

Analyse von Condensin-Komplexen in *Drosophila melanogaster*

Charakterisierung der Untereinheit CapG und Identifizierung von Interaktionen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
-Doktors der Naturwissenschaften-

-Dr. rer. nat.-

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Sabine Herzog

Bayreuth 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2007 bis August 2011 an der Universität Bayreuth am Lehrstuhl für Genetik, unter der Betreuung von PD Dr. Stefan Heidmann angefertigt.

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

Dissertation eingereicht am:	17. 08. 2011
Zulassung durch Prüfungskommission:	29. 09. 2011
Wissenschaftliches Kolloquium:	09. 12. 2011

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:

PD. Dr. Stefan Heidmann (Erstgutachter)
Prof. Dr. Benedikt Westermann (Zweitgutachter)
Prof. Dr. Olaf Stemmann (Vorsitz)
Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt
PD. Dr. Stefan Geimer

Gliederung

Zusammenfassung	7
Summary	9
1. Einleitung	11
1.1. Der Zellzyklus	11
1.1.1. Die Interphase.....	12
1.1.2. Die Mitose.....	12
1.2. Die Chromatinstrukturierung im Verlauf des Zellzyklus	13
1.2.1. Die Chromatinstruktur während der Interphase.....	13
1.2.2. DNA-Replikation und Etablierung der Kohäsion.....	14
1.2.3. Chromosomenkondensation und Resolution der Chromatiden.....	16
1.2.4. Mechanismen der Chromosomenkondensation.....	16
1.2.5. Chromosomensegregation.....	18
1.3. Der Condensin-Komplex	19
1.3.1. Identifikation des Condensin.....	19
1.3.2. Aufbau der Condensin-Komplexe	20
1.3.3. Evolutionäre Konservierung der Condensin-Komplexe.....	21
1.3.4. Subzelluläre Lokalisation und Chromatinassoziation der Condensin-Komplexe.....	21
1.3.5. Funktionen des Condensin für Chromosomenkondensation und –segregation.....	22
1.3.6. Die Condensin abhängige Ablösung des Kohäsin-Komplexes.....	23
1.3.7. Mechanismen der Condensin-vermittelten Chromatinkompaktierung.....	24
1.3.8. Die Regulation der Condensin-Komplexe.....	26
1.3.9. Weitere Funktionen der Condensin-Komplexe.....	28
1.3.10. Besonderheit des Condensin-Komplexes in <i>Drosophila melanogaster</i>	30
1.4. Zielsetzung	31
2. Ergebnisse	33
2.1. Struktur- und Funktionsanalyse von CapG	33
2.1.1. CapG lokalisiert während der Interphase am Heterochromatin.....	35
2.1.2. Die Chromatinassoziation von CapG ^{NM} -EGFP ist nicht am Zentromer.....	38
2.1.3. Die N-terminalen zwei-Drittel von CapG vermitteln biologische Funktionalität	41
2.1.4. Die Expression verkürzter CapG ^{NM} -EGFP Transgene führt zur SAC-vermittelten Verzögerung der Mitose.....	44

2.1.5. Die N-terminalen zwei-Drittel von CapG sind essentiell für Interaktion mit den weiteren Condensin-Untereinheiten	45
2.1.6. CapG liegt in der Fliege in unterschiedlichen Isoformen vor.....	47
2.1.7. CapG wird während des Zellzyklus phosphoryliert.....	51
2.1.8. Lokalisation und Funktionalität von CapG in weiblichen Fortpflanzungsorganen.....	54
2.1.9. Lokalisation von CapG und CapD2 in männlichen Fortpflanzungsorganen.....	59
2.2. Komposition der Condensin-Komplexe in <i>D. melanogaster</i>	61
2.2.1. Genetische Interaktionsstudien	62
2.2.1.1. Disassemblierung von polytäнем Nährzellchromatin in Ovarien.....	62
2.2.1.2. Disassemblierung von polytäнем Speicheldrüsenchromatin in Larven.....	66
2.2.2. <i>In vivo</i> Identifikation der Condensin II- Komponenten in <i>D. melanogaster</i>	68
2.2.2.1. Condensin II-spezifische Untereinheiten werden durch CapG nicht präzipitiert....	69
2.2.2.2. Die Präzipitation Condensin II-spezifischer Untereinheiten ist auch durch SMC4 nicht ermöglicht.....	73
2.2.2.3. Die Präzipitation der Condensin-Kernuntereinheiten ist durch CapH2 ermöglicht.....	76
2.2.2.4. Eine Interaktion der Condensin-Untereinheiten mit Komponenten des RNA- <i>silencing</i> Signalweges kann nicht bestätigt werden.....	81
2.2.3. <i>In vitro</i> Assay zur Analyse der Interaktionen einzelner Condensin-Untereinheiten	82
2.2.3.1. Interaktionen der Condensin I-Komponenten werden im <i>in vitro</i> Assay bestätigt.....	83
2.2.3.2. CapG interagiert nicht mit CapH2 und CapD3.....	84
2.2.3.3. Eine direkte Interaktion von CapH2 und CapD3 ist im <i>in vitro</i> Assay nachweisbar.....	86
2.2.3.4. Bildung eines ternären Komplexes ist nur durch Condensin I-spezifische Untereinheiten ermöglicht.....	87
3. Diskussion	90
3.1. Die Domänenstruktur von CapG in <i>D. melanogaster</i>	90
3.2. CapG liegt während der Interphase am Heterochromatin lokalisiert vor	91
3.3. Regulation von CapG durch graduelle Phosphorylierung	94
3.4. Biologische Funktionalität der N-terminalen zwei-Drittel von CapG	95
3.5. Die initiale Chromatinassoziation von CapG muss nicht zwingend am Zentromer stattfinden	95

3.6. Die Expression verkürzter CapG ^{NM} -EGFP Transgene führt zu SAC-vermittelter Verzögerung der Mitose.....	96
3.7. CapG liegt in der Fliege in verschiedenen Isoformen vor, welche gleichermaßen durch Phosphorylierung reguliert werden	97
3.8. Lokalisation und Funktion von CapG in weiblichen Fortpflanzungsorganen.....	98
3.9. Lokalisation von CapG und CapD2 in männlichen Fortpflanzungsorganen.....	100
3.10. Genetische Interaktion von CapG mit CapH2 und CapD3	101
3.11. Die Komposition löslicher Condensin-Komplexe	103
3.12. Identifikation von Interaktionspartnern der Condensin-Untereinheiten.....	105
3.13. <i>In vitro</i> Rekonstitution der Condensin-Komplexe.....	106
4. Materialien und Methoden.....	109
4.1. Material.....	109
4.1.1. cDNA-Plasmide.....	109
4.1.2. Vektoren.....	109
4.1.3. Oligonukleotide.....	109
4.1.4. Fliegenstämme.....	110
4.1.5. Antikörper.....	112
4.2. Umgang mit <i>Drosophila melanogaster</i>.....	113
4.2.1. Standardmethoden.....	113
4.2.2. Transformation von <i>D. melanogaster</i> -Embryonen durch Mikroinjektion und Kartierung von Transgeninsertionen.....	113
4.2.3. Embryonenkollektion.....	113
4.2.4. Immunfluoreszenzfärbung von Embryonen	113
4.2.5. Immunfluoreszenzfärbung von Speicheldrüsen, Fliegenovarien und Testis	114
4.3. Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	114
4.4. Molekularbiologische Methoden.....	115
4.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	115
4.4.2. DNA-Fragmentierung durch Restriktionsendonukleasen.....	115
4.4.3. Enzymatische Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	115
4.4.4. Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten.....	115
4.4.5. Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Bakterien.....	115
4.4.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Bakterien.....	116
4.4.7. Agarosegelelektrophorese und Extraktion von DNA-Fragmenten.....	116

4.4.8. Präparation genomischer DNA aus Fliegenembryonen.....	116
4.4.9. Präparation von RNA aus Fliegengeweben und Reverse Transkription.....	116
4.4.10. Sequenzierung und Sequenzvergleiche.....	116
4.5. Proteinbiochemische Methoden.....	117
4.5.1. Herstellung von Affinitätsmatrizes auf Basis von Protein A-Sepharose.....	117
4.5.1.1. Kopplung polyklonaler Antikörper.....	117
4.5.1.2. Kopplung von monoklonalen Maus-Hybridomaüberständen.....	117
4.5.2. Herstellung nativer Proteinextrakte aus <i>D. melanogaster</i> -Geweben und anschließende Immunpräzipitation.....	117
4.5.3. Proteinpräparation von <i>D. melanogaster</i> -Embryonen in verschiedenen Phasen der Mitose 14.....	118
4.5.4. Demecolzinbehandlung von <i>D. melanogaster</i> -Embryonen.....	119
4.5.5. Phosphatasebehandlung von <i>D. melanogaster</i> -Embryonen.....	119
4.5.6. Herstellung denaturierender Extrakte aus <i>D. melanogaster</i> -Geweben.....	119
4.5.7. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	119
4.5.8. Westernblot und immunologischer Nachweis (Immunblot)	120
4.5.9. Detektion von Proteinen im SDS-Gel durch Autoradiografie.....	120
4.5.10. Silberfärbung von SDS-Gelen.....	120
4.5.11. Kolloidale Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen.....	120
4.5.12. Massenspektrometrische Analyse.....	121
4.6. <i>In vitro</i>-Interaktionsassay.....	121
4.6.1. Überprüfung des Proteinmodells von CapD3.....	121
4.6.2. <i>In vitro</i> Translation (IVT) und Immunpräzipitation	122
4.7. Programme zur Vorhersage von Proteinstruktur und Phosphorylierungsstellen.....	123
4.8. Puffer und Lösungen.....	123
5. Abkürzungsverzeichnis.....	126
6. Referenzen.....	128
7. Anhang.....	137
8. Danksagung.....	160
9. Lebenslauf.....	161

Zusammenfassung

Die akkurate Verteilung der Chromosomen während der Mitose ist essentiell für die genetische Stabilität der Zellen. Der heteropentamere Condensin-Komplex ist hierbei an der Strukturierung der Chromosomen und deren physikalischer Stabilität während der Segregation maßgeblich beteiligt. In höheren Eukaryoten konnten zwei dieser Komplexe (Condensin I und Condensin II) identifiziert werden, die ihrerseits eine distinkte subzelluläre Lokalisation während der Interphase und auch Beladung an das mitotische Chromatin aufweisen. Die beiden Komplexe haben die *Structural maintenance of chromosomes* (SMC) Untereinheiten SMC2 und SMC4 gemein, während sie sich in den nicht-SMC-Untereinheiten unterscheiden: In Condensin I findet man die Komponenten *Chromosome associated protein D2* (CapD2), CapG und CapH und in Condensin II die verwandten Proteine CapD3, CapG2 und CapH2. Während in Vertebraten die Rolle beider Condensin-Komplexe während der Mitose klar etabliert ist, zeichnet sich in *Drosophila melanogaster* ein anderes Bild ab. Mutanten in den Genen CapH2 und CapD3 zeigen keine mitotischen Phänotypen und ein zu CapG2 homologes Protein konnte bisher nicht identifiziert werden. Da CapG aus *Drosophila* ein ähnliches Lokalisationsverhalten wie die Condensin II-Untereinheiten der Vertebraten aufweist, wird CapG als Komponente beider Condensin-Komplexe diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktion und die Regulation von CapG in *Drosophila melanogaster*, primär durch die Analyse von EGFP-fusionierten Proteinvarianten, näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von CapG neben den hauptsächlichen Phosphorylierungsstellen auch Kernimportsequenzen enthält, welche die subzelluläre Lokalisation des Proteins während des Zellzyklus regulieren. Während der Interphase zeigt CapG im Zellkern eine Kolo-kalisation mit dem Heterochromatin-bindenden Protein HP1, was auf eine direkte Chromatinassoziation von CapG hinweist und mögliche Chromatin-strukturierende Funktionen bestätigen würde. Diese Heterochromatin-spezifische Lokalisation kann vom C-terminalen Drittel von Cap-G vermittelt werden, der andererseits für die generelle Chromatinassoziation während der Mitose, die Interaktion mit den anderen Condensin I-Untereinheiten und für die Funktionalität von CapG während der somatischen Mitosen entbehrlich ist. Da ein Proteinfragment entsprechend der N-terminalen Zwei-Drittel von CapG (CapG^{NM}) während der Interphase hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert ist, kann die präferentielle Kernlokalisation von CapG während der Interphase, und auch die Phospho-

Regulation des Proteins, für die Entwicklung vom Beginn der embryonalen zygotischen Expression bis hin zum adulten Stadium nicht essentiell sein. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Lokalisation von CapG und anderen Condensin Untereinheiten in Geweben der weiblichen und männlichen Keimbahn legt die Vermutung nahe, dass CapG, eventuell im Kontext mit den anderen Condensin-Untereinheiten, eine Rolle bei der Gametogenese zukommt. Konsistent hiermit ist die Beobachtung, dass Weibchen steril sind, die in ihren Keimbahnzellen keine funktionelle CapG-Variante exprimieren. Die Integrität der Ovarien in diesen Tieren spricht für eine Funktion von CapG bei der Reifung des Oozytenkerns oder den meiotischen Teilungen.

Die Präsenz von CapG in löslichen Komplexen mit den bekannten Condensin I-Untereinheiten konnte in dieser Arbeit durch Koimmunpräzipitationen mit nachfolgender massenspektroskopischer Bestimmung der assoziierten Proteine bestätigt werden. Eine Assoziation mit Condensin II-spezifischen Untereinheiten wurde dagegen nicht gefunden. Ebenso assembliert eine ektopisch exprimierte, funktionelle Variante von CapH2 nicht in einem löslichen Komplex mit CapG. Auch die Analyse direkter Protein-Protein-Interaktionen in einem *in vitro*-System ergab keine Hinweise auf eine Assoziation von CapG mit Condensin II-spezifischen Untereinheiten. Dagegen konnten in diesem System die Interaktionen nachvollzogen werden, die für Condensin I und Condensin II aus anderen Systemen publiziert und somit erwartet sind. Experimente zur genetischen Interaktion der Condensin-Untereinheiten offenbarten bei Anwesenheit von *CapG*-Mutationen eine Suppression des Phänotyps, der nach Überexpression von *CapH2* in Speicheldrüsen erhalten wird. In einem reziproken Ansatz führten *CapG*-Mutationen zu einer Verstärkung des *CapH2*-mutanten Phänotyps in den Nährzellen von Ovarien. *CapH2* und *CapG* scheinen also auf genetischer Ebene miteinander zu interagieren. Zusammengefasst legen die Ergebnisse ein Modell nahe, in dem CapG zwar nicht in direkter Assoziation mit Condensin II-spezifischen Komponenten vorliegt, aber parallel an der Strukturierung von Chromatin beteiligt ist und funktionell zum Teil mit den Aufgaben der Condensin II-spezifischen Komponenten überlappt.

Summary

The faithful segregation of sister chromatids during mitosis is essential for the inheritance of the genome. Here, the heteropentameric condensin complex is important for a robust structure of the chromosomes and for their accurate segregation during anaphase. Two related complexes, condensin I and condensin II, have been identified in higher eukaryotes. The two complexes exhibit distinct localization patterns during the cell cycle and a distinct association with mitotic chromatin. Both complexes are built on a framework of the two structural maintenance of chromosomes (SMC) subunits SMC2 and SMC4, and a distinct set of non-SMC-subunits: Condensin I contains Chromosome associated protein D2 (CapD2), CapG and CapH, condensin II the related proteins CapD3, CapG2 and CapH2. Whereas for both complexes clear functions could be established during mitosis in vertebrates, the situation in *Drosophila melanogaster* is ambiguous. In *Drosophila*, mitosis is undisturbed in the absence of CapH2 or CapD3, and so far no homolog for CapG2 could be identified. However, the localization pattern of CapG is similar to the vertebrate Condensin II specific subunits. Hence it is speculated, that CapG can be part of both condensin complexes of *Drosophila melanogaster*.

In this study, the function and regulation of CapG in *Drosophila melanogaster* was scrutinized by analyzing a set of EGFP-fused protein variants. It was shown, that the C-terminal part of CapG contains the major phosphorylation sites and also nuclear import sequences, thereby regulating the subcellular localization of CapG during the cell cycle. Furthermore, during interphase, colocalisation of CapG with the heterochromatin binding protein HP1 was shown, which implies a direct chromatin binding of CapG and supports a previously reported role of CapG in the regulation of heterochromatic gene expression. The targeting to heterochromatin is mediated by the C-terminal part of CapG. Surprisingly, this protein fragment is neither essential for chromatin association during mitosis, nor for the interaction with the other condensin I subunits, nor for the function of CapG during the somatic cell divisions in *Drosophila* embryos. Contrariwise, a protein fragment consisting of the N-terminal two-thirds of CapG (CapG^{NM1}) is able to provide the protein function required for the development from an embryo to an adult fly, after the exhaustion of maternal contribution. Thus, the subcellular localization of CapG during interphase and also its C-terminal phospho-regulation are not essential for protein function during these stages of development. Furthermore, a unique localization of CapG and its condensin I binding partner CapD2 was shown in germline tissues of adult flies, which implies a specific function of condensin I during gametogenesis. Consistent with this notion, females lacking a functional

version of CapG during oogenesis are sterile. Nevertheless, ovaries dissected from these females did not show obvious defects, an observation which implies a function of CapG during oocyte maturation or the meiotic divisions.

The composition of soluble condensin I complexes was verified by the precipitation of individual components from *Drosophila* embryo and ovary extracts and subsequent analysis of their interacting proteins via mass spectrometry. In contrast, an interaction of CapG and endogenous condensin II-specific components could not be demonstrated. Furthermore, an ectopically expressed CapH2-variant was not found to associate with CapG. The additional analysis of direct protein-protein interactions using an *in vitro* assay also did not reveal an interaction between CapG and the condensin II-specific components. Rather the established geometry of the condensin I or condensin II complex components was confirmed in this assay.

Nevertheless, genetic interaction assays revealed that the phenotypes obtained after overexpression or mutation of genes encoding condensin II specific components are modified by mutations in *CapG*. CapH2 and CapD3 can promote the disassembly of polytene structures into chromosomal components in the ovarian nurse cells and also in the salivary glands. In this context, it was shown that the *CapH2*-overexpression phenotype is suppressed, and the *CapH2*-mutant phenotype is enhanced, in a *CapG* heterozygous mutant background. Thus, there is a genetic interaction between *CapH2* and *CapG* in these tissues. Taken together, these results reveal that CapG, even if it is not directly associated within a condensin II complex, contributes to chromatin organization in a manner that partially overlaps with the function of the condensin II-specific subunits.

1. Einleitung

1.1. Der Zellzyklus

Durch Zellteilung können aus einer Zelle zwei genetisch identische Tochterzellen hervorgehen. Sie ist somit die Grundlage für die Existenz aller multizellulären Organismen. Die Ereignisse, die in einer Zelle von einer Teilung bis hin zur nächsten stattfinden, werden im Zellzyklus zusammengefasst. Der Zellzyklus muss ein sehr strukturierter und regulierter Prozess sein. Er kann in zwei hauptsächliche Phasen unterteilt werden (Abbildung 1). Die **Interphase** ist die längere der beiden und wird als die Periode zwischen zwei Zellteilungen definiert. In dieser Phase werden essentielle Zellbestandteile synthetisiert, die DNA wird repliziert und Zellwachstum findet statt. Während der **Mitose** hingegen werden die Verteilung der Chromosomen und des Zellkerns bewerkstelligt. In der folgenden Zytokinese wird die Zellteilung schließlich durch die Teilung des Zytoplasmas vervollständigt.

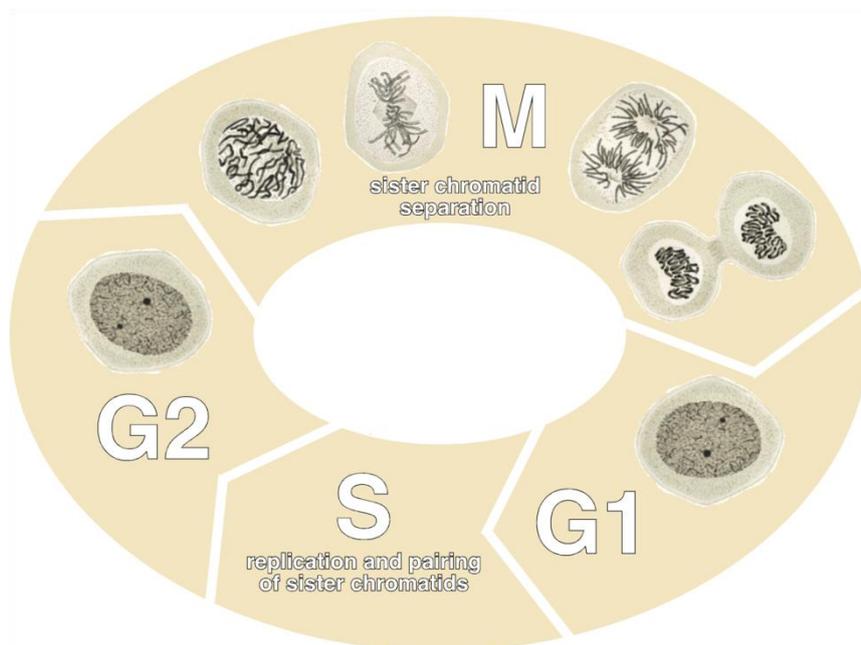


Abbildung 1: Der eukaryotische Zellzyklus. Der Zellzyklus bezeichnet die zyklische Abfolge von Ereignissen innerhalb der Zelle, die zwischen zwei Zellteilungen stattfinden. Während der Interphase finden Zellwachstum, die Synthese von Nährstoffen und die Duplikation der Chromosomen statt. Zur Teilung der Zelle werden zuerst die Kernbestandteile aufgeteilt (Mitose) aus denen anschließend durch die Zellteilung (Zytokinese) zwei genetisch identische Tochterzellen gebildet werden können. (Cartoon von O. Stemmann mit Zeichnungen von W. Flemming.)

1.1.1. Die Interphase

Während der **Interphase** liegt das Chromatin hauptsächlich entspiralisiert und verteilt im Lumen des Zellkerns vor, einzelne Chromosomen sind nicht erkennbar. Die Interphase kann ihrerseits in 3 Abschnitte untergliedert werden.

Direkt nach der Mitose schließt eine sogenannte *Gap*-Phase, die **G1-Phase** an. Hier finden überwiegend metabolische Prozesse wie Proteinbiosynthese und RNA-Synthese statt. Die Zelle ist außerdem empfänglich für intra- und extrazelluläre Signale. Als Reaktion auf diese Signale kann die Zelle in einen neuen Zellzyklus eintreten um sich erneut zu teilen, sie kann sich differenzieren oder aber auch in einen nicht proliferierenden Zustand (G0) übergehen. Weiter im Zellzyklus schließt die **S-Phase** an. Diese dient der Verdopplung der DNA (Replikation). Während der DNA-Replikation werden zwei identische Kopien jedes Chromosoms erstellt, so dass zum Ende der S-Phase jedes Chromosom aus zwei Schwesterchromatiden besteht. Während der S-Phase werden auch die Zentrosomen dupliziert, die später als zentraler Bestandteil der mitotischen Spindel fungieren. Nach Beenden der Replikation schließt erneut eine *Gap*-Phase, die **G2-Phase** an. Es findet weiteres Wachstum der Zelle und eine Vorbereitung auf die folgende Mitose statt.

1.1.2. Die Mitose

Im ersten Teil der Mitose, der **Prophase**, beginnt die Vorbereitung des Chromatins für die Segregation. Die Chromosomenkondensation findet statt, bei der das Chromatin zu kompakten aber trotzdem flexiblen Strukturen gepackt wird, die von der mitotischen Spindel transportiert werden können. Es entstehen definierte Chromosomen, deren Schwesterchromatiden hauptsächlich am Kinetochor zusammengehalten werden. Die replizierten Zentrosomen wandern zu den entgegengesetzten Zellpolen und bilden dort die mitotische Spindel aus. Die **Prometaphase** beginnt bei höheren Eukaryoten mit dem Auflösen der Kernhülle. Dadurch können Mikrotubuli der entgegengesetzten Zellpole in der Mitte der Zelle überlappen und eine stabile, bipolare Spindel ausbilden. Außerdem heften die Mikrotubuli an den Kinetochoren der Schwesterchromatiden an und bewirken deren Migration zur Zellmitte. In der **Metaphase** sind die Schwesterchromatiden dann im Zentrum der Spindel entlang der Metaphasenplatte angeordnet. Erst wenn alle Kinetochore der Schwesterchromatiden bipolar an den Mikrotubuli angeheftet sind, setzt die **Anaphase** ein. Die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden wird

nun abrupt aufgelöst und diese können durch die Zugkraft der Mikrotubuli zu unterschiedlichen Zellpolen gezogen werden. Haben die Schwesterchromatiden die entgegengesetzten Zellpole erreicht, wird die Mitose durch die **Telophase** abgeschlossen. Die Spindel löst sich auf, die Chromosomen decondensieren und eine neue Kernhülle wird gebildet.

1.2. Die Chromatinstrukturierung im Verlauf des Zellzyklus

Eine erfolgreiche Weitergabe des kompletten genetischen Materials ist das maßgebliche Ziel des Zellzyklus. Das Erbmateriale liegt in der Zelle in Form von Chromosomen vor, welche während der Zellteilung akkurat verdoppelt und verteilt werden müssen. In eukaryotischen Zellen sind die vier hauptsächlichen Etappen der Chromatinstrukturierung (DNA-Replikation, Etablierung von Kohäsion, Chromosomenkondensation und Chromosomensegregation) zeitlich an distinkte Phasen des Zellzyklus geknüpft.

1.2.1. Die Chromatinstruktur während der Interphase

Während der Interphase liegt das Chromatin zwar decondensiert, aber dennoch definiert strukturiert vor. Hierbei müssen zwei wichtige Punkte gewährleistet werden. Zum einen muss das Chromatin so kompakt sein, dass es in die Zelle passt und zum anderen muss es flexibel genug sein, um die Zugänglichkeit der DNA für Transkription und Replikation sowie für Reparaturmechanismen zu gewährleisten. Das Chromatin kann in der Interphase in zwei funktionell und strukturell unterschiedliche Bereiche unterteilt werden. Den Großteil bildet hierbei das transkriptionsaktive Euchromatin, welches partiell decondensiert werden kann. Dichter gepackt und transkriptionsinaktiver liegt das Heterochromatin vor. Dieses ist durch repetitive Sequenzen, Hypoacetylierungen der Histonschwänze (Jeppesen et al., 1992) und Methylierung des Histon H3 am Lysinrest 9 (H3K9^{Me}) (Peters et al., 2001) charakterisiert. Ein weiteres Merkmal des Heterochromatins ist die Anreicherung des HP1. HP1 ist ein kleines Protein, welches erstmals in *D. melanogaster* beschrieben wurde (James und Elgin, 1986). Mittels einer Chromodomäne kann HP1 spezifisch am H3K9^{Me} binden und durch Komplexbildung mit einer Methyltransferase (Su(var)3-9), die Methylierung weiterer Histone vermitteln. Somit kann durch HP1 die Assemblierung und auch Ausbreitung von Heterochromatinbereichen gesteuert werden (Talbert und Henikoff, 2006).

1.2.2. DNA-Replikation und Etablierung der Kohäsion

Die DNA-Replikation findet während der S-Phase statt. Durch die antiparallele und komplementäre Struktur der DNA-Doppelhelix, kann jeder der beiden DNA-Stränge als Matrize für die Synthese eines neuen DNA-Strangs dienen. Jedes Chromosom besteht zum Ende der S-Phase somit aus zwei genetisch identischen Schwesterchromatiden. Eine Verteilung dieser Schwesterchromatiden in die Tochterzellen findet allerdings erst während der M-Phase statt. In der zwischengelagerten G2-Phase muss folglich das Auseinanderdriften der Schwesterchromatiden verhindert werden. Dies wird zum einen durch die Verwicklungen der duplizierten DNA-Moleküle gewährleistet, die während der Replikation entstehen, wenn zwei benachbarte Replikationsgabeln aneinander treffen (Murray und Szostak, 1985; Sundin und Varshavsky, 1980). Diese DNA-Katenierungen werden allerdings bis zur Mitose durch die Topoisomerase II (Topo II) weitgehend aufgelöst. Zum anderen wird durch den Kohäsion-Komplex, der an den duplizierten DNA-Molekülen assembliert und diese zusammenhält, eine Kohäsion zwischen den Chromatiden vermittelt (Ivanov und Nasmyth, 2007).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der Kohäsion-Komplex eine Schlüsselrolle bei der Chromatidenkohäsion spielt und essentiell für eine akkurate Segregation ist (Guacci et al., 1997; Losada et al., 1998; Michaelis et al., 1997). Er besteht aus den Kernuntereinheiten SMC1 und SMC3, einer Kleisin-Untereinheit und einer weiteren akzessorischen Untereinheit (Nasmyth und Haering, 2005; Nasmyth und Haering, 2009). Die beiden Kernuntereinheiten SMC1 und SMC3 besitzen lange, antiparallele *coiled-coil* Regionen, die durch eine Gelenkregion unterbrochen sind. Durch Dimerisierung beider SMC-Proteine an deren Gelenkregionen, können Heterodimere gebildet werden (Abbildung 2A). Die N- und C-Termini beider SMC-Proteine bilden nach Proteinfaltung jeweils eine Kopfdomäne aus, wobei die Kopf-Domäne von SMC1 einem *Walker A*-Motiv entspricht, die von SMC3 hingegen einem *Walker B*-Motiv. Die Kopfdomänen beider SMC-Proteine können miteinander interagieren und eine gemeinsame ATPase-Domäne ausbilden (Abbildung 2A). Durch ATP-Bindung kann wahrscheinlich eine Assoziation beider Kopfdomänen erreicht werden, hingegen sollte die ATP-Hydrolyse die Abkoppelung der Kopfdomänen bewirken (Abbildung 2B). Die dritte Kohäsion-Untereinheit, *Sister-chromatid cohesion 1* (Scc1), gehört zur Familie der Kleisine (Schleiffer et al., 2003). Indem der N-Terminus von Scc1 an die Kopfdomäne von SMC3 und der C-Terminus an die Kopfdomäne von SMC1 bindet, kann ein dreigliedriger Ring mit einem Durchmesser von 35 nm ausgebildet werden (Gruber et al., 2003) (Abbildung 2A). In eben diesem Ring werden nach dem favorisierten Modell

die Schwesterchromatiden zusammengehalten. Am Scc1 wiederum kann die Kohäsin-Untereinheit *Sister-chromatid cohesion 3* (Scc3) anlagern (Abbildung 2A). Scc3 enthält charakteristische *Huntingtin, Elongation factor 3, the A subunit of protein phosphatase 2A, TOR lipid kinase (HEAT)-Repeat-Motive*. Diese ca. 30 Aminosäuren enthaltenden Motive vermitteln Protein-Protein-Interaktionen (Neuwald und Hirano, 2000).

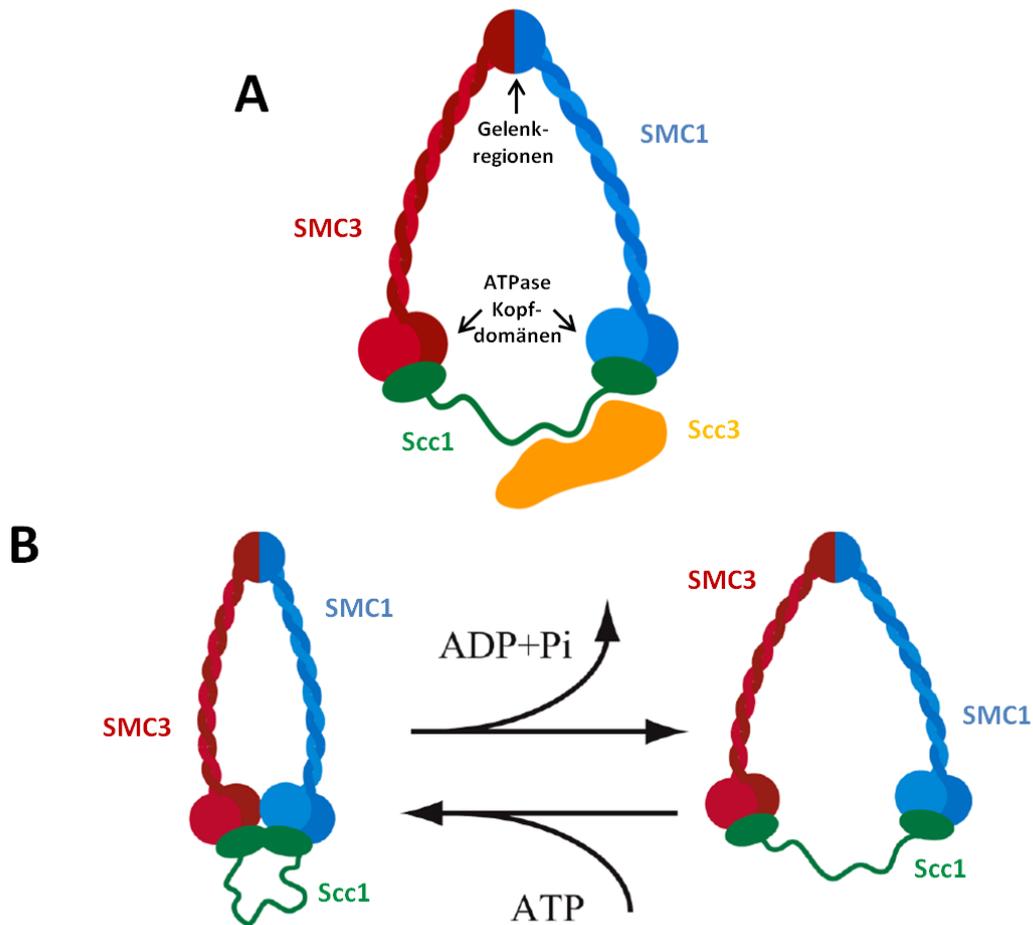


Abbildung 2: Struktur des Kohäsin-Komplexes und ATPase-Zyklus. A) Schematische Darstellung des Kohäsin-Komplexes. Die beiden SMC-Proteine bilden ein V-förmiges Heterodimer aus. Die beiden Kopfdomänen der SMC-Proteine werden durch Scc1 verbunden, an dem die akzessorische Untereinheit Scc3 anlagert. **B)** ATPase-Zyklus der SMC-Proteine. Durch die Bindung von ATP können die Kopfdomänen aneinander anlagern. Die ATP-Hydrolyse hingegen bewirkt wahrscheinlich das Loslösen beider Kopfdomänen. Modifiziert nach Nasmyth und Haering (2009).

1.2.3. Chromosomenkondensation und Resolution der Chromatiden

Da die Schwesterchromatiden zu Beginn der Mitose noch massiv verwickelt und außerdem im gesamten Zellkern verteilt sind, wäre es unmöglich, sie in solch einer Form erfolgreich zu segregieren. Der Eintritt in die Mitose geht daher mit einer massiven Umstrukturierung der Chromosomen einher. Diese müssen kompaktiert und individualisiert werden.

Eine Kompaktierung wird durch die **Chromosomenkondensation** vermittelt, bei welcher das Chromatin in robuste, stabartige Strukturen gepackt wird. Diese physikalische Verdichtung ermöglicht eine Kernteilung innerhalb der Dimension einer biologischen Zelle. Durch die Replikation und die Ausdehnung des Chromatins während der Interphase entstehen außerdem Verknüpfungen zwischen den Schwesterchromatiden aber auch zwischen benachbarten Chromosomen. Diese Verknüpfungen müssen aufgelöst und reorganisiert werden, man spricht von der **Chromatidenresolution**. Es entstehen letztlich kompaktierte, sehr definierte aber trotzdem dynamische Chromosomenstrukturen, welche den Kräften der mitotischen Spindel in der Anaphase standhalten und durch diese ebenso erfolgreich segregiert werden können.

1.2.4. Mechanismen der Chromosomenkondensation

Die Grundeinheit der DNA-Anordnung stellt das Nucleosom dar. 147 Basenpaare der DNA werden hierbei innerhalb 1,67 linksgedrehter Windungen um ein Oktamer aus Histonproteinen (jeweils zwei Kopien H2A, H2B, H3 und H4) gewickelt (Eickbush und Moudrianakis, 1978). Diese Histonoktamere sind entlang der DNA in einem Abstand von etwa 200 Basenpaaren angeordnet. Die Perlenkettenstruktur oder auch 10 nm-Faser bewirkt eine 3-fache Verkürzung der DNA-Moleküle (Richmond et al., 1984). Eine weitere 6- bis 7-fache Kompaktierung wird bis hin zur sogenannten 30 nm-Faser erreicht. Hierbei könnte die Anlagerung des Histon H1, welches die DNA an Bereichen außerhalb des Histon-Kerns bindet, eine Rolle spielen (Oudet et al., 1975; Suau et al., 1979). Nach Depletion von H1 in *Xenopus laevis*-Eizellextrakten (Ohsumi et al., 1993), oder des *H1*-Gens in *Tetrahymena* (Shen et al., 1995) konnte allerdings trotzdem eine normale Chromosomenkondensation beobachtet werden, was die Rolle von H1 wiederum in Frage stellt. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die 30 nm-Fasern durch Interaktionen der Nucleosomen selbst gebildet werden könnten (zusammengefasst in Li und Reinberg (2011)).

Bis hin zur Mitose muss eine weitere 200- bis 500-fache Kompaktierung der 30 nm-Faser bewerkstelligt werden. Der genaue Mechanismus ist hierbei bisher nicht vollständig aufgeklärt, es werden aber verschiedene Modelle vorgeschlagen.

Basierend auf dem **coiled/radial loop-Modell** würde die 30 nm-Chromatinfaser entlang eines axialen Chromosomengerüsts in Schlaufen gewickelt (Marsden und Laemmli, 1979; Paulson und Laemmli, 1977). Dieses Gerüst ist aus verschiedenen nicht-Histon Proteinen aufgebaut, einschließlich Topoisomerase II (Topo II) (Earnshaw et al., 1985; Gasser et al., 1986; Lewis und Laemmli, 1982) und SMC2, einer Kernuntereinheit des Condensin-Komplexes (Lewis und Laemmli, 1982; Saitoh et al., 1994). An der Verankerung der Chromatinschleifen könnten wiederum spezifische AT-reiche Sequenzen der DNA wichtig sein. Diese werden als *scaffold associated region* (SAR) bezeichnet (Mirkovitch et al., 1984; Razin, 1996). Konsistent zu diesem Modell wurden nach Präzipitation von Metaphase-Chromosomen Topo II (Earnshaw und Heck, 1985; Gasser et al., 1986) und SMC2 (Saitoh et al., 1994) als hauptsächlich assoziierte Proteine erhalten. Auch weitere Experimente deuteten auf eine zentrale Rolle beider Proteine bei der Chromosomenkondensation hin. So konnte nach Inhibition der Topo II eine verminderte Chromosomenkondensation beobachtet werden (Gorbsky, 1994). Durch Hinzufügen des Condensin-Komplexes konnte eine *in vitro* Chromosomenkondensation in mitotischen *X. laevis*-Eizellextrakten vermittelt werden (Hirano et al., 1997). Weiterhin wurde durch Immunfluoreszenzfärbung der Condensin-Untereinheiten (Maeshima und Laemmli, 2003; Ono et al., 2003) und direkter *in vivo* Mikroskopie der EGFP-markierten Topo II (Tavormina et al., 2002) eine axiale Lokalisation dieser Proteine an nativen Metaphase-Chromosomen bestätigt. Dem Modell widersprechend, konnte durch spätere *in vivo* Studien gezeigt werden, dass Topo II und SMC2 erst während der späten Prophase am Chromatin lokalisieren (Kireeva et al., 2004; Maeshima und Laemmli, 2003), zu einem Zeitpunkt, an dem die Kondensation bereits weit fortgeschritten ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch nach Depletion bzw. *knockdown* von Topo II (Carpenter und Porter, 2004; Sakaguchi und Kikuchi, 2004) oder SMC2 (Hudson et al., 2003) eine Chromosomenkondensation möglich ist.

Ein weiteres Modell ist das **hierarchical folding-Modell**. Gemäß diesem Modell wird eine weitere stufenweise Auffaltung der 10 nm und 30 nm-Fasern in eine definierte Hierarchie höhergeordneter Ebenen vorgeschlagen. Die entstehenden Fasern könnten sich dann weiter zu den Metaphase-Chromosomen aufwinden (Belmont et al., 1987; Sedat und Manuelidis, 1978; Zatsepina et al., 1983).

Beide beschriebenen Modelle werden im **hierarchical folding axial glue-Modell** vereinigt (Abbildung 3). Hier ist die initiale Faltung der Chromatinfasern in frühe Prophase-Chromosomen gefolgt von einer weiteren Faltung in dichte Chromatiden von ca. 200-300 nm bis zur mittleren Prophase. Eine weitere Verdrillung dieser Chromatide bis zur Prometaphase bewirkt eine zusätzliche Kompaktierung, was zur Ausbildung der Metaphase-Chromosomen führt. Diese

könnten einen sehr dynamischen Kern enthalten, welcher aus einem Geflecht an vernetztem Chromatin und ebenso aus nicht-Histon Proteinen wie Topo II und SMC2 aufgebaut sein könnte. Eine Chromosomenkompaktierung könnte so auch ohne Topo II und SMC2 vermittelt werden, zur Stabilität und Funktion der Metaphase-Chromosomen hingegen wären diese Proteine essentiell (Kireeva et al., 2004).

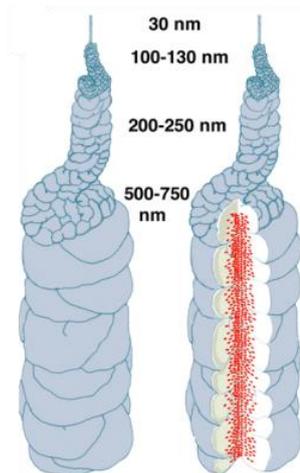


Abbildung 3: Darstellung des *hierarchical folding axial glue-Modells*. Die 30 nm-Fasern der Interphase-Chromosomen werden zu 100-130 nm-Fasern aufgefaltet, welche in der mittleren Prophase zu 200-250 nm Chromatiden verdrillt werden. Bis zur Metaphase wird eine maximale Kompaktierung von 500-750 nm erreicht. Im axialen Kern der Chromatiden finden sich Condensin und Topo II (rote Kugeln), welche die Chromatiden als eine Art axialer „Kleber“ stabilisieren könnten. Entnommen aus Kireeva et al. (2004).

Durch 4-dimensionale Mikroskopie von Säugerzellen, welche ein EGFP-markiertes *Histon 2B* exprimieren, konnte die Kondensation der Chromosomen in lebenden Zellen verfolgt und deren Volumen quantifiziert werden (Mora-Bermudez et al., 2007). Wie erwartet konnte eine Reduktion dieses Volumens von der Interphase über die Prophase zur Metaphase beobachtet werden. Überraschenderweise war in der Metaphase noch keine maximale Kompaktierung der Chromosomen erreicht. Erst während der Anaphase wurde das Minimalvolumen der Chromosomen durch ein maximal-axiales Verkürzen der einzelnen Chromatiden bewirkt. Während die Lokalisation der Aurora B Kinase an den Spindelmikrotubuli essentiell für diese Anaphasen-Kompaktierung ist, konnten keine Effekte nach Depletion der Condensin-Komplexe beobachtet werden. Dieser weitere Kompaktierungsmechanismus während der Anaphase bietet eventuell eine zusätzliche Möglichkeit noch bestehende Chromatidverwicklungen aufzulösen um die Chromatiden unversehrt segregieren zu können (Mora-Bermudez et al., 2007).

1.2.5. Chromosomensegregation

Die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden muss im Wesentlichen bis zu deren Segregation in der Anaphase erhalten bleiben. In höheren Eukaryoten erfolgt die Aufhebung der Kohäsion in zwei Schritten. Ein Großteil des Kohäsins wird bereits in der Prophase von den

Chromosomenarmen abgelöst (Losada et al., 1998; Sumara et al., 2000; Waizenegger et al., 2000). Dieser Vorgang, der als **Prophaseweg** bezeichnet wird, wird durch die Kinase *Polo-like kinase 1* (Plk1) ermöglicht (Hauf et al., 2005; Lenart et al., 2007; Sumara et al., 2000). Plk1 phosphoryliert die mitotische Kohäsin-Untereinheit Scc3 (Hauf et al., 2005), wodurch wahrscheinlich der Kohäsin-Komplex dissoziiert. Der grundlegende Mechanismus ist hierbei nicht bekannt, es wird aber eine Funktion der Proteine *Wings apart-like* (Wapl) und Pds5 vermutet (Gandhi et al., 2006; Hartman et al., 2000; Panizza et al., 2000). Ein Teil des Kohäsins bleibt an den Zentromeren der Chromosomen erhalten. Verantwortlich hierfür ist ein am Zentromer-assoziiertes Protein, das als Shugoshin bezeichnet wird. Dieses wirkt der Plk1-abhängigen Phosphorylierung von Scc3 durch Rekrutierung der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) entgegen (Kitajima et al., 2006). Erst nach korrekter Anlagerung der Spindelmikrotubuli an den Kinetochoren der Schwesterchromatide kann die **zweite Phase** der Kohäsinabspaltung einsetzen und die Schwesterchromatiden können zu entgegengesetzten Zellpolen gezogen werden. Dies wird mittels proteolytischer Spaltung der Kohäsin-Untereinheit Scc1 durch die konservierte Cystein-Protease Separase ermöglicht (Uhlmann et al., 2000; Waizenegger et al., 2000). Die Separase muss hierbei bis zum Einsetzen der Anaphase inaktiv bleiben. Dies wird einerseits durch den inhibitorischen Kofaktor Securin ermöglicht, der die Separase durch eine direkte Bindung inaktiviert, bis alle Kinetochore der Schwesterchromatiden korrekt an der Mitotischen Spindel angelagert sind (Ciosk et al., 1998; Yamamoto et al., 1996; Zou et al., 1999). Erst zum Eintritt in die Anaphase wird die Inhibition der Separase durch Degradation von Securin aufgehoben (Cohen-Fix et al., 1996; Zou et al., 1999). Außerdem wird die phosphorylierte Form der Separase durch Bindung an den Ckd1-Cyclin B1-Komplex reguliert (Gorr et al., 2005; Stemmann et al., 2001).

1.3. Der Condensin-Komplex

1.3.1. Identifikation des Condensin

Erstmals wurde Condensin nach Experimenten in zellfreien Eizellextrakten aus *X. laevis* beschrieben. Nach Depletion von X-CapC/SMC4 durch spezifische Antikörper konnte gezeigt werden, dass dieses Protein wichtig für die Chromosomenkondensation aber auch für den Erhalt mitotischer Chromosomen *in vitro* ist (Hirano und Mitchison, 1994). SMC4 bildet zusammen mit SMC2 einen Kernkomplex aus, der mit drei weiteren Proteinen assoziiert (Kimura und Hirano, 1997). Dieser Komplex ist in der Lage, eine *in vitro* Chromosomenkondensation zu vermitteln

(Hirano et al., 1997) und wurde daher als Condensin benannt. Durch die Arbeitsgruppe um Hirano konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Condensin-Komplex *in vitro* an DNA binden und abhängig von Topoisomerase I (Topo I) und ATP positive Windungen in die DNA einfügen kann (Kimura und Hirano, 1997). Später wurde auch der humane Condensin-Komplex identifiziert, welcher ebenso positive Windungen in die DNA einfügen konnte und sogar befähigt war, in mitotischen *X. laevis*-Eizellextrakten eine Chromosomenkondensation zu vermitteln (Kimura und Hirano, 2000). Das deutete auf eine hohe Konservierung und Bedeutung des Condensin-Komplexes hin. In *HeLa*-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) und auch im *X. laevis*-Eizellextrakt konnte schließlich noch ein weiterer Condensin-Komplex identifiziert werden, der chronologisch als Condensin II bezeichnet wurde (Ono et al., 2003; Yeong et al., 2003).

1.3.2. Aufbau der Condensin-Komplexe

Analog zum Kohäsion-Komplex wird auch der Kern der Condensin-Komplexe in Eukaryoten aus einem Heterodimer von SMC-Proteinen gebildet. Neben diesem zentralen SMC2/SMC4-Heterodimer sind die Condensin-Komplexe aus 3 weiteren Untereinheiten aufgebaut (Abbildung 4). Charakteristisch für den Condensin I-Komplex sind hierbei CapH, CapG und CapD2, für den Condensin II-Komplex CapH2, CapG2 und CapD3. CapH und CapH2 gehören wie auch das Scc1 Protein des Kohäsion-Komplexes, zur Familie der Kleisine (Schleiffer et al., 2003). Charakteristisch für CapG, CapG2, CapD2 und CapD3 sind wie auch für das Scc3 des Kohäsion-Komplexes, *HEAT-Repeat*-Domänen (Neuwald und Hirano, 2000).

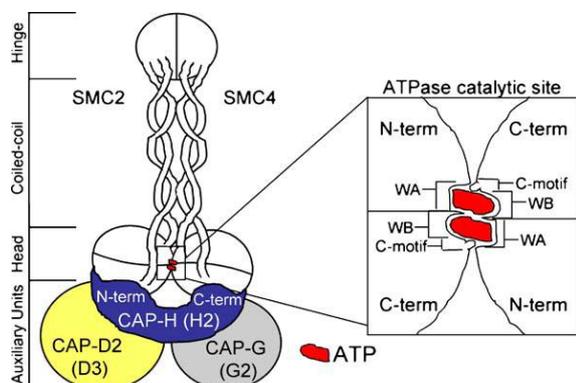


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Condensin-Komplexe. Die Basis beider pentamerer Komplexe bildet ein Heterodimer der Proteine SMC2 und SMC4, welches an den Scharnierdomänen beider Proteine ausgebildet wird. Die Termini beider Proteine bilden eine katalytische ATPase Domäne aus. Hier binden auch die jeweiligen Kleisine, CapH im Condensin I und CapH2 im Condensin II. Diese verbrücken die Interaktion zu den *HEAT-Repeat*-Proteinen CapG und CapD2 (Condensin I) bzw. CapG2 und CapD3 (Condensin II). Entnommen aus Hudson et al. (2009).

Die genaue Geometrie der Condensin-Komplexe wurde am Beispiel der humanen Komplexe untersucht. Einzelne Untereinheiten wurden hierbei in rekombinanten Expressionssystemen

hergestellt und dann auf ihre Wechselwirkungen hin untersucht (Onn et al., 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide SMC-Proteine an den Kopfdomänen durch die Kleisin-Untereinheit CapH verbrückt werden. Die beiden *HEAT-Repeat*-Untereinheiten CapG und CapD2 interagieren nur schwach miteinander und nicht mit den SMC-Untereinheiten. Es konnte eine starke Interaktion von CapH mit CapG und CapD2 festgestellt werden. Die N-terminale Hälfte des CapH verbrückt CapD2 mit SMC2, die C-terminale Hälfte hingegen CapG mit SMC4 (Abbildung 4). Obwohl die Aminosäuresequenzen der nicht-SMC-Untereinheiten beider Condensin-Komplexe sehr divergent sind, konnte ein analoger Aufbau auch für den Condensin II-Komplex gezeigt werden (Onn et al., 2007).

1.3.3. Evolutionäre Konservierung der Condensin-Komplexe

Auch in Bakterien wurden unterschiedliche Klassen von Condensin-Komplexen identifiziert. Diese sind allerdings aus einem SMC-Homodimer und nur zwei weiteren akzessorischen Untereinheiten aufgebaut (Niki et al., 1991; Petrushenko et al., 2011; Volkov et al., 2003; Yamazoe et al., 1999). Modellorganismen, wie *Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa*, die weniger stark kondensierte Metaphase-Chromosomen aufweisen, besitzen nur den Condensin I-Komplex. Höhere Eukaryoten haben hingegen zwei Condensin-Komplexe, weshalb spekuliert wurde, dass ein weiterer Condensin-Komplex Organismen mit komplexeren Chromosomen weitere Ebenen der Strukturierung dieser ermöglichen könnte (Hirano, 2005). In *Caenorhabditis elegans* konnte noch ein weiterer Condensin I-ähnlicher Komplex identifiziert werden, der *Dosage Compensation Complex* (Condensin I^{DC}) (Hagstrom und Meyer, 2003). Dieser wird aus dem SMC2 Homolog MIX1, einer SMC4-Variante (DPY27) und 3 weiteren Proteinen, DPY26, DPY28 und CapG1, gebildet (Csankovszki et al., 2009). Der DCC-Komplex spielt allerdings keine Rolle in der Mitose, er wird vielmehr zur X-Chromosomalen Dosiskompensation der Hermaphroditen benötigt (Hagstrom und Meyer, 2003).

1.3.4. Subzelluläre Lokalisation und Chromatinassoziation der Condensin-Komplexe

Die subzelluläre Lokalisation der Condensin-Komplexe während der Interphase variiert innerhalb der verschiedenen Eukaryoten. Der Condensin-Komplex in *S. cerevisiae* lokalisiert während des gesamten Zellzyklus im Kern (Bhalla et al., 2002; Freeman et al., 2000). In *S. pombe* werden die zytoplasmatisch lokalisierten Condensin-Untereinheiten während der Mitose in den Kern

transportiert (Sutani et al., 1999). In Vertebraten unterscheiden sich die Condensin-Komplexe in ihrer Interphasenlokalisation und ihrer Rekrutierung an das Chromatin. Die Condensin I-spezifischen Untereinheiten sind während der Interphase im Zytoplasma lokalisiert und erhalten einen Zugang zum mitotischen Chromatin erst nach dem Zusammenbruch der Kernhülle (NEBD) zum Ende der Prophase (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2003). Die Condensin II-spezifischen Untereinheiten sind bereits während der Interphase im Kern lokalisiert (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2003; Yeong et al., 2003). So wird dem Condensin II eine spezifische Rolle bei der initialen Chromosomenkondensation zugesprochen. Condensin I, nicht aber Condensin II, wird hingegen für die vollständige Ablösung des Kohäsins entlang der Chromosomenarme, für die Chromosomenverkürzung und für einen zeitlich-normalen Ablauf durch die Prometa- und Metaphase benötigt (Hirota et al., 2004). Es konnte außerdem eine voneinander unabhängige Chromatinassoziation beider Komplexe und eine alternierende Lokalisation mit teilweise überlappenden Bereichen am Chromatin gezeigt werden (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004).

1.3.5. Funktionen der Condensin-Komplexe bei Chromosomenstrukturierung und -segregation

Überraschenderweise konnte auch in Abwesenheit der Condensin-Untereinheiten in vielen Systemen, wie *D. melanogaster*, *S. pombe*, *C. elegans* und *Gallus gallus* eine weitgehend normale Chromosomenkondensation beobachtet werden (Bhat et al., 1996; Dej et al., 2004; Giet und Glover, 2001; Hagstrom et al., 2002; Hudson et al., 2003; Jäger et al., 2005; Saka et al., 1994; Savvidou et al., 2005). Nach diesen Studien musste die Beteiligung des Condensin-Komplexes an der Chromosomenkondensation *per se* in Frage gestellt werden. In all diesen Arbeiten wurden hingegen massive Defekte bei der Schwesterchromatidensegregation beschrieben.

Die robuste Struktur der Metaphase-Chromosomen scheint in Abwesenheit von Condensin gestört zu sein. Diese sind weniger resistent gegen physikalischen Stress, der experimentell durch einen Wechsel verschieden-ionischer Puffer nachgestellt werden konnte (Hudson et al., 2003). Ebenso konnte eine Fehllokalisation verschiedener nicht-Histon Proteine wie Topo II und INCENP nach Depletion von SMC2 oder SMC4 gezeigt werden (Hudson et al., 2008; Hudson et al., 2003).

Auch bei der Definition und Organisation des zentromeren Chromatins und folglich bei der Strukturierung der Zentromere könnte Condensin eine Rolle spielen. In HeLa-Zellen (Ono et al., 2004), *C. elegans* (Hagstrom et al., 2002) und auch *D. melanogaster* (Steffensen et al., 2001) wurde eine Anreicherung der Condensin-Untereinheiten am Zentromer der Chromatiden

beobachtet. In *D. melanogaster* konnte weiterhin eine initiale Beladung der nicht-SMC-Untereinheiten des Condensin am Zentromer beobachtet (Fischer, 2010; Nagarkar, 2010; Oliveira et al., 2007) und sogar eine direkte Interaktion von CapG mit der Zentromer-spezifischen Histon H3 Variante CID nachgewiesen werden (Jäger et al., 2005). In HeLa-Zellen wurde zudem gezeigt, dass durch eine Depletion des Condensin die Inkorporation des Zentromer-spezifischen Histon H3 (CenpA) reduziert ist (Samoshkin et al., 2009). Darüber hinaus konnte nach Depletion des Condensin eine undefinierte Anordnung der Chromosomen innerhalb der Metaphasenplatte, Defekte bei der Anlagerung der Mikrotubuli an den Kinetochoren und auch merotelische Anlagerungen der Spindelmikrotubuli in *S. cerevisiae* (Yong-Gonzalez et al., 2007), *C. elegans* (Hagstrom et al., 2002), *D. melanogaster* (Oliveira et al., 2005), *X. laevis*-Eizelleextrakten (Wignall et al., 2003) und HeLa-Zellen (Ono et al., 2004) beobachtet werden. Nach Depletion von SMC2 in humanen Zellen wurde beispielsweise eine ungewöhnlich weite Verteilung von Proteinen des inneren und äußeren Kinetochors und eine verminderte Aktivität der Aurora B Kinase am Zentromer aufgezeigt (Samoshkin et al., 2009). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit postuliert, dass eine Condensin-Depletion eine partielle Dekondensation des zentromeren Chromatins zur Folge hat. Es käme zum fehlerhaften Anlagern der Mikrotubuli an diese ungeordneten Kinetochorstrukturen. Dadurch wäre auch der Anteil an Zentromer-lokalisierter Aurora B-Kinase und deren Aktivität am Zentromer vermindert und fehlerhaft angelagerte Mikrotubuli könnten nicht mehr korrigiert werden (Samoshkin et al., 2009). Eine Folge wären Segregationsdefekte während der Anaphase.

In Condensin depletierten DT40-Zellen (B-Zelllinie von *G. gallus*) hingegen erschien die Kinetochorstruktur weitgehend normal. Jedoch konnten abnormale, unkoordinierte Bewegungen der Schwesterkinetochore nach Anlagerung der Spindelmikrotubuli beobachtet werden. Diese Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass in diesem System allgemein weniger Mikrotubuli am Kinetochor anlagern und somit auch weniger Zugkräfte am Zentromer entstehen (Ribeiro et al., 2009).

1.3.6. Die Condensin-abhängige Ablösung des Kohäsins-Komplexes

Um die lokale Segregation einzelner Chromatidenarme während der Mitose zu beobachten, wurden verschiedene Loci entlang der Chromosomenarme in *S. cerevisiae* visualisiert und mikroskopiert (Renshaw et al., 2010). Anhand der Ergebnisse konnte ein Modell für die Beteiligung des Condensin-Komplexes an der Entfernung des Kohäsins von den Schwesterchromatidenarmen aufgestellt werden. Demnach werden durch den Zug der

Spindelmikrotubuli in der Anaphase die Schwesterchromatiden schrittweise von den Zentromeren hin zu den Telomeren segregiert. Noch an den Chromatidenarmen verbliebene Kohäsionmoleküle führen zu regionalen Spannungen im Chromatin. Um die Stabilität der Chromosomen zu erhalten, muss diesen Spannungen durch spezifische Verdrillung des Chromatins entgegengewirkt werden, was wiederum durch den Condensin-Komplex vermittelt werden könnte. Durch diese Chromatinumlagerungen würden verbleibende Kohäsion-Moleküle vom Chromatin abgelöst. Ohne einen funktionellen Condensin-Komplex könnten diese Umstrukturierungen des Chromatins nicht stattfinden und die lokalen Spannungen würden schließlich zur Beschädigung oder gar zum Zerreißen der Chromosomen führen (Renshaw et al., 2010). Auch mit diesem Modell könnten die beobachteten Segregationsdefekte der Condensin-Mutanten erklärt werden.

In HeLa-Zellen konnte nach Depletion der Condensin I-Untereinheit CapD2 durch RNAi ebenfalls ein Bestehen der Kohäsion an den Chromosomenarmen beschrieben werden (Hirota et al., 2004). In *S. cerevisiae* wurde eine Condensin abhängige Kohäsion-Entfernung auch während der Meiose beobachtet (Yu und Koshland, 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Condensin für die Dissoziation des Kohäsions bereits zwischen Prophase I und Metaphase I benötigt wird, wahrscheinlich über eine Aktivierung der *Polo-like Kinase* (Cdc5).

1.3.7. Mechanismen der Condensin-vermittelten Chromatinkompaktierung

Die Condensin-Komplexe sind also zur Strukturierung der Chromosomen essentiell, aber wie kann diese Strukturierung vermittelt werden? Es ist mittlerweile etabliert, dass der strukturell sehr ähnliche Kohäsion-Komplex DNA-Stränge ringförmig umschließt und somit zusammenhält (Haering et al., 2008). Eine Reihe von Studien spricht allerdings dagegen, dass auch der Condensin-Komplex DNA-Stränge oder auch Chromatinfasern topologisch umschließen und somit strukturieren und regulieren kann (Anderson et al., 2002; Bazett-Jones et al., 2002; Hudson et al., 2008). So zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen des humanen Condensin-Komplexes eine eher geschlossene Formation auf, bei der das SMC2/SMC4-Heterodimer sehr eng gefaltet erscheint, während die nicht-SMC-Untereinheiten globulär anlagern (*lollipop*-Struktur) (Anderson et al., 2002). Für den Kohäsion-Komplex konnte in derselben Studie eine vermehrt offene Formation beobachtet werden, bei der die *coiled-coil* Bereiche des SMC1/SMC3-Heterodimers eine offene V-Form ausbilden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Kohäsion-Komplex nach ektopischer Proteolyse von SMC3 vom Chromatin gelöst werden kann, wobei die Schwesterchromatidentrennung artifiziell initiiert wird (Gruber et

al., 2003). Der Condensin-Komplex blieb allerdings nach proteolytischem Schneiden von SMC2 innerhalb der *coiled-coil* Region weitgehend intakt und konnte auch nicht vom Chromatin abgelöst werden (Hudson et al., 2008). Außerdem konnte eine direkte Interaktion der Kleisin-Untereinheit Cnd2/CapH mit den Histonen H2A und H2A.Z in *S. pombe* und auch eine direkte Interaktion des CapH mit dem Histon H2A in HeLa-Zellen gezeigt werden (Tada et al., 2011). Auch elektronenspektroskopische Aufnahmen implizieren eine direkte Bindung der SMC-Kopfdomänen an das Chromatin (Bazett-Jones et al., 2002). So wäre eine Strukturierung des Chromatins durch eine direkte Bindung einzelner Condensin-Untereinheiten denkbar, indem verschiedene Chromatinbereiche miteinander verknüpft und eine gefaltete Struktur der Chromatinfaser fixiert würde (Abbildung 5A) (Cuylen und Haering, 2011).

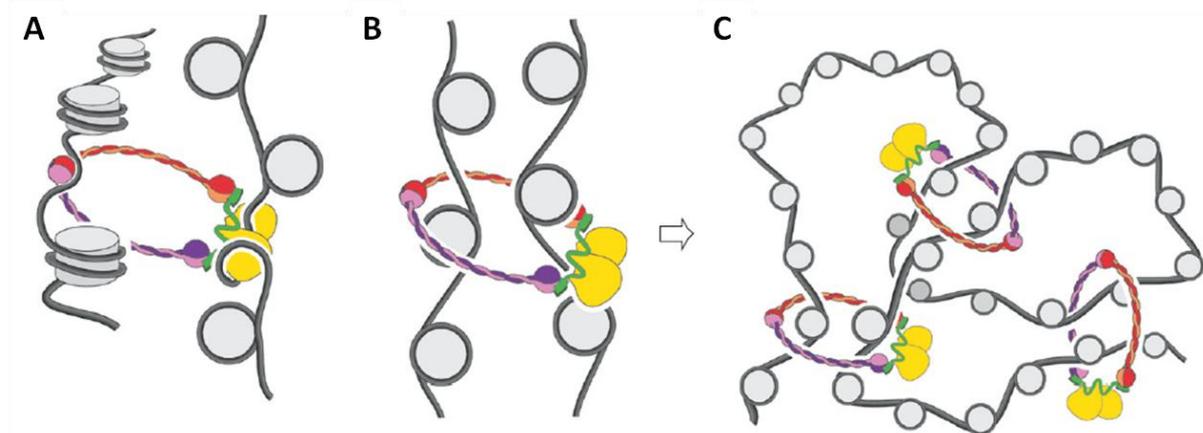


Abbildung 5: Modell der Condensin-vermittelten Chromatinkompaktierung. **A)** Durch direkte Bindung einzelner Condensin-Untereinheiten an die DNA könnten zwei Chromosomenbereiche miteinander verknüpft werden. **B)** Alternativ könnte der Condensin-Komplex zwei Chromatinfasern topologisch umschließen, wobei ebenso eine direkte Bindung einzelner Condensin-Untereinheiten an die DNA möglich wäre, um eine Fixierung der Struktur zu vermitteln. **C)** Durch die Condensin-Komplexe könnte letztlich eine strukturelle Verfestigung der Chromosomen erreicht werden. Entnommen aus Cuylen und Haering (2011).

Durch Cuylen et al. konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Condensin-Komplex dennoch fähig ist, DNA-Moleküle topologisch zu umschließen (Cuylen et al., 2011). In dieser Arbeit wurde die Bindung des Condensin-Komplexes an artifizelle Minichromosomen im Vergleich zu der des Kohäsin-Komplexes in *S. cerevisiae* untersucht. Sowohl nach Linearisierung der Minichromosomen mit Restriktionsenzymen als auch nach proteolytischer Spaltung der Condensin-Untereinheiten Brn4/CapH oder SMC4 konnte eine Dissoziation der Minichromosomen vom Condensin-Komplex vermittelt werden. Im Unterschied zur Dissoziation des Kohäsin-Komplexes, wurden für eine Ablösung der Minichromosomen vom Condensin-Komplex allerdings höhere Salzkonzentrationen benötigt. Das könnte auf die Existenz weiterer

elektrostatischer Kontakte, wie einer direkten DNA-Bindung einzelner Condensin-Untereinheiten (Ball et al., 2002; Bazett-Jones et al., 2002; Tada et al., 2011) hinweisen. Indem die Condensin-Ringe zwei Chromatinfasern direkt umschließen oder aber an einem Abschnitt des Chromatins direkt anbinden und einen weiteren topologisch umschließen (Abbildung 5B), könnten verschiedene Chromatinbereiche ebenso miteinander verknüpft und strukturiert werden (Abbildung 5C) (Cuylen und Haering, 2011).

Da die Strukturierung der Chromatinfasern mit einer Verringerung der Entropie einhergeht, erfordert dieser Prozess Energie. Die Existenz der ATPase-Domänen der SMC-Untereinheiten deutet darauf hin, dass der Condensin-Komplex prinzipiell als molekularer Motor fungieren könnte (Cuylen und Haering, 2011). Obwohl gereinigte Condensin-Komplexe nur eine geringe ATPase-Aktivität aufweisen, kann der ATP-Umsatz durch Zugabe von DNA erhöht werden (Kimura und Hirano, 1997; Kimura und Hirano, 2000; Yoshimura et al., 2002). Nach Mutagenesestudien der ATPase-Domäne des SMC-Homodimers in *B. subtilis* wurde vermutet, dass die ATP-Bindung zur Verknüpfung der beiden SMC-Kopfdomänen, die ATP-Hydrolyse hingegen zu einer Ablösung der Kopfdomänen führt (Hirano et al., 2001; Hirano, 2006). Für den Condensin-Komplex konnte weiterhin gezeigt werden, dass Mutationen innerhalb der ATPase-Domäne des SMC2 letal sind und dass die ATP-Bindung, nicht aber die ATP-Hydrolyse, für eine stabile Chromatinbindung des Condensin essentiell ist (Hudson et al., 2008).

1.3.8. Die Regulation der Condensin-Komplexe

Phosphorylierungen spielen für die Regulation der Condensin-Komplexe während des Zellzyklus eine wichtige Rolle. In unterschiedlichen Organismen wurde gezeigt, dass die Condensin-Untereinheiten durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden können. Für die humanen Condensin-Untereinheiten hSMC4, hCapH, hCapG und hCapD2 konnte gezeigt werden, dass diese während der Interphase durch CK2-vermittelte Phosphorylierungen inhibiert werden. Die Dephosphorylierung dieser Phosphatreste spielt außerdem eine wichtige Rolle bezüglich der Aktivität des Condensin-Komplexes in der Mitose. Während der Mitose werden die Condensin-Untereinheiten durch Cdk1/Cdc2 an zusätzlichen Phosphorylierungsstellen phosphoryliert, wodurch der Komplex vollständig aktiviert werden kann (Takemoto et al., 2006). So wurde gezeigt, dass die DNA-*supercoiling* Aktivität der Condensin-Komplexe aus *X. laevis* und HeLa-Zellen Cdk1/Cdc2-abhängige Phosphorylierungen benötigt (Kimura et al., 2001). In *S. cerevisiae* wurde außerdem eine Cdc5-abhängige Phosphorylierung der nicht-SMC-Untereinheiten mit dem Eintreten in die Anaphase beschrieben (St-Pierre et al., 2009). Auch durch diese

Phosphorylierung konnte eine erhöhte DNA-*supercoiling* Aktivität des Condensin-Komplexes hervorgerufen werden (St-Pierre et al., 2009). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Modell erstellt, nach dem Condensin während der mitotischen Chromosomenkondensation in drei Stufen aktiviert wird (Bazile et al., 2010). So wird Condensin während der Interphase durch CK2-abhängige inhibitorische Phosphorylierungen inaktiv gehalten. Die Aktivierung während der Prophase benötigt zum einen die Dephosphorylierung dieser inhibitorischen Phosphorylierungen und zum anderen aktivierende Phosphorylierungen, die durch Cdk1/Cdc2 vermittelt werden. Da der Cdk1/Cdc2-Level mit dem Eintritt in die Anaphase abnimmt, muss Condensin während der Anaphase durch eine weitere Kinase aktiv gehalten werden. Hier wird wahrscheinlich Polo/Cdc5 aktiv (Bazile et al., 2010).

Auch Aurora B hat einen Einfluss auf die Regulation der Condensin-Untereinheiten. In *D. melanogaster* (Giet und Glover, 2001) und *C. elegans* (Hagstrom et al., 2002) konnte gezeigt werden, dass die Funktion von Aurora B wichtig für die Chromatinlokalisierung des Condensin ist. In HeLa-Zellen spielt Aurora B nur für die Chromatinassoziation und den Erhalt des Condensin I-Komplexes, nicht aber des Condensin II-Komplexes eine Rolle (Lipp et al., 2007). Erst kürzlich konnte sowohl in *S. pombe* als auch in HeLa-Zellen eine Aurora B-abhängige Phosphorylierung des Cnd2/CapH gezeigt werden, durch die eine direkte Bindung des Condensin an die Histone H2A und H2A.Z vermittelt werden kann (Tada et al., 2011). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine räumlich-zeitliche Regulation des Condensin I-Komplexes durch Aurora B postuliert. Während Prometa- und Metaphase wäre Condensin wie auch Aurora B vorrangig am Kinetochor lokalisiert. Mit dem Eintritt in die Anaphase wird Aurora B zur Spindelmitte translokalisiert (Ruchaud et al., 2007), wodurch weiteres, lösliches Condensin durch Phosphorylierung an das Chromatin rekrutiert werden könnte. So konnte die Chromatinlokalisierung des Condensin I in dieser Studie tatsächlich während der Metaphase vorrangig am Zentromer und während der Anaphase vermehrt an den Chromosomenarmen beobachtet werden (Tada et al., 2011).

Auch Dephosphorylierungen spielen bei der Regulation des Condensin eine wichtige Rolle. So konnte PP2(A) als direkter Interaktor des humanen CapD3 identifiziert werden (Yeong et al., 2003). Später wurde gezeigt, dass PP2(A) hierbei nicht katalytisch aktiv ist, sondern eher als Rekrutierungsprotein fungiert, um eine Lokalisation des humanen Condensin II am Chromatin zu vermitteln (Takemoto et al., 2009).

Eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation ist das Anhängen Ubiquitin-ähnlicher Proteine an Lysinreste von Proteinen. Ein solches Ubiquitin-ähnliches Protein ist *Small ubiquitin-related modifier* (SUMO). Zahlreiche Proteine werden durch kovalente Bindung von

SUMO modifiziert, wodurch eine Vielzahl von zellulären Prozessen reguliert werden kann (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Zhao, 2007). In *S. cerevisiae* konnte eine SUMO-abhängige Zellzyklus-spezifische Regulation der genomischen Condensin-Verteilung beschrieben werden (Bachelier-Bassi et al., 2008). Durch diese Studie wurde gezeigt, dass eine Inaktivierung der nuklären SUMO-Isopeptidase die Assoziation des Condensin am Kinetochor schwächt, die Lokalisation des Condensin an der rDNA hingegen verstärkt.

Neben den kovalenten Modifikationen einzelner Condensin-Untereinheiten, konnte in *D. melanogaster* eine Verbindung der mitotischen Chromosomenkondensation mit dem piRNA-Signalweg hergestellt werden (Pek und Kai, 2011). Hier wurde eine direkte Interaktion der konservierten DEAD-Box RNA-Helikase Vasa mit Barren und CapD2 nachgewiesen. Dieser Prozess ist außerdem abhängig von Aubergine, einem piRNA-bindendem Protein und einer weiteren piRNA-Komponente, Spindle-E (Pek und Kai, 2011).

1.3.9. Weitere Funktionen der Condensin-Komplexe

Wie in der Mitose werden die Condensin-Komplexe auch während der Meiose zur axialen Chromosomenkompaktierung und zur Auflösung von Verknüpfungen zwischen den homologen Chromosomen benötigt (Chan et al., 2004; Yu und Koshland, 2003). Durch Immunfluoreszenzaufnahmen von Mausspermatozyten konnte gezeigt werden, dass der Condensin I-Komplex im axialen Kern der kondensierten Chromatide lokalisiert ist (Viera et al., 2007). In *C. elegans* und *S. cerevisiae* wurden in Abwesenheit des Condensin Anaphasebrücken während beider meiotischer Teilungen beobachtet (Chan et al., 2004; Hagstrom et al., 2002; Yu und Koshland, 2003). Außerdem konnten meiosespezifische Funktionen des Condensin beschrieben werden. In *S. cerevisiae* wurde eine Funktion des Condensin-Komplexes bei der Chromosomenindividualisierung zusammen mit Komponenten der axialen Elemente beschrieben. Ebenso wird der Condensin-Komplex in diesem Organismus zur effizienten Homologenpaarung, zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen und zur Assemblierung des Synaptonemalen Komplexes benötigt (Yu und Koshland, 2003).

Die Condensin-Komplexe beeinflussen die Chromosomenstruktur nicht nur während der Mitose und Meiose, sondern sie können auch während der Interphase eine wichtige Rolle bei der Modulation der Chromosomenstruktur und somit bei der Genregulation übernehmen. Ein Zusammenspiel von Chromosomenkompaktierung und Genregulation wurde erstmals in *C.*

elegans gezeigt (Chuang et al., 1994). Hier fungiert der Condensin I-ähnliche Dosiskompensationskomplex (Condensin I^{DC}) als Transkriptionsrepressor X-lokalisierter Gene (Chuang et al., 1994).

In *D. melanogaster* konnte eine Interaktion von Barren und dem *polycomb group*-Protein Polyhomeotic (PH) nachgewiesen werden (Lupo et al., 2001). Beide Proteine zeigen hierbei eine Kollokalisierung an *polycomb*-Regulationselementen und werden benötigt, um den transkriptionsinaktiven Status homeotischer Gene aufrecht zu halten. Die Condensin-Untereinheiten können die Genexpression in der Fliege auch durch die Modulation der umgebenden Chromatinstruktur zu beeinflussen, was als *position-effect variegation* (PEV) definiert ist (Cobbe et al., 2006; Dej et al., 2004; Lupo et al., 2001). CapG wird hierbei während der Interphase benötigt, um Zentromer umgebendes Heterochromatin in einem transkriptionsinaktiven Zustand zu halten (Dej et al., 2004). In einer späteren Studie wurde gezeigt, dass mutante Allele verschiedener Condensin-Untereinheiten auch aktivierende Effekte auf die Expression von Genen haben können, die durch PEV kontrolliert werden (Cobbe et al., 2006), was auf eine komplexe Funktion und auch Regulation des Condensin-Komplexes oder der einzelnen Condensin-Untereinheiten hierbei hinweist.

Auch in der Hefe konnte eine Korrelation der Condensin-Funktion und der Inaktivierung einzelner Gene beschrieben werden. So konnte nach Mutation von Ysc4/CapD2 in *S. cerevisiae* keine Repression des *mating type* Locus mehr gewährleistet werden (Bhalla et al., 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass Condensin in *S. cerevisiae* rDNA Chromatin *Repeats* in einer Heterochromatin-ähnlichen Struktur organisiert und somit eine wichtige Rolle für die Genregulation während der Interphase spielt (Machin et al., 2004).

In embryonalen Stammzellen der Maus wurde eine Funktion des Condensin für die Chromatinkompaktierung während der Interphase beschrieben (Fazio und Panning, 2010). Nach Depletion beider Condensin-Komplexe konnten hier stark vergrößerte Interphasenkerne beobachtet werden. Embryonale Stammzellen weisen eine sehr dynamische Chromatinstruktur auf, in welcher nur ein geringer Anteil des Chromatins als Heterochromatin vorliegt. In diesen Zellen könnten die Condensin-Komplexe als Alternative zu den Regulationsmechanismen somatischer Zellen eine dynamischere Kompaktierung des Interphasenchromatins erlauben. (Fazio und Panning, 2010).

Für das humane CapG konnte weiterhin eine Funktion beim *bookmarking* des *hsp70i* Promotors gezeigt werden (Xing et al., 2005). Hierbei werden Promotorregionen bestimmter Stress-induzierbarer Gene während der Mitose nicht so dicht gepackt, um aktivierbar zu bleiben. Der Transkriptionsfaktor HSF2 bindet an die Promotorregion des *hsp70i*, rekrutiert PP2(A) und

vermittelt durch eine Interaktion mit CapG die Dephosphorylierung und Inaktivierung der Condensin-Untereinheiten (Xing et al., 2005).

Die Condensin I-Komplexe spielen in *S. pombe* (Aono et al., 2002) und *S. cerevisiae* (Yu und Koshland, 2003) eine Rolle bei DNA-Reparatur und bei DNA-*damage checkpoint* vermittelten Antworten. Auch für das humane Condensin I wurde eine Funktion bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen gezeigt. Es ermöglicht hierbei im Komplex mit der DNA *nick-sensor poly* (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) und dem *base excision repair* (BER) Faktor XRCC1 eine schnelle Antwort auf DNA-Schädigungen (Heale et al., 2006).

1.3.10. Besonderheit des Condensin-Komplexes in *Drosophila melanogaster*

Während in höheren Eukaryoten beide Condensin-Komplexe essentiell für die akkurate Strukturierung der Chromosomen während der Metaphase sind, bildet *D. melanogaster* eine Ausnahme. Es konnten hier Homologe für die Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapH2 und CapD3 identifiziert werden (Hartl et al., 2008a; Savvidou et al., 2005), nicht aber für CapG2. So wurde bereits spekuliert, dass CapG eine Komponente beider Condensin-Komplexe sein könnte (Longworth et al., 2008; Resnick et al., 2009). Allerdings sind die Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapH2 und CapD3 nicht essentiell für die Vitalität der Fliege, für CapD3 konnte auch keine Lokalisation am mitotischen Chromatin nachgewiesen werden (Savvidou et al., 2005).

Durch *in vivo* Analysen von EGFP-markierten Condensin-Komponenten konnte deren subzelluläre Lokalisation sowie deren Beladung an das mitotischen Chromatin in lebenden Embryonen untersucht werden (Fischer, 2010; Nagarkar, 2010; Oliveira et al., 2007). Barren/CapH, CapD2 und auch SMC2 sind während der Interphase im Zytoplasma angereichert, für CapG konnte hingegen eine präferentiell nukleäre Lokalisation während der Interphase beobachtet werden. In diesen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Chromosomenassoziation der Condensin-Untereinheiten bereits vor dem NEBD initiiert wird. Während zum Zeitpunkt des NEBD eine etwa halbmaximale Assoziation von Barren und CapD2 beobachtet wurde, war CapG bereits maximal am Chromatin assoziiert. Die Bindung von CapG an das mitotische Chromatin sollte somit auch unabhängig von einem Condensin I-Komplex stattfinden können. Dem CapG könnte in der Fliege folglich eine maßgebliche Rolle für die frühe Chromosomenstrukturierung während der Mitose zukommen.

Für die Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapD3 und CapH2 von *D. melanogaster* konnten hingegen Funktionen für die Chromatinstrukturierung außerhalb der Mitose

beschrieben werden. So wurde eine Beteiligung von CapH2 und CapD3 bei der Disassemblierung von Polytänstrukturen der ovariellen Nährzellen in der weiblichen Keimbahn gezeigt (Hartl et al., 2008a). Außerdem wurden auch Meiose-spezifische Funktionen einzelner Condensin-Untereinheiten beschrieben. So sind homozygot *CapD3*-mutante Männchen steril (Savvidou et al., 2005) und auch für transheterozygot *CapH2*-mutante Fliegen wurde eine Sterilität der Männchen für gewisse Allelkombinationen beobachtet (Hartl et al., 2008b). In dieser Studie wurde speziell eine Funktion von CapH2 und CapD3 bei der Ausbildung distinkter Chromosomenterritorien in den primären Spermatozytenkernen herausgearbeitet, was auf eine Funktion beider Proteine während der Spermatogenese hinweist. Auch für die Condensin I-spezifische Komponente CapG konnte eine meiotische Aufgabe beschrieben werden. So wurde eine Beteiligung des Proteins an der Disassemblierung des Synaptonemalen Komplexes während der Prophase I in Fliegenweibchen gezeigt (Resnick et al., 2009).

1.4. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Besonderheiten der Funktion und Regulation der Condensin-Untereinheit CapG in *D. melanogaster* näher zu charakterisieren. In vorausgegangener Arbeit wurden Fliegen generiert, in welchen eine ektopische Expression einzelner EGFP-markierter *UAST-CapG*-Fragmente durch Gal4-Treiber gewebs- und stadienspezifisch gesteuert werden konnte. So konnte die subzelluläre Lokalisation der einzelnen CapG-Fragmente während der Interphase sowie deren Chromatinassoziation im Verlauf der Mitose in lebenden Embryonen untersucht werden. Hierbei wurde gezeigt, dass die N-terminalen zwei-Drittel von CapG weitgehend ausreichend für dessen Proteinfunktion sind. Diese Tatsache ist überraschend, da das entsprechende Proteinfragment während der Interphase hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist und erst nach dem NEBD einen Zugang zum mitotischen Chromatin erhält. So sollten weder die Kernlokalisation während der Interphase, noch die Chromatinassoziation vor dem NEBD essentiell für die Proteinfunktion von CapG sein.

Diese unerwarteten Aspekte sollen in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. So sollte die Lokalisation verschiedener CapG-EGFP-Fragmente zusammen mit dem mRFP1-markierten HP1 mittels Mikroskopie in lebenden Embryonen beobachtet und geprüft werden, ob CapG bereits während der Interphase am Chromatin gebunden vorliegt. Hierbei könnten Rückschlüsse auf eine mögliche Chromatin-strukturierende Funktion von CapG während der Interphase gezogen werden. Durch Mikroskopie von Embryonen sollte weiterhin untersucht werden, ob auch die Chromatinassoziation der N-terminalen zwei-Drittel nach dem NEBD am

Zentromer initiiert wird oder alternativ entlang der gesamten Chromosomen erfolgen kann. Mittels Immunpräzipitation einzelner EGFP-markierter CapG-Fragmente sollte außerdem herausgearbeitet werden, welche Domänen von CapG wichtig für die Interaktion mit den weiteren Condensin-Untereinheiten sind. Hierbei könnte ein Zusammenhang zur Chromatinassoziation bzw. zur biologischen Funktionalität der einzelnen Domänen hergestellt werden. Um die Regulation der Condensin-Komplexe näher zu charakterisieren, sollte außerdem geprüft werden, ob auch die Condensin-Untereinheiten in *D. melanogaster* während des Zellzyklus phosphoryliert werden und welche Domänen innerhalb von CapG die hauptsächlichsten Phosphorylierungsstellen enthalten.

Durch Mikroskopie entsprechender Fliegengewebe, in denen ein fluoreszenzmarkiertes CapG-Konstrukt unter Kontrolle der genomischen regulatorischen Elemente von *CapG* exprimiert wird, sollte zudem die Lokalisation von CapG in den Zellen der weiblichen und männlichen Keimbahn der Fliege analysiert werden, um eventuelle Funktionen des Proteins in diesen Geweben zu erarbeiten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll durch verschiedene experimentelle Fragestellungen die mögliche Assemblierung von CapG innerhalb eines Condensin II-Komplexes gezeigt oder alternativ ein Kandidat für CapG2 identifiziert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Condensin II-spezifischen Untereinheiten die Disassemblierung von polytären Chromosomenstrukturen innerhalb der ovariellen Nährzellen und auch der larvalen Speicheldrüsen initiieren können. Durch genetische Interaktionsstudien sollte hierbei eine Beteiligung von CapG an diesen Prozessen untersucht werden. Die Immunpräzipitation eines mRFP1-markierten CapG aus Embryonen- und Ovarienextrakten und Analyse der Präzipitate könnte weiterhin eine mögliche physikalische Interaktion von CapG mit Condensin II-spezifischen Untereinheiten bestätigen. Mittels Immunpräzipitation der Epitop-markierten Untereinheiten SMC4 und CapH2 in Ovarienextrakten und anschließender massenspektrometrischer Analyse der Präzipitate wäre hingegen die Identifikation der Condensin II-Untereinheit CapG2 ermöglicht. Diese sollte in Analogie zu den CapG2-Untereinheiten höherer Eukaryoten ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa aufweisen und *HEAT-Repeat*-Domänen enthalten. Abschließend könnten direkte Interaktionen zwischen den einzelnen Condensin-Untereinheiten durch ein *in vitro* Assay weiterführend verifiziert und somit die Geometrie der Condensin-Komplexe von *D. melanogaster* erarbeitet werden.

2. Ergebnisse

2.1. Struktur- und Funktionsanalyse von CapG

Um Domänen innerhalb von CapG zu identifizieren, welche für die Kernlokalisierung während der Interphase und auch für die Lokalisation des Proteins am Chromatin verantwortlich sind, wurde bereits in vorausgehenden Studien das Verhalten einzelner CapG-Fragmente im Verlauf der Mitose untersucht. Hierzu wurden C-terminal EGFP-markierte Proteinfragmente von CapG hergestellt und transgene Fliegen generiert, in welchen diese Fragmente unter Kontrolle eines UAST-Promotors exprimiert werden konnten (Frank, 2008; Herzog, 2007). Während dieser Arbeit wurde ein weiteres EGFP-markiertes CapG-Konstrukt (*UAST-CapG^{NM5}-EGFP*) hergestellt und mittels P-Element vermittelter Keimbahntransformation in das Fliegen-genom eingebracht. Es konnten hierbei drei unterschiedliche Transgeninsertionen erhalten werden (Tabelle 11).

Die Lokalisation der verschiedenen Proteinfragmente wurde durch *in vivo* Mikroskopie lebender Embryonen während der 14. epidermalen Mitose beobachtet (Frank, 2008; Herzog, 2007; sowie diese Arbeit). Die gewonnenen Erkenntnisse wurden in dieser Arbeit zusammengefasst und mit computergenerierten Strukturanalysen der Aminosäuresequenz von CapG durch die Programme PSORT und SMART verglichen. Durch PSORT vorhergesagte Kernlokalisationssequenzen innerhalb des C-terminalen Bereichs von CapG (Abbildung 6, rote Balken) konnten auch experimentell bestätigt werden. Alle Fragmente, die den C-Terminus von CapG enthalten (CapG^{FL}-EGFP, CapG^{MC}-EGFP und CapG^C-EGFP), waren während der Interphase im Kern angereichert. Für CapG^C-EGFP konnte eine fast ausschließliche Kernlokalisierung beobachtet werden (vergleiche Abbildung 7B). Durch PSORT wurde auch eine Kernexportsequenz im Bereich der Aminosäureposition 898 vorhergesagt (Abbildung 6, blauer Balken). Die *in vivo* Mikroskopie ergab jedoch, dass auch Fragmente, die diesen Aminosäurebereich nicht enthalten (CapG^N-EGFP, CapG^{NM1}-EGFP und CapG^{NM2}-EGFP) während der Interphase vorrangig im Zytoplasma lokalisieren. Diese Tatsache könnte die Existenz einer weiteren Exportsequenz im N-Terminus von CapG implizieren. CapG^{NM}-EGFP, CapG^{NM1}-EGFP, CapG^M-EGFP und CapG^N-EGFP wären somit vom Kern ausgeschlossen, da diesen Proteinfragmenten die C-terminalen Kernimportsequenzen fehlen und Exportsequenzen im Bereich der N-terminalen zwei-Drittel des Proteins zum Tragen kommen. CapG^C-EGFP wäre während der Interphase ausschließlich kernlokalisiert, da dieses Fragment Kernimportsequenzen, hingegen aber keine Kernexportsequenzen enthält.

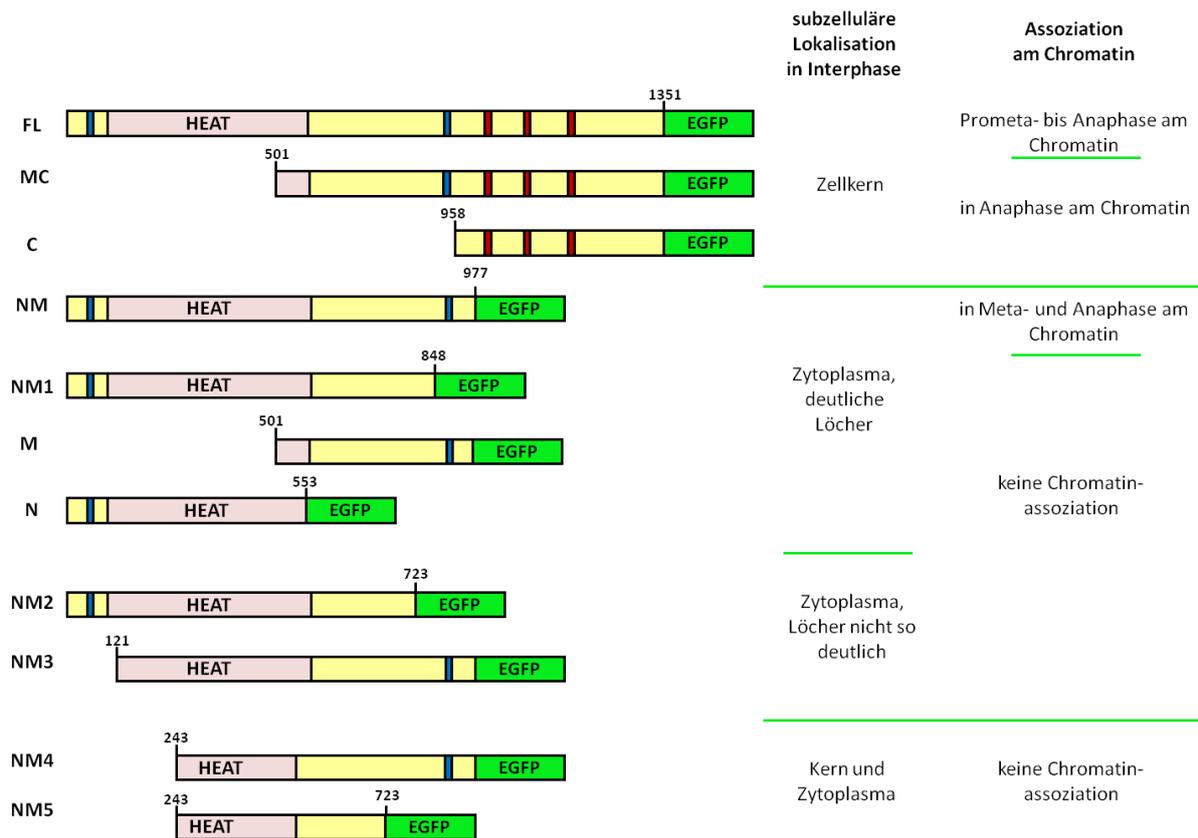


Abbildung 6: Schematische Darstellung der untersuchten CapG-Fragmente und deren Lokalisationsverhalten während der 14. epidermalen Mitose. Es sind vorhergesagte *HEAT-Repeat*-Domänen durch rosa Balken (SMART: Bereich der Aminosäuren 90-553), Kernimportsequenzen durch rote Balken (PSORT: Aminosäuren 1072, 1162, 1210), sowie Kernexportsequenzen durch blaue Balken dargestellt. Eine dieser Exportsequenzen wurde durch PSORT an Aminosäure 898 vorhergesagt, eine weitere wird auf Grund des Lokalisationsverhaltens der Fragmente im N-terminalen Bereich vermutet.

HEAT-Repeat-Domänen wurden durch SMART im N-terminalen Bereich von CapG zwischen den Aminosäuren 90 und 553 vorhergesagt (Abbildung 6, rosa Balken). Diese Sequenzen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen (Neuwald und Hirano, 2000) und könnten daher auch wichtige Bereiche zur Regulation von CapG darstellen. Protein-Protein-Interaktionen könnten beispielsweise den Transport von CapG während des Zellzyklus vermitteln. Da CapG^C-EGFP keine *HEAT-Repeat*-Regionen enthält, trotzdem aber sehr effizient im Kern angereichert werden kann, sollten entsprechende Protein-Protein-Interaktionen eher beim Kernexport als beim Kernimport zum Tragen kommen. Tatsächlich erscheinen die Fragmente, denen ein großer Bereich der *HEAT-Repeat*-Domänen fehlt (CapG^{NM4}-EGFP und CapG^{NM5}-EGFP), während der Interphase weitgehend gleichmäßig in der Zelle verteilt. CapG^M-EGFP stellt hierbei eine Ausnahme dar, da dieses Fragment anscheinend ohne *HEAT-Repeat*-vermittelte Interaktionen aus dem Kern exportiert werden kann. Eventuell ist der Export dieses Fragments durch dessen geringere Größe auch ohne entsprechende Protein-Protein-Interaktionen möglich. Allgemein scheint die

subzelluläre Lokalisation von CapG während der Interphase durch ein Gleichgewicht von Proteinexport und -import reguliert zu sein, welches durch die An- bzw. Abwesenheit der einzelnen Proteindomänen verschoben wird.

Die N-Terminalen zwei-Drittel (CapG^{NM}-EGFP) von CapG erscheinen hingegen wichtig, um die Chromatinlokalisierung während der Mitose zu ermöglichen. Nach Zusammenbruch der Kernhülle, erhält CapG^{NM}-EGFP Zugang zur DNA und lokalisiert im weiteren Verlauf der Mitose wie auch das volle-Länge Protein am Chromatin (Herzog, 2007 und Abbildung 9A bis E). Nach weiterer Verkürzung dieses Proteinbereichs (CapG^{NM1}-EGFP, CapG^{NM2}-EGFP, CapG^{NM3}-EGFP, CapG^{NM4}-EGFP, CapG^{NM5}-EGFP, CapG^N-EGFP und CapG^M-EGFP) kann keinerlei Lokalisation am Chromatin beobachtet werden. Für die Chromatinassoziation während der Metaphase erscheint somit der gesamte Bereich der N-terminalen zwei-Drittel essentiell.

Auch CapG^{MC}-EGFP und CapG^C-EGFP können am Chromatin assoziieren, allerdings erst während der Anaphase. Zu diesem Zeitpunkt delokalisieren das endogene CapG und die beiden anderen nicht-SMC Condensin I-Untereinheiten bereits vom Chromatin (Fischer, 2010; Nagarkar, 2010; Oliveira et al., 2007). Das würde für eine alternative DNA-Bindung dieser CapG-Fragmente außerhalb des Condensin-Komplexes sprechen, die bevorzugt ermöglicht ist, wenn das endogene CapG bereits nicht mehr am Chromatin lokalisiert.

2.1.1. CapG lokalisiert während der Interphase am Heterochromatin

CapG ist während der Interphase nicht homogen im Zellkern verteilt. In eigener vorausgegangener Arbeit konnte durch *in vivo* Mikroskopie von Embryonen, welche *UAS-CapG^{FL}-EGFP* während Mitose 14 exprimieren, gezeigt werden, dass lokale Anreicherungen des Proteins innerhalb der Zellkerne vorhanden sind (Herzog, 2007). Diese lokalen Anreicherungen innerhalb der Interphase-Zellkerne sind für CapG^C-EGFP noch deutlicher (Abbildung 7B). Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um eine Lokalisation der Fusionsproteine speziell an Heterochromatinbereichen der Chromosomen während der Interphase handelt, wurde die Lokalisation der CapG-EGFP-Fragmente zusammen mit dem mRFP1-markierten HP1 untersucht. HP1 wurde in *D. melanogaster* als ein mit Heterochromatin-spezifischen DNA-Sequenzen assoziiertes Protein beschrieben (James und Elgin, 1986). Auch die Chromatinassoziation dieses Proteins wurde bereits untersucht. HP1 erscheint während der Interphase regional am Chromatin konzentriert, dissoziiert allerdings mit beginnender Chromosomenkondensation und ist während in der Metaphase schließlich gleichmäßig in der Zelle verteilt (Kellum et al., 1995).

Um eine Expression der *UAST-CapG-EGFP*-Konstrukte zusammen mit *mRFP1-HP1* zu vermitteln, wurden die Transgeninsertionen *UAST-CapG^{FL}-EGFP II.2* und *UAST-CapG^C-EGFP II.3* jeweils mit einer Transgeninsertion eines mRFP1-markierten HP1-Konstruktes rekombiniert. Die Expression von *mRFP1-HP1* wird hierbei unter Kontrolle der genomischen regulatorischen Elemente des *HP1*-Genlokus vermittelt. Durch *in vivo* Mikroskopie von Embryonen, in denen die Expression der *UAST-CapG-EGFP*-Transgeninsertionen durch *α4tub-Gal4-VP16* vermittelt wurde, konnte die Lokalisation von CapG^{FL}-EGFP und CapG^C-EGFP in Bezug zu der von mRFP1-HP1 während des Zellzyklus beobachtet werden. Die durch Kellum et al. 1995 beschriebene Lokalisation von HP1 konnte für das mRFP1-markierte HP1 in lebenden Embryonen bestätigt werden (Abbildung 7 und Abbildung 8). Während der Interphase werden lokal konzentrierte Bereiche von CapG^{FL}-EGFP deutlich, welche mit mRFP1-HP1 überlappen (Abbildung 7A, gelber Pfeil). Es können ebenso Bereiche beobachtet werden, in denen nur CapG^{FL}-EGFP (Abbildung 7A, grüner Pfeil) oder aber nur mRFP1-HP1 lokal angereichert vorliegen (Abbildung 7A, roter Pfeil).

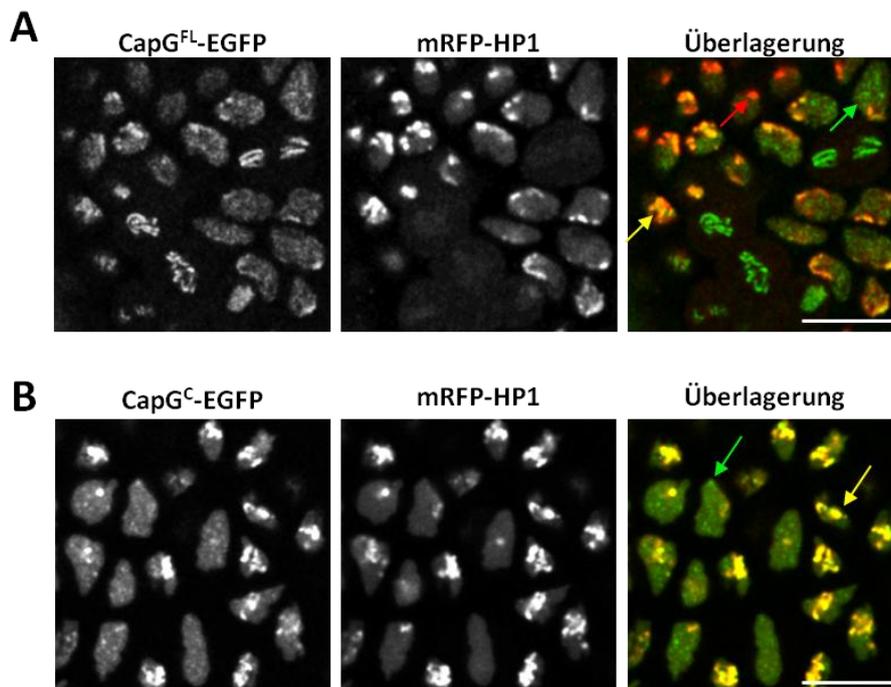


Abbildung 7: CapG lokalisiert während der Interphase am Heterochromatin. **A)** Lebende Embryonen, die *UAST-CapG^{FL}-EGFP* (grün) zusammen mit *mRFP1-HP1* (rot) während der Mitose 14 exprimieren (*α4tub-Gal4-VP16/UAST-CapG^{FL}-EGFP II.2*, *mRFP1-HP1 II.1*). Während der Interphase treten lokal konzentrierte Bereiche von CapG^{FL}-EGFP auf, die mit mRFP1-HP1 überlappen (gelber Pfeil). In der Überlagerung werden auch lokale Anreicherungen von CapG^{FL}-EGFP deutlich, welche nicht mit mRFP1-HP1 überlappen (grüner Pfeil); ebenso lokale Anreicherungen von mRFP1-HP1, die nicht mit CapG^{FL}-EGFP überlappen (roter Pfeil). **B)** Lebende Embryonen, die *UAST-CapG^C-EGFP* (grün) zusammen mit *mRFP1-HP1* (rot) in Mitose 14 exprimieren (*α4tub-Gal4-VP16/UAST-CapG^C-EGFP II.3*, *mRFP1-HP1 II.1*). Während der Interphase zeigt sich hier eine sehr ausgeprägte Lokalisation von CapG^C-EGFP im Kern. Alle lokal konzentrierten Bereiche von mRFP1-HP1 überlappen auch mit CapG^C-EGFP (gelber Pfeil). In der Überlagerung werden aber auch lokale Anreicherungen von CapG^C-EGFP deutlich, die nicht mit mRFP1-HP1 überlappen (grüner Pfeil). Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm.

Die Kolokalisation von CapG^{FL}-EGFP und mRFP1-HP1 wurde weiterhin auch im Verlauf der Mitose verfolgt (Abbildung 8A bis G). Beginnend mit der Chromosomenkondensation in der Prophase findet eine Beladung von CapG^{FL}-EGFP an das Chromatin statt (Abbildung 8B), während mRFP1-HP1 beginnt, sich gleichmäßig in der gesamten Zelle zu verteilen (Abbildung 8C). CapG^{FL}-EGFP verbleibt bis hin zur Anaphase am Chromatin lokalisiert, mRFP1-HP1 hingegen bleibt diffus in der Zelle verteilt (Abbildung 8D bis E). Erst während der Interphase der Mitose 15 kann wiederum eine lokale Konzentration von mRFP1-HP1 beobachtet werden (Abbildung 8G). Es findet bereits hier eine Kolokalisation mit dem CapG^{FL}-EGFP statt.

CapG^C-EGFP zeigt während der Interphase eine sehr deutliche Kernlokalisierung (Abbildung 7B). Alle lokal konzentrierten Bereiche von mRFP1-HP1 überlappen hier auch mit CapG^C-EGFP (Abbildung 7B, gelber Pfeil). In der Überlagerung werden aber auch lokale Anreicherungen von CapG^C-EGFP deutlich, welche nicht mit mRFP1-HP1 überlappen (Abbildung 7B, grüner Pfeil). Im Verlauf der Mitose (Abbildung 8H bis O) können während der späten Prophase noch lokal konzentrierte Bereiche von CapG^C-EGFP beobachtet werden, während mRFP1-HP1 beginnt in die gesamte Zelle zu diffundieren (Abbildung 8K). Nach dem NEBD sind beide Proteine diffus in der ganzen Zelle verteilt (Abbildung 8L). Während der Anaphase ist CapG^C-EGFP in der Lage, am Chromatin zu lokalisieren (Abbildung 8M). Kurz danach werden hier CapG^C-EGFP-Anreicherungen deutlich, in denen auch eine beginnende Kolokalisation des mRFP1-HP1 beobachtet werden kann (Abbildung 8N).

Die Kolokalisation von CapG^{FL}-EGFP bzw. CapG^C-EGFP mit mRFP1-HP1 legt eine Chromatinlokalisierung von CapG während der Interphase präferentiell am Heterochromatin der Chromosomen nahe. Diese Beobachtung könnte auf eine Funktion von CapG beispielsweise zur Strukturierung des Heterochromatins während der Interphase hinweisen. Außerdem ist der Großteil des Heterochromatins perizentrisch und trägt zur Ausbildung der Zentromere der Chromosomen bei. Während der Mitose erscheinen CapG, Barren und CapD2 vorerst an den Zentromeren angereichert und erst später entlang der gesamten Chromosomenarme verteilt (Fischer, 2010; Nagarkar, 2010; Oliveira, 2007). So könnte ein Teil von CapG während des gesamten Zellzyklus am Heterochromatin assoziiert verbleiben, um bei der Beladung der weiteren Condensin-Untereinheiten als Zentromer-spezifische *Docking-site* zu fungieren. Konsistent hierzu konnte für CapG^{FL}-EGFP keine Delokalisation der konzentrierten Bereiche von der Interphase hin zur Prophase beobachtet werden.

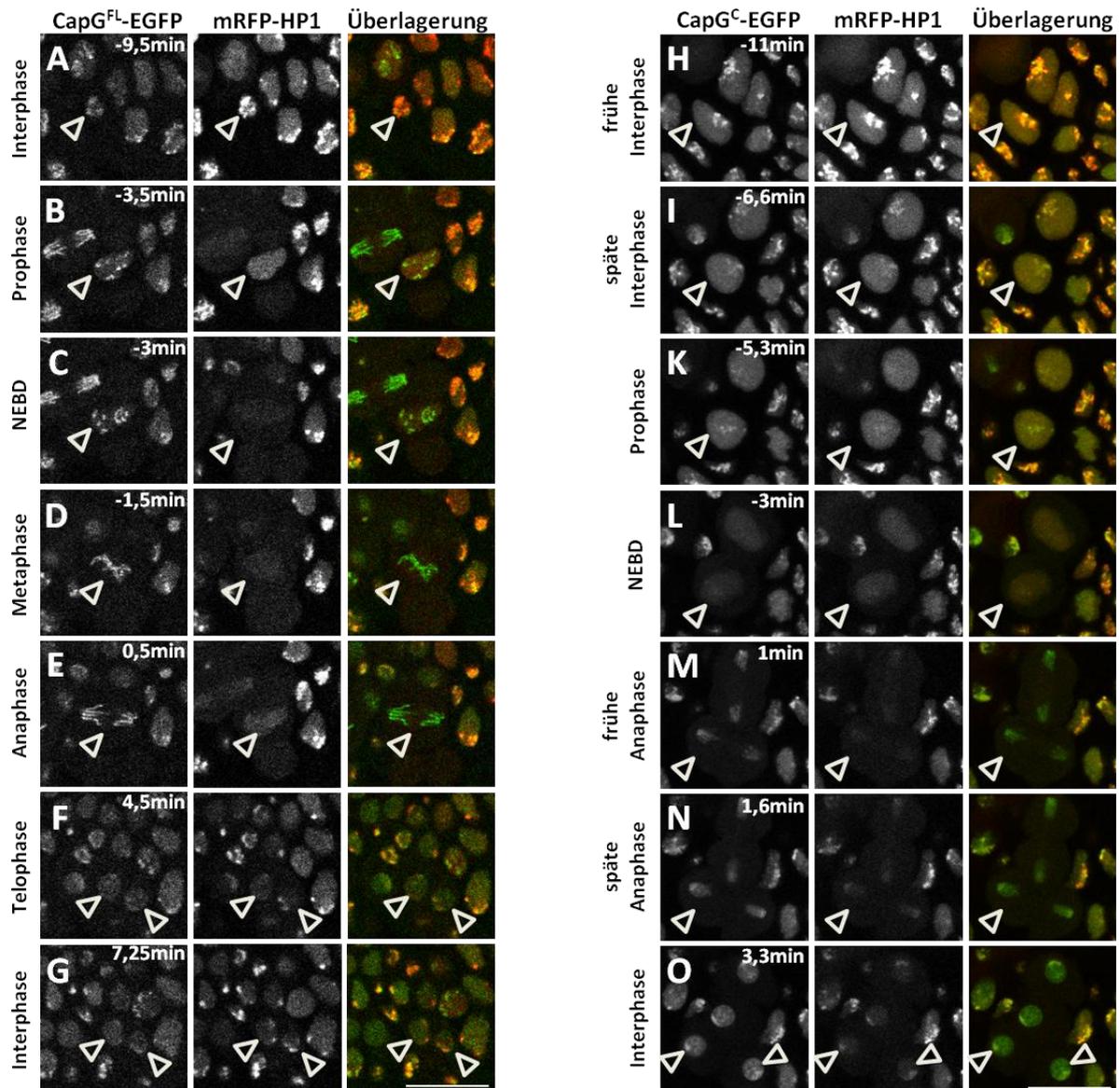


Abbildung 8: Heterochromatinlokalisierung von CapG im Verlauf der Mitose. A bis G) Lebende Embryonen, die *UAST-CapG^{FL}-EGFP* (grün) zusammen mit *mRFP1-HP1* (rot) während der Mitose 14 exprimieren (*α4tub-Gal4-VP16/UAST-CapG^{FL}-EGFP II.2, mRFP1-HP1 II.1*). H bis O) Lebende Embryonen, die *UAST-CapG^C-EGFP* (grün) zusammen mit *mRFP1-HP1* (rot) in Mitose 14 exprimieren (*α4tub-Gal4-VP16/UAST-CapG^C-EGFP II.3, mRFP1-HP1 II.1*). Die beschriebenen Kerne sind jeweils durch Pfeilspitzen markiert. Die Zeitpunkte der jeweiligen Aufnahmen sind in jedem Bild angegeben. Der Zeitpunkt t=0 entspricht dem letzten aufgenommenen Bild vor Eintreten der Anaphase. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm .

2.1.2. Die Chromatinassoziation von CapG^{NM}-EGFP ist nicht am Zentromer initiiert

Eine zeitlich dem endogenen CapG entsprechende Chromatinbeladung konnte für keines der verkürzten CapG-EGFP Fragmente beobachtet werden (vgl. Abbildung 6). CapG^{NM}-EGFP ist während der Interphase weitgehend zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 9A), kann aber nach dem Zusammenbruch der Kernhülle am Chromatin anlagern (Herzog, 2007). Um zu untersuchen,

ob auch diese verspätete Assoziation von CapG^{NM}-EGFP, gemäß der des endogenen Proteins, entlang der zentromeren Region der Chromosomen initiiert wird, wurde eine *in vivo* Mikroskopie durchgeführt. Hierbei wurden Embryonen mikroskopiert, welche *UAST-CapG^{NM}-EGFP* vermittelt durch *α4tub-Gal4-VP16* zusammen mit einem mRFP1-markierten Histon exprimieren (*α4tub-Gal4-VP16, His-2AvD-mRFP1 II.2/+; UAST-CapG^{NM}-EGFP III.2/+*). Die Expression von *His-2AvD-mRFP1* wird hierbei unter Kontrolle der genomischen regulatorischen Elemente des *His-2AvD*-Genlokus vermittelt. Zum Zeitpunkt des NEBD kann eine gleichmäßige Verteilung von CapG^{NM}-EGFP in der Zelle beobachtet werden (Abbildung 9B). Eine Chromatinlokalisierung findet im Folgenden gleichmäßig entlang der gesamten Chromosomen statt (Abbildung 9C). Es können keine lokal angereicherten Bereiche von CapG^{NM}-EGFP zu Beginn der Chromosomenassoziation vergleichbar zu denen von CapG^{FL}-EGFP beobachtet werden (vergleiche Abbildung 9C und Abbildung 8C). Die Anlagerung von CapG^{NM}-EGFP während der Metaphase sollte somit entlang der gesamten Chromosomenarme initiiert werden können.

Erst während der Metaphase werden lokale Anreicherungen von CapG^{NM}-EGFP am Chromatin deutlich (Abbildung 9D). Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um Anreicherungen des Proteinfragments an den Zentromeren der Chromosomen handelt, wurde eine anti-CID Färbung der *UAST-CapG^{NM}-EGFP* exprimierenden Embryonen vorgenommen. CID ist die Zentromer-spezifische Histon H3 Variante in *D. melanogaster*, die homolog zum CENP-A Protein von Vertebraten ist (Henikoff et al., 2000). Die lokal konzentrierten Bereiche von CapG^{NM}-EGFP überlappen jedoch nur teilweise mit den CID-spezifischen Signalen (Abbildung 9F bis I), was auf eine nicht ausschließlich Zentromer-spezifische Konzentration dieses Proteinfragments hinweist. CapG^{NM}-EGFP könnte weiterhin auch an den Heterochromatinbereichen der Chromosomenarme lokal angereichert vorliegen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Färbungen von Embryonen verschiedenen Alters vorgenommen. Die lokalen Anreicherungen von CapG^{NM}-EGFP am Chromatin konnten hierbei sowohl während der Mitose 11 als auch während der Mitose 14 beobachtet werden (vergleiche Abbildung 9G und I). Die frühe Embryonalentwicklung in *D. melanogaster* ist durch eine Phase sehr schneller Zellzyklen in einem syncytialen Blastoderm gekennzeichnet, in denen das Chromatin sehr homogen erscheint und kaum Transkription stattfindet (Edgar et al., 1986). Mit dem Einsetzen der Transkription embryonaler Gene setzt auch eine Transition im Erscheinungsbild des Chromatins ein, es erscheint zunehmend heterogen. Diese Transition findet während der Mitosen 10 – 14 statt (Edgar und Schubiger, 1986). Die Mitose 11 findet somit zu einem Zeitpunkt statt, an dem die

Heterochromatinbereiche der Chromosomen noch weitgehend undefiniert sind, was einer vorrangigen Konzentration von CapG^{NM}-EGFP am Heterochromatin wiederum entgegen spricht.

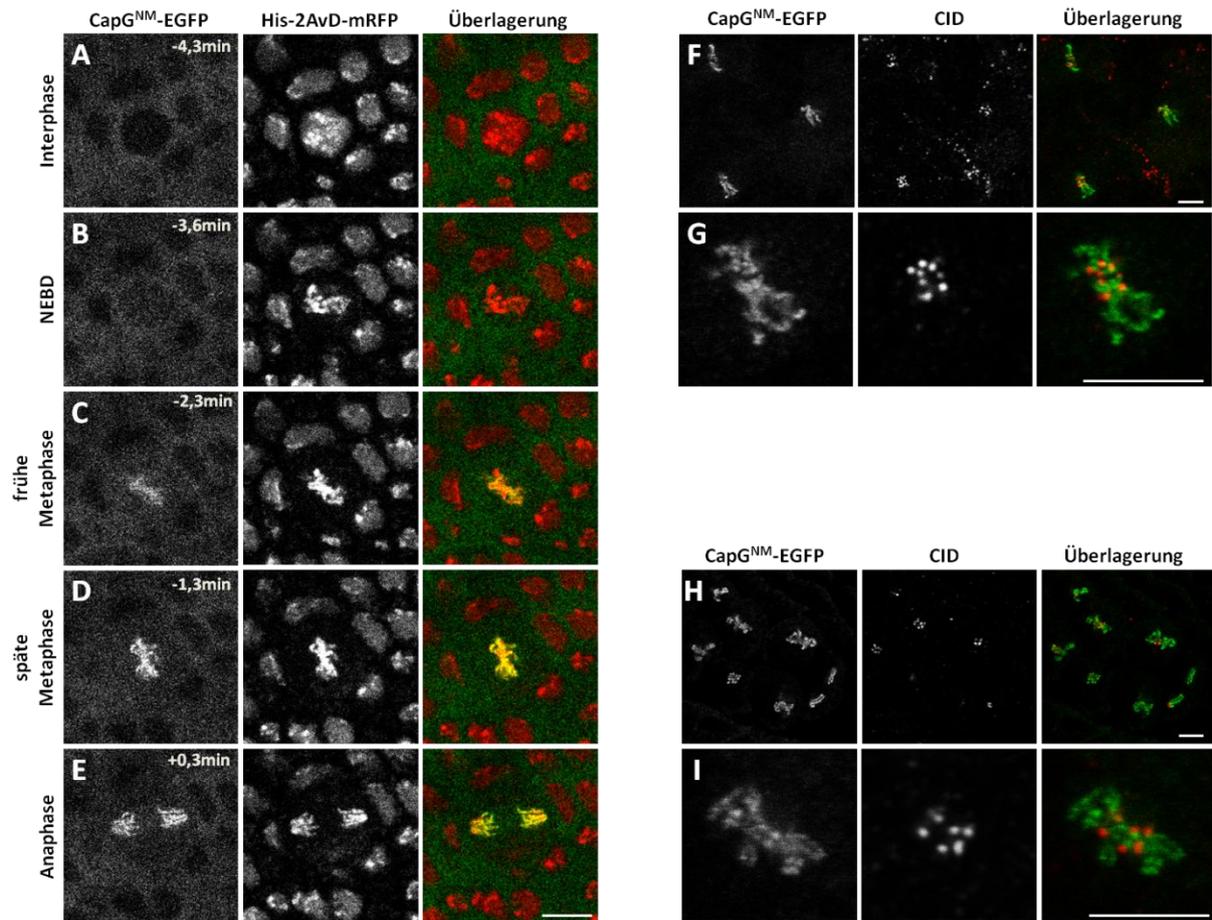


Abbildung 9: Die initiale Beladung von CapG^{NM}-EGFP erfolgt nicht über das Zentromer. **A bis E)** Lebende Embryonen, die *UAST-CapG^{NM}-EGFP* (grün) zusammen mit *His-2AvD-mRFP1* (rot) in Mitose 14 exprimieren (*α4tub-Gal4-VP16*, *His-2AvD-mRFP1 II.2/+*; *UAST-CapG^{NM}-EGFP III.2/+*). Die Zeitpunkte der jeweiligen Aufnahmen sind in jedem Bild angegeben. Der Zeitpunkt t=0 entspricht dem letzten aufgenommenen Bild vor Eintreten der Anaphase. **F bis I)** *UAST-CapG^{NM}-EGFP* exprimierenden Embryonen (*α4tub-Gal4-VP16*, *His-2AvD-mRFP1 II.2/+*; *UAST-CapG^{NM}-EGFP III.2/+*) wurden sowohl während Mitose 11 (**F** und **G**) als auch während Mitose 14 (**H** und **I**) fixiert und mit Kaninchen-anti-CID Antikörpern sondiert. In den Überlagerungen ist die Autofluoreszenz von CapG^{NM}-EGFP in grün und die anti-CID-Färbung in rot dargestellt. In **G**) und **I**) sind jeweils einzelne mitotische Figuren der in **F**) und **H**) dargestellten epidermalen Regionen gezeigt. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 µm.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Beladung von CapG^{NM}-EGFP erst nach dem Zusammenbrechen der Kernhülle erfolgt und nicht wie für das endogene CapG am Zentromer initiiert ist. Es findet eine gleichmäßige Assoziation des Proteinfragmentes entlang der Chromosomenarme statt. Bis hin zur späten Metaphase erscheint CapG^{NM}-EGFP allerdings inhomogen am Chromatin verteilt.

2.1.3. Die N-terminalen zwei-Drittel von CapG vermitteln biologische Funktionalität

Mutationen in *CapG* sind in *D. melanogaster* bereits im Embryonalstadium letal. Um die physiologische Relevanz der einzelnen Proteindomänen von CapG zu untersuchen, wurde geprüft, ob der *CapG*-mutante Phänotyp durch die Expression der verschiedenen *UAST-CapG-EGFP*-Transgeninsertionen komplementiert werden kann. Hierbei wurden drei unterschiedliche *CapG*-mutante Allele eingesetzt (*CapG*¹, *CapG*⁶ und *CapG*^{EP2346}). *CapG*¹ und *CapG*⁶ enthalten Punktmutationen, welche jeweils ein vorzeitiges Stopkodon an Stelle der Triplets der Aminosäuren 343 (*CapG*¹) und 77 (*CapG*⁶) einführen (Jäger et al., 2005). Bei *CapG*^{EP2346} handelt es sich um eine P-Element-Insertion in der 5'UTR, 17 bp stromaufwärts des Startkodons von *CapG* (Dej et al., 2004). Alle diese Mutationen sind homozygot embryonal letal und die mutanten Embryonen weisen während der Mitose 15 massive Anaphasenbrücken auf (Dej et al., 2004; Jäger et al., 2005).

Die unterschiedlichen *UAST-CapG-EGFP*-Transgene sollten durch die ubiquitär exprimierenden Treiber *da-Gal4* (Wodarz et al., 1995) bzw. *tubP-Gal4* (O'Donnell et al., 1994) in verschiedenen transheterozygot *CapG*-mutanten Fliegen exprimiert werden. Hierzu wurden Jungfrauen der Genotypen *CapG*¹/*CyO*; *da-Gal4/da-Gal4* oder *TM3,Ser* bzw. *CapG*¹/*CyO*; *tubP-Gal4/TM3,Ser* mit Männchen der Genotypen *CapG*⁶/*CyO*; *UAST-CapG*^X-*EGFP/UAST-CapG*^X-*EGFP* oder *TM3,Ser* bzw. *CapG*^{EP2346}/*CyO*; *UAST-CapG*^X-*EGFP/UAST-CapG*^X-*EGFP* oder *TM3,Ser* gekreuzt und deren Nachkommen analysiert. Nachkommen, welche den transheterozygot *CapG*-mutanten Genotyp komplementieren, konnten anhand der Abwesenheit des dominanten Markers *Cy* selektiert werden. Tabelle 1 zeigt den prozentualen Anteil der tatsächlich aufgetretenen Fliegen, die den transheterozygot *CapG*-mutanten Genotyp komplementieren können, von den nach den Mendelschen Regeln theoretisch erwarteten Fliegen des jeweiligen Geschlechts.

Das volle-Länge Konstrukt ist in der Lage, die physiologische Funktion von CapG in *CapG*¹/*CapG*⁶ transheterozygot *CapG*-mutanten Individuen zu vermitteln. Überraschenderweise konnten auch adulte Fliegen erhalten werden, welche *UAST-CapG*^{NM}-*EGFP* als alleiniges funktionelles *CapG*-Allel exprimieren. Keines der weiteren untersuchten Konstrukte war in der Lage, die Funktion von CapG in den *CapG*¹/*CapG*⁶ transheterozygot *CapG*-mutanten Fliegen zu komplementieren.

Im Versuchsansatz erlaubt in homozygot *CapG*-mutanten Individuen zunächst (bis einschließlich Mitose 14) die maternale Kontribution eine ungestörte Proliferation. Weiterhin kann die Expression der *UAST-CapG-EGFP*-Transgene, bedingt durch den *da-Gal4* Treiber, erst im späten Zellzyklus 14 vermittelt werden. So konnte eine Funktionalität der Transgeninsertionen, bedingt durch den Versuchsaufbau, während der ersten 14 Zellzyklen nicht untersucht werden. Da *UAST-*

Konstrukte in der weiblichen Keimbahn nicht exprimiert werden (Brand und Perrimon, 1993), konnte die Funktionalität der Transgeninsertionen auch während der Oogenese nicht untersucht werden. Sowohl die durch CapG^{FL}-EGFP, als auch die durch CapG^{NM}-EGFP komplementierten *CapG*¹/*CapG*⁶ transheterozygot *CapG*-mutanten Weibchen sind steril, was auf eine mitotische Funktion von CapG während der Oogenese oder sogar auf eine meiotische Funktion des Proteins schließen lässt.

Tabelle 1: Funktionalität der UAST-CapG^X-EGFP-Transgene. Angegeben ist die Komplementationsfähigkeit verschiedener mutanter *CapG*-Allelkombinationen für die UAST-CapG^X-EGFP-Transgeninsertionen nach ubiquitärer Expression in transheterozygot *CapG*-mutanten Fliegen. **n** stellt hier die Gesamtzahl der ausgezählten Fliegen dar, % ♀/ % ♂ den Anteil an tatsächlich aufgetretenen Weibchen bzw. Männchen, die zur Komplementation der *CapG*-mutanten Allele befähigt sind, bezogen auf die Anzahl der nach den Mendelschen Regeln erwarteten Fliegen im Falle einer vollständigen Komplementation. Die durch - gekennzeichneten Genotypen wurden experimentell nicht untersucht.

<u>da-Gal4/</u>	<i>CapG</i> ¹ / <i>CapG</i> ⁶			<i>CapG</i> ¹ / <i>CapG</i> ^{EP2346}		
	n	% ♀	% ♂	n	% ♀	% ♂
<i>UAST-CapG</i> ^{FL} -EGFP ^{III.2}	95	0	6	1355	42 fertil	55 fertil
<i>UAST-CapG</i> ^{FL} -EGFP ^{III.3}	345	2 steril, befruchtete Eier	10 fertil	865	64 fertil	80 fertil
<i>UAST-CapG</i> ^{NM} -EGFP ^{III.1}	1007	7 steril, keine Eier	4 fertil	900	70 fertil	68 fertil
<i>UAST-CapG</i> ^{NM} -EGFP ^{III.2}	310	40 steril, befruchtete Eier	20 fertil	372	110 fertil	105 fertil
<i>UAST-CapG</i> ^{NM1} -EGFP ^{III.1}	235	0	0	670	8	3
<i>UAST-CapG</i> ^{NM2} -EGFP ^{III.1}	-	-	-	950	3	1,5
<i>UAST-CapG</i> ^{NM3} -EGFP ^{III.1}	340	0	0	355	10	0
<i>UAST-CapG</i> ^N -EGFP ^{III.1}	-	-	-	660	1	1
<i>UAST-CapG</i> ^M -EGFP ^{III.1}	-	-	-	760	0,8	0
<i>UAST-CapG</i> ^{MC} -EGFP ^{III.1}	620	0	0	570	0	0
<i>UAST-CapG</i> ^C -EGFP ^{III.1}	900	0	0	-	-	-
<i>UAST-CapG</i> ^C -EGFP ^{III.2}	780	0	0	-	-	-
<i>UAST-CapG</i> ^C -EGFP ^{III.4}	820	0	0	-	-	-
<i>tubP-Gal4/</i> <i>UAST-CapG</i> ^N ^{III.1} , <i>UAST-CapG</i> ^{MC} ^{III.2}	800	0	0	-	-	-

Die Allelkombination *CapG*¹/*CapG*^{EP2346} konnte durch die untersuchten Transgene insgesamt besser komplementiert werden. Hier konnte auch eine Funktionalität der kürzeren CapG-Fragmente beobachtet werden, jedoch wesentlich uneffektiver als für CapG^{FL}-EGFP und CapG^{NM}-EGFP. Die Abdomen dieser komplementierten Fliegen wiesen allerdings Defekte bei der Ausbildung der dorsalen Strukturen auf, was Zellproliferationsdefekte impliziert (Daten nicht gezeigt). Weiterhin sind sowohl die durch CapG^{FL}-EGFP als auch die durch CapG^{NM}-EGFP komplementierten *CapG*¹/*CapG*^{EP2346} transheterozygot *CapG*-mutanten Weibchen fertil.

Bei $CapG^{EP2346}$ handelt es sich daher sehr wahrscheinlich um ein hypomorphes Allel, dessen inhibitorische Effekte eventuell durch die verschiedenen CapG-EGFP Fragmente titriert werden können. $CapG^1$ und $CapG^6$ enthalten außerdem die weiteren rezessiven Allele *aristaless*, *black*, *curved* und *speck* (Lindsley, 1992) welche die Vitalität der $CapG^1/CapG^6$ komplementierten Individuen zusätzlich einschränken.

Die transgenen Fliegen wurden durch P-Element vermittelte Keimbahn-Transformation von *D. melanogaster* w^1 -Embryonen erzeugt (Rubin und Spradling, 1982), wobei eine zufällige Insertion der Transgene in das Fliegen genom stattfindet. Dass Fliegen unterschiedlicher Transgeninsertionen der einzelnen Fragmentkonstrukte nicht das gleiche Maß an Funktionalität zeigen, ist somit auch auf Insertionseffekte und dadurch bedingte, unterschiedliche Expressionsstärken der Transgene zurückzuführen. Auffallend ist auch, dass die $UAST-CapG^{NM}-EGFP$ III.2 exprimierenden Individuen die Allellkombination $CapG^1/CapG^6$ weitaus besser komplementieren können als die $UAST-CapG^{FL}-EGFP$ III.2 oder $UAST-CapG^{FL}-EGFP$ III.3 exprimierenden Fliegen. Diese Beobachtung korreliert wiederum nicht mit der unterschiedlichen Expressionsstärke der Transgene. Die Expression beider $UAST-CapG^{NM}$ -Transgene ($UAST-CapG^{NM}-EGFP$ III.1 und $UAST-CapG^{NM}-EGFP$ III.2) ist gegenüber der der $UAST-CapG^{FL}$ -Transgene ($UAST-CapG^{FL}-EGFP$ III.2 und $UAST-CapG^{FL}-EGFP$ III.3) nur etwa 1,5-fach erhöht (Daten nicht gezeigt).

Einen Effekt auf die Funktionalität der Fusionsproteine könnte auch die C-terminale EGFP-Markierung ausüben. Diese könnte die Funktion des volle-Länge CapG aufgrund von sterischen Effekten behindern. So konnten auch für Fliegen, welche ein C-terminal EGFP-markiertes CapG unter Kontrolle der genomischen regulatorischen Sequenzen exprimieren, nur 17% der theoretisch erwarteten Fliegen erhalten werden, welche die Allellkombination $CapG^1/CapG^6$ komplementieren konnten (Nagarkar, 2010). CapG besitzt 1351 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von etwa 154 kDa auf. Das EGFP markierte volle-Länge Fusionsprotein umfasst 1589 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 181 kDa. Die EGFP-markierten N-terminalen zwei-Drittel von CapG sind hier mit 1216 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 140 kDa wesentlich kompakter und entsprechen von der Größe eher dem endogenen CapG.

Insgesamt kann eine Korrelation der Chromatinlokalisation zum Zeitpunkt des NEBD am mitotischen Chromatin mit der Funktionalität der Transgene hergestellt werden. Die N-terminalen zwei-Drittel von CapG sind hierbei essentiell für die Proteinfunktion. Überraschenderweise ist eine nukleäre Lokalisation von CapG während der Interphase nicht

essentiell, was gegen wesentliche Funktionen von CapG innerhalb des Zellkerns während der Interphase spricht.

2.1.4. Die Expression verkürzter CapG^{NM}-EGFP Transgene führt zur SAC-vermittelten Verzögerung der Mitose

Keines der verkürzten CapG^{NM}-Fragmente war in der Lage, in lebenden Embryonen während der frühen Mitose effizient am Chromatin zu lokalisieren (Frank, 2008). Nach Expression dieser Fragmente konnte allerdings eine erhebliche Verzögerung der Mitosedauer (insbesondere die Zeitspanne vom erstmaligen Auftreten einer Metaphasenplatte bis zum Eintreten der Anaphase) während der Mitose 15 beobachtet werden (Frank, 2008 und Abbildung 10B und D). Nach dieser verzögerten Mitose erfolgte eine Segregation der Chromatiden und es wurden keine weiteren Phänotypen beobachtet. Verglichen zur Metaphasedauer von *UAST-CapG^{FL}-EGFP* bzw. *UAST-CapG^{NM}-EGFP* exprimierenden Embryonen, war die Metaphasedauer nach Expression der verkürzten *UAST-CapG^{NM}-EGFP*-Transgene quantitativ kaum unterschiedlich um den Faktor 4-5 verlängert (Abbildung 10D). Das lässt vermuten, dass das lange Verharren der Zellen in der Metaphase durch einen analogen Mechanismus, beispielsweise der Aktivierung des Spindelassemblierungs-Kontrollpunkts (SAC, *spindle assembly checkpoint*) ausgelöst wird. Der SAC kontrolliert den Übergang von der Meta- zur Anaphase. Erst wenn eine korrekte Anlagerung der Kinetochore der Schwesterchromatiden an den Mikrotubuli entgegengesetzter Zellpole stattgefunden hat, wird das Kohäsion im Zentromerbereich gespalten, und die Schwesterchromatiden können zu den Zellpolen segregiert werden (Musacchio und Hardwick, 2002).

Um zu überprüfen ob, der SAC nach Expression der verkürzten *UAST-CapG^{NM}-EGFP*-Transgene aktiviert wird, wurden daher Embryonen mikroskopiert, welche eines der Transgenkonstrukte (*UAST-CapG^{NM1}-EGFP*) zusammen mit dem mRFP1-markierten Histon (*His-2AvD-mRFP1*) in einem *Mad2*-mutanten genetischen Hintergrund exprimieren. *Mad2* ist eine Komponente des SAC, welche in *D. melanogaster* nicht essentiell ist (Buffin et al., 2007). Bei Expression von *UAST-CapG^{NM1}-EGFP* in *Mad2*-Mutanten und somit SAC-inaktiven Embryonen, konnte eine Reduktion der Metaphasendauer gegenüber der Expression dieses Fragments in *Mad2*-wildtypischen Embryonen festgestellt werden (Abbildung 10D). Durch Expression der verkürzten *UAST-CapG^{NM}-EGFP* Transgene zusätzlich zu endogenem *CapG* treten wahrscheinlich dominant-negative Effekte auf, durch die der SAC aktiviert wird. Während der verzögerten Metaphase

sollten diese Effekte korrigiert werden können, da im weiteren Verlauf der Mitose keine Phänotypen beobachtet werden können.

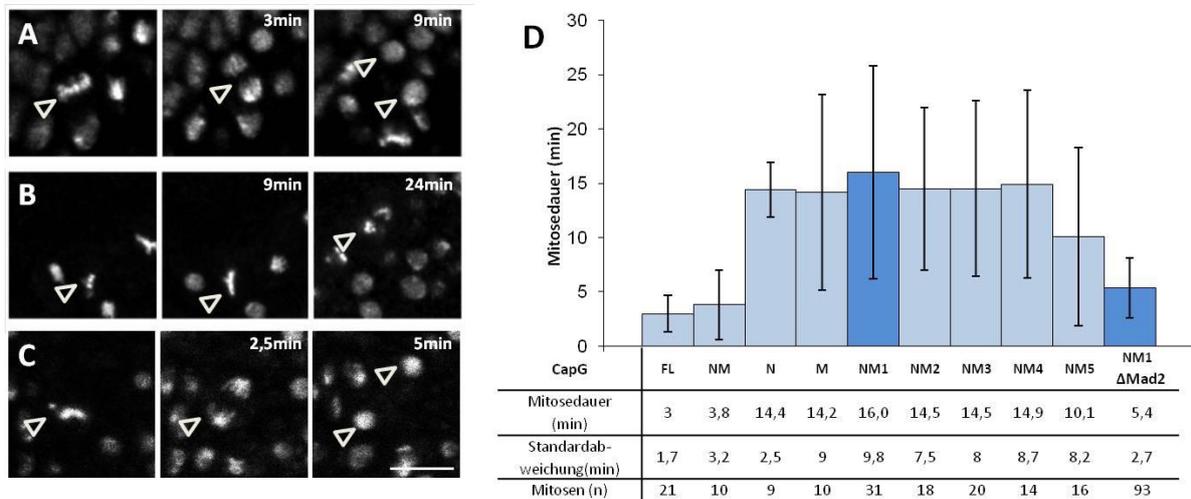


Abbildung 10: Die Expression verkürzter *UAST-CapG^{NM}-EGFP* Transgene führt zur SAC-abhängigen Verzögerung der Metaphasen. **A)** Lebende Embryonen die *UAST-CapG^{FL}-EGFP* zusammen mit *His-2AvD-mRFP1* in Mitose 15 exprimieren (*α 4tub-Gal4-VP16, His-2AvD-mRFP1 II.2/+; UAST-CapG^{FL}-EGFP III.2/+*) **B)** Lebende Embryonen die *UAST-CapG^{NM1}-EGFP* zusammen mit *His-2AvD-mRFP1* in Mitose 15 exprimieren (*α 4tub-Gal4-VP16, His-2AvD-mRFP1 II.2/UAST-CapG^{NM1}-EGFP II.1*). **C)** Lebende Embryonen die *UAST-CapG^{NM1}-EGFP* zusammen mit *His-2AvD-mRFP1* in einem *Mad2*-mutanten genetischen Hintergrund in Mitose 15 exprimieren (*α 4tub-Gal4-VP16, His-2AvD-mRFP1 II.2/UAST-CapG^{NM1}-EGFP II.1; Mad2 Δ*). Gezeigt ist die Expression des *His-2AvD-mRFP1* zur Visualisierung des Chromatins. Die Zeitpunkte der jeweiligen Aufnahmen sind in jedem Bild angegeben. Der Zeitpunkt t=0 entspricht dem Auftreten der Metaphasenplatte. Durch die Pfeilspitzen sind die beschriebenen Kerne verdeutlicht. Die Maßstabsbalken betragen 5 μ m. **D)** Quantitative Analyse der Metaphasedauer von Mitose 15 in der dorsalen Epidermis in lebenden Embryonen, welche die unterschiedliche Transgeninsertionen der angegebenen *UAST-CapG-EGFP* Transgene zusammen mit *His-2AvD-mRFP1* in Mitose 15 exprimieren. Es wurde jeweils die Dauer der Metaphase vom ersten Auftreten einer Metaphasenplatte bis zum Beginn der Anaphase bestimmt. In dunkelblau sind hierzu die Dauern unterschiedlicher Transgeninsertionen des *UAST-CapG^{NM1}-EGFP* bei Expression in *Mad2*-wildtypischen Embryonen (Balken 5) verglichen zu der in *Mad2*-mutanten Embryonen (Balken 10: *α 4tub-Gal4-VP16, His-2AvD-mRFP1 II.2/UAST-CapG^{NM1}-EGFP II.1; Mad2 Δ*) dargestellt.

2.1.5. Die N-terminalen zwei-Drittel von CapG sind essentiell für Interaktion mit den weiteren Condensin-Untereinheiten

Bei den Lokalisationsstudien der CapG-EGFP-Fragmente in Embryonen konnten zwei hauptsächliche Muster der Chromatinassoziation während der Mitose beobachtet werden. Die beiden funktionellen Proteinfragmente CapG^{FL}-EGFP und CapG^{NM}-EGFP können nach dem Zusammenbrechen der Kernhülle am Chromatin lokalisieren. Eine Chromatinlokalisierung der Fragmente CapG^C-EGFP und CapG^{MC}-EGFP kann hingegen erst während der Anaphase beobachtet werden. Alle weiteren untersuchten Fragmente können während der 14.

epidermalen Mitose nicht am Chromatin lokalisieren. Diese unterschiedlichen Lokalisationsmuster könnten mit der Fähigkeit der einzelnen Proteinfragmente korrelieren, in einen funktionellen Condensin-Komplex assembliert zu werden.

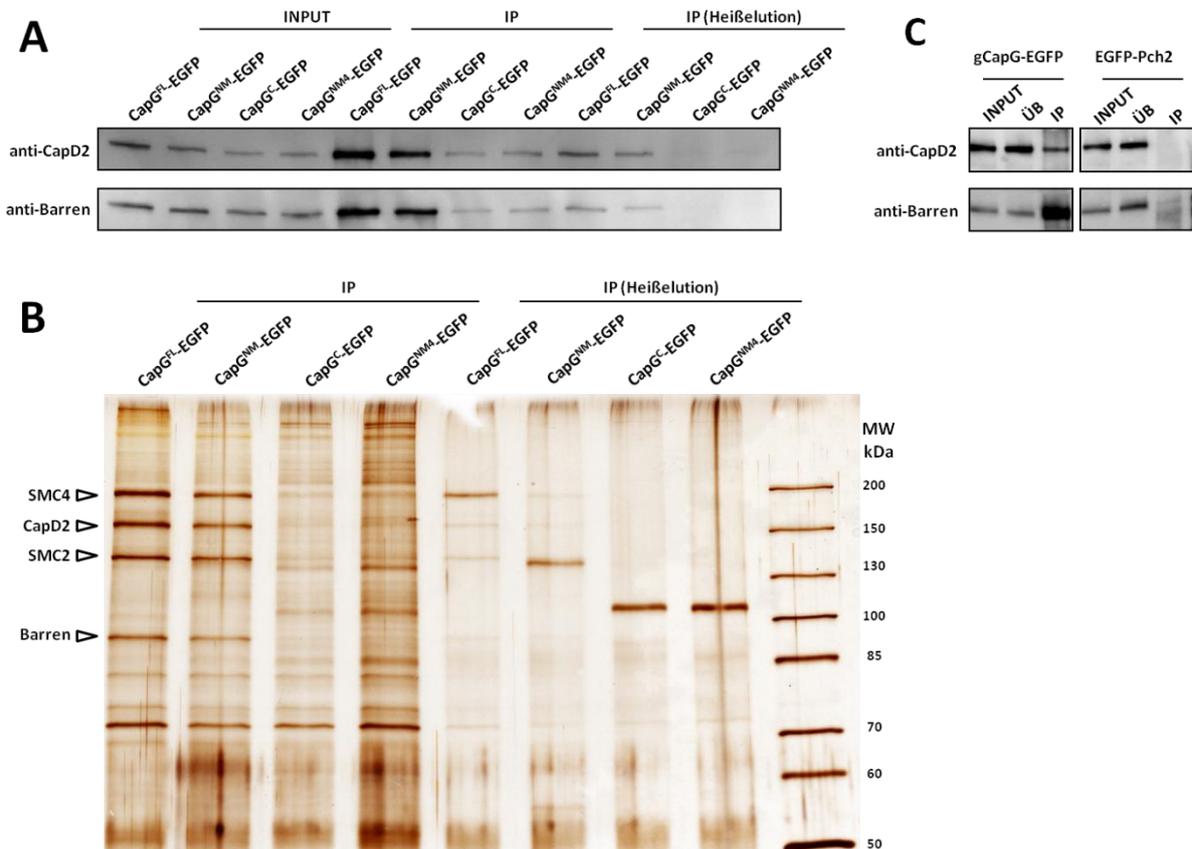


Abbildung 11: Die N-terminalen zwei-Drittel von CapG sind essentiell für die Fähigkeit einen Condensin-Komplex auszubilden. Extrakte aus 3-6 Stunden alten Embryonen, die die entsprechenden EGFP-markierten CapG-Fragmente exprimieren ($\alpha 4\text{-tub-Gal4-VP16/+}$; $UAS\text{-CapG}^{\text{FL}}\text{-EGFP III.2/+}$ und $\alpha 4\text{-tub-Gal4-VP16/+}$; $UAS\text{-Cap}^{\text{NM4}}\text{-EGFP III.2/+}$ und $\alpha 4\text{-tub-Gal4-VP16/+}$; $UAS\text{-CapG}^{\text{C}}\text{-EGFP III.2/+}$ und $\alpha 4\text{-tub-Gal4-VP16/UAS-CapG}^{\text{NM4}}\text{-EGFP II.1}$), wurden zur Immunpräzipitation mit Kaninchen-anti-EGFP Antikörpern, welche kovalent an Protein G-Sepharose gekoppelt waren, eingesetzt. An die Sepharose gebundene Proteine wurden mit Elutionspuffer (IP) und anschließend durch SDS-Probenpuffer (IP, Heißelution) eluiert. **A)** Extrakte und Präzipitate wurden durch Immunblotten unter Verwendung der entsprechenden Antikörper auf eine Kopräzipitation der Condensin I-Untereinheiten Barren und CapD2 untersucht. **B)** Durch SDS-Gelelektrophorese der Präzipitate und anschließender Silberfärbung konnte die Interaktionsfähigkeit der untersuchten Fragmente mit den Condensin-Kernuntereinheiten SMC2 und SMC4 gezeigt werden. Deren Position im SDS-Gel konnte in Analogie zu den in Abbildung 21C gezeigten Banden abgeschätzt werden, welche mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden. In den Spuren der Eluate durch Elutionspuffer (IP) können die kopräzipitierten Condensin I-Untereinheiten nachgewiesen werden, in den Spuren der Heißelution (IP, Heißelution) werden vor allem die EGFP-markierten CapG-Fragmente eluiert. Diese Spur dient somit als Ladekontrolle. **C)** Zur Kontrolle wurden Extrakte aus 3-6 Stunden alten Embryonen die CapG unter Kontrolle des *CapG*-genomischen Promotors (*gCapG-EGFP*) bzw. EGFP-markiertes Pch2 unter Kontrolle des *sryα*-Promotors exprimieren (*sryα-Gal4*, *UAS-EGFP-Pch2*), zur Immunpräzipitation mit Kaninchen-anti-EGFP Antikörpern, welche kovalent an Protein G-Sepharose gekoppelt waren, eingesetzt. An die Sepharose gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer (IP) eluiert.

Durch Immunpräzipitation einzelner CapG-EGFP Fragmente konnte deren Interaktionsfähigkeit mit den weiteren Condensin I-Untereinheiten untersucht werden. Hierzu wurden native Proteinextrakte von Embryonen hergestellt, in welchen die entsprechenden EGFP-markierten Fragmente unter Kontrolle von *α4tub-Gal4-VP16* exprimiert wurden. Die EGFP-fusionierten Proteine wurden dann durch anti-EGFP Sepharose immunpräzipitiert und die erhaltenen Präzipitate durch Immunblotten auf den Gehalt der anderen nicht-SMC-Untereinheiten untersucht. Durch CapG^{NM}-EGFP konnten die Condensin I-spezifischen Untereinheiten Barren und CapD2 nahezu genauso effektiv präzipitiert werden wie durch CapG^{FL}-EGFP. Dagegen konnte für CapG^{NM4}-EGFP und CapG^C-EGFP eine nur sehr schwache Kopräzipitation von Barren und CapD2 beobachtet werden (Abbildung 11A). Zur Kontrolle wurde die C-terminal EGFP-markierte AAA-Adenosin Triphosphatase Pch2 verwendet, durch welche weder Barren noch CapD2 kopräzipitiert werden konnten (Abbildung 11C). Nach SDS-Gelelektrophorese von Proben der Präzipitate und anschließender Silberfärbung konnte weiterhin gezeigt werden, dass CapG^{NM}-EGFP ebenso in der Lage war, die Condensin-Kernuntereinheiten SMC2 und SMC4 vergleichbar dem CapG^{FL}-EGFP zu präzipitieren (Abbildung 11B). Eine entsprechende Präzipitation von SMC2 und SMC4 durch CapG^{NM4}-EGFP oder CapG^C-EGFP wurde nicht beobachtet (Abbildung 11B). Durch die Heißelution konnte sichergestellt werden, dass entsprechende Mengen der unterschiedlichen EGFP-Fusionsproteine als Köder an die Sepharose gebunden waren (Abbildung 11B).

Domänen, welche eine Interaktion mit Barren und CapD2 vermitteln, sind demnach innerhalb der N-terminalen zwei-Drittel von CapG lokalisiert, wo sich auch die *HEAT-Repeat*-Motive befinden. CapG^{NM4}-EGFP, dem etwa ein Drittel der *HEAT-Repeat*-Domänen fehlen, ist zu dieser Interaktion nicht befähigt. Die Domänen innerhalb der N-terminalen zwei-Drittel von CapG vermitteln wahrscheinlich über die Interaktion mit den anderen Condensin I-Untereinheiten eine Lokalisation am Chromatin während der Meta- und Anaphase und sind außerdem essentiell für die Proteinfunktion von CapG. Die Chromatinbindung von CapG^C-EGFP sollte hingegen unabhängig von einer Interaktion mit den anderen Condensin-Untereinheiten, eventuell sogar direkt am Chromatin, stattfinden können.

2.1.6. CapG liegt in der Fliege in unterschiedlichen Isoformen vor

Um Immunfluoreszenz-, Immunblot- und Immunpräzipitationsexperimente durchführen zu können, wurden in unserer Arbeitsgruppe polyklonale Antikörper gegen CapG generiert

(Reithinger, 2009). Hierzu wurde ein N-terminales Fragment von CapG in Bakterien exprimiert, gereinigt und zur Immunisierung von Meerschweinchen und Kaninchen eingesetzt. Die erhaltenen Antikörper wurden affinitätsgereinigt und charakterisiert (Reithinger, 2009).

In Immunblots von Proteinextrakten aus w^1 -Embryonen bzw. Ovarien können nach Verwendung von diesen polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen (Abbildung 12A) und auch aus Meerschweinchen (Reithinger, 2009) zwei Banden im erwarteten Größenbereich von CapG detektiert werden. Beide Proteinbanden sind spezifisch für das endogene CapG, da sie in Proteinextrakten von Fliegenovarien, welche *UAST-CapG^{NM}-EGFP* als alleinig funktionelles *CapG*-Allel exprimieren, nicht nachgewiesen werden können (Abbildung 12A, *CapG^{NM}-Rescue*-Ovarien). Allerdings werden in diesen Proteinextrakten auch für das *CapG^{NM}-EGFP* zwei Banden detektiert.

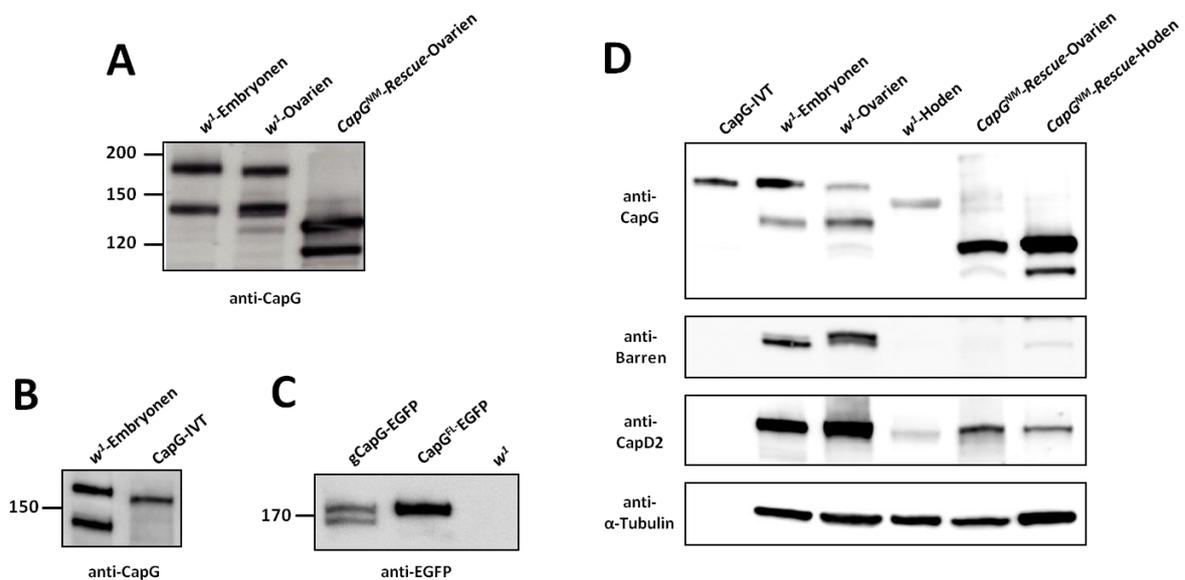


Abbildung 12: In der Fliege können verschiedene Isoformen von CapG nachgewiesen werden. **A)** Proteinextrakte von 3-6 Stunden alten w^1 -Embryonen und Ovarien, sowie aus Ovarien von Fliegen, welche *UAST-CapG^{NM}-EGFP* als allein funktionelles *CapG*-Allel exprimieren (*CapG^{NM}-Rescue* = *CapG⁶/CapG¹*; *UAST-CapG^{NM}-EGFP III.2/da-Gal4*), wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Der Immunblot wurde mit Kaninchen-anti-CapG(N) Antikörpern sondiert. **B)** Proteinextrakte aus 3-6 Stunden alten w^1 -Embryonen und aus einem *in vitro* transkribierten und translatierten cDNA-Plasmid (*pCS2-CapG*) von CapG (CapG-IVT) wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und mit Kaninchen-anti-CapG(N)-Antikörpern sondiert. **C)** Ein Proteinextrakt aus transgenen Fliegen, welche ein C-terminal EGFP-markiertes CapG exprimieren, das basierend auf der für *CapG*-kodierenden genomischen DNA hergestellt wurde (*gCapG-EGFP*) sowie ein Proteinextrakt aus transgenen Fliegen, welche ein C-terminal EGFP-markiertes CapG exprimieren, das basierend auf der cDNA von CapG generiert wurde (*CapG^{FL}-EGFP*= *α4tub-Gal4-VP16/+*; *UAST-CapG^{FL}-EGFP III.2/+*), wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und mit Kaninchen-anti-EGFP-Antikörpern sondiert. **D)** Proteinextrakte von 3-6 Stunden alten w^1 -Embryonen, Ovarien und Hoden sowie aus Ovarien und Hoden der *CapG^{NM}-Rescue*-Fliegen, wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde nacheinander mit Kaninchen-anti-CapG(N), anti-Barren, anti-CapD2 und anti-Tubulin als Ladekontrolle sondiert.

In Proteinextrakten aus transgenen Fliegenembryonen, in welchen ein C-terminal EGFP-markiertes CapG exprimiert wird, das auf Basis der genomischen DNA von CapG generiert wurde, werden durch Kaninchen-anti-EGFP Antikörper ebenso zwei Banden entsprechender Größe erfasst (Abbildung 12C, gCapG-EGFP). Im Proteinextrakt aus Embryonen transgener Fliegen, in denen *UAST-CapG^{FL}-EGFP* unter Kontrolle eines Gal4-Promotors exprimiert wird (*UAST-CapG^{FL}-EGFP*), kann durch Kaninchen-anti-EGFP Antikörper im Immunblot jedoch nur eine Bande detektiert werden (Abbildung 12C, CapG^{FL}-EGFP). Die Migration dieser Bande im SDS-Gel entspricht derjenigen der höher-molekularen Bande im Extrakt aus gCapG-EGFP Embryonen. Die *UAST-CapG-EGFP* Konstrukte wurden auf der Basis von cDNA (*SD10043*) von *CapG* generiert. Mit dieser cDNA wurde ebenso ein Plasmid hergestellt (*pCS2-CapG*), mit welchem CapG *in vitro* transkribiert und translatiert werden konnte. Nach Transkription und Translation des *pCS2-CapG* im Retikulozytenlysat konnte für das erhaltene Protein im Immunblot, nach Sondierung mit Kaninchen-anti-CapG-Antikörpern ebenso nur eine Bande detektiert werden (Abbildung 12B, CapG-IVT). Die Migration dieser Bande entspricht wiederum derjenigen der höher-molekularen Bande aus dem Extrakt der *w¹*-Embryonen, erscheint allerdings leicht nach unten verschoben. Überraschenderweise konnte in Proteinextrakten aus Hoden von *w¹*-Fliegen durch den Kaninchen-anti-CapG Antikörper nur eine einzelne Bande detektiert werden (Abbildung 12D, *w¹*-Hoden). Diese Männchen-spezifische Isoform von CapG weist wiederum ein modifiziertes Laufverhalten im SDS-Gel verglichen zu den beiden Isoformen von CapG von Embryonen und Ovarien auf.

Der hergestellte Blot wurde weiterhin auch mit Antikörpern sondiert, welche gegen die beiden weiteren nicht-SMC Condensin I-Untereinheiten Barren und CapD2 gerichtet sind (Abbildung 12D). Barren konnte im Proteinextrakt aus Hoden von *w¹*-Fliegen nicht nachgewiesen werden. Auch das Signal von CapD2 ist in den Proteinextrakten der Hoden schwächer als in denen der Ovarien. Auffallend ist weiterhin, dass sowohl Barren als auch CapD2 in den Ovarienextrakten der Fliegen, welche *UAST-CapG^{NM}-EGFP* als alleiniges funktionelles *CapG*-Allel exprimieren (*CapG^{NM}-Rescue-Ovarien*), weniger abundant sind als in den Ovarienextrakten der *w¹*-Fliegen (Abbildung 12D). Auch nach Abreicherung von Barren bzw. CapD2 durch RNAi in *S2 Drosophila*-Zellen oder auch in *Barren* bzw. *SMC4* homozygot-mutanten Embryonen konnte eine Reduktion der Proteinlevel der weiteren Condensin I-Untereinheiten beobachtet werden (Oliveira et al., 2005; Savidou et al., 2005). Dieser Effekt kann für die Proteinproben aus den Fliegenhoden nicht bestätigt werden. Allerdings ist anhand der α -Tubulin-Sondierung zu erkennen, dass sich die Lademengen der Proben hier nicht entsprechen.

Bei der niedermolekularen Proteinbande von CapG könnte es sich um eine Isoform des Proteins handeln, welche durch Translation einer alternativ gespleißten mRNA entsteht. Nicht ganz konsistent hierbei ist das Auftreten der Doppelbande in Proteinextrakten *UAST-CapG^{NM}-EGFP* exprimierender Fliegen, da auch dieses Konstrukt basierend auf der cDNA von *CapG* hergestellt wurde. Sowohl bei Detektion des endogenen Proteins durch anti-CapG(N)-Antikörper, als auch bei Detektion des auf genomischer DNA basierenden, C-terminal markierten CapG-EGFP durch anti-EGFP-Antikörper, kann eine Doppelbande detektiert werden. Die prä-mRNA von *CapG* sollte demzufolge intern prozessiert werden. Das Überspringen von Exons (*Exon-skipping*) oder das Benutzen alternativer 5' bzw. 3' Spleißstellen könnten hierbei in einer verkürzten mRNA resultieren.

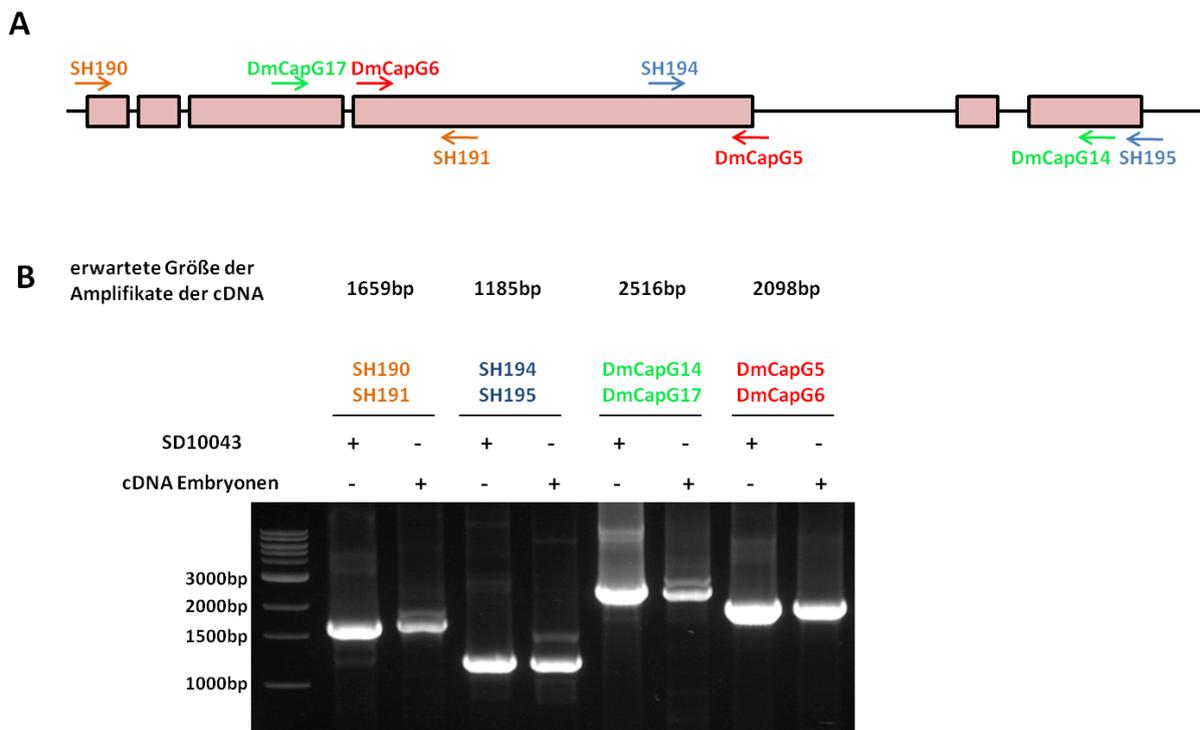


Abbildung 13: Die prä-mRNA von *CapG* wird in Embryonen nicht alternativ gespleißt. **A)** Darstellung der *CapG* kodierenden Genregion. Die rosa Balken entsprechen den 6 Exons von *CapG*. Angegeben sind die Oligonukleotid-Paare, welche zur PCR-Analyse eingesetzt wurden, um ein mögliches alternatives Spleißen der *CapG*-mRNA nachzuweisen. **B)** Gelelektrophoretische-Analyse der PCR zum Nachweis eines alternativen Spleißens der prä-mRNA von *CapG*. Als Matrize für die PCR wurde das cDNA-Plasmid *SD10043* und eine cDNA eingesetzt, welche durch reverse Transkription einer aus Fliegenembryonen hergestellten mRNA gewonnen wurde (cDNA Embryonen). Die erwarteten Produkte nach Amplifikation der cDNA sind angegeben.

Um eine eventuell verkürzte mRNA von *CapG* nachzuweisen, wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Die genomische DNA von *CapG* enthält 6 Exons und 5 Introns (Abbildung 13A). Es

wurden die in Abbildung 13A angegebenen Primerpaare verwendet, um verschiedene Bereiche von CapG zu amplifizieren. Als Matrize wurde zum einen das cDNA-Plasmid *SD10043* eingesetzt, welches auch für die Klonierung der *UAST-CapG-EGFP* Konstrukte und des *pCS2-CapG* genutzt wurde. Zum anderen wurde durch reverse Transkription einer mRNA aus *w¹*-Fliegenembryonen, eine cDNA hergestellt und als Matrize eingesetzt. Bei einem Fehlen von internen Exonsequenzen sollten nach Amplifikation der entsprechenden hergestellten cDNA aus Fliegenembryonen auch kleinere Fragmente im Agarosegel nachweisbar sein. Die jeweils erhaltenen Amplifikate der cDNA, die aus der mRNA der Embryonen gewonnen wurden, entsprechen aber ohne Ausnahme denen des cDNA-Plasmides *SD10043* (Abbildung 13B).

Die Ergebnisse der PCR-Analyse legen nahe, dass die im Immunblot auftretende Doppelbande nicht auf ein alternatives Spleißergebnis der prä-mRNA von *CapG* zurückzuführen ist. So sollten in der Fliege unterschiedliche Isoformen von CapG vorhanden sein, die auf eine Modifikation des Proteins zurückzuführen sind.

2.1.7. CapG wird während des Zellzyklus phosphoryliert

In unterschiedlichen Geweben der Fliege treten auch unterschiedliche Isoformen von CapG auf. Das könnte darauf hinweisen, dass CapG durch entsprechende Modifikationen gewebsspezifisch reguliert werden kann. Weiterhin wurde untersucht, ob eine entsprechende Regulation außerdem auch zellzyklusspezifisch stattfinden kann. Hierzu wurden Embryonen von Fliegen des Genotyps *string^{7B}, P[w+,Hs-string]/TM3,Ser* während der Mitose 14 durch Hitzeschock synchronisiert (siehe Materialien und Methoden 4.5.3). Anschließend wurden Embryonen sortiert, in welchen sich alle Zellen in der G2-Phase (vor Mitose 14), Prophase, Metaphase, Anaphase oder Telophase befanden. Es wurden Proteinextrakte der sortierten Embryonen hergestellt und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Immunblot konnten zwei Banden für CapG während der verschiedenen Phasen der Mitose gleichermaßen intensiv nachgewiesen werden (Abbildung 14A), was auf eine Funktionalität beider Isoformen des Proteins während der Mitose schließen lässt. Das Laufverhalten beider Banden im SDS-Gel scheint jedoch während der Metaphase verzögert zu sein. Die Zuordnung der Embryonen zu Ana- und Telophase konnte hierbei im Immunblot durch eine anti-Cyclin B-Sondierung bestätigt werden (Abbildung 14A).

Es ist bereits bekannt, dass die Condensin-Untereinheiten verschiedener Organismen während der Mitose durch Phosphorylierung reguliert werden (zusammengefasst in Bazile et al. (2010)). So könnten auch in *D. melanogaster* beide Isoformen von CapG während der Metaphase

phosphoryliert vorliegen, was die Verzögerung der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteinformen im SDS-Gel erklären würde. Im Folgenden wurden daher die Phosphorylierung von CapG und die der weiteren nicht-SMC Condensin I-Untereinheiten während der Mitose untersucht. 1-2 Stunden alte syncytiale w^1 -Embryonen wurden in einer Mischung aus Heptan und Schneiders-Medium inkubiert, dem Demecolzin zugesetzt wurde. Demecolzin hemmt die Ausbildung der Mikrotubuli der mitotischen Spindel, wodurch die Zellen in der Prometaphase arretieren. So konnte ein Proteinextrakt aus Metaphase-arretierten und somit Zellzyklus-synchronen Embryonen erhalten werden (+Deme). Es wurde außerdem ein nativer Proteinextrakt von 2-4 Stunden alten, nicht Zellzyklus-synchronen w^1 -Embryonen hergestellt. Ein Teil dieses Extrakts wurde durch λ -Phosphatase *in vitro* dephosphoryliert (+ λ). Ein weiterer Teil des Extrakts wurde nicht mit λ -Phosphatase behandelt (- λ), einem letzten Teil wurde λ -Phosphatase zugegeben und unmittelbar danach denaturiert (+ λ^+). Nach SDS-Gelelektrophorese wurde ein Immunblot angefertigt und mit anti-CapG(N), anti-CapD2, anti-Barren und anti- α -Tubulin-Antikörpern sondiert (Abbildung 14B).

Im Proteinextrakt aus nicht synchronisierten Embryonen (- λ) können beide Isoformen von CapG im SDS-Gel schneller wandern als die Isoformen aus Metaphase-arretierten, synchronen Embryonen (+Deme) (Abbildung 14B). Nach zusätzlicher Dephosphorylierung des Extrakts aus nicht synchronisierten Embryonen (+ λ) kann eine weitere Beschleunigung des Laufverhaltens beider Banden beobachtet werden (Abbildung 14B). Das deutet darauf hin, dass CapG während des gesamten Zellzyklus phosphoryliert vorliegt, während der Metaphase allerdings zusätzliche Phosphorylierungen stattfinden können.

Das Phosphorylierungsmuster von CapG unterscheidet sich außerdem von dem der weiteren Condensin I-Untereinheiten CapD2 und Barren. Auch für CapD2 kann nach Phosphatasebehandlung des Proteinextrakts aus nicht-synchronen Embryonen (+ λ) ein beschleunigtes Laufverhalten im SDS-Gel beobachtet werden (Abbildung 14B). Es kann jedoch kein Unterschied im Laufverhalten von Metaphase-arretierten, synchronen Embryonen (+Deme) zu nicht synchronisierten Embryonen (- λ) festgestellt werden (Abbildung 14B). Eine Mitose-spezifische Phosphorylierung von CapD2 ist daher unwahrscheinlich. Im Gegensatz dazu ist für Barren in Metaphase-arretierten Embryonen (+Deme) im Vergleich zu nicht synchronisierten Embryonen (- λ) ein verzögertes Laufverhalten im SDS-Gel festzustellen (Abbildung 14 B).

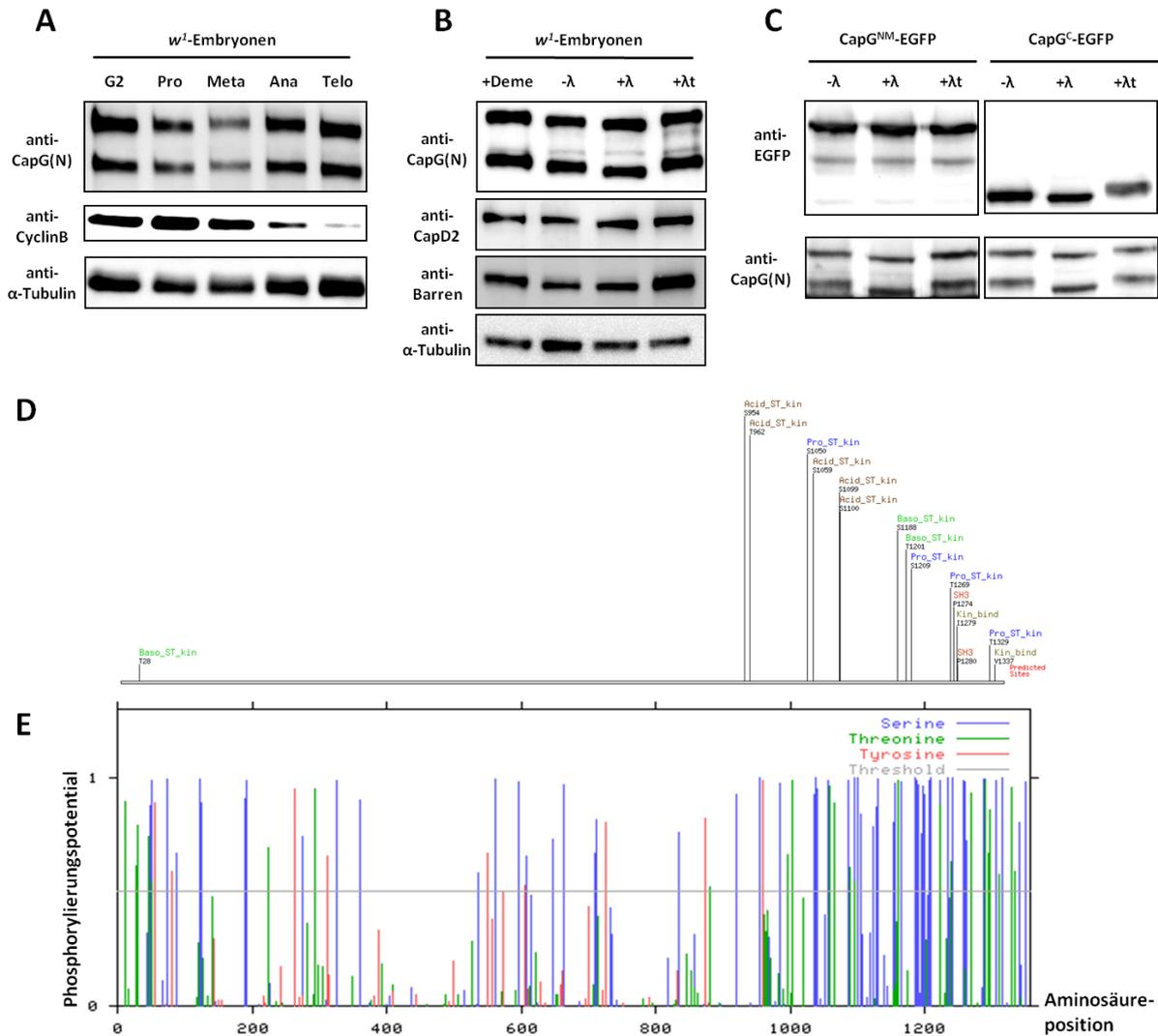


Abbildung 14: CapG wird während der Metaphase phosphoryliert, die hauptsächlich Phosphorylierungsstellen befinden sich innerhalb des C-Terminus. A) Phosphorylierung von CapG im Verlauf der Mitose. Embryonen von Fliegen des Genotyps *string*^{7B}, *P[w+,Hs-string]/TM3,Ser* wurden während der Mitose 14 synchronisiert. Es wurden Embryonen sortiert, in welchen sich alle Zellen in der G2-Phase (vor Mitose 14), Prophase (Pro), Metaphase (Meta), Anaphase (Ana) oder Telophase (Telo) der 14. Mitose befanden. Nach SDS-Gelelektrophorese der Proteinextrakte wurde ein Immunblot angefertigt und dieser nacheinander mit Kaninchen-anti-CapG(N), Maus-anti-Cyclin B und Maus-anti-α-Tubulin-Antikörpern sondiert. Cyclin B wurde hierbei als Kontrolle für die Zuordnung der Embryonen zu den angegebenen Phasen der Mitose und α-Tubulin als Ladekontrolle eingesetzt. **B)** 1-2 Stunden alte, syncytiale *w*¹-Embryonen wurden durch Demecolzin-Behandlung während der Metaphase arretiert (+Deme). Es wurde außerdem ein nativer Proteinextrakt von 2-4 Stunden alten, nicht Zellzyklus-synchronen *w*¹-Embryonen hergestellt (-λ). Ein Teil dieses Extrakts wurde mit λ-Phosphatase behandelt (+λ), ein weiterer mit λ-Phosphatase behandelt und unmittelbar in SDS-Probenpuffer aufgeköcht (+λt). Nach SDS-Gelelektrophorese wurde ein Immunblot angefertigt, der nacheinander mit Kaninchen-anti-CapG(N), Kaninchen-anti-Barren, Kaninchen-anti-CapD2, und Maus-anti-α-Tubulin-Antikörpern zur Ladekontrolle sondiert wurde. **C)** Es wurden native Proteinextrakte von 3-6 Stunden alten Embryonen, die *UAST-CapG^{NM}-EGFP* (*α4tub-Gal4-VP16/+; UAST-Cap^{NM}-EGFP III.1/+*) oder *UAST-CapG^C-EGFP* (*α4tub-Gal4-VP16/+; UAST-Cap^C-EGFP III.1/+*) exprimieren, hergestellt (-λ). Ein Teil dieser Extrakts wurde mit λ-Phosphatase behandelt (+λ), ein weiterer mit λ-Phosphatase behandelt und direkt in SDS-Probenpuffer aufgeköcht (+λt). Nach SDS-Gelelektrophorese der Proteinextrakte wurde ein Immunblot angefertigt und dieser nacheinander mit Kaninchen-anti-EGFP und Kaninchen-anti-CapG(N)-Antikörpern sondiert. **D** und **E)** Vorhersagen der Phosphorylierungsstellen von CapG durch die Web-basierten Programme SCANSITE (D) und NETPHOS(E). Beide Programme sagen Phosphorylierungsstellen vorrangig im C-terminalen Bereich von CapG voraus.

Durch Phosphatasebehandlung (+ λ) kann hier allerdings keine Beschleunigung des Laufverhaltens von Barren im SDS-Gel beobachtet werden (Abbildung 14B), was auf eine Metaphase-spezifische Phosphorylierung von Barren hinweist. Die nicht-SMC Untereinheiten des Condensin I-Komplexes scheinen daher während des Zellzyklus unterschiedlich phosphoryliert und somit individuell kontrolliert werden zu können.

Die Phosphorylierungsstellen innerhalb von CapG wurden im Weiteren näher kartiert. Durch die Web-basierten Programme SCANSITE und NETPHOS wurden Phosphorylierungsstellen von CapG für den C-terminalen Bereich des Proteins vorhergesagt (Abbildung 14D und E). Native Proteinextrakte aus *UAST-CapG^{NM}-EGFP* und *UAST-CapG^C-EGFP* exprimierenden Embryonen wurden mit λ -Phosphatase behandelt und das Laufverhalten der verschiedenen CapG-Fragmente während SDS-Gelelektrophorese mit dem der Fragmente aus unbehandelten Proteinextrakten verglichen (Abbildung 14C). Im Immunblot wurden Kaninchen-anti-EGFP Antikörper zur Detektion der EGFP-markierten Fragmente und Kaninchen-anti-CapG(N) Antikörper zur Kontrolle der Phosphataseaktivität eingesetzt. Für CapG^C-EGFP konnte nach Phosphatasebehandlung ein schnellerer Gellauf beobachtet werden, nicht aber für CapG^{NM}-EGFP. Es konnte somit die Vorhersage einer hauptsächlichen Lokalisation der Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich von CapG bestätigt werden.

Es ist zusammenzufassen, dass beide Isoformen von CapG während der Mitose gleichermaßen abundant auftreten und außerdem auch beide während der Metaphase phosphoryliert werden können. Dies spricht einer Zellzyklus-spezifischen Funktion einer der beiden Isoformen und einer unterschiedlichen Phospho-Regulation entgegen. Die Phosphorylierungsstellen ihrerseits liegen vorrangig im C-terminalen Bereich von CapG.

2.1.8. Lokalisation und Funktionalität von CapG in weiblichen Fortpflanzungsorganen

Es konnte sowohl eine Funktionen der Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapH2 und CapD3 bei der Chromatinstrukturierung (Hartl et al., 2008a) als auch eine Rolle von CapG während der Meiose in der weiblichen Keimbahn beschrieben werden (Resnick et al., 2009). Um die detaillierte Lokalisation von CapG in den Fortpflanzungsorganen adulter Weibchen näher zu untersuchen, wurden Ovarien aus Fliegen des Genotyps *gCapG-EGFP III.1, His-2AvD-mRFP1 III.1/TM3,Ser* präpariert, in denen ein C-terminal EGFP-markiertes CapG zusammen mit dem mRFP1-markierten Histon 2AvD exprimiert wird (Nagarkar, 2010). Das C-terminal EGFP-markierte CapG wird in diesen Fliegen unter Kontrolle der genomischen, regulatorischen

Elemente des *CapG*-Genlokus exprimiert und konnte bereits als funktionell beschrieben werden (Nagarkar, 2010).

Die Ovarien der Fliege bestehen aus einzelnen Ovariolen, welche wiederum aus Eikammern verschiedener Entwicklungsstadien aufgebaut sind. Die Eikammern sind ihrerseits von Epithelzellen somatischen Ursprungs (Follikelzellen) umgeben. Im anterioren Teil jeder Ovariolen befindet sich das Germarium. Hier sind die Keimbahnstammzellen angesiedelt. Nach deren mitotischer Teilung werden wiederum eine Keimbahnstammzelle und eine Zystoblastenzelle gebildet. Die Zystoblastenzelle durchläuft 4 mitotische Teilungen, woraus 15 Nährzellen und eine Oozyte hervorgehen (de Cuevas et al., 1997).

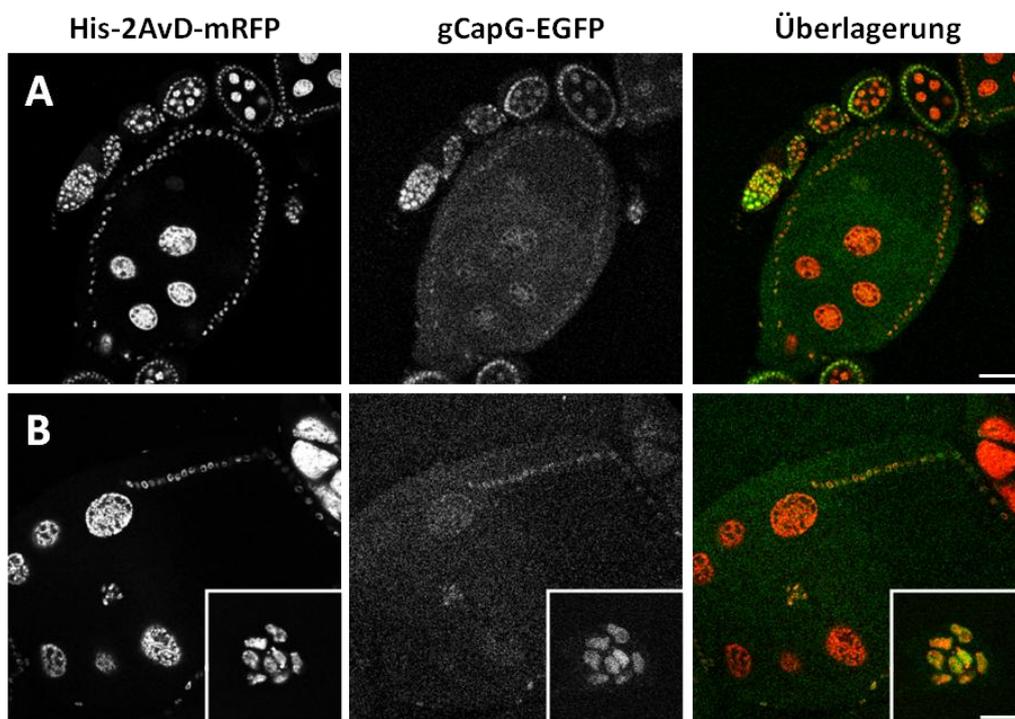


Abbildung 15: Lokalisation von CapG in der weiblichen Keimbahn. Autofluoreszenz der Ovarien von Weibchen, welche *gCapG-EGFP* (grün) zusammen mit *His-2AvD-mRFP1* (rot) exprimieren (*gCapG-EGFP III.1*, *His-2AvD-mRFP1 III.1/TM3,Ser*). **A)** Übersicht von Eikammern verschiedener Entwicklungsstadien. **B)** Eikammer im Stadium 10 und vergrößerte Aufnahme der Grenzstellen dieser Eikammer. Die Maßstabsbalken betragen 10 μm .

Es konnte eine Lokalisation von *gCapG-EGFP* sowohl in den Kernen der Zellen des Germariums, der Follikelzellen als auch der Nährzellen beobachtet werden (Abbildung 15). Die Intensität der EGFP-Fluoreszenz nimmt hierbei nach dem Entwicklungsstadium 6 der Eikammern ab. Eine weitere interessante Beobachtung ist die Lokalisation von *CapG-EGFP* in den Kernen der Grenzstellen (*border cells*). Die Grenzstellen gehen aus den epithelialen Follikelzellen hervor, vollziehen dann allerdings eine Morphologieänderung und werden zu Mesenchymzellen

(Montell, 2001). Somit werden sie beweglich und können durch die Nährzellen hindurch zum anterioren Ende der Oozyte gelangen. Die Grenzzellen tragen während der Oogenese zur Ausbildung der Mikropyle bei, welche später zum Eindringen der Spermien gebraucht wird (Montell et al., 1992). Sie spielen ebenso eine Rolle bei der Spezifizierung von Zellen des anterioren und posterioren Bereiches von Ei und Embryo (Stevens et al., 1990). Eine Lokalisation von CapG im Kern dieser Grenzzellen könnte auf eine postmitotische Funktion des Proteins bei der Grenzzellentwicklung oder auch -migration hinweisen. Ebenso könnte CapG an der Ausbildung der Mikropyle oder an der Zellspezifizierung beteiligt sein.

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Fliegenweibchen, welche *UAST-CapG^{FL}-EGFP* oder auch *UAST-CapG^{NM}-EGFP* als alleinig funktionelle *CapG*-Allele vermittelt durch *da-Gal4* exprimieren, lebensfähig, aber steril sind und nur sehr wenige Eier legen (Tabelle 1). Da *UAST*-Vektoren in Keimbahn-spezifischen Zellen nicht exprimiert werden (Brand und Perrimon, 1993), könnte die Sterilität der Weibchen darauf zurückzuführen sein, dass in diesen Zellen nicht ausreichend Protein zur Verfügung steht. Durch diese Weibchen konnten folglich mögliche Phänotypen von Zellen der weiblichen Geschlechtsorgane bei unzureichender Proteinmenge von CapG untersucht werden. In Abbildung 16 sind die Ovarien von Weibchen des Genotyps *CapG¹/CapG⁶; UAST-CapG^{NM}-EGFP III.2/da-Gal4* gezeigt. Diese werden im Folgenden als *CapG^{NM}-Rescue*-Weibchen bezeichnet. Anhand der Autofluoreszenz von *CapG^{NM}-EGFP* konnte eine Expression des Proteinfragments in den Ovarien dieser Weibchen vor allem in Zellen somatischen Ursprungs (Follikel- und Grenzzellen) bestätigt werden (Abbildung 16B). Die Intensität des EGFP-Signals variiert hier stark von Zelle zu Zelle, was auf eine nicht gleichmäßige Expression der *UAST-CapG^{NM}-EGFP*-Konstrukts hinweist. Durch die Hoechst 33258-Färbung konnte auch das Erscheinungsbild der Grenzzellen der Entwicklungsstadien 9 und 10 beobachtet werden. Auch in den Grenzzellen zeigt sich eine ungleichmäßige Expression des *UAST-CapG^{NM}-EGFP* (Abbildung 16B). Das Proteinfragment ist in den Grenzzellen sowie auch in den Follikelzellen hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Abbildung 16B), was konsistent zur subzellulären Lokalisation von *CapG^{NM}-EGFP* in Embryonen ist (Abbildung 9A). Mittels der DNA-Färbung konnten allerdings keine unerwarteten Phänotypen in Bezug auf die Anzahl der Grenzzellen, deren Gruppierung oder auch Migration festgestellt werden (vgl. Abbildung 16A mit 15B).

Da die Grenzzellen auch an der Ausbildung der Mikropyle beteiligt sind, welche eine Funktion beim Eindringen der Spermien hat, könnten die von *CapG^{NM}-Rescue*-Weibchen abgelegten Eier schlichtweg nicht befruchtungsfähig sein. Um dies zu überprüfen, wurden entsprechende

Weibchen mit w^1 -Männchen gekreuzt. Die abgelegten Eier wurden mit einem anti-*Spermtail*-Antikörper sondiert und mit Hoechst 33258 gefärbt (Abbildung 16D und E). Der hierbei angefärbte Schwanz der Spermien ist innerhalb der Embryonen zu beobachten, was eine Befruchtungsfähigkeit der abgelegten Eier belegt.

Das Erscheinungsbild der Grenzzellen und auch die Befruchtungsfähigkeit der Embryonen von Weibchen des Genotyps $CapG^1/CapG^6$; $UAST-CapG^{FL}-EGFP III.3/da-GAL4$ ($CapG^{FL}$ -Rescue) wurden während dieser Arbeit in analoger Weise untersucht. Auch hier konnten in Bezug auf die Anzahl, Gruppierung oder Migration der Grenzzellen keine Phänotypen festgestellt werden. Von diesen Weibchen abgelegte Eier können ebenso durch w^1 -Männchen befruchtet werden (Daten nicht gezeigt).

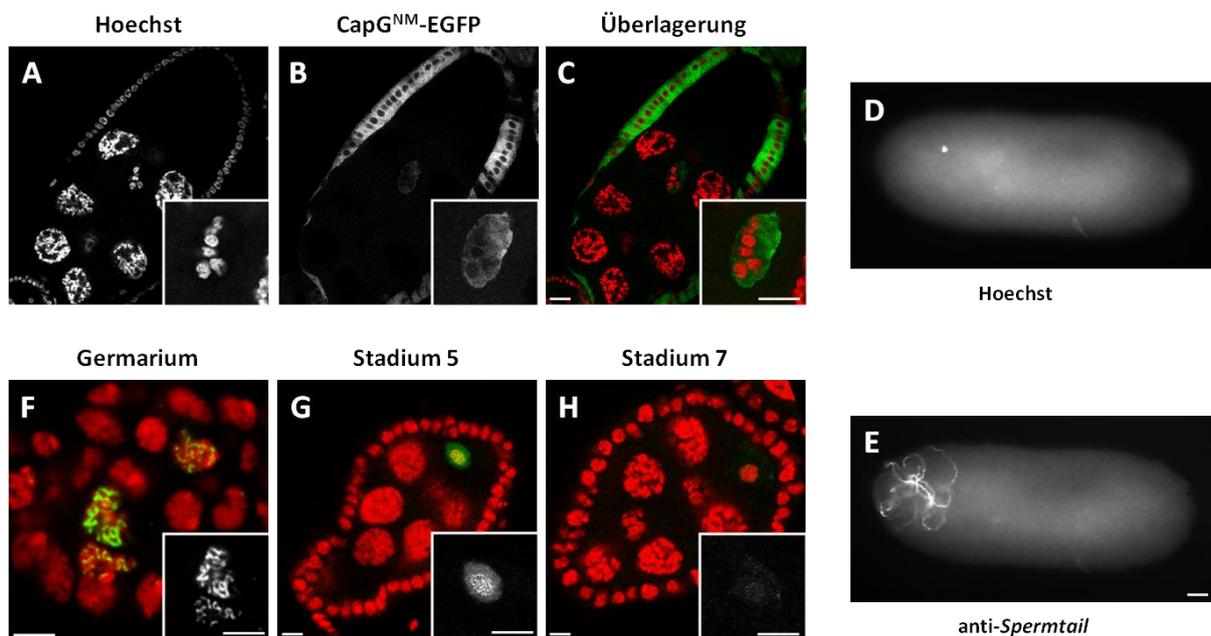


Abbildung 16: Morphologie der Grenzzellen und des Synaptonemalen Komplexes in der weiblichen Keimbahn nach Abreicherung von CapG. A bis C) Eikammern des Stadiums 10 aus einem Ovar von Fliegenweibchen des Genotyps $CapG^1/CapG^6$; $UAST-CapG^{NM}-EGFP III.2/da-Gal4$. A) DNA-Färbung mit Hoechst 33258. B) $CapG^{NM}-EGFP$ konnte anhand der Autofluoreszenz visualisiert werden. C) In der Überlagerung ist $CapG^{NM}-EGFP$ in grün und die Hoechst 33258-Färbung in rot dargestellt. Dargestellt sind Eikammern des Entwicklungsstadiums 10 und vergrößerte Aufnahmen deren Grenzzellen. D und E) Fliegenweibchen des Genotyps $CapG^1/CapG^6$; $UAST-CapG^{NM}-EGFP III.2/da-Gal4$ wurden mit w^1 -Männchen gekreuzt. Die abgelegten Eier wurden mit einem Maus-anti-*Spermtail*-Antikörper sondiert, um die Befruchtungsfähigkeit der Eier nachzuweisen (E), und mit Hoechst 33258 gefärbt (D). F bis H) Ovarien von Fliegenweibchen des Genotyps $CapG^1/CapG^6$; $UAST-CapG^{NM}-EGFP III.2/da-Gal4$ wurden präpariert, mit einem anti-C(3)G-Antikörper (grün) sondiert, um den SC darzustellen und mit Hoechst 33258 (rot) gefärbt. Es ist jeweils auch eine Vergrößerung der C(3)G-Färbung dargestellt. Es zeigt sich eine Assemblierung des SC entlang der Chromosomen im Germarium (F) und dessen graduelle Dissoziation von den Chromosomen in das Zytoplasma vom Stadium 5 (G) bis hin zum Stadium 7 (H). Die Maßstabsbalken betragen 10 μ m.

Obwohl eine spezifische Lokalisation von gCapG-EGFP im Kern der Grenzzellen beobachtet werden konnte, deuten die durchgeführten Ergebnisse insgesamt nicht auf eine Rolle der Kernlokalisierung von CapG bei der Migration oder Funktion der Grenzzellen hin.

Durch Resnick et al. (2009) konnte eine meiotische Funktion von CapG bei der Disassemblierung des Synaptonemalen Komplexes (SC) während der Prophase I in der weiblichen Keimbahn der Fliege beschrieben werden (Resnick et al., 2009). Der SC ist eine Proteinstruktur, welche während der Meiose zwischen den homologen Chromosomen ausgebildet wird, und an der meiotischen Rekombination beteiligt ist (Page und Hawley, 2003). Der SC ist während der Prophase der Meiose I entlang der Chromosomen assoziiert und kann durch Immunfärbung SC-spezifischer Proteinkomponenten wie C(3)G, einer Komponente des transversalen Elements, sichtbar gemacht werden. Eine Dissoziation kann graduell ab dem Entwicklungsstadium 4 beobachtet werden, ist aber bis hin zum Entwicklungsstadium 9 abgeschlossen (Resnick et al., 2009). In den Ovariolen von Fliegenweibchen der Allelkombination *CapG^{Z1}/CapG^{K4}* konnte zwar eine akkurate Assemblierung, aber eine verspätete Disassemblierung des SC beobachtet werden (Resnick et al., 2009). *CapG^{Z1}* trägt eine Punktmutation an Aminosäureposition 157 von CapG, was einen Aminosäureaustausch zur Folge hat. *CapG^{K4}* hingegen weist eine Deletion im C-terminalen Bereich von CapG auf und ist wahrscheinlich eine Nullmutation (Dej et al., 2004). *CapG^{Z1}/CapG^{K4}*-transheterozygote Fliegenweibchen sind steril (Resnick et al., 2009).

Um die Assemblierung und auch Disassemblierung des SC in den *CapG^{NM}-Rescue*-Weibchen zu untersuchen, wurden deren Ovarien präpariert und mit anti-C(3)G-Antikörpern sondiert, sowie Hoechst 33258 gefärbt. Es zeigt sich eine akkurate Assemblierung des SC entlang der Chromosomen im Germarium (Abbildung 16F). Ebenso konnte eine graduelle Disassemblierung des SC vom Entwicklungsstadium 5 (Abbildung 16G) bis hin zum Entwicklungsstadium 7 (Abbildung 16H) beobachtet werden. Eine analoge Immunfluoreszenzfärbung wurde auch mit Ovarien der *CapG^{FL}-Rescue*-Weibchen vorgenommen. Auch hier konnte eine akkurate Assemblierung und auch Disassemblierung des SC beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Es wurde außerdem beschrieben, dass CapH2 und CapD3 eine Rolle bei der Disassemblierung des polytären Nährzellchromatins haben, da dieses in *CapH2* oder auch *CapD3* transheterozygot-mutanten Weibchen bis hin zum Entwicklungsstadium 10 polytän verbleibt (Hartl et al., 2008a). In den hier untersuchten *CapG^{NM}-Rescue* und auch *CapG^{FL}-Rescue*-Weibchen konnte nach Abreicherung von CapG im Kern der Nährzellen keine vergleichbar verzögerte Disassemblierung des Nährzellchromatins beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Sterilität der *Rescue*-Fliegen ist somit nicht auf einen Defekt der Befruchtungsfähigkeit der produzierten Eier oder offensichtlichen Problemen bei der frühen Differenzierung der Eikammern zurückzuführen. Auch die durch Resnick et al., 2009 beschriebene, verzögerte Disassemblierung des SC nach Abreicherung von CapG konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden.

2.1.9. Lokalisation von CapG und CapD2 in männlichen Fortpflanzungsorganen

Die Keimbahnstammzellen der männlichen Fliegen befinden sich im anterioren Bereich der Hoden (Apikalzentrum). Durch deren mitotische Teilung gehen wiederum eine Stammzelle und eine primäre Spermatogonie hervor. Primäre Spermatogonien werden in zwei Zystenzellen somatischen Ursprungs eingeschlossen. Die Zystenzellen gehen ihrerseits aus Stammzell-ähnlichen Zystenvorläuferzellen hervor, welche die Keimbahnstammzellen umgeben. Spermatogonien und Zystenzellen bilden eine Zyste. Aus den primären Spermatogonien werden durch 4 synchrone mitotische Teilungen 16 Spermatogonien gebildet. Die Spermatogonien innerhalb einer Zyste durchlaufen die Mitose, das Spermatozytenwachstum, die Meiose und auch die Spermatidendifferenzierung in Synchronität. Während der Meiose findet in *Drosophila*-Männchen weder Rekombination noch die Ausbildung eines Synaptonemalen Komplexes statt (Meyer, 1960). Die Prophase I kann anhand der Morphologie der Zellkerne in verschiedene Stadien eingeteilt werden (Cenci et al., 1994). In den frühen Stadien S1 und S2a sind die 8 Chromosomen vermischt und nehmen das gesamte Volumen des Zellkerns ein. Während des Stadiums S2b können drei abgegrenzte Chromosomenterritorien beobachtet werden, welche den drei großen Chromosomenpaaren entsprechen. Die Bivalente der Chromosomen verbleiben während der Prophase I voneinander abgegrenzt in den einzelnen Chromosomenterritorien.

Mutationen in den Genen für die Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapH2 und CapD3 führen in *D. melanogaster* zu Defekten in der Bildung der Chromosomenterritorien während der Prophase I (Hartl et al., 2008b). Eine Funktion oder Lokalisation der Condensin I–Untereinheiten in der männlichen Keimbahn wurde bisher allerdings nicht gezeigt. Um die Lokalisation der Condensin I-spezifischen Untereinheiten CapG und CapD2 in den männlichen Fortpflanzungsorganen von *D. melanogaster* näher zu untersuchen, wurden zunächst Hoden aus Fliegen des Genotyps *gCapG-EGFP III.1, His-2AvD-mRFP1 III.1/TM3,Ser* präpariert. Anhand der EGFP-Autofluoreszenz konnte die Lokalisation von CapG-EGFP zusammen mit der des Chromatins dargestellt werden (Abbildung 17A bis E). CapG-EGFP lokalisiert in den Kernen der Zellen des apikalen Zentrums (Abbildung 17A), wobei keine Differenzierung zwischen den

einzelnen Zelltypen vorgenommen werden kann. Die Intensität der CapG-EGFP-Fluoreszenz in den primären Spermatozyten ist hingegen sehr schwach (Abbildung 17B).

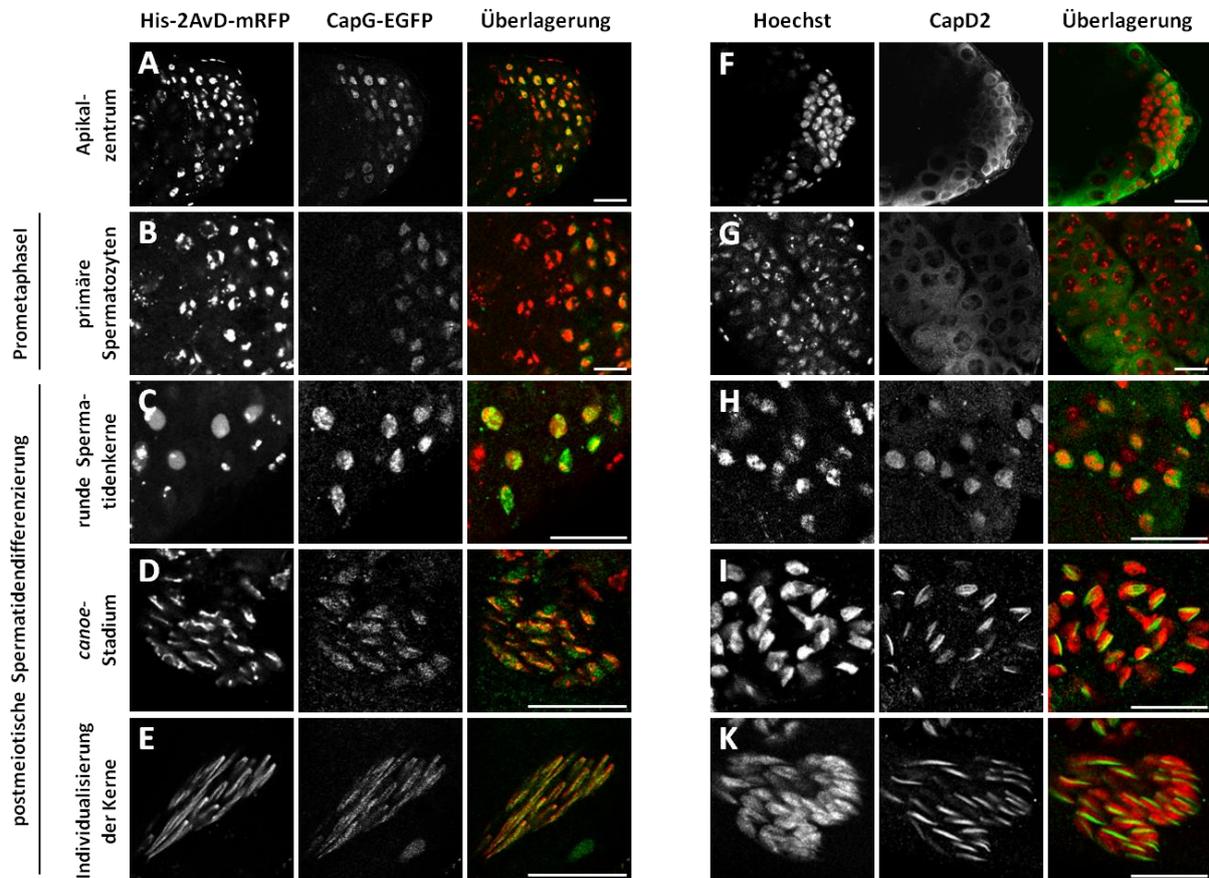


Abbildung 17: Lokalisation von CapG und CapD2 in Fliegenhoden. A bis E) Autofluoreszenz der Hoden von Männchen welche gCapG-EGFP (grün) zusammen mit His-2AvD-mRFP1 (rot) exprimieren (gCapG-EGFP *III.1*, His-2AvD-mRFP1 *III.1/TM3,Ser*. F bis K) Immunfluoreszenz der Hoden von w^1 -Männchen welche mit anti-CapD2 sondiert (grün) und Hoechst 33258 (rot) gefärbt wurden. Die Maßstabsbalken betragen 10 μm .

Um auch die Lokalisation von CapD2 untersuchen zu können, wurden Hoden von w^1 -Männchen präpariert, mit anti-CapD2-Antikörpern sondiert und mit Hoechst 33258 gefärbt, um das Chromatin zu visualisieren (Abbildung 17F bis K). CapD2 erscheint in den Zellen der apikalen Hodenspitze hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 17F). In den primären Spermatozyten kann eine Lokalisation sowohl im Zytoplasma als auch in den Kernen der Zellen beobachtet werden (Abbildung 17G). Jedoch kann hier keine Anreicherung am Chromatin festgestellt werden.

Eine deutliche Anreicherung von CapG-EGFP und auch von CapD2 wurde hingegen in den postmeiotischen Spermatischen beobachtet. Beide Proteine können hier in den

Spermatidenkernen lokalisiert um das Chromatin nachgewiesen werden. Während CapG-EGFP sowohl während des *canoe*-Stadiums als auch während der Individualisierung der Spermatiden diffus mit dem Chromatin kolokalisiert (Abbildung 17C bis E), zeigt sich eine sehr distinkte Chromatinlokalisierung von CapD2 (Abbildung 17H bis K). Dieses Protein scheint dem Chromatin hier stabförmig aufzuliegen. Die beobachtete Anlagerung von CapG und CapD2 am Chromatin der reifenden Spermatiden könnte postmeiotische Funktionen dieser Proteine implizieren.

Nach der Meiose muss das Chromatin im Spermium reorganisiert und dicht gepackt werden. In Säugetieren werden die somatischen Histone hierfür modifiziert und teilweise schon während der meiotischen Prophase gegen Spermatid-spezifische Varianten ersetzt (Drabent et al., 1996). Nach der Meiose werden die Histone dann durch die *major transition*-Proteine TP1 und TP2 ausgetauscht (Meistrich et al., 2003) und anschließend durch basische Protamine ersetzt. Hierbei entstehen hoch kompaktierte, transkriptionsinaktive Spermien (Braun, 2001). Lichtmikroskopisch kann auch in *D. melanogaster* eine Veränderung der rundlichen Kerne nach der Meiose in hoch kondensierte, nadelartige Strukturen beobachtet werden (Fuller, 1993). Hier konnte eine Abreicherung des His2-AvD zum Zeitpunkt der Inkorporation der Protamine Mst35Ba und Mst35Bb und des linker-Histons Mst77f beobachtet werden (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005).

Die durch diese Arbeit beschriebene spezifische Lokalisation von CapG und CapD2 am Chromatin der Spermatidenkerne könnte auf eine Funktion der Proteine bei der Reorganisation des Spermatidenchromatins hinweisen. CapG und CapD2 könnten hierbei unabhängig oder innerhalb des Condensin-Komplexes zur Ausbildung der reifen Spermien beitragen.

2.2. Komposition der Condensin-Komplexe in *D. melanogaster*

In der Fliege konnte bisher kein CapG2 Homolog identifiziert werden konnte, weshalb in der Literatur spekuliert wird, dass CapG in *D. melanogaster* integraler Bestandteil beider Condensin-Komplexe sein könnte (Longworth et al., 2008; Resnick et al., 2009). Condensin I-spezifische Untereinheiten wurden in Vertebraten während der Interphase eher zytoplasmatisch lokalisiert beschrieben (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). In unserer Arbeitsgruppe wurden Lokalisationsstudien für CapG, Barren und auch CapD2 mit Hilfe EGFP-markierter Transgene in *D. melanogaster* durchgeführt. Während der Interphase erscheinen auch Barren-EGFP und EGFP-CapD2 zytoplasmatisch angereichert, CapG-EGFP allerdings ist vorrangig im Zellkern lokalisiert. Die Beladung von CapG-EGFP an das mitotische Chromatin ist bereits vor dem Zusammenbruch

der Kernhülle abgeschlossen, nicht aber die von Barren-EGFP und EGFP-CapD2. (Fischer, 2010; Nagarkar, 2010; Oliveira et al., 2007). Die zelluläre Lokalisation von CapG während der Interphase sowie die Beladung an das mitotische Chromatin erscheint somit ähnlich zu der der Condensin II-Untereinheiten in Vertebraten (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). Allerdings konnten in *D. melanogaster* bisher keine Funktionen der Condensin II-spezifischen Untereinheiten während der Mitose nachgewiesen werden, ebenso sind CapH2 und CapD3 nicht essentiell für die Vitalität der Fliege. Für beide Proteine wurde in *D. melanogaster* hingegen eine Rolle bei der Disassemblierung des polytären Nährzellchromatin in Ovarien und eine Funktion bei der Bildung separierter Chromosomenterritorien in Hoden aufgezeigt (Hartl et al., 2008a; Hartl et al., 2008b).

Auch in dieser Arbeit konnte eine Lokalisation von CapG-EGFP in den Kernen der ovariellen Nährzellen (Abbildung 15) und ebenso am Chromatin der Spermatiden (Abbildung 17) nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen wären konsistent mit einer Einlagerung von CapG in beide Condensin-Komplexe der Fliege. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde durch verschiedene experimentelle Ansätze die mögliche Assemblierung von CapG innerhalb eines Condensin II-Komplexes weiterführend untersucht.

2.2.1. Genetische Interaktionsstudien

2.2.1.1. Disassemblierung von polytänem Nährzellchromatin in Ovarien

Das Chromatin der ovariellen Nährzellen liegt in frühen Stadien (Stadien 2-3) der Oogenese polytän vor. Während der Stadien 4-5 wird diese polytäne Struktur aufgelöst. In transheterozygot *CapH2*-mutanten Fliegen findet diese Disassemblierung des Chromatins verspätet statt, das Chromatin erscheint noch im Stadium 10 polytän. Auch in transheterozygot *CapD3*-mutanten Fliegen kann dieser Phänotyp beobachtet und durch Einbringen einer zusätzlichen *CapH2*-Mutation weiter verstärkt werden (Hartl et al., 2008a). Dieser Assay sollte nun auch verwendet werden, um zu überprüfen, ob eine genetische Interaktion von CapG mit CapH2 oder CapD3 nachweisbar ist.

Die Polytänie des Chromatins der Nährzellkerne in Ovarien von transheterozygot *CapD3*-mutanten Weibchen könnte hierbei auch durch Einbringen eines zusätzlich mutanten *CapG*-Allels weiter verstärkt werden. Um dies zu untersuchen, wurden jeweils zwei unterschiedliche mutante *CapG*-Allele (*CapG*¹ und *CapG*⁵) mit dem *CapD3*-Allel *CapD3*^{EY00456} rekombiniert, bei

welchem eine P-Element Insertion im dritten Exon des *CapD3* vorliegt (Hartl et al., 2008a). Die erhaltenen Fliegen wurden dann mit Individuen gekreuzt, in welchen auf Grund einer chromosomalen Deletion auf einem der beiden Chromosomen kein *CapD3* vorhanden ist (*CapD3^{Df(2L)Exel7023}/CyO*). So konnten weibliche Nachkommen der Genotypen *CapG¹, CapD3^{EY00456}/CapD3^{Df(2L)Exel7023}* und *CapG⁶, CapD3^{EY00456}/CapD3^{Df(2L)Exel7023}* erhalten werden. Ovarien dieser Weibchen und auch die von Weibchen des Genotyps *CapD3^{EY00456}/CapD3^{Df(2L)Exel7023}* wurden präpariert und mit Hoechst 33258 gefärbt. Durch Mikroskopie konnte schließlich die Morphologie des Chromatins der Nährzellkerne im Entwicklungsstadium 10 untersucht werden. Da diese auch innerhalb der einzelnen Genotypen variierte, wurden mehrere Eikammern ausgewertet und deren Nährzellchromatin den Phänotypenklassen schwach polytän, polytän und verstärkt polytän zugeteilt (Abbildung 18).

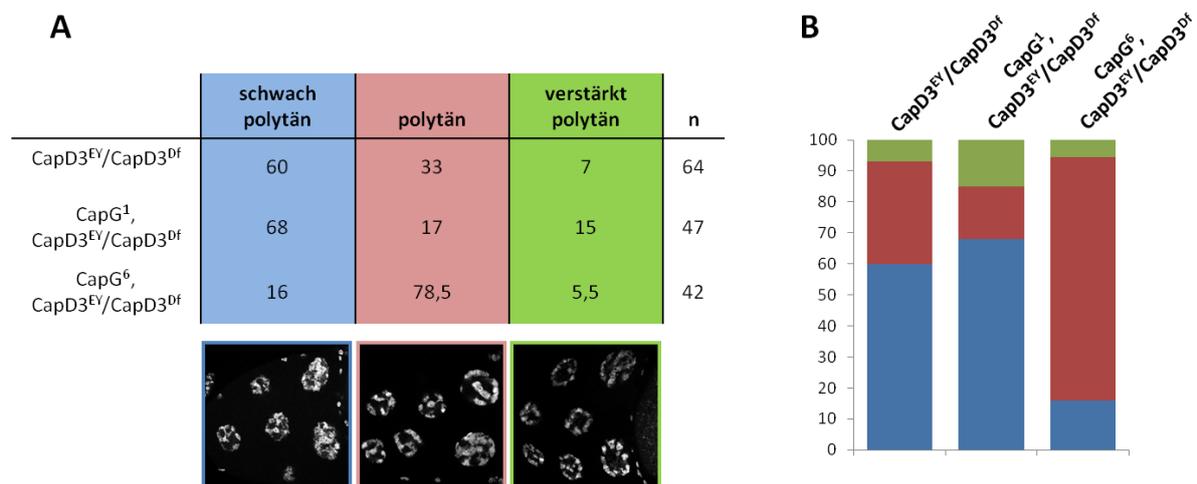


Abbildung 18: Durch ein zusätzlich *CapG*-mutantes Allel kann die Polytänie der ovariellen Nährzellen von heterozygot *CapD3*-mutanten Weibchen weiter gesteigert werden. A) Hoechst 33258 gefärbte Ovarien von Weibchen der Genotypen *CapD3^{EY00456}/CapD3^{Df(2L)Exel7023}* (Zeile 1); *CapG¹, CapD3^{EY00456}/CapD3^{Df(2L)Exel7023}* (Zeile 2) und *CapG⁶, CapD3^{EY00456}/CapD3^{Df(2L)Exel7023}* (Zeile 3). Durch Mikroskopie wurde die Polytänie des Chromatins der Nährzellen in Eikammern des Stadiums 10 untersucht und in 3 Phänotypenklassen eingeteilt. In der Tabelle sind die Gesamtzahl der ausgezählten Eikammern (n) und der prozentuale Anteil der Eikammern, die den entsprechenden Phänotypenklassen (schwach polytän, polytän und verstärkt polytän) zugeordnet wurden, angegeben. Unter den jeweiligen Spalten sind Beispiele von Eikammern der einzelnen Phänotypenklassen dargestellt. **B)** Grafische Darstellung der Ergebnisse aus A). Die einzelnen Balken entsprechen jeweils den darüber angegebenen Genotypen. Die Phänotypenklassen der Eikammern sind in unterschiedlichen Farben dargestellt (blau: schwach polytän, rot: polytän, grün: verstärkt polytän) und entsprechen denen der Darstellung in A).

Über die Hälfte der Eikammern der transheterozygot *CapD3*-mutanten Weibchen weisen einen schwach polytänen Phänotyp des Nährzellchromatins auf, in 33 % erscheint das Chromatin polytän und in nur 7% stark polytän (Abbildung 18B, Balken 1). In Weibchen, welche das

zusätzliche *CapG*¹-Allel enthalten, bleibt der Anteil an Eikammern mit schwach polytänem Nährzellchromatin fast gleich, allerdings ist der Anteil der Eikammern mit polytänem Nährzellchromatin hier hin zu denen mit verstärkt polytänem Nährzellchromatin verschoben (Abbildung 18B, Balken 2). In Weibchen, welche das zusätzliche *CapG*⁶-Allel enthalten, erscheint der Anteil an Eikammern mit verstärkt polytänem Nährzellchromatin gegenüber den transheterozygot *CapD3*-Mutanten nicht verändert, allerdings ist hier der Anteil der Eikammern mit schwach polytänem Chromatin hin zu denen mit polytänem Chromatin verschoben (Abbildung 18, B Balken 3).

Durch das Einbringen eines zusätzlich *CapG*-mutanten Allels kann der polytäne Phänotyp des Nährzellchromatins in transheterozygot *CapD3*-mutanten Fliegen also insgesamt weiter verstärkt werden. Für beide *CapG*-Allele konnten unterschiedliche Effekte beobachtet werden, was durch zusätzliche Mutationen auf den Chromosomen mit den *CapG*-Allelen erklärt werden könnte.

Es wurde gleichermaßen untersucht, ob die Polytänie des Chromatins der Nährzellkerne in Ovarien von transheterozygot *CapH2*-mutanten Weibchen ebenso durch Einbringen eines zusätzlich mutanten *CapG*-Allels weiter verstärkt werden kann. Hierbei wurden eine chromosomale Deletion (*CapH2*^{Df(3R)Exel6159}) und zwei unterschiedliche *CapH2*-Allele eingesetzt. Bei *CapH2*^{PL00617} liegt eine pBac-Insertion im ersten Intron von *CapH2* vor, bei *CapH2*^{TH2} hingegen handelt es sich um eine Deletion innerhalb der 5'-Region von *CapH2* (Hartl et al., 2008a). Da bereits für die verschiedenen *CapH2*-Allelkombinationen unterschiedliche Phänotypen bezüglich der Morphologie des Nährzellchromatins beobachtet werden konnten, wurden die Phänotypen der verschiedenen transheterozygot *CapH2*-mutanten Weibchen getrennt getrachtet. So wurden vorerst Ovarien von Weibchen der Genotypen *CapH2*^{PL00617}/*CapH2*^{Df(3R)Exel6159} und *CapG*¹/+; *CapH2*^{PL00617}/*CapH2*^{Df(3R)Exel6159} präpariert, mit Hoechst 33258 gefärbt und die Morphologie des Nährzellchromatins in Eikammern des Stadiums 10 bestimmt. Auch hier wurde die Polytänie des Nährzellchromatins in mehreren Eikammern ausgewertet und verschiedenen Klassen zugeordnet (Abbildung 19A). Etwa die Hälfte der Eikammern der transheterozygot *CapH2*-mutanten Weibchen weisen einen schwach polytänen Phänotyp des Nährzellchromatins auf, in 44,8% erscheint das Chromatin polytän und in nur 3,4% stark polytän (Abbildung 19B, Balken 1). Weibchen, welche ein zusätzliches *CapG*-mutantes Allel (*CapG*¹) enthalten, zeigen eine Verringerung an Eikammern mit schwach polytänem Nährzellchromatin und eine Zunahme an Eikammern mit polytän bzw. verstärkt polytänem Chromatin (Abbildung 19B, Balken 2).

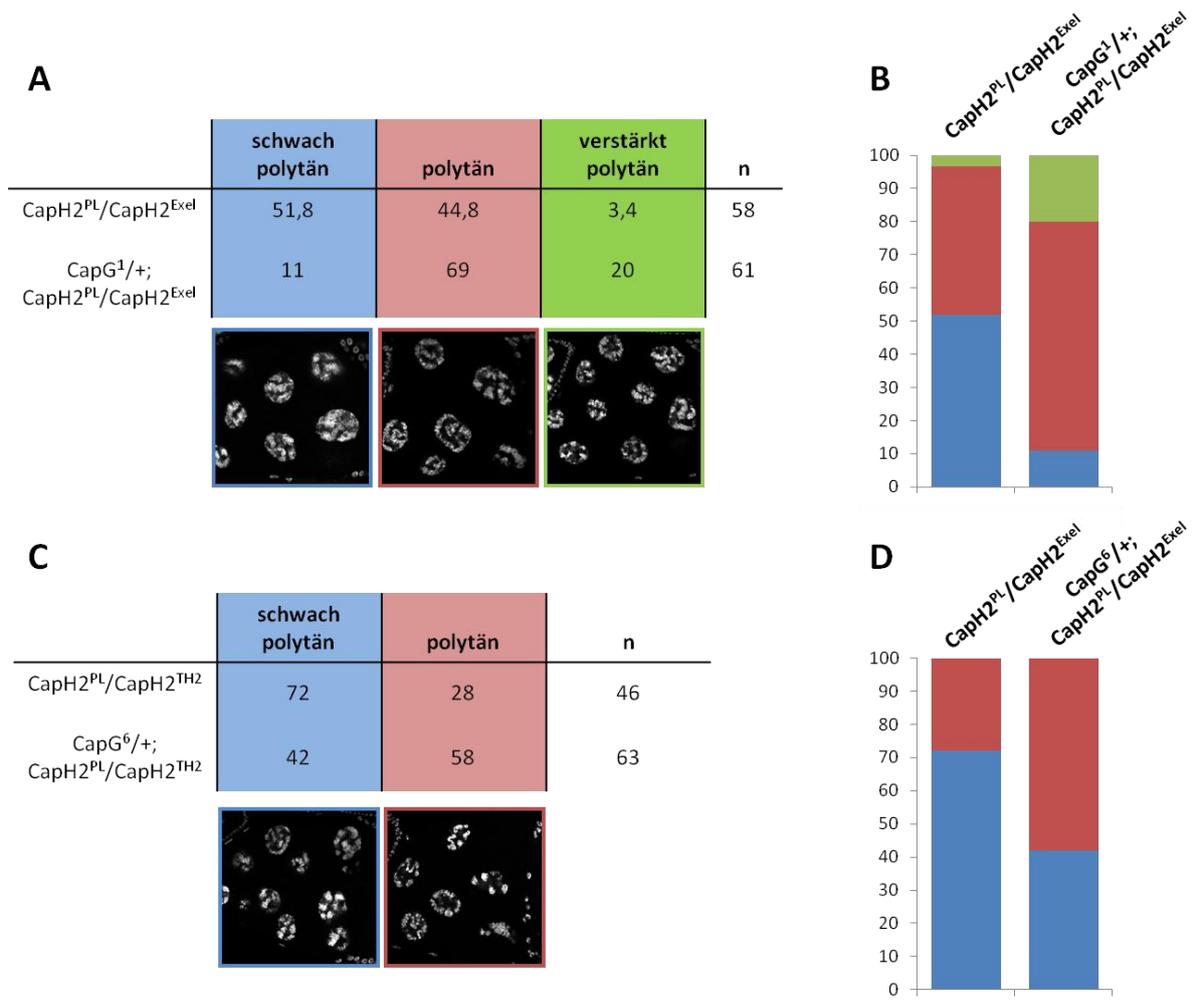


Abbildung 19: Durch ein zusätzliches *CapG*-mutantes Allel kann die Polytänie der ovariellen Nährzellen von heterozygot *CapH2*-mutanten Weibchen weiter gesteigert werden. A) Hoechst 33258 gefärbte Ovarien von Weibchen der Genotypen *CapH2*^{PL00617}/*CapH2*^{Df(3R)Exel6159} (Zeile 1) und *CapG*¹/+; *CapH2*^{PL00617}/*CapH2*^{Df(3R)Exel6159} (Zeile 2). C) Hoechst 33258 gefärbte Ovarien von Weibchen der Genotypen *CapH2*^{PL00617}/*CapH2*^{TH2} (Zeile 1) und *CapG*⁶/+; *CapH2*^{PL00617}/*CapH2*^{TH2} (Zeile 2). Durch Mikroskopie konnte die Polytänie des Chromatins der Nährzellen in Eikammern des Stadiums 10 untersucht und in die angegebenen Phänotypenklassen eingeteilt werden. In der Tabelle sind die Gesamtzahl der ausgezählten Eikammern (n) und der prozentuale Anteil der Eikammern, die den entsprechenden Phänotypenklassen (schwach polytän, polytän und verstärkt polytän) zugeordnet wurden, dargestellt. Unter den jeweiligen Spalten sind Beispiele von Eikammern der einzelnen Phänotypenklassen dargestellt. B) Grafische Darstellung der Ergebnisse aus A). D) Grafische Darstellung der Ergebnisse aus C). Die einzelnen Balken entsprechen jeweils den darüber angegebenen Genotypen. Die Phänotypenklassen der Eikammern sind in unterschiedlichen Farben dargestellt (blau: schwach polytän, rot: polytän, grün: verstärkt polytän) und entsprechen denen der Darstellungen in A) und C).

Eine analoge Analyse wurde mit Ovarien von Weibchen der Genotypen *CapH2*^{PL00617}/*CapH2*^{TH2} und *CapG*⁶/+; *CapH2*^{PL00617}/*CapH2*^{TH2} vorgenommen (Abbildung 19C). 72% der Eikammern der transheterozygot *CapH2*-mutanten Weibchen dieser Allelkombination weisen einen schwach polytänen Phänotyp des Nährzellchromatins auf, in 28% erscheint das Chromatin polytän (Abbildung 19D, Balken 1). Weibchen, welche ein zusätzliches *CapG*-mutantes Allel (*CapG*⁶)

enthalten, zeigen ebenso eine Verringerung an Eikammern mit schwach polytäнем Nährzellchromatin und eine Zunahme an Eikammern mit polytäнем Chromatin (Abbildung 19D, Balken 2). Eikammern mit verstärkt polytäнем Chromatin konnten hier nicht beobachtet werden.

Auch der polytäne Phänotyp der Nährzellkerne von transheterozygot *CapH2*-mutanten Fliegen kann durch das Einbringen eines mutanten-*CapG* Allels weiter gesteigert werden. Durch diese genetischen Interaktionsstudien wird eine Funktion von CapG bei der Disassemblierung des polytäнем Chromatins der Nährzellkerne von Fliegenovarien im Zusammenspiel mit CapH2 und CapD3 nahegelegt.

2.2.1.2. Disassemblierung von polytäнем Speicheldrüsenchromatin in Larven

Auch in den Kernen von Speicheldrüsen aus Larven können polytäne Chromatinstrukturen beobachtet werden (Abbildung 20A). Im Gegensatz zu den Nährzellkernen der Ovarien, bleiben diese gebänderten Strukturen hier allerdings während der Entwicklung erhalten. Während in *CapH2*-mutanten Ovarien der polytäne Status der Nährzellkerne länger als normal persistiert, führt in einem komplementärem Ansatz die Überexpression von *CapH2* in den normalerweise polytäнем Speicheldrüsenzellen zu einer Dispersion des polytäнем Chromatins (Hartl et al., 2008a). Um die mögliche genetische Interaktion von CapG mit den Condensin II-Untereinheiten zu verifizieren, wurde weiterhin untersucht, ob auch CapG zur Disassemblierung des Speicheldrüsenchromatins beitragen kann. Hierfür wurden 2 verschiedene *UASP-CapG*-Transgene vermittelt durch *F4-Gal4* in den Speicheldrüsen von Fliegenlarven überexprimiert. Nach Überexpression von CapG (Abbildung 20C und D), konnte hier eine Disassemblierung des polytäнем Chromatins der Speicheldrüsen beobachtet werden. Nach analoger Überexpression der Condensin I-Untereinheit Barren wurde hingegen keine vergleichbare Chromatindispersion beobachtet (Abbildung 20E).

Im Fall einer genetischen Interaktion der Condensin-Untereinheiten, sollte die *CapH2*-Überexpression in *CapD3* oder auch heterozygot *CapG*-mutanten Larven supprimiert werden (Hartl et al., 2008a). Daher wurden die Effekte der Überexpression von *CapH2* auch in heterozygot *CapD3*-mutanten Larven, heterozygot *CapG*-mutanten Larven sowie transheterozygot *CapD3/CapG*-mutanten Larven untersucht. Nach *F4-Gal4* vermittelter Überexpression des funktionellen Transgens *UASP-mcherry-CapH2 III.2* (2.2.2.3.) kann ebenfalls eine Disassemblierung des Chromatins der Speicheldrüsenkerne beobachtet werden (Abbildung

20B). In heterozygot *CapD3*-mutanten Larven wird diese Disassemblierung supprimiert (Abbildung 20F). Auch das Chromatin von heterozygot *CapG*-mutanten Larven kann nach Überexpression von *mcherry-CapH2* nicht vollständig disassembliert werden und erscheint wie auch nach *mcherry-CapH2* Überexpression in heterozygot *CapD3*-mutanten Larven noch teilweise polytän (Abbildung 20G und H). Nach *CapH2*-Überexpression in transheterozygot *CapD3/CapG*-mutanten Larven kann jedoch keine weitere Suppression der Chromatin-disassemblierung beobachtet werden (vergleiche Abbildung 20I und K mit F, G und H).

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass CapG vergleichbar zu CapH2 befähigt ist, eine Disassemblierung des polytänen Speicheldrüsenchromatins zu induzieren. Es wurde auch hier ein Zusammenspiel von CapG und CapH2 nachgewiesen, da die Effekte der *CapH2*-Überexpression durch ein *CapG* oder auch *CapD3*-mutantes Allel supprimiert werden konnten. Ob CapG, CapH2 und CapD3 die Dispersion des Speicheldrüsenchromatins als Untereinheiten innerhalb eines Condensin II-Komplexes vermitteln oder ob CapG unabhängig von einem Condensin II-Komplex eine Chromatinreorganisation ausüben kann, konnte durch die genetischen Interaktionsstudien allerdings nicht differenziert werden.

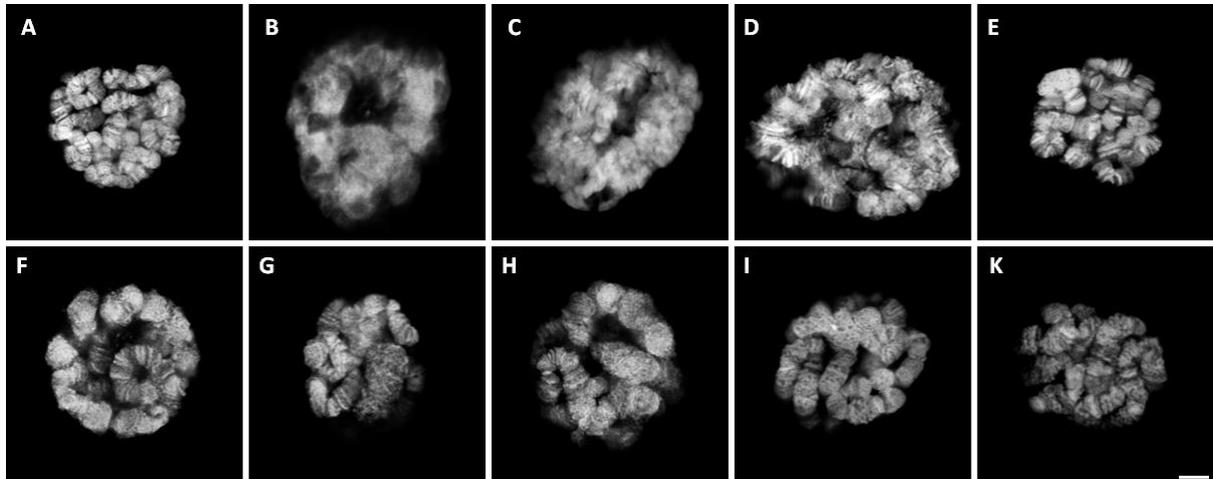


Abbildung 20: Funktionalität von CapG bei der Disassemblierung der polytänen Speicheldrüsenchromosomen. Hoechst 33258 gefärbte Kerne der Speicheldrüsen von Larven im Stadium 3. **A)** Wildtyp (w^1). **B)** *CapH2*-Überexpression ($F4-Gal4/+; UASP-mcherry-CapH2 III.2/+$). **C)** *CapG*-Überexpression ($F4-Gal4/+; UASP-CapG III.2/+$) und **D)** ($F4-Gal4/+; UASP-CapG-mRFP1 III.1/+$). **E)** *Barren*-Überexpression ($F4-Gal4/ UASP-Barren-EGFP III.2$). **F)** *CapH2*-Überexpression in heterozygot *CapD3*-mutanten Larven ($F4-Gal4/CapD3^{EY00456}; UASP-mcherry-CapH2 III.2/+$). **G)** *CapH2*-Überexpression in heterozygot *CapG*-mutanten Larven ($F4-Gal4/CapG^1; UASP-mcherry-CapH2 III.2/+$) und **H)** ($F4-Gal4/CapG^6; UASP-mcherry-CapH2 III.2/+$). **I)** *CapH2*-Überexpression in transheterozygot *CapD3/CapG*-mutanten Larven ($F4Gal4/CapD3^{EY00456}, CapG^1; UASP-mcherry-CapH2 III.2/+$) und **K)** ($F4-Gal4/CapD3^{EY00456}, CapG^6; UASP-mcherry-CapH2 III.2/+$). Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

2.2.2. *In vivo* Identifikation der Condensin II-Komponenten von *D. melanogaster*

2.2.2.1. Condensin II-spezifische Untereinheiten werden durch CapG nicht präzipitiert

Die Fähigkeit von CapG, eine Disassemblierung von polytären Chromosomenstrukturen im Zusammenspiel mit CapH2 und CapD3 zu induzieren, zeigt eine genetische Interaktion von CapG mit den Condensin II-spezifischen Untereinheiten auf. Die Frage, ob diese genetische Interaktion auf die Präsenz von CapG und CapH2 bzw. CapD3 in einem gemeinsamen Komplex zurückzuführen ist, könnte durch den Nachweis physikalischer Interaktionen dieser Condensin-Untereinheiten beantwortet werden.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden Proteinextrakte von Embryonen und Ovarien, in denen ein C-terminal durch mRFP1-markiertes *CapG*-Transgen unter Kontrolle der genomischen, regulatorischen Elemente des *CapG*-Genlokus exprimiert wird (*gCapG-mRFP1*), durch Immunpräzipitation mit Kaninchen-anti-mRFP1-Sepharose analysiert. Die Funktionalität des CapG-mRFP1 Fusionsproteins in der Fliege war bereits gezeigt worden (Nagarkar, pers. Mitteilung). Zur Kontrolle wurden Extrakte aus w^1 -Embryonen und Ovarien von w^1 -Fliegen hergestellt und in analoger Weise analysiert. Um unspezifische Kopräzipitationen durch Bindung an die mRFP1-Markierung zu kontrollieren, wurde einem Teil dieser nativen Proteinextrakte bakteriell exprimiertes mRFP1 Protein zugesetzt. Durch Immunblotten konnte eine Kopräzipitation der Condensin I-spezifischen Untereinheiten Barren und CapD2 durch CapG-mRFP1 nachgewiesen werden (Abbildung 21B). Die Präzipitate wurden ebenso durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Es konnten hier distinkte Banden in den Präzipitaten der CapG-mRFP1 enthaltenden Proteinextrakte, nicht aber in denen der w^1 -Ovarien nachgewiesen werden (Abbildung 21A, Pfeilspitzen), was darauf hinweist, dass spezifische Interaktoren von CapG-mRFP1 kopräzipitiert werden konnten. Um die Identifikation der kopräzipitierten Proteine über Massenspektrometrie zu ermöglichen, wurde ein weiteres SDS-Proteingel der Massenspektrometrie-kompatiblen Färbung mittels kolloidalem Coomassie unterzogen. Da durch diese Färbemethode nur wenige distinkte Banden angefärbt werden konnten, wurden die gesamten Spuren der Präzipitate in Bereiche aufgeteilt (Abbildung 21C und D, rote Kästchen), und die Gesamtheit der Peptide dieser Bereiche mittels Massenspektrometrie identifiziert.

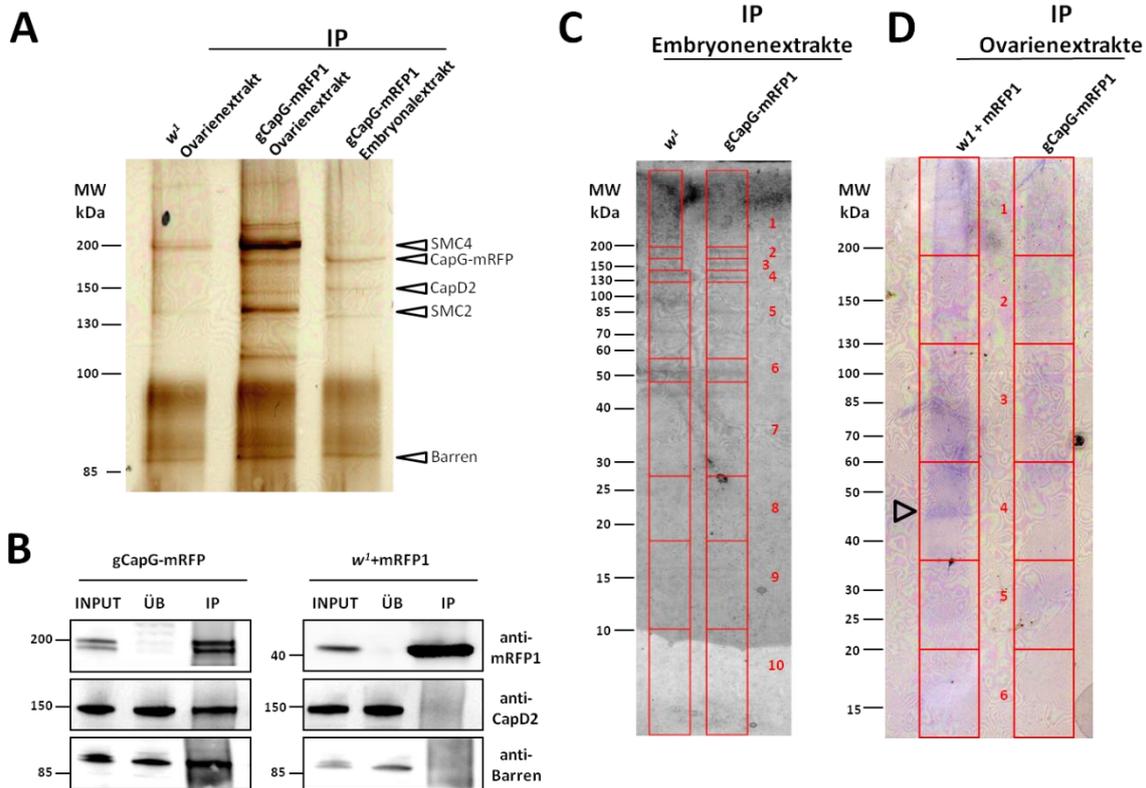


Abbildung 21: Die Untereinheiten des Condensin I-Komplexes können durch gCapG-mRFP1 präzipitiert werden. Native Proteinextrakte aus 3-6 Stunden alten w^1 -Embryonen und Ovarien von w^1 -Weibchen, sowie aus 3-6 Stunden alten Embryonen und Fliegenweibchen des Genotyps $gCapG-mRFP1/TM3,Ser$ wurden durch Immunpräzipitation unter Verwendung von Kaninchen-anti-mRFP1-Sepharose analysiert. Zum Teil wurde den w^1 -Extrakten bakteriell exprimiertes mRFP1 (1 ng/ μ l) zugesetzt. **A)** Proben der Eluate (IP) der Immunpräzipitationen wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung unterzogen. **B)** Proben der Proteinextrakte vor Immunpräzipitation (INPUT), der Überstände nach Präzipitation (ÜB) und der Eluate nach Präzipitation (IP) der Immunpräzipitationen aus Embryonenextrakten wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Immunblotten unter Verwendung von Kaninchen-anti-mRFP1, Kaninchen-anti-CapD2 und Kaninchen-anti-Barren Antikörpern analysiert. **C)** Proben der Eluate (IP) der Immunpräzipitationen aus w^1 - bzw. gCapG-mRFP1 Embryonenextrakten wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und kolloidal-Coomassie gefärbt. Die gesamten Gelspuren der Präzipitate wurden in jeweils 10 Bereiche aufgeteilt (rote Kästchen) und die Gesamtheit der Peptide dieser Bereiche mittels Massenspektrometrie identifiziert. **D)** Proben der Eluate (IP) der Immunpräzipitationen aus w^1 - bzw. gCapG-mRFP1 Ovarienextrakten wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und kolloidal-Coomassie gefärbt. Die gesamten Gelspuren der Präzipitate wurden in jeweils 6 Bereiche aufgeteilt (rote Kästchen) und die Gesamtheit der Peptide dieser Bereiche mittels Massenspektrometrie identifiziert. Durch die Pfeilspitze ist die Bande des bakteriell exprimierten mRFP1 gekennzeichnet, welches dem Extrakt der w^1 -Ovarien vor der Präzipitation zugesetzt wurde.

Die Massenspektrometrie und primäre Analyse der Daten wurden in der Biochemie *core facility* des Max Planck Instituts in Martinsried durchgeführt. In den Präzipitaten der $gCapG-mRFP1$ Embryonenextrakte konnten insgesamt 168 *D. melanogaster*-Proteine identifiziert werden, in denen aus $gCapG-mRFP1$ exprimierenden Ovarien 545 Proteine. In den Präzipitaten der w^1 -Embryonen wurden 234 Proteine und in denen der w^1 -Ovarien 899 Proteine identifiziert. Eine weitere Analyse der Daten wurde von mir vorgenommen. Die identifizierten Proteine wurden

vorerst nach ihrem *unique and razor coverage* sortiert, der ein Maß für die Spezifität der Peptidmassenzuordnung darstellt. Es wurden alle Proteine verworfen, deren *unique and razor coverage* kleiner als 5 war. Es wurden ebenso ribosomale Proteine und Proteine deletiert, denen nur 1 spezifisches Peptid zugeordnet werden konnte. Alphabetisch geordnete Tabellen der verbliebenen Proteine finden sich im Anhang (A1) CapG-mRFP1-Embryonen Orbi_0112 und A2) CapG-mRFP1-Ovarien Orbi_1060). Um die Proteine zu identifizieren, die ebenfalls aus w^1 -Ovarienextrakten präzipitiert wurden, wurden die in der Negativkontrolle identifizierte Proteine analog sortiert und zusammengestellt (Anhang: A3) w^1 -Ovarien Orbi_1060).

Tabelle 2: Zusammenstellung der mit höchster Intensität durch CapG-mRFP1 präzipitierten Proteine. Dargestellt sind die 30 mit höchster Intensität identifizierten Proteine (sowie CapG) aus Präzipitaten von CapG-mRFP1 exprimierenden Embryonen (A) und Ovarien (B), bzw. aus w^1 -Embryonen (A) und w^1 -Ovarien (B) nach Immunpräzipitation mit Kaninchen-anti-mRFP1 Sepharose. Den Extrakten der w^1 -Ovarien war bakteriell exprimiertes mRFP1-Protein zugesetzt worden. Angegeben sind die identifizierten Proteine, die Spezifität ihrer Peptidmassenzuordnung (Coverage), ihr Molekulargewicht (MW), der gemittelte Wert des Gelbereiches, in dem die meisten Peptide identifiziert wurden (SA), die Anzahl der Peptide, die dem entsprechendem Protein zugeordnet werden konnten (PEP), sowie die Intensität mit der die Peptide identifiziert wurden (INT). In grün sind die identifizierten Condensin I-Untereinheiten dargestellt. In blau sind die Werte der Proben der CapG-mRFP1 Präzipitationen hervorgehoben.

A	Protein	Coverage [%]	MW [kDa]	SA	PEP CapG	PEP w^1	INT CapG	INT w^1
1	SMC4	48,8	160	2,2	198	1	126540000	0
2	SMC2	48,5	134	4,2	121	4	101560000	93326
3	CAPD2	37,5	158	3,5	158	1	84385000	25022
4	Hsc70-4	54,2	71	5,1	52	56	36548000	37354000
5	Barren	34,6	83	5,2	34	0	29572000	0
6	Stress-sensitive B	32,1	33	7,8	17	13	11578000	7376300
7	CG11700;CG32744;Ubi-p63E	22,6	34	5,4	22	20	4574000	3875400
8	betaTubulin 56D	45,4	50	5,7	33	60	4094900	31003000
9	Hsc70-3	25,8	72	5,0	18	17	4011800	3941500
10	polyA-binding protein	33,1	70	5,3	25	26	3823800	5736900
11	Yolk protein 3	26	46	6,7	15	14	3387200	4325100
12	Receptor of activated	25,5	36	7,0	10	9	3236700	3220900
13	Protein-L-isoaspartat O-methyltransferase	27	25	8,0	8	11	2749500	7217600
14	Stubarista	33,3	30	7,0	10	12	2597500	4642000
15	Ribosomal protein S2	15	29	7,3	6	8	2591400	4090400
16	Dacapo	6,1	27	5,5	10	10	2295500	1982100
17	alphaTubulin 84B	31,1	50	5,5	14	24	2258500	10668000
18	Yolk protein 2	30,3	52	6,5	17	15	2094400	2932200
19	CG8010	23	44	5,0	9	10	1798000	2724800
20	Actin 5C	41,2	42	6,6	17	57	1660500	27681000
21	Ef1alpha 48D	23,3	50	6,6	9	19	1653600	7225300
22	CLIP-190	20,9	189	2,3	2	47	1644500	4116600
23	Quemao	14,7	26	7,9	5	5	1541000	2027200
24	Jaguar	32,2	144	3,7	14	89	1440200	22498000
25	Yolk protein 1	22,6	49	6,5	12	10	1386200	1991500
26	Rudimentary	6,1	247	1,6	13	13	1331600	1576100
27	Ef2b	10	94	5,0	9	4	1188700	478270
28	Clathrin heavy chain	17	191	3,0	15	26	1092100	3492100
29	Tropomyosin 1	8,7	29	5,6	10	10	1037200	994390
30	CapG	5,8	154	3,6	11	0	971730	0

Ergebnisse

B	Protein	Coverage [%]	[kDa]	SA	PEP CapG	PEP w ¹	INT CapG	INT w ¹
1	Hsc70-4	63,3	71	3,88	86	101	133400000	269390000
2	SMC2	52,2	134	5	105	0	101770000	0
3	SMC4	47,3	160	5,9	104	0	100370000	0
4	Zipper	65,1	237	5,5	160	537	76121000	118880000
5	Ef1alpha 48D	39,1	50	3,27	39	47	63100000	73740000
6	betaTubulin 56D	57,9	50	3,46	83	51	58024000	35158000
7	CAPD2	34,4	158	5,76	85	0	56621000	0
8	Cul-2	56,8	87	4,04	49	64	34056000	60057000
9	Jaguar	60,7	145	4,88	71	225	34039000	428380000
10	Barren	41,5	83	4,52	58	0	33304000	0
11	Protein interacting with APP	39,8	79	4,01	40	48	31463000	45880000
12	Yolk protein 3	68,3	46	3,52	46	55	28376000	90561000
13	Alpha Tubulin 84D	53,1	50	3,27	37	26	26099000	24056000
14	PolyA-binding protein	60,3	70	3,75	49	67	25549000	78034000
15	Lava lamp	60,3	316	5,8	103	230	21780000	154450000
16	Hsc70-3	45,1	72	3,99	27	40	18853000	43022000
17	Ribosomal protein S2	50,6	29	2,07	18	26	16997000	46994000
18	Stubarista	60,7	35	2,87	20	25	16498000	44612000
19	Stress-sensitive B	59,6	34	2,02	19	28	16205000	45981000
20	Didum	59,7	208	5,58	67	275	15956000	375100000
21	Quemao	38,8	28	2,1	22	19	15263000	33973000
22	Rack1	63,5	36	2,16	25	31	14793000	58550000
23	Yolk protein 2	50,9	50	3,48	34	61	14614000	72422000
24	Maternal expression at 31B	66,4	52	3,12	35	42	13635000	32885000
25	Yolk protein 1	43,7	49	3,88	45	67	13410000	53108000
26	Myosin 61F	53,1	121	4,61	34	131	12823000	134940000
27	Trailer hitch	38,8	69	4,04	23	28	11865000	21185000
28	DnaJ-like-2	44,7	45	3	19	15	10761000	8311900
29	Pontin	47,1	50	3,56	18	16	10504000	6327800
30	Hsp26	53,8	23	2	14	15	9501100	24070000
108	CapG	4,5	154	6	6	0	922630	0

Nach Deletion der Treffer mit niedriger Signifikanz konnten 65 mögliche Interaktoren von gCapG-mRFP in Embryonalextrakten und 260 mögliche Interaktoren in den Extrakten der Ovarien erhalten werden. Diese wurden schließlich nach der Intensität der in den Präzipitaten detektierten Peptide geordnet. Die Daten der jeweils 30 mit höchster Intensität kopräzipitierten Proteine und die der Condensin-Untereinheiten sind in Tabelle 2 dargestellt. Peptide der Condensin-Kernuntereinheiten SMC4 und SMC2 sowie die der Condensin I-spezifischen Untereinheiten Barren und CapD2 konnten konsistent zur durchgeführten Immunblot-Analyse (Abbildung 21B) mit hoher Spezifität (*coverage*) und Intensität in den Präzipitaten der CapG-mRFP1 enthaltenden Extrakte, nicht aber in denen der Negativkontrolle identifiziert werden (Tabelle 2, grün markiert), was generell für eine effektive Präzipitation durch CapG-mRFP1 spricht. Dem CapG selbst konnten unerwarteterweise nur wenige Peptide mit geringer Spezifität und Intensität zugeordnet werden. Für die Massenspektrometrie wurden die Proteine in den entsprechenden Gelstücken mit Trypsin in Peptide geschnitten und anschließend analysiert. Wie viele Peptide so generiert werden, und wie gut diese dann in der Massenspektrometrie

identifiziert werden können, hängt von der Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine ab. Somit können nicht alle Proteine gleich gut durch diese Methode prozessiert und identifiziert werden. Weitere Proteine, deren Peptide mit hoher Intensität im Präzipitat der CapG-mRFP1 exprimierenden Embryonen bzw. der CapG-mRFP1 Ovarienextrakte identifiziert wurden, wurden allerdings mit ähnlich hoher Intensität auch im Präzipitat der Negativkontrolle gefunden und sind somit nicht spezifisch. Peptide der Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapD3 und CapH2 konnten in der Gesamtheit der in den Präzipitaten identifizierten Proteine nicht detektiert werden, was eine Interaktion dieser Proteine mit CapG in den untersuchten löslichen Lysaten unwahrscheinlich macht.

Obwohl die Funktionalität des mRFP1-markierten CapG in der Fliege nachgewiesen werden konnte, könnten spezifische Protein-Protein-Interaktionen durch die C-terminale Fusion mit mRFP1-Markierung behindert sein. Daher wurde außerdem eine Immunpräzipitation von CapG aus w^1 -Embryonen unter Verwendung von Kaninchen-anti-CapG(N)-Sepharose durchgeführt. Hierbei konnte eine Kopräzipitation der Condensin I-spezifischen Untereinheiten CapD2 und Barren durch das endogene CapG klar nachgewiesen werden, nicht aber eine Kopräzipitation des Condensin II-spezifischen CapH2 (Abbildung 22).

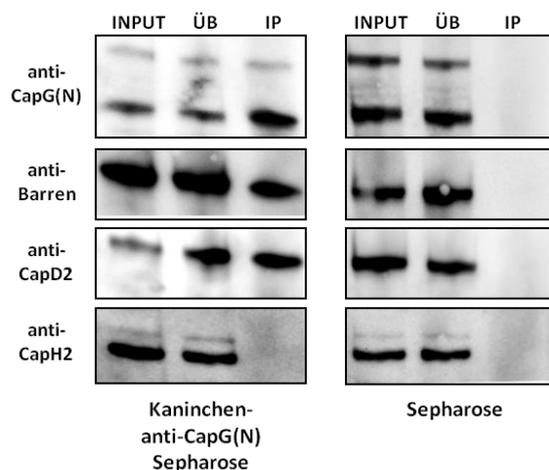


Abbildung 22: CapH2 kann durch das unmarkierte, endogene CapG nicht präzipitiert werden. Native Proteinextrakte aus 3-6 Stunden alten w^1 -Embryonen wurden durch Immunpräzipitation mit Kaninchen-anti-CapG(N)-Sepharose bzw. Antikörper-freier-Sepharose (Sepharose) analysiert. Proben der Proteinextrakte vor Immunpräzipitation (INPUT), der Überstände nach Präzipitation (ÜB) und der Eluate nach Präzipitation (IP) wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Der angefertigte Blot wurde nacheinander mit Kaninchen-anti-CapG(N), Kaninchen-anti-Barren, Kaninchen-anti-CapD2 und Ratte-anti-CapH2 Antikörpern sondiert.

CapG konnte sowohl im Proteinextrakt aus Embryonen als auch aus Ovarien in einem löslichen Condensin I-Komplex vertreten nachgewiesen werden, nicht aber in einem löslichen Condensin II-Komplex. Es konnten außerdem keine weiteren, bisher nicht bekannten Interaktoren von CapG identifiziert werden.

2.2.2.2. Die Präzipitation Condensin II-spezifischer Untereinheiten kann auch durch SMC4 nicht erreicht werden

Die bisher durchgeführten Koimmunpräzipitationsexperimente weisen nicht darauf hin, dass CapG in einem Condensin II-Komplex assemblieren kann. Alternativ könnte auch in *D. melanogaster* ein bisher nicht charakterisiertes CapG2-Protein existieren. Mögliche Kandidaten für CapG2 könnten hierbei durch Immunpräzipitation der Condensin-Kernuntereinheit SMC4 und anschließender massenspektrometrischer Analyse der Präzipitate identifiziert werden.

Da in *D. melanogaster* eine Lokalisation und Funktion der Condensin II-spezifischen Untereinheiten in der weiblichen Keimbahn gezeigt werden konnte (Hartl et al., 2008a), sollte eine Präzipitation eines Condensin II-Komplexes aus Ovarienextrakten möglich sein. Daher wurde ein nativer Proteinextrakt aus Ovarien hergestellt, in denen *UASP-SMC4-EGFP II.1* bzw. *UASP-SMC4-EGFP III.1* unter Kontrolle von *$\alpha 4tub-Gal4-VP16$* ektopisch exprimiert wurden. Dieser Extrakt wurde durch Immunpräzipitation unter Verwendung von Kaninchen-anti-EGFP-Sepharose analysiert. Obwohl die vollständige biologische Funktionalität von SMC4 in transheterozygot *SMC4*-mutanten Fliegen durch Expression der *UASP-SMC4-EGFP*-Transgene nicht vermittelt werden konnte, wurde eine Lokalisation des EGFP-markierten SMC4 entlang der zentralen Achse der Metaphase-Chromosomen konsistent zu der des endogenen SMC4 bestätigt (Oliveira, 2007). Im Immunblot konnte weiterhin eine Kopräzipitation der Condensin I-spezifischen Untereinheiten Barren und CapD2 durch SMC4-EGFP gezeigt werden (Abbildung 23A), was insgesamt dafür spricht, dass das Fusionsprotein dennoch effektiv in einem Condensin-Komplex assembliert werden kann. Die Immunpräzipitate wurden außerdem durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend kolloidal-Coomassie gefärbt. Da hier auch in der Spur der Heißelution distinkte Banden kenntlich waren (Abbildung 23B, IP Heiß), wurden die Spuren der Präzipitate beider Elutionsschritte in Bereiche aufgeteilt, und die Gesamtheit der Peptide dieser Bereiche mittels Massenspektrometrie identifiziert (Abbildung 23B, rote Kästchen). Da bereits im vorherigen Experiment eine Analyse des Präzipitats der Negativkontrolle vorgenommen wurde, wurde diese hier nicht analysiert.

Die Massenspektrometrie und Primäranalyse der Daten wurden analog zum vorausgegangenen Experiment vorgenommen. Die Liste der insgesamt 731 identifizierten Proteine der Präzipitate wurde wie bereits beschrieben von mir prozessiert. Eine alphabetisch geordnete Tabelle der verbliebenen 278 potentiellen SMC4-Interaktoren ist im Anhang dargestellt (EGFP-SMC4-Ovarien Orbi_0231). Diese Proteine wurden schließlich nach der Intensität der in den Präzipitaten

detektierten Peptide geordnet. Die Daten der 30 mit insgesamt höchster Intensität kopräzipitierten Proteine und die der Condensin-Untereinheiten sind in Tabelle 3 dargestellt.

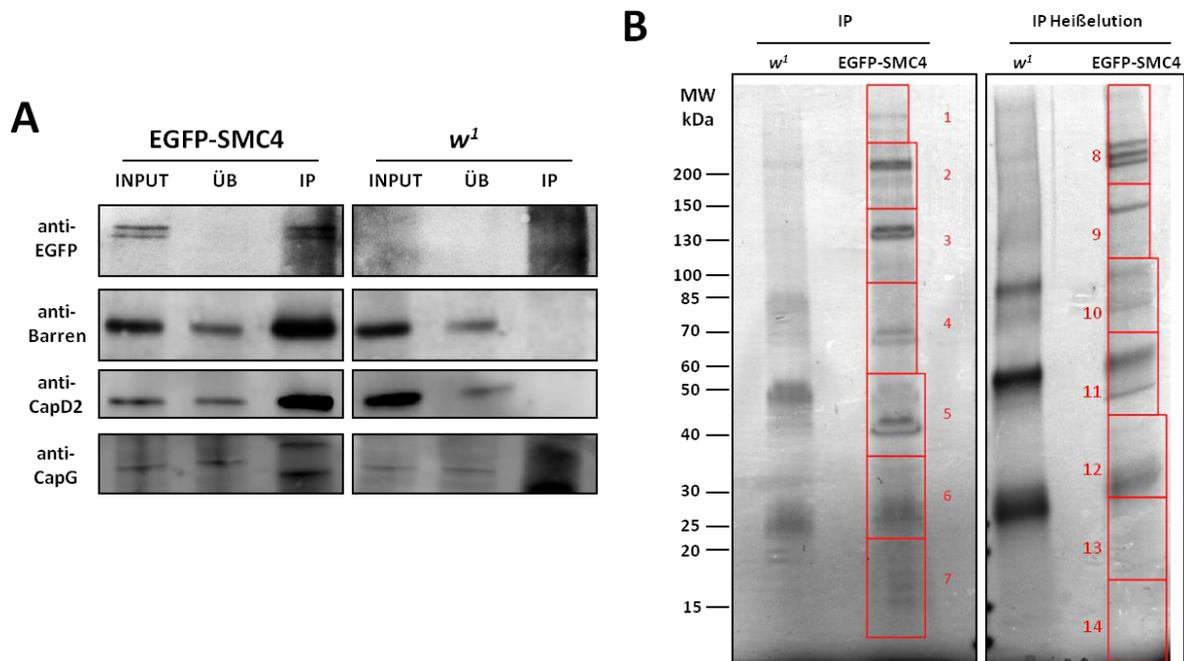


Abbildung 23: Durch SMC4-EGFP können die Condensin I-spezifischen Untereinheiten präzipitiert werden. Native Proteinextrakte aus Ovarien von w^1 -Weibchen, sowie *UASP-SMC4-EGFP* exprimierenden Weibchen (*$\alpha 4tub-Gal4-VP16/UASP-EGFP-SMC4 II.1$* und *$\alpha 4tub-Gal4-VP16/+; UASP-EGFP-SMC4 III.1/+$*) wurden durch Kaninchen-anti-EGFP-Sepharose immunpräzipitiert. Eine Elution der Präzipitate erfolgte vorerst durch Elutionspuffer (IP) und anschließend durch Aufkochen der Sepharose in SDS-Probenpuffer (IP, Heißelution). **A**) Proben der Proteinextrakte vor Immunpräzipitation (INPUT), der Überstände nach Präzipitation (ÜB) und der Eluate nach der ersten Präzipitation (IP) wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Immunblot unter Verwendung von Kaninchen-anti-EGFP, Kaninchen-anti-CapD2, Kaninchen-anti-Barren und Kaninchen-anti-CapG(N) Antikörpern sondiert. **B**) Proben der Präzipitate nach Elution 1 (IP) und nach Elution 2 (IP, Heißelution) der Immunpräzipitationen aus w^1 -bzw. den SMC4-EGFP Ovarienextrakten wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und kolloidal-Coomassie gefärbt. Die gesamten Gelspuren der Präzipitate wurden in jeweils 7 Bereiche aufgeteilt (rote Kästchen) und die Gesamtheit der Peptide dieser Bereiche mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Peptide des SMC4 selbst und des SMC2 sowie die der Condensin I-spezifischen Untereinheiten Barren und CapD2 konnten mit hoher Spezifität (*coverage*) und mit hoher Intensität in den Präzipitaten identifiziert werden (Tabelle 3, in grün hervorgehoben). Dem CapG konnten wiederum nur sehr wenige Peptide mit geringer Spezifität und Intensität zugeordnet werden. Peptide der Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapH2 und CapD3 konnten in der Gesamtheit der in den Präzipitaten identifizierten Proteine nicht detektiert werden. Es scheint daher auch nicht wahrscheinlich, dass ein mögliches CapG2 durch das SMC4-Fusionsprotein kopräzipitiert werden konnte.

Tabelle 3: Zusammenstellung der mit höchster Intensität durch SMC4-EGFP präzipitierten Proteine. Dargestellt sind die mit höchster Intensität identifizierten Proteine aus Präzipitaten von *UASP-SMC4-EGFP* exprimierenden Ovarien aus Fliegen des Genotyps (*α4tub-Gal4-VP16/ UASP-EGFP-SMC4 II.1* bzw. *α4tub-Gal4-VP16/+; UASP-EGFP-SMC4 III.1/+*) nach Immunpräzipitation an Kaninchen-anti-EGFP Sepharose. Gebundene Interaktoren wurden zunächst durch Elutionspuffer (IP) und anschließend durch Aufkochen der Sepharose in SDS-Probenpuffer (IP, Heiß) eluiert. Angegeben sind die identifizierten Proteine, die Spezifität deren Peptidmassenzuordnung (*Coverage*), deren Molekulargewicht (MW), der gemittelte Wert des Gelbereiches, in dem die meisten Peptide identifiziert wurden (SA), die Anzahl der Peptide, die dem entsprechendem Protein in den jeweiligen Eluatn zugeordnet werden konnten (PEP IP und PEP IP, Heiß), sowie die Intensität mit der die Peptide in den jeweiligen Eluatn identifiziert werden konnten (INT IP und INT IP, Heiß). In grün sind die identifizierten Condensin I-Untereinheiten dargestellt.

Proteine	Coverage [%]	MW [kDa]	SA	PEP IP	PEP IP,Heiß	INT IP	INT IP Heiß
1 Zipper	53	231	2	395	196	1586800000	601680000
2 SMC2	58	134	3	300	172	1095500000	647100000
3 Act5C	71	42	5	102	67	667910000	244950000
4 Myosin heavy chain	52	224	2	175	101	525440000	208140000
5 Hsc70-4	50	71	4	114	80	523510000	342220000
6 CAPD2	42	158	2	128	86	364570000	125160000
7 Didum	43	207	2	127	73	325620000	108860000
8 Jaguar	41	144	3	131	68	287500000	147120000
9 SMC4	57	160	2	149	387	189860000	2967800000
10 Lava lamp	46	316	1	204	77	185190000	92671000
11 PolyA-binding protein	45	70	4	56	29	133860000	34964000
12 Myosin61F	36	121	3	60	40	122760000	56883000
13 Act57B	23	42	5	30	11	115920000	22962000
14 Hsp26	75	23	6	34	29	97334000	91928000
15 Hsc70-3	28	72	4	26	21	95719000	38608000
16 Ef1alpha 48D	24	50	4	30	26	93923000	42901000
17 eIF4G	39	150	2	91	44	84431000	25631000
18 Stubarista	36	30	5	22	20	79298000	40815000
19 Beta Tubulin 56D	35	50	5	38	27	72882000	30701000
20 Barren	30	83	3	47	28	66636000	28864000
21 Alpha Tubulin 84B	45	50	5	30	17	58959000	25286000
22 CG3999	33	110	3	55	30	56827000	33403000
23 CLIP-190	30	189	2	48	14	56479000	10801000
24 Maternal expression at 31B	50	52	5	28	16	53301000	15772000
25 Tropomyosin 1	55	29	5	32	24	51294000	33745000
26 Hsp27	50	24	6	26	25	50469000	57367000
27 Tropomyosin 2	55	33	5	32	24	46579000	23383000
28 Upheld	25	47	5	27	13	44868000	18928000
29 Laminin B2	22	182	2	34	10	40350000	8194100
30 Yolk protein 2	31	52	4	27	15	36722000	13558000
42 CapG-PA	18	132	2	34	17	24166000	5900600

Durch die Condensin-Kernuntereinheit SMC4 konnten somit zwar die anderen Untereinheiten des Condensin I-Komplexes mit hoher Signifikanz, nicht aber die des Condensin II-Komplexes präzipitiert werden. Durch diese Ergebnisse wird die Existenz eines löslichen Condensin II-Komplexes in der Fliege *per se* in Frage gestellt.

2.2.2.3. Die Präzipitation der Condensin-Kernuntereinheiten ist durch CapH2 ermöglicht

Nachdem keine Assoziation der Condensin II-Untereinheiten mit SMC4-EGFP nachgewiesen werden konnte, wurde in einem komplementärem Ansatz überprüft, inwieweit Condensin-Untereinheiten mittels Immunpräzipitation von CapH2 identifiziert werden können. Es standen hierbei transgene Fliegenstämme zur Verfügung, die eine Gal4-abhängige Expression von mcherry oder EGFP-markierten CapH2-Varianten erlauben (Aurich, 2009; Pfeiffer, 2009).

Die Funktionalität der CapH2-Transgene wurde im Rahmen dieser Arbeit geprüft. Nach Expression der Transgene *UASP-mcherry-CapH2 II.1* und *UASP-EGFP-CapH2 II.4* in transheterozygot *CapH2*-mutanten Fliegenovarien konnte eine zeitgerechte Disassemblierung des polytären Chromatins und somit eine Komplementation des bereits beschriebenen *CapH2*-mutanten Phänotyps in diesem Gewebe beobachtet werden (Abbildung 24C und D). Eine Funktionalität konnte auch für die Transgeninsertion *UASP-EGFP-CapH2 II.2* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Wie bereits für das endogene CapH2 beschrieben (Hartl et al., 2008a), konnte eine verstärkte Chromatinlokalisierung in Nährzellen des Stadiums 4 und 5 auch für die fluoreszenzmarkierten CapH2-Transgenprodukte beobachtet werden (Daten hier nicht gezeigt). Im komplementären Ansatz wurde der Effekt der F4-Gal4 vermittelten ektopischen Expression der hergestellten CapH2-Transgene in larvalen Speicheldrüsen untersucht. Nach Expression der Transgene konnte eine partielle Dispersion der Polytänstrukturen vergleichbar der ektopischen Expression des Allels *CapH2^{EY09979}* beobachtet werden (Abbildung 24 F bis H), welches bedingt durch eine *UAS*-Promotor enthaltende P-Elementinsertion stomaufwärts des *CapH2*-Genlokus, ebenfalls eine Gal4-abhängige Überexpression von CapH2 erlaubt (Hartl et al., 2008a).

Trotz der angefügten N-terminalen Markierung sind die CapH2-Fusionsproteine in der Lage, analog dem endogenen CapH2 am Chromatin der ovariellen Nährzellen zu lokalisieren und polytäre Chromatinstrukturen in verschiedenen Geweben aufzulösen, sowie den transheterozygot *CapH2*-mutanten Phänotyp zu komplementieren. Deren Funktionalität konnte somit in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen belegt werden.

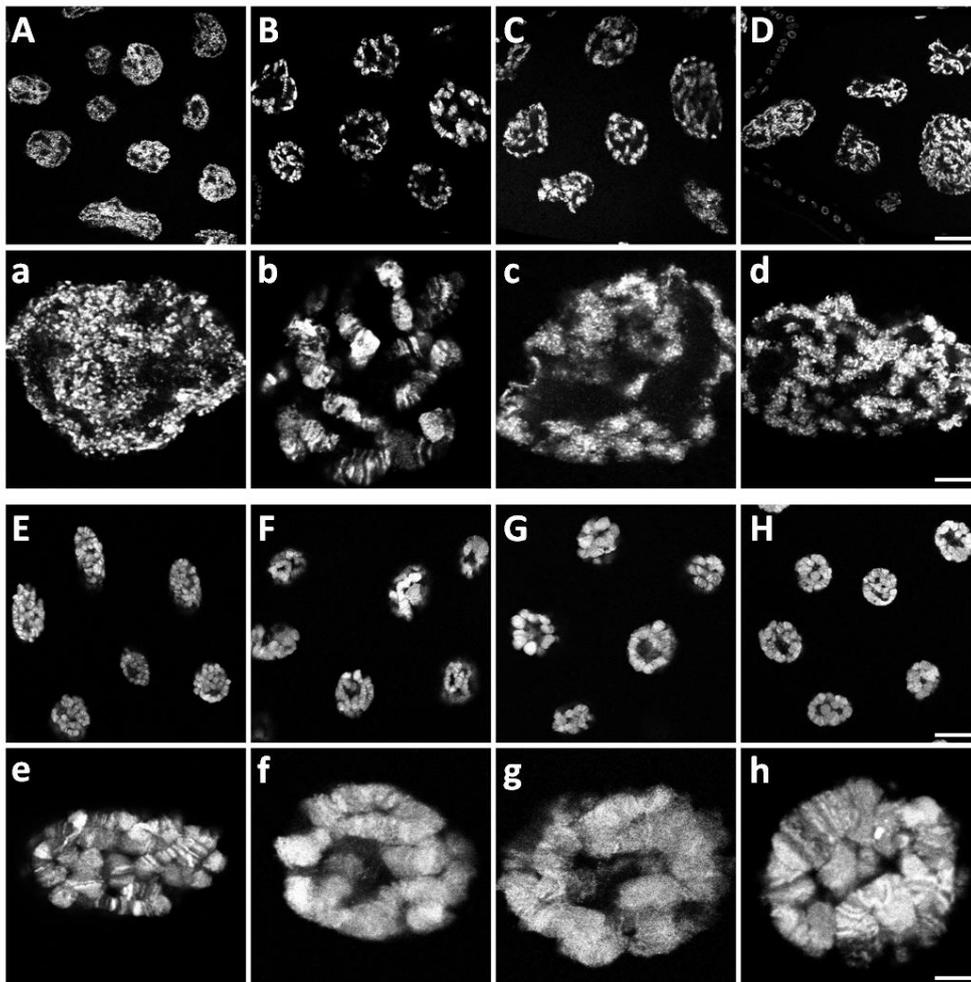


Abbildung 24: CapH2-Transgeninsertionen vermitteln die Funktion von CapH2 zur Disassemblierung des Nährzellchromatins in Fliegenovarien und dissoziieren polytänes Chromatin in Speicheldrüsen. A bis D) Hoechst 33258 gefärbte Nährzellkerne aus Eikammern des Entwicklungsstadiums 10. A,a) Heterozygot *CapH2*-mutante Nährzellkerne (*UASP-EGFP-CapH2 II.4/+; CapH2^{Df(3R)Exel6159/+}*). B,b) Transheterozygot *CapH2*-mutante Nährzellkerne (*UASP-EGFP-CapH2 II.4/CyO; CapH2^{Df(3R)Exel6159/CapH2^{TH2}}*. C und D) Durch $\alpha 4tub$ -*Gal4*-VP16 induzierte Expression der *CapH2*-Transgene in trans-heterozygot *CapH2*-mutanten adulten Weibchen (*UASP-EGFP-CapH2 II.4/ $\alpha 4tub$ -Gal4-VP16; CapH2^{Df(3R)Exel6159/CapH2^{TH2}}*) (C,c) und (*UASP-mcherry-CapH2 II.1/ $\alpha 4tub$ -Gal4-VP16; CapH2^{Df(3R)Exel6159/CapH2^{TH2}}*). (D,d) Gezeigt sind Nährzellkerne aus Eikammern des Stadiums 10 in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μ m für A, B, C, D bzw. 5 μ m für a, b, c, d. E bis F) Hoechst 33258 gefärbte Zellkerne aus Speicheldrüsen von Fliegenlarven des Stadiums L3. E,e) Wildtypische Fliegenlarven (w^1). F,f) Überexpression von *CapH2* (*F4-Gal4/CapH2^{EY09979}*). G und H) Überexpression der *UASP-CapH2*-Transgene (*UASP-mcherry-CapH2 II.1/+; F4-Gal4/+*) (G,g) und (*UASP-EGFP-CapH2 II.4/+; F4-Gal4/+*) (H,h). Gezeigt sind Speicheldrüsen aus Larven im dritten Larvenstadium sowie eine Vergrößerung einzelner Chromosomen. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m für E, F, G, H bzw. 5 μ m für e, f, g, h.

Um zu untersuchen, ob die Untereinheiten des Condensin II-Komplexes durch CapH2 präzipitiert werden können, wurden native Proteinextrakte aus Ovarien hergestellt, in denen *UASP-EGFP-CapH2 II.4* bzw. *UASP-mcherry-CapH2 II.1* unter Kontrolle von *tubP-Gal4* ektopisch exprimiert wurden. Diese wurden mittels Immunpräzipitation unter Verwendung von Kaninchen-anti-EGFP-

Sepharose bzw. Kaninchen-anti-mcherry-Sepharose analysiert. Als Negativkontrolle wurden Extrakte EGFP-Pch2 exprimierender Embryonen unter Verwendung von Kaninchen-anti-EGFP-Sepharose durch Immunpräzipitation analysiert. Die Präzipitate wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend geblottet bzw. durch kollektional-Coomassie gefärbt. Durch Immunblotten konnte eine Präzipitation der markierten CapH2 Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 25A). In den Coomassie-gefärbten Gelen wurden die gesamten Spuren der Präzipitate in Bereiche aufgeteilt (Abbildung 25B, rote Kästchen) und die Gesamtheit der Peptide dieser Bereiche mittels Massenspektrometrie identifiziert. Wechselwirkungen mit spezifischen Interaktoren sollten hierbei in den Präzipitaten beider unterschiedlich markierter CapH2-Proteine nachweisbar sein. Die Präzipitate der Negativkontrolle wurden nicht zusätzlich analysiert.

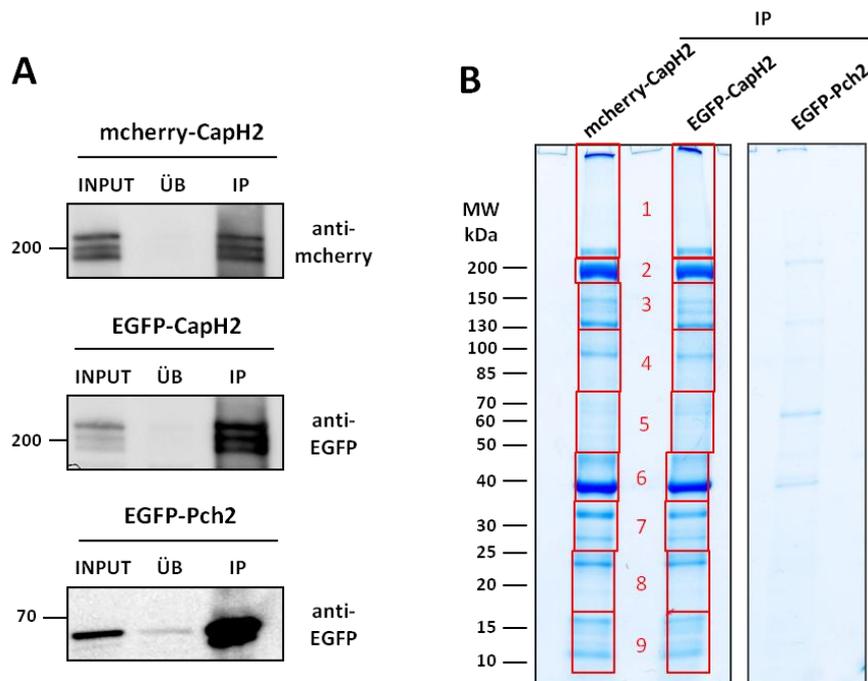


Abbildung 25: Immunpräzipitation von mcherry-CapH2 und EGFP-CapH2 aus Ovarienextrakten. Native Proteinextrakte aus Ovarien von *mcherry-CapH2* (*UASP-mcherry-CapH2 II.1/+; tubP-Gal4/+*) und *EGFP-CapH2* (*UASP-EGFP-CapH2 II.4/+; tubP-Gal4/+*) überexprimierenden Fliegen wurden unter Verwendung von Kaninchen-anti-EGFP-Sepharose beziehungsweise Kaninchen-anti-mcherry-Sepharose immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle wurden Extrakte aus *EGFP-Pch2* exprimierenden Embryonen (*sryα-Gal4, UAS-EGFP-Pch2*) unter Verwendung von Kaninchen-anti-EGFP-Sepharose immunpräzipitiert. **A)** Native Proteinextrakte vor Präzipitation (INPUT), Überstände nach Präzipitation (ÜB) und Präzipitate nach Heißelution mit SDS-Probenpuffer (IP) wurden durch Immunblotten unter Verwendung von Kaninchen-anti-EGFP-Antikörpern und Kaninchen-anti-mcherry-Antikörpern analysiert. **B)** Unter A) beschriebene Präzipitate nach Heißelution mit SDS-Probenpuffer (IP) wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit kollektionaler Coomassie gefärbt. Rot markierte Bereiche wurden ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie analysiert.

Die initial 1280 identifizierten Proteine wurden wie bereits beschrieben weiter spezifiziert. Eine alphabetisch geordnete Tabelle der verbliebenen 803 Proteine ist im Anhang dargestellt (CapH2-Ovarien Orbi_0498). Die Daten der 30 mit insgesamt höchster Intensität kopräzipitierten Proteine und die der Condensin-Untereinheiten sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Zusammenstellung der mit höchster Intensität durch mcherry-CapH2 bzw. EGFP-CapH2 präzipitierten Proteine. Die mit höchster Intensität identifizierten Proteine aus Präzipitaten von *mcherry-CapH2 (UASP-mcherry-CapH2 II.1/+; tubP-Gal4/+)* und *EGFP-CapH2 (UASP-EGFP-CapH2 II.4/+; tubP-Gal4/+)* exprimierenden Ovarien nach Immunpräzipitation an Kaninchen-anti-mcherry Sepharose bzw. Kaninchen-anti-EGFP Sepharose. Angegeben sind die identifizierten Proteine, deren Molekulargewicht (MW), die Spezifität deren Peptidmassenzuordnung (*Coverage*) und der gemittelte Wert des Gelbereiches, in dem die meisten Peptide identifiziert wurden (*SA*). Weiterhin sind die Anzahl der Peptide (*PEP*), die dem entsprechenden Protein in den Eluatn zugeordnet werden konnten und deren Intensität (*INT*), angegeben. Die Werte der mcherry-CapH2 Präzipitate sind in rosa, die der EGFP-CapH2 Präzipitate in blau hervorgehoben. In grün sind die Werte der Condensin-Untereinheiten hervorgehoben.

Proteine	Coverage [%]	MW [kDa]	SA	PEP cry	PEP EGFP	INT cry	INT EGFP
1 Zipper	70,3	232	3,1	2028	1348	9569300000	4389300000
2 Myosin heavy chain-PJ	63,4	224	3,0	1147	926	4254000000	2425400000
3 Act5C	89,9	42	6,1	726	591	3083300000	2377900000
4 alpha-Spectrin	77,4	278	2,5	1098	821	1394500000	7289500000
5 Jaguar	63,9	145	3,9	770	461	1045700000	1043100000
6 Act57B	39,1	42	6,4	266	148	970700000	4696800000
7 beta-Spectrin	66,1	266	2,6	805	599	890100000	4487300000
8 Myosin 61F	65,3	119	4,2	541	321	761250000	4701400000
9 Tropomyosin 1-PA	85,3	29	6,7	235	145	455880000	3400300000
10 Tropomyosin 1-PE	19,8	80	6,7	194	145	443290000	3109800000
11 Spaghetti squash	79,3	20	7,6	154	117	422790000	2464900000
12 Upheld	51,4	47	6,0	160	94	421970000	2575200000
13 Tropomyosin 2	71,1	33	7,2	210	137	391520000	3183500000
14 Hu li tai shao	61,6	128	5,2	271	223	347820000	2071300000
15 Lava lamp	54	316	2,9	438	426	313510000	2444000000
16 Myosin alkali light chain 1	95,9	17	7,4	97	77	307630000	2080800000
17 Hermaphrodite	68,9	239	2,9	524	418	304330000	1979200000
18 Wings up A	51	24	7,7	117	73	291330000	1641200000
19 Myosin light chain 2	86,9	24	7,7	159	135	253950000	1782700000
20 Hsc70-4	55,5	71	5,3	196	148	206980000	2245100000
21 Yolk protein 3	72,4	46	5,2	185	150	189940000	1640200000
22 Actin 79B	27,1	42	6,3	44	28	189320000	1574800000
23 Yolk protein 2	65,8	52	5,3	168	119	183460000	1666100000
24 Karst	47,9	484	1,6	329	255	156270000	70161000
25 Nucleosome assembly	51,9	43	6,3	93	57	148190000	1083000000
26 Troponin C at 73F	65,2	18	8,4	69	47	145610000	75519000
27 Hsp26	82,7	23	7,3	119	123	144450000	1689400000
28 terribly reduced optic lobes	24,9	513	2,9	299	290	116580000	1029300000
29 Calmodulin	98,7	17	8,7	55	42	112490000	67294000
30 Stubarista	71,2	35	6,9	111	71	107640000	1406600000
64 CapH2	29,9	110	4,6	109	65	42097000	14688000
105 SMC4	36,8	160	2,6	76	46	18390000	11313000
114 SMC2	42,9	134	3,5	76	43	16710000	16934000

Die Condensin-Kernuntereinheiten SMC2 und SMC4 konnten durch beide CapH2-Fusionsproteine präzipitiert werden, allerdings nicht mit höchster Priorität (Tabelle 4, grün markiert). Eventuell konnte eine Präzipitation von SMC2 und SMC4 durch das Überangebot an CapH2 hier stimuliert oder sogar erzwungen werden. Unter der Gesamtheit der präzipitierten Proteine finden sich keine für CapG spezifischen Peptide, was ein erneuter Hinweis darauf ist, dass CapG nicht in beiden Condensin-Komplexen assoziieren kann. Bemerkenswerterweise war auch CapD3 unter den insgesamt 1280 identifizierten Proteinen nicht vertreten, was eine Interaktion von CapD3 und CapH2 an sich und im Rahmen eines Condensin II-Komplexes, zumindest in löslichen Extrakten aus Ovarien, wiederum in Frage stellt.

Weiterhin wurde untersucht, ob ein bisher nicht identifiziertes CapG2 durch CapH2 präzipitiert werden konnte. Die bereits identifizierten CapG2 Proteine höherer Vertebraten haben ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa und enthalten charakteristische *HEAT-Repeat*-Domänen. Die in den Präzipitaten von CapH2 identifizierten Proteine wurden daher nach ihrem Molekulargewicht sortiert und entsprechende Kandidaten durch NETPHOS und SCANSITE analysiert. So konnte die Existenz von *HEAT*-Domänen und weiteren Strukturelementen, bzw. Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen untersucht werden. Es konnte hier nur ein *HEAT*-Domänen enthaltendes Protein herausgearbeitet werden (CG32164), welches allerdings eine signifikante Homologie zu Importinen aber keine Verwandtschaft zu CapG2-Vertretern aufweist. Außerdem stellt sich die Frage, ob unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine Präzipitation von CapG2 durch CapH2 erwartet werden kann, wenn auch keine Präzipitation von CapD3 durch CapH2 erreicht wurde.

Durch die Immunpräzipitationen einzelner Condensin-Untereinheiten konnte die Existenz eines löslichen Condensin I-Komplexes in der Fliege nachgewiesen werden. Es konnten hingegen keine Hinweise auf eine Assoziation von CapG in einem Condensin II-homologen Komplex erhalten werden. Da auch nicht alle erwarteten Interaktionen der Komponenten des Condensin II-Komplexes nachvollzogen werden konnten, muss die Existenz und Relevanz eines löslichen Condensin II-Komplexes in *D. melanogaster* in Frage gestellt werden.

2.2.2.4. Eine Interaktion der Condensin-Untereinheiten mit Komponenten des RNA-silencing Signalweges kann nicht bestätigt werden

Erst kürzlich konnte in *D. melanogaster* eine Funktion der RNA-Helikase Vasa während der Mitose gezeigt und ein Modell für die Regulation des Condensin I-Komplexes durch Komponenten des piRNA-Signalwegs in der weiblichen Keimbahn aufgestellt werden (Pek und Kai, 2011). Die Autoren konnten eine direkte Interaktion von Vasa mit den Condensin I-spezifischen Untereinheiten Barren und CapD2, nicht aber mit CapD3 zeigen. Auch durch die hier durchgeführten massenspektrometrischen Analysen konnten in den Präzipitaten der Condensin-Untereinheiten Komponenten des RNA-silencing Signalweges identifiziert werden, allerdings nicht mit hoher Priorität (siehe Tabellen im Anhang, entsprechende Daten sind grau hervorgehoben).

Die Interaktion der Condensin-Untereinheiten mit Komponenten des RNA-silencing Signalweges wurde durch eine Immunblot-Analyse der Präzipitate einzelner Condensin-Untereinheiten unter Verwendung von Antikörpern, welche gegen die RNA-silencing-Komponenten Vasa und Argonaute 2 (Ago2) gerichtet sind, weiterführend überprüft. Hierzu wurden native Proteinextrakte aus *gCapG-EGFP* und *gCapG-mRFP1* exprimierenden Embryonen mittels Immunpräzipitation, unter Verwendung einer entsprechend Antikörper-gekoppelten Sepharose, analysiert. Außerdem wurden *UASP-SMC4-EGFP III.1* und *UASP-EGFP-CapH2 II.4* vermittelt durch *tubP-Gal4* in Ovarien überexprimiert und Proteine der nativen Extrakte aus diesem Gewebe durch anti-EGFP-Sepharose immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurde einerseits ein Extrakt aus *EGFP-Pch2* exprimierenden Embryonen hergestellt und mittels Immunpräzipitation unter Verwendung von anti-EGFP-Sepharose analysiert. Andererseits wurde ein nativer Proteinextrakt aus wildtypischen (w^1) Embryonen hergestellt und diesem vor der Immunpräzipitation durch anti-mRFP1-Sepharose, bakteriell exprimiertes mRFP1-Protein zugesetzt. Die Präzipitate wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Immunblot mit anti-SMC2, anti-Vasa und anti-Ago2-Antikörpern sondiert (Abbildung 26).

Für CapG-EGFP, CapG-mRFP1 und SMC4-EGFP konnte der Erfolg der Kopräzipitation durch den Nachweis der Präzipitation von SMC2 bestätigt werden. Eine vergleichbar effektive Präzipitation von SMC2 durch EGFP-CapH2 konnte hingegen nicht gezeigt werden. Diese Tatsache bestätigt, dass die Interaktionen zwischen den einzelnen Untereinheiten innerhalb eines Condensin I-Komplexes wesentlich stringenter sind, als die innerhalb der Condensin II-Komplexe. Für Vasa konnte eine gewisse Präzipitation bereits durch EGFP-Pch2 beobachtet werden, was auf eine unspezifische Interaktion des Proteins mit der EGFP-Markierung oder aber der eingesetzten

Affinitätsmatrix hinweist. Eine merklich spezifische Kopräzipitation von Vasa konnte allerdings durch keine der Condensin-Untereinheiten erreicht werden. Auch eine Interaktion von Ago2 mit den hier eingesetzten Condensin-Proteinen wurde durch dieses Experiment nicht bestätigt.

Eine physikalische Interaktion von SMC4, CapG oder CapH2 mit den *RNA-silencing* Komponenten Vasa und Ago2 konnte somit nicht verifiziert werden, wodurch in dieser Arbeit keine Hinweise auf eine mögliche Regulation der Condensin-Komplexe durch den *RNA-silencing* Signalweg erhalten werden konnten.

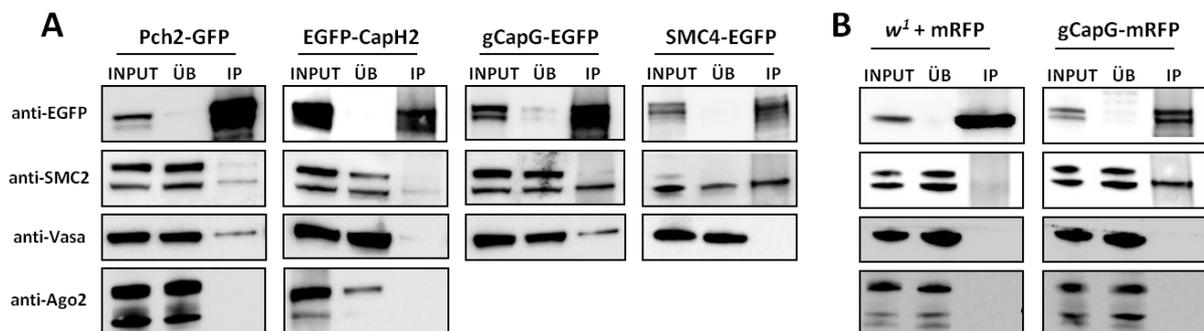


Abbildung 26: Eine Interaktion der Condensin-Untereinheiten mit Komponenten des *RNA-silencing* Signalweges konnte nicht bestätigt werden. A) Native Proteinextrakte aus EGFP-CapH2 (*UASP-EGFP-CapH2 II.4/+; tubP-Gal4/+*) und SMC4-EGFP (*UASP-EGFP-SMC4 III.1/tubP-Gal4*) enthaltenden Ovarien, sowie aus 3-6 Stunden alten Embryonen des Genotyps (*gCapG-EGFP III.1/TM3,Ser*) wurden durch Kaninchen-anti-EGFP-Sepharose immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle wurden Proteine aus Extrakten von 3-6 Stunden alten Embryonen des Genotyps *sryα-Gal4, UAS-EGFP-Pch2* analog präzipitiert. **B)** Ein nativer Proteinextrakt von 3-6 Stunden alten Embryonen des Genotyps (*gCapG-mRFP1/TM3,Ser*) wurde durch Kaninchen-anti-mRFP1-Sepharose präzipitiert. Als Negativkontrolle wurde einem Extrakt aus 3-6 Stunden alten *w¹*-Embryonen bakteriell exprimiertes mRFP1 zugesetzt und dieses analog präzipitiert. Native Proteinextrakte vor Präzipitation (INPUT), Überstände nach Präzipitation (ÜB) und Präzipitate nach Heißelution mit SDS-Probenpuffer (IP) wurden durch Immunblotten unter Verwendung von Kaninchen-anti-EGFP-Antikörpern, Kaninchen-anti-mRFP1-Antikörpern, Kaninchen-anti-SMC2-Antikörpern, Ratte-anti-Vasa-Antikörpern und Maus-anti-Ago2-Antikörpern analysiert.

2.2.3. *In vitro* Assay zur Analyse der Interaktionen einzelner Condensin-Untereinheiten

Unerwarteterweise konnte durch die bisherigen Ergebnisse keine stringente Interaktion der Condensin II-Komponenten gezeigt werden, was die Existenz eines löslichen Condensin II-Komplexes in *D. melanogaster* insgesamt in Frage stellt. Um direkte Interaktionen der Untereinheiten in einem möglichen Condensin II-Komplex in einem weiteren unabhängigen experimentellen Ansatz nachzuvollziehen, wurde basierend auf den Experimenten der Arbeitsgruppe von Hirano (Onn et al., 2007), ein *in vitro* Interaktionsassay etabliert. Hierbei

wurden einzelne Condensin-Untereinheiten *in vitro* transkribiert und translatiert und deren direkte Interaktion durch anschließende Koimmunpräzitationsexperimente untersucht.

2.2.3.1. Interaktionen der Condensin I-Komponenten werden im *in vitro* Assay bestätigt

Vorerst wurde die Funktionalität des *in vitro* Assays anhand der bereits beschriebenen Interaktionen der Condensin I-Untereinheiten in *D. melanogaster* geprüft. In den folgenden Experimenten wurde mit dem SP6-gekoppelten-Retikulozytenlysat-System von Promega gearbeitet, um die kodierenden Bereiche für die entsprechenden Condensin-Untereinheiten transkribieren und translatieren zu können. Es wurde eine C-terminale His-Flag-Markierung an Barren (Barren-HFHF) angefügt, um eine Präzitation durch Maus-anti-Flag-Agarose zu ermöglichen. Eine an entsprechender Position angefügte EGFP-Markierung des Proteins konnte in der Fliege als funktionell beschrieben werden (Oliveira et al., 2007). Als Negativkontrolle wurde eine His-Flag-markierte Variante des humanen Securins verwendet, welches nicht mit den Condensin-Untereinheiten interagieren sollte. Unterschiedliche Kombinationen der einzelnen Konstrukte wurden im Lysat kotranskribiert, in Gegenwart von [³⁵S]Methionin kotranslatiert und einer Koimmunpräzitation unterzogen. Es wurden Aliquots der Reaktionen vor der Präzitation, vom Überstand nach Präzitation und vom Eluat der Präzitation durch SDS-Gelelektrophorese und über anschließende Autoradiografie analysiert. Hierbei konnte eine Präzitation von CapG und CapD2 durch Barren-HFHF gezeigt werden (Abbildung 27).

Des Weiteren wurde die Interaktion der Kleisin-Untereinheiten Barren und CapH2 mit der Condensin-Kernuntereinheit SMC4 untersucht. Hierbei wurde eine C-terminale His-Flag-Markierung analog zu der von Barren an CapH2 fusioniert. Nach Durchführen des bereits beschriebenen Interaktions-Assays konnte eine Präzitation von SMC4 durch Barren-HFHF gezeigt werden (Abbildung 27). Auch CapH2-HFHF ist in der Lage, SMC4 zu präzitimieren, nicht aber mit vergleichbarer Effektivität. Barren scheint also stringenter mit SMC4 interagieren zu können als CapH2 mit SMC4.

Mit dem verwendeten Assay war es somit möglich, Interaktionen der Condensin-Untereinheiten von *D. melanogaster in vitro* zu rekonstruieren. Diese Interaktionen entsprechen den bereits etablierten Modellvorstellungen der Condensin-Komplexe (Onn et al., 2007). Der Assay kann somit zu weiterführenden Interaktionsstudien der Condensin-Untereinheiten eingesetzt werden.

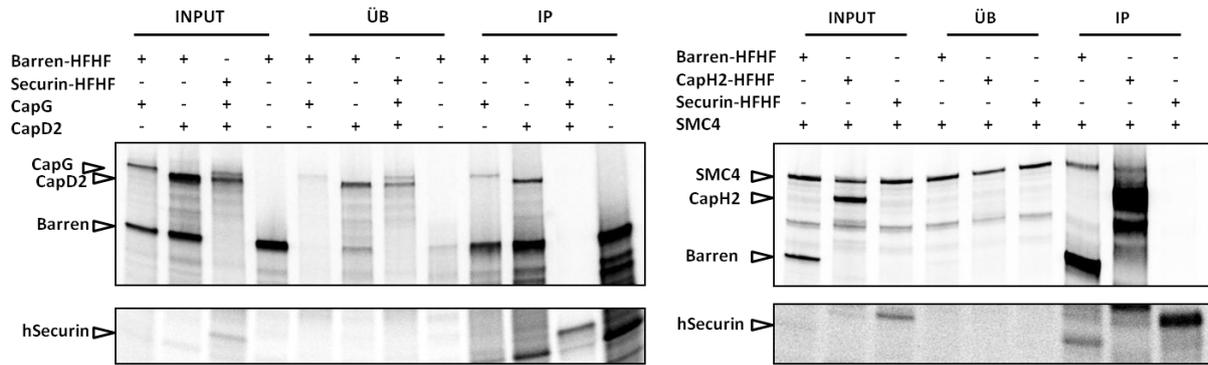


Abbildung 27: Etablierung eines *in vitro* Assays zur Interaktionsanalyse der Condensin Untereinheiten. Die angegebenen Proteinkombinationen wurden *in vitro* kotranskribiert und in Gegenwart von [³⁵S]Methionin kotranslatiert. Die Reaktionen wurden unter Verwendung von Maus-anti-Flag-Agarose (Sigma) immunpräzipitiert. Proben der Reaktionen vor Präzipitation (INPUT), Überstand nach Präzipitation (ÜB) und Eluate nach Präzipitation (IP) wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiografie analysiert.

2.2.3.2. CapG interagiert nicht mit CapH2 und CapD3

Durch den etablierten Interaktions-Assay konnte weiterhin untersucht werden, ob CapG direkt mit CapH2 beziehungsweise CapD3 interagieren kann. Es wurden die His-Flag-markierten Konstrukte für Barren und CapH2 verwendet, für die bereits eine Kopräzipitation von SMC4 gezeigt werden konnte. Außerdem wurde auch in diesem Experiment das His-Flag-markierte humane Securin als Negativkontrolle herangezogen. Da CapH2 und CapG bei SDS-Gelelektrophorese eine ähnliche Migration aufweisen, wurden die Untereinheiten zunächst einzeln transkribiert und translatiert. [³⁵S]Methionin wurde hierbei nur zur Markierung von CapG eingesetzt. Die einzelnen Reaktionen wurden gemischt und direkt durch Maus-anti-Flag-Agarose präzipitiert. Aliquots der Reaktionsgemische vor Präzipitation, der Überstände nach Präzipitation und der Eluate nach Präzipitation wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und zunächst geblottet. Die Effizienz der Präzipitationen konnte durch die Verwendung von Kaninchen-anti-Flag Antikörpern zur Identifikation der Flag-markierten Proteine im Immunblot gezeigt werden (Abbildung 28A). Im Präzipitat der Reaktion von Barren-HFHF und CapG tritt neben der erwarteten Bande von Barren-HFHF noch eine weitere Bande entsprechend des Molekulargewichts von Securin-HFHF auf (Abbildung 28A). Da dieser Reaktion kein Securin-HFHF zugegeben wurde (INPUT), sollte es sich hierbei um ein Abbauprodukt von Barren-HFHF handeln. Die Autoradiografie des Blots zeigt weiterhin, dass CapG durch Barren-HFHF kopräzipitiert werden konnte, nicht aber durch CapH2-HFHF (Abbildung 28A).

Um eine mögliche Interaktion von CapG und CapD3 zu untersuchen, wurde ein N-terminal 6xmyc-markiertes CapD3 eingesetzt. Ebenso wurde die Interaktion von CapG und CapD2 untersucht. CapD2 wurde analog durch eine N-terminale 6xmyc-Markierung gekennzeichnet. Für ein an entsprechender Position EGFP-markiertes Fusionsprotein war bereits eine biologische Funktionalität in der Fliege gezeigt worden (Fischer, 2010). Als Negativkontrolle wurde hier die N-terminal 6xmyc-markierte katalytische Untereinheit der humanen Phosphatase PP2A (PP2A(C)) verwendet. Die einzelnen Untereinheiten wurden auch in diesem Experiment zunächst individuell transkribiert und translatiert, gemischt und unter Verwendung von Maus-anti-myc-Sepharose präzipitiert. Die Interaktionsanalyse erfolgte auch hier durch SDS-Gelelektrophorese und Westernblot, gefolgt durch einem Nachweis mit Maus-anti-myc-Antikörpern. Hierbei konnte eine wenig stringente Kopräzipitation von CapG durch myc-CapD2 nicht aber durch myc-CapD3 bzw. myc-PP2A(C) nachgewiesen werden (Abbildung 28B).

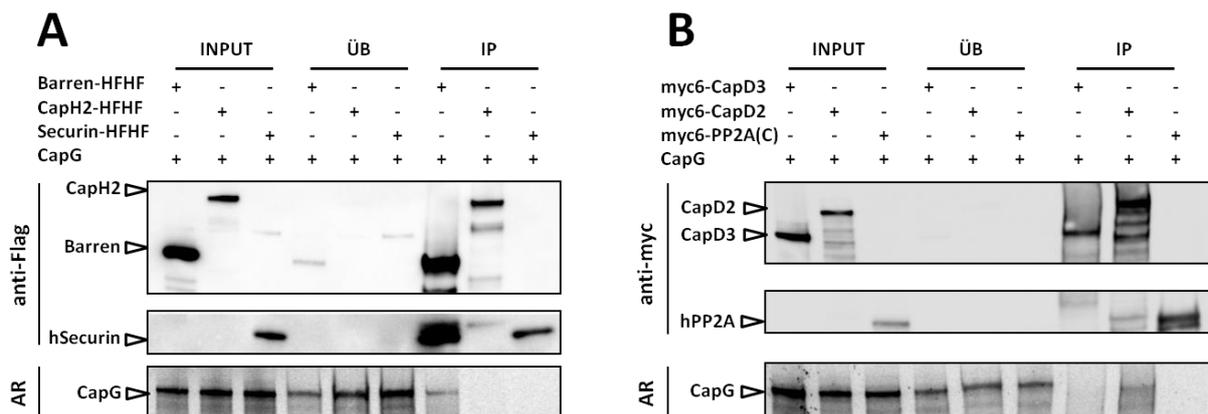


Abbildung 28: CapG interagiert nicht mit CapH2 und CapD3. CapG wurde in Gegenwart von [³⁵S]Methionin *in vitro* translatiert. Die angegebenen Epitop-markierten Proteine wurden ebenso *in vitro* translatiert, allerdings in Abwesenheit von [³⁵S]Methionin. Die Reaktionen wurden gemischt und unter Verwendung von Maus-anti-Flag-Agarose (**A**) bzw. Kaninchen-anti-myc-Agarose (**B**) immunpräzipitiert. Proben der Reaktionen vor Präzipitation (INPUT), Überstand (ÜB) und Eluate der Präzipitate (IP) wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Um die Effizienz der Immunpräzipitationen zu bestimmen, wurden die Westernblots zunächst mit Kaninchen-anti-Flag (**A**) bzw. Maus-anti-myc (**B**) Antikörpern sondiert. Durch die anschließende Autoradiografie (AR) der Blots konnte die Kopräzipitation von CapG untersucht werden.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen konnte eine direkte Interaktion von CapG mit den Condensin I-spezifischen Untereinheiten Barren und CapD2, nicht aber mit denen des Condensin II-Komplexes gezeigt werden. Eine direkte Assemblierung von CapG innerhalb eines Condensin II-Komplexes scheint somit weiter unwahrscheinlich.

2.2.3.3. Die direkte Interaktion von CapH2 und CapD3 ist im *in vitro* Assay nachweisbar

Eine zentrale Frage, die durch den *in vitro* Interaktions-Assay beantwortet werden sollte, ist die der Interaktionsfähigkeit der Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapH2 und CapD3. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die zu untersuchenden Proteine myc-CapD3 und CapH2 zunächst getrennt transkribiert und translatiert. [³⁵S]Methionin wurde wiederum nur zum Markieren der möglichen Interaktoren eingesetzt. Die myc-markierte katalytische Untereinheit der humanen PP2(A) wurde erneut als Negativkontrolle herangezogen. Als weitere Negativkontrolle sollte die Präzipitation von Barren durch myc-CapD3 dienen. Die Präzipitation erfolgte unter Verwendung von Kaninchen-anti-myc-Agarose. Entnommene Proben wurden durch SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Westernblot unter Verwendung von Maus-anti-myc-Antikörpern analysiert. Danach wurde eine Autoradiografie des Blots durchgeführt.

Es konnte eine Kopräzipitation von CapH2 durch myc-CapD3 gezeigt werden. Ebenso wurde eine Kopräzipitation von Barren durch myc-CapD3 nachgewiesen. Barren konnte allerdings auch durch myc-PP2(A) präzipitiert werden (Abbildung 29A). Eine spezifische Interaktion von Barren mit der hier eingesetzten katalytischen Untereinheit der humanen PP2A(C) konnte durch Verwendung einer weiteren Kontrolle ausgeschlossen werden. So wurde eine vergleichbare Kopräzipitation von Barren auch durch ein N-terminal myc-markiertes Konstrukt der humanen Kohäsin-Untereinheit Scc1 unter Verwendung einer Maus-anti-myc-Sepharose beobachtet (Daten nicht gezeigt), was insgesamt auf eine unspezifische Interaktion von Barren mit den eingesetzten Affinitätsmatrizes oder mit dem myc-Epitop der Proteine hinweist. Die Spezifität der Interaktion von Barren und CapD3 muss somit in Frage gestellt werden.

In einem weiteren Experiment wurde die Kopräzipitation von CapD3 durch die bereits verwendeten C-terminal His-Flag-markierten Proteine CapH2 und Barren untersucht. Es wurde auch ein N-terminal-Flag markiertes CapH2 verwendet, um mögliche Beeinträchtigungen der Proteininteraktionen durch die C-terminale Markierung auszuschließen. Ein an entsprechender Position EGFP-markiertes Protein konnte unter Punkt 2.2.2.3. als funktionell beschrieben werden. Als Negativkontrollen wurden das His-Flag-markierte humane Securin und das His-Flag-markierte Barren eingesetzt. Die einzelnen Untereinheiten wurden auch in diesem Experiment zunächst individuell transkribiert und translatiert, gemischt und unter Verwendung von Maus-anti-Flag-Sepharose kopräzipitiert. Die Interaktionsanalyse erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Westernblot durch Verwendung von Kaninchen-anti-Flag-Antikörpern. In der Autoradiografie des Blots kann eine Kopräzipitation von CapD3 bereits durch Securin

beobachtet werden (Abbildung 29B), was auf eine gewisse unspezifische Interaktion von CapD3 mit der eingesetzten Affinitätsmatrix oder der His-Flag-Markierung hinweist. Eine stringenter Kopräzipitation von CapD3 kann durch das C-terminal His-Flag-markierte CapH2-Konstrukt, aber auch durch Barren-HFHF nachgewiesen werden (Abbildung 29B).

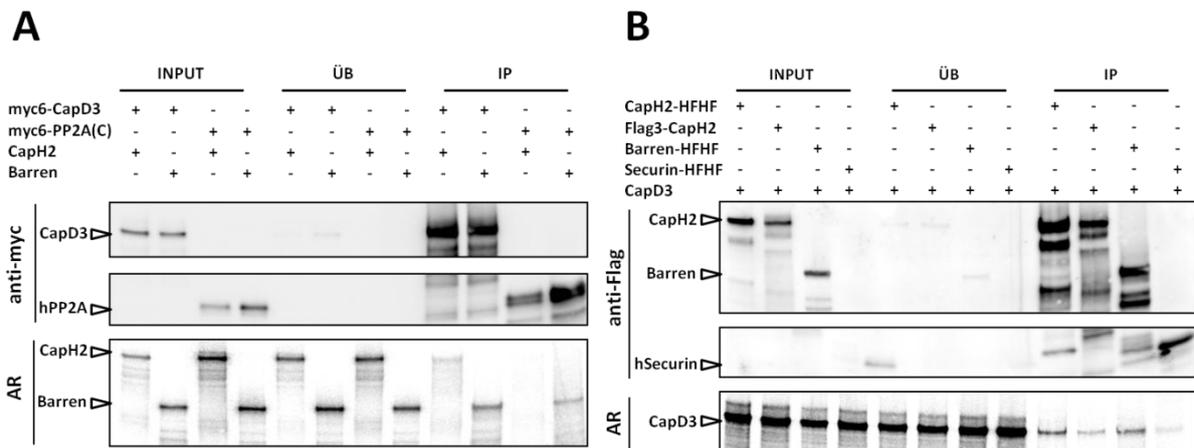


Abbildung 29: Interaktionen der Condensin II spezifischen Untereinheiten. A) Myc-PP2A(C), CapH2 und Barren wurden in Gegenwart von [³⁵S]Methionin *in vitro* translatiert. Myc-CapD3 wurde ebenso *in vitro* translatiert, allerdings in Abwesenheit von [³⁵S]Methionin. **B)** CapD3 wurde in Gegenwart von [³⁵S]Methionin *in vitro* kotranslatiert. Die angegebenen Flag-markierten Proteine wurden ebenso *in vitro* translatiert, allerdings in Abwesenheit von [³⁵S]Methionin. Die Reaktionen wurden entsprechend gemischt und unter Verwendung von Maus-anti-myc-Sepharose (**A**) bzw. Maus-anti-Flag-Agarose (**B**) immunpräzipitiert. Proben der Reaktionen vor Präzipitation (INPUT), Überstand (ÜB) und Elution (IP) wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und gebロットet. Um die Effizienz der Immunpräzipitation zu bestimmen, wurden die Westernblots zunächst mit Maus-anti-myc (**A**) bzw. Kaninchen-anti-Flag-Antikörpern (**B**) sondiert. Durch die Autoradiografie (AR) der Blots konnte eine mögliche Kopräzipitation der radioaktiv markierten Untereinheiten untersucht werden.

Zusammenfassend konnte im verwendeten *in vitro* Assay eine direkte Interaktion von CapH2 und CapD3 gezeigt werden. Weiterhin wurde auch eine unerwartete Interaktion der Condensin I-Untereinheit Barren mit der Condensin II-Untereinheit CapD3 beobachtet, deren Spezifität allerdings nicht klar herausgearbeitet werden konnte.

2.2.3.4. Die Bildung eines ternären Komplexes ist nur durch Condensin I-spezifische Untereinheiten ermöglicht

Im Gegensatz zur Präzipitation von CapH2 aus Geweben der Fliege, konnte im *in vitro* Assay eine Interaktion von CapH2 und CapD3 nachgewiesen werden. Ebenso konnten durch den Assay unerwartete Interaktionen zwischen Condensin I und Condensin II-spezifischen Untereinheiten

gezeigt werden. Es stellt sich nun aber die Frage, ob diese *in vitro* Interaktionen nur durch das gezielte Zusammenbringen einzelner Untereinheiten ermöglicht sind oder auch eine physiologische Relevanz haben. Diese Frage könnte durch die *in vitro* Rekonstitution ternärer Komplexe beantwortet werden. Nach der bisherigen Modellvorstellung wird eine Interaktion von CapD2/CapD3 mit der Kernuntereinheit SMC4 durch die Kleisine Barren/CapH2 verbrückt. Im folgenden Versuchsansatz wurde demzufolge untersucht, ob durch die Gegenwart der Kleisine eine Kopräzipitation von SMC4 durch die myc-markierten Proteine CapD2 beziehungsweise CapD3 verbrückt werden kann.

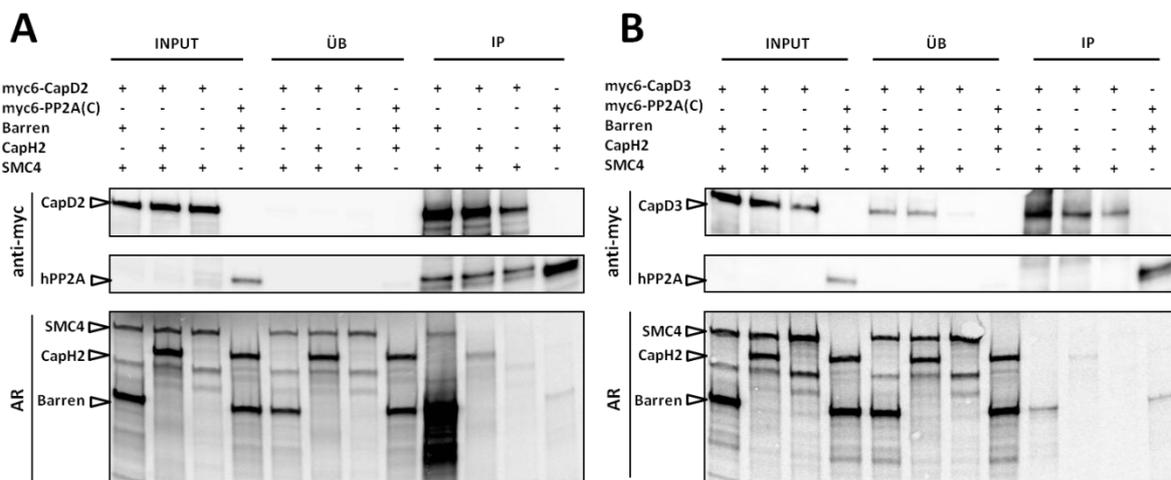


Abbildung 30: Die Interaktion von CapD2 und SMC4 wird durch Barren stimuliert. SMC4, CapH2 und Barren wurden in Gegenwart von [³⁵S]Methionin *in vitro* kotranslatiert. Die myc-markierten Proteine myc-CapD2 (**A**) und myc-CapD3 (**B**) wurden ebenso *in vitro* translatiert, allerdings in Abwesenheit von [³⁵S]. Die Reaktionen wurden entsprechend gemischt und unter Verwendung von Maus-anti-myc-Sepharose immunpräzipitiert. Proben der Reaktionen vor Präzipitation (INPUT), Überstand (ÜB) und Elution (IP) wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Um die Effizienz der Immunpräzipitation zu bestimmen, wurden die Westernblots zunächst mit Maus-anti-myc Antikörpern sondiert. Durch die Autoradiografie der Blots (AR) konnte eine mögliche Kopräzipitation der radioaktiv markierten Untereinheiten untersucht werden.

Die eingesetzten Proteine wurden wiederum getrennt translatiert, anschließend gemischt und einer Präzipitation an Maus-anti-myc-Sepharose unterzogen. Die Effizienz der Präzipitationen wurde durch Westernblots unter Verwendung von Maus-anti-myc-Antikörpern gezeigt. In Abbildung 30A sind in allen Präzipitaten (IP) Banden im Molekulargewichtsbereich von myc-PP2A(C) erkennbar. Da diesen Reaktionen kein myc-PP2A(C) zugesetzt wurde (INPUT), sollte es sich hierbei um Abbauprodukte von myc-CapD2 handeln. Die Autoradiografie beider Blots macht wiederum eine gewisse Kopräzipitation von Barren durch die Negativkontrolle myc-

PP2A(C) deutlich. Verglichen zu dieser unspezifischen Präzipitation kann allerdings eine starke Kopräzipitation von Barren durch myc-CapD2 (Abbildung 30A), nicht aber durch myc-CapD3 (Abbildung 30B) beobachtet werden. Ebenso wurde die Bildung eines ternären Komplexes zwischen myc-CapD2, Barren und SMC4 ermöglicht (Abbildung 30A), was der bisherigen Modellvorstellung eines Condensin I-Komplexes entsprechen würde. Eine nachweisbare Präzipitation von SMC4 durch myc-CapD3 konnte durch Barren nicht verbrückt werden (Abbildung 30B). Auch CapH2 wurde durch myc-CapD2 präzipitiert, konnte aber keine nachweisbare Interaktion mit SMC4 vermitteln (Abbildung 30A). Ebenso konnte durch die wenig stringente Interaktion von CapH2 mit CapD3 keine, dem Modell des Condensin II-Komplexes entsprechende, Präzipitation mit SMC4 verbrückt werden.

In den durchgeführten Experimenten konnte die bisherige Modellvorstellung des Condensin I-Komplexes auch in der Fliege bestätigt werden. Es wurde ebenso eine schwache direkte Interaktion der Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapH2 und CapD3 gezeigt. Überraschend wurde eine vergleichsweise schwache Interaktion auch zwischen Condensin I und Condensin II-spezifischen Komponenten beobachtet. Da die Bildung eines ternären Komplexes von SMC4, CapH2 und CapD3 jedoch nicht stimuliert werden konnte, muss die Existenz eines löslichen Condensin II-Komplexes in *D. melanogaster* erneut in Frage gestellt werden.

3. Diskussion

3.1. Die Domänenstruktur von CapG in *D. melanogaster*

Die Condensine sind hoch konservierte Proteinkomplexe, die für die akkurate Segregation der Chromosomen während der Zellteilung essentiell sind (zusammengefasst in Hudson et al. (2009). Obwohl in höheren Eukaryoten zwei dieser Komplexe an der Chromosomenorganisation beteiligt sind (Hirano et al., 1997; Ono et al., 2003; Yeong et al., 2003), kann diese in *D. melanogaster* hauptsächlich durch den Condensin I-Komplex vermittelt werden. In diesem Organismus konnten speziell für die Condensin I-Untereinheit CapG sehr charakteristische Merkmale beschrieben werden. So ist CapG bereits während der Interphase hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und zum Zeitpunkt des NEBD bereits vollständig am Chromatin angelagert (Nagarkar, 2010). Es konnte außerdem eine Funktion von CapG bei der Regulation der Genexpression während der Interphase (Cobbe et al., 2006; Dej et al., 2004) und auch bei der Disassemblierung des Synaptonemalen Komplexes während der Meiose gezeigt werden (Resnick et al., 2009).

Durch diese Arbeit konnte schließlich ein Modell der Domänenstruktur von CapG erarbeitet werden. So wurden im C-terminalen Bereich von CapG viele Regulationselemente des Proteins identifiziert. Erstaunlicherweise ist aber ein Proteinfragment, das die N-terminalen zwei-Drittel von CapG ohne den C-Terminus enthält, alleine in der Lage, die Funktion von CapG vom Beginn der embryonalen zygotischen Expression bis hin zum adulten Tier zu gewährleisten. Die N-terminalen zwei-Drittel sind sowohl für die Interaktion mit den weiteren Condensin-Untereinheiten als auch für die Chromatinassoziation während der Metaphase essentiell (Abbildung 31). Weiterhin sollte die Lokalisation von CapG während der Interphase durch eine Wechselwirkung von Kernimport- und Kernexportsequenzen reguliert werden. Hierbei sind die durch Computer-gestützte Programme vorhergesagten Kernimportsequenzen innerhalb des C-Terminus konsistent mit dem beobachteten Lokalisationsverhalten der EGFP-markierten Deletionskonstrukten von CapG. Im Bereich der N-terminalen zwei-Drittel könnte neben der durch PSORT vorhergesagten Exportsequenz an Aminosäureposition 898 noch eine weitere Kernexportsequenz lokalisiert sein, da auch Proteinfragmente, die diesen Aminosäurebereich nicht enthalten, während der Interphase hauptsächlich im Zytoplasma angereichert vorliegen.

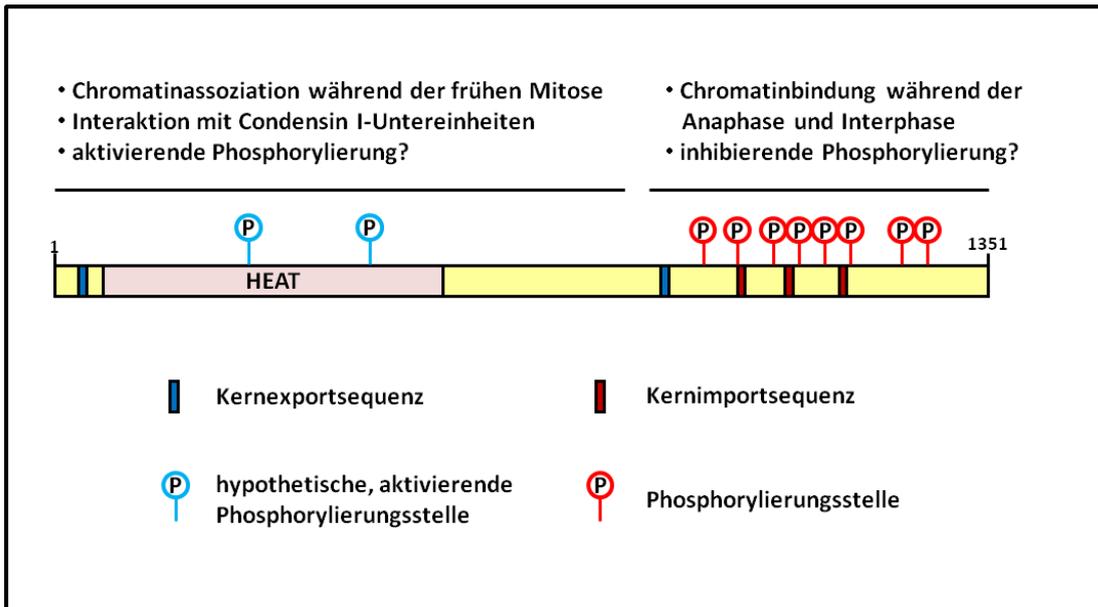


Abbildung 31: Modell der Domänenstruktur von CapG. Im Bereich der N-terminalen zwei-Drittel befinden sich durch PSORT vorhergesagte *HEAT-Repeats* (rosa Balken), welche Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Dieser Bereich ist sowohl für die Interaktion mit den weiteren Condensin-Untereinheiten als auch für die Chromatinassoziation während der Mitose essentiell. Es könnten hier weiterhin Kernexportsignale (blaue Balken) sowie aktivierende Phosphorylierungsstellen lokalisiert sein. Im C-Terminus befinden sich Kernimportsequenzen (rote Balken), welche durch Computer-gestützte Programme vorhergesagt und auch konsistent mit dem Lokalisationsverhalten der in dieser Arbeit untersuchten EGFP-markierten CapG-Fragmente sind. Weiterhin konnte herausgearbeitet werden, dass die Phosphorylierung von CapG hauptsächlich im C-terminalen Bereich des Proteins stattfindet. Der C-Terminus vermittelt außerdem eine Chromatinbindung während der Interphase, welche unabhängig von den weiteren Condensin-Untereinheiten stattfinden kann.

3.2. CapG liegt während der Interphase am Heterochromatin lokalisiert vor

Alternativ zur Chromatinassoziation während der frühen Mitose, welche wahrscheinlich durch die Interaktion mit den anderen Condensin I-Untereinheiten vermittelt wird, scheint der C-Terminus von CapG eine direkte Chromatinbindung zu ermöglichen. So findet die Anlagerung von CapG^C-EGFP und CapG^{MC}-EGFP am Chromatin erst im Verlauf der Anaphase statt, wenn das endogene CapG, Barren und auch CapD2 bereits vom Chromatin dissoziieren (Fischer, 2010; Nagarkar, 2010; Oliveira et al., 2007). CapG^C-EGFP ist außerdem nur sehr schwach zu einer Interaktion mit den anderen Condensin I-Untereinheiten befähigt, was mit der Chromatinbindung dieses Fragments während der Anaphase unabhängig von einem vollständigen Condensin-Komplex konsistent ist. Auch für das humane CapD2 konnte eine Condensin-unabhängige Chromatinlokalisierung gezeigt werden, die durch eine chromosomale *targeting*-Domäne im C-terminalen Bereich des humanen Proteins ermöglicht wird. Diese Domäne vermittelt eine Lokalisation des hCapD2 durch Interaktion mit den Histonen H1 und H3 und ist nicht an der Ausbildung eines Condensin-Komplexes beteiligt (Ball et al., 2002). Weiterhin konnte sowohl in *S. pombe* als auch in HeLa-Zellen eine direkte Bindung der Kleisin-

Untereinheiten Cnd2 bzw. CapH an die Histone H2A und H2A.Z gezeigt werden. Diese Bindung findet in diesen Systemen, vermittelt durch Aurora B-abhängige Phosphorylierung der Condensin-Untereinheiten während der Mitose statt (Tada et al., 2011). Analog könnte auch der C-Terminus von CapG in *D. melanogaster* Bereiche enthalten, welche eine Condensin-unabhängige Chromatinbindung ermöglichen. Eine Interaktion von CapG mit Histonproteinen konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationsexperimente nicht belegt werden, was allerdings drauf zurückzuführen sein sollte, dass diese Immunpräzipitationen mit löslichen Proteinextrakten vorgenommen wurden.

Bereits in früheren Studien wurde eine Funktion von CapG bei der Strukturierung des Heterochromatins während der Interphase beschrieben (Dej et al., 2004). Da Heterochromatinbereiche reich an Transposon-Elementen sind, werden sie großteils transkriptionsinaktiv gehalten, um eine genetische Stabilität zu gewährleisten. Eine wichtige Komponente des Heterochromatins ist HP1. HP1, das in der Fliege durch *Su(var)2-5* kodiert wird, hat hier einen Einfluss auf die durch die Struktur des Heterochromatins vermittelte Regulation der Genexpression unmittelbar benachbarter Chromatinbereiche (PEV). Nach Mutation von *Su(var)2-5*, konnte eine starke Suppression der PEV festgestellt werden, wodurch eine Expression PEV-regulierter Gene ermöglicht wird. Eine erhöhte Expression des *Su(var)2-5* hingegen verstärkt die durch PEV vermittelten Effekte, regulierte Gene werden transkriptionsinaktiv gehalten (Eissenberg et al., 1990). Auch für heterozygot *CapG*-mutante Fliegen konnte eine Suppression der PEV-vermittelten Effekte gezeigt werden (Dej et al., 2004). So könnte auch CapG benötigt werden, um Bereiche des Heterochromatins in einem transkriptionsinaktiven Zustand zu halten. Konsistent hierzu wurde in dieser Arbeit eine distinkte Kollokalisierung von CapG^{FL}-EGFP und CapG^C-EGFP mit HP1 am Heterochromatin während der Interphase des Zellzyklus 14 in lebenden Embryonen gezeigt. CapG^C-EGFP zeigt, wahrscheinlich aufgrund fehlender Kernexportsequenzen, eine deutlichere Kernlokalisierung während der Interphase als CapG^{FL}-EGFP. Interessant ist weiterhin, dass auch die lokalen Chromatinanreicherungen von CapG^C-EGFP viel intensiver und deutlicher sind als die von CapG^{FL}-EGFP. Der C-Terminus von CapG ist somit offensichtlich ausreichend, um eine Heterochromatinbindung während der Interphase zu vermitteln. Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, ob eine entsprechende Chromatinbindung auch durch die N-terminalen zwei-Drittel von CapG ermöglicht wäre, da dieses Proteinfragment während der Interphase im Zytoplasma lokalisiert ist. In weiteren Analysen könnte durch das Anbringen einer

Kernimportsequenz an CapG^{NM}-EGFP dessen Kernlokalisierung während der Interphase erzwungen und eine Kollokalisierung mit HP1 untersucht werden.

Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass in den *UAST-CapG^C-EGFP* exprimierenden Embryonen alle lokal konzentrierten Bereiche von mRFP1-HP1 eine Kollokalisierung mit CapG^C-EGFP aufweisen. Durch CapG^C-EGFP könnten aufgrund der verstärkten Präsenz eventuell weitere Bereiche des Heterochromatins umstrukturiert werden, was indirekt eine Lokalisierung von HP1 ermöglichen würde. Alternativ könnte CapG auch eine direkte, rekrutierende Funktion auf HP1 ausüben. Da durch HP1 die Assemblierung und auch Ausbreitung von Heterochromatinbereichen gesteuert werden kann (Talbert und Henikoff, 2006), sollten diese in den entsprechenden Embryonen vermehrt auftreten. Diese Hypothese könnte analog zu den Arbeiten von Dej et al., 2004 und Cobbe et al., 2005 durch weiterführende PEV-Analysen untersucht werden. Nach Expression von *UAST-CapG^C-EGFP* sollten die PEV-vermittelten Effekte hierbei verstärkt werden.

CapG ist im Gegensatz zu den weiteren Condensin I-Untereinheiten bereits während der Interphase im Kern lokalisiert. Durch FRAP-Analysen wurde außerdem gezeigt, dass CapG während der Mitose stabiler am Chromatin gebunden ist als Barren und CapD2 (Fischer, 2010; Nagarkar, 2010; Oliveira et al., 2007). Man könnte also spekulieren, dass ein gewisser Anteil von CapG während des gesamten Zellzyklus am Heterochromatin lokalisiert verbleibt, um als *Docking-site* des Condensin-Komplexes während der Mitose zu fungieren. Ein Großteil des Heterochromatins ist perizentrisch und trägt zur Ausbildung der Zentromere der Chromosomen bei. Während der Mitose erscheinen CapG, Barren und CapD2 tatsächlich zuerst an den Zentromeren angereichert und danach entlang der Chromosomenarme verteilt (Fischer, 2010; Nagarkar, 2010; Oliveira et al., 2007). Konsistent zu dieser Hypothese konnte während dieser Arbeit keine Delokalisierung von CapG^{FL}-EGFP vom Chromatin von der Interphase bis hin zur Prophase beobachtet werden. Die konzentrierten Bereiche von CapG^{FL}-EGFP bleiben von der Interphase bis zur beginnenden Chromosomenkondensation in der Prophase erhalten. Auch nach der Anaphase kann keine gleichmäßige Verteilung von CapG^{FL}-EGFP im Zellkern beobachtet werden. Vielmehr verbleiben lokale Anreicherungen, an denen auch eine Kollokalisierung mit mRFP1-HP1 stattfindet.

Beginnend von der zygotischen Entwicklung der Embryonen bis hin zum adulten Tier kann die Funktion von CapG allein durch die N-terminalen zwei-Drittel des Proteins gewährleistet werden. Da das entsprechende Proteinfragment CapG^{NM}-EGFP während der Interphase allerdings vorrangig im Zytoplasma lokalisiert, sollten sowohl eine mögliche CapG-abhängige Regulation

der Chromatinstruktur als auch die initiale Rekrutierung der anderen Condensin-Untereinheiten während dieser Entwicklungsstadien nicht essentiell sein.

3.3. Regulation von CapG durch graduelle Phosphorylierung

Es wurde in der Literatur ein Modell vorgeschlagen, nachdem die Aktivität der Condensin-Komplexe während des Zellzyklus durch graduelle Phosphorylierung der einzelnen Untereinheiten in drei Stufen reguliert wird (Bazile et al., 2010). Da die mitotischen Funktionen des Condensin-Komplexes während der Interphase inaktiviert werden müssen, werden hier einzelne Untereinheiten durch Phosphorylierungen inhibiert. In Einklang mit diesem Modell könnte auch in *D. melanogaster* die Aktivität von CapG durch Phosphorylierung während der Interphase inhibiert werden. So konnte während dieser Arbeit gezeigt werden, dass CapG in nicht Zellzyklus-synchronen Embryonen bereits phosphoryliert vorliegt, in der Metaphase aber noch weiter phosphoryliert werden kann. Zusätzliche aktivierende Phosphorylierungen während der Mitose könnten auch im Bereich der N-terminalen zwei-Drittel stattfinden. So wurden für das humane CapG zwei Threoninreste im N-terminalen Bereich beschrieben, die durch Cdk1/Cyclin B phosphoryliert werden können, und welche für die Chromatinlokalisierung des hCapG während der Mitose essentiell sind (Murphy und Sarge, 2008). Es wurde eine evolutionäre Konservierung dieser Threoninreste auch im N-terminalen Bereich von CapG von *D. melanogaster* gezeigt (Bazile et al., 2010). Diese Threonine (Positionen 349 und 376) wurden durch SCANSITE und NETPHOS allerdings nicht als Phosphorylierungsstellen vorhergesagt. Außerdem konnte im hier durchgeführten Phosphatase-Assay keine experimentelle Evidenz für eine Phosphorylierung der N-terminalen zwei-Drittel von CapG gefunden werden. Um eine Mitose-spezifische Phosphorylierung von CapG^{NM}-EGFP abschließend zu untersuchen, sollten *UAST-CapG^{NM}-EGFP* exprimierende Embryonen während der Metaphase arretiert und das Laufverhalten deren Proteine durch SDS-Gelelektrophorese analysiert werden. Weiterhin könnten die dem humanen CapG homologen Threoninreste zu nicht phosphorylierbaren Aminosäureresten mutiert und transgene Fliegen erzeugt werden, in denen das Auftreten eventueller Phänotypen nach Expression dieses modulierten Proteins untersucht werden könnte.

3.4. Biologische Funktionalität der N-terminalen zwei-Drittel von CapG

Die biologische Funktionalität von CapG^{NM}-EGFP vom Beginn der embryonalen zygotischen Expression bis hin zum adulten Stadium könnte schließlich durch die Abwesenheit inhibitorischer Phosphorylierungsstellen im Zusammenspiel mit der zytoplasmatischen Lokalisation während der Interphase erklärt werden. Eine durch Phosphorylierung vermittelte Inhibition von CapG^{NM}-EGFP wäre nicht nötig, da das Proteinfragment während der Interphase nicht zum Chromatin gelangen kann. Nach dem NEBD muss folglich auch keine Dephosphorylierung der inhibitorischen Phosphorylierungen stattfinden, wodurch das Proteinfragment schneller aktiviert werden könnte. Da CapG^{NM}-EGFP während der Interphase vorrangig im Zytoplasma lokalisiert ist, wäre auch die Komplexbildung des Condensin I bereits hier ermöglicht. Die Assemblierung des Condensin an das mitotische Chromatin könnte somit durch den Komplex als Ganzes erfolgen und daher eventuell schneller und effektiver verlaufen. Alternativ könnte die Phospho-Regulation des Condensin-Komplexes auch zusätzlich durch die weiteren Condensin-Untereinheiten vermittelt werden. So konnten auch in *S. cerevisiae* nach Mutation entsprechender Phosphorylierungsstellen einzelner Condensin-Untereinheiten keine Wachstumsdefekte der Hefen festgestellt werden. Die Kombination phosphomutanter Allele zweier verschiedener Condensin-Untereinheiten war jedoch letal (St-Pierre et al., 2009). Weiterhin könnten sterische Effekte durch die C-terminal angefügte EGFP-Markierung ausgeglichen werden, durch die das CapG^{NM}-EGFP Fusionsprotein (1216 Aminosäuren) ähnlich viele Aminosäuren enthält, wie das endogene Protein (1351 Aminosäuren). Die EGFP-Markierung könnte somit auch einen Einfluss auf die Tertiärstruktur von CapG^{NM}-EGFP ausüben und zur Proteinfunktion von CapG beitragen.

Interessant wäre es, in folgenden Analysen einerseits die Funktionalität eines nicht EGFP-markierten CapG^{NM} zu untersuchen oder andererseits die Kernlokalisierung von CapG^{NM} während der Interphase durch Einbringen von Kernlokalisationssequenzen zu erzwingen.

3.5. Die initiale Chromatinassoziation von CapG muss nicht zwingend am Zentromer stattfinden

Bisherige Beobachtungen lassen ein Modell zu, nachdem der Condensin-Komplex vorerst am Zentromer konzentriert wird und sich anschließend entlang der Chromosomenarme ausbreitet. Demnach sollte die Beladung der Condensin-Untereinheiten zwingend am Zentromer initiiert sein. Durch CapG^{NM}-EGFP kann allerdings eine Entwicklung der Embryonen vom Beginn der

embryonalen zygotischen Expression bis hin zum adulten Stadium gewährleistet werden. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Chromatinassoziation von CapG vor dem NEBD während dieser Entwicklungsstadien nicht essentiell für dessen Proteinfunktion ist und auch nicht am Zentromer initiiert werden muss. Vielmehr konnte eine sehr schnelle und vor allem gleichmäßige Anlagerung von CapG^{NM}-EGFP entlang der gesamten Chromosomen gezeigt werden.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass CapD2 und Barren zum Zeitpunkt des NEBD etwa halbmaximal am Chromatin angelagert sind (Fischer, 2010; Oliveira et al., 2007). So könnte die Assemblierung eines Prä-Condensin-Komplexes während der Prophase in Abwesenheit von CapG stattfinden und CapG^{NM}-EGFP dann nach dem NEBD direkt entlang der gesamten Chromosomen an diesem Prä-Komplex assemblieren. Alternativ wäre eine Beladung des gesamten Condensin-Komplexes, der schon im Zytoplasma assembliert sein könnte, erst nach dem NEBD ermöglicht. Diese wäre dann nicht mehr am Zentromer initiiert. Die Lokalisation von CapG^{NM}-EGFP wurde in den hier durchgeführten Experimenten durch eine *α4tub-Gal4-VP16* vermittelte Expression des *UAST-CapG^{NM}-EGFP^{III.2}* Transgens in *CapG*-wildtypischen Fliegen analysiert. Die verspätete Lokalisation von CapG^{NM}-EGFP könnte daher auch entlang der Chromosomenarme an assemblierte Condensin-Komplexe durch einen Austausch von bereits Condensin-gebundenem endogenem CapG mit ungebundenem CapG^{NM}-EGFP erfolgen. Durch FRAP-Analysen wurde allerdings gezeigt, dass CapG recht stabil am Chromatin assoziiert bleibt und nur etwa 17,5% des Proteins während der Metaphase gegen mobiles CapG ausgetauscht werden (Nagarkar, 2010).

Um abschließend festzustellen, ob eine Beladung von CapG über das Zentromer stattfinden muss, sollte die Assoziation von CapG^{NM}-EGFP am Chromatin in *CapG*-mutanten Fliegenembryonen während der Mitose 16 untersucht werden, wenn die maternale Kontribution des endogenen CapG aufgebraucht ist. In diesen Embryonen könnte durch die Analyse der Chromatinassoziation anderer Epitop-markierter Condensin-Untereinheiten auch geklärt werden, ob deren initiale Chromatinbeladung auch ohne CapG am Zentromer initiiert werden kann.

3.6. Die Expression verkürzter CapG^{NM}-EGFP Transgene führt zu SAC-vermittelter Verzögerung der Mitose

Obwohl dem Condensin eine wesentliche Rolle bei der Strukturierung des Zentromerbereichs der Chromosomen zugesprochen wird (siehe 1.3.5), ist die Aktivierung des SAC nach Mutation der Condensin-Untereinheiten fraglich. Während in *S. cerevisiae* eine Aktivierung und

Aufrechterhaltung des SAC in Condensin-Mutanten stattfindet (Yong-Gonzalez et al., 2007), ist die Erhaltung der SAC-Aktivität in SMC2-depletierten Humanzellen nicht gewährleistet (Samoshkin et al., 2009). Im hier durchgeführten Experiment konnte eine Aktivierung des SAC nicht nach Abreicherung der Condensin-Untereinheiten, sondern durch ektopische Expression verkürzter Fragmente von CapG zusätzlich zu dem endogenen *CapG* beobachtet werden. Während CapG^{NM}-EGFP im Condensin-Komplex angelagert werden kann, könnte eine Assemblierung der verkürzten Fragmente im Condensin-Komplex nicht ermöglicht sein. Konsistent hierzu konnten SMC2, SMC4, Barren und CapD2 durch CapG^{NM}-EGFP, nicht aber durch CapG^{NM4}-EGFP präzipitiert werden. So könnten die verkürzten CapG^{NM}-EGFP-Fragmente nach ektopischer Expression in der Zelle angereichert vorliegen und dominant-negative Effekte hervorrufen. Es wurde bereits eine direkte Interaktion der Zentromer-spezifischen Histonkomponente CID mit CapG gezeigt, die hauptsächlich durch den N-terminalen Bereich von CapG vermittelt wird (Jäger et al., 2005). Der Einbau von CID in das zentromere Chromatin, der bereits während der Metaphase stattfinden kann (Mellone et al., 2011), könnte hierbei durch eine Interaktion mit den verkürzten CapG^{NM}-EGFP Fragmente behindert sein. Demzufolge könnte das zentromere Chromatin fehlerhaft definiert werden und letztlich eine Situation entstehen, die eine Aktivierung des SAC hervorruft. Alternativ könnten durch weitere dominant-negative Effekte, Komponenten, die zur Regulation der SAC-Proteine nötig sind, behindert werden. Der verzögerten Metaphase schloss sich allerdings eine apparent normale Anaphase an. Es konnten somit keine weiteren zytologischen Effekte nach Überexpression der verkürzten CapG-Fragmente beobachtet werden. Allerdings wurden nach gewebspezifischer ektopischer Expression dieser Fragmente im sich entwickelnden Auge durchaus offensichtliche Phänotypen verzeichnet (Frank, 2008).

3.7. CapG liegt in der Fliege in verschiedenen Isoformen vor, welche gleichermaßen durch Phosphorylierung reguliert werden

In Proteinextrakten aus wildtypischen Embryonen und Ovarien konnten im Immunblot jeweils zwei Banden im erwarteten Größenbereich von CapG detektiert werden, die nicht auf alternative Spleißereignisse der *CapG*-prä-mRNA zurückzuführen sind. Es konnte allerdings weder eine Zellzyklus-spezifische Funktion noch eine unterschiedliche Phospho-Regulation der beiden Isoformen in Embryonen nachgewiesen werden. In Proteinextrakten aus Hoden konnte im Immunblot hingegen nur eine Bande für CapG nachgewiesen werden, welche wiederum einen modifizierten Gellauf verglichen zu den Isoformen der Embryonen und Ovarien aufweist.

In der Fliege sollten also verschiedene Isoformen von CapG vorliegen, welche auf einer Modifikation des Proteins beruhen. Beachtlich ist hierbei, dass die entsprechende Modifikation in Embryonen und Ovarien eine erhöhte Mobilität von CapG während der SDS-Gelelektrophorese hervorruft. So könnte CapG beispielsweise proteolytisch prozessiert werden. Eine entsprechende Prozessierung sollte allerdings intern stattfinden, da die Doppelbande zum einen durch polyklonale Antikörper detektiert werden kann, welche gegen den N-Terminus von CapG generiert wurden (Kaninchen-anti-CapG(N)). Zum anderen werden auch C-terminale CapG-Fusionsproteine durch Antikörper, welche gegen die C-terminale Markierung gerichtet sind, als Doppelbande detektiert. Auch für das cDNA-basierte CapG^{NM}-EGFP, nicht aber CapG^{FL}-EGFP, konnte sowohl durch Sondierung mit anti-EGFP als auch mit anti-CapG(N) Antikörpern, eine Doppelbande im Immunblot nachgewiesen werden. Würde bei dem kleineren CapG^{NM}-EGFP eine analoge hypothetische proteolytische Prozessierung vorliegen wie bei dem genomischen Konstrukt voller-Länge, würde man erwarten, dass der Abstand der beiden Proteinbanden im Gel vergrößert wird. Der Abstand beider CapG^{NM}-EGFP Banden ist allerdings geringer als der, der beiden Banden des endogenen CapG, was wiederum gegen eine proteolytische Modifikation von CapG spricht. Da die generierten *UAST-CapG^{NM}-EGFP*-Transgeninsertionen die Proteinfunktion von CapG vom Beginn der embryonalen zygotischen Expression bis hin zum adulten Stadium besser komplementieren können als die *UAST-CapG^{FL}-EGFP*-Transgeninsertionen, könnte die besagte Modifikation dennoch einen Einfluss auf die Funktionalität von CapG haben. Die molekulare Grundlage dieser Modifikation sollte daher in weiterführenden Experimenten näher untersucht werden.

3.8. Lokalisation und Funktion von CapG in weiblichen Fortpflanzungsorganen

Es konnte eine spezifische Lokalisation von CapG in den Kernen der Zellen des Germariums, der Nährzellen, der Follikelzellen und auch der Grenzzellen gezeigt werden, was auf eine Funktion des Proteins in diesen Zellkernen hinweist. Außerdem sind Weibchen, welche *UAST-CapG^{NM}-EGFP* (*CapG^{NM}-Rescue*) oder auch *UAST-CapG^{FL}-EGFP* (*CapG^{FL}-Rescue*) als alleinig funktionelle *CapG*-Allele vermittelt durch *da-Gal4* exprimieren steril, was darauf zurückzuführen ist, dass *UAST*-Konstrukte in der weiblichen Keimbahn nicht exprimiert werden (Brand und Perrimon, 1993; Rorth, 1998). Da in diesen Weibchen jedoch die Expression von *CapG^{NM}-EGFP* bzw. *CapG^{FL}-EGFP* durch den ubiquitären Gal4-Treiber (*da-Gal4*) in den somatischen Geweben gewährleistet ist, kann hier die Konsequenz der kompletten Abwesenheit von CapG während der Oogenese

studiert werden. In Weibchen, welche spezielle hypomorphe *CapG*-Allele tragen, die ebenfalls zu weiblicher Sterilität führen, wurde eine verzögerte Disassemblierung des SC beschrieben (Resnick et al., 2009). In den hier untersuchten *CapG^{NM}-Rescue* und *CapG^{FL}-Rescue*-Weibchen konnte jedoch sowohl eine akkurate Assemblierung als auch Disassemblierung des SC beobachtet werden, was eine gestörte Struktur des SC als Grund für die Sterilität unwahrscheinlich macht. Weiterhin interessant schien die Lokalisation von CapG im Kern der postmitotischen Grenzzellen. Trotz der vorrangig zytoplasmatischen Lokalisation von CapG^{NM}-EGFP in den Grenzzellen der *CapG^{NM}-Rescue*-Weibchen, konnten allerdings keine Auffälligkeiten bezüglich der Anzahl, Gruppierung oder Migration dieser Zellen beobachtet werden. Außerdem waren die Eier der *CapG^{NM}-Rescue*-Weibchen befruchtungsfähig, was insgesamt gegen eine beeinträchtigte Funktion der Grenzzellen in den *CapG^{NM}-Rescue*-Weibchen spricht. Somit konnten bisher keine spezifischen Phänotypen innerhalb der weiblichen Keimbahn nach Abreicherung von CapG herausgearbeitet werden. Es ist möglich, dass CapG in späten Stadien der Oogenese, z.B. bei den meiotischen Teilungen nach der Befruchtung eine Rolle spielt. Die geringe Anzahl von reifen Oozyten und abgelegten Eiern in den *CapG^{NM}-Rescue*- und *CapG^{FL}-Rescue*-Weibchen haben eine genaue Analyse dieser Prozesse nicht ermöglicht.

Weiterhin konnte, bedingt durch die Verwendung von UAST-Konstrukten, nicht untersucht werden, ob die N-terminalen zwei-Drittel von CapG auch die Funktionalität von CapG während der Oogenese gewährleisten können. Um diese Frage zu beantworten, sollte das entsprechende CapG^{NM}-EGFP-Fragment unter Kontrolle der *CapG*-regulatorischen genomischen Sequenzen exprimiert, oder in einen UASP-Vektor kloniert werden. Der UASP-Vektor enthält eine modifizierte UAS-Expressionskassette, die auch in der weiblichen Keimbahn aktiviert werden kann (Rorth, 1998). Durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation könnten entsprechende Konstrukte in das Fliegen-genom eingebracht und schließlich die Funktionalität von CapG^{NM}-EGFP in *CapG*-mutanten Fliegenweibchen untersucht werden. Die durch diese Weibchen eventuell abgelegten Eier würden es schließlich auch erlauben, eine Funktionalität von CapG^{NM}-EGFP in den frühen syncytialen Teilungen zu untersuchen. Die subzelluläre Lokalisation oder auch Phospho-Regulation von CapG könnte nämlich durchaus wichtig sein, um die schnellen Zyklen im Syncytium zu erlauben. Durch analoge Analysen entsprechend nicht-EGFP-markierter CapG^{NM}-Konstrukte könnte auch hier der Einfluss der EGFP-Markierung untersucht werden.

3.9. Lokalisation von CapG und CapD2 in männlichen Fortpflanzungsorganen

Da transheterozygot *CapD3*-mutante Fliegenmännchen steril sind (Savvidou et al., 2005) und außerdem eine Funktion von CapH2 und CapD3 bei der Ausbildung der Chromosomenterritorien in den primären Spermatozyten gezeigt werden konnte (Hartl et al., 2008b), wurde bisher vermutet, dass dem Condensin II-Komplex speziell eine Rolle während der Spermatogenese von *D. melanogaster* zukommen sollte. Hingegen wurde die Lokalisation der Condensin I-Untereinheiten in den Hoden von Fliegenmännchen in der hier durchgeführten Arbeit erstmals beschrieben. Während eine Lokalisation von CapG in den Zellkernen der apikalen Hodenspitze gezeigt werden konnte, war diese in den primären Spermatozyten nicht nachweisbar. Das deutet eher auf eine Rolle von CapG während der mitotischen gonialen Teilungen, als eine Beteiligung des Proteins an der Ausbildung der Chromosomenterritorien in den Kernen der primären Spermatozyten im Zusammenspiel mit CapH2 und CapD3 hin.

Überraschend konnte aber eine Anreicherung von CapG am Chromatin der reifenden Spermatidenkerne gezeigt werden. Eine sehr ausgeprägte Lokalisation zeigt sich hier auch für CapD2, das dem Chromatin stabförmig aufzuliegen scheint. Die unterschiedlichen Lokalisationsmuster beider Proteine könnten dadurch erklärt werden, dass im ersten Fall die Autofluoreszenz von CapG-EGFP zusammen mit der von His-2AvD-mRFP1 und im zweiten Fall anti-CapD2 über indirekte Immunfluoreszenz zusammen mit der DNA-Färbung durch Hoechst 33258 analysiert wurde. So muss in weiterführenden Experimenten die Spezifität des anti-CapD2-Antikörpers in männlichen Hoden gezeigt werden, die während dieser Arbeit nicht überprüft wurde. Weiterhin könnte die Kolo-kalisation zweier unterschiedlich Epitop-markierter Condensin-Untereinheiten in diesem Gewebe untersucht werden.

Damit das Chromatin in den reifen Spermien hoch kompaktiert und transkriptionsinaktiv vorliegen kann, muss es während der Spermatidenreifung reorganisiert werden. Da entsprechende Funktionen für den Condensin-Komplex in anderen Geweben bereits gezeigt werden konnten, könnten CapG und CapD2 entweder unabhängig oder innerhalb eines Condensin-Komplexes zur Reorganisation des Spermatidenchromatins und somit zur Ausbildung des reifen Spermienchromatins beitragen. Durch spezifische Abreicherung der Proteine in den Hoden der Fliegen und Analyse auftretender Phänotypen könnten entsprechende Funktionen der Condensin-Untereinheiten weiterführend untersucht werden.

3.10. Genetische Interaktion von CapG, CapH2 und CapD3

Während je drei nicht SMC-Untereinheiten beider Condensin-Komplexe in Vertebraten (Ono et al., 2003; Yeong et al., 2003), Pflanzen (Fujimoto et al., 2005) und auch *C. elegans* (Csankovszki et al., 2009) beschrieben werden konnten, wurde in *D. melanogaster* bisher kein CapG2-Homolog identifiziert. So wurde bereits spekuliert, dass CapG analog zu den SMC-Untereinheiten, in beiden Condensin-Komplexen der Fliege assembliert werden kann (Longworth et al., 2008; Resnick et al., 2009).

Für die Condensin II-spezifischen Untereinheiten von *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass diese eine Disassemblierung von polytänen Chromatinstrukturen vermitteln können. So persistiert das polytäne Chromatin der ovariellen Nährzellkerne in *CapH2*- und auch *CapD3*-mutanten Fliegenweibchen bis hin zum Entwicklungsstadium 10 (Hartl et al., 2008a). Während dieser Arbeit konnte nach Abreicherung von CapG innerhalb der Nährzellkerne hingegen keine verzögerte Disassemblierung des Chromatins beobachtet werden. In den hierbei analysierten *CapG^{NM}-Rescue*-Weibchen wird die Funktion von CapG allein durch die *CapG^{NM}-EGFP*-Transgeninsertion vermittelt, die allerdings bei den verwendeten Expressionssystemen in den Keimbahngeweben, zu denen auch die Nährzellen gehören, nicht exprimiert wird. Somit sprechen diese Resultate zunächst gegen eine Rolle von CapG bei der Disassemblierung des Nährzellchromatins. Durch genetische Interaktionsanalysen konnte hingegen gezeigt werden, dass CapH2, CapD3 und CapG eine gemeinsame Funktionalität zur Disassemblierung des Nährzellchromatins auszuüben scheinen. So wurde der polytäne Phänotyp des Nährzellchromatins sowohl in transheterozygot *CapD3*-mutanten Weibchen, als auch in transheterozygot *CapH2*-mutanten Weibchen durch das Einbringen eines zusätzlich *CapG*-mutanten Allels weiter verstärkt. Fraglich bleibt, ob CapG, CapH2 und CapD3 eine Funktion als Untereinheiten innerhalb eines Condensin II-Komplexes vermitteln oder ob CapG unabhängig von einem Condensin II-Komplex eine Funktion zur Chromatinreorganisation ausübt.

CapG vermittelt klar eine Proteinfunktion auch innerhalb des Condensin I-Komplexes. Da Mutanten in den Genen für die Condensin I-spezifischen Komponenten früh in der Entwicklung sterben, konnten bisher keine Phänotypen bezüglich der Morphologie des Nährzellchromatins in Condensin I-Mutanten untersucht werden. Weiterführend könnte aber in einem analogen Experiment die Polytanie des Nährzellchromatins in transheterozygot *CapH2*- oder *CapD3*-mutanten Fliegen nach Einbringen eines zusätzlichen *Barren*- oder *CapD2*-mutanten Allels untersucht werden.

Während in *CapH2*-mutanten Ovarien der polytäne Status des Nährzellchromatins länger als normal persistiert, kann in einem komplementären Ansatz durch die Überexpression von *CapH2* in den normalerweise polytänen larvalen Speicheldrüsenzellen eine Disassemblierung des Chromatins induziert werden (Hartl et al., 2008a). Wäre *CapH2* in einem Condensin II-Komplex aktiv, sollten die weiteren Condensin II-Untereinheiten im Überschuss vorhanden sein. Konsistent mit dieser Annahme, kann der durch die *CapH2*-Überexpression erzeugte Phänotyp in *CapD3*-Mutanten supprimiert werden. Auch in *CapG*-mutanten Larven konnte der durch die Überexpression von *CapH2* erzeugte Phänotyp supprimiert werden, was wiederum ein Hinweis auf eine Assemblierung von *CapG* im Condensin II-Komplex wäre. Allerdings wurde auch nach Überexpression von *CapG* eine Disassemblierung des polytänen Chromatins beobachtet. Wäre *CapG* innerhalb eines Condensin II-komplexes aktiv, sollte wiederum vorausgesetzt sein, dass die weiteren Condensin II-Untereinheiten im Überschuss vorhanden sind. Diese Folgerung ist nicht schlüssig, da ja *CapH2* ebenso überexprimiert werden muss, um eine Disassemblierung des Chromatins hervorzurufen.

Alternativ könnte *CapG* außerhalb eines Condensin II-Komplexes nach Überexpression die Chromatinstruktur der Speicheldrüsenchromosomen beeinflussen. Nach Überexpression der Condensin I-spezifischen Untereinheit *Barren* konnte keine Dispersion des polytänen Speicheldrüsenchromatins von Fliegenlarven beobachtet werden. Unter der Annahme, dass die Menge an *CapG* in den Speicheldrüsen limitierend ist, wäre diese Beobachtung konsistent zu Condensin I-vermittelten Effekten nach Überexpression von *CapG*.

Die zur Überexpression der Proteine genutzten transgenen Fliegen wurden durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation erzeugt. Da hier eine zufällige Transgeninsertion in das Fliegen genom stattfindet, hängt die Expressionsstärke der Transgeninsertionen auch von deren Insertionsort innerhalb des Fliegen genoms ab. Die Expressionslevel der unterschiedlichen Transgeninsertionen wurden während dieser Arbeit nicht verglichen. Es könnte daher auch möglich sein, dass die genutzten *UASP-CapH2* und *UASP-CapG*-Transgeninsertionen stärker exprimiert werden als die *UASP-Barren*-Transgeninsertion. Um die Effekte der Überexpression einzelner Condensin-Untereinheiten zu verifizieren, sollten in folgenden Analysen die Expressionslevel der eingesetzten Transgeninsertionen gegeneinander abgeglichen werden. Beispielsweise könnte die Integration unterschiedlicher Transgeninsertionen basierend auf dem ϕ C31-Intergrase-Integrationssystem an definierten Positionen des Fliegen genoms gesteuert werden (Bischof et al., 2007), was Insertions-abhängige Expressionsunterschiede ausschließen würde. Weiterhin könnte auch die Fähigkeit weiterer Condensin I-Komponenten untersucht werden, eine Disassemblierung von polytänen Chromatinstrukturen zu vermitteln. So könnten in

genetischen Interaktionsstudien die Effekte der Überexpression von *CapH2* in *Barren-*heterozygot mutanten Fliegenlarven untersucht werden. Für eine Analyse der Überexpression von *CapH2* in *CapD2*-heterozygot mutanten Fliegenlarven müssten vorerst *CapD2*-mutante Allele erzeugt werden.

3.11. Die Komposition löslicher Condensin-Komplexe

Durch die genetischen Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass neben *CapH2* und *CapD3* auch *CapG* an der Strukturierung von polytämem Chromatin beteiligt ist. Eine mögliche Assemblierung von *CapG* innerhalb eines Condensin II-Komplexes wurde durch Immunpräzipitation einzelner Condensin-Untereinheiten und massenspektrometrischer Analyse der jeweiligen Präzipitate näher untersucht. Insgesamt konnte in den Präzipitaten der Condensin-Proteine, aber auch in denen der jeweiligen Kontrollen, eine Vielzahl von Peptiden detektiert und möglichen Proteinen zugeordnet werden. Diese Tatsache ist auf die Sensitivität der gewählten Analyseverfahren mittels eines Orbitrap-Massenspektrometers zurückzuführen. Die Spezifität der Interaktoren ist durch die Anzahl der ihnen zugeordneten Peptide im Verhältnis zur Spezifität dieser Peptidmassenzuordnung (*unique and razor coverage*) bestimmt. Die Relevanz der einzelnen Interaktoren konnte durch die Anzahl der insgesamt identifizierten Peptide und deren Intensität normiert zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle ermittelt werden. So konnten nach Immunpräzipitation von *CapG* aus Proteinextrakten von Embryonen und auch Ovarien alle anderen Komponenten des Condensin I-Komplexes als spezifische Interaktoren identifiziert werden. Neben diesen Proteinen konnten allerdings keine weiteren signifikanten Interaktoren von *CapG*, insbesondere nicht *CapH2* und *CapD3*, identifiziert werden. Da eine Assemblierung von *CapG* im Condensin II-Komplex somit nicht wahrscheinlich erschien, sollte ein möglicher *CapG2*-Kandidat in *D. melanogaster* durch Präzipitation von *SMC4* identifiziert werden.

In den Präzipitaten von *SMC4* konnten insgesamt mehr Peptide als in denen des *CapG* detektiert und entsprechenden Proteinen zugeordnet werden. Umso überraschender war die Tatsache, dass in den 731 analysierten Interaktoren wiederum weder *CapH2* noch *CapD3* enthalten waren. Die Präzipitationen von *CapG* und *SMC4* wurden in Ovarienextrakten von Fliegen vorgenommen. In diesem Gewebe wurde sowohl eine Expression von *CapH2* als auch Funktionalität von *CapH2* und *CapD3* nachgewiesen (Hartl et al., 2008a). Falls diese Funktionen durch einen Condensin II-Komplex vermittelt werden, sollte so auch dessen Präzipitation aus Extrakten dieses Gewebes möglich sein.

Nach Überexpression und Präzipitation zweier unterschiedlich Epitop-markierter Varianten der Condensin II-Untereinheit CapH2 aus Ovariextrakten konnte andererseits eine Kopräzipitation der Condensin-Kernuntereinheiten erreicht werden. SMC2- und SMC4-spezifische Peptide wurden hier allerdings nicht mit höchster Intensität nachgewiesen. Obwohl die einzelnen Präzipitationsexperimente nicht direkt miteinander verglichen werden können, waren die jeweils anderen Condensin I-Untereinheiten nach Präzipitation durch CapG und SMC4 unter den 30 mit höchster Intensität identifizierten Proteine enthalten. Eine Ausnahme bildet hier nur CapG, das wahrscheinlich durch die Methode der Massenspektrometrie nicht effektiv prozessiert bzw. analysiert werden kann. So konnten sogar nach Präzipitation von CapG selbst nur sehr wenige Peptide des Proteins in den Präzipitaten gefunden werden. Durch Präzipitation von CapH2 konnten SMC2 und SMC4 hingegen nicht einmal unter den 100 mit höchster Intensität kopräzipitierten Proteine gefunden werden. Eine Interaktion von SMC4 und CapH2 konnte somit nur nach Überexpression und Präzipitation von CapH2, nicht aber im komplementären Experiment nachgewiesen werden. Durch das Überangebot an CapH2 könnten zusätzliche Condensin II-Komplexe gebildet und folglich eine Interaktion des CapH2 mit SMC2 und SMC4 stimuliert werden. Vorausgesetzt wird hierbei, dass SMC2 und SMC4 bereits im Überangebot vorhanden sind oder aber dass CapH2 Barren aus bereits assemblierten Condensin I-Komplexen verdrängen könnte.

Wenn CapH2 nach Überexpression im Condensin II-Komplex funktioniert, sollten SMC2, SMC4, CapD3 und ein mögliches CapG2 im Überschuss vorliegen, da bereits durch die Überexpression von CapH2 allein Phänotypen generiert werden können. So konnte zumindest nach Überexpression von CapH2 in Speicheldrüsen von Fliegenlarven eine Disassemblierung des polytären Chromatins in wildtyischen Larven, nicht aber in *CapD3*-mutanten Larven beobachtet werden (Hartl et al., 2008a). Obwohl die Peptide der Präzipitate von CapH2 insgesamt 1280 Proteinen zugeordnet werden konnten, was immerhin fast einem Zehntel des gesamten Fliegenproteoms entspricht, wurde CapD3 hier nicht identifiziert. Die N-terminal an CapH2 angefügten EGFP- bzw. mcherry-Markierungen sollten eine Interaktion mit CapD3 hierbei nicht behindern. So konnte einerseits die biologische Funktionalität der für die Präzipitationsexperimente eingesetzten N-terminal mcherry- bzw. EGFP-markierten Transgene durch Komplementationsanalysen nachgewiesen werden (Punkt 2.2.2.3). Zum anderen wurde eine direkte Interaktion eines an analoger Position N-terminal His-Flag-markierten CapH2 mit CapD3 im *in vitro* Assay gezeigt (Punkt 2.2.3.3).

Auch CapG konnte in den Präzipitaten von CapH2 nicht nachgewiesen werden, was sowohl gegen eine physikalische Interaktion von CapG und CapH2 als auch gegen eine Anlagerung dieses

Proteins im Condensin II-Komplex spricht. Unter der Vielzahl der kopräzipitierten Proteine konnte weiterhin auch kein offensichtlicher Kandidat für ein mögliches CapG2 von *D. melanogaster* herausgearbeitet werden. Hierbei ist allerdings fraglich, ob unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine Interaktion von CapH2 mit CapG2 erwartet werden kann, wenn auch die Interaktion von CapH2 und CapD3 nicht stattfindet.

3.12. Identifikation von Interaktionspartnern der Condensin-Untereinheiten

Durch die Immunpräzipitation der einzelnen Condensin-Untereinheiten und der massenspektrometrischen Analyse der jeweiligen Präzipitate konnten neben den Condensin-Untereinheiten selbst keine weiteren offensichtlichen Interaktoren der Condensin-Komponenten identifiziert werden. Allerdings konnten die in den Präzipitaten identifizierten Proteine mit den bereits in der Literatur diskutierten Interaktoren der Condensin-Untereinheiten verglichen werden. So wurde in *D. melanogaster* eine direkte Interaktion von Barren mit Topo II gezeigt (Bhat et al., 1996). Topo II-spezifische Peptide konnten in dieser Arbeit nur in den Präzipitaten von CapH2, nicht aber in denen von CapG und SMC4 nachgewiesen werden (siehe Tabelle im Anhang, grau markiert). Dies könnte eine spezifische Interaktion von Topo II mit den Kleisin-Untereinheiten implizieren.

Für die humanen Condensin II-spezifischen Untereinheiten (Yeong et al., 2003) wie auch die des *X. laevis* (Takemoto et al., 2009) konnte weiterhin eine direkte Interaktion mit der Proteinphosphatase PP2(A) nachgewiesen werden. Da Peptide der PP2(A) auch während dieser Analysen speziell in Präzipitaten von CapH2 identifiziert wurden (siehe Tabelle im Anhang, grau markiert), könnte PP2(A) auch in der Fliege eine regulatorische Funktion bezüglich der Condensin II-Untereinheiten übernehmen.

Erst kürzlich konnte in *D. melanogaster* eine Funktion der RNA-Helikase Vasa während der Mitose demonstriert, sowie eine Regulation des Condensin I-Komplexes durch den piRNA-Signalweg nahelegt werden. Es wurde eine direkte Interaktion von Vasa mit den Condensin I-spezifischen Untereinheiten Barren und CapD2 gezeigt, nicht aber mit der Condensin II-spezifischen Untereinheit CapD3 (Pek und Kai, 2011). Bei den hier durchgeführten Präzipitationsexperimenten konnte Vasa allerdings auch speziell in den Präzipitaten von CapH2 nachgewiesen werden. Neben Vasa wurden auch weitere Komponenten des RNA-*silencing* Signalweges in den Präzipitaten der Condensin-Untereinheiten identifiziert (siehe Tabellen im Anhang, grau markiert). In *D. melanogaster* wurden 5 Argonaut-Effektor Proteine beschrieben, welche

wiederum in 2 Subfamilien unterteilt werden können (zusammengefasst in Hutvagner und Simard (2008)). Zur Ago-Subfamilie gehören Ago1 und Ago2, welche ubiquitär in der Fliege exprimiert werden. Ago1 reguliert die mRNA-Expression und spielt somit bei der Transkriptionsrepression eine Rolle. Ago2 hat neben der Transkriptionsrepression auch eine Funktion bei der Immunabwehr da es gegen exogene doppelsträngige RNAs schützt (Hammond et al., 2001; Wang und Ligoxygakis, 2006). Die Mitglieder der Piwi-Subfamilie Piwi, Aubergine und Ago3 werden spezifisch in den Gonaden exprimiert und vermitteln hier eine Suppression von Transkriptionselementen (Brennecke et al., 2007; Yin und Lin, 2007).

Während Ago2-spezifische Peptide nur in den Präzipitaten des CapH2 identifiziert werden konnten, waren Peptide von Aubergine und Piwi auch in den Präzipitaten von CapG und SMC4 enthalten. Da eine ähnliche Anzahl an Peptiden allerdings auch in den Präzipitaten der *w¹*-Ovarienextrakte identifiziert wurde, handelt es sich eher um eine unspezifische Präzipitation dieser Komponenten. Die Interaktion der Condensin-Untereinheiten mit Komponenten des RNA-*silencing* Signalweges wurde nochmals durch Immunpräzipitation einzelner Condensin-Untereinheiten und anschließender Westernblot-Analyse mit anti-Ago2 und anti-Vasa-Antikörpern untersucht. Da in diesem Experiment keine spezifische Kopräzipitation von Ago2 oder Vasa nachgewiesen wurde, konnte eine Regulation der Condensin-Untereinheiten durch Komponenten des RNA-*silencing* Signalweges in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine direkte Interaktion von Barren oder CapD2 mit Vasa wurde hier allerdings nicht untersucht.

3.13. *In vitro*-Rekonstitution der Condensin-Komplexe

Da durch die Immunpräzipitation von CapH2 keine Kopräzipitation von CapD3 erreicht werden konnte, muss die Existenz eines löslichen Condensin II-Komplexes in *D. melanogaster* in Frage gestellt werden. Obwohl entsprechende Interaktionen zwischen den Condensin II-Komponenten der Eukaryoten sehr wohl in löslichen Extrakten nachgewiesen wurden (Csankovszki et al., 2009; Ono et al., 2003; Yeong et al., 2003), könnten die Interaktionen der Condensin II-spezifischen Untereinheiten in *D. melanogaster* spezifisch am Chromatin stattfinden, was hier nicht untersucht wurde. Um zu untersuchen, ob die *Drosophila*-Proteine CapH2 und CapD3 überhaupt direkt miteinander interagieren können, wurde in dieser Arbeit, basierend auf den Experimenten der Arbeitsgruppe von Hirano (Onn et al., 2007), ein Interaktions-Assay etabliert.

Bei diesem Assay wurden einzelne Condensin-Untereinheiten *in vitro* transkribiert und translatiert und anschließend durch Immunpräzipitation auf direkte Wechselwirkungen untersucht. Hierbei konnte die bisherige Modellvorstellung der Topologie des Condensin I-

Komplexes auch in *D. melanogaster* bestätigt werden (Abbildung 4). Es wurden direkte Interaktionen von Barren mit SMC4, CapG und CapD2 nachgewiesen. Ebenso konnte eine direkte Interaktion von CapD2 mit Barren und auch mit CapG gezeigt werden, nicht aber mit SMC4. Die Kopräzipitation von SMC4 durch CapD2 konnte aber erwartungsgemäß durch Barren stimuliert werden, was zeigt, dass durch den etablierten Assay auch ternäre Komplexe rekonstituiert werden können.

Die zentrale Fragestellung, die durch den Assay beantwortet werden sollte, ist die nach der Existenz der postulierten Protein-Protein-Interaktionen innerhalb eines Condensin II-Komplexes in *D. melanogaster* und einer möglichen Beteiligung von CapG in diesem Komplex. Obwohl im angewandten Assay eine Interaktion von CapG mit Barren und auch CapD2 nachgewiesen wurde, konnte keine Interaktion von CapG mit CapH2 oder CapD3 gezeigt werden. Hingegen wurden direkte Interaktionen von CapH2 und CapD3 beobachtet. Sowohl CapH2 konnte durch das myc-markierte CapD3 kopräzipitiert werden, als auch CapD3 durch die unterschiedlich Flag-markierten CapH2-Konstrukte. Unerwartet konnten auch Interaktionen zwischen Condensin I und Condensin II-spezifischen Untereinheiten beobachtet werden, wenn diese auch schwächer ausgeprägt waren. So konnte CapD2 durch CapH2 präzipitiert werden und auch Barren wurde durch CapD3 präzipitiert, allerdings nicht merklich spezifisch. Eine Stimulation der Interaktionen von CapD2 oder CapD3 mit SMC4 durch die beiden eingesetzten Kleisine konnte allerdings nur dem Modell des Condensin I-Komplexes entsprechend erreicht werden, was die Relevanz der weiteren beobachteten Interaktionen innerhalb möglicher Condensin-Komplexe in Frage stellt.

Eventuell sind unspezifische Interaktionen der nicht-SMC Untereinheiten durch deren hohe Konzentration im löslichen Extrakt, oder auch aufgrund ihrer Sequenzhomologien ermöglicht. Diese Tatsache würde erneut darauf hinweisen, dass Interaktionen der einzelnen Untereinheiten *in vitro* gezielt stimuliert werden können. Trotzdem konnte auch durch das gezielte Zusammenbringen von CapG mit CapH2 oder auch CapD3 keine Interaktion stimuliert bzw. erzwungen werden.

In *C. elegans* wurden drei Condensin-Komplexe beschrieben (Csankovszki et al., 2009). Einzelne Condensin-Untereinheiten können hier in unterschiedlichen Komplexen anlagern. So kann in *C. elegans* durch den Austausch einer Untereinheit im Condensin I-Komplex der Dosiskompensationskomplex (Condensin I^{DC}) gebildet werden (Meyer, 2005), der eine Funktion für die X-Chromosomen-spezifische Genregulation in Hermaphroditen vermittelt. Analog hierzu könnten auch in *D. melanogaster* konzentrationsabhängige Interaktionen *in vivo* zwischen den Condensin-Untereinheiten unterschiedlicher Komplexe stattfinden. Die beschriebenen *in vitro*

Interaktionen der Condensin-Untereinheiten konnten allerdings durch die Immunpräzipitationen aus Extrakten von Fliegengewebe nicht nachvollzogen werden, was darauf hinweist, dass diese in löslichen Extrakten deutlich weniger abundant auftreten als die Interaktionen zwischen Condensin I-Untereinheiten.

Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse kann das in Vertebraten etablierte Vorkommen eines löslichen Condensin II-Komplexes für *D. melanogaster per se* nicht bestätigt werden. Während der Mitose scheint der Condensin I-Komplex eine essentielle Funktion bei der Strukturierung der Chromosomen während der Metaphase und der Aufrechterhaltung deren Stabilität während der Anaphase zu vermitteln. Die Funktion des Condensin sollte hier dem Modell entsprechend durch den Komplex als Ganzes vermittelt werden, was stringente Interaktionen der einzelnen Untereinheiten voraussetzt. Der Condensin II-Komplex sollte hingegen eine untergeordnete Rolle spielen, da in *CapH2*- oder *CapD3*-Mutanten keine mitotischen Phänotypen auftreten. Die Condensin II-spezifischen Untereinheiten könnten also Komplex-unabhängige, Chromatin-strukturierende Funktionen vor allem in der Keimbahn der Fliegen übernommen haben. Eine stringente Komplexbildung ist hier für die Funktion eventuell nicht zwingend erforderlich, könnte aber durch das nicht physiologische Zusammenbringen oder durch ein Überangebot einzelner Untereinheiten trotzdem stimuliert oder sogar erzwungen werden. Dennoch konnte auch hierbei keine nachweisbare physikalische Interaktion von CapG mit CapH2 oder CapD3 beobachtet werden.

Abschließend wird durch die hier durchgeführten Analysen nahegelegt, dass die Funktion der Condensin II-Untereinheiten in *D. melanogaster* vielmehr durch die Proteine selbst als durch einen gesamten Proteinkomplex ausgeübt wird. Weiterhin ist die Beteiligung von CapG in Condensin II-ähnlichen Komplexen sehr in Frage zu stellen. Da CapH2 und CapD3 keine Funktion während der somatischen Mitosen haben, mag die Notwendigkeit einer zu CapG2 homologen Komponente evolutionär weggefallen sein.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. cDNA-Plasmide

Tabelle 5: Zur Klonierung der Condensin-Untereinheiten verwendete cDNA-Klone.

Plasmid	Enthaltende cDNA	Quelle
<i>SD10043</i>	CapG	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
<i>RE48802</i>	Barren	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
<i>LD40412</i>	CapD2	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
<i>SD18322</i>	CapH2	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
<i>RE74832</i>	CapD3	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project

4.1.2. Vektoren

Bei allen in der Folge aufgeführten *pCS2*-Vektoren ist die multiple Klonierungsstelle (MCS) deletiert und durch Schnittstellen der Restriktionsenzyme *FseI* und *AscI* ersetzt worden.

Tabelle 6: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Insertion	Markierung	Referenz
<i>pUAST-MCS-EGFP</i>		C-EGFP	Schittenhelm et al., 2007
<i>pCS2-SMC4</i>	SMC4	-	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-Barren</i>	Barren	-	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-CapG</i>	CapG	-	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-CapD2</i>	CapD2	-	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-CapH2</i>	CapH2	-	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-CapD3</i> (Genmodell RA)	CapD3 (Genmodell RA)	-	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-Barren-HFHF</i>	Barren	C-His-Flag-His-Flag	Häfner, 2010
<i>pCS2-CapH2-HFHF</i>	CapH2	C-His-Flag-His-Flag	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-Securin-HFHF</i>	hSecurin	C-His-Flag-His-Flag	<i>pTT1945</i> , Stemmann Laborplasmidkollektion
<i>pCS2-Flag3-FA</i>		N-Flag3	Stemmann Laborplasmidkollektion
<i>pCS2-Flag3-CapH2</i>	CapH2	N-Flag3	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-myc6-FA</i>		C-myc6	Stemmann Laborplasmidkollektion
<i>pCS2-myc6-CapD2</i>	CapD2	C-myc6	Häfner, 2010
<i>pCS2-myc6-CapD3(RA)</i>	CapD3(RA)	C-myc6	in dieser Arbeit angefertigt
<i>pCS2-myc6-PP2A(C)</i>	hPP2A(C)	C-myc6	<i>pAS1568</i> , Stemmann Laborplasmidkollektion

4.1.3. Oligonukleotide

Die Synthesen der Oligonucleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) durchgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung, Orientierung
SaHe1	GCA ATA GCG GCC GCG GAA TGA TTA CCA TTC CGC AC	PCR von CapG , Einbringen einer <i>NotI</i> -Schnittstelle, sense
SaHe2	GCA ATA GGT ACC CTG CAT CGT GTA CAG TTG	PCR von CapG , Einbringen einer <i>Asp718</i> -Schnittstelle, antisense
SaHe17	TAA AGT TCA TGT AGA GCA CC	PCR von CapD3(RA) zum Prüfen des Transkriptionsmodells von CapD3, antisense

SaHe18	ATA TGC AGC TAG CCC TCA ATG	PCR von CapD3(RA) zum Prüfen des Transkriptionsmodells von CapD3, sense
SaHe19	TCT CGT CAT TGC TTT TCC A	PCR von CapD3 zum Prüfen des Transkriptionsmodells von CapD3, antisense
SaHe30	ATA AGG CCG GCC ACC ATG GCC AAA CCA AAG GCG	PCR von CapG , Einbringen einer <i>FseI</i> -Schnittstelle, enthält die Kozak-Sequenz und das Startkodon von <i>CapG</i> , sense
SaHe32	ATA AGG CCG GCC ACC ATG ACT CTG CCC CGC TTA G	PCR von Barren , Einbringen einer <i>FseI</i> -Schnittstelle, enthält die Kozak-Sequenz und das Startkodon von <i>Barren</i> , sense
SaHe34	ATA AGG CCG GCC AAT GGA GGA ATC GCA CGA CTT C	PCR von CapD2 , Einbringen einer <i>FseI</i> -Schnittstelle, enthält das Startkodon von <i>CapD2</i> , sense
SaHe35	ATA GGC GCG CCG CTA GTC GCT GCT GCT GG	PCR von CapD2 , Einbringen einer <i>AscI</i> -Schnittstelle, enthält das Stopkodon von <i>CapD2</i> , antisense
SaHe38	ATA GGC CGG CCA CCA TGC AGA AGG CGC GTCC	PCR von SMC4 , Einbringen einer <i>FseI</i> -Schnittstelle, enthält die Kozak-Sequenz und das Startkodon von <i>SMC4</i> , sense
SaHe39	ATA GGC GCG CCT TAA ACA TTA AGT ATG GCT GG	PCR von SMC4 , Einbringen einer <i>AscI</i> -Schnittstelle, enthält das Stopkodon von <i>SMC4</i> , antisense
SaHe40	ATA GGC CGG CCA CCA TGG AGC GGG TTT TGC CTG	PCR von CapH2 , Einbringen einer <i>FseI</i> -Schnittstelle, enthält die Kozak-Sequenz und das Startkodon von <i>CapH2</i> , sense
SaHe41	ATA GGC GCG CCA CTT CAG GCG GGC TGT CG	PCR von CapH2 , Einbringen einer <i>AscI</i> -Schnittstelle, enthält kein Stopkodon, hybridisiert unmittelbar vor Stopkodon, antisense
SaHe42	ATA AGG CCG GCC AAT GGA GCG GGT TTT GCC TG	PCR von CapH2 , Einbringen einer <i>FseI</i> -Schnittstelle, enthält das Startkodon von <i>CapH2</i> , sense
SaHe43	ATA GGC GCG CCC TAC TTC AGG CGG GCT G	PCR von CapH2 Einbringen einer <i>AscI</i> -Schnittstelle, enthält das Stopkodon von <i>CapH2</i> , antisense
SaHe45	ATA GGC GCG CCG CTA CCA ATC GGG TGG CTG G	PCR von CapD3 , Einbringen einer <i>AscI</i> -Schnittstelle, enthält das Stopkodon, antisense
SaHe46	ATA AGG CCG GCC AAT GTC GGA TTT CCA TCG TA	PCR von CapD3(RA) , Einbringen einer <i>FseI</i> -Schnittstelle, enthält das Startkodon von <i>CapD3</i> (im Exon1), sense
SaHe61	ATA GGC GCG CCC TAT TTC CTC CTG CTG CGC	PCR von CapG , Einbringen einer <i>AscI</i> -Schnittstelle, enthält das Stopkodon von <i>CapG</i> , antisense
SaHe62	ATA GGC GCG CCT CAA TCC AAC ACC TGG CG	PCR von Barren , Einbringen einer <i>AscI</i> -Schnittstelle, enthält das Stopkodon von <i>Barren</i> , antisense
SaHe63	TCG CTG TTT TAC TGG AAC GG	PCR von CapD3 zum Prüfen des Transkriptionsmodells von <i>CapD3</i> , sense
SaHe64	CGA CGA GAT CTT CCA GCA AA	PCR von CapD3 zum Prüfen des Transkriptionsmodells von <i>CapD3</i> , antisense
SH60	ACC AAG CAC TTC ATC CGC C	PCR von RpL32 zur Normierung von cDNA, antisense
SH61	GCG CTC GAC AAT CTC CTT G	PCR von RpL32 zur Normierung von cDNA, sense

4.1.4. Fliegenstämme

In den Tabellen 8-10 sind die Fliegenstämme aufgelistet, welche während dieser Arbeit verwendet, aber nicht selbst hergestellt wurden.

Tabelle 8: Mutante Fliegenstämme

Genotyp	Referenz
w^1	Lindsley, 1992
w^* ; $CapG^1 / CyO$, $P[ry+, ftz lacZ]$	Jäger et al., 2005
w^* ; $CapG^6 / CyO$, $P[ry+, ftz lacZ]$	Jäger et al., 2005
w^* ; $CapG^{64} / CyO$, $P[ry+, ftz lacZ]$	Cobbe et al., 2006
w^* ; $CapG^{EP(2)2346} / CyO$, $P[ry+, ftz lacZ]$	Jäger et al., 2005
$y^1 w^{67c23}$; $P\{EPgy2\}Cap-H2^{EY09979}$	Bloomington Stock Center
w^* ; $P\{FRT(w^{hs})\}2A P\{neoFRT\}82B PBac\{Gal4D,EYFP\}Cap-H2^{PL00617}$	Bloomington Stock Center

w^* ; P{lacW}(3)j9A5 ^{9A5} Cap-H2 ^{TH2} /TM6B, Tb	Bloomington Stock Center
w^{1118} ; Df(3R)Exel6159, P{XP-U}Exel6159/TM6B, Tb	Bloomington Stock Center
w^{1118} ; Df(2L)Exel7023/CyO	Bloomington Stock Center
$y^1 w^{67c23}$; P{EPgy2}Cap-D3 ^{EY00456}	Bloomington Stock Center
w^* ; string ^{7B} , P[w+,Hs-string]/TM3, Ser	Sauer et al., 1995
Mad2Δ	Buffin et al., 2007

Tabelle 9: Gal4-Treiber- und Balancerstämme

Genotyp	Referenz
w^* , α4 tub-Gal4-VP16	Micklem et al., 1997
w^* , α4 tub-Gal4-VP16, gHis-2AvD- mRFP1 II.2	F. Althoff, persönliche Mitteilung
w^* ; P[w+,da-Gal4] G.32	Bloomington Stock Center
$y^1 w^*$ P{w[+mC]=tubP-Gal4}LL7/ TM3, Sb	Bloomington Stock Center
F4-Gal4	Weiss et al., 1998
w^* ; Sco / CyO, P[ry+,ftz lacZ]	Lindsley 1992
w^* ; Sb / TM3, Ser	Lindsley 1992
w^* ; Sco / CyO, P[ry+,ftz lacZ]; D/TM3, Sb, P[w+,Ubx-lacZ]	Lindsley,1992

Tabelle 10: Transgene Fliegenstämme

Genotyp	Referenz
w^* ; pBAC[3xP3-EGFP,gCapG-EGFP III.1] /TM3,Ser	S. Heidmann, K. Trunzer, unveröffentlicht
w^* ; pBAC[3xP3-EGFP, gCapG-mRFP1] /TM3,Ser	S. Heidmann, K. Trunzer, unveröffentlicht
w^* ; P[w+, pUASP1-CapG-mRFP1] III.1/TM3,Ser	Nagarkar, 2010
gCapG-EGFP III.1, His-2AvD III.1/ TM3, Ser	Nagarkar, 2010
pUASP1-CapG III.2	Jäger et al., 2005
pUAST-CapG ^{FL} -EGFP II.2	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^{FL} -EGFP III.3	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^{FL} -EGFP III.2	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^{NM} -EGFP III.1	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^{NM} -EGFP III.2	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^{NM1} -EGFP II.1	Frank, 2008
pUAST-CapG ^{NM1} -EGFP III.1	Frank, 2008
pUAST-CapG ^{NM2} -EGFP III.1	Frank, 2008
pUAST-CapG ^{NM3} -EGFP III.1	Frank, 2008
pUAST-CapG ^{NM4} -EGFP II.1	Frank, 2008
pUAST-CapG ^N -EGFP III.1	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^M -EGFP III.1	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^{MC} -EGFP III.1	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^{MC} -EGFP III.2	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^C -EGFP III.1	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^C -EGFP III.2	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^C -EGFP III.4	Herzog, 2007
pUAST-CapG ^C -EGFP II.3	Herzog, 2007
pUASP-EGFP-SMC4 II.1 (Transgeninsertion Δ8.3)	Oliveira, 2007
pUASP-EGFP-SMC4 III.1 (Transgeninsertion Δ8.5.2)	Oliveira, 2007
pUASP-Barren-EGFP III.2	Oliveira, 2007
pUASP-mcherry-CapH2 II.1	Aurich, 2009
pUASP-mcherry-CapH2 III.2	Aurich, 2009
pUASP-EGFP-CapH2 II.4	Aurich, 2009
g-mRFP1-HP1 II.1	Wen et al., 2008
sryα-Gal4, UAS-EGFP-Pch2	Schittenhelm et al., 2007

In Tabelle 11 sind die Fliegenstämme aufgelistet, welche während dieser Arbeit hergestellt wurden.

Tabelle 11: Während dieser Arbeit hergestellt Fliegenstämme

Genotyp	Herstellungsart
<i>pUAST-CapG^{NM5}-EGFP II.1</i>	P-Element vermittelte Keimbahntransformation
<i>pUAST-CapG^{NM5}-EGFP III.1</i>	
<i>pUAST-CapG^{NM5}-EGFP III.2</i>	
<i>pUAST-CapG^{FL}-EGFP II.2, g-mRFP1-HP1 II.1/ CyO, P[ry+, ftz lacZ]</i>	Rekombination einzelner Allele
<i>pUAST-CapG^C-EGFP II.3, g-mRFP1-HP1 II.1/ CyO, P[ry+, ftz lacZ]</i>	
<i>pUAST-CapG^N-EGFP III.1, pUAST-CapG^{MC}-EGFP III.2</i>	
<i>w*; CapG¹, P{EPgy2}Cap-D3^{EY00456}/ CyO, P[ry+, ftz lacZ]</i>	
<i>w*; CapG⁶, P{EPgy2}Cap-D3^{EY00456}/ CyO, P[ry+, ftz lacZ]</i>	

4.1.5. Antikörper

Tabelle 12: Verwendete Antikörper.

Primäre Antikörper	Blot	Immunfluoreszenz	Referenz/ Quelle
Kaninchen-anti-EGFP(IS28)	1:3000	1:3000	Dürr, 2004
Kaninchen-anti-mRFP1	1:3000	1:3000	Schittenhelm et al., 2007
Kaninchen-anti-CapG(N)	1:3000		Reithinger, 2009
Kaninchen-anti-SMC2(IS04), ungereinigtes Serum	1:3000		S. Heidmann, persönliche Mitteilung
Kaninchen-anti-Barren	1:4000		Bhat et al., 1996
Kaninchen-anti-CapD2	1:10000	1:1000	Savidou et al., 2005
Kaninchen-anti-CID(IS1)		1:500	Jäger et al., 2005
Kaninchen-anti-C(3)G		1:3000	Geschenk von M. Lily
Kaninchen-anti-Flag	1:2000		Sigma
Maus-anti α -tub	1:80000		Sigma Aldrich
Maus-anti-sperm tail		1:20	Karr, 1991
Maus-anti-Cyclin B (F2)	1:40		Knoblich und Lehner, 1993
Maus-anti-GFP (Clone #71 hybridoma supernatant)	1:200		Geschenk von P. Heun (MPI, Freiberg) unveröffentlicht, gereinigt von M. Hermann
Maus-anti myc (9E10 hybridoma supernatant)	1:100 – 1:1000		Evan et al., 1985
Maus-anti-Ago-2	unverdünnt		Miyoshi et al., 2005
Meerschweinchen-anti-CapG(N)	1:3000		Reithinger, 2009
Ratte-anti-CapH2	1:500		Oliveira, 2007
Ratte-anti-Vasa	1:1000		<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
Sekundäre Antikörper			
POD-Ziege-anti-Kaninchen	1:3000		<i>Jackson Immunochemicals</i>
POD-Ziege-anti-Meerschweinchen	1:3000		<i>Jackson Immunochemicals</i>
POD-Ziege-anti-Maus	1:3000		<i>Jackson Immunochemicals</i>
POD-Ziege-anti-Ratte	1:3000		<i>Jackson Immunochemicals</i>
Cy3- Ziege-anti-Kaninchen		1:600	<i>Jackson Immunochemicals</i>
Cy5- Ziege-anti-Kaninchen		1:600	<i>Jackson Immunochemicals</i>

4.2. Umgang mit *Drosophila melanogaster*

4.2.1. Standardmethoden

Haltung von *D. melanogaster* und Kreuzungsexperimente erfolgten wie bei (Greenspan, 1997), (Roberts, 1998) und (Sullivan, 2000) beschrieben. Informationen zu den Mutationen, die als phänotypische Marker dienen, zu Balancierchromosomen sowie zur genetischen Nomenklatur finden sich bei (Lindsley, 1992) oder bei FlyBase (FlyBase Consortium, 2003).

4.2.2. Keimbahntransformation von *D. melanogaster*-Embryonen durch Mikroinjektion und Kartierung von Transgeninsertionen

Transgene Fliegen wurden durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation von *D. melanogaster* w^1 -Embryonen erzeugt (Spradling und Rubin, 1982). Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise der Injektion findet sich bei Herzig (1999). Als Injektionsapparatur wurde ein Femtojet (Eppendorf) genutzt. Eine detaillierte Beschreibung der Kartierung und Etablierung transgener Fliegenstämme finden sich bei Kramer (1999).

4.2.3. Embryonenkolektionen

Für Embryonenkolektionen wurden adulte Fliegen in Flugkäfigen bei einer Inkubationstemperatur von 25°C gehalten. Die Flugkäfige wurden mit Hefe bestrichenen Apfelsaftagarplatten verschlossen. Zum Ablegen zurückgehaltener Embryonen, wurde stets eine 1-stündige Vorkollektion durchgeführt. Für die eigentliche Kollektion wurden Apfelsaftagarplatten entsprechend der Kollektionsdauer gewechselt, die Embryonen entsprechend der Kollektionsdauer bei 25°C zur Alterung inkubiert und anschließend mit NaCl-Tx von der Apfelsaftagarplatte gewaschen. Nach einer 3-minütigen Dechorionisierung mit 50% Klorix (v/v; Colgate Palmolive GmbH) wurden die Embryonen mit NaCl-Tx gewaschen und entsprechend weiterbehandelt.

4.2.4. Immunfluoreszenzfärbung von Embryonen

Nach Kollektion und Dechorionisierung (siehe 4.2.3) wurden die Embryonen in einer 1:1 Mischung aus Methanol und Heptan (je 700 µl) für 5 min unter Rotation fixiert. Nach der Fixierung wurden die Embryonen zuerst dreimal mit 1 ml Methanol und dann dreimal mit 1 ml PBTx gespült und dreimal für 10 min mit 500 µl PBTx unter Rotation bei RT gewaschen. Die Embryonen wurden dann für 1h in 1 ml PBTx (10% NGS, *normal goat serum* oder 10% FBS, *fetal bovine serum*) unter Rotation bei RT inkubiert, um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren und anschließend über Nacht mit dem primären Antikörper in 1 ml PBTx (10% NGS oder 10% FBS) bei 4°C unter Rotation inkubiert. Danach wurden überschüssige Antikörper durch 3-maliges Spülen und 2-maliges Waschen in je 1 ml PBTx entfernt und die Embryonen mit dem sekundären Antikörper in 500 µl PBTx (5% NGS oder 5% FBS) für 2h bei RT unter Rotation inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurde dreimal mit 1 ml PBTx gespült und einmal mit 1 ml PBTx für 5 min unter Rotation gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der DNA durch den interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258. Hierzu wurden die Embryonen 5 min lang unter Rotation mit 1 ml PBS/Hoechst 33258 (1 µg/ml Hoechst 33258 in PBS) inkubiert. Nach Abziehen der Färbelösung wurden die Embryonen mit 1 ml PBS gespült und 5 min in 1 ml PBS unter Rotation gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend auf einen Objektträger überführt, überschüssiges PBS abpipettiert, in Montiermedium aufgenommen und mit einem Deckglas fixiert.

4.2.5. Immunfluoreszenzfärbung von Speicheldrüsen, Fliegenovarien und Hoden

Für die Präparation von Speicheldrüsen wurden *Drosophila*-Larven des dritten Larvenstadiums in PBS überführt und deren Verdauungstrakt mit einer Pinzette heraus präpariert. Für die Präparation von Ovarien und Hoden wurden die Fliegen mit CO₂ betäubt und in PBS überführt. Mittels einer Pinzette wurde das Abdomen geöffnet und die Ovarien bzw. die männlichen Reproduktionsorgane heraus präpariert. Sollte eine direkte Mikroskopie folgen, konnten die erhaltenen Gewebe direkt auf einen Objektträger gegeben, in Montiermedium sezirt und durch ein Deckglas fixiert werden. Alternativ wurden die erhaltenen Gewebe in ein Gemisch aus 150 µl Fixierungslösung und 300 µl Heptan transferiert und 20 min unter Rotation fixiert. Nach mehrfachem Waschen mit PBST wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Gewebe analog zur der von fixierten Embryonen vorgenommen (siehe 4.2.4), mit dem Unterschied, dass sowohl die Waschschritte als auch die Antikörperverdünnungen in PBST statt PBTx vorgenommen wurden. Alternativ wurde direkt nach dem Waschen eine Hoechst 33258-Färbung (analog zur der fixierter Embryonen) der Gewebe vorgenommen. Die gefärbten Gewebe wurden abschließend auf einen Objektträger überführt, mit Montiermedium überschichtet, unter dem Mikroskop (Zeiss, Stemi 2000) sezirt und mit einem Deckglas fixiert.

4.3. Mikroskopie und Bildbearbeitung

Zur mikroskopischen Analyse wurde ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Axioplan 2 von Zeiss genutzt. Es wurde eine 16-fache bzw. 20-fache Objektiv-Vergrößerung verwendet. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit der AxioCam MRm-Kamera angefertigt und mit der Software AxioVision 3.1 (Zeiss) erstellt.

Konfokale Lasermikroskopie erfolgte am Laser-Scanning-Mikroskop von Leica (Leica Confocal TCS SP5) mit der LCS-Software. Sollten hierbei lebende Embryonen mikroskopiert werden (*in vivo* Mikroskopie), wurden diese nach Dechorionisierung auf einem Apfelsaftagarblock aufgereiht und mittig auf ein mit Klebstoff (Heptanextrakt von Packetklebeband) versehenes Deckglas überführt. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Embryonen mit einem sauerstoffdurchlässigem, hochviskosen Öl (Votalef 10 S, elf atochem) überschichtet. Zu Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33258, EGFP, mRFP1, Cy3 sowie Cy5 wurden einen Dioden UV-Laser 405 (Anregungswellenlänge 405 nm), ein Argonlaser (Anregungswellenlänge 458-514 nm), ein DPSS561-Laser (Anregungswellenlänge 561 nm) und ein Helium/Neon-Laser (Anregungswellenlänge 633 nm) eingesetzt. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden ein 40-faches und ein 60-faches Öl-Objektiv verwendet. Für Zeitreihen wurde alle 15s bzw. 20s ein Bild aufgenommen. Die Einstellungen der Blenden und des Photomultipliers wurden den entsprechenden Präparaten bzw. der experimentellen Zielsetzung angepasst. Bei hohem Hintergrundsignal, wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit einer 2- bis 4-fachen Abrasterung aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ v1.41 (National Institute of Health, USA) und mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.).

4.4. Molekularbiologische Methoden

4.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für PCR-Reaktionen wurden das „Expand Long Range dNTPack“ (Roche), oder *Pfu*-DNA-Polymerase (Fermentas) oder eine selbst hergestellte *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Als Template wurden 50-500 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Genomische DNA oder cDNA aus Fliegen wurde zu je 1 µl entweder unverdünnt oder in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:10 eingesetzt. Den 25–50 µl PCR-Ansätzen wurde weiterhin der jeweilige PCR-Puffer in einer 1-fachen Endkonzentration, Desoxyribonukleotidmix und PCR-Primer nach Angaben der jeweiligen Hersteller zugegeben. Bei Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase wurden 1,5 mM MgCl₂; 0,1 mM Desoxyribonukleotidmix, 0,4 µM PCR-Primer, sowie PCR-Puffer in einer 1-fachen Endkonzentration eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in den PCR-Maschinen RoboCycler Gradient 96 Hot Top Combo (Stratagene) und Perkin Elmer Cetus Gene Amp PCR System 9600 durchgeführt. Eine Entsalzung der PCR-Reaktionen wurde mittels des „Qiagen PCR purification Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers vorgenommen.

4.4.2. DNA-Fragmentierung durch Restriktionsendonukleasen

Die enzymatische Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Hersteller NEB, Fermentas und Roche entsprechend der Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Es wurden 0,5 bis 3 µg Plasmid-DNA mit 2 bis 10 U des/der jeweiligen Restriktionsenzym/-enzyme in einem Gesamtvolumen von 10 bis 50 µl gemischt. Gleichzeitig wurde eine 1-fache Konzentration des entsprechenden Reaktionspuffers (10x) sowie gegebenenfalls von Rinderserum-Albumin (BSA) eingestellt. Der Restriktionsansatz wurde bei der enzymspezifischen Temperatur für mindestens 1h inkubiert.

4.4.3. Enzymatische Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation von Vektor-DNA während der enzymatischen Ligation zu vermeiden, wurden Vektoren nach der enzymatischen Restriktion an ihren 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurden die Restriktionsansätze nach Hitze-Inaktivierung der Restriktionsenzyme (15 min bei 65°C) entsalzt, eine 1-fache Konzentration an SAP-Puffer eingestellt und 1 bis 5 U Alkalische Garnelen-Phosphatase (SAP; Fermentas) zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend Hitze-inaktiviert (15 min bei 65°C).

4.4.4. Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Generierung von Plasmiden wurde ein kloniertes und mit Restriktionsenzymen geschnittenes DNA-Fragment unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (Fermentas/ NEB) in einen Vektor kloniert. Die entsprechende Reaktion wurde in einem Volumen von 10 µl mit 1 µl des vom jeweiligen Hersteller angegebenen Reaktionspuffers (10x) sowie 1 µl T4-DNA-Ligase angesetzt und für mindestens 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Ligation wurden die Ansätze für 15 min bei 65°C inkubiert um die Ligase zu inaktivieren.

4.4.5. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Bakterien

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* wurden 50 µl chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien mit 10 µl eines Ligationsansatzes gemischt und für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock (45s bei 42°C) vorgenommen, gefolgt von einer erneuten Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Bakterien für etwa 30 min bei 37°C

unter schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Agarplatten ausgebracht, die Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml enthielten, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden der „QIAprep Spin Miniprep Kit“ und der „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers verwendet.

4.4.7. Agarosegelelektrophorese und Extraktion von DNA-Fragmenten

Zur analytischen und zur präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%-ige Agarosegele auf Tris-Borat-Basis verwendet (Sambrook, 1989). Pro 100 ml flüssiger Agarose wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, um die DNA später im UV-Licht sichtbar zu machen. Sollte eine Präparation der DNA-Fragmente aus der Agarose erfolgen, wurden diese mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend mit dem „Gel-Extraction Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers extrahiert.

4.4.8. Präparation genomischer DNA aus Fliegenembryonen

Zur Präparation der genomischen DNA aus *D. melanogaster* wurden 4 bzw. 30 adulte Fliegen mit CO₂-betäubt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Fliegen wurden in 100 µl bzw. 400 µl Puffer A homogenisiert und das Homogenat anschließend 30 min bei 65°C inkubiert. Dann wurden 120 µl bzw. 900 µl einer Lithiumchlorid/Kaliumacetat-Lösung zugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5415 D, 16000g, RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, die DNA durch Zugabe von 100 µl bzw. 540 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 60000g, RT) sedimentiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl bzw. 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

4.4.9. Präparation von RNA aus Fliegengeweben und Reverse Transkription

Zur Präparation von RNA aus Fliegengeweben wurde der „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach dem Protokoll „Purification of Total RNA from Animal Tissues“ genutzt. Um RNA aus *w*¹-Embryonen zu erhalten, wurden diese nach entsprechender Kollektion von der Apfelsaftagarplatte gesammelt, dechorionisiert, mit NaCl-Tx gewaschen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Überschüssiger Waschpuffer wurde quantitativ abgezogen und das Volumen der Embryonen durch eine skalierte Kapillare bestimmt. Es wurden 20–100 µl Embryonen eingesetzt. Diese wurden zur Lagerung in flüssigen Stickstoff eingefroren und dann direkt in RTL-Puffer (Qiagen) aufgearbeitet. Zur Präparation von RNA aus adulten *w*¹-Fliegen wurden jeweils 20 Männchen oder Weibchen betäubt und direkt in RTL-Puffer (Qiagen) aufgearbeitet. Zur reversen Transkription wurden der „Omniscript RT Kit“ (Qiagen) oder eine Reverse Transkriptase (Fermentas) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers eingesetzt. Es wurde je 1 µl (300-400 ng) der präparierten RNA-Proben pro Transkriptionsreaktion eingesetzt. Hierbei wurden sowohl Oligo-dT als auch Hexamerprimer zu je 10 µM pro Transkriptionsreaktion eingesetzt.

4.4.10. Sequenzierung und Sequenzvergleiche

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Sequencing Laboratories Göttingen durchgeführt. DNA-Proben wurden nach den Angaben der Firma vorbereitet. Sequenzanalysen wurden mit den Programmen SeqBuilder (DNA Star Software) und Multalign (Multiple sequence alignment by Florence Corpet; <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) durchgeführt.

4.5. Proteinbiochemische Methoden

4.5.1. Herstellung von Affinitätsmatrizes auf Basis von Protein A-Sepharose

4.5.1.1. Kopplung polyklonaler Antikörper

Für die Immunpräzipitation aus nativen *D. melanogaster*-Proteinextrakten wurden ausschließlich selbst hergestellte Affinitätsmatrizes verwendet. Hierfür wurden die polyklonalen Antikörper, Kaninchen-anti-EGFP(IS28), Kaninchen-anti-mRFP1, Kaninchen-anti-mcherry oder Kaninchen-anti-CapG(N) kovalent an Protein A-Sepharose (Affi-Prep Protein A, BIORAD) gekoppelt. Die Protein A-Sepharose wurde vorerst dreimal mit dem 10-fachen Volumen an 50 mM Borax (pH 9,0) gewaschen. Schließlich wurden pro 100 µl gesetzter Protein A-Sepharose 50 µl affinitätsgereinigte, polyklonale Antikörperlösung verdünnt in 1 ml 50 mM Borax (pH 9,0) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation unter Rotation (RT) wurde der Überstand nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, VWR Galax Mini, 20 sek) von der Sepharose abgetrennt, diese zweimal mit dem 10-fachen Volumen an 50 mM Borax (pH 9,0) gewaschen und im 10-fachen Volumen an 50 mM Borax (pH 9,0) aufgenommen. Zur kovalenten Kopplung der Antikörper an die Sepharose wurde festes Dimethylpimelidat in einer Endkonzentration von 20 mM zugeben. Nach 30-minütiger Inkubation unter Rotation (RT) wurde der Überstand abgenommen. Zur Blockierung von nicht reagiertem Dimethylpimelidat wurde die Sepharose mit dem 10-fachen Volumen an 200 mM Ethanolamin (pH 8) gewaschen und weitere 2h im 10-fachen Volumen an 200 mM Ethanolamin (pH 8) unter Rotation bei RT inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend mit dem 10-fachen Volumen an 100 mM Glycin (pH 3) gewaschen und zweimal für 10 min im 10-fachen Volumen an 100 mM Glycin (pH 3) unter Rotation (RT) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem 10-fachen Volumen an PBS konnte die erhaltene Affinitätsmatrix im 10-fachen Volumen an PBS (0,01% Thimerosal) bei 4°C gelagert werden.

4.5.1.2. Kopplung von monoklonalen Maus-Hybridomaüberständen

Die Kopplung von monoklonalen Maus-Hybridomaüberständen an Protein A-Sepharose erfolgte im Wesentlichen wie unter 4.5.1.1 beschrieben, allerdings unter Hochsalzbedingungen. Hierzu wurde dem 50 mM Borax NaCl in einer Endkonzentration von 3 M zugesetzt wurde. Dem Hybridomaüberstand wurde vor der Kopplung NaCl in einer Endkonzentration von 3 M zugesetzt sowie der pH-Wert mittels 1 M NaOH auf 9,0 eingestellt. Zur Kopplung wurden 2 ml Hybridomaüberstand pro 100 µl Protein A-Sepharose eingesetzt. Während dieser Arbeit wurde ein anti-myc Hybridomaüberstand (*mAB 9E10 anti-myc*) zur Herstellung einer entsprechenden Affinitätsmatrix eingesetzt.

4.5.2. Herstellung nativer Proteinextrakte aus *D. melanogaster*-Geweben und anschließende Immunpräzipitation

Embryonen wurden wie unter Punkt 4.2.3 beschrieben erhalten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmen der Embryonenmenge (in µl) wurde der überschüssige Puffer entfernt. Für eine längere Lagerung konnten die Embryonen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden. Um native Proteinextrakte aus Ovarien herzustellen, wurden diese aus Fliegenweibchen präpariert (siehe Punkt 4.2.5) und in Portionen von ja 20-30 Ovarienpaaren in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach Entfernen des überschüssigen Puffers wurden auch die Ovarien in flüssigem Stickstoff eingefroren. In gefrorener Form konnten schließlich mehrere Aliquots vereint werden. Die Extrakterstellung wurde bei 4°C durchgeführt. Hierbei wurden die Fliegengewebe durch Zugabe von gekühltem Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren) in einen Glashomogenisator (Kontes) überführt. Der Aufschluss erfolgte durch ein Teflon-Pistill (Kontes), das durch eine

Bohrmaschine (Bosch) angetrieben wurde (ca. 10mal auf und ab, bei mittlerer Drehzahl). Es wurden je 400 µl Lysepuffer pro 100 µl Embryonen bzw. 100 Ovarienpaaren eingesetzt. Die Homogenate wurden schließlich zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5415 D, 15 min, 16000g, 4°C). Die mittlere Phase mit löslichen Proteinen wurde mittels einer Pasteurpipette abgenommen und in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (15 min, 16000g, 4°C) konnte durch erneutes Abnehmen der mittleren Phase der native Proteinextrakt erhalten werden. Diesem wurden 20 µl entnommen und in 10 µl SDS-Probenpuffer aufgeköcht (INPUT). Der restliche Extrakt wurde dann mit einer Antikörper-gekoppelten Affinitätsmatrix (4.5.1.1) für 3-4h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Pro 200-400 µl nativem Proteinextrakt wurden 30 µl Affinitätsmatrix eingesetzt, welche vorher dreimal mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen wurde. Nach der Inkubation wurde der Überstand durch Zentrifugation abgetrennt (1 min, 16000g, 4°C), diesem 20 µl entnommen und in 10 µl SDS-Probenpuffer aufgeköcht (ÜB). Die Affinitätsmatrix wurde dreimal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen und weitere 10 min in 1 ml Lysepuffer unter Rotation bei 4°C inkubiert. Um unspezifische Interaktoren von der Matrix abzutrennen, konnte diese je nach Experiment durch weitere Puffer (WPS und folgend WPD) je einmal gespült und für 10 min unter Rotation bei 4°C inkubiert werden. Nach Abnehmen des Waschpuffers folgte die Elution. Diese konnte vorerst mittels Elutionspuffer erfolgen. Hierbei wurde die Matrix in 40 µl Elutionspuffer für 5 min bei 37°C inkubiert, dieser schließlich nach Zentrifugation (1 min, 16000g, 4°C) abgenommen, mit weiteren 20 µl SDS-Probenpuffer versetzt und gekocht (IP). Anschließend konnte die Affinitätsmatrix in 40 µl SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C inkubiert und nach Zentrifugation (1 min, 16000g, 4°C) und Abnahme des Überstandes ein weiteres Eluat erhalten werden (IP, Heißelution). Alternativ konnte die Matrix nach dem letzten Waschschritt auch in eine Mobicol-Säule (Mobictec) überführt und durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, VWR, Galax mini, 20 sek) vom Puffer abgetrennt werden. In diesem Fall wurde die Elution direkt durch Zugabe von 40 µl SDS-Probenpuffer (ohne β-Mercaptoethanol) und 5-minütiger Inkubation bei 95°C vorgenommen. Durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 20 sek) wurde das Eluat schließlich von der Affinitätsmatrix abgetrennt und nach Zugabe von 4 µl β-Mercaptoethanol (14,4M) erneut für 10 min gekocht (IP).

Für die Immunpräzipitationen von CapG-mRFP1 und SMC4-EGFP (siehe Ergebnisse, Abschnitte 2.2.2.1 und 2.2.2.2) wurde eine zweistufige Präzipitation vorgenommen. Für die Präzipitationen von mcherry-CapH2 und EGFP-CapH2 (siehe Ergebnisse, Abschnitt 2.2.2.3) wurden die Affinitätsmatrizes direkt in SDS-Probenpuffer gekocht. Die Proben von INPUT und ÜB wurden schließlich so verdünnt, dass 20 Embryonen bzw. 2,5 Ovarien pro 10 µl SDS-Probenpuffer enthalten waren. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden jeweils 10 µl für INPUT und ÜB und 5–15 µl der Eluate eingesetzt.

4.5.3. Proteinpräparation von *D. melanogaster*-Embryonen in verschiedenen Phasen der Mitose 14

Fliegen des Genotyps *string*^{7B}, *P[w+,Hs-string]/TM3,Ser* wurden in Flugkäfigen (siehe Punkt 4.2.3) gehalten. Embryonen wurden jeweils für 30 min gesammelt und weitere 160 min bei 25°C gealtert. In einer solchen Kollektion (160-190 min) befinden sich die Zellen einer Mehrzahl der Embryonen in der G2-Phase des Zellzyklus 14 und können durch eine ektopische Expression der Phosphatase *Cdc25/string* synchron in die Mitose getrieben werden (Sauer et al., 1995). Um eine Expression des *Hs-string* zu vermitteln, wurden die Apfelsaftagarplatten für 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 5 min, 8 min, 12 min oder 15 min bei 25°C gealtert. Die Embryonen wurden dechorionisiert und in einer 1:1 Mischung aus Methanol (1mM Vanadat) und Heptan (je 700 µl) für 5 min unter Rotation fixiert. Anschließend wurden die Embryonen dreimal mit Methanol (1mM Vanadat) und zweimal mit EB-Puffer (0,5% Tween 20 (w/v)) gewaschen und 5 min unter Rotation mit

Hoechst 33258 (1 µg/ ml in EB) gefärbt. Nach zweimaligem Waschen in EB-Puffer konnten die Embryonen in EB (60% Glycerin) bei -20°C gelagert werden. Die Embryonen wurden schließlich mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Axiovert 25; Carl Zeiss) auf einem Objektträger anhand der Morphologie ihrer DNA den unterschiedlichen Zellzyklusphasen der Mitose 14 zugeordnet. Entsprechende Embryonen wurden vereinigt, in kEB homogenisiert und 5 min bei 95°C gekocht.

4.5.4. Demecolzinbehandlung von *D. melanogaster*-Embryonen

Um einen Zellzyklusarrest innerhalb der Mitose zu bewirken, wurden Embryonen nach entsprechender Kollektion und Dechorionisierung (Punkt 4.2.3) in eine 1:1 Mischung aus Schneiders-Medium (Gibco) (10 µM Demecolzin) und Heptan (je 300-700 µl, entsprechend der Embryonenmenge) überführt und 20 min bei RT unter Rotation inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurden Embryonen in einer Mischung aus Schneiders-Medium und Heptan ohne Demecolzin inhibiert. Nach der Inkubation wurden die Embryonen zweimal mit Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren) gewaschen, in einer entsprechenden Menge an Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren) homogenisiert und nach Zugabe von SDS-Probenpuffer 5 min bei 95°C gekocht. Um den Erfolg des Metaphasenarrestes zu überprüfen, wurde ein Teil der Embryonen nach der Inkubation durch Methanol/Heptan fixiert (Punkt 4.2.4) und deren DNA durch 5-minütige Inkubation in Hoechst 33258 (1 µg/ml in PBS) gefärbt.

4.5.5. Phosphatasebehandlung von Embryonalextrakten

Zur Phosphatasebehandlung wurden Embryonen nach dem Absammeln von der Apfelagarplatte (Punkt 4.2.3) dechorionisiert und mit NaCl-Tx gewaschen. Die Anzahl der Embryonen wurde durch eine skalierte Kapillare bestimmt. Es wurden jeweils 300 Embryonen in 150 µl λ-Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren) homogenisiert. 50 µl des Homogenates wurden mit 1 µl λ-Phosphatase (NEB) für 15 min bei 30°C inkubiert (+λ). Weitere 50 µl des Homogenates wurden ohne Zugabe von λ-Phosphatase analog inkubiert (-λ). Anschließend wurden je 25 µl SDS-Probenpuffer zugegeben und die Extrakte für 5 min bei 95°C gekocht. Dem letzten Teil des Homogenates wurden λ-Phosphatase und SDS-Probenpuffer gleichzeitig zugegeben und unmittelbar aufgeköcht (+λ[†]).

4.5.6. Herstellung denaturierender Extrakte aus *D. melanogaster*-Geweben

Zur Herstellung denaturierender Proteinextrakte von Embryonen wurden diese nach der Kollektion (Punkt 4.2.3) gesammelt, dechorionisiert, mit NaCl-Tx gewaschen und die Anzahl der Embryonen durch eine skalierte Kapillare gestimmt. Nach Zugabe von 50 µl SDS-Probenpuffer pro 100 Embryonen wurden diese homogenisiert und 5 min bei 95°C gekocht. Zur Herstellung denaturierender Proteinextrakte aus Ovarien und Hoden wurden diese vorerst in PBS präpariert (siehe Punkt 4.2.5), anschließend in Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren; 50 µl Lysepuffer je 10 Ovarien bzw. 25 Hodenpaare) homogenisiert und nach Zugabe von SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C gekocht. Nach 1-minütiger Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5415 D, 16000g, RT) wurden die Extrakte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.5.7. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinextrakte wurden entweder durch selbst hergestellte 10%ige SDS-Polyacrylamidgele oder durch Gradientengele (SERVAGel™ Neutral pH 7.4 Gradient) der Firma Serva aufgetrennt. Die Elektrophorese fand in entsprechenden Gelkammern bei 100 bis 140 V in SDS-Laufpuffer statt. Als Molekulargewichtsstandard wurden PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa Fermentas) und PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas) eingesetzt.

4.5.8. Westernblot und immunologischer Nachweis (Immunblot)

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Hybond-ECL-Nitrozellulose Membran (GE Healthcare) erfolgte durch Elektroblothen. Das Blotten wurde 1h bei 100 V in Transferpuffer durchgeführt. Die Membran wurde nach dem Transfer mit Ponceau S gefärbt und die Markerbanden ggf. mit einem Kugelschreiber gekennzeichnet. Durch Spülen der Membran in H₂O wurde die Färbelösung wieder entfernt. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch einstündiges Schwenken der Membran bei RT in Milchpuffer blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Milchpuffer (0,02% (w/v) Natriumazid) über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dann dreimal kurz und zweimal 30 min unter Schütteln mit Milchpuffer gewaschen. Nach 2-stündiger Inkubation der Membran mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in Milchpuffer, wurde diese erneut dreimal mit Milchpuffer gespült und dreimal 15 min gewaschen. Zuletzt wurde die Membran dreimal kurz mit PBST gespült und zweimal 15 min in PBST gewaschen. Der Nachweis der Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte durch die ECL-Detektionssysteme „ECL Plus Western Blotting Detection Reagents“, ECL Advance Western Blotting Detection Reagents“ (GE Healthcare) und „Two Bottle Substrate“ (p.j.k.) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Die Signaldetektion erfolgte mit dem Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fuji Corp.) mit der dazugehörigen Software Image Reader LAS-4000 v2.0. Zur weiteren Bearbeitung wurde Multi Gauge (Fujifilm) und Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.) verwendet. Die Blots konnten nach „Vergiften“ der Peroxidaseaktivität des sekundären Antikörpers mittels 1-stündiger Inkubation der Blots in Milchpuffer (0,02% (w/v) Natriumazid) mit weiteren primären Antikörpern sondiert werden.

4.5.9. Detektion von Proteinen im SDS-Gel durch Autoradiografie

Zur Detektion von radioaktiv markierten Proteinen wurden diese wie beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Inkubation des Gels für 1h in Entfärbelösung wurde dieses auf WhatmanTM Papier (Schleicher & Schuell) getrocknet und durch Auflegen eines Phosphoimager-Schirms (Fuji Corp.) für mindestens 4h exponiert. Die autoradiographische Entwicklung erfolgte unter Verwendung eines FLA 7.000 Phosphoimagers (Fuji Corp.). Die weitere Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.) vorgenommen.

4.5.10. Silberfärbung von SDS-Gelen

Zur Silberfärbung von SDS-Gelen wurden diese nach der Elektrophorese mehrmals mit H₂O gespült und anschließend mit dem „PageSilver Silver Staining Kit“ (Fermentas) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Die Digitalisierung der Gele erfolgte durch direktes scannen (HP, Scanner), die Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.) vorgenommen.

4.5.11. Kolloidale Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit kolloidalem Coomassie erfolgte nach (Candiano et al., 2004). Dabei wurden SDS-Gele nach der Elektrophorese mehrmals mit H₂O gespült und dann über Nacht in kolloidalem Coomassie, dem kurz vor Gebrauch Methanol in einer Konzentration von 20% (v/v) zugesetzt worden war, bei RT inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch mehrtägige Inkubation in H₂O. Die Digitalisierung der Gele erfolgte durch direktes scannen (HP, Scanner), die Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.) vorgenommen.

4.5.12. Massenspektrometrische Analyse

Zur massenspektrometrischen Analyse wurden die Proteinproben zunächst durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und kolloidal Coomassie gefärbt (Punkt 4.5.11). Die Gele wurden durch Scannen (HP, Scanner) digitalisiert und mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. So konnten Bereiche markiert werden, welche später analysiert werden sollten. Die Gele wurden schließlich in H₂O gefüllte Entsorgungsbeutel (Roche) eingeschweißt und zur *Mass Spectrometry Core Facility* des Max Planck Instituts nach Martinsried verschickt, wo eine NanoLC-MS/MS-Analyse durchgeführt wurde. Hierbei wurden die Proteine aus dem SDS-Gel extrahiert, tryptisch verdaut, durch on-line nanoLC separiert und durch electrospray tandem Massenspektrometrie mittels eines LTQ Orbitrap Massenspektrometers analysiert.

4.6. *In vitro* Interaktions-Assay

4.6.1. Überprüfung des Proteinmodells von CapD3

Für den *in vitro* Assay wurde die einzelnen Condensin-Untereinheiten *in vitro* transkribiert und translatiert. Hierzu mussten entsprechende, *in vitro* transkribierbare Plasmide hergestellt werden. Da im *in vitro*-System kein mRNA-Spleißen stattfindet, mussten die Klonierungen ausgehend von cDNA-Klonen der einzelnen Condensin-Untereinheiten durchgeführt werden. Zur Amplifikation von *SMC4* wurde hierbei selbst hergestellte cDNA aus 4-8 Stunden alten Embryonen (Trunzer, persönliche Mitteilung) verwendet. Für die Amplifikation der weiteren Condensin-Komponenten wurden die in Tabelle 5 aufgeführten cDNA-Plasmide eingesetzt. Für CapH2 und CapD3 sind bei flybase (www.flybase.org) verschiedene Proteinmodelle vorgeschlagen, die auf unterschiedlichen Transkriptionsmodellen beruhen. Die Klonierung von CapH2 wurde basierend auf dem Proteinmodell PA durchgeführt. Entsprechend diesem Modell wurden auch die *UASP-mcherry-CapH2* und *UASP-EGFP-CapH2* transgenen Fliegen generiert (Pfeiffer, 2009; Häfner, 2009), deren Funktionalität in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (siehe Ergebnisse, Abschnitt 2.2.2.3). Für *CapD3* sind drei verschiedene Transkriptionsmodelle sowie deren korrespondierende Proteine vorgeschlagen (Abbildung 32). Modell A und B unterscheiden sich hierbei nur im Bereich der 5'UTR (*untranslated region*), die korrespondierenden Proteine CapD3-PA und CapD3-PB sind identisch. Dem Modell RC zu Folge sollte von einem verkürzten Transkript die Translationsinitiation erst im Exon 2 erfolgen, wobei ein N-terminal verkürztes Protein gebildet würde (CapD3-PC).

Um die Präsenz der CapD3-Transkripte in *D. melanogaster* zu prüfen, wurden mRNA's aus verschiedenen wildtypischen Fliegengewebe (*w*¹-Embryonen unterschiedlichen Alters, *w*¹-Fliegenweibchen, *w*¹-Fliegenmännchen) präpariert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Punkt 4.4.9). Diese cDNA's wurden schließlich als Matrizen für PCR-Reaktionen eingesetzt. Anhand der Amplifikation der cDNA für *RpL32* (*Ribosomal protein L32*), welches in allen Geweben gleich abundant transkribiert werden sollte, konnten die erhaltenen cDNA's der unterschiedlichen Fliegengewebe normiert werden. Es wurden ebenso der CapD3 cDNA-Klon *RE74832* und aus adulten *w*¹-Fliegen präparierte, genomische DNA (Punkt 4.4.8) als Matrizes für die PCR eingesetzt. Zur PCR-Amplifikation wurden die in Abbildung 32 angegebenen Primer eingesetzt, welche an verschiedenen Bereichen des *CapD3* anlagern. Durch Amplifikation mit dem Oligonukleotid-Paar SaHe18/SaHe19 konnte ein Produkt in den cDNA-Proben der frühen Embryonen und ein sehr schwaches Produkt in den cDNA-Proben der Fliegenmännchen erhalten werden, dessen Größe einer Amplifikation von cDNA gemäß der Transkriptionsmodelle RA bzw. RB entspricht. Die Klonierung der *CapD3-Konstrukte* wurde daher basierend auf dem Transkriptionsmodell RA bzw. RB vorgenommen, deren Proteinmodelle übereinstimmen.

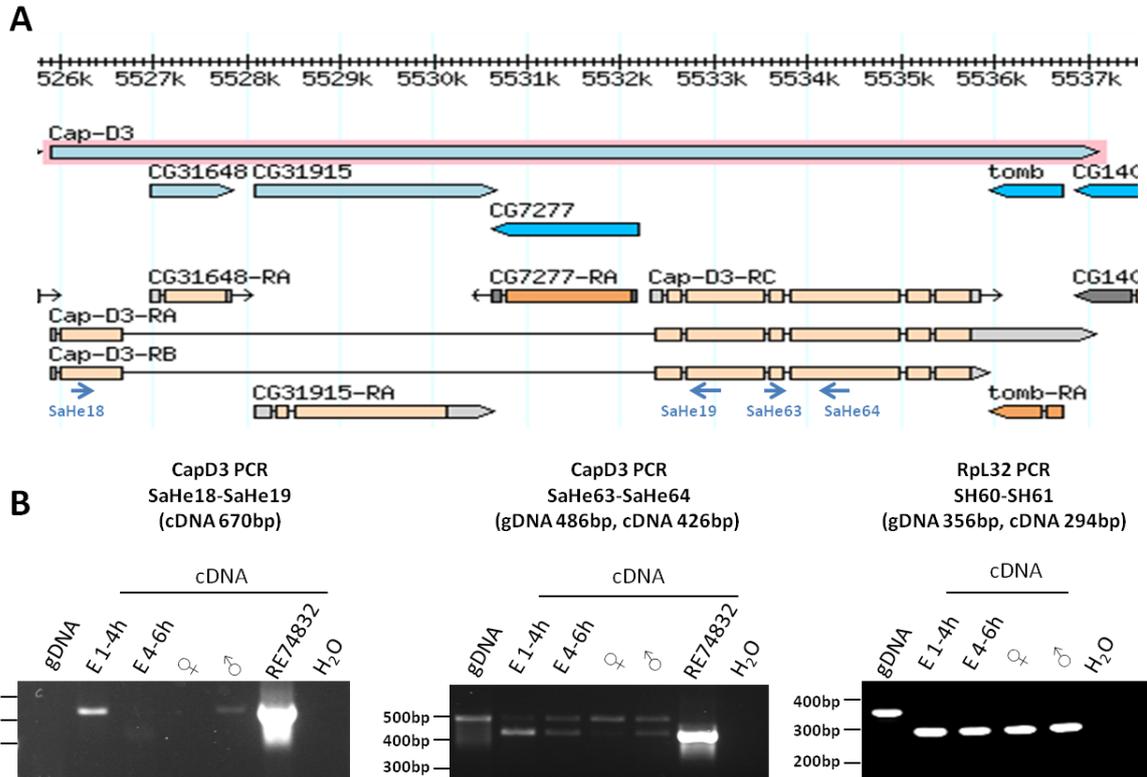


Abbildung 32: Genomische Region von *CapD3*. A) Genomische Region von *CapD3*. Die Grafik repräsentiert neben *CapD3* noch drei weitere Gene (in Blau), sowie deren vorgeschlagene Transkriptionsmodelle (in Orange). Es sind auch die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide angegeben. Entnommen von www.flybase.org. B) PCR Assay Überprüfung des Transkriptionsmodells von *CapD3*. Als Matrize für die PCR wurde aus adulten w^1 -Fliegen präparierte, genomische DNA (gDNA), das cDNA-Plasmid *RE74832* und cDNA-Proben eingesetzt, welche durch reverse Transkription von mRNA's aus 1-4 Stunden alten Fliegenembryonen (E 1-4h), aus 4-6 Stunden alten Fliegenembryonen (E 4-6h), Fliegenweibchen (♀) und Fliegenmännchen (♂) erhalten wurden. Die erwarteten PCR-Produkte bei Einsatz der angegebenen Oligonukleotid-Paare sind angegeben.

4.6.2. *In vitro* Transkription und Translation (IVT) mit anschließender Immunpräzipitation

Die gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation von Plasmid-DNA (IVT) wurde unter Verwendung des „TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System“ oder des „TNT SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei handelt es sich um auf Kaninchen-Retikulozytenlysate basierende Systeme, in welchen eine SP6 RNA-Polymerase eingesetzt wird. Die zu untersuchenden Gene konnten in diesen Systemen direkt kotranskribiert und die entsprechenden mRNA's kotranslatiert werden. Es wurden bis zu drei unterschiedliche Plasmide in einer Gesamtmenge von bis zu 2 µg Plasmid-DNA pro 25 µl IVT-Ansatz eingesetzt. Für *pCS2-CapG* wurden hierbei 1 µg Plasmid-DNA, für *pCS2-Securin-HFHF* 0,5-1 µg Plasmid-DNA und für alle weiteren Plasmide 0,5 µg Plasmid-DNA pro Ansatz verwendet. Zur radioaktiven Markierung von Proteinen wurde dem Reaktionsmix 1 mM [³⁵S]-markiertes Methionin (Hartmann Analytics; 1 Ci/ml) zugesetzt.

Da die zu untersuchenden Proteine zum Teil ein sehr ähnliches Laufverhalten bei SDS-Gelelektrophorese aufwiesen, wäre eine eindeutige Identifikation einzelner Proteine durch Autoradiografie nicht möglich gewesen. In einigen Experimenten wurden die zu untersuchenden Komponenten somit vorerst einzeln transkribiert und translatiert. Die nicht Epitop-markierten Konstrukte wurden in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin translatiert. Die jeweils als Köder fungierenden, Epitop-markierten Komponenten wurden hierbei nicht radioaktiv translatiert, da diese

durch Immunblotten unter Verwendung der entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden konnten. Für *pCS2-CapG* wurde hierbei 1 µg Plasmid-DNA, für alle weiteren Konstrukte 0,5 µg Plasmid-DNA pro 12,5 µl IVT-Ansatz eingesetzt. Nach der IVT wurden dann jeweils 12,5 µl der einzelnen IVT-Reaktionen durch auf- und abpipettieren miteinander gemischt. Den Ansätzen wurde ein 1 µl Aliquot entnommen und in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht (INPUT). Die restlichen Ansätze wurden einer Immunpräzipitation unter Verwendung einer entsprechenden Affinitätsmatrix unterzogen. Es wurden hierbei Maus-anti-Flag-Agarose (Sigma, A1080), Kaninchen-anti-myc-Agarose (Sigma, A7470) oder Maus-anti-myc-Sepharose (selbst hergestellt, Punkt 4.5.1.2) als Affinitätsmatrizes verwendet. Vor der Präzipitation wurden diese je dreimal mit dem 10-fachen Volumen Lysepuffer gewaschen. Es wurden jeweils 5 µl Affinitätsmatrix pro 25 µl IVT-Proteingemisch eingesetzt. Für die Immunpräzipitation wurden die Ansätze 3-4 Stunden bei 4°C auf einer Walze inkubiert. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, VWR Galax Mini, 20 sek) wurden die Überstände abgenommen. Den Ansätzen wurde wiederum 1 µl Aliquots entnommen und in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht (ÜB). Die Affinitätsmatrizes wurden dann dreimal mit 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen und 10 min mit gekühltem Lysepuffer unter Rotation bei 4°C inkubiert. Die gesamten Ansätze wurden schließlich in eine Mobicol-Säule (Mobictec) überführt. Durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 20 sek) konnten die Affinitätsmatrizes vom Puffer abgetrennt werden. Es wurden 40 µl SDS-Probenpuffer (ohne β-Mercaptoethanol) in die Mobicol-Säule gegeben und diese für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend konnten die Eluate durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 20 sek) von den Affinitätsmatrizes abgetrennt werden. Zu den Eluaten wurden schließlich 4 µl β-Mercaptoethanol (14,4M) gegeben und diese erneut 10 min bei 95°C inkubiert (IP). Es wurden jeweils 5-12 µl der aufgearbeiteten Proben für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Nach der Gelelektrophorese konnten markierte Proteine direkt im Gel über Autoradiografie oder nach vorherigem Westernblotten detektiert werden.

4.7. Programme zur Vorhersage von Proteinstruktur und Phosphorylierungsstellen

Computergenerierte Strukturanalysen der Aminosäuresequenz von CapG wurden mittels der Web-basierten Programme PSORT (<http://psort.hgc.jp>) und SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) vorgenommen. Phosphorylierungsstellen innerhalb der Aminosäuresequenz von CapG wurden durch die Web-basierten Programme SCANSITE (<http://scansite.mit.edu>) und NETPHOS (<http://www.embraceregistry.net/service/netphos-prediction-generic-hosphorylation-sites-eukaryotic-proteins>) analysiert.

4.8. Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer:	50% (v/v) Glycerin 0,1 M EDTA 0,02% (w/v) Xylencyanol 0,02% (w/v) Bromphenolblau 0,02% (w/v) SDS
EB-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8.0) 80 mM Na-β-glycerophosphat 20 mM EGTA 15 mM MgCl ₂ 2 mM Na ₃ VO ₄ 1mM Na ₂ S ₂ O ₅ 1 mM Benzamidin

Elutionspuffer:	50mM Tris/HCl, pH 6,8 2% (w/v) SDS
Montiermedium:	70% Glycerin 50 mM Tris/HCl (pH 9.5) 10 mg/ml Propylgallat 0,5 mg/ml p-Phenylendiamin in 1xPBS
Entfärbelösung:	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Fixierlösung:	0,5% (w/v) Nonidet P40 2% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS
kEB-Puffer:	10 mM Glycerin 2,7 mM β -Mercaptoethanol 3% (w/v) SDS 185 mM Tris/HCl, pH 8.8 0.01% (w/v) Bromphenolblau 50 mM NaF 20 mM EGTA, pH 8.0 2 mM Na_3VO_4 1mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
kolloidales Coomassie:	0,1% (w/v) Coomassie G-250 10% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12% (v/v) Phosphorsäure
LB-Medium:	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar
Lithiumchlorid/ Kaliumacetat-Lösung:	1,4 M KAc 4,3 M LiCl
Lysepuffer:	50 mM HEPES 60 mM NaCl 3 mM MgCl_2 1 mM CaCl_2 0,2% (w/v) Triton-X-100 0,2% (w/v) Nonidet NP40 10% (v/v) Glycerin pH 7,5 mit NaOH einstellen
bei Bedarf wurden hier Proteaseinhibitoren zugesetzt:	Pefablock (2 mM) Benzamidin (2 mM) Aprotinin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Leupeptin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Pepstatin A (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Milchpuffer:	5% (w/v) Magermilchpulver (Sucofin) in PBST

NaCl-Tx:	0,7% (w/v) NaCl 0,07% (w/v) Triton-X-100
1xPBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM KH ₂ PO ₄
PBTx:	1x PBS; 0.1% (w/v) Triton-X-100
PBST:	1x PBS; 0,2% (w/v) Tween-20
Puffer A:	100 mM Tris/HCl (pH 7.5) 100 mM EDTA 100 mM NaCl 0,5% (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer:	2,5 mM Tris (pH 8.3) 19,1 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer:	6% (w/v) SDS 0,3 M β-Mercaptoethanol 30% (v/v) Glycerin 0,3% (w/v) Bromophenolblau 0,15 M Tris/HCl (pH 6.8)
10x TBE buffer (1lit):	90 mM Tris 90 mM Borat 2,5 mM EDTA, pH 8.0
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
Transferpuffer:	200 mM Glycin 25mM Tris 20% (v/v) Methanol
WPS:	wie Lysepuffer, aber mit 300mM NaCl
WPD:	wie Lysepuffer, aber mit 0,4% (w/v) Nonidet NP40 und 0,4% (w/v) Triton-X-100
λ-Lysepuffer:	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM MnCl ₂ 20 mM Tris/HCl (pH 7,6) 0,1% (w/v) Triton-X-100 10% (v/v) Glycerin pH 7,5, mit HCl einstellen
bei Bedarf wurden hier Proteaseinhibitoren zugesetzt:	Pefablock (2 mM) Benzamidin (2 mM) Aprotinin (10 µg/ml) Leupeptin (10 µg/ml) Pepstatin A (2 µg/ml)

5. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AS	Aminosäure
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Cap	chromosome associated polypeptide
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
cDNA	<i>copy</i> -DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
Cdk	Cyclin abhängige Kinase
CPC	Chromosomaler <i>Passenger</i> Komplex
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
C(2)M	<i>crossover suppressor on 2 of Manheim</i>
C(3)G	<i>crossover suppressor on 3 of Gowen</i>
DCC	Dosiskompensationskomplex (engl. „ <i>Dosage compensation complex</i> “)
Df	Defizienz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FBS	fötale Kälberserum
Flag	Epitop-Anhang (AS-Sequenz: DYKDDDDK)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
Gal4	an der Regulation der Galaktoseverwertung beteiligter Transkriptionsfaktor der Hefe
GMR	<i>glass multiple repeat</i>
h	human oder Stunde
HEAT	<i>helical repeat protein domain (Huntingtin, elongation factor 3, PP2A-A, Tor1)</i>
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IVT	<i>In vitro</i> Transkription und Translation
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani (<i>E.coli</i> -Nährmedium)
μ	mikro
m	milli
M	Molar (mol/l)

MCS	Multiple Klonierstelle (engl. „ <i>Multiple Cloning Site</i> “)
mRFP1	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
min	Minuten
MT	Mikrotubuli
Myc	c-Myc Onkogen, Epitop-Anhang (AS-Sequenz: EQKLISEEDL)
n	nano
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
p. a.	pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEV	<i>Position effect variegation</i>
Plk1	Polo-ähnliche Kinase 1 (engl. „ <i>Polo-like kinase 1</i> “)
PCR	Polymerasekettenreaktion
POD	(Meerretich-)Peroxidase
PP2A	Proteinphosphatase 2A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAC	Spindelassemblierungs-Kontrollpunkt (engl. „ <i>Spindle Assembly Checkpoint</i> “)
SAP	Alkalische Phosphatase (engl. „ <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> “)
SDS	sodium dodecyl sulfat
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
U	Unit
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
vgl.	vergleiche
Wapl	engl. „ <i>Wings apart-like</i> “
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>

6. Referenzen

- Anderson, D.E., A. Losada, H.P. Erickson und T. Hirano. 2002. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol.* 156:419-424.
- Aono, N., T. Sutani, T. Tomonaga, S. Mochida und M. Yanagida. 2002. Cnd2 has dual roles in mitotic condensation and interphase. *Nature.* 417:197-202.
- Aurich, F. 2009. Etablierung und Charakterisierung von transgenen *Drosophila melanogaster*-Linien und Untersuchung der Funktion des Condensin-Komplexes. Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Bachellier-Bassi, S., O. Gadal, G. Bourout und U. Nehrass. 2008. Cell cycle-dependent kinetochores localization of condensin complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Struct Biol.* 162:248-259.
- Ball, A.R., Jr., J.A. Schmiesing, C. Zhou, H.C. Gregson, Y. Okada, T. Doi und K. Yokomori. 2002. Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol Cell Biol.* 22:5769-5781.
- Bazett-Jones, D.P., K. Kimura und T. Hirano. 2002. Efficient supercoiling of DNA by a single condensin complex as revealed by electron spectroscopic imaging. *Mol Cell.* 9:1183-1190.
- Bazile, F., J. St-Pierre und D. D'Amours. 2010. Three-step model for condensin activation during mitotic chromosome condensation. *Cell Cycle.* 9:3243-3255.
- Belmont, A.S., J.W. Sedat und D.A. Agard. 1987. A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchical organization. *J Cell Biol.* 105:77-92.
- Bhalla, N., S. Biggins und A.W. Murray. 2002. Mutation of YCS4, a budding yeast condensin subunit, affects mitotic and nonmitotic chromosome behavior. *Mol Biol Cell.* 13:632-645.
- Bhat, M.A., A.V. Philp, D.M. Glover und H.J. Bellen. 1996. Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell.* 87:1103-1114.
- Bischof, J., R.K. Maeda, M. Hediger, F. Karch und K. Basler. 2007. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3312-3317.
- Brand, A.H. und N. Perrimon. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118:401-415.
- Braun, R.E. 2001. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet.* 28:10-12.
- Brennecke, J., A.A. Aravin, A. Stark, M. Dus, M. Kellis, R. Sachidanandam und G.J. Hannon. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* 128:1089-1103.
- Buffin, E., D. Emre und R.E. Karess. 2007. Flies without a spindle checkpoint. *Nat Cell Biol.* 9:565-572.
- Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi und P.G. Righetti. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 25:1327-1333.
- Carpenter, A.J. und A.C. Porter. 2004. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell.* 15:5700-5711.
- Cenci, G., S. Bonaccorsi, C. Pisano, F. Verni und M. Gatti. 1994. Chromatin and microtubule organization during premeiotic, meiotic and early postmeiotic stages of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *J Cell Sci.* 107 (Pt 12):3521-3534.
- Chan, R.C., A.F. Severson und B.J. Meyer. 2004. Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions. *J Cell Biol.* 167:613-625.
- Chuang, P.T., D.G. Albertson und B.J. Meyer. 1994. DPY-27: a chromosome condensation protein homolog that regulates *C. elegans* dosage compensation through association with the X chromosome. *Cell.* 79:459-474.

- Ciosk, R., W. Zachariae, C. Michaelis, A. Shevchenko, M. Mann und K. Nasmyth. 1998. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*. 93:1067-1076.
- Cobbe, N., E. Savvidou und M.M. Heck. 2006. Diverse mitotic and interphase functions of condensins in *Drosophila*. *Genetics*. 172:991-1008.
- Cohen-Fix, O., J.M. Peters, M.W. Kirschner und D. Koshland. 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev*. 10:3081-3093.
- Csankovszki, G., K. Collette, K. Spahl, J. Carey, M. Snyder, E. Petty, U. Patel, T. Tabuchi, H. Liu, I. McLeod, J. Thompson, A. Sarkeshik, J. Yates, B.J. Meyer und K. Hagstrom. 2009. Three distinct condensin complexes control *C. elegans* chromosome dynamics. *Curr Biol*. 19:9-19.
- Cuylen, S. und C.H. Haering. 2011. Deciphering condensin action during chromosome segregation. *Trends Cell Biol*. 21:552-559
- Cuylen, S., J. Metz und C.H. Haering. 2011. Condensin structures chromosomal DNA through topological links. *Nat Struct Mol Biol*. 18(8):894-901
- de Cuevas, M., M.A. Lilly und A.C. Spradling. 1997. Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*. 31:405-428.
- Dej, K.J., C. Ahn und T.L. Orr-Weaver. 2004. Mutations in the *Drosophila* condensin subunit dCAP-G: defining the role of condensin for chromosome condensation in mitosis and gene expression in interphase. *Genetics*. 168:895-906.
- Drabent, B., C. Bode, B. Bramlage und D. Doenecke. 1996. Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem Cell Biol*. 106:247-251.
- Dürr, J. 2004. Biochemische Charakterisierung der Kinetochorkomponente CID aus *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Earnshaw, W.C., B. Halligan, C.A. Cooke, M.M. Heck und L.F. Liu. 1985. Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol*. 100:1706-1715.
- Earnshaw, W.C. und M.M. Heck. 1985. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J Cell Biol*. 100:1716-1725.
- Edgar, B.A., C.P. Kiehle und G. Schubiger. 1986. Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* development. *Cell*. 44:365-372.
- Edgar, B.A. und G. Schubiger. 1986. Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development. *Cell*. 44:871-877.
- Eickbush, T.H. und E.N. Moudrianakis. 1978. The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry*. 17:4955-4964.
- Eissenberg, J.C., T.C. James, D.M. Foster-Hartnett, T. Hartnett, V. Ngan und S.C. Elgin. 1990. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:9923-9927.
- Evan, G.I., G.K. Lewis, G. Ramsay und J.M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*. 5:3610-3616.
- Fazio, T.G. und B. Panning. 2010. Condensin complexes regulate mitotic progression and interphase chromatin structure in embryonic stem cells. *J Cell Biol*. 188:491-503.
- Fischer, S. 2010. Untersuchungen zur Dynamik der Condensin-Untereinheiten Cap-D2 und SMC2 aus *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Frank, M. 2008. Untersuchung zur Struktur und Funktion der Condensin-Untereinheit CapG aus *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Freeman, L., L. Aragon-Alcaide und A. Strunnikov. 2000. The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J Cell Biol*. 149:811-824.
- Fujimoto, S., M. Yonemura, S. Matsunaga, T. Nakagawa, S. Uchiyama und K. Fukui. 2005. Characterization and dynamic analysis of *Arabidopsis* condensin subunits, AtCAP-H and AtCAP-H2. *Planta*. 222:293-300.

- Fuller, M.T. 1993. Spermatogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 71-147 pp.
- Gandhi, R., P.J. Gillespie und T. Hirano. 2006. Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol.* 16:2406-2417.
- Gasser, S.M., T. Laroche, J. Falquet, E. Boy de la Tour und U.K. Laemmli. 1986. Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol.* 188:613-629.
- Geiss-Friedlander, R. und F. Melchior. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:947-956.
- Giet, R. und D.M. Glover. 2001. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol.* 152:669-682.
- Gorbsky, G.J. 1994. Cell cycle progression and chromosome segregation in mammalian cells cultured in the presence of the topoisomerase II inhibitors ICRF-187 [(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane; ADR-529] and ICRF-159 (Razoxane). *Cancer Res.* 54:1042-1048.
- Gorr, I.H., D. Boos und O. Stemmann. 2005. Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell.* 19:135-141.
- Greenspan, R.J. 1997. Fly Pushing. The theory and practice of Drosophila genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Gruber, S., C.H. Haering und K. Nasmyth. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell.* 112:765-777.
- Guacci, V., D. Koshland und A. Strunnikov. 1997. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell.* 91:47-57.
- Haering, C.H., A.M. Farcas, P. Arumugam, J. Metson und K. Nasmyth. 2008. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature.* 454:297-301.
- Häfner, R. 2010. Untersuchungen zu in vitro Interaktionen der Condensin-Untereinheiten aus *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Hagstrom, K.A., V.F. Holmes, N.R. Cozzarelli und B.J. Meyer. 2002. *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* 16:729-742.
- Hagstrom, K.A. und B.J. Meyer. 2003. Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nat Rev Genet.* 4:520-534.
- Hammond, S.M., S. Boettcher, A.A. Caudy, R. Kobayashi und G.J. Hannon. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* 293:1146-1150.
- Hartl, T.A., H.F. Smith und G. Bosco. 2008a. Chromosome alignment and transvection are antagonized by condensin II. *Science.* 322:1384-1387.
- Hartl, T.A., S.J. Sweeney, P.J. Knepler und G. Bosco. 2008b. Condensin II resolves chromosomal associations to enable anaphase I segregation in *Drosophila* male meiosis. *PLoS Genet.* 4:e1000228.
- Hartman, T., K. Stead, D. Koshland und V. Guacci. 2000. Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 151:613-626.
- Hauf, S., E. Rötinger, B. Koch, C.M. Dittrich, K. Mechtler und J.M. Peters. 2005. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* 3:e69.
- Heale, J.T., A.R. Ball, Jr., J.A. Schmiesing, J.S. Kim, X. Kong, S. Zhou, D.F. Hudson, W.C. Earnshaw und K. Yokomori. 2006. Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair. *Mol Cell.* 21:837-848.
- Henikoff, S., K. Ahmad, J.S. Platero und B. van Steensel. 2000. Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:716-721.
- Herzig. 1999. Untersuchungen zu Wechselwirkungen der *Drosophila melanogaster* Proteine Pimples und Three Rows. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.

- Herzog, S. 2007. Untersuchungen zu Interaktionen der chromosomalen Proteine CID und CapG in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Hirano, M., D.E. Anderson, H.P. Erickson und T. Hirano. 2001. Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *EMBO J.* 20:3238-3250.
- Hirano, T. 2005. Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol.* 15:R265-275.
- Hirano, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:311-322.
- Hirano, T., R. Kobayashi und M. Hirano. 1997. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein. *Cell.* 89:511-521.
- Hirano, T. und T.J. Mitchison. 1994. A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell.* 79:449-458.
- Hirota, T., D. Gerlich, B. Koch, J. Ellenberg und J.M. Peters. 2004. Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J Cell Sci.* 117:6435-6445.
- Hudson, D.F., K.M. Marshall und W.C. Earnshaw. 2009. Condensin: Architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* 17:131-144.
- Hudson, D.F., S. Ohta, T. Freisinger, F. Macisaac, L. Sennels, F. Alves, F. Lai, A. Kerr, J. Rappsilber und W.C. Earnshaw. 2008. Molecular and genetic analysis of condensin function in vertebrate cells. *Mol Biol Cell.* 19:3070-3079.
- Hudson, D.F., P. Vagnarelli, R. Gassmann und W.C. Earnshaw. 2003. Condensin is required for nonhistone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes. *Dev Cell.* 5:323-336.
- Hutvagner, G. und M.J. Simard. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:22-32.
- Ivanov, D. und K. Nasmyth. 2007. A physical assay for sister chromatid cohesion in vitro. *Mol Cell.* 27:300-310.
- Jäger, H., M. Rauch und S. Heidmann. 2005. The Drosophila melanogaster condensin subunit Cap-G interacts with the centromere-specific histone H3 variant CID. *Chromosoma.* 113:350-361.
- James, T.C. und S.C. Elgin. 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene. *Mol Cell Biol.* 6:3862-3872.
- Jayaramaiah Raja, S. und R. Renkawitz-Pohl. 2005. Replacement by Drosophila melanogaster protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Mol Cell Biol.* 25:6165-6177.
- Jeppesen, P., A. Mitchell, B. Turner und P. Perry. 1992. Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. *Chromosoma.* 101:322-332.
- Karr, T.L. 1991. Intracellular sperm/egg interactions in Drosophila: a three-dimensional structural analysis of a paternal product in the developing egg. *Mech Dev.* 34:101-111.
- Kellum, R., J.W. Raff und B.M. Alberts. 1995. Heterochromatin protein 1 distribution during development and during the cell cycle in Drosophila embryos. *J Cell Sci.* 108 (Pt 4):1407-1418.
- Kimura, K., O. Cuvier und T. Hirano. 2001. Chromosome condensation by a human condensin complex in Xenopus egg extracts. *J Biol Chem.* 276:5417-5420.
- Kimura, K. und T. Hirano. 1997. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell.* 90:625-634.
- Kimura, K. und T. Hirano. 2000. Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11972-11977.
- Kireeva, N., M. Lakonishok, I. Kireev, T. Hirano und A.S. Belmont. 2004. Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J Cell Biol.* 166:775-785.

- Kitajima, T.S., T. Sakuno, K. Ishiguro, S. Iemura, T. Natsume, S.A. Kawashima und Y. Watanabe. 2006. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature*. 441:46-52.
- Knoblich, J.A. und C.F. Lehner. 1993. Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *EMBO J.* 12:65-74.
- Kramer. 1999. Untersuchungen zur Regulation der *dacapo*-Expression in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Lenart, P., M. Petronczki, M. Steegmaier, B. Di Fiore, J.J. Lipp, M. Hoffmann, W.J. Rettig, N. Kraut und J.M. Peters. 2007. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol.* 17:304-315.
- Lewis, C.D. und U.K. Laemmli. 1982. Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell.* 29:171-181.
- Li, G. und D. Reinberg. 2011. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 21:175-186.
- Lindsley, D.L.u.Z., G.G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, New York.
- Lipp, J.J., T. Hirota, I. Poser und J.M. Peters. 2007. Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J Cell Sci.* 120:1245-1255.
- Longworth, M.S., A. Herr, J.Y. Ji und N.J. Dyson. 2008. RBF1 promotes chromatin condensation through a conserved interaction with the Condensin II protein dCAP-D3. *Genes Dev.* 22:1011-1024.
- Losada, A., M. Hirano und T. Hirano. 1998. Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 12:1986-1997.
- Lupo, R., A. Breiling, M.E. Bianchi und V. Orlando. 2001. *Drosophila* chromosome condensation proteins Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain Fab-7 PRE silencing. *Mol Cell.* 7:127-136.
- Machin, F., K. Paschos, A. Jarmuz, J. Torres-Rosell, C. Pade und L. Aragon. 2004. Condensin regulates rDNA silencing by modulating nucleolar Sir2p. *Curr Biol.* 14:125-130.
- Maeshima, K. und U.K. Laemmli. 2003. A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell.* 4:467-480.
- Marsden, M.P. und U.K. Laemmli. 1979. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell.* 17:849-858.
- Meistrich, M.L., B. Mohapatra, C.R. Shirley und M. Zhao. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma.* 111:483-488.
- Mellone, B.G., K.J. Grive, V. Shteyn, S.R. Bowers, I. Oderberg und G.H. Karpen. 2011. Assembly of *Drosophila* centromeric chromatin proteins during mitosis. *PLoS Genet.* 7:e1002068.
- Meyer, B.J. 2005. X-Chromosome dosage compensation. *WormBook*:1-14.
- Meyer, G. 1960. The fine structure of spermatocyte nuclei of *Drosophila melanogaster*. In European regional Conference on Electron Microscopy.
- Michaelis, C., R. Ciosk und K. Nasmyth. 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell.* 91:35-45.
- Micklem, D.R., R. Dasgupta, H. Elliott, F. Gergely, C. Davidson, A. Brand, A. Gonzalez-Reyes und D. St Johnston. 1997. The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila*. *Curr Biol.* 7:468-478.
- Mirkovitch, J., M.E. Mirault und U.K. Laemmli. 1984. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell.* 39:223-232.
- Miyoshi, K., H. Tsukumo, T. Nagami, H. Siomi und M.C. Siomi. 2005. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.* 19:2837-2848.
- Montell, D.J. 2001. Command and control: regulatory pathways controlling invasive behavior of the border cells. *Mech Dev.* 105:19-25.
- Montell, D.J., P. Rorth und A.C. Spradling. 1992. slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP. *Cell.* 71:51-62.

- Mora-Bermudez, F., D. Gerlich und J. Ellenberg. 2007. Maximal chromosome compaction occurs by axial shortening in anaphase and depends on Aurora kinase. *Nat Cell Biol.* 9:822-831.
- Murphy, L.A. und K.D. Sarge. 2008. Phosphorylation of CAP-G is required for its chromosomal DNA localization during mitosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 377:1007-1011.
- Murray, A.W. und J.W. Szostak. 1985. Chromosome segregation in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Biol.* 1:289-315.
- Musacchio, A. und K.G. Hardwick. 2002. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:731-741.
- 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. Dissertation am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Nasmyth, K. und C.H. Haering. 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem.* 74:595-648.
- Nasmyth, K. und C.H. Haering. 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet.* 43:525-558.
- Neuwald, A.F. und T. Hirano. 2000. HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res.* 10:1445-1452.
- Niki, H., A. Jaffe, R. Imamura, T. Ogura und S. Hiraga. 1991. The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* 10:183-193.
- O'Donnell, K.H., C.T. Chen und P.C. Wensink. 1994. Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* alpha 1-tubulin gene. *Mol Cell Biol.* 14:6398-6408.
- Ohsumi, K., C. Katagiri und T. Kishimoto. 1993. Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science.* 262:2033-2035.
- Oliveira, R. 2007. Condensins and mitotic chromosome structure: functional and dynamic analysis in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, University Coimbra.
- Oliveira, R.A., P.A. Coelho und C.E. Sunkel. 2005. The condensin I subunit Barren/CAP-H is essential for the structural integrity of centromeric heterochromatin during mitosis. *Mol Cell Biol.* 25:8971-8984.
- Oliveira, R.A., S. Heidmann und C.E. Sunkel. 2007. Condensin I binds chromatin early in prophase and displays a highly dynamic association with *Drosophila* mitotic chromosomes. *Chromosoma.* 116:259-274.
- Onn, I., N. Aono, M. Hirano und T. Hirano. 2007. Reconstitution and subunit geometry of human condensin complexes. *EMBO J.* 26:1024-1034.
- Ono, T., Y. Fang, D.L. Spector und T. Hirano. 2004. Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell.* 15:3296-3308.
- Ono, T., A. Losada, M. Hirano, M.P. Myers, A.F. Neuwald und T. Hirano. 2003. Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell.* 115:109-121.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard und P. Chambon. 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell.* 4:281-300.
- Page, S.L. und R.S. Hawley. 2003. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science.* 301:785-789.
- Panizza, S., T. Tanaka, A. Hochwagen, F. Eisenhaber und K. Nasmyth. 2000. Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr Biol.* 10:1557-1564.
- Paulson, J.R. und U.K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell.* 12:817-828.
- Pek, J.W. und T. Kai. 2011. A role for vasa in regulating mitotic chromosome condensation in *Drosophila*. *Curr Biol.* 21:39-44.
- Peters, A.H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia und T. Jenuwein. 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 107:323-337.

- Petrushenko, Z.M., W. She und V.V. Rybenkov. 2011. A new family of bacterial condensins. *Mol Microbiol.* 81:881-896.
- Pfeiffer, A. 2009. Untersuchungen zur Überexpression der Condensin II–Untereinheit Cap-H2 in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Razin, S.V. 1996. Functional architecture of chromosomal DNA domains. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 6:247-269.
- Reithinger, J. 2009. Herstellung und Charakterisierung von Antisera gegen die Condensin-Untereinheit Cap-G aus *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik. Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Renshaw, M.J., J.J. Ward, M. Kanemaki, K. Natsume, F.J. Nedelec und T.U. Tanaka. 2010. Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation. *Dev Cell.* 19:232-244.
- Resnick, T.D., K.J. Dej, Y. Xiang, R.S. Hawley, C. Ahn und T.L. Orr-Weaver. 2009. Mutations in the chromosomal passenger complex and the condensin complex differentially affect synaptonemal complex disassembly and metaphase I configuration in *Drosophila* female meiosis. *Genetics.* 181:875-887.
- Ribeiro, S.A., J.C. Gatlin, Y. Dong, A. Joglekar, L. Cameron, D.F. Hudson, C.J. Farr, B.F. McEwen, E.D. Salmon, W.C. Earnshaw und P. Vagnarelli. 2009. Condensin regulates the stiffness of vertebrate centromeres. *Mol Biol Cell.* 20:2371-2380.
- Richmond, T.J., J.T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes und A. Klug. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature.* 311:532-537.
- Roberts, D.B. 1998. *Drosophila – A practical approach*. Oxford university press, Oxford.
- Rorth, P. 1998. Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev.* 78:113-118.
- Rubin, G.M. und A.C. Spradling. 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* 218:348-353.
- Ruchaud, S., M. Carmena und W.C. Earnshaw. 2007. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:798-812.
- Saitoh, N., I.G. Goldberg, E.R. Wood und W.C. Earnshaw. 1994. ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J Cell Biol.* 127:303-318.
- Saka, Y., T. Sutani, Y. Yamashita, S. Saitoh, M. Takeuchi, Y. Nakaseko und M. Yanagida. 1994. Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *EMBO J.* 13:4938-4952.
- Sakaguchi, A. und A. Kikuchi. 2004. Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase. *J Cell Sci.* 117:1047-1054.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. In Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samoshkin, A., A. Arnaoutov, L.E. Jansen, I. Ouspenski, L. Dye, T. Karpova, J. McNally, M. Dasso, D.W. Cleveland und A. Strunnikov. 2009. Human condensin function is essential for centromeric chromatin assembly and proper sister kinetochore orientation. *PLoS One.* 4:e6831.
- Sauer, K., J.A. Knoblich, H. Richardson und C.F. Lehner. 1995. Distinct modes of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* 9:1327-1339.
- Savvidou, E., N. Cobbe, S. Steffensen, S. Cotterill und M.M. Heck. 2005. *Drosophila* CAP-D2 is required for condensin complex stability and resolution of sister chromatids. *J Cell Sci.* 118:2529-2543.
- Schittenhelm, R.B., S. Heeger, F. Althoff, A. Walter, S. Heidmann, K. Mechtler und C.F. Lehner. 2007. Spatial organization of a ubiquitous eukaryotic kinetochore protein network in *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma.* 116:385-402.
- Schleiffer, A., S. Kaitna, S. Maurer-Stroh, M. Glotzer, K. Nasmyth und F. Eisenhaber. 2003. Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol Cell.* 11:571-575.
- Sedat, J. und L. Manuelidis. 1978. A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 42 Pt 1:331-350.

- Shen, X., L. Yu, J.W. Weir und M.A. Gorovsky. 1995. Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell*. 82:47-56.
- Spradling, A.C. und G.M. Rubin. 1982. Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes. *Science*. 218:341-347.
- St-Pierre, J., M. Douziech, F. Bazile, M. Pascariu, E. Bonneil, V. Sauve, H. Ratsima und D. D'Amours. 2009. Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. *Mol Cell*. 34:416-426.
- Steffensen, S., P.A. Coelho, N. Cobbe, S. Vass, M. Costa, B. Hassan, S.N. Prokopenko, H. Bellen, M.M. Heck und C.E. Sunkel. 2001. A role for Drosophila SMC4 in the resolution of sister chromatids in mitosis. *Curr Biol*. 11:295-307.
- Stemmann, O., H. Zou, S.A. Gerber, S.P. Gygi und M.W. Kirschner. 2001. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell*. 107:715-726.
- Stevens, L.M., H.G. Frohnhofer, M. Klingler und C. Nusslein-Volhard. 1990. Localized requirement for torso-like expression in follicle cells for development of terminal Anlagen of the Drosophila embryo. *Nature*. 346:660-663.
- Suau, P., E.M. Bradbury und J.P. Baldwin. 1979. Higher-order structures of chromatin in solution. *Eur J Biochem*. 97:593-602.
- Sullivan, W., Ashburner, M., Hawley, R.S. 2000. Drosophila Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sumara, I., E. Vorlaufer, C. Gieffers, B.H. Peters und J.M. Peters. 2000. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*. 151:749-762.
- Sundin, O. und A. Varshavsky. 1980. Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell*. 21:103-114.
- Sutani, T., T. Yuasa, T. Tomonaga, N. Dohmae, K. Takio und M. Yanagida. 1999. Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev*. 13:2271-2283.
- Tada, K., H. Susumu, T. Sakuno und Y. Watanabe. 2011. Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature*. 474:477-483.
- Takemoto, A., K. Kimura, J. Yanagisawa, S. Yokoyama und F. Hanaoka. 2006. Negative regulation of condensin I by CK2-mediated phosphorylation. *EMBO J*. 25:5339-5348.
- Takemoto, A., K. Maeshima, T. Ikehara, K. Yamaguchi, A. Murayama, S. Imamura, N. Imamoto, S. Yokoyama, T. Hirano, Y. Watanabe, F. Hanaoka, J. Yanagisawa und K. Kimura. 2009. The chromosomal association of condensin II is regulated by a noncatalytic function of PP2A. *Nat Struct Mol Biol*. 16:1302-1308.
- Talbert, P.B. und S. Henikoff. 2006. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nat Rev Genet*. 7:793-803.
- Tavormina, P.A., M.G. Come, J.R. Hudson, Y.Y. Mo, W.T. Beck und G.J. Gorbsky. 2002. Rapid exchange of mammalian topoisomerase II alpha at kinetochores and chromosome arms in mitosis. *J Cell Biol*. 158:23-29.
- Uhlmann, F., D. Wernic, M.A. Poupart, E.V. Koonin und K. Nasmyth. 2000. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell*. 103:375-386.
- Viera, A., R. Gomez, M.T. Parra, J.A. Schmiesing, K. Yokomori, J.S. Rufas und J.A. Suja. 2007. Condensin I reveals new insights on mouse meiotic chromosome structure and dynamics. *PLoS One*. 2:e783.
- Volkov, A., J. Mascarenhas, C. Andrei-Selmer, H.D. Ulrich und P.L. Graumann. 2003. A prokaryotic condensin/cohesin-like complex can actively compact chromosomes from a single position on the nucleoid and binds to DNA as a ring-like structure. *Mol Cell Biol*. 23:5638-5650.
- Waizenegger, I.C., S. Hauf, A. Meinke und J.M. Peters. 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*. 103:399-410.
- Wang, L. und P. Ligoxygakis. 2006. Pathogen recognition and signalling in the Drosophila innate immune response. *Immunobiology*. 211:251-261.

- Weiss, A., A. Herzig, H. Jacobs und C.F. Lehner. 1998. Continuous Cyclin E expression inhibits progression through endoreduplication cycles in *Drosophila*. *Curr Biol.* 8:239-242.
- Wen, H., L. Andrejka, J. Ashton, R. Karess und J.S. Lipsick. 2008. Epigenetic regulation of gene expression by *Drosophila* Myb and E2F2-RBF via the Myb-MuvB/dREAM complex. *Genes Dev.* 22:601-614.
- Wignall, S.M., R. Deehan, T.J. Maresca und R. Heald. 2003. The condensin complex is required for proper spindle assembly and chromosome segregation in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol.* 161:1041-1051.
- Wodarz, A., U. Hinz, M. Engelbert und E. Knust. 1995. Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell.* 82:67-76.
- Xing, H., D.C. Wilkerson, C.N. Mayhew, E.J. Lubert, H.S. Skaggs, M.L. Goodson, Y. Hong, O.K. Park-Sarge und K.D. Sarge. 2005. Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science.* 307:421-423.
- Yamamoto, A., V. Guacci und D. Koshland. 1996. Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 133:85-97.
- Yamazoe, M., T. Onogi, Y. Sunako, H. Niki, K. Yamanaka, T. Ichimura und S. Hiraga. 1999. Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 18:5873-5884.
- Yeong, F.M., H. Hombauer, K.S. Wendt, T. Hirota, I. Mudrak, K. Mechtler, T. Loregger, A. Marchler-Bauer, K. Tanaka, J.M. Peters und E. Ogris. 2003. Identification of a subunit of a novel Kleisin-beta/SMC complex as a potential substrate of protein phosphatase 2A. *Curr Biol.* 13:2058-2064.
- Yin, H. und H. Lin. 2007. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 450:304-308.
- Yong-Gonzalez, V., B.D. Wang, P. Butylin, I. Ouspenski und A. Strunnikov. 2007. Condensin function at centromere chromatin facilitates proper kinetochore tension and ensures correct mitotic segregation of sister chromatids. *Genes Cells.* 12:1075-1090.
- Yoshimura, S.H., K. Hizume, A. Murakami, T. Sutani, K. Takeyasu und M. Yanagida. 2002. Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer. *Curr Biol.* 12:508-513.
- Yu, H.G. und D. Koshland. 2005. Chromosome morphogenesis: condensin-dependent cohesin removal during meiosis. *Cell.* 123:397-407.
- Yu, H.G. und D.E. Koshland. 2003. Meiotic condensin is required for proper chromosome compaction, SC assembly, and resolution of recombination-dependent chromosome linkages. *J Cell Biol.* 163:937-947.
- Zatsepina, O.V., V. Poliakov und S. Chentsov lu. 1983. [Electron microscopic study of the chromonema and chromomeres in mitotic and interphase chromosomes]. *Tsitologiya.* 25:123-129.
- Zhao, J. 2007. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci.* 64:3017-3033.
- Zou, H., T.J. McGarry, T. Bernal und M.W. Kirschner. 1999. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science.* 285:418-422.

7. Anhang

Zusammenstellung der durch die Massenspektrometrie identifizierten Proteine der untersuchten Präzipitate in alphabetischer Reihenfolge. Identifizierte Proteine nach Immunpräzipitation aus CapG-mRFP1-Embryonenextrakten (**A1**), CapG-mRFP1-Ovarienextrakten (**A2**) und w^1 -Ovarienextrakten (**A3**) durch Kaninchen-anti-mRFP Sepharose. Den Extrakten der w^1 -Ovarien war bakteriell exprimiertes mRFP1-Protein zugesetzt worden. Identifizierte Proteine nach Immunpräzipitation aus EGFP-SMC4 enthaltenden Ovarienextrakten durch Kaninchen-anti-EGFP Sepharose (**A4**), sowie nach Immunpräzipitation aus mcherry-CapH2 und EGFP-CapH2 enthaltenden Ovarienextrakten durch Kaninchen-anti-mcherry Sepharose bzw. Kaninchen-anti-EGFP Sepharose (**A5**). Die durch die Massenspektrometrie erfassten Daten der in den Präzipitaten identifizierten Proteine wurden wie in Abschnitt (siehe Ergebnisse 2.2.2.1) prozessiert. Angegeben sind alle verbliebenen Proteine in alphabetischer Reihenfolge, die Spezifität ihrer Peptidmassenzuordnung (Coverage), ihr Molekulargewicht (MW), der gemittelte Wert des Gelbereiches, in dem die meisten Peptide identifiziert wurden (SA), die Anzahl der Peptide, die dem entsprechendem Protein zugeordnet werden konnten (PEP), sowie die Intensität mit der die Peptide identifiziert wurden (INT). In grau sind die im Text erwähnten Proteine hervorgehoben.

A1) CapG-mRFP1-Embryonen Orbi 0112

Protein	Coverage [%]	MW[kDa]	SA	PEP CapG	PEP w^1	INT CapG	INT w^1
Act5C-PA	41,2	42	6,6	17	57	1660500	27681000
alphaTub67C-PA	19,7	51	5,0	3	7	539520	1183600
alphaTub84B-PA	31,1	50	5,5	14	24	2258500	10668000
ATPsyn-beta-PA	40	54	6,0	8	16	619220	2259300
barr-PA;barr-PB	34,6	83	5,2	34		29572000	0
betaTub56D-PB	45,4	50	5,7	33	60	4094900	31003000
blw-PA	20,5	59	6,2	8	11	590120	2405000
CAP-D2-PA;bnI-PA	37,5	158	3,5	158	1	84385000	25022
Cap-G-PA	5,8	132	3,6	11		971730	0
Cctgamma-PA	17,5	59	5,0	4	10	326840	790040
CG11700-PA;CG32744-PA;Ubi-p63E-PA	22,6	34	5,4	22	20	4574000	3875400
CG15092-PA	11,6	36	6,6	3	9	347000	892580
CG6439-PA	7,8	40	7,0	2	3	121650	384930
CG6459-PA	7,2	29	8,0	2	1	625080	66440
CG6842-PA	5,4	50	3,3	7	9	828710	810100
CG6904-PA	9,9	82	5,0	6	4	482910	344180
CG8010-PA	23	44	5,0	9	10	1798000	2724800
CG8258-PA	7,7	59	5,0	2	2	97323	93201
CG8863-PA;	9,4	45	6,3	2	5	135860	535960
CG9461-PA	6,9	125	4,3	11	7	891880	525910
Chc-PA	17	191	3,0	15	26	1092100	3492100
CLIP-190-PA	20,9	189	2,3	2	47	1644500	4116600
cul-2-PA;cul-2-PB	13,8	87	5,0	8	11	833400	1411900
dap-PA	6,1	27	5,5	10	10	2295500	1982100
didum-PA	27,2	207	2,3	6	64	841530	12049000
Ef1alpha48D-PA	23,3	50	6,6	9	19	1653600	7225300
Ef2b-PA	10	94	5,0	9	4	1188700	478270
gammaTub37C-PA	19,9	51	6,0	5	11	322620	2260900
glu-PA	48,8	160	2,2	198	1	126540000	0
His2A:CG31618-PA	7,3	13	6,0	3	4	777640	605240
His2B:CG17949-PA	20,3	14	8,8	2	3	115230	63971
His4:CG31611-PA	17,5	11	7,4	2	5	165190	349330
Hsc70-3-PA;	25,8	72	5,0	18	17	4011800	3941500
Hsc70-4-PA	54,2	71	5,1	52	56	36548000	37354000
Hsc70-5-PA	7,1	74	6,1	8	8	772400	618480
Hsp26-PA	17,3	23	8,0	2	3	102560	219150
Hsp83-PA	10,2	82	5,0	6	6	896170	636140
Imp-PA	10,1	62	5,0	4	1	300780	27498
Jafrac1-PA;Jafrac1-PB	5,7	22	5,2	9	6	556250	381910
jar-PA	32,2	144	3,7	14	89	1440200	22498000
l(1)G0022-PA	12,2	58	5,0	5	5	410100	871480
l(1)G0156-PA;CG32026-PA	25,4	39	7,0	8	12	706560	2112500
mod(mdg4)-PF;mod(mdg4)-PA	13,6	59	5,0	7	6	421560	753840
Nap1-PA	13	43	5,6	3	6	200650	1003400
oho23B-PA	62,7	9	9,4	3	4	338160	492760
pAbp-PA	33,1	70	5,3	25	26	3823800	5736900
Pat1-PA	7,3	79	5,0	3	8	419550	1209100
Pcmt-PA	27	25	8,0	8	11	2749500	7217600
piwi-PA	5,9	97	5,0	5	2	569770	188080
pont-PA	16	50	5,0	3	7	324970	683170
Qm-PA;Qm-PB	14,7	26	7,9	5	5	1541000	2027200
Rack1-PA	25,5	36	7,0	10	9	3236700	3220900
r-PA;r-PB	6,1	247	1,6	13	13	1331600	1576100
sesB-PA	32,1	33	7,8	17	13	11578000	7376300
SMC2-PA	48,5	134	4,2	121	4	101560000	93326

Anhang

SmD3-PA	12,6	16	9,0	2	2	118470	226150
sop-PA	15	29	7,3	6	8	2591400	4090400
sta-PA;sta-PB;sta-PD	33,3	30	7,0	10	12	2597500	4642000
T-cp1-PA;T-cp1-PB	16,2	60	5,0	3	7	113770	700860
Tm1-PA	8,7	29	5,6	10	10	1037200	994390
Yp1-PA	22,6	49	6,5	12	10	1386200	1991500
Yp2-PA	30,3	52	6,5	17	15	2094400	2932200
Yp3-PA	26	46	6,7	15	14	3387200	4325100
zip-PB	33,1	231	1,0	2	76	36963	19344000

A2) CapG-mRFP1-Ovarien Orbi 1060

Protein	Coverage [%]	MW[kDa]	SA	PEP CapG	PEP w ¹	INT CapG	INT w ¹
14-3-3epsilon;14-3-3e;SR3-	48,1	30	2,3	11	19	1780500	8730700
26-29-p;26-29kD-	24,2	62	3,07	10	20	1602500	4477000
Aats-asp;CG3821;Dmel_CG3821	5,5	59	3,67	2	1	64743	57906
Act57B;CG10067	31,4	42	3,1	9	52	7763500	129060000
Act87E;CG18290;Act88F;CG5178;Ac	6,4	42	2,67	4	2	889800	8154700
alphaCop;alpha-COP;alpha-	24,7	139	5	6	29	649960	7131200
alpha-Spec;SPEC-A;CG1977	71,1	278	5,72	28	394	2409600	513690000
alphaTub67C;TubA67C;CG8308	34,6	51	3,43	10	11	4506500	3553200
alphaTub84D;TubA84D;CG2512;alp	53,1	50	3,27	37	26	26099000	24056000
aret;bruno;CG31762	18,7	65	4	3	12	259880	2563700
ATPsyn-beta;CG11154	32,1	54	3,33	8	13	1420400	3401800
aub;aubergine;sting;CG6137;Dmel	27,4	99	4,22	7	20	527280	5472800
ball;Dmel_CG6386	12	66	4	6	5	848200	625530
Bap;BAD1;CG12532;Dmel_CG1253	5,5	101	4,38	2	6	84169	1054400
barr;CG10726	41,5	83	4,52	58	0	33304000	0
BcDNA.GH02678;CG6842;Dmel_CG	24,2	50	3,74	6	13	560620	2564500
BcDNA.GH07774;CG5366	7,9	139	5	7	11	518970	1720600
BcDNA.LD23634;CG4119;Dmel_CG	14,8	113	5	10	7	921290	975380
bel;CG9748	29,4	85	4,03	20	16	3606900	3620000
ben;UbcD3;CG18319	17,9	17	1	2	0	100080	0
betaCop;CG6223	17,3	107	4,14	2	12	199120	2342300
beta'Cop;CG6699	16,8	103	4,31	5	11	516660	3080900
beta-Spec;Spec-b;CG5870	61	266	5,63	8	304	433600	329380000
betaTub56D;Dmel_CG9277	57,9	50	3,46	83	51	58024000	35158000
betaTub97EF;beta-	14	59	3,47	9	8	4600700	2539800
BicC;CG4824	22,2	98	4,35	8	18	761300	5662300
blw;ATPSYN-ALPHA;CG3612	31,2	59	3,29	18	16	5286700	8166700
bor;CP89BC	24,3	68	4,1	11	10	1953800	3138500
Borr;CG4454	9,4	35	3	3	2	363730	299200
CaBP1;CG5809;Dmel_CG5809	14,3	47	3,17	6	6	1512400	2109700
Cam;CG8472	74,5	17	1	12	28	2321000	25665000
CAP-D2;CG1911;Dmel_CG1911	34,4	158	5,76	85	0	56621000	0
Cap-G;CG34438;Dmel_CG34438	4,5	154	6	6	0	922630	0
Cbp80;CG7035;Dmel_CG7035	6,4	93	4,14	3	4	273960	565330
Cctgamma;CCT-3;Cctg;CG8977	17,8	59	4	4	6	378210	699310
CG10077	35,2	88	4,05	13	28	3901900	20116000
CG10237;Dmel_CG10237	5,2	38	3	2	0	177160	0
CG10306	15,3	26	2	2	3	386570	610940
CG10971;Dmel_CG10971	7,7	128	5	9	2	470470	126820
CG11107;Dmel_CG11107	12,8	83	4	3	11	198800	2746700
CG11198;Dmel_CG11198	13,3	288	6	26	19	4539600	3712800
CG11876;Dmel_CG11876	16,7	39	2,29	2	5	198490	845940
CG11882	6,5	30	3	3	0	543410	0
CG11943	15,6	235	6	2	30	43446	7469700
CG11999;Dmel_CG11999	26,4	24	2	5	4	1419100	719730
CG12163	11,1	69	2,12	3	5	243180	435050
CG12262	18,6	46	3	4	8	583010	1571000
CG12264	18,2	51	3	7	5	1889400	834050
CG1249	32,8	14	1	2	6	253530	1235400
CG13083-	13	35	3	5	5	2213300	3006300
CG13084;Dmel_CG13084	25,6	51	3,55	12	8	2710100	3747100
CG13900	11,2	137	5	6	10	343580	1267800
CG13903;CG32479;Dmel_CG32479	6,2	165	6	2	8	76673	1068600
CG14309;Dmel_CG14309	13,1	111	3,44	5	13	426580	2821100
CG14834;Dmel_CG14834	7,9	46	1,86	3	4	1105200	1490800
CG15092;Dmel_CG15092	22,8	36	3,11	18	9	4031000	2367900
CG15721;Dmel_CG15721	9,7	93	6	4	4	445070	780040
CG16892;Dmel_CG16892	6,4	52	3	2	3	14775	356670
CG17018;Dmel_CG17018	17,2	148	5,03	8	22	959360	5219100
CG17255	5,7	236	5,79	2	12	72050	1057600
CG18067;Dmel_CG18067	8,6	26	2	2	1	325360	230850
CG1837;Dmel_CG1837	13,9	47	3	3	6	463970	960040
CG18811;Dmel_CG18811	12,2	104	5	3	11	195720	2355600
CG2118;Dmel_CG2118	8,6	77	3,75	4	4	275230	216110
CG2807;Dmel_CG2807	10,1	150	5	3	10	181460	1038600
CG2982;Dmel_CG2982	9,3	73	4	2	6	87155	1191200
CG3074;Dmel_CG3074	11,8	49	3	3	3	592480	488760
CG32306;Dmel_CG32306	22,1	237	5,26	4	86	46568	26119000

Anhang

CG3364;CG30159;Dmel_CG30159	12,1	28	2	2	4	213220	632580
CG3509;Dmel_CG3509	5,9	39	3	2	0	117260	0
CG3909;Dmel_CG3909	10,9	36	2,5	2	2	252920	227840
CG4038	10,1	23	2	2	2	237530	863370
CG4164;Dmel_CG4164	16,9	40	3	6	4	1317700	368540
CG4169;Dmel_CG4169	5,9	45	3	2	2	155270	250300
CG4849;Dmel_CG4849	15,1	111	4,8	5	15	232440	2606900
CG4857;Dmel_CG4857	7,8	200	5,95	9	10	642980	1931100
CG5174;Dmel_CG5174	12,4	39	2	2	4	83703	416110
CG5261;Dmel_CG5261	6,8	54	3,6	3	2	402650	369710
CG5525;Dmel_CG5525	14,1	57	3,43	7	7	1821600	1551700
CG5642;Dmel_CG5642	8,3	63	3,78	4	5	872550	732470
CG5931	15,5	245	6	8	25	392000	4603900
CG6439;Dmel_CG6439	15,9	40	3	4	4	871950	547460
CG6459;Dmel_CG6459	28,5	29	2	2	8	522520	3943200
CG6904	37,7	82	4	13	27	4003300	19828000
CG7033;Dmel_CG7033	11	58	4	3	4	388400	538720
CG7461;Dmel_CG7461	11,3	71	4	2	7	135200	1250100
CG7834;Dmel_CG7834	7,1	27	2	2	0	118590	0
CG7911;Dmel_CG7911	18,6	17	2	2	2	447250	362970
CG8010;Dmel_CG8010	25,1	44	3,82	15	23	7136200	13190000
CG8031;Dmel_CG8031	6,1	33	2,4	3	2	334850	468670
CG8036;Dmel_CG8036	5,4	68	4	2	2	99226	256950
CG8199;Dmel_CG8199	6,6	50	3	3	3	383480	337360
CG8258;Dmel_CG8258	13,4	59	3,91	5	6	518180	682980
CG8303;Dmel_CG8303	7,7	62	3,67	4	2	567060	601070
CG8351;Dmel_CG8351	8,5	59	3,5	3	3	336850	412370
CG8507;Dmel_CG8507	18,5	45	3	5	7	1222800	2418600
CG8578;Dmel_CG8578	59,3	45	3	3	21	213790	8811200
CG8636;Dmel_CG8636	8,9	30	2	3	2	285470	161150
CG8863;Dmel_CG8863	44,7	45	3	19	15	10761000	8311900
CG8963;Dmel_CG8963	12,7	63	4	4	7	546360	1608900
CG9281	26	70	4	14	15	2574400	3089800
CG9461	8,6	125	5	6	8	563790	1500800
CG9769;Dmel_CG9769	22,9	31	2	5	5	1476300	1683300
CG9911;Dmel_CG9911	10	47	3	2	3	220530	434900
CG9953	13,6	57	3,56	2	14	227460	2427100
Chc;CG9012	28,6	191	5,2	10	55	2887200	17832000
cher;CG3937;Dmel_CG3937	64,7	239	5,34	7	222	327240	181100000
ck;CG7595	41,6	250	5,76	7	135	429110	74212000
CklIbeta;Dmel_CG15224	10,6	27	2	3	4	178790	571720
CLIP-190;CG5020	47,9	189	5,68	46	134	7108000	60268000
coro;CG9446;Dmel_CG9446	45,5	57	3,78	6	35	568050	25967000
Cp1;fs(2)50Ca;CG6692	33,4	42	2,56	6	21	1263600	8734600
Cp19;s19;CG6524	47,4	19	1	4	6	878780	1248400
Cp38;s38;CG1121	25,5	30	2,25	8	16	1904500	6929900
cul-2;CG1512;Dmel_CG1512	56,8	87	4,04	49	64	34056000	60057000
cup;fs(2)cup;CG11181	38,3	127	4,99	33	55	6231100	20119000
dec-1;CG2175	46,5	137	3,66	12	179	4668500	135510000
deltaCOP;delta-	13,3	58	4	2	6	142750	1214200
dhd;Trx-1;CG4193	30,8	12	1	5	5	599500	564810
didum;Dmel_CG2146	59,7	208	5,58	67	275	15956000	375100000
Dp1;Dmel_CG5170	9,4	144	5,15	2	11	114900	1293800
Ef1alpha48D;EF1B;F1;CG8280;Ef1aI	39,1	50	3,27	39	47	63100000	73740000
Ef1beta;CG6341	23,4	29	2	4	6	590270	2750700
Ef1gamma;Ef1g;CG11901	24,8	49	3	3	10	627610	4941000
Ef2b;CG2238	44,5	94	4,12	30	42	6871400	20037000
EG:25E8.1;CG2918;Dmel_CG2918	11,3	103	5	5	9	610150	1638500
eIF-3p40	16,6	38	3	4	3	408520	546390
eIF-3p66;CG10161	9,5	64	4	3	4	742620	1365600
eIF3-S10;CG9805	20,3	134	5	16	24	1912200	4109100
eIF3-S8;Dmel_CG4954	11,1	106	4,71	8	16	944350	1689600
eIF3-S9;Dmel_CG4878	16,8	80	4	12	11	2015000	2378800
eIF-4a;eIF4A;(2L)162;CG9075	15,1	46	3	3	5	210690	1625700
eIF4AIII;CG7483	34,8	46	3,12	8	17	1178400	5694100
eIF-4E;Dmel_CG4035	41,7	29	2,88	6	11	1200000	2709600
eIF-4G;Dmel_CG10811	32,3	211	5,52	35	102	4319900	29368000
Elongin-B;CG4204;Dmel_CG4204	64,4	13	1	7	7	2113600	1704500
Elongin-C;CG9291;Dmel_CG9291	41	13	1	4	8	383130	1157400
exu;CG8994	31,2	58	3,96	9	17	3627700	17366000
Fer2LCH;CG1469	12,3	25	1,88	3	5	186750	412070
Fib;CG9888	41	35	2,96	7	16	871630	6782900
FK506-bp1;FKBP39;CG6226	28,3	39	3,12	6	19	330250	3399500
gammaCop	18,1	98	4	5	16	392470	4012900
gammaTub37C;Tub37CD;TubG2;Tu	34,4	51	3,39	13	20	3623500	8515800
Glt;CG9280	17,5	119	5,05	24	20	4192100	10591000
glu;CG11397	47,3	160	5,9	104	0	100370000	0
gnu;CG5272;Dmel_CG5272	7,5	27	2	2	2	188000	340490
Grip75;75p;CG6176	8,8	75	4	2	6	58591	1011300
Grip84;Dmel_CG3917	13	107	4	4	11	415010	2963200
growl;CG14648	48,1	60	4	19	23	7026200	13785000
His2B;His2B;CG17949;CG17949;His	43,1	14	1,52	10	15	4517400	15253000
His3.3A;CG5825;His3.3B;CG8989;Hi	15,4	15	2,33	3	6	515490	3204300
His4;H4;His4r;H4r;CG3379;His4:CG	51,5	11	1,65	4	13	865080	12667000

Anhang

hoip;CG3949	36,2	14	1	2	3	424530	1987100
Hrb27C;hrp48;Rbp7;CG10377	30,4	45	3	7	19	1566200	6216300
Hsc70-3;Hsc3;CG4147	45,1	72	3,99	27	40	18853000	43022000
Hsc70-4;Hsc4;CG4264	63,3	71	3,88	86	101	133400000	269390000
Hsc70-5;Hsc5;CG8542	32,9	74	3,85	16	23	2325300	8339900
Hsp26;CG4183	53,8	23	2	14	15	9501100	24070000
Hsp27;CG4466	54,5	24	2	11	14	4792400	12144000
Hsp60;Mmp-P1;CG12101	36,5	61	3,97	8	21	1620100	6335200
Hsp83;Hsp82;CG1242	36,7	82	4,07	18	23	4072100	9275100
hyx;CG11990;Dmel_CG11990	5,9	61	4	2	2	175420	166710
Imp;CG1691	28,3	62	4	3	16	394400	3370400
Int6;CG9677	11	51	3	6	5	919270	1214000
ird5;DIK;CG4201	16,2	86	4	9	14	1266600	2217500
Jafrac1;TPX-1;CG1633	10,8	22	2,43	5	2	615060	286940
Jafrac2;CG1274;Dmel_CG1274	31,8	27	2	11	7	5098600	2116400
jar;Mhc95F;CG5695	60,7	145	4,88	71	225	34039000	428380000
key;IKKGAMMA;CG16910	15	44	3	5	4	602110	593680
Klp3A;EG:BACR25B3.9;CG8590;Dm	12,5	136	5	4	13	75538	1611300
Kr-h2;CG9159	14,5	31	2	3		216630	0
l(1)dd4;CG10988	14,5	104	4,18	5	12	382670	3152200
l(1)G0022;CG8231;Dmel_CG8231	16,9	58	4	6	9	865840	2667800
l(1)G0156;CG12233	46,9	41	2,94	17	19	6734800	9215200
l(2)tid;CG5504	18,3	56	3	4	5	452380	96800
LanA;lamA;CG10236	6,2	411	5,79	14	15	1184500	1991700
LanB1;lamB1;CG17123	16,3	198	5,8	17	27	2667000	6354200
LanB2;LAMC1;LAMG1;CG3322	23,4	182	5,33	27	34	6232000	10478000
larp;Dmel_CG14066	13,2	151	5,78	15	17	1843700	2931900
lic;MKK3;p38MAPKK;CG12244;Dme	15,3	38	3	4	2	490540	304740
lva;CG6450	60,3	316	5,8	103	230	21780000	154450000
me31B;CG4916	66,4	52	3,12	35	42	13635000	32885000
Mlc2;CG2184	50	24	1,92	2	22	469370	9451300
Mlc-c;CG3201	52,4	17	1,05	6	13	3002700	31469000
mtrm;anon-D52;CG18543	29,5	25	2	3	5	577740	1088600
mtSSB;lopo;CG4337	63	16	1	6	13	2106800	7455600
Myo31DF;CG7438	27,3	117	4,75	2	30	128550	5261600
Myo61F;Dmel_CG9155	53,1	121	4,61	34	131	12823000	134940000
Nap1;CG5330	38,1	43	3,31	18	30	4750300	34601000
Ndg;Dmel_CG12908	12,6	151	5,41	10	19	1054800	4647400
NHP2;CG5258	18,1	18	1	2	4	122100	1715920
Nipsnap;CG9212	7,3	32	2	2	1	648830	199470
Nlp;CRP1;CG7917	23,7	17	2	2	4	299670	1000800
nop5;Dnop5;CG10206	49,3	57	3,96	3	21	406470	9200600
Nop56;CG13849	24	55	3,3	6	14	890570	7093100
Nop60B;mfl;CG3333	13	57	3,6	3	12	201610	2188300
Nup170;CG6743	17,6	97	4	7	14	616840	4077900
Nup358;CG11856	16,3	296	5,54	17	55	2689000	14955000
oho23B;rpS21;CG2986;Dmel_CG29	63,9	9	1	5	7	1707700	4442200
pAbp;CG5119	60,3	70	3,75	49	67	25549000	78034000
Pat1;CG10695;Dmel_CG10695	39,8	79	4,01	40	48	31463000	45880000
Pdi;CG6988	9,7	56	3,33	2	4	201010	507810
pen;CG1685	8,5	81	4,11	2	7	201420	1235200
Pen;CG4799	13	58	3,89	3	6	421160	811780
piwi;CG6122	39,3	97	4	12	34	1659000	10232000
pix;CG5651;Dmel_CG5651	11,8	69	4	2	6	140330	1242400
pont;CG4003	47,1	50	3,56	18	16	10504000	6327800
Pp2A-29B;CG17291	10,3	65	3,83	6	6	1036500	772050
PpV;PPPv6A;CG12217	6,6	35	2	2	2	188880	187960
Pros26.4;P26s4;CG5289	10,5	49	3,43	3	4	206400	294200
Pros28.1;PROS-28.1;CG3422	14,5	28	2	4	3	256480	246420
Pros29;PROS-29;CG9327	7,6	29	2	3	3	297590	432240
Prosalpha6;CG18495	32,8	27	2	8	5	2520100	873540
Prosalpha7;CG1519	16,6	28	2	2	3	85016	288530
prp8;Dmel_CG8877	7,6	280	6	11	17	780590	3123400
pUf68;hfp;CG12085	11,8	68	4	4	6	555470	1413000
PyK;CG7070	27,8	57	3,79	11	3	3009300	586980
Qm;Rpl10;CG17521	38,8	28	2,1	22	19	15263000	33973000
r;CG18572	23,1	247	5,91	37	37	8097100	11827000
Rab1;CG3320;Dmel_CG3320	10,2	23	2	2	2	144060	104630
Rack1;CG7111	63,5	36	2,16	25	31	14793000	58550000
Ranbp9;CG5252;Dmel_CG5252	11,4	114	5	6	11	632110	1462300
REG;CG1591;Dmel_CG1591	13,5	28	2	3	1	338570	34482
rept;CG9750	35,3	54	3,49	19	16	6648900	5573400
RfaBp	15,1	373	5,4	8	42	900130	9904200
rig;CG30149	5,7	138	5	6	5	616030	678800
Rm62;Dmel_CG10279	15,2	79	3,43	4	10	362830	1500700
Roc1a;CG16982	22,2	13	1	2	2	250970	691190
Scsalpha;CG1065	15,5	34	2,8	2	3	122970	295060
Scs-fp;CG17246	13,2	72	4	4	6	334770	852260
sesB;A/A-T;CG16944	59,6	34	2,02	19	28	16205000	45981000
slmb;slimb;CG3412	8	59	3,33	2	4	89802	327090
SmB;CG5352	22,1	21	1,73	4	7	547890	1479000
SMC2;CG10212;Dmel_CG10212	52,2	134	5	105	0	101770000	0
SmD3;guf2;CG8427	12,6	16	1	2	2	575460	1102600
sop;RpS2;CG5920	50,6	29	2,07	18	26	16997000	46994000

Anhang

sqh;CG3595	64,9	20	1,11	6	21	1371900	18501000
Srp68;CG5064	5,3	69	4	2	4	69339	302090
sta;CG14792	60,7	35	2,87	20	25	16498000	44612000
Su(var)3-9;KMT1;CG6476	20	51	3	5	7	517780	965210
swa;CG3429	60,2	62	3,98	2	42	156840	22583000
Tango7;CG8309	6,2	44	3	2	2	311310	444230
T-cp1;CCT-1;Tcp-1;CG5374	22,8	60	4	6	9	918250	2275700
Thiolase;CG4581	21,7	51	3	8	10	1966300	3294200
Tm2;Tml;CG4843	71,5	33	2,77	17	75	3427800	86344000
TppII;CG3991	11,5	159	5,04	7	16	419850	1792700
tral;BEST:GH08269;CG10686;Dmel	38,8	69	4,04	23	28	11865000	21185000
Trip1;DmTRIP;CG8882	17,5	36	3	5	4	511180	598990
U2af50;CG9998	8,4	47	3	2	1	345520	49038
Vha55;CG17369	11,2	55	3,33	2	7	232160	1201300
wupA;HDP;Tnl;CG7178	38,9	24	1,97	11	22	2697300	42672000
yellow-g;Dmel CG5717	28,2	43	3	3	9	373510	3097500
Yp1;CG2985	43,7	49	3,88	45	67	13410000	53108000
Yp2;CG2979	50,9	50	3,48	34	61	14614000	72422000
Yp3;CG11129	68,3	46	3,52	46	55	28376000	90561000
yps;CG5654	41,8	38	3,47	15	17	2911000	6062500
zip;CG15792	65,1	237	5,5	160	537	76121000	1188800000
	45,1	25	2	23	21	11791000	10589000

A3) w¹-Ovarien Orbi 1060

Protein	Coverage [%]	[kDa]	SA	PEP	INT
14-3-3epsilon;14-3-3e;SR3-9;CG31196	48,1	30	2,3	19	8730700
26-29-p;26-29kd-proteinase;CG8947	24,2	62	3,07	20	4477000
Aats-ile;CG11471;Dmel CG11471	9,9	141	5	12	1520700
Act42A;CG12051	10,1	42	3	5	5253000
Act57B;CG10067	31,4	42	3,1	52	129060000
Act5C;CG4027	77,9	42	3,26	208	1046100000
Act87E;CG18290;Act88F;CG5178;Act79B;CG7478	6,4	42	2,67	2	8154700
Actn;fliA;l(1)2Cb;CG4376	36,8	104	4	35	10184000
alpha-Adaptin;CG4260	13,6	106	4	12	2078700
alpha-Cat;CG17947	29,1	102	4,82	40	6277300
alphaCop;alpha-COP;CG7961	24,7	139	5	29	7131200
alpha-Spec;SPEC-A;CG1977	71,1	278	5,72	394	513690000
alphaTub67C;TubA67C;CG8308	34,6	51	3,43	11	3553200
alphaTub84D;TubA84D;CG2512;alphaTub84B;tubA8	53,1	50	3,27	26	24056000
alt;CG18212	8,6	99	5	7	923280
Ank;Dmel CG1651	9,6	170	5	11	1541800
AnnIX;AnxB9;CG5730	38	36	2	13	21126000
AnnX;CG9579	27,2	36	2	8	1120500
Anxb11;Dmel CG9968	34,5	36	2,27	15	4044800
AP-2sigma;AP-2-sigma;CG6056	10,6	17	1	2	267050
AP-50;AP50;CG7057;Dmel CG7057	5,3	50	3	2	131820
Aph-4;CG1462	7,7	65	4	4	470140
Arc-p20;CG5972;Dmel CG5972	30,4	20	1	6	1352000
Arc-p34;CG10954	25,9	35	2	7	2069000
aret;bruno;CG31762	18,7	65	4	12	2563700
arm;CG11579	26,3	91	3,9	20	6005600
Arp14D;Actr14D;CG9901	6,3	45	3,33	5	1723400
Arp66B;Actr66B;CG7558	27,8	47	3	10	2698200
Arcp3A;Dmel CG4560	17,4	22	1	3	328700
ATPsyn-beta;CG11154	32,1	54	3,33	13	3401800
ATPsyn-gamma;CG7610	7,7	33	2	2	183900
Atx2;CG5166	8,8	118	5	9	1429200
aub;aubergine;sting;CG6137	27,4	99	4,22	20	5472800
bai;CG11785;Dmel CG11785	10,7	24	1	2	244870
ball;Dmel CG6386	12	66	4	5	625530
Bap;BAD1;CG12532;Dmel CG12532	5,5	101	4,38	6	1054400
baz;bazooka;CG5055	14,3	157	5,56	24	4567000
BcDNA.GH02678;CG6842;Dmel CG6842	24,2	50	3,74	13	2564500
BcDNA.GH07774;CG5366	7,9	139	5	11	1720600
BcDNA.GH07921;CG8108	7,2	103	5	6	771480
BcDNA.LD23634;CG4119	14,8	113	5	7	975380
BcDNA.LD24702;CG17286	5,1	125	5	5	283140
BcDNA.GH03163;CG31012	17,5	92	4,79	14	2544400
bel;CG9748	29,4	85	4,03	16	3620000
betaCop;CG6223	17,3	107	4,14	12	2342300
beta'Cop;CG6699	16,8	103	4,31	11	3080900
beta-Spec;Spec-b;CG5870	61	266	5,63	304	329380000
betaTub56D;Dmel CG9277	57,9	50	3,46	51	35158000
betaTub97EF;beta-Tub97EF;CG4869	14	59	3,47	8	2539800
BicC;CG4824	22,2	98	4,35	18	5662300
bif;bifocal	54,8	130	4,67	102	40179000
blw;ATPSYN-ALPHA;CG3612	31,2	59	3,29	16	8166700
bor;CP89BC	24,3	68	4,1	10	3138500
Borr;CG4454	9,4	35	3	2	299200
CaBP1;CG5809;Dmel CG5809	14,3	47	3,17	6	2109700
Cam;CG8472	74,5	17	1	28	25665000

Anhang

cathD;CG1548;Dmel_CG1548	33,9	42	3	8	1614400
Cbp80;CG7035;Dmel_CG7035	6,4	93	4,14	4	565330
Cctgamma;CCT-3;Cctg;CG8977	17,8	59	4	6	699310
CG10077	35,2	88	4,05	28	20116000
CG10103;Dmel_CG10103	5	46	3	2	451450
CG10306	15,3	26	2	3	610940
CG10527	24,3	32	2	8	5970800
CG10576	5,6	43	3	2	93536
CG10627;Dmel_CG10627	7,5	61	4	3	381140
CG10882;Dmel_CG10882	9,9	129	5	10	1960300
CG10971;Dmel_CG10971	7,7	128	5	2	126820
CG11092;Dmel_CG11092	24,4	94	4	18	4130400
CG11107;Dmel_CG11107	12,8	83	4	11	2746700
CG11198;Dmel_CG11198	13,3	288	6	19	3712800
CG11875;Dmel_CG11875	10,6	35	2	3	471350
CG11876;Dmel_CG11876	16,7	39	2,29	5	845940
CG11943	15,6	235	6	30	7469700
CG11999;Dmel_CG11999	26,4	24	2	4	719730
CG12026;Dmel_CG12026	11,7	30	2	3	253960
CG12163	11,1	69	2,12	5	435050
CG12262	18,6	46	3	8	1571000
CG12264	18,2	51	3	5	834050
CG12398;Dmel_CG12398	23,9	71	4	11	4241800
CG1249	32,8	14	1	6	1235400
CG12702;Dmel_CG12702	27	97	3,95	20	5321700
CG12703;Dmel_CG12703	8,3	75	4	4	570650
CG12928;Dmel_CG12928	15,1	31	4,5	4	682070
CG13083-RB;CG13083;Dmel_CG13083	13	35	3	5	3006300
CG13084;Dmel_CG13084	25,6	51	3,55	8	3747100
CG13117;Dmel_CG13117	50,9	12	1	4	710530
CG13220;Dmel_CG13220	9,2	16	1	2	87978
CG13321;Dmel_CG13321	19,2	31	2	4	378410
CG1381;Dmel_CG1381	12,5	29	2	3	339650
CG13900	11,2	137	5	10	1267800
CG13903;CG32479;Dmel_CG32479	6,2	165	6	8	1068600
CG14309;Dmel_CG14309	13,1	111	3,44	13	2821100
CG14516;Dmel_CG14516	6,9	115	5	6	746720
CG14542	7	27	1,67	2	506050
CG14816	21,1	33	2	5	1237600
CG14834;Dmel_CG14834	7,9	46	1,86	4	1490800
CG15092;Dmel_CG15092	22,8	36	3,11	9	2367900
CG15293;Dmel_CG15293	22,5	37	3	6	2079500
CG15721;Dmel_CG15721	9,7	93	6	4	780040
CG16892;Dmel_CG16892	6,4	52	3	3	356670
CG17018;Dmel_CG17018	17,2	148	5,03	22	5219100
CG17202	12,7	20	2	2	391730
CG17255	5,7	236	5,79	12	1057600
CG17266;Dmel_CG17266	10,9	20	1	2	72985
CG17272;Dmel_CG17272	25,5	17	1	4	580340
CG17494;Dmel_CG17494	5,5	104	5	5	522920
CG17514	6,1	294	6	14	2292700
CG1837;Dmel_CG1837	13,9	47	3	6	960040
CG18811;Dmel_CG18811	12,2	104	5	11	2355600
CG1893	8	30	2	2	363640
CG2118;Dmel_CG2118	8,6	77	3,75	4	216110
CG2158;Dmel_CG2158	8,5	59	3,5	4	647660
CG2556;Dmel_CG2556	17,7	51	3,54	13	5585100
CG2807;Dmel_CG2807	10,1	150	5	10	1038600
CG2982;Dmel_CG2982	9,3	73	4	6	1191200
CG30185;Gr59f;CG30185;Dmel_CG30185	10,6	20	1	2	99317
CG30377;Dmel_CG30377	8,2	96	4,14	7	897330
CG30492;Dmel_CG30492	25,1	103	4,84	30	8015100
CG3074;Dmel_CG3074	11,8	49	3	3	488760
CG32056;Dmel_CG32056	6,2	44	3	3	874610
CG32306;Dmel_CG32306	22,1	237	5,26	86	26119000
CG32644;Dmel_CG32644	6	63	5,33	6	343030
CG33224;CG4040;Dmel_CG4040	5,4	68	5	3	129380
CG3364;CG30159;Dmel_CG30159	12,1	28	2	4	632580
CG3529;Dmel_CG3529	5,3	58	4	3	382060
CG3662	5,3	36	1	2	112860
CG3689;Dmel_CG3689	11,8	27	2	2	341310
CG3800;Dmel_CG3800	20,6	18	1	2	82839
CG3902	5,1	45	3	2	186080
CG3909;Dmel_CG3909	10,9	36	2,5	2	227840
CG4038	10,1	23	2	2	863370
CG4066;Dmel_CG4066	7,3	64	5	4	2620300
CG4164;Dmel_CG4164	16,9	40	3	4	368540
CG4169;Dmel_CG4169	5,9	45	3	2	250300
CG4389;Dmel_CG4389	10,1	84	4	6	718760
CG4612;Dmel_CG4612	7,2	34	2	2	174400
CG4618;Dmel_CG4618	15,6	24	2	3	479620
CG4670;Dmel_CG4670	7,2	72	4	5	724520
CG4692	17,8	12	1	2	199810
CG4738	8,6	160	5	11	1973300

Anhang

CG4849;Dmel_CG4849	15,1	111	4,8	15	2606900
CG4857;Dmel_CG4857	7,8	200	5,95	10	1931100
CG4991;Dmel_CG4991	6,5	51	4,2	5	895040
CG5174;Dmel_CG5174	12,4	39	2	4	416110
CG5261;Dmel_CG5261	6,8	54	3,6	2	369710
CG5525;Dmel_CG5525	14,1	57	3,43	7	1551700
CG5642;Dmel_CG5642	8,3	63	3,78	5	732470
CG5706	8,8	66	4	5	1216400
CG5726;Dmel_CG5726	8,5	87	4,17	5	1023100
CG5840;Dmel_CG5840	10,3	28	2	2	165000
CG5931	15,5	245	6	25	4603900
CG6181	5	149	5	8	824590
CG6439;Dmel_CG6439	15,9	40	3	4	547460
CG6455	6,3	94	4	5	805100
CG6459;Dmel_CG6459	28,5	29	2	8	3943200
CG6540;Dmel_CG6540	9,4	35	3	2	395770
CG6543;Dmel_CG6543	24,4	32	2	7	881010
CG6904	37,7	82	4	27	19828000
CG6961;Dmel_CG6961;CG18259	6,3	53	3	2	155040
CG7033;Dmel_CG7033	11	58	4	4	538720
CG7208;Dmel_CG7208	14,9	51	3,12	7	1118200
CG7262;Dmel_CG7262	11,6	91	4	7	1277500
CG7380	27,8	10	1	3	991970
CG7461;Dmel_CG7461	11,3	71	4	7	1250100
CG7671	19,8	40	3	5	1336600
CG7777;Dmel_CG7777	16	29	2	4	1780700
CG7830;Dmel_CG7830	6,1	37	2	2	105300
CG7843	5,9	107	5	5	508620
CG7911;Dmel_CG7911	18,6	17	2	2	362970
CG7993	13,4	36	3	4	921030
CG8010;Dmel_CG8010	25,1	44	3,82	23	13190000
CG8031;Dmel_CG8031	6,1	33	2,4	2	468670
CG8036;Dmel_CG8036	5,4	68	4	2	256950
CG8199;Dmel_CG8199	6,6	50	3	3	337360
CG8258;Dmel_CG8258	13,4	59	3,91	6	682980
CG8303;Dmel_CG8303	7,7	62	3,67	2	601070
CG8351;Dmel_CG8351	8,5	59	3,5	3	412370
CG8368;Dmel_CG8368	7	77	4	3	282300
CG8507;Dmel_CG8507	18,5	45	3	7	2418600
CG8578;Dmel_CG8578	59,3	45	3	21	8811200
CG8636;Dmel_CG8636	8,9	30	2	2	161150
CG8771;Dmel_CG8771	6,2	208	5,91	11	1461700
CG8775;CG32473	8,9	116	4,91	9	1392300
CG8801	7,2	75	4	4	649020
CG8831	9,8	64	4	5	983310
CG8863;Dmel_CG8863	44,7	45	3	15	8311900
CG8963;Dmel_CG8963	12,7	63	4	7	1608900
CG9027	14,7	23	2	3	898150
CG9281	26	70	4	15	3089800
CG9461	8,6	125	5	8	1500800
CG9577;Dmel_CG9577	33	34	2	12	5127600
CG9598	13,7	119	4,61	18	1666400
CG9769;Dmel_CG9769	22,9	31	2	5	1683300
CG9775	12,8	46	3	4	223690
CG9796;Dmel_CG9796	10	28	2	2	427370
CG9911;Dmel_CG9911	10	47	3	3	434900
CG9953	13,6	57	3,56	14	2427100
Chc;CG9012	28,6	191	5,2	55	17832000
cher;CG3937;Dmel_CG3937	64,7	239	5,34	222	181100000
CHKov1;CG10618	6,5	44	4	2	136040
Chmp1;CG4108;Dmel_CG4108	9,4	22	2	3	436500
CHOp24;CG3564;Dmel_CG3564	16,8	23	1	3	411900
ck;CG7595	41,6	250	5,76	135	74212000
Cklalpha;CKI;CG2028	5,9	40	3	2	304850
CklIalpha;Cask-II-a;CG17520	9,8	40	2,75	3	517710
CklIbeta;Dmel_CG15224	10,6	27	2	4	571720
CLIP-190;CG5020	47,9	189	5,68	134	60268000
cora;Dmel_CG11949	13,6	184	5,5	26	2982600
coro;CG9446;Dmel_CG9446	45,5	57	3,78	35	25967000
Cp1;fs(2)50Ca;CG6692	33,4	42	2,56	21	8734600
Cp19;s19;CG6524	47,4	19	1	6	1248400
Cp36;s36;CG1478	13	30	3	3	505050
Cp38;s38;CG1121	25,5	30	2,25	16	6929900
Cp7Fb;Dmel_CG15350	6,6	56	1,67	2	126840
cpa;CG10540	48,6	33	2	16	6744800
cpb;ANCP-BETA;CG17158	47,8	31	1,94	16	8229700
cue;CG12086;Dmel_CG12086	7,3	73	4	4	931970
cul-2;CG1512;Dmel_CG1512	56,8	87	4,04	64	60057000
cup;fs(2)cup;CG11181	38,3	127	4,99	55	20119000
dec-1;CG2175	46,5	137	3,66	179	135510000
deltaCOP;delta-COP;CG14813	13,3	58	4	6	1214200
dhd;Trx-1;CG4193	30,8	12	1	5	564810
didum;Dmel_CG2146	59,7	208	5,58	275	375100000
Dp1;Dmel_CG5170	9,4	144	5,15	11	1293800

Anhang

eEF1delta;CG4912	12,1	29	2	2	386290
Ef1alpha48D;EF1B;F1;CG8280;Ef1alpha100E;EF1a;F	39,1	50	3,27	47	73740000
Ef1beta;CG6341	23,4	29	2	6	2750700
Ef1gamma;Ef1g;CG11901	24,8	49	3	10	4941000
Ef2b;CG2238	44,5	94	4,12	42	20037000
EG:118B3.2;CG13366	18,6	122	4,79	24	3809000
EG:25E8.1;CG2918;Dmel_CG2918	11,3	103	5	9	1638500
EG:34F3.8;CG12467;CG7359	9,5	25	2	2	238560
eIF-3p40	16,6	38	3	3	546390
eIF-3p66;CG10161	9,5	64	4	4	1365600
eIF3-S10;CG9805	20,3	134	5	24	4109100
eIF3-S8;Dmel_CG4954	11,1	106	4,71	16	1689600
eIF3-S9;Dmel_CG4878	16,8	80	4	11	2378800
eIF-4a;eIF4A;(2L)162;CG9075	15,1	46	3	5	1625700
eIF4AIII;CG7483	34,8	46	3,12	17	5694100
eIF-4E;Dmel_CG4035	41,7	29	2,88	11	2709600
eIF-4G;Dmel_CG10811	32,3	211	5,52	102	29368000
eIF6;CG17611	10,6	26	2	2	315720
Elongin-B;CG4204;Dmel_CG4204	64,4	13	1	7	1704500
Elongin-C;CG9291;Dmel_CG9291	41	13	1	8	1157400
epsilonCOP;BcDNA.LD29885;epsilon-COP;CG9543	13,7	35	2,2	4	972730
ERp60;CG8983;Dmel_CG8983	7	55	3,25	3	430470
exba;Dmel_CG2922	7,6	49	3	3	263880
exu;CG8994	31,2	58	3,96	17	17366000
Fas1;CG6588	5	74	4	2	475630
Fcp26Aa;CG9050	10,8	41	4,25	8	8962700
Fcp26Ac;CG13997;Dmel_CG13997	7,7	19	1	2	115550
Fer1HCH;Fer1	12,7	23	1,5	2	166010
Fer2LCH;CG1469	12,3	25	1,88	5	412070
Fib;CG9888	41	35	2,96	16	6782900
Fim;CG8649;Dmel_CG8649	15	72	3,15	13	1807800
FK506-bp1;FKBP39;CG6226	28,3	39	3,12	19	3399500
flil;CG1484	18,1	144	4,91	23	6307700
Flo-2;FLODm-2;CG32593	8	48	3	3	271020
flw;PP1-9C;PP1-BETA-9C;CG2096	5,9	51	3	2	354180
Fmr1;FXR;CG6203	20,8	76	4	12	3631200
fon;CG15825;Dmel_CG15825	15,1	58	3,83	5	1070900
fs(1)M3;fs(1)ph	16,5	207	5,37	38	9953000
fs(1)N;EG:8D8.1;CG11411	19,9	239	5,36	56	13438000
Fs(2)Ket;CG2637	12,1	99	4	9	2399900
gammaCop	18,1	98	4	16	4012900
gammaTub37C;TubG2;TubG37C;CG17566	34,4	51	3,39	20	8515800
Gbp;CG5519	5	55	3,25	3	284750
Gel;CG1106	16,6	98	3,13	14	4484700
Glt;CG9280	17,5	119	5,05	20	10591000
gnu;CG5272;Dmel_CG5272	7,5	27	2	2	340490
gp210;Dmel_CG7897	24,7	210	6	36	12001000
Grip71;CG10346	9,9	72	4	4	923750
Grip75;75p;CG6176	8,8	75	4	6	1011300
Grip84;Dmel_CG3917	13	107	4	11	2963200
growl;CG14648	48,1	60	4	23	13785000
His2A;CG31618;His2A;CG33808;His2A;CG33814;His	37,1	13	2,21	10	15891000
His2B;His2B;CG17949;CG33868;CG33870;His2B;CG3	43,1	14	1,52	15	15253000
His3.3A;CG5825;His3.3B;CG8989;His3;CG31613;His3	15,4	15	2,33	6	3204300
His4;H4;His4r;H4r;CG3379;His4;His4;CG33869;His4:	51,5	11	1,65	13	12667000
hkl;CG10473	5,5	84	5	3	379010
hoip;CG3949	36,2	14	1	3	1987100
Hrb27C;hrp48;Rbp7;CG10377	30,4	45	3	19	6216300
Hrp59;CG9373	9,7	67	4	5	798360
Hsc70-3;Hsc3;CG4147	45,1	72	3,99	40	43022000
Hsc70-4;Hsc4;CG4264	63,3	71	3,88	101	269390000
Hsc70-5;Hsc5;CG8542	32,9	74	3,85	23	8339900
Hsp26;CG4183	53,8	23	2	15	24070000
Hsp27;CG4466	54,5	24	2	14	12144000
Hsp60;Mmp-P1;CG12101	36,5	61	3,97	21	6335200
Hsp83;Hsp82;CG1242	36,7	82	4,07	23	9275100
hts;Dmel_CG9325	52,2	128	3,79	101	67233000
hyx;CG11990;Dmel_CG11990	5,9	61	4	2	166710
ik2;CG2615	11,7	82	4	8	1880100
Imp;CG1691	28,3	62	4	16	3370400
Int6;CG9677	11	51	3	5	1214000
ird5;DIK;CG4201	16,2	86	4	14	2217500
Jafrac1;TPX-1;CG1633	10,8	22	2,43	2	286940
Jafrac2;CG1274;Dmel_CG1274	31,8	27	2	7	2116400
jar;Mhc95F;CG5695	60,7	145	4,88	225	428380000
Kap-alpha3;Kap-alpha-3;CG9423	5,8	57	3,33	2	432520
kek5;Kek5	11,3	102	4,6	10	1003300
key;IKKGAMMA;CG16910	15	44	3	4	593680
Klp3A;EG:BACR25B3.9;CG8590	12,5	136	5	13	1611300
kst;Dmel_CG12008	17,3	497	5,93	71	17536000
l(1)dd4;CG10988	14,5	104	4,18	12	3152200
l(1)G0022;CG8231;Dmel_CG8231	16,9	58	4	9	2667800
l(1)G0156;CG12233	46,9	41	2,94	19	9215200
l(1)G0222;Dmel_CG8465	7,4	129	5	10	1700800

Anhang

I(2)03709;CG15081;Dmel_CG15081	11,5	37	2	3	370130
I(2)tid;CG5504	18,3	56	3	5	968000
Lam;CG6944	28,9	71	4	16	4871200
LamC;CG10119	8,2	70	4	4	402400
LanA;lamA;CG10236	6,2	411	5,79	15	1991700
LanB1;lamB1;CG7123	16,3	198	5,8	27	6354200
LanB2;LAMC1;LAMG1;CG3322	23,4	182	5,33	34	10478000
larp;Dmel_CG14066	13,2	151	5,78	17	2931900
Lasp;CG3849	7,2	74	4	4	576540
lic;MKK3;p38MAPKK;CG12244	15,3	38	3	2	304740
lig;CG8715	9	139	5,12	7	1294000
Iva;CG6450	60,3	316	5,8	230	154450000
mbo;Nup88;CG6819	14,7	79	4	10	1521700
Mbs;CG32156	11,5	124	5	11	1622600
Mcr;CG7586;Dmel_CG7586	6,6	203	6	10	1649300
me31B;CG4916	66,4	52	3,12	42	32885000
Men	18,9	85	4,08	11	3245000
Mlc1;MLC-ALK;CG5596	23,2	18	1	4	2345000
Mlc2;CG2184	50	24	1,92	22	9451300
Mlc-c;CG3201	52,4	17	1,05	13	31469000
mod;CG2050	10,1	60	4	4	879950
Moe;Dmel_CG10701	40,2	76	3,95	40	21020000
mRpL17;CG13880;Dmel_CG13880	9,7	21	1	2	131720
mSk	5,2	119	5	5	524010
Mtor;Dmel_CG8274	11,6	262	5,82	21	3183400
mtrm;anon-D52;CG18543	29,5	25	2	5	1088600
mtSSB;lopo;CG4337	63	16	1	13	7455600
mud	11,5	289	6	20	4627500
Myo31DF;CG7438	27,3	117	4,75	30	5261600
Myo61F;Dmel_CG9155	53,1	121	4,61	131	134940000
Nap1;CG5330	38,1	43	3,31	30	34601000
Ndg;Dmel_CG12908	12,6	151	5,41	19	4647400
ndl;CG10129	25,2	292	5,34	128	123150000
NHP2;CG5258	18,1	18	1	4	715920
nito;BcDNA.GH11110;CG2910	8,4	89	4	6	596550
Nlp;CRP1;CG7917	23,7	17	2	4	1000800
nop5;Dnop5;CG10206	49,3	57	3,96	21	9200600
Nop56;CG13849	24	55	3,3	14	7093100
Nop60B;mfl;CG3333	13	57	3,6	12	2188300
Nrg;CG1634	7,5	144	5	9	1329100
Nup133;CG6958	10,2	135	5	13	2754400
Nup154;CG4579	19,7	154	5	27	5969400
Nup170;CG6743	17,6	97	4	14	4077900
Nup358;CG11856	16,3	296	5,54	55	14955000
Nup75;CG5733	12,9	77	4	8	2688700
Nup98;CG10198	8,6	210	4,4	19	3265900
oho23B;rpS21;CG2986;Dmel_CG2986	63,9	9	1	7	4442200
Ote;CG5581	6,1	47	3,33	2	212750
p24-	8,6	28	2	3	303960
P5cr;CG6009	8,9	30	2	3	128590
pAbp;CG5119	60,3	70	3,75	67	78034000
Pat1;CG10695;Dmel_CG10695	39,8	79	4,01	48	45880000
Pdi;CG6988	9,7	56	3,33	4	507810
pen;CG1685	8,5	81	4,11	7	1235200
Pen;CG4799	13	58	3,89	6	811780
pgant5;CG9152/CG31651	8,3	72	4	4	387420
piwi;CG6122	39,3	97	4	34	10232000
pix;CG5651;Dmel_CG5651	11,8	69	4	6	1242400
pont;CG4003	47,1	50	3,56	16	6327800
porin;POR-1;VDAC;CG6647	21,3	31	2	4	458310
Pp1-87B;CG5650;Pp1-13C;CG9156	48	35	2,06	16	9071100
Pp2A-29B;CG17291	10,3	65	3,83	6	772050
PpV;PPPv6A;CG12217	6,6	35	2	2	187960
Prrm;CG5939	54,2	102	4,15	60	24411000
Pros26.4;P26s4;CG5289	10,5	49	3,43	4	294200
Pros26;CG4097	14,5	26	2	2	208340
Pros28.1;PROS-28.1;CG3422	14,5	28	2	3	246420
Pros29;PROS-29;CG9327	7,6	29	2	3	432240
Pros54;PROS-54;CG7619	7,1	43	3	2	228650
Prosalpha6;CG18495	32,8	27	2	5	873540
Prosalpha7;CG1519	16,6	28	2	3	288530
prp8;Dmel_CG8877	7,6	280	6	17	3123400
pUf68;hfp;CG12085	11,8	68	4	6	1413000
Pyk;CG7070	27,8	57	3,79	3	586980
qkr58E-1;CG3613	9,6	45	3	3	350580
Qm;RpL10;CG17521	38,8	28	2,1	19	33973000
qua;CG6433	48,8	101	4,29	74	92756000
r;CG18572	23,1	247	5,91	37	11827000
Rab1;CG3320;Dmel_CG3320	10,2	23	2	2	104630
Rack1;CG7111	63,5	36	2,16	31	58550000
Rae1;CG9862	11	39	3	3	473120
ran;Ran10A;CG1404	33,8	25	2	6	1414500
Ranbp9;CG5252;Dmel_CG5252	11,4	114	5	11	1462300
RanGap;Sd;CG9999	18	66	4	8	2295600

Anhang

rdx;HIB;CG12537	9,2	90	3	7	1327100
rept;CG9750	35,3	54	3,49	16	5573400
RfaBp	15,1	373	5,4	42	9904200
rhea;Talin;CG6831	10,2	307	6	23	3874400
RhoGEF2;Dmel_CG9635	9,8	281	5,86	22	3766800
rig;CG30149	5,7	138	5	5	678800
rin;CG9412;Dmel_CG9412	17,8	75	4	12	3939300
Rm62;Dmel_CG10279	15,2	79	3,43	10	1500700
Roc1a;CG16982	22,2	13	1	2	691190
Sap-r;CG12070	15,1	106	4,88	16	2861900
Sc2;CG10849	18,9	34	2	5	851850
Scsalph;CG1065	15,5	34	2,8	3	295060
Scs-fp;CG17246	13,2	72	4	6	852260
scu;CG7113	10,6	27	2	2	187920
sec13	6,5	40	3	2	568890
sec23;CG1250	20,7	87	4	15	2700200
sesB;A/A-T;CG16944	59,6	34	2,02	28	45981000
SF2;p28/SF2;CG6987;Dmel_CG6987	40	28	2	13	2476400
shg;gp150;CG3722	7,4	170	4,27	11	1251200
shot;Dmel_CG18076	9,7	990	5,87	85	16243000
shrb;Vps32;CG8055;Dmel_CG8055	28,3	25	3	7	3473900
skpA;Dredd;EG:115C2.4;CG16983	22,2	19	1	3	404180
slif;CG11128;Dmel_CG11128	8,3	66	4,07	14	2200200
slmb;slimb;CG3412	8	59	3,33	4	327090
SmB;CG5352	22,1	21	1,73	7	1479000
SmD3;guf2;CG8427	12,6	16	1	2	1102600
snf;D25;fs(1)1621;liz;CG4528	8,3	25	2	2	604610
snRNP69D;CG10753	19,4	14	1	2	305750
sop;RpS2;CG5920	50,6	29	2,07	26	46994000
spir;p150-Spir;CG10076	6	115	5	5	356780
Spn;CG16757	12	233	5,79	29	5361700
sqh;CG3595	64,9	20	1,11	21	18501000
Srp68;CG5064	5,3	69	4	4	302090
ssh;CG6238	13,5	132	5	15	2968600
sta;CG14792	60,7	35	2,87	25	44612000
Su(var)3-9;KMT1;CG6476	20	51	3	7	965210
Surf4;Surf-4;CG6202	12,6	31	2	3	451770
swa;CG3429	60,2	62	3,98	42	22583000
Tango1;CG11098	10,3	159	5,88	16	2861600
T-cp1;CCT-1;Tcp-1;CG5374	22,8	60	4	9	2275700
TER94;CG2331	9,4	89	4	6	1040000
TFAM;Dmel_CG4217	7,7	33	2	3	179590
Thiolase;CG4581	21,7	51	3	10	3294200
timeout;Dmel_CG7855	14,1	159	5,05	19	2762700
Tm2;Tml;CG4843	71,5	33	2,77	75	86344000
tmod;SPDO;spdo;CG1539	27,4	59	3,14	21	13972000
TpnC47D;TnC47D;CG9073	19,4	18	1	4	522530
TpnC73F;TnC73F;CG7930	65,2	18	1	20	8802600
TppII;CG3991	11,5	159	5,04	16	1792700
tral;BEST;GH08269;CG10686	38,8	69	4,04	28	21185000
Trip1;DmTRIP;CG8882	17,5	36	3	4	598990
Tsp74F;CG5492;Dmel_CG5492	16,1	26	2	5	591350
tsr;Cadf;CG4254	31,1	17	1	4	1078600
Tudor-SN;CG7008	5,1	103	5	4	343880
tum;Dmel_CG13345	5,6	70	4	3	580120
twf;CG3172	7,9	39	3	2	171160
U2A;CG1406	10,2	30	2	3	232720
unc-115;CG9489;dunc-115l;CG31332;CG31352	38,6	90	4,14	43	12529000
up;int;CG7107	41,2	47	3,19	36	72997000
up;int;CG7107	9,6	47	3,2	3	5852700
Vap-33-1;Dmel_CG5014	15,2	29	2	4	503540
Vha100-2;CG18617;Dmel_CG18617	22,4	95	4,05	22	9977700
Vha26;CG1088	28,8	26	2	7	1597400
Vha55;CG17369	11,2	55	3,33	7	1201300
Vha68-2;VHAA2;CG3762	30,3	68	4	17	4767300
VhaAC39;CG2934	17,7	40	3	4	1464900
VhaM9.7-2;CG7625	28,1	10	1	2	188200
Vinc;CG3299	5	106	1,5	6	465380
Vm32E	26,7	12	1	3	578540
wupA;HDP;Tnl;CG7178	38,9	24	1,97	22	42672000
x16;9G8;Dxl6;CG10203;Dmel_CG10203	9,7	28	2	2	274870
yellow-g;Dmel_CG5717	28,2	43	3	9	3097500
yellow-g2;Dmel_CG13804	8,4	43	2,6	4	1265400
yl;CG1372	24,8	220	5,74	75	46672000
Yp1;CG2985	43,7	49	3,88	67	53108000
Yp2;CG2979	50,9	50	3,48	61	72422000
Yp3;CG11129	68,3	46	3,52	55	90561000
yps;CG5654	41,8	38	3,47	17	6062500
Zeelin1;z1	11,8	42	1,8	5	511270
zip;CG15792	65,1	237	5,5	537	1188800000
zpg;inx4;CG10125	11,7	43	2,14	7	1063400
	19,6	168	4,82	33	9348000

A4) EGFP-SMC4-Ovarien Orbi 0321

Protein Descriptions	Coverage [%]	[kDa]	SA	PEP E1	PEP hotE	INT E1	INT hotE
>14-3-3epsilon-PA	24	30	5	12	5	1543800	2265900
>14-3-3zeta-PA	11	28	5	1	2	77975	384060
>26-29-p-PA	14	62	5	8	7	1854500	1592600
>Aats-ile-PA	5	141	3	5	2	1568200	445480
>Aats-lys-PA	7	65	4	3	0	572960	0
>Act57B-PA	23	42	5	30	11	115920000	22962000
>Act5C-PA	71	42	5	102	67	667910000	244950000
>Act87E-PA	6	42	5	2	2	2868800	430640
>alphaCop-PA	19	139	3	24	6	9693600	2360000
>alpha-Spec-PA	25	278	1	63	16	31864000	9590300
>alphaTub67C-PA	22	51	5	8	4	6800200	1717700
>alphaTub84B-PA	45	50	5	30	17	58959000	25286000
>Arc-p34-PA	8	35	5	0	2	0	325150
>aret-PA	14	64	4	7	0	1511600	0
>ATPsyn-beta-PA	35	54	5	13	10	8624000	3612600
>ATPsyn-gamma-PA	23	33	6	4	3	808480	362990
>aub-PA	16	99	4	15	4	5418400	910620
>awd-PA	25	19	7	3	2	276760	305960
>barr-PA	30	83	3	47	28	66636000	28864000
>bel-PA	29	85	4	25	7	14586000	2349400
>ben-PA	10	17	7	2	0	194000	0
>betaCop-PA	14	107	4	13	4	4421500	878890
>beta'Cop-PA	10	103	3	11	3	5136700	1154400
>beta-Spec-PA	16	266	1	39	8	12704000	7415700
>betaTub56D-PB	35	50	5	38	27	72882000	30701000
>betaTub97EF-PA	13	59	5	11	3	9214700	2773600
>Bicc-PA	11	98	3	13	4	3617100	655710
>bif-PB	7	130	3	10	4	2453000	296750
>blw-PA	19	59	5	10	7	10934000	4315100
>bor-PA	9	68	4	7	3	8275400	887450
>CaBP1-PA	10	47	5	3	1	1209200	234130
>Cam-PA	63	17	7	15	13	14939000	2579000
>CAP-D2-PA	42	158	2	128	86	364570000	125160000
>Cap-G-PA	18	132	2	34	17	24166000	5900600
>cathD-PA	19	42	5	5	2	1254800	295110
>CG10055-PA	7	69	4	3	0	619290	0
>CG10077-PA	22	88	4	15	7	12425000	2582100
>CG10237-PA	21	35	5	4	4	1374700	1095900
>CG10289-PA	16	111	3	10	3	3702400	1443800
>CG10306-PA	22	26	6	3	2	735130	159210
>CG10540-PA	13	33	5	3	2	2344600	935860
>CG10932-PA	22	43	5	7	3	1689500	343560
>CG11107-PA	10	83	4	6	1	2082200	370510
>CG11198-PA	9	279	1	18	3	4661600	812700
>CG11984-PA	11	68	4	3	0	273200	0
>CG11999-PA	10	24	6	2	1	823840	0
>CG12026-PA	17	30	6	4	0	701340	0
>CG12163-PA	11	69	6	3	1	980820	319800
>CG12262-PA	11	46	5	3	3	1412400	946170
>CG12264-PA	13	51	5	4	0	1436600	0
>CG12398-PA	8	71	4	3	0	215170	0
>CG13084-PA	8	51	5	3	1	1798400	569060
>CG14309-PA	8	107	4	8	1	1176400	236510
>CG14482-PA	39	6	7	2	3	712150	544900
>CG14648-PA	32	60	4	14	5	17656000	6111000
>CG15092-PA	11	36	5	4	2	2478600	680810
>CG15293-PA	21	37	5	3	2	2494100	464960
>CG17018-PA	11	144	3	12	4	9323900	2866100
>CG17202-PA	8	20	6	2	0	350840	0
>CG18591-PA	28	11	7	4	2	1565400	532560
>CG18811-PA	6	104	3	4	2	1787500	610000
>CG2118-PA	6	77	4	3	0	720190	0
>CG30069-PA	15	420	2	32	14	12762000	14218000
>CG30159-PA	19	28	6	4	3	3898800	2838000
>CG30382-PA	14	27	5	2	3	315120	832170
>CG30410-PA	11	31	6	3	0	713730	0
>CG3061-PA	12	42	5	2	2	699570	392430
>CG3074-PA	17	49	5	2	10	2359300	9901700
>CG31012-PA	7	57	3	3	0	486520	0
>CG32164-PA	8	121	3	6	6	1561000	1124800
>CG32230-PA	13	9	7	0	2	0	193580
>CG33123-PA	7	135	3	6	1	1149200	193920
>CG3394-PA	6	77	4	3	0	318910	0
>CG3428-PA	8	36	5	4	1	2480900	637410
>CG3909-PA	8	36	5	2	2	730680	442030
>CG3999-PA	33	110	3	55	30	56827000	33403000
>CG4164-PA	13	40	5	3	1	1885200	406020
>CG4169-PA	20	45	5	5	0	3488700	0
>CG4389-PA	8	84	4	5	5	1650700	0

Anhang

>CG4692-PA	21	12	7	2	1	336440	297000
>CG4849-PA	9	111	3	6	1	1998800	202780
>CG5214-PA	8	50	5	2	1	755790	131520
>CG5366-PA	10	139	2	9	10	4193000	3214800
>CG5525-PA	6	57	5	3	1	1545000	318570
>CG5599-PA	12	50	5	4	1	1435200	283520
>CG5604-PA	6	302	1	12	1	1893500	576510
>CG5641-PA	8	44	5	3	0	922560	0
>CG5642-PA	7	63	5	3	1	1211200	402750
>CG6439-PA	18	40	5	3	6	858990	2263800
>CG6904-PA	7	82	4	5	1	2294800	181900
>CG7033-PA	18	58	4	8	4	1705000	516960
>CG7461-PA	8	71	4	4	0	1368700	0
>CG7519-PA	31	19	7	4	0	741720	0
>CG7911-PA	39	17	6	4	1	1429300	143770
>CG8309-PA	14	44	5	3	2	1521700	342650
>CG8464-PA	6	46	5	2	1	432360	108320
>CG8507-PA	7	45	5	2	1	1322500	113110
>CG8578-PA	22	45	5	7	3	4748400	1264600
>CG8863-	35	45	5	15	11	22329000	9492600
>CG8885-PA	18	28	6	3	1	596640	77203
>CG8963-PA	8	63	4	4	0	1133800	0
>CG9050-PA	6	41	4	4	2	3120600	466140
>CG9247-PA	10	72	4	5	0	1663400	0
>CG9281-PB	19	70	4	15	3	14523000	1239400
>CG9911-PA	10	47	5	4	0	1187700	0
>CG9924-PA	14	46	5	4	1	1451900	283480
>CG9953-PA	7	57	5	3	0	1180500	0
>Chc-PA	12	191	2	17	9	8637800	2585100
>cher-PA	12	239	3	33	10	12207000	1852100
>Cklalpha-PA	10	40	5	1	3	623050	503620
>Cklalpha-PA	12	40	5	4	3	2773700	761220
>ck-PA	14	250	2	27	8	24216000	3745800
>CLIP-190-PA	30	189	2	48	14	56479000	10801000
>coro-PA	9	57	4	5	3	2665600	1296000
>Cp19-PA	57	19	7	6	4	3656000	1819000
>Cp36-PA	33	30	5	10	6	2983300	1910700
>Cp38-PA	20	30	6	15	12	10438000	9603900
>cpb-PA	16	31	5	5	3	1227700	1097600
>ctp-PA	63	10	7	3	4	774620	1519300
>cul-2-PA	16	87	4	10	1	3392500	149900
>cup-PA	30	127	3	45	22	25984000	10973000
>dec-1-PA	18	179	5	47	10	17811000	4109700
>deltaCOP-PA	17	58	4	10	1	4871800	187580
>dhd-PA	31	12	7	3	5	1076800	1340300
>Dhod-PA	7	44	5	2	0	407130	0
>didum-PA	43	207	2	127	73	325620000	108860000
>Drp1-PA	8	83	4	4	1	567230	265120
>Ef1alpha48D-PA	24	50	4	30	26	93923000	42901000
>Ef1beta-PA	9	29	6	2	2	808610	574660
>Ef1gamma-PA	11	49	5	4	1	2355800	291520
>Ef2b-PA	23	94	4	18	5	13270000	2805400
>elF2B-epsilon-PA	7	75	4	4	0	1709200	0
>elF3-S10-PA	8	134	3	8	5	3925700	1722300
>elF4AIII-PA	22	46	5	8	2	4198900	363460
>elF-4a-PA	14	46	4	3	2	757550	1768300
>elF-4E-PA	36	29	5	7	5	4069000	2007700
>elF-4G-PA	39	150	2	91	44	84431000	25631000
>elF-5C-PA	8	49	5	3	3	3584300	998280
>Elongin-B-PA	32	13	7	2	1	413710	179430
>emb-PA	7	123	3	7	0	1463200	0
>eRF1-PA	12	49	5	4	1	1301000	61424
>ERp60-PA	5	55	5	2	0	292280	0
>exu-PA	14	58	4	12	6	18308000	4085300
>Fib-PA	30	35	5	10	9	8442600	4817000
>fit-PA	9	14	7	1	3	41596	468810
>FK506-bp1-PA	8	39	6	4	5	1704800	734410
>flil-PA	5	144	3	6	1	1731300	134910
>Fmr1-PA	11	76	4	5	0	967660	0
>gammaCop-PA	5	97	4	6	2	4513600	1130700
>gammaTub37C-PA	29	51	5	13	8	13807000	4185600
>Glt-PA	15	119	2	17	6	17697000	4429600
>glu-PA	57	160	2	149	387	189860000	2967800000
>Gp93-PA	6	90	4	5	0	4533000	0
>Grip71-PA	6	72	4	3	0	914090	0
>Grip75-PA	8	75	4	4	0	2079700	0
>Grip84-PA	16	107	4	14	3	5722700	1281500
>His2A:CG31618-PA	32	13	6	4	9	1071300	2336200
>His2B:CG17949-PA	28	14	6	11	9	5331700	3741700
>His4:CG31611-PA	42	11	6	11	13	4906000	8097900
>hoip-PA	48	14	7	4	2	1173900	792180
>Hsc70-3-PA	28	72	4	26	21	95719000	38608000
>Hsc70-4-PA	50	71	4	114	80	523510000	342220000
>Hsc70-5-PA	24	74	4	16	4	9528800	553860

Anhang

>Hsp26-PA	75	23	6	34	29	97334000	91928000
>Hsp27-PA	50	24	6	26	25	50469000	57367000
>Hsp60-PA	19	61	4	9	3	1714600	488650
>Hsp83-PA	12	82	4	9	4	12905000	3514300
>hts-PA	18	128	4	16	4	4528900	894400
>ida-PA	5	89	4	3	0	821070	0
>Imp-PA	15	62	4	10	1	3657800	150530
>Int6-PA	7	51	5	2	0	1005000	0
>Jfrac1-PA	19	22	5	3	6	796710	1093500
>jar-PA	41	144	3	131	68	287500000	147120000
>Kap-alpha3-PA	6	57	5	2	2	932140	337870
>Karybeta3-PA	6	124	3	5	1	1090000	301990
>Klp3A-PA	6	136	3	6	2	2062800	268980
>kst-PA	8	472	1	26	1	6012100	293380
>l(1)dd4-PA	13	104	4	10	1	5995700	62310
>l(1)G0022-PA	17	58	4	10	3	4432600	874620
>l(1)G0156-PB	48	41	5	22	15	33424000	17928000
>l(1)G0230-PA	10	17	7	2	0	152910	0
>l(1)G0334-PA	6	44	5	1	2	256440	282750
>LanA-PA	16	411	1	62	27	38223000	19690000
>LanB1-PA	13	198	2	25	7	22797000	5125300
>LanB2-PA	22	182	2	34	10	40350000	8194100
>Iarp-PC	8	151	2	14	4	6650400	1898500
>lic-PA	13	38	5	2	3	422540	603770
>lva-PC	46	316	1	204	77	185190000	92671000
>me31B-PA	50	52	5	28	16	53301000	15772000
>Mhc-PJ	52	224	2	175	101	525440000	208140000
>Mlc1-PA	17	18	6	5	5	12270000	3982400
>Mlc2-PA	51	24	6	11	10	7511600	5986100
>Mlc-c-PA	62	17	7	15	16	25830000	11910000
>Moe-PA	10	75	4	7	1	3395900	366180
>Mpcp-PA	15	39	5	5	4	1684000	1177300
>msk-PA	6	119	3	6	2	2666400	1033200
>mts-PA	8	35	5	2	1	174160	98406
>mtSSB-PA	15	16	7	4	3	1994700	919390
>Myo31DF-PA	22	117	3	21	10	13107000	3110900
>Myo61F-PD	36	121	3	60	40	122760000	56883000
>Nap1-PA	18	43	5	13	11	23216000	8893300
>Ndg-PA	11	149	2	15	1	12444000	230660
>Nlp-PA	15	17	6	2	0	1164900	0
>Nop56-PA	17	55	5	7	3	3688000	915330
>nop5-PA	24	57	4	12	2	6151700	660370
>Nop60B-PA	9	57	5	5	2	1203500	165870
>oho23B-PA	51	9	7	5	5	4812000	1858800
>pAbp-PA	45	70	4	56	29	133860000	34964000
>Pat1-PA	7	79	4	3	2	1907900	760020
>Pcmt-PA	45	25	6	24	14	14161000	9690900
>Pen-PA	10	58	5	5	2	867050	241850
>Pep-PB	9	78	3	7	1	1402400	434730
>piwi-PA	22	97	4	20	5	12113000	1625900
>pont-PA	18	50	5	6	5	3462800	1173000
>Pp1-87B-PA	16	35	5	7	4	1082400	799290
>PpV-PA	13	35	6	5	1	1682400	563890
>Prm-PA	24	102	3	17	7	6971100	1626500
>Pros45-PA	10	46	5	3	1	1876800	305370
>pUf68-PA	11	68	4	5	0	1483800	0
>PyK-PA	16	57	5	6	2	3282800	758300
>Qm-PA	10	26	6	3	4	1055000	1380300
>qua-PA	18	101	4	15	5	8489900	1551300
>Rack1-PA	29	36	5	19	11	22148000	14077000
>Ranbp9-PA	17	114	3	13	9	5880900	4141100
>REG-PA	13	28	6	5	4	2329400	3535800
>rept-PA	7	54	5	3	1	2054300	417470
>RfaBp-PA	8	373	2	24	6	8885000	1575700
>RfC38-PA	6	41	5	2	1	721860	257300
>RfC3-PA	8	37	5	2	0	1209700	0
>r-PA	6	247	2	11	2	5633700	265940
>Sc2-PA	11	34	6	4	3	857580	951860
>Scsalpha-PA	9	34	5		2	0	245630
>scu-PA	11	27	6	1	2	209950	238520
>sec13-PA	7	40	5	2	0	595420	0
>sesB-PA	46	33	6	25	27	25593000	36515000
>SF2-PA	15	28	6	2	1	317930	321550
>shot-PA	5	628	1	23	1	4216000	128450
>skpA-PA	9	19	6	3	1	375010	62090
>SmB-PA	11	21	6	2	2	406950	600390
>SMC2-PA	58	134	3	300	172	1095500000	647100000
>SmD3-PA	6	16	7	2	1	1805900	395200
>snRNP69D-PA	9	14	7	2	0	495780	0
>sop-PA	34	29	6	11	7	9996100	5643000
>sqd-PA	15	35	5	2	2	934980	463540
>sqh-PA	64	20	6	25	16	17236000	6573300
>Ssb-c31a-PA	18	12	7	2	1	411950	188950
>sta-PA	36	30	5	22	20	79298000	40815000

Anhang

>Su(var)3-9-PB	6	51	5	2	1	792410	69995
>swa-PA	10	62	4	5	0	2122200	0
>Tbp-1-PA	6	48	5	2	1	757900	216010
>T-cp1-PA	16	60	4	11	3	3515700	637450
>TER94-PA	9	89	4	6	2	3196800	287290
>Thiolase-PA	14	51	5	5	2	4070500	1498900
>Tm1-PA	55	29	5	32	24	51294000	33745000
>Tm2-PA	55	33	5	32	24	46579000	23383000
>tmod-PA	25	41	5	7	5	9560700	2363300
>Tom70-PA	14	66	4	7	2	3041900	600050
>torp4a-PA	6	38	5	1	2	496990	717790
>TpnC47D-PA	12	18	7	3	0	490970	0
>TpnC73F-PA	46	18	6	18	7	9356700	2013200
>tral-PA	22	69	4	13	5	19278000	2652000
>Trip1-PA	15	36	5	4	4	1085800	402030
>Upf1-PA	7	130	3	6	0	1422100	0
>up-PA	10	47	5	6	1	13537000	940160
>up-PF	25	47	5	27	13	44868000	18928000
>vas-PA PA	7	72	4	4	1	1683700	102300
>vkg-PA	5	194	1	5	9	3110800	19000000
>wal-PA	8	34	5	1	2	56545	196340
>wupA-PA	16	24	6	9	10	19639000	6776700
>yellow-g2-PA	15	43	5	5	7	1925600	2846300
>yellow-g-PA	20	43	5	5	6	5121100	4481500
>yl-PA	6	215	2	16	4	17627000	3040200
>Yp1-PA	32	49	4	20	14	29402000	12356000
>Yp2-PA	31	52	4	27	15	36722000	13558000
>Yp3-PA	32	46	4	25	10	23696000	4974500
>yps-PA	21	38	5	8	5	3620400	1680500
>zip-PB	53	231	2	395	196	1586800000	601680000

A5) cherry-CapH2 und EGFP-CapH2-Ovarien Orbi 0498

Protein Descriptions	Coverage [%]	[kDa]	SA	PEP cry	PEP EGFP	INT cry	INT EGFP
>128up-PA	18,2	41	6,4	8	5	875350	1278300
>14-3-3epsilon-PA	59,5	30	6,4	45	37	10331000	28334000
>14-3-3zeta-PD	45,6	28	7,5	12	18	3572400	6733400
>26-29-p-PA	31,5	62	6,1	34	33	8559100	8939400
>Aats-arg-PA	8,4	76	5,0	5	1	462270	110590
>Aats-asp-PA	13	59	4,9	5	5	568670	465530
>Aats-ile-PA	14,6	141	3,4	18	15	1424300	2527900
>Aats-lys-PB	14	69	4,9	9	6	1667700	1099100
>Acp65Aa-PA	18,1	11	9,0	2	2	217300	540510
>Act42A-PA	9,6	42	6,7	17	15	26290000	29487000
>Act57B-PA	39,1	42	6,4	266	148	970700000	469680000
>Act5C-PA	89,9	42	6,1	726	591	3083300000	2377900000
>Act79B-PA	27,1	42	6,3	44	28	189320000	157480000
>Act88F-PA	13,3	42	6,4	17	13	9795200	16742000
>Actn-PA	55,1	104	4,6	87	46	33784000	25067000
>Adam-PA	9,7	27	7,0	2	1	213710	185740
>Adh-PC	26,2	28	7,6	9	5	466000	459600
>AGO2-PC	19,7	137	4,0	50	42	7792600	8794200
>Aldh-PA	5,8	57	5,2	6	3	1017600	865150
>alpha-Adaptin-PA	11,2	106	3,9	14	2	1875800	238470
>alpha-Cat-PA	38,3	102	4,5	30	20	9335800	6764600
>alphaCop-PA	7,2	139	5,2	19	6	2323100	614570
>alpha-Spec-PA	77,4	278	2,5	1098	821	1394500000	728950000
>alphaTub67C-PA	29,7	51	5,9	23	23	4387300	5860400
>alphaTub84B-PA	43,6	50	6,1	86	58	40872000	46215000
>Aly-PA	34,6	28	7,6	25	20	4733200	7671500
>Ance-PA	35,3	71	5,2	27	13	22701000	9503000
>Ank-PA	8,2	170	3,4	13	10	1228400	1590600
>AnnIX-PB	63,6	36	7,4	41	33	46954000	70429000
>AnnX-PA	69,4	36	7,2	46	43	14407000	57804000
>Anxb11-PA	41,6	36	6,8	36	25	9133600	6607700
>Aph-4-PA	27,5	65	5,0	11	13	1030100	2291400
>aralar1-PC	15,3	77	4,8	9	4	1277900	313590
>Arc-p20-PA	48,8	20	8,5	18	14	8909500	6350500
>Arc-p34-PA	56,8	35	7,0	35	21	8342200	5984700
>Ard1-PA	11,7	22	8,0	2	2	261170	249290
>Arf102F-PA	23,3	21	5,7	2	4	98665	1017300
>Argk-PA	15,5	61	6,2	17	9	2216400	1840300
>arm-PA	24	91	4,2	29	16	5552600	4231800
>Arp11-PA	23,3	42	6,0	10	10	2490600	3617300
>Arp14D-PA	17	45	4,9	10	8	3618300	2229700
>Arp66B-PA	42,3	47	6,0	21	13	20014000	6976000
>Arp87C-PA	52,7	43	6,5	41	31	33212000	44562000
>Arpc3A-PB	48,4	22	8,5	22	17	6975100	2205700
>ATPsyn-beta-PA	56	54	5,5	70	54	24496000	32156000
>ATPsyn-b-PA	21,4	27	7,9	6	6	910850	484720

Anhang

>ATPsyn-d-PA	20,8	20	8,0	3	3	322680	445550
>ATPsyn-gamma-PA	32,7	33	7,6	15	12	2594100	2108800
>aub-PA	26,4	99	4,2	26	13	4947100	4050300
>awd-PA	30,2	19	8,1	13	7	829640	609170
>bai-PA	18	24	8,8	9	7	2338100	2046900
>ball-PA	7,3	66	5,0	4	4	386990	833270
>Bap-PA	25	101	4,2	27	13	5716700	3183100
>bel-PA	48,9	85	5,1	118	98	91818000	68574000
>ben-PA	29,8	17	9,0	3	3	648390	296530
>betaCop-PA	36,4	107	4,4	73	44	25004000	18401000
>beta-Spec-PA	66,1	266	2,6	805	599	890100000	448730000
>betaTub56D-PB	62,2	50	6,1	133	97	69037000	84408000
>betaTub97EF-PA	15,7	59	5,5	30	22	7394200	9034400
>BicC-PA	23,3	98	4,8	26	20	4073000	3965000
>bic-PA	78,7	18	8,2	22	19	8101100	7132200
>Bin1-PA	7,3	17	9,0	3	3	318490	309850
>blw-PA	34,8	59	6,0	41	38	17101000	21979000
>bocksbeutel-PB	6,5	44	7,8	2	4	89888	231360
>bonsai-PA	8,2	33	7,0	2	2	48103	109520
>bor-PA	50,5	68	5,2	51	40	19957000	18049000
>bsf-PA	26	157	3,3	23	28	6066900	4258400
>Bsg-PG	15,8	32	6,4	3	6	334780	843190
>bur-PA	5,5	76	5,0	3	1	261790	110940
>CaBP1-PA	8,1	47	6,1	4	5	748820	1479500
>Caf1-PA	5,8	49	5,8	2	2	266500	120710
>Cam-PA	98,7	17	8,7	55	42	112490000	67294000
>CapH2	29,9	110	4,6	109	65	42097000	14688000
>cathD-PA	26,8	42	6,6	14	15	1837700	3930400
>Cctgamma-PA	13,1	59	5,0	8	6	971050	2222200
>cdc2-PA	11,8	34	7,0	3	3	200110	307580
>CG10031-PA	16,3	14	9,0	2	2	354620	528710
>CG10077-PA	26,8	88	5,1	36	23	6923600	7174100
>CG10116-PA	30,4	31	7,0	6	5	2579200	1677800
>CG10237-PB	31,8	38	7,1	10	8	2420100	1929800
>CG10289-PA	5,2	111	3,4	6	2	1126800	227430
>CG10306-PA	45	26	8,1	15	12	5800400	3284600
>CG10407-PA	6,2	30	8,0	2	2	140580	169530
>CG10469-PA	16,1	30	7,0	4	1	990390	0
>CG10470-PA	22,4	21	8,4	6	4	1017400	493520
>CG10472-PA	17,6	31	7,7	5	7	1537600	1520500
>CG10527-PA	35,5	32	7,1	12	13	1225100	4640900
>CG10540-PA	78	33	6,6	51	39	73322000	53643000
>CG10565-PA	13	74	4,9	9	4	1299500	421860
>CG10576-PA	19,2	43	5,9	9	7	1542500	1603500
>CG10627-PA	31,5	61	5,0	15	11	3199900	2418900
>CG10641-PA	51,2	25	8,0	7	8	1371400	1049000
>CG10664-PA	19,8	21	8,9	5	5	2366700	1725100
>CG10672-PA	25,6	34	8,0	8	9	1326900	1832600
>CG10680-PA	16,3	28	7,0	1	3	23343	291650
>CG10724-PA	32,9	67	5,0	20	13	5488600	2267400
>CG10911-PA	23,1	38	3,4	18	16	22713000	11868000
>CG10912-PA	16,2	30	4,8	6	3	2688600	2208200
>CG1091-PB	7,1	64	5,0	5	4	771310	622840
>CG10990-PA	5,1	56	4,7	4	3	378770	286810
>CG10992-PA	7,6	37	8,1	5	2	343370	194120
>CG11015-PA	20	14	9,0	2	2	228440	261850
>CG11092-PA	7,2	94	4,2	4	2	685810	448710
>CG11107-PA	12,8	83	5,0	8	7	910520	1056100
>CG11137-PA	36,1	18	8,8	5	4	373850	331180
>CG11241-PA	6,7	56	6,0	2	3	451900	658910
>CG1146-PA	7	36	9,0	2	1	162090	41862
>CG11669-PA	29,9	67	4,8	18	5	11176000	1540900
>CG11837-PA	7,5	35	7,0	2	2	265300	338220
>CG11844-PB	21,2	49	6,0	6	7	1493200	2340500
>CG11875-PA	29,1	35	7,0	6	11	967200	1947400
>CG11876-PA	26,8	39	6,9	9	9	5688600	9695300
>CG11909-PA	25,6	75	5,0	16	8	5969000	1061100
>CG11999-PA	16,7	24	8,0	3	3	659540	837270
>CG12042-PA	45,5	58	5,6	23	19	4875400	5713800
>CG12079-PA	14,7	30	8,0	3	3	305950	205510
>CG12114-PA	11,5	41	7,1	8	6	380240	750130
>CG12128-PA	12,4	54	5,1	5	4	508360	545750
>CG12139-PB	6,4	506	1,6	22	29	1793600	2705800
>CG12163-PA	13,4	69	6,9	13	13	2516300	2053600
>CG12206-PA	8,4	63	8,9	6	4	549100	257090
>CG12262-PA	7,6	46	6,4	6	6	1019900	10907000
>CG12264-PA	16,5	51	6,7	15	6	1584800	1960800
>CG12304-PA	10,2	37	7,0	3	2	205770	298980
>CG12400-PA	22,4	13	9,0	2	2	348360	237390
>CG1249-PA	63	14	9,0	8	8	2412300	2723200
>CG12534-PA	22,3	22	8,4	6	6	381770	334300
>CG12602-PA	6,5	93	7,8	8	4	1000100	977630
>CG12883-PA	17,8	18	8,7	3	4	85103	266300
>CG1307-PB	19,4	20	8,0	3	3	340020	355650

Anhang

>CG13083-PB	6	35	6,3	3	1	739000	687520
>CG13084-PA	14,5	51	5,2	21	18	3211500	4111700
>CG13117-PA	73,6	12	8,7	10	7	2838700	2052400
>CG13220-PA	24,8	16	9,0	4	1	2456900	244130
>CG13277-PA	23,6	12	9,0	2	1	180920	105500
>CG13298-PA	19	14	9,0	2	2	48943	63041
>CG13321-PA	67,1	31	7,5	30	19	9733700	8519300
>CG13335-PA	33,2	46	6,3	28	12	56594000	3376700
>CG13392-PA	9	25	8,0	2	2	78227	110460
>CG13472-PA	5	92	4,6	6	4	493340	701150
>CG13492-PB	8,5	321	2,1	39	22	8286700	2562000
>CG1381-PA	26,2	29	7,0	6	5	590120	835010
>CG13887-PB	10,1	26	8,0	2	3	585230	298120
>CG13997-PA	22,1	19	8,7	2	1	133320	47008
>CG14120-PA	9,4	151	2,0	13	13	1832900	1615600
>CG14207-PA	47,5	21	8,1	9	7	3012400	3017400
>CG14213-PA	11,8	34	7,0	2	3	195170	673180
>CG14224-PA	8,2	59	5,0	3	3	235780	356560
>CG14309-PA	21,7	107	6,3	31	26	7308400	10157000
>CG1444-PA	13,4	35	7,0	3	3	127730	242930
>CG14516-PB	6,3	115	3,6	7	9	910860	1673700
>CG14544-PA	18,3	35	7,0	4	2	434570	198670
>CG14648-PA	50,6	60	5,3	52	33	34224000	34711000
>CG14816-PA	38,1	33	7,2	18	11	2668200	2220000
>CG14820-PA	14,9	48	7,0	3	3	383650	409950
>CG14872-PB	7,1	35	7,0	1	2	31259	150780
>CG15019-PA	19,9	17	8,8	3	2	156310	112330
>CG15092-PA	16,2	36	6,9	18	14	3201800	2260800
>CG15100-PA	10,3	112	4,0	9	4	1386300	610600
>CG15255-PA	29,1	29	8,1	12	9	4241700	3649600
>CG15293-PA	12,3	37	6,7	2	4	235940	786780
>CG15347-PA	16,4	23	6,6	5	5	1404400	1605900
>CG15721-PA	6,3	93	1,0	4	5	772940	503320
>CG15818-PA	11,7	32	7,0	3	3	218960	294430
>CG15820-PA	6,5	35	8,3	3	1	142390	169750
>CG15825-PB	20,6	58	5,0	5	6	372550	1110500
>CG1623-PA	13,8	48	7,5	14	13	2091500	2198600
>CG16749-PA	15,5	28	7,0	4	4	744770	800020
>CG16817-PA	25	21	8,0	2	4	30972	344700
>CG16935-PA	7,3	39	6,5	2	2	284440	407720
>CG17018-PD	20,2	148	3,8	53	34	18585000	8842800
>CG17033-PA	25,7	36	6,9	9	6	1270900	1534500
>CG17266-PA	19,1	20	8,9	5	3	236910	221960
>CG17272-PA	70,5	17	9,0	23	18	30127000	8352000
>CG17280-PA	22,9	12	9,0	2	1	448000	269560
>CG17347-PA	25,4	20	8,1	5	5	1033000	1686300
>CG1749-PA	11,9	44	5,9	7	6	2427800	2077900
>CG1751-PA	30,2	22	7,9	8	5	405310	401520
>CG17556-PA	25,5	33	7,0	5	6	600660	958810
>CG17593-PA	6,3	54	5,6	5	4	560730	535380
>CG17768-PA	14,3	17	9,0	4	4	236940	299450
>CG17838-PD	5,9	77	5,0	2	4	2262300	4179200
>CG18067-PA	20,8	26	8,0	5	4	670400	646420
>CG18178-PA	15,2	43	5,9	6	5	1159600	1823000
>CG18190-PA	18,2	27	7,0	4	4	84816	386930
>CG18212-PG	7,4	99	4,1	6	2	848360	281510
>CG1837-PA	22,1	47	5,8	9	6	2141700	1827200
>CG18493-PA	7,5	54	5,7	5	4	630780	813450
>CG18591-PA	27,7	11	9,0	4	4	1849500	2082200
>CG18811-PA	11,9	104	4,9	20	20	3530400	2427200
>CG1893-PA	14,4	30	7,5	6	6	1003000	1049700
>CG1939-PA	13,6	27	8,1	4	3	219160	227230
>CG1962-PA	17,6	90	5,3	39	21	4838500	4317900
>CG1973-PA	6	97	4,6	7	1	608280	51157
>CG2081-PB	20,6	18	9,0	2	2	76158	169940
>CG2185-PA	27	22	8,1	6	5	529890	519810
>CG2233-PA	14,3	47	6,1	6	4	1645700	1571200
>CG2246-PA	10,1	45	6,0	2	2	567310	536430
>CG2358-PA	11,9	21	9,0	2	2	197680	201100
>Cg25C-PA	6,5	174	3,1	34	39	45884000	36780000
>CG2789-PA	9,2	20	9,0	2	2	174830	192810
>CG2791-PA	26	63	4,8	10	13	1042300	2558100
>CG2982-PA	46,1	73	5,1	44	42	20713000	23068000
>CG3004-PA	15,7	35	7,0	3	3	466290	641200
>CG30069-PA	13	420	3,0	9	14	398630	1717800
>CG30159-PA	23,8	28	8,3	7	5	1482300	1655600
>CG30185-PA	14,5	20	8,3	4	2	306480	254980
>CG30360-PA	17,3	69	5,2	12	9	7466800	2944400
>CG30382-PA	26,6	27	7,3	5	7	531450	891680
>CG30492-PE	12,4	103	3,7	18	15	2723900	1928100
>CG3074-PA	57,5	49	6,6	50	37	24694000	28649000
>CG31012-PC	5,3	92	4,6	7	5	578870	668170
>CG31195-PA	18,1	96	4,0	16	9	2625000	1801300
>CG31198-PA	46,1	107	3,5	70	46	64192000	77940000

Anhang

>CG31233-PA	40,9	107	4,1	42	27	30572000	26369000
>CG31249-PA	50,8	28	8,0	14	13	2392200	2569600
>CG31266-PA	14,7	28	8,0	3	3	191330	263420
>CG31343-PA	27,6	108	4,1	60	42	38060000	35826000
>CG31352-PA	38	90	5,1	84	60	17844000	14657000
>CG3164-PA	5,7	78	6,6	15	11	1819600	2217600
>CG31739-PA	9,5	122	3,3	7	8	578330	1011700
>CG31938-PA	20,3	25	8,0	4	3	408430	153970
>CG32147-PA	21	25	8,0	5	4	974520	1237700
>CG32165-PA	23,4	121	4,5	39	20	7731400	3645500
>CG32177-PA	7,5	29	7,9	4	3	145310	276460
>CG3226-PA	10,9	26	8,0	1	2	130360	117420
>CG32306-PB	6,5	237	5,7	27	24	3352400	5711700
>CG32473-PA	14,7	113	3,8	22	18	2037200	3862400
>CG3249-PC	10,2	67	5,2	6	4	708770	730360
>CG32633-PA	66,7	31	7,3	27	23	12875000	14288000
>CG32644-PB	7,4	63	3,2	2	3	113870	495300
>CG32671-PA	5,6	23	5,3	1	2	22398	927680
>CG3305-PA	5,3	35	5,3	2	1	209440	198020
>CG33105-PA	18,9	28	8,0	5	5	664870	823420
>CG33123-PA	10,8	135	3,4	12	9	628540	1536100
>CG33127-PA	38	31	7,2	16	10	6029600	3963900
>CG33303-PA	7,2	52	6,0	3	3	686750	1116900
>CG3394-PA	5,8	77	5,0	2	1	241530	70491
>CG34039-PA	11,2	22	8,0	2	1	115580	34367
>CG3428-PA	22	36	7,0	9	8	1111900	1363900
>CG3430-PA	8,6	68	5,1	6	5	770420	1105900
>CG3501-PA	21,2	23	8,1	4	4	400110	613720
>CG3529-PB	18,4	58	5,1	11	10	2668700	4246100
>CG3564-PA	28,8	23	8,3	9	7	1380400	1510100
>CG3566-PB	24,8	13	9,0	3	3	127470	146590
>CG3662-PA	10	36	7,0	3	2	63852	154150
>CG3672-PA	7,7	30	6,6	2	3	51850	210030
>CG3734-PA	20,3	53	6,0	7	4	3457400	1064800
>CG3800-PA	43,6	18	8,9	9	9	1428400	1443700
>CG3841-PA	9,9	63	5,0	4	3	2023200	1101100
>CG3884-PB	68,2	31	7,2	31	13	9626100	6516000
>CG3902-PA	6	45	6,0	2	1	383320	170740
>CG3906-PA	5	28	7,2	3	2	161270	51363
>CG3909-PA	25,4	36	7,0	9	7	668140	999130
>CG3940-PA	6,9	34	7,0	2	2	143620	358600
>CG3957-PA	7,9	36	7,0	1	2	43212	120600
>CG3983-PA	8,1	66	5,0	4	4	361690	460920
>CG3999-PA	37,2	110	4,0	2	46	41410	28330000
>CG4009-PA	10,4	71	5,0	5	4	649730	455760
>CG4038-PA	31,2	23	8,0	13	8	3214100	1960200
>CG4164-PA	11	40	6,3	4	2	308620	489350
>CG4169-PA	30,9	45	7,0	26	17	4424000	3590900
>CG4279-PA	23,4	16	9,0	2	2	155030	156110
>CG4289-PA	5,4	31	6,8	3	2	651150	1023500
>CG4363-PA	37,2	21	9,0	6	3	1026200	259430
>CG4365-PC	12,9	39	7,0	4	4	219910	537110
>CG4377-PA	26,8	25	8,1	5	2	971480	208560
>CG4389-PA	26,1	84	5,2	28	21	4862500	4104300
>CG4572-PA	22,4	54	5,0	6	6	1283400	1496800
>CG4586-PA	39,9	77	5,0	19	20	5563900	8191100
>CG4611-PA	7	80	5,0	3	3	530830	733640
>CG4612-PA	24,8	34	7,4	13	12	1787200	2555900
>CG4619-PA	18,8	64	5,0	10	10	2016800	2077800
>CG4643-PA	23,1	29	8,0	5	5	1259700	1178500
>CG4653-PA	10,2	27	7,3	3	3	858990	1068300
>CG4658-PA	9,9	58	5,3	4	5	456660	459860
>CG4679-PA	8	74	4,9	3	4	299030	314790
>CG4692-PA	39,3	12	9,0	4	4	889510	951400
>CG4827-PA	11,7	65	5,0	3	3	929760	635870
>CG4858-PA	17,7	28	8,0	2	3	731010	697440
>CG4951-PA	17,2	36	6,8	1	4	70393	385500
>CG5064-PA	13,6	69	5,0	8	8	1075800	946340
>CG5073-PA	29,8	24	7,9	9	9	1699600	2014800
>CG5174-PB	25,9	39	7,7	12	12	1235200	1981500
>CG5190-PA	6,1	53	6,0	2	1	462090	172170
>CG5214-PA	15,2	50	6,5	14	9	3739500	3806100
>CG5261-PB	5,1	54	5,9	4	3	288620	376680
>CG5317-PA	8,2	29	7,0	1	2	36874	124060
>CG5366-PA	10	139	4,3	28	15	3147700	3300200
>CG5434-PA	11,4	73	5,0	6	5	755270	490830
>CG5447-PA	12,6	17	9,0	2	2	168560	225600
>CG5525-PA	15	57	5,3	14	8	2382700	2984500
>CG5558-PA	6,2	49	6,0	2	1	1266900	371150
>CG5599-PA	12,8	50	6,0	1	4	83495	986280
>CG5641-PA	14,6	44	6,3	6	5	1538800	2840300
>CG5642-PA	31,5	63	5,3	27	16	9018600	4760500
>CG5726-PA	14	87	4,4	13	14	1445700	3851700
>CG5733-PA	29,6	77	5,0	15	14	3288600	2869200

Anhang

>CG5840-PA	41,4	28	7,9	12	10	3791000	1181000
>CG5885-PA	10	22	8,4	5	3	434160	419350
>CG5886-PA	20,6	59	5,0	12	9	2300000	2031600
>CG5903-PA	21,7	24	8,0	4	4	267640	429530
>CG5913-PA	5,1	50	6,0	2	2	549400	400090
>CG5941-PA	11,5	20	8,3	3	1	301900	73232
>CG5946-PB	7,9	36	7,2	3	2	172690	231660
>CG6322-PA	5,1	62	5,3	1	2	57851	151740
>CG6393-PA	5,3	32	6,8	1	3	59411	181140
>CG6439-PA	6,2	40	6,0	2	2	234620	330590
>CG6455-PA	9,2	94	5,0	7	7	863920	1270100
>CG6459-PA	40,7	29	8,1	12	11	4989900	6431600
>CG6540-PA	13,9	35	7,0	2	2	127750	400600
>CG6543-PA	30,8	32	8,0	7	7	1034700	986770
>CG6579-PA	10,8	20	9,0	1	2	23002	133560
>CG6617-PA	46,7	26	8,0	7	8	1653700	1710400
>CG6693-PA	37,1	35	7,0	13	10	2295400	2861300
>CG6745-PA	11,7	83	4,0	5	2	723470	275480
>CG6767-PB	40,2	43	6,9	37	14	16840000	7510400
>CG6782-PA	10,7	34	7,7	4	7	353070	340390
>CG6783-PC	19,7	17	8,3	5	8	309060	347400
>CG6842-PA	16,7	50	4,1	10	10	5117100	4404400
>CG6891-PA	14,7	19	9,0	2	1	210740	76740
>CG6904-PA	40,3	82	5,1	39	19	17152000	4877700
>CG7006-PA	25	21	8,2	4	5	581810	553650
>CG7033-PA	26,4	58	4,7	15	8	2046100	1182100
>CG7182-PA	12,7	57	5,0	5	4	671340	624030
>CG7262-PA	9,8	91	5,0	5	4	720000	488740
>CG7288-PA	9,3	58	5,9	4	5	534070	700950
>CG7359-PA	19,9	25	7,8	4	7	278800	672850
>CG7375-PA	25,4	21	7,9	8	7	1297400	748630
>CG7380-PA	33,3	10	9,0	3	2	544920	953610
>CG7429-PA	15,9	20	7,3	2	2	66241	101930
>CG7461-PA	17,9	71	5,3	13	6	1585500	937760
>CG7470-PA	8,9	84	5,0	5	4	730420	392610
>CG7580-PA	37,1	10	9,0	3	4	436190	691900
>CG7637-PA	42,2	8	9,0	3	2	305790	190230
>CG7668-PA	7,8	48	4,4	5	9	1113000	1128300
>CG7671-PA	6,7	40	6,0	4	2	556230	514240
>CG7777-PB	16	29	6,8	6	5	1216000	307850
>CG7834-PA	7,9	27	8,0	2	2	99512	81348
>CG7911-PA	28,8	17	8,2	4	2	372450	346400
>CG7920-PA	7,5	52	5,8	4	1	1870400	286880
>CG7945-PA	7,3	29	7,3	5	1	404410	201530
>CG7993-PA	32,5	36	7,1	9	9	474980	1282600
>CG8029-PA	15,6	41	8,1	9	7	11435000	9800800
>CG8036-PB	7,2	68	4,6	5	3	676030	494390
>CG8055-PA	9,3	25	7,0	2	2	73645	104760
>CG8142-PA	21,5	40	6,6	19	14	3011400	2515400
>CG8232-PA	9,8	139	3,2	9	8	423430	1248200
>CG8258-PA	18,5	59	5,2	19	15	2141500	1248900
>CG8309-PA	26,6	44	6,1	10	7	4136800	2700400
>CG8351-PA	22,6	59	4,9	11	10	1509500	1283000
>CG8397-PA	18	28	8,3	2	2	69972	57356
>CG8444-PA	9,4	34	7,5	2	4	239350	544670
>CG8464-PA	5,5	46	6,7	3	3	201030	267230
>CG8560-PA	8,4	47	7,0	3	2	368150	335740
>CG8578-PA	39,6	45	6,7	51	35	34257000	24228000
>CG8636-PA	28,3	30	7,1	9	12	1028600	1557700
>CG8693-PA	23,3	66	5,0	14	11	4365900	2934300
>CG8773-PA	6,3	110	3,0	2	3	337870	530840
>CG8798-PA	5,7	113	4,0	4	1	555610	61172
>CG8801-PA	6,4	75	6,1	6	2	691810	259060
>CG8831-PA	10,7	64	5,4	12	6	5626200	6625800
>CG8863-PA	36,2	45	6,2	22	14	9839200	7057500
>CG8885-PA	14,7	28	7,8	3	3	394940	354950
>CG8963-PA	21,6	63	5,1	12	10	2697400	2982600
>CG9027-PC	18,6	20	7,4	8	8	3575100	7849800
>CG9050-PA	5,5	41	5,0	2	2	2679500	1770400
>CG9172-PA	9	25	7,8	3	1	170740	67215
>CG9273-PA	43,1	26	7,6	7	12	563480	1010100
>CG9281-PB	37,5	70	6,4	65	39	14271000	6636600
>CG9306-PA	21,5	17	8,0	8	3	478820	287370
>CG9328-PA	6,1	20	8,8	3	1	264450	120850
>CG9336-PA	14,9	16	9,0	3	3	533730	1126900
>CG9373-PA	28,6	67	5,7	25	27	4683100	21103000
>CG9468-PA	5,6	115	5,3	4	4	1082500	768720
>CG9543-PA	41,8	35	7,1	20	17	8276600	10941000
>CG9577-PA	51	34	7,2	22	16	4479200	7989300
>CG9673-PA	27,2	28	8,4	16	10	4304100	2508700
>CG9675-PA	49,8	26	8,1	12	12	5189900	3975300
>CG9684-PA	6,9	72	5,4	5	3	298760	249100
>CG9742-PA	26,3	9	8,4	3	4	107720	159040
>CG9769-PA	38,6	31	7,7	14	14	7604000	7373400

Anhang

>CG9796-PA	50,8	28	8,0	12	13	2082100	5239100
>CG9911-PA	13,6	47	6,2	8	5	1368300	1286300
>CG9953-PA	23,6	57	5,6	19	14	5287700	4979600
>CG9987-PA	9,7	56	5,4	7	7	806340	849230
>Chd64-PB	51,6	21	8,1	9	9	1030700	905550
>cher-PA	68,9	239	2,9	524	418	304330000	197920000
>chic-PA	43,7	14	9,0	2	3	181100	350830
>CHIP-PA	10,7	34	7,0	2	2	64443	161980
>Chit-PA	9,3	50	5,7	2	5	153910	723040
>Cklalpha-PA	28,2	40	7,1	11	11	2231000	3001600
>CklIalpha-PA	37,5	40	7,0	22	14	7304500	9044100
>CklIbeta-PE	23,4	27	7,9	7	9	1088100	1731800
>ck-PA	11,7	250	3,6	71	34	12019000	3675900
>CLIP-190-PA	49,2	189	3,0	198	226	81712000	173270000
>cora-PA	9,9	184	3,3	27	26	2800400	10278000
>coro-PA	57,4	57	5,5	93	57	101210000	43344000
>Cortactin-PA	5,5	61	6,3	5	4	310960	273520
>CoVa-PA	45	17	9,0	7	6	1821600	950250
>Cp15-PA	36,5	12	8,6	4	4	173540	126850
>Cp16-PA	44,2	14	9,0	5	4	549070	776240
>Cp18-PA	12,8	17	9,0	2	2	229400	244930
>Cp19-PA	59	19	8,9	7	6	567600	768810
>Cp1-PC	36,4	42	6,9	38	22	10076000	14835000
>Cp36-PA	32,7	30	6,6	32	20	3893400	6537600
>Cp38-PA	37,9	30	6,6	43	32	4892800	6695300
>Cp7Fb-PA	5,6	56	6,4	3	4	169030	422740
>cpb-PA	75,4	31	7,2	52	39	47593000	26273000
>cue-PA	9,5	73	4,8	7	7	898510	1362300
>cup-PA	23	127	4,7	61	67	7549400	20021000
>Cyp1-PA	20,3	25	8,6	8	6	654550	641300
>Cyt-b5-PB	6,7	15	8,7	2	1	75118	103250
>dco-PA	5,5	48	6,8	3	1	159110	42775
>Ddx1-PA	31,5	81	5,2	29	16	4958800	3399000
>dec-1-PA	15,8	179	6,9	51	30	9735500	7498900
>deltaCOP-PA	40	58	5,5	36	25	12865000	9869900
>Dhc64C-PA	45,6	530	2,0	338	284	105420000	66754000
>dhd-PA	37,4	12	8,9	11	13	10488000	15952000
>didum-PC	41,3	208	4,2	242	170	92797000	49717000
>Dip1-PA	30,9	20	8,6	12	12	3279600	2078800
>Dlc90F-PA	55	12	8,9	14	12	3706900	4414700
>Dlic2-PA	46,7	54	6,1	71	61	25037000	41260000
>Dmn-PA	57,6	42	6,8	46	42	24836000	36885000
>DnaJ-1-PA	24,9	37	6,7	16	7	1393500	1382400
>dod-PA	34,3	18	8,9	3	4	309000	307130
>Dox-A2-PA	11,3	56	4,8	8	4	532470	473110
>Dp1-PA	23,8	144	3,2	32	25	5135600	7844200
>Drp1-PA	12,5	83	5,0	8	6	805630	716510
>dyn-p25-PA	34,4	21	8,0	6	6	1229000	1817800
>eEF1delta-PB	23,4	29	6,9	11	4	897430	1017300
>Ef1alpha48D-PA	38	50	5,0	83	55	54944000	29464000
>Ef1beta-PA	50,2	29	7,8	14	14	2490900	3210300
>Ef1gamma-PA	16,2	49	6,6	9	6	2125500	1288100
>Ef2b-PA	21,3	94	3,9	51	35	7864100	5275700
>eIF-1A-PA	34,5	17	8,4	9	8	601170	592120
>eIF-2alpha-PA	16,7	39	6,5	11	6	3282900	1959700
>eIF-2beta-PA	14,1	35	7,3	9	9	692770	913750
>eIF2B-gamma-PA	17,1	51	6,0	5	3	704950	414360
>eIF-3p40-PA	12,1	38	6,0	4	3	1652900	1299000
>eIF-3p66-PB	23,9	64	5,1	12	8	4594900	3720200
>eIF3-S10-PA	21,1	134	3,5	34	20	5659200	5895500
>eIF3-S8-PA	16,9	106	4,0	20	17	4040500	3033100
>eIF3-S9-PA	19	80	4,5	20	4	2614400	200830
>eIF-4a-PA	9,4	46	4,2	8	7	1182200	1373700
>eIF-4E-PA	56,8	29	7,1	14	10	2271700	5111500
>eIF-4G-PA	13,7	150	4,7	51	42	5642400	8647800
>eIF-5A-PA	49,1	18	8,8	13	11	3669900	3560700
>eIF6-PA	42,4	26	8,0	7	7	1678100	1678800
>eRF1-PA	18,3	49	5,8	8	6	2108800	1996300
>ERp60-PA	5,1	55	5,7	3	3	605790	571520
>etaTry-PA	46,6	28	7,2	14	8	2806700	1488400
>exu-PA	44,4	58	5,5	70	46	49326000	28605000
>Fas1-PC	18,6	73	4,9	9	9	1390300	1793400
>fau-PC	16,8	14	9,0	2	1	146300	105390
>Fer1HCH-PA	51,7	23	8,3	16	12	3518000	4399100
>Fer2LCH-PA	65,6	25	8,0	17	17	5013300	6979400
>Fib-PA	39,8	35	7,0	31	22	9185000	15275000
>Fibp-PD	19,4	47	6,5	7	5	1108200	626020
>Fim-PD t	28,2	72	6,4	37	20	7884500	3867200
>FK506-bp1-PA	32,2	39	6,4	42	44	11385000	24228000
>flil-PA	18,9	144	4,5	53	12	18327000	2610900
>fln-PA	35,2	21	7,8	6	2	544550	56501
>Flo-2-PA	22,6	48	5,9	7	4	1976100	785350
>flw-PA	8,5	51	7,0	1	3	24892	154710
>Fmr1-PA	40,4	76	4,4	56	44	18346000	13988000

Anhang

>Fs(2)Ket-PA	8,7	99	4,2	8	5	906780	863020
>gammaCop-PB	42,6	98	4,7	90	54	38388000	24682000
>gammaTub37C-PA	42,5	51	6,3	31	19	12200000	9953500
>Gapdh1-PA	10,5	35	4,7	9	14	636500	7915200
>Gbeta13F-PA	12,4	37	7,0	4	4	264130	578080
>Gbp-PA	43,8	55	5,1	17	13	3731700	3592100
>Gdh-PA	55,9	63	5,8	90	98	23272000	70342000
>Gel-PH	40,5	98	5,6	130	74	76770000	44409000
>gft-PA	7,5	90	4,6	7	1	704820	122420
>gish-PG	8,4	54	5,8	11	8	1215600	1630000
>Gl-PA	45	141	3,6	58	69	10739000	34785000
>Glt-PA	45,8	119	4,0	46	49	22918000	35609000
>glu-P	36,8	160	2,6	76	46	18390000	11313000
>gnu-PA	9,2	27	7,8	5	6	361130	649890
>Grip84-PA	19,9	107	4,6	23	17	4934100	2053400
>GstD1-PA	12	24	7,6	3	2	278700	119790
>GstS1-PA	30,9	28	6,7	9	7	2959800	5520400
>Hel25E-PA	14,6	49	5,4	8	8	1795300	2385700
>Hexo2-PA	15,6	71	5,2	10	7	3767000	1153800
>His1:CG31617-PA	11,7	26	7,4	5	3	429950	1478300
>His2A:CG31618-PA	41,9	13	8,6	6	4	9309900	8496500
>His2Av-PA	34,8	15	7,9	9	8	10103000	14924000
>His2B:CG17949-PA	36,6	14	9,0	11	10	4976400	10016000
>His3.3A-PA	15,4	15	6,8	5	5	702050	4136700
>His4:CG31611-PA	51,5	11	7,0	17	17	6475200	15193000
>HmgD-PA	27,7	12	9,0	3	3	357910	269570
>hoip-PA	48	14	9,0	11	11	5864300	6312000
>Hop-PA	22,4	56	5,2	12	8	2608100	1731800
>Hpr1-PA	11,1	81	4,4	12	9	1003000	1667000
>Hrb27C-PA	44,2	45	6,6	37	29	20237000	20545000
>Hrb87F-PA	7,3	39	6,6	5	3	269040	452720
>Hrb98DE-PB	10,4	39	6,6	10	6	1221500	1243100
>Hsc70-1-PA	5,6	71	4,4	1	4	14086	1052700
>Hsc70-3-PA	40,4	72	4,9	40	30	17940000	22193000
>Hsc70-4-PA	55,5	71	5,3	196	148	206980000	224510000
>Hsc70-5-PA	37,5	74	5,0	25	17	6450000	3987300
>Hsc70Cb-PA	10,1	89	3,8	5	1	892030	149720
>Hsp23-PA	78	21	8,1	23	24	9526200	17286000
>Hsp26-PA	82,7	23	7,3	119	123	144450000	168940000
>Hsp27-PA	54,9	24	7,4	82	73	93508000	112670000
>Hsp60-PA	42,6	61	4,9	24	24	4195200	5698300
>Hsp83-PA	36,5	82	4,5	63	50	29727000	25573000
>hts-PA	61,6	128	5,2	271	223	347820000	207130000
>ldgf4-PA	48,2	49	6,2	19	18	10414000	19210000
>ik2-PB t	28,5	82	4,9	19	19	4796000	5579000
>Imp-PA	39,2	62	5,7	53	46	23285000	23844000
>inx2-PA	20,2	42	7,2	12	7	2565000	1421200
>Iris-PA	9,8	59	5,0	4	3	620000	776430
>Jafrac1-PA	35,6	22	7,0	19	9	2450100	1929500
>Jafrac2-PA	14	27	8,0	3	1	803450	93797
>jar-PC	63,9	145	3,9	770	461	1045700000	1043100000
>kappaTry-PA	7,6	28	6,9	3	4	857860	1275000
>Karybeta3-PA	8,1	124	4,3	9	5	2012400	881950
>key-PA	7,8	44	6,2	3	2	323550	277310
>Khc-PA	7,9	110	4,4	8	7	707180	710460
>Klc-PA	8,3	58	4,9	5	4	785630	743110
>Klp3A-PA	29,5	136	3,6	56	44	14215000	11634000
>kst-PC	47,9	484	1,6	329	255	156270000	70161000
>(1)G0022-PA	18,4	58	5,3	13	7	2040300	1340200
>(1)G0156-PB	46,4	41	7,1	57	49	13846000	15884000
>(1)G0230-PA	46,5	17	9,0	7	5	928260	589250
>(1)G0320-PA	13,6	33	6,6	4	3	2292300	3019900
>(1)G0334-PC	11,7	49	6,0	4	3	632680	648570
>(1)G0431-PA	11,9	70	4,8	8	7	812330	912290
>(2)03709-PA	57,2	27	6,9	23	15	5612800	3516600
>(2)06496-PA	61,5	21	8,0	15	14	3112700	5353400
>(2)09851-PA	15,4	51	5,0	4	4	803710	894900
>(2)35Di-PA	19,8	19	9,0	3	3	188120	199830
>(2)37Cc-PA	65,9	30	7,4	33	22	10986000	6997900
>(2)44DEa-PD	16,9	81	5,0	11	9	1959100	1391400
>(2)efl-PA	31,6	21	8,1	6	4	695270	692100
>(2)k09913-PA	23,1	44	7,3	15	12	1208900	2191900
>(2)tid-PB	9,2	56	6,0	2	3	234580	410360
>(3)03670-PA	26,9	24	8,0	2	3	123870	227200
>(3)neo18-PA	16,7	22	8,7	3	4	363670	438520
>LamC-PA	8,5	70	5,1	4	4	208690	270080
>Lam-PA	27,3	71	5,1	11	13	644600	1913900
>LanA-PA	29,6	411	1,9	186	169	63256000	50246000
>LanB1-PA	23,3	198	3,1	121	140	27728000	43721000
>LanB2-PA	35,1	182	3,5	163	158	50775000	75698000
>La-PA	29	45	5,7	11	9	5333400	4470100
>lark-PA	13,9	40	7,0	11	10	652930	1004800
>larp-PC	8,6	151	4,5	23	21	2743000	2847500
>lic-PA	6,3	38	7,0	4	2	117750	175830

Anhang

>lin19-PA	9,8	90	4,6	10	2	956310	116120
>lva-PC	54	316	2,9	438	426	313510000	244400000
>LvpD-PA;	34,4	65	5,0	19	13	9083100	3869500
>LvpH-PA	44,9	66	5,8	33	15	36152000	6540600
>LvpL-PA	41,3	65	5,3	25	14	18722000	6480700
>mad2-PA	10,6	23	8,0	1	2	36283	147880
>mago-PA	46,3	17	8,9	7	4	1517800	1112900
>mbf1-PA	14,5	16	9,0	2	2	180050	262910
>me31B-PA	47,1	52	4,5	120	92	55442000	29779000
>MED18-PA	11,1	25	8,0	2	2	132620	188690
>MED4-PA	17,4	28	5,4	3	5	65864	451810
>Men-PB	41,5	85	4,8	19	37	2000000	7081000
>mfas-PJ	12,4	100	4,4	10	8	869650	1065800
>Mhcl-PA	28,7	227	2,2	140	54	53974000	10070000
>Mhc-PJ	63,4	224	3,0	1147	926	4254000000	2425400000
>Mhc-PK	5,1	221	3,5	98	84	140180000	147070000
>micr-PD	11	107	5,0	6	6	965680	1187800
>mit(1)15-PB	22,9	82	5,0	10	10	2132300	2165000
>Mlc1-PA	35,5	18	7,7	26	14	61434000	84780000
>Mlc2-PA	86,9	24	7,7	159	135	253950000	178270000
>Mlc-c-PA	95,9	17	7,4	97	77	307630000	208080000
>Mlp60A-PA	33,7	10	9,0	2	1	165000	65872
>Mo25-PA	5,9	39	7,0	2	2	174930	234030
>mod-PA	42,8	60	4,4	60	39	21747000	8970000
>Moe-PB	40,4	76	5,2	50	43	29651000	20444000
>MRG15-PA	14,2	47	6,1	4	4	726750	947800
>mrj-PA	26,6	29	8,1	7	6	1359200	955660
>msk-PA	16,4	119	3,9	19	6	4888300	941570
>mt:Coll-PA	23,2	26	8,2	5	4	2928400	1951300
>Mtor-PA	7,1	262	2,7	26	31	6334400	2390600
>mtrm-PA	24,9	25	7,6	15	13	1263000	2165800
>mtSSB-PA	62,3	16	9,0	14	12	8386200	6576500
>mTTF-PA	5,4	48	5,7	3	3	451780	578740
>mud-PB	5,5	289	2,2	8	11	1163500	1040200
>mus209-PA	16,2	29	7,1	3	4	146910	558550
>Myo31DF-PA	49	117	3,7	151	77	65226000	21906000
>Myo61F-PA	65,3	119	4,2	541	321	761250000	470140000
>Nacalpa-PA	43,8	23	7,3	29	18	9846300	10021000
>Nap1-PA	51,9	43	6,3	93	57	148190000	108300000
>Nat1-PA	7	103	4,1	6	3	875340	340130
>Nc73EF-PF	14,9	114	4,3	17	7	3468000	2060400
>ncd-PA	10,3	77	5,1	7	6	1201000	880220
>ND23-PA	10,6	25	8,0	1	2	110920	169740
>ND75-PA	19,4	79	4,9	10	6	1539000	881780
>Ndg-PB	23,9	151	3,0	57	65	15942000	24751000
>ndl-PA	12,3	292	3,0	41	49	5519100	11563000
>NHP2-PA	46,2	18	8,9	13	11	2868300	2978900
>Nipsnap-PA	16,8	32	7,9	4	4	913020	504360
>nito-PA	5,4	89	4,7	10	4	839640	624280
>Nlp-PA	23,7	17	8,2	9	8	1774700	2331700
>nmd-PA	12,7	42	7,0	4	4	181420	365050
>Nmt-PA	12,7	54	5,6	12	10	3732500	3110300
>noi-PA	8,5	58	5,0	3	3	433850	577450
>nonA-PB	19	82	5,0	8	10	2009100	3742800
>Nop56-PA	30,8	55	5,8	17	14	4444400	6805000
>nop5-PA	32,5	57	4,9	28	25	7254400	9697500
>NPC2-PA	23,6	16	8,1	4	6	699700	1021500
>Nrg-PB	13,6	144	3,1	5	15	176530	3044100
>nrv1-PA	29,4	35	7,0	5	6	622140	2300900
>nrv2-PA	10,2	37	7,0	1	2	21795	160790
>nuf-PA	22,9	57	5,3	12	12	1810800	4224200
>Nup170-PA	17	97	4,1	14	10	2544000	3291400
>Nup358-PA	15,9	296	4,0	83	65	23863000	30470000
>Nup58-PA	8,6	56	6,6	8	6	409260	746930
>Nup62-PA	15,7	41	6,8	10	7	801100	492150
>Nurf-38-PA	33,7	38	6,7	12	7	1318100	1196900
>nxf2-PA	6,4	97	4,6	6	3	663100	265780
>Obp83cd-PA	21,5	28	8,0	3	4	386840	551330
>Oda-PA	9,8	28	7,0	2	2	103480	179340
>oho23B-PA	69,9	9	9,0	12	9	4682400	5284800
>Oscp-PA	52,6	22	8,0	15	11	2015000	1964100
>Ost48-PA	8,9	50	6,0	3	3	261210	369870
>Ote-PA	16	47	6,6	3	8	49254	691440
>p16-ARC-PA	38,4	17	9,0	5	4	1373200	585520
>P5cr-PA	38,2	30	8,1	19	16	10534000	10734000
>Pabp2-PA	20,1	25	7,0	5	6	781470	1685700
>pAbp-PA	56,2	70	6,0	122	96	73029000	91391000
>Pcmt-PA	77,4	25	8,1	39	30	22563000	18580000
>Pdi-PA	20,8	56	4,9	7	9	595530	1403600
>PdsW-PA	18,9	19	9,0	2	2	141140	115430
>Pen-PA	30,7	58	4,5	22	18	4898300	5916200
>pen-PA	13	81	4,7	9	11	768600	1919200
>Pep-PB	25,3	78	4,5	22	32	5996100	28893000
>Pglym78-PA	14,9	29	8,0	3	3	219230	268480

Anhang

>pit-PA	7,2	77	5,0	3	4	311350	303770
>piwi-PA	16,7	97	4,1	25	13	6953000	2929100
>png-PA	19,2	33	6,9	6	4	659970	602900
>pod1-PA	8,2	119	4,8	12	6	1764300	889530
>polo-PA	16,5	67	6,9	12	11	2103100	1570700
>pont-PA	34,6	50	5,9	12	9	3723100	3121300
>porin-PA	67,4	31	7,7	30	31	13679000	12728000
>Pp1-87B-PA	40,1	35	7,2	15	12	2844700	5476500
>Pp1alpha-96A-PA t	5,8	37	7,0	2	2	151330	223360
>Pp2A-29B-PA	33,2	65	5,2	26	22	8641400	8349100
>Ppn-PA	9,3	313	2,6	42	50	9426400	8906400
>PpV-PA	10,9	35	7,2	4	2	504250	291060
>PRL-1-PA	33,5	20	8,0	6	4	438940	341820
>Prm-PA	30	102	2,3	44	35	9683700	4686900
>Prm-PC	10,8	74	7,0	6	7	760900	967480
>Pros26-PA t	16,2	26	8,0	2	2	460480	372160
>Pros28.1-PA	14,9	28	8,0	2	4	188200	269960
>Pros29-PA	19,3	29	6,6	4	7	416380	679600
>Pros35-PA	15,8	31	7,0	4	4	228550	400850
>Pros45-PA	6,4	46	6,3	3	3	619780	544860
>Prosbeta3-PA	22	23	8,0	4	4	266200	306590
>Prosbeta5-PA	14,5	31	7,9	3	4	186070	191190
>ProsMA5-PA	10,2	27	8,2	3	2	114950	116870
>Prx5037-PA	10,7	26	8,0	2	1	128310	65606
>pUf68-PA	11,8	68	5,5	10	6	1851900	938050
>PyK-PA	9,2	57	5,3	7	3	993010	790060
>qkr58E-1-PA	11,1	45	6,6	4	5	475140	742940
>Qm-PA	52,3	26	7,9	19	17	13656000	16394000
>qua-PA	25,6	101	4,1	61	24	10694000	2399400
>Rab11-PA	40,2	24	7,2	7	9	286510	1341100
>Rab4-PA	11,3	24	6,9	5	3	197180	572860
>RabX4-PA	9,4	24	5,7	7	8	2253600	2049100
>Rac1-PA	14,6	21	7,9	4	3	141510	186760
>Rack1-PA	71,4	36	7,1	76	60	73803000	79898000
>Rae1-PA	7,8	39	6,5	1	3	52792	254370
>Rala-PA	11,9	23	8,0	1	2	103140	187860
>Ranbp9-PA	10,9	114	4,2	13	4	2930200	737560
>RanGap-PA	7,6	66	5,0	3	3	348720	591510
>ran-PA	42,1	25	8,0	8	7	846590	727460
>Rap21-PA t	12,6	20	8,5	4	4	284940	327810
>Rbp1-PD	24,3	16	8,6	5	5	1571100	1508300
>ref(2)P-PA	15	65	5,3	8	9	846270	1471900
>rept-PA	16,2	54	5,9	9	7	1793900	2011200
>REV_CG10103-PA	5,5	46	2,3	3	1	1167600	6102400
>RfaBp-PA	8,1	373	4,7	33	22	15768000	8972700
>RfC38-PA	25,3	41	5,5	9	9	2929500	2425000
>RfC3-PA	52,1	37	7,0	21	18	3146900	4032400
>RfC40-PA	66,2	37	6,9	36	24	6316200	7507100
>rhea-PA	13	307	1,7	40	40	3869000	3268000
>rin-PA	5,7	75	6,0	11	10	295030	1143200
>Rm62-PA	49,2	79	5,5	106	79	69843000	56470000
>RnrL-PA	7,4	92	4,1	6	3	1065100	813430
>robl-PA	60,8	11	9,0	6	6	422000	1171300
>R-PA	12,5	21	8,0	2	2	189640	204270
>Rsf1-PA	12,5	21	8,4	4	3	357100	372930
>Sap-r-PA	13	106	4,9	20	18	1690100	2733100
>sar1-PA	13	22	8,0	1	2	61908	157630
>SC35-PB	34,4	21	7,3	10	12	1829500	13260000
>Scs-fp-PA	12	72	5,0	7	7	980740	982150
>scu-PA	42,7	27	7,9	8	8	720820	920820
>sec13-PA	9,3	40	6,2	6	7	689680	889190
>Ser6-PA	22	28	8,1	4	4	1579100	1199900
>sesB-PC	49,7	34	7,0	49	33	8010100	4250500
>SF2-PA	42,4	28	7,3	27	23	11214000	19751000
>Sh3beta-PA	47,5	17	7,9	23	17	4911700	3142900
>shg-PA	15,3	170	5,0	21	21	2298800	3110900
>shot-PH	17,1	990	1,6	196	159	29368000	18306000
>skpA-PA	63,6	19	8,5	13	10	2429900	1849600
>Slh-PD	11,1	75	5,0	4	6	453990	857410
>Smb-PA	36,2	21	8,6	18	14	3514800	3948800
>SMC2-PA	42,9	134	3,5	76	43	16710000	16934000
>SmD3-PA	12,6	16	8,9	4	3	2724400	3118600
>smt3-PA	13,3	10	7,3	2	1	55974	99520
>Snap-PA	18,8	33	7,0	4	4	158920	543040
>snf-PA	32,9	25	8,0	6	6	890500	1483800
>sn-PC	15,1	63	5,5	11	5	2539100	840560
>snRNP69D-PA	33,9	14	9,0	4	2	1182500	308200
>Sop2-PA	26,3	42	6,6	17	10	5270100	3463200
>sop-PA	50,6	29	8,0	31	26	15830000	19042000
>sqd-PB	20,1	36	6,4	15	11	3044500	3275900
>sqh-PA	79,3	20	7,6	154	117	422790000	246490000
>Src64B-PB	11,1	63	5,0	5	5	527580	517640
>SrpRbeta-PA	31,1	27	8,0	6	7	365470	556550
>Ssb-c31a-PA	18,2	12	9,0	2	1	324980	197730

Anhang

>SsRbeta-PA	22,6	21	7,5	5	8	2046400	3534900
>sta-PD	71,2	35	6,9	111	71	107640000	140660000
>Su(var)205-PA	17,5	23	8,0	2	3	185290	336070
>Su(var)3-9-PB	21,3	51	6,2	12	9	3276500	3263400
>swa-PA	51,6	62	5,7	61	51	16414000	25798000
>sw-PJ	40,3	74	5,3	25	27	18785000	29712000
>Syx7-PA typ	14,9	32	7,0	3	3	188160	898690
>Tao-1-PD	5,6	118	4,8	5	1	583340	156920
>Tapdelta-PA	18,7	18	8,9	6	4	1528900	1884100
>Tctp-PA	19,8	20	7,5	7	3	409160	312710
>TER94-PA	21,5	89	4,2	17	16	1400900	2830900
>tex-PA	21,9	36	7,0	7	6	564410	1001000
>TFAM-PB	29,2	33	7,7	16	17	1988700	2547000
>Thiolase-PA t	26,9	51	7,2	25	18	4484100	3924100
>thoc6-PA	6,9	39	6,2	3	2	384860	491660
>thoc7-PB	10,1	33	6,9	4	5	134290	440910
>Tm1-PA	85,3	29	6,7	235	145	455880000	340030000
>Tm1-PE	19,8	80	6,7	194	145	443290000	310980000
>Tm1-PF	5,8	53	6,9	18	12	63975000	50665000
>Tm2-PA	71,1	33	7,2	210	137	391520000	318350000
>tmod-PD	49,7	49	6,6	84	58	90228000	47637000
>Tom40-PA	9,6	36	6,5	4	6	163520	387530
>Top2-PA	10,4	164	2,6	20	18	1998100	2101200
>torp4a-PA t	19,7	38	7,0	3	5	259250	946870
>TpnC25D-PA	32,9	17	9,0	5	5	1864500	999890
>TpnC47D-PA	43,2	18	9,0	15	9	10234000	4445900
>TpnC4-PA	45,1	17	9,0	6	5	3475800	1497500
>TpnC73F-PA	65,2	18	8,4	69	47	145610000	75519000
>TppII-PD	16,2	159	3,5	23	23	1059600	3480700
>Tps1-PA	28,6	91	4,5	39	14	6930200	2542600
>tral-PA	45,2	69	5,7	87	66	46724000	65598000
>translin-PA	21,7	27	7,9	5	4	685340	494860
>Trax-PB	6,2	34	7,0	2	1	148240	93686
>Treh-PC	23,8	68	4,9	12	8	2635000	1581500
>Trip1-PA	57,7	36	6,6	28	18	4340600	2735600
>trol-PF	24,9	513	2,9	299	290	116580000	102930000
>Tsf2-PA	11,2	92	4,7	8	9	760090	1489800
>tsr-PA	72,3	17	8,7	27	17	20931000	8253600
>tsu-PA	20,6	19	8,3	5	3	722800	647390
>Tudor-SN-PA	46,2	103	4,1	46	33	17805000	17304000
>twf-PA	28,3	39	6,0	14	4	4260100	1097900
>tws-PA	6,4	57	5,8	5	7	1802900	1897600
>TxI-PA	8	32	7,0	1	2	25960	167420
>U2af38-PA	17,8	30	6,7	7	6	728420	1105800
>U2A-PA	48,3	30	7,4	9	8	676170	1411000
>Uch-L3-PA	14,5	38	7,0	4	5	360090	665660
>und-PA	11,2	50	5,0	5	5	1360400	1496200
>Upf1-PA	13	130	3,8	14	8	2485000	1334700
>up-P	8,1	47	6,1	29	18	65386000	36061000
>up-PA	51,4	47	6,0	160	94	421970000	257520000
>Vap-33-1-PB	48,7	29	7,1	21	23	4567500	12019000
>vas-PA type=protei	13,8	72	5,1	13	8	1608500	1283600
>Vha100-2-PA	10,6	95	3,9	18	18	2427100	1609800
>Vha13-PA	20,5	14	8,9	3	4	1853300	1732100
>Vha14-PA	40,3	14	9,0	7	7	956740	1502300
>Vha26-PA	72,1	26	7,4	38	30	13886000	17187000
>Vha36-PA	36,2	28	7,5	21	13	3278800	5684500
>Vha44-PA	39,2	45	6,0	21	16	7951200	9409600
>Vha55-PA	52,7	55	6,2	35	43	29502000	35556000
>Vha68-2-PA	61,7	68	5,3	73	68	49829000	58465000
>VhaAC39-PA	48	40	6,8	59	43	22029000	26868000
>VhaM9.7-2-PA	28,1	10	9,0	4	4	287910	521950
>VhaSFD-PA	36,3	54	5,9	19	21	6211300	8322800
>vig-PA	10,6	53	5,0	3	3	326150	492350
>Vinc-PA	7,1	106	8,8	10	9	1129000	1242800
>vkg-PA	10	194	2,3	37	59	28265000	32176000
>wal-PA	20	34	7,0	5	7	250500	470720
>waw-PA	10,9	78	5,9	7	4	453010	312200
>wdp-PA	16,8	75	6,3	19	15	2012900	2651500
>wupA-PA	51	24	7,7	117	73	291330000	164120000
>wupA-PB	21,6	24	7,9	5	5	1519300	759820
>wupA-PD t	22,1	24	7,9	7	6	5388600	3924800
>wupA-PG	36,8	30	7,3	16	17	3781600	3989000
>yellow-g-PA	26,7	43	6,5	19	16	2383700	2562500
>yl-PB	13,5	220	3,4	33	40	5310200	7218100
>Yp1-PA t	61,3	49	4,7	131	110	78989000	92613000
>Yp2-PA	65,8	52	5,3	168	119	183460000	166610000
>Yp3-PA	72,4	46	5,2	185	150	189940000	164020000
>yps-PA	34,7	38	6,2	17	15	5669900	5432600
>Zeelin1-PB	35,9	42	6,8	39	24	29584000	9714600
>zetaCOP-PA	14,9	20	9,0	3	3	658330	921730
>zetaTry-PA	21,8	30	7,3	11	7	1103900	1388500
>zip-PD	70,3	232	3,1	2028	1348	9569300000	4389300000

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Betreuer PD Dr. Stefan Heidmann bedanken, da er die Herausforderung meiner familiären Situation angenommen und mir eine Doktorandenstelle zur Verfügung gestellt hat. Er hat mich vom Modellorganismus *Drosophila* begeistert und mir die nötigen methodischen Grundlagen nähergebracht, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Außerdem hat er stets Zeit gefunden, um über Fragen und Probleme zu diskutieren.

Stefan, vielen Dank für die wirklich tolle Zusammenarbeit!

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Olaf Stemmann, der uns *Drosophilisten* herzlich in seinem Froschteich aufgenommen und uns außerdem durch Diskussionen und auch Materialien stets in unserer Arbeit unterstützt und vorangebracht hat.

Ich möchte mich auch bei Anne Frohn, Felix Oppermann und Cyril Boulegue (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und die Hilfe bei der Auswertung meiner Daten bedanken.

Herzlicher Dank gilt natürlich auch all meinen Laborkollegen, die mich stets unterstützt und mir außerdem eine sehr nette Zeit im Labor beschert haben. Ich danke besonders Frau Brigitte Jaunich für hervorragende technische Assistenz und Evelin Urban und Sonal Nagarkar für deren Zusammenarbeit und sowohl experimentelle als auch persönliche Unterstützung. Dank gilt natürlich auch Martina Frank, Johannes Reithinger, Regine Häfner, Franziska Aurich, Annika Pfeiffer, Irene Boos und Kristina Seel für die experimentelle Unterstützung. Ich hatte echt eine angenehme Zeit am Lehrstuhl, die mich in allen Bereichen vorangebracht hat.

Besonderer Dank gebührt auch meiner gesamten Familie. Besonders meine Eltern und auch meine Schwiegermama haben mich während meines Studiums und auch während meiner Doktorandenzeit stets unterstützt. Ohne Euch wäre diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen.

Auch bei meinem Mann Gregor möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Er hat wirklich immer an mich geglaubt und mir durch seine Liebe einen sehr großen Rückhalt in allen Lebenslagen gegeben. Schatz, ich liebe Dich!

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kindern Theo und Charlotte. Die Beiden haben für den nötigen Ausgleich zur Laborarbeit gesorgt und mein Leben sehr bereichert. Ich habe Euch echt ganz doll lieb!

Lebenslauf

Name: Sabine Herzog, geb. Noske
Geburtsdatum: 8. November 1982
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1989-1993 Grundschule in Chemnitz/Siegmars
1993-2001 Johannes Kepler Gymnasium in Chemnitz
Abschluss mit Abitur im Juni 2001

Studium


2002-2007 Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth
2006-2007 Diplomarbeit Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth
in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Stefan Heidmann
Thema: „Untersuchungen zu Interaktionen der chromosomalen
Proteine CID und Cap-G in *Drosophila melanogaster*“
Abschluss mit Diplom im April 2007

Doktorarbeit

2007-2011 Doktorarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth
in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Stefan Heidmann

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 17. August 2011



Sabine Herzog