleisin subunits of cohesin specify mechanisms to tether and release meiotic chromosomes. *Elife*, 3, e03467.
- Skibbens, R. V., Corson, L. B., Koshland, D. & Hieter, P. 1999. Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev*, 13, 307-19.
- Skowrya, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J & Harper, J. W. 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, 91, 209-19.
- Spradling, A. C. 1993. The Development of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Spradling, A. C. & Rubin, G. M. 1982. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, 218, 341-7.
- Stack, S. M. & Anderson, L. K. 2001. A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome Res*, 9, 175-98.
- Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P. & Kirschner, M. W. 2001. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell*, 107, 715-26.
- Strachan, T. 2005. Cornelia de Lange Syndrome and the link between chromosomal function, DNA repair and developmental gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 258-64.

- Styhler, S., Nakamura, A., Swan, A., Suter, B. & Lasko, P. 1998. *vasa* is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development*, 125, 1569-78.
- Sudakin, V., Chan, G. K. & Yen, T. J. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*, 154, 925-36.
- Sullivan, M., Lehane, C., & Uhlmann, F. 2001. Orchestrating anaphase and mitotic exit: separate cleavage and localization of Slk19. *Nat Cell Biol*, 3, 771-7.
- Sullivan, W., Ashburner, M. & Hawley, R. S. 2000. *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H. & Peters, J. M. 2000. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*, 151, 749-62.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A. & Peters, J. M. 2002. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell*, 9, 515-25.
- Sutani, T., Kawaguchi, T., Kanno, R., Itoh, T. & Shirahige, K. 2009. Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr Biol*, 19, 492-7.
- Tachibana-Konwalski, K., Godwin, J., Borsos, M., Rattani, A., Adams, D. J. & Nasmyth, K. 2013. Spindle assembly checkpoint of oocytes depends on a kinetochore structure determined by cohesin in meiosis I. *Curr Biol*, 23, 2534-9.
- Tachibana-Konwalski, K., Godwin, J., Van Der Weyden, L., Champion, L., Kudo, N. R., Adams, D. J. & Nasmyth, K. 2010. Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes Dev*, 24, 2505-16.
- Takahashi, T. S., Yiu, P., Chou, M. F., Gygi, S. & Walter, J. C. 2004. Recruitment of Xenopus Scc2 and cohesin to chromatin requires the pre-replication complex. *Nat Cell Biol*, 6, 991-6.
- Takeo, S., Lake, C. M., Morais-De-Sa, E., Sunkel, C. E. & Hawley, R. S. 2011. Synaptonemal complex-dependent centromeric clustering and the initiation of synapsis in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol*, 21, 1845-51.
- Tanneti, N. S., Landy, K., Joyce, E. F. & McKim, K. S. 2011. A pathway for synapsis initiation during zygotene in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol*, 21, 1852-7.
- Tavosanis, G., Llamazares, S., Goulielmos, G. & Gonzalez, C. 1997. Essential role for gamma-tubulin in the acentriolar female meiotic spindle of *Drosophila*. *EMBO J*, 16, 1809-19.
- Theurkauf, W. E. & Hawley, R. S. 1992. Meiotic spindle assembly in *Drosophila* females: behavior of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein. *J Cell Biol*, 116, 1167-80.
- Thomas, S. E., Soltani-Bejnood, M., Roth, P., Dorn, R., Logsdon, J. M., Jr. & McKee, B. D. 2005. Identification of two proteins required for conjunction and regular segregation of achiasmate homologs in *Drosophila* male meiosis. *Cell*, 123, 555-68.
- Thorpe, H. M., Wilson, S. E. & Smith, M. C. 2000. Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Mol Microbiol*, 38, 232-41.
- Tinker, R., Silver, D. & Montell, D. J. 1998. Requirement for the *vasa* RNA helicase in *gurken* mRNA localization. *Dev. Biol.* 199, 1-10.
- Tomkiel, J. E., Wakimoto, B. T. & Briscoe, A., Jr. 2001. The teflon gene is required for maintenance of autosomal homolog pairing at meiosis I in male *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 157, 273-81.
- Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsey, S. E., Uhlmann, F., Nasmyth, K. & Yanagida, M. 2000. Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev*, 14, 2757-70.

- Tonkin, E. T., Wang, T. J., Lisgo, S., Bamshad, M. J. & Strachan, T. 2004. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet*, 36, 636-41.
- Toth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A. & Nasmyth, K. 1999. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev*, 13, 320-33.
- Tracey, W. D., Jr., Ning, X., Klingler, M., Kramer, S. G. & Gergen, J. P. 2000. Quantitative analysis of gene function in the Drosophila embryo. *Genetics*, 154, 273-84.
- Tsai, J. H., Yan, R. & McKee, B. D. 2011. Homolog pairing and sister chromatid cohesion in heterochromatin in Drosophila male meiosis I. *Chromosoma*, 120, 335-51.
- Turner, D. L. & Weintraub, H. 1994. Expression of achaete-scute homolog 3 in Xenopus embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev*, 8, 1434-47.
- Uhlmann, F. 2004. The mechanism of sister chromatid cohesion. *Exp Cell Res*, 296, 80-5.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F. & Nasmyth, K. 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, 400, 37-42.
- Uhlmann, F. & Nasmyth, K. 1998. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol*, 8, 1095-101.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupard, M. A., Koonin, E. V. & Nasmyth, K. 2000. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell*, 103, 375-86.
- Unal, E., Heidinger-Pauli, J. M., Kim, W., Guacci, V., Onn, I., Gygi, S. P. & Koshland, D. E. 2008. A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science*, 321, 566-9.
- Urban, E., Nagarkar-Jaiswal, S., Lehner, C. F. & Heidmann, S. K. 2014. The cohesin subunit Rad21 is required for synaptonemal complex maintenance, but not sister chromatid cohesion, during Drosophila female meiosis. *PLoS Genet*, 10, e1004540.
- Van Doren, M., Williamson, A. L. & Lehmann, R. 1998. Regulation of zygotic gene expression in Drosophila primordial germ cells. *Curr Biol*, 8, 243-6.
- Vega, H., Waisfisz, Q., Gordillo, M., Sakai, N., Yanagihara, I., Yamada, M., Van Gosliga, D., Kayserili, H., Xu, C., Ozono, K., Jabs, E. W., Inui, K. & Joenje, H. 2005. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet*, 37, 468-70.
- Virchow, R. L. K. 1858. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung und in ihrer Auswirkung auf die physiologische und pathologische Gewebelehre. *Verlag A. Hirschwald, Berlin*
- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A. & Peters, J. M. 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*, 103, 399-410.
- Watanabe, Y. 2004. Modifying sister chromatid cohesion for meiosis. *J Cell Sci*, 117, 4017-23.
- Watanabe, Y. & Nurse, P. 1999. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature*, 400, 461-4.
- Watrin, E., Schleiffer, A., Tanaka, K., Eisenhaber, F., Nasmyth, K. & Peters, J. M. 2006. Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression. *Curr Biol*, 16, 863-74.
- Webber, H. A., Howard, L. & Bickel, S. E. 2004. The cohesion protein ORD is required for homologue bias during meiotic recombination. *J Cell Biol*, 164, 819-29.
- Weng, K. A., Jeffreys, C. A. & Bickel, S. E. 2014. Rejuvenation of meiotic cohesion in oocytes during prophase I is required for chiasma maintenance and accurate chromosome segregation. *PLoS Genet*, 10, e1004607.
- Xu, H., Beasley, M., Verschoor, S., Inselman, A., Handel, M. A. & McKay, M. J. 2004. A new role for the mitotic RAD21/SCC1 cohesin in meiotic chromosome cohesion and segregation in the mouse. *EMBO Rep*, 5, 378-84.
- Xu, Z., Cetin, B., Anger, M., Cho, U. S., Helmhart, W., Nasmyth, K. & Xu, W. 2009. Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Mol Cell*, 35, 426-41.

- Yamamoto, A., Guacci, V. & Koshland, D. 1996. Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol*, 133, 99-110.
- Yan, R. & McKee, B. D. 2013. The cohesion protein SOLO associates with SMC1 and is required for synapsis, recombination, homolog bias and cohesion and pairing of centromeres in *Drosophila* Meiosis. *PLoS Genet*, 9, e1003637.
- Yan, R., Thomas, S. E., Tsai, J. H., Yamada, Y. & McKee, B. D. 2010. SOLO: a meiotic protein required for centromere cohesion, coorientation, and SMC1 localization in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, 188, 335-49.
- Yen, H. C. & Elledge, S. J. 2008. Identification of SCF ubiquitin ligase substrates by global protein stability profiling. *Science*, 322, 923-9.
- Yokobayashi, S., Yamamoto, M. & Watanabe, Y. 2003. Cohesins determine the attachment manner of kinetochores to spindle microtubules at meiosis I in fission yeast. *Mol Cell Biol*, 23, 3965-73.
- Yu, H. G. & Koshland, D. 2007. The Aurora kinase Ipl1 maintains the centromeric localization of PP2A to protect cohesin during meiosis. *J Cell Biol*, 176, 911-8.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101, 25-33.
- Zhang, N., Kuznetsov, S. G., Sharan, S. K., Li, K., Rao, P. H. & Pati, D. 2008. A handcuff model for the cohesin complex. *J Cell Biol*, 183, 1019-31.
- Zickler, D. & Kleckner, N. 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet*, 33, 603-754.
- Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T. & Kirschner, M. W. 1999. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*, 285, 418-22.

7. Anhang

Tabelle 1: Mittels Massenspektrometrie nachgewiesene Interaktionspartner von EGFP-SOLO nach nos-Gal4 gesteuerter Expression und EGFP-spezifischer Immunpräzipitation von löslichen Proteinextrakten aus Ovarien

Nr.	Name	Score	Mr [Da]	Info
1	vasa, isoform B	3293	112674	
2	CG10254, isoform A	894	157916	Ubiquitin-conjugating enzyme, E2
3	transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94	763	89518	ATP binding; protein binding; hydrolase activity
4	endoplasmic reticulum membrane fusion protein	728	89379	
5	heat shock protein cognate 1, isoform A	624	70871	Heat shock protein 70 family, unfolded protein binding
6	RE37107p (CG32164)	621	122068	Importin-beta, Ran GTPase binding
7	heat shock protein cognate 71	531	74390	
8	CG8258	528	59795	Chaperonin TCP-1
9	heat shock protein Hsp70Ba	526	70493	heat shock-mediated polytene chromosome puffing
10	Hsp70/Hsp90 organizing protein homolog	500	55920	Heat shock chaperonin-binding
11	CG7033	461	58483	Chaperonin TCP-1
12	CG17018, isoform A	455	144951	Meiosis arrest female protein, nucleic acid binding,
13	Cullin-associated and neddylation-dissociated 1	452	140806	negative regulation of protein neddylation; regulation of protein stability.
14	T-complex chaperonin 5, isoform A	437	59697	Chaperonin TCP-1
15	aralar1, isoform A	415	75310	transmembrane transporter activity
16	RNA helicase (Eukaryotic initiation factor 4a)	387	52663	single-stranded DNA-dependent ATP-dependent DNA helicase activity
17	Tcp-1eta	386	59976	Chaperonin TCP-1
18	Tcp1-like, isoform A	372	60089	Chaperonin TCP-1
19	cctgamma, isoform A	357	59927	Chaperonin TCP-1
20	Ranbp9, isoform A	345	115304	Ran GTPase binding, intracellular protein transport
21	elongation factor 2, isoform A	306	95424	translation elongation factor activity; GTPase activity
22	CG17514, isoform A	294	296460	Proteasome component ECM29, Armadillo-like helical
23	gamma-tubulin	284	51633	
24	T-cp1zeta	284	58495	Chaperonin TCP-1
25	protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit	282	66081	protein serine/threonine phosphatase activity
26	pendulin (NLS-receptor)	271	58055	protein transmembrane transporter activity
27	RE65203p (eIF3-S10)	264	134481	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A; Proteasome component (PCI) domain
28	CG5525	258	57764	Chaperonin TCP-1
29	pontin	256	50382	AAA+ ATPase domain, spindle assembly involved in mitosis

30	Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase, isoform A	256	190491	glutamyl-tRNA aminoacylation
31	CG9281, isoform B	244	70085	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances
32	La related protein	243	178266	RNA-binding protein Lupus La, DNA-binding domain, spindle assembly
33	spindle defective 2	240	125605	spindle assembly involved in mitosis; centrosome organization
34	protein on ecdysone puffs, isoform B	231	76123	Zinc finger, C2H2, DNA binding
35	jabba, isoform B	228	36054	
36	exuperantia, isoform A	228	57996	pole plasm oskar mRNA localization
37	CG10077, isoform A	222	88497	ATP-dependent RNA helicase activity
38	coatomer alpha subunit	221	141003	phagocytosis; retrograde vesicle-mediated transport
39	SD07726p (CG33123)	217	135745	Aminoacyl-tRNA synthetase, class 1a,
40	RE04347p (Argonaute 2)	217	137736	endoribonuclease activity; siRNA binding
41	eIF3-S8, isoform A	214	106158	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C
42	RE70645p	209	94161	Helicase, DNA-dependent ATPase activity, SNF2-related
43	microtubule associated protein (mini spindles)	201	228045	microtubule binding, Armadillo-like helical
44	CG7546, isoform E	200	138661	Ubiquitin-like
45	CG5214	195	50177	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase activity
46	fat facets long isoform	193	311582	ubiquitin-specific protease activity
47	karyopherin beta 3, isoform A	186	125078	protein import into nucleus
48	l(3)76BDr	183	201137	zinc ion binding
49	Fmr1, isoform C	181	76001	protein self-association; mRNA binding
50	swallow	174	62488	regulation of pole plasm oskar mRNA localization
51	SD02803p (CG10289)	168	111559	SIT4 phosphatase-associated protein family
52	AT05114 (CG15100)	168	112249	Aminoacyl-tRNA synthetase
53	eIF2B-gamma protein	165	51153	Nucleotide-diphospho-sugar transferases
54	Tid56 protein	165	56557	Chaperone DnaJ, heat shock protein binding
55	CG4849	163	111606	Elongation factor
56	cell division cycle 16 ortholog	158	82598	mitotic anaphase-promoting complex activity.
57	coat protein (coatomer) beta	154	108308	retrograde vesicle-mediated transport,
58	dynamamin related protein 1, isoform A	153	83085	Dynamamin GTPase effector
59	ribosomal protein LP0, isoform A	152	34295	structural constituent of ribosome
60	coatomer protein gamma subunit	152	98498	Clathrin/coatomer adaptor, adaptin-like
61	regulatory particle non-ATPase	149	58452	Proteasome component
62	importin beta	149	99800	Ran GTPase binding; protein transmembrane transporter activity
63	fs(1)Ya protein	146	78801	nuclear envelope protein

64	CG31739, isoform A	145	122071	Aminoacyl-tRNA synthetase, class II
65	replication protein A 70	144	67153	Replication factor-A protein 1, single-stranded DNA binding
66	transforming acidic coiled-coil protein, isoform C	144	146175	negative regulation of microtubule depolymerization; female meiosis
67	RE66761p (TOM70)	137	67034	P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter activity
68	Y-box protein	136	38975	transcription factor or nuclease-sensitive element-binding protein
69	regulatory particle non-ATPase 2, isoform A	135	113754	26S proteasome regulatory complex
70	eukaryotic initiation factor 2gamma, isoform B	132	52080	Translation elongation factor EF1A/initiation factor IF2gamma
71	Ran binding protein 7	132	120094	Ran GTPase binding
72	gij8488	130	45841	60S ribosomal protein L4
73	malic enzyme	130	85471	malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity
74	regulatory particle non-ATPase 1	129	103010	26S proteasome regulatory complex
75	RE52161p (Ribosomal protein L3)	127	35918	structural constituent of ribosome
76	CG7208, isoform A	127	51767	
77	Aspartyl-tRNA synthetase, isoform A	126	59307	Aminoacyl-tRNA synthetase, class II
78	ribosomal protein L3, isoform A	124	47285	structural constituent of ribosome
79	eukaryotic translation initiation factor 3 p66 subunit	123	64228	
80	aubergine, isoform A	120	99363	Ribonuclease H-like domain
81	cup	119	127721	Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter
82	topoisomerase 2, isoform A	119	165034	
83	Bub1-related kinase	118	166382	Mad3/BUB1 homology region 1; Mitotic checkpoint serine/threonine protein kinase
84	IGF-II mRNA-binding protein, isoform A	117	62376	mRNA binding
85	eIF2B-delta, isoform A	117	68311	negative regulation of translational initiation
86	regulatory particle triple-A ATPase 5	115	48005	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process
87	beta-2 tubulin	114	50382	
88	P26s4	113	49407	26S proteasome subunit P45
89	gij732656	113	116238	E1-E2_ATPase
90	RH30202p (Adaptor Protein complex 2, alpha subunit)	110	90237	protein transporter activity.
91	chromosomal region maintenance protein CRM1	110	123716	nuclear export signal receptor activity
92	FKBP39	108	39462	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; FK506 binding
93	host cell factor HCF	107	161000	sequence-specific DNA binding transcription factor activity
94	retinoid- and fatty acid-binding glycoprotein	106	374353	Lipid transport protein
95	morula	102	92220	Anaphase-promoting complex subunit 2
96	Arginyl-tRNA synthetase	99	76441	Aminoacyl-tRNA synthetase, class 1a

97	Gamma-tubulin ring protein 84, isoform C	98	95587	Gamma-tubulin complex component protein
98	muskelin, isoform A	97	98701	regulation of cell-matrix adhesion
99	CG2982, isoform B	93	73623	Bifunctional lysine-specific demethylase and histidyl-hydroxylase NO66
100	actin 5C, isoform B	91	42194	structural constituent of cytoskeleton
101	RH04607p (CG17593)	91	54389	
102	gjl8356 protein kinase (plk1)	91	67588	Serine/threonine-protein kinase
103	Fas-associated factor, isoform A	90	53213	Ubiquitin-related domain
104	gjl4972720	89	101024	mRNA 3'-UTR binding; satellite DNA binding.
105	RE53774p	89	120423	Regulator of chromosome condensation, RCC1, ubiquitin-protein ligase activity
106	droj1	88	37191	Chaperone DnaJ,
107	clathrin adaptor protein AP-50	87	48686	
108	regulatory particle non-ATPase 3, isoform A	87	56084	26S proteasome regulatory subunit
109	mitochondrial trifunctional protein alpha subunit	87	84478	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
110	Not1, isoform C	87	283129	CCR4-Not complex component, Not1
111	gamma-tubulin ring protein Dgrip91	85	104551	Gamma-tubulin complex component/Spindle pole body component.
112	nucleostemin ortholog 3, isoform A	82	70430	GTPase activity, ribosome biogenesis
113	CG7878	82	78975	DEAD/DEAH box helicase domain
114	nibbler	81	72876	3'-5' exonuclease domain
115	coatomer, beta-prime subunit	81	103716	retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER
116	DNA polymerase delta	81	126282	DNA-directed DNA polymerase
117	RNA polymerase	81	128806	
118	longitudinals lacking, isoform P	80	103469	sequence-specific DNA binding transcription factor activity
119	Tudor-SN, isoform A	77	103436	RNA-induced silencing complex
120	Nop56	76	55031	neurogenesis
121	aluminum tubes, isoform G	76	98763	
122	shattered	76	229352	Anaphase-promoting complex subunit 1

8. Publikationsliste

Urban E, Nagarkar-Jaiswal S, Lehner CF, Heidmann SK. (2014). The Cohesin Subunit Rad21 Is Required for Synaptonemal Complex Maintenance, but Not Sister Chromatid Cohesion, during *Drosophila* Female Meiosis. PLoS Genet. 10(8):e1004540

Herzog S, Nagarkar-Jaiswal S, **Urban E**, Riemer A, Fischer S, Heidmann SK. (2013). Functional dissection of the *Drosophila melanogaster* condensin subunit Cap-G reveals its exclusive association with condensin I. PLoS Genet. 9(4):e1003463.

9. Danksagung

Ich danke PD Dr. Stefan Heidmann, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine Promotion am Lehrstuhl für Genetik durchzuführen, denn schon in jungen Jahren habe ich meine Liebe für die Genetik entdeckt und bis heute nicht verloren. Außerdem möchte ich mich für die permanente Diskussionsbereitschaft bedanken und für sein immer offenes Ohr bei vielen Fragen.

Ein besonderer Dank geht auch an Professor Dr. Olaf Stemmann und Professor Dr. Christian Lehner, die als Teil meines Mentorats der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNat) mir immer wieder neue Anregungen, Vorschläge oder Ansatzpunkte für weitere Experimente gegeben haben.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen lieben Laborkollegen Brigitte Jaunich, Sabine Herzog und Kristina Seel, die mir bei einer Vielzahl an kleinen Alltagsproblemen immer weitergeholfen haben und mit denen man immer wieder neue Vorschläge für weitere Experimente kritisch diskutieren konnte. Darüber hinaus bedanke ich mich auch für die vielen nützlichen und amüsanten Gesprächen im und außerhalb des Labors.

Mein Dank gilt außerdem Michael Orth, Bernd Mayer, Philip Kahlen und Andreas Brown für die ständige Hilfsbereitschaft, ihren Enthusiasmus und ihre Kritik, die mich auch einige Dinge hinterfragen ließ, um so zu einem besseren Ergebnis zu kommen.

Vielen Dank auch an Mareike Jordan, Sarah Herberg, Matthias Rotheneder und Maria Stenger, die im Rahmen ihrer Forschungspraktika oder Bachelorarbeiten einen Teil zu meinem großen Puzzle Doktorarbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich Regine Häfner, Gertrud Lallinger-Kube, Andrea Bogutzki und Ina Hallstein für ihre vielen fachlichen und zum Teil auch privaten Ratschläge, die mich stets weiter gebracht haben.

Ein großer Dank geht an dieser Stelle auch an meine Eltern und vor allem an meine beiden Großeltern, die mich immer unterstützt haben und mir durch ihre Gespräche immer wieder gezeigt haben, dass sie hinter mir stehen und dass es noch schönere und wichtigere Dinge gibt als die Forschung!

Vielen Dank an Euch alle!

10. Lebenslauf

Name	Evelin K. Urban
Geburtsdatum	05. November 1986
Geburtsort	Greiz (Thüringen)
Nationalität	Deutsch

Promotion

10/2010-03/2015	Universität Bayreuth, Bayreuth <ul style="list-style-type: none">• Promotion am Lehrstuhl für Genetik bei PD Dr. Heidmann• Mitglied der Graduiertenschulen: UNIVERSITY OF BAYREUTH GRADUATE SCHOOL, Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNat)
-----------------	--

Studium

10/2008-09/2010	Universität Bayreuth, Bayreuth <ul style="list-style-type: none">• Master of Science (MSc) in Biochemie und molekularer Biologie• Masterarbeit am Lehrstuhl für Genetik bei PD Dr. Heidmann Thema: Analyse post-mitotischer Funktionen der Condensin-Untereinheit CapG aus <i>Drosophila melanogaster</i>
10/2005-09/2008	Universität Bayreuth, Bayreuth <ul style="list-style-type: none">• Bachelor of Science (BSc) in Biochemie• Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik bei PD Dr. Heidmann Thema: Etablierung von Kontrollen für ein fluoreszenzbasiertes System zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in <i>Drosophila melanogaster</i>

Schulbildung

1997-2005	Goethe-Gymnasium , Reichenbach im Vogtland (Sachsen) <ul style="list-style-type: none">• Abschluss: Abitur
1993-1997	Grundschule Netzschkau

11. Eidesstattliche Versicherungen und Erklärungen

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. (§ 8 S. 2 Nr. 6 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. (§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

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. (§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerbliche Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde. (§ 8 S. 2 Nr. 10 PromO)

Bayreuth, den 18. März 2015

Evelin Urban