

Shugoshin-2 in Vertebraten: Lokalisation, Funktion und neue Bindungspartner

Dissertation der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Michael Orth

April 2010

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG:

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 12. April 2010

Promotionsgesuch eingereicht am:

12. April 2010

Tag der mündlichen Prüfung:

24. August 2010

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Cremer

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Olaf Stemmann zwischen Mai 2005 und Dezember 2008 in der Abteilung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und zwischen Januar 2009 und April 2010 am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Orth, M.*, Mayer, B.*, Brongel., K., Rothweiler, U., Weber, L., Hofmann, K., Holak, T., und Stemmann, O. (2010). Shugoshin is a Mad1/Cdc20-like interaction partner of Mad2. Manuskript in Vorbereitung. *geteilter Erstautor

Rothweiler, U., Czarna, A., Weber, L., Popowitz, G. M., Brongel, K., Kowalska, K., **Orth, M.**, Stemmann, O., und Holak, T. A. (2008). NMR screening for lead compounds using tryptophan-mutated proteins. *Jour. Med. Chem.* *51(16)*, 5035-5042.

Widmung

Meinen Eltern mit großer Dankbarkeit.

1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
2.1 Der eukaryotische Zellzyklus	8
2.2 Die Mitose	9
2.2.1 Der Eintritt in die Mitose	10
2.2.2 Die Schwesterchromatidkohäsion	11
2.2.2.1 Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion in S-Phase	13
2.2.2.2 Aufhebung der Schwesterchromatidkohäsion in Mitose	14
2.2.2.3 Aufhebung der Schwesterchromatidkohäsion in Meiose	15
2.2.3 Shugoshin: „Schützender Geist“ der Kohäsion	16
2.2.4 Der <i>Spindle Assembly Checkpoint</i> (SAC)	19
2.2.4.1 Mad2 als zentraler Effektor des SAC	21
2.2.4.2 Strukturelle Aktivierung von Mad2: Das Matrizenmodell	23
2.2.4.3 Mitotischer Checkpoint Komplex (MCC)	23
2.2.4.4 Chromosomaler Passenger Komplex (CPC)	25
2.2.4.5 Funktion des <i>Spindle Assembly Checkpoint</i> in Meiose	25
2.2.4.6 Inaktivierung des SAC und Austritt aus der Mitose	26
2.2.5 Shugoshin im spannungsabhängigen Zweig des SAC	27
2.3 Zielsetzung der Arbeit	28
3. Ergebnisse	30
3.1 Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Shugoshin und Mad2	30
3.1.1 Humanes Shugoshin-2 (hSgo2) wechselwirkt mit Mad2	30
3.1.1.1 Die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 ist zellzyklusunabhängig	31
3.1.1.2 Die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 benötigt keine Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad1 oder Cdc20	32
3.1.1.3 Die Wechselwirkung von Shugoshin mit Mad2 im Menschen ist auf hSgo2 beschränkt	32
3.1.1.4 Die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 ist in Säugern konserviert	33
3.1.2 Die Shugoshin-Mad2-Wechselwirkung besteht auch in Organismen, die nur über ein Shugoshingen verfügen	35
3.1.3 Bestimmung des Mad2-bindenden Motivs in <i>Xenopus laevis</i> Shugoshin-1 (XSgo1) über Far Western Blot	37
3.1.4 Shugoshine besitzen ein in Mad1 und Cdc20 konserviertes Mad2-interagierendes Motiv (MIM)	38
3.1.5 Shugoshine wechselwirken ausschließlich mit der geschlossenen Konformation von Mad2 (C-Mad2)	43

Inhaltsverzeichnis

3.1.6	Shugoshin, Mad1 und Cdc20 konkurrieren um eine gemeinsame Bindestelle an Mad2	46
3.1.7	Ein Komplex bestehend aus Shugoshin und Mad2 kann analog dem Mad1-Mad2-Komplex offenes Mad2 rekrutieren	49
3.1.8	Die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 entspricht biochemisch der Wechselwirkung zwischen hCdc20 und Mad2	50
3.2	Untersuchung der Sgo2-Mad2 Wechselwirkung auf Funktionen innerhalb der Mitose von Säugern	52
3.2.1	Die Lokalisation von humanem Sgo2 während der Mitose	53
3.2.1.1	Humanes Sgo2 relokalisiert zweifach während der Mitose	53
3.2.2	Die Lokalisation von hSgo2 am zentralen Zentromer benötigt Mad2	55
3.2.2.1	Die grundsätzlichen Lokalisationen von hSgo2 und hMad2 während der Mitose sind unabhängig voneinander	55
3.2.2.2	Mad2-bindedefizientes hSgo2 lokalisiert an Randbereiche des Zentromers	57
3.2.2.3	Mad2-bindedefizientes hSgo2 bleibt fähig, das Kinesin MCAK an Zentromere zu rekrutieren	59
3.2.3	Humanes Sgo2 wird für den Erhalt der Schwesterchromatidkohäsion in der frühen Mitose nicht benötigt	59
3.2.4	Humanes Sgo2 wird für die mitotische Progression in unbehandelten Zellen nicht benötigt	62
3.2.5	Humanes Sgo2 akkumuliert an Chromosomen, die in Metaphase außerhalb der Äquatorialebene liegen	65
3.2.5.1	Humanes Sgo2 vermittelt die Akkumulation von MCAK an Chromosomen, die außerhalb der Metaphaseplatte liegen	68
3.2.5.2	Die Akkumulation von hSgo2 und MCAK an polnahen Metaphasechromosomen ist abhängig von Bub1 und Aurora B	68
3.2.5.3	Die Depletion von Mad2 führt zu einer Fehllokalisierung von hSgo2 an Randbereiche des Zentromers	70
3.2.5.4	Die Akkumulation von Faktoren des mitotischen SAC an fehlorientierten Chromosomen ist unabhängig von hSgo2	72
3.2.6	Humanes Sgo2 wird für die generelle Funktion des SAC in Mitose nicht benötigt	75
3.2.7	Ein <i>in vitro</i> System zum Studium des SAC bestätigt seine Unabhängigkeit von Shugoshin	77
3.2.8	Die Depletion von Sgo2 weist auf eine aktive Funktion von Aurora B Kinase innerhalb des mitotischen SAC hin	79
4.	Diskussion	84
4.1	Humanes Shugoshin-2 besitzt keine essentiellen Funktionen während der Mitose	84

4.2 Identifikation von Shugoshin als Mad1/Cdc20-ähnlichen Bindepartner von Mad2 in Vertebraten	86
4.3 Potenzielle Funktionen der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung in Meiose	87
4.4 Experimentelle Ansätze zur Bestimmung der Funktion der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung in der Meiose von Säugern	92
5. Material und Methoden	94
5.1 Material	94
5.1.1 Hard- und Software	94
5.1.2 Protokolle	94
5.1.3 Chemische und Biochemische Materialien	94
5.1.4 Molekularbiologische Materialien	95
5.1.4.1 Vektoren	95
5.1.4.2 Oligonukleotide	95
5.1.4.3 <i>E. coli</i> -Stämme	97
5.1.4.4 Puffer und Medien	97
5.1.4.5 <i>Small interfering RNAs</i> (siRNAs)	97
5.1.5 Kultivierung von Säuger- bzw. <i>Xenopus laevis</i> -Zellen	98
5.1.5.1 Zelltypen	98
5.1.5.2 Puffer und Medien	98
5.1.6 Antikörper	99
5.2 Methoden	99
5.2.1 Molekularbiologische Methoden	99
5.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	99
5.2.1.2 DNA-Fragmentierung durch Restriktionsendonukleasen	100
5.2.1.3 Enzymatische Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	100
5.2.1.4 Agarosegelelektrophorese	100
5.2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	100
5.2.1.6 Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten	101
5.2.1.7 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	101
5.2.1.8 Herstellung transformationskompetenter Hefen	101
5.2.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Bakterien	102
5.2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in Hefen	102
5.2.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Bakterien	102
5.2.1.12 Einführung von Mutationen durch gezielte Mutagenese	102
5.2.1.13 Sequenzierung von DNA	103
5.2.2 Proteinbiochemische Methoden	103
5.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	103
5.2.2.2 Kolloidale Coomassie-Blau-Färbung	103

Inhaltsverzeichnis

5.2.2.3	Detektion von Proteinen mittels Western Blot	104
5.2.2.4	Rekombinante Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> -Bakterien	104
5.2.2.5	Native Aufreinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i> -Bakterien	105
5.2.2.6	Denaturierende Aufreinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i> -Bakterien	106
5.2.2.7	Generierung polyklonaler Antikörper gegen <i>Xenopus laevis</i> Sgo1	106
5.2.2.8	Immunpräzipitation von Proteinen aus Zelllysaten	107
5.2.2.9	Affinitätsreinigung von Proteinen im gereinigten System	108
5.2.2.10	Affinitätsreinigung zur Darstellung der konkurrierenden Bindung von Shugoshin, Mad1 und Cdc20 an Mad2	108
5.2.2.11	Far Western Blot	108
5.2.2.12	Hefe-Zwei-Hybrid System	109
5.2.2.13	Isothermische Kalorimetrie (ITC)	109
5.2.2.14	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie (HSQC)	109
5.2.3	Zellkultur	110
5.2.3.1	Kultivierung von 293T-, HeLa WT-, und HeLa S3-Zellen	110
5.2.3.2	Kultivierung von XTC-Zellen	110
5.2.3.3	Calciumphosphat-abhängige Transfektion von 293T-Zellen	110
5.2.3.4	Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA	111
5.2.3.5	Transfektion von XTC-Zellen mit Plasmid-DNA	111
5.2.3.6	Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA	111
5.2.3.7	Untersuchung von hSgo2-Mutanten mittels RNAi/-Rescue	111
5.2.3.8	Zellzyklus-Synchronisation von 293T- oder HeLa-Zellen	112
5.2.3.9	Durchflusszytometrie	112
5.2.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	112
5.2.4.1	Herstellung Poly-L-Lysin-beschichteter Deckgläser	112
5.2.4.2	Zentrifugation von HeLa-Zellen auf Deckgläser	112
5.2.4.3	Fixierung und Permeabilisierung von HeLa-Zellen	113
5.2.4.4	Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in HeLa-Zellen	113
5.2.4.5	Immunfluoreszenzfärbung von Chromosomen- <i>Spreads</i>	113
5.2.4.6	Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten	114
5.2.4.7	Lebend-Zell-Mikroskopie	114
5.2.5	<i>Xenopus laevis</i> Ei-Extrakte	114
5.2.5.1	Herstellung von Meiose II-arretierten Ei-Extrakten	114
5.2.5.2	Immundepletion von XSgo1 aus Ei-Extrakten	116
5.2.5.3	Etablierung des <i>Spindle Assembly Checkpoint</i> in Ei-Extrakten	116
5.2.5.4	<i>In vitro</i> Translation (IVT)	116
5.2.5.5	Autoradiographie	116
6.	Literatur	117
7.	Abkürzungen	133
8.	Danksagung	136

9. Lebenslauf

137

1. Zusammenfassung

Akkurate Verteilung der Chromosomen während der Zellteilung ist eine fundamentale Voraussetzung für den Erhalt der genetischen Information eines Organismus. Durch Fehler innerhalb dieses Prozesses resultieren Aneuploidien, die wiederum zur Entstehung von Krebs oder Trisomien (z.B. Down-Syndrom) führen können. Es überrascht daher nicht, dass die Chromosomensegregation einen der am höchsten regulierten Vorgänge innerhalb des eukaryotischen Zellzyklus darstellt.

Die Schwesterchromatide eines jeden Chromosoms werden in S-Phase synthetisiert und gleichzeitig von einem sie ringförmig umschließenden Multi-Proteinkomplex, Kohäsin genannt, miteinander verpaart. Ihre Trennung in der nachfolgenden Kernteilungsphase (Mitose) erfolgt bei Vertebraten in zwei Stufen. Während Kohäsin von den Chromosomenarmen bei Phosphorylierung in Prophase dissoziiert, wird zentromerisches Kohäsin von der später aktiv werdenden Separase proteolytisch gespalten, wodurch die Anaphase ausgelöst wird. Shugoshine (SGOs) schützen die Schwesterchromatidkohäsion im Bereich der Zentromeren, indem sie durch Rekrutierung von Protein-Phosphatase 2A (PP2A) der Phosphorylierung von Kohäsin entgegenwirken. In Säugern schützt Sgo1 mitotisches Kohäsin in der Prophase, während Sgo2 meiotisches Kohäsin vor der phosphorylierungsabhängigen Spaltung durch Separase während der ersten Reifeteilung bewahrt. Sowohl Mitose als auch Meiose werden maßgeblich durch den *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) reguliert. Dieser lässt Anaphase grundsätzlich erst dann zu, wenn alle Chromosomen über ihre Kinetochore mit Mikrotubuli des Spindelapparates in einer Weise wechselwirken, dass Zugspannung entsteht. Solange dies nicht der Fall ist, katalysiert ein kinetochorständiger Mad1-Mad2-Komplex die konformationelle Umwandlung von löslichem Mad2 hin zu einer Form, in der es über Bindung an Cdc20 die Aktivierung von Separase und den Austritt aus der Mitose blockiert.

In der vorliegenden Arbeit wird durch funktionelle Charakterisierungen in Krebszelllinien gezeigt, dass Sgo2 keine essentielle mitotische Funktion ausübt. Ein bislang in der Literatur bestehender Widerspruch wird hierdurch geklärt. Die RNAi-vermittelte Depletion von Sgo2 führt zwar zu einem Verlust des Mikrotubuli-depolymerisierenden Kinesins MCAK von den Zentromeren, entsprechende HeLa-Zellen zeigen bei fehlender Zugspannung aber weiterhin einen mitotischen Arrest, der von Aurora B abhängig ist. Die Funktion dieser mitotischen Kinase innerhalb des SAC beruht dem-

zufolge nicht auf der Erzeugung freier Kinetochore durch die Rekrutierung von MCAK sondern auf einem alternativen Signalweg.

Weiterhin wird eine unerwartete, direkte Bindung von humanem Sgo2 an Mad2 beschrieben. Biochemische Experimente machen deutlich, dass Sgo2 genauso mit Mad2 interagiert, wie dies Mad1 und Cdc20 tun. Gleichzeitig wird gezeigt, dass die Wechselwirkung zwischen Sgo2 und Mad2 konserviert ist und in Organismen, denen ein zweites Shugoshin fehlt, von Sgo1 übernommen wird. Diese Daten stellen ein zentrales Dogma in Frage, das für den SAC beschrieben wurde und das für das aktive *Checkpoint*-Signal von *einer* „Quelle“ (kinetochorständiges Mad1-Mad2) und *einem* „Zielprotein“ (Cdc20) ausgeht. Die Mad2-Bindung ist für die Fokussierung von Sgo2 am inneren Zentromer erforderlich. In Abwesenheit von Mad2 oder bei mutierter Mad2-Bindestelle verlagert sich Sgo2 an Randbereiche des Zentromers. Aufgrund dieser Daten sowie publizierter Studien über die Funktion von Sgo2 in Meiose wird postuliert, dass der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung eine Funktion in der Monoorientierung von Schwesterkinetochoren während der ersten Reifeteilung zukommt.

2. Einleitung

2.1 Der eukaryotische Zellzyklus

Der Zellzyklus stellt eine geordnete Folge von Ereignissen dar, an deren Ende die Teilung der Zelle und damit die Entstehung von zwei, mit der Mutterzelle identischen Tochterzellen steht. Der Vorgang der Zellteilung erfordert zum einen die vollständige und fehlerlose Verdopplung des genetischen Materials, zum anderen dessen gleichmäßige Aufteilung auf die Tochterzellen.

Innerhalb des eukaryotischen Zellzyklus erfolgt die Verdopplung der Chromosomen, den sichtbaren Trägern der Erbinformation, in der S- (Synthese) Phase, während die Verteilung (Segregation) der Chromosomen in der M-Phase (Mitose) stattfindet. Dazwischen liegen Wachstumsphasen, sog. *Gap*-Phasen (G1 und G2), wobei die G1-Phase zwischen M- und S-Phase liegt, während sich die G2-Phase zwischen S-Phase und der nachfolgenden M-Phase befindet (siehe Abb. 1). Zusammengefasst werden G1-, S- und G2-Phase, d.h. die Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden M-Phasen als Interphase bezeichnet. In höheren Eukaryoten (u.a. Vertebraten) verlassen viele differenzierte Zellen ausgehend von G1 den Zellzyklus und treten in die G0-Phase über, in der keine Proliferation mehr stattfindet.

Die verschiedenen Abläufe im Zellzyklus müssen aufeinander abgestimmt und somit genau reguliert sein. Außer auf Transkriptionsebene geschieht dies v.a. durch posttranslationale Modifikation oder Degradation von Proteinen (Murray, 2004). Innerhalb der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen kommt der Phosphorylierung die weitaus größte Bedeutung zu. Die bedeutendsten Zellzyklus-Regulatoren stellt daher eine Familie von Proteinkinasen dar, die als Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks) bezeichnet werden. Diese Kinasen werden durch regulatorische Untereinheiten, sog. Cycline, reguliert, deren Konzentrationen zumeist zellzyklusabhängig variieren. (Murray, 2004). Für den Eintritt der Zelle in M-Phase spielt die Kinase Cdk1 (Cdc2) in Verbindung mit Cyclin B1 (Cdc13) eine entscheidende Rolle (Murray, 2004). Die mit der Aktivierung dieser Kinase einhergehenden Phosphorylierungen bringen die für die Mitose typischen strukturellen Veränderungen mit sich. Als Beispiel hierfür diene die Phosphorylierung nukleärer Laminfilamente, an die sich deren Depolymerisation und der Zerfall der Kernhülle anschließen (Heald und McKeon, 1990; Peter et al., 1990).

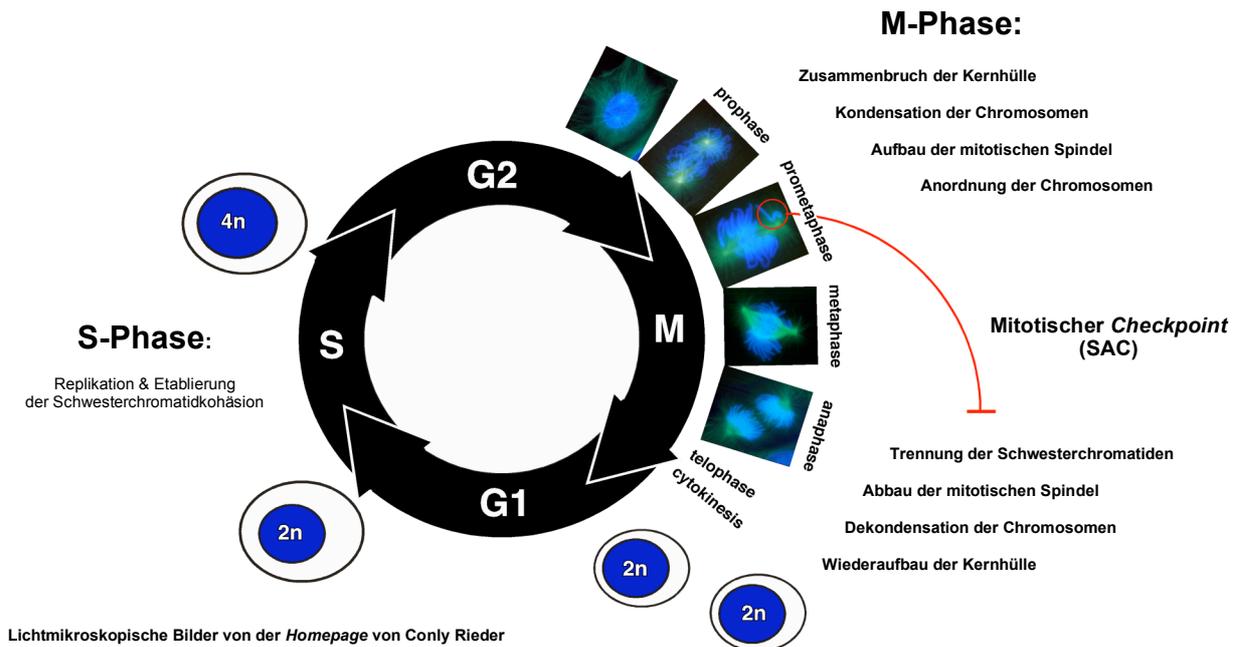


Abbildung 1: Der eukaryotische Zellzyklus

Der eukaryotische Zellzyklus wird in eine M-Phase sowie in eine zeitlich längere Interphase, die neben der S-Phase auch zwei sog. *Gap*-Phasen (G1 und G2) umfasst, unterteilt. Während in S-Phase das genetische Material der Zelle verdoppelt und gleichzeitig miteinander gepaart wird (Replikation), erfolgt in M-Phase dessen Aufteilung auf die Tochterzellen (Segregation). Die M-Phase umfasst sowohl die Teilung des Kerninhaltes (Mitose) als auch die Teilung des Zytoplasmas (Zytokinese). Eine ausführliche Beschreibung der Vorgänge in M-Phase ist unter Abschnitt 2.2 ff. dargelegt.

2.2 Die Mitose

In der Mitose kommt es zur gleichmäßigen Aufteilung des genetischen Materials einer Mutterzelle auf zwei identische Tochterzellen. Dazu werden beide Kopien eines Chromosoms (Schwesterchromatide) zunächst voneinander getrennt und mittels einer charakteristischen bipolaren Struktur, die als mitotischer Spindelapparat bezeichnet wird, auf die Tochterzellen verteilt. Eine hohe Genauigkeit in der Verteilung der Chromosomen während einer jeden mitotischen Teilung ist Voraussetzung für die Homöostase der genetischen Information eines Organismus und damit für dessen funktionelle Integrität auf Zellebene. In vielzelligen Organismen (Metazoen) können zuweilen Fehler bei der Weitergabe der genetischen Information auftreten, was eine der wichtigsten Ursachen für krebsartige Entartungen von Zellen und dadurch bedingte Bildung von Tumoren darstellt.

Die Grundzüge der Mitose wurden bereits 1882 durch Walther Flemming (1843 - 1905) beschrieben. Von diesen Beobachtungen ausgehend wurde die Mitose in fünf

Phasen unterteilt, die durch Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase angegeben werden (siehe Abb. 1). In Prophase kommt es zunächst zum Zusammenbruch der Kernhülle und zur Kondensation der Chromosomen. Gleichzeitig findet der Aufbau der mitotischen Spindel statt, einer Struktur, die aus Proteinfilamenten des interphasischen Zytoskeletts, Mikrotubuli (MTs) genannt, besteht. Mikrotubuli stellen hochdynamische Gebilde dar, die aus Dimeren von α -Tubulin und β -Tubulin aufgebaut sind und die sich in einem ständigen Wechsel zwischen Aufbau und Abbau befinden; man spricht von sog. dynamischer Instabilität (Cassimeris et al., 1987). In der folgenden Prometaphase kommt es zur Anordnung der Chromosomen in der sog. Äquatorialebene, wobei der Zustand, in dem alle Chromosomen diese Ebene erreicht haben, als Metaphase bezeichnet wird. Während der frühen Anaphase, Anaphase A genannt, werden die Schwesterchromatide voneinander getrennt und infolge von Verkürzung der Spindel-Mikrotubuli zu gegenüberliegenden Seiten der Zelle transportiert. Die eigentliche Trennung des Zellinhaltes wird in Anaphase B durch die Verlängerung der Spindel-Mikrotubuli, die die Spindelpole miteinander verbinden, im Bereich des Spindeläquators vollzogen. Gleichzeitig kommt es zur Einschnürung des Zytoplasmas im Bereich des Spindeläquators (McIntosh, 1985). In der zuletzt folgenden Telophase kommt es dann zur Dekondensation der Chromosomen, zur Depolymerisation der Spindel sowie zur Neubildung der Kernhülle. Der Vorgang der Zellteilung wird durch die Abschnürung des Zytoplasmas (Zytokinese genannt) abgeschlossen (Lodish et al., 2004).

2.2.1 Der Eintritt in die Mitose

Beim Eintritt in Prophase, dem sichtbaren Übergang aus der G₂-Phase in Mitose, werden in Folge der Kondensation erstmals die Chromosomen sichtbar. Die Kondensation der chromosomalen DNA hängt zumindest in niederen Vertebraten (u.a. Amphibien) von einem pentameren Proteinkomplex ab, der als Kondensin bezeichnet wird (Hirano, 2005). Dieser Komplex assoziiert zu Beginn von Mitose mit Chromatin und bewirkt dort eine Kompaktierung der DNA (Hirano et al., 2005; Hudson et al., 2009). U.a. deshalb wird der Kondensin-Komplex für die korrekte Segregation des Chromatins während der Mitose essentiell benötigt (Hudson et al., 2009).

Das interphasische Mikrotubuli-Netzwerk ist um das Zentrosom herum zentriert, weshalb dieses auch als Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC) bezeichnet wird.

Das Zentrosom, das aus einem Paar sog. Zentriolen sowie einer perizentrosomalen Matrix besteht, wird in S-Phase dupliziert (Mattison und Winey, 2006). Zu Beginn der Mitose trennen sich die beiden Zentrosomen und wandern entlang der sich auflösenden Kernhülle zu den Polen der Zelle, von wo aus sie später als Spindelpole fungieren. Dabei werden die Mikrotubuli in zwei radiale Anordnungen konvertiert, die als sog. Astern bezeichnet werden und die von den Zentrosomen her ausgehen (Wittmann et al., 2001). Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung der Dynamik der Mikrotubuli, wodurch diese mit den innerhalb des Zytoplasmas verteilten Chromosomen verstärkt in Wechselwirkung treten können; der entsprechende Mechanismus wird als „*Search and Capture*“ bezeichnet. Am Aufbau der Spindel ist eine Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (sog. MAPs) beteiligt, die hauptsächlich zur Proteinfamilie der Kinesine gehören. Diese Proteine binden an Mikrotubuli und sind in der Lage, sich unter Verbrauch von chemischer Energie in der Form von ATP progressiv an Mikrotubuli entlang zu bewegen. Bestimmte Vertreter dieser Proteinfamilie besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, Mikrotubuli zu polymerisieren, weshalb diesen Faktoren eine besondere Bedeutung beim Aufbau der Spindel zukommt. Beispiele stellen u.a. die Proteine der Dis1-Familie (TOG, XMAP215) dar (Sharp et al., 2000).

2.2.2 Die Schwesterchromatidkohäsion

Die Schwesterchromatide verbleiben vom Zeitpunkt ihrer Replikation in S-Phase bis zum Erreichen des Überganges von Metaphase zu Anaphase miteinander gepaart. Dieser Zusammenhalt wird durch Kohäsion, einem tetrameren, ringförmigen Proteinkomplex vermittelt (Gruber et al., 2003; Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997), der die beiden DNA-Doppelstränge ringförmig umschließt (Haering et al., 2008; Ivanov und Nasmyth, 2005, 2007). Der Kohäsionskomplex besteht aus zwei sog. SMC-Untereinheiten (*Structural Maintenance of Chromosomes*), die als SMC1 und SMC3 bezeichnet werden, einer α -Kleisin-Untereinheit, die Scc1/Rad21/Mcd1 genannt wird, und einer weiteren, akzessorischen Untereinheit, die als Scc3 (SA1/SA2) bezeichnet wird (Nasmyth und Haering, 2005, 2009).

Die SMC-Proteine bestehen jeweils aus langen, antiparallelen *Coiled Coil*-Regionen, die durch eine sog. Gelenk-Region unterbrochen sind. Die N- und die C-Termini der beiden SMC-Proteine bilden in Folge ihrer Proteinfaltung jeweils eine Kopf-Domäne aus, wobei die Kopf-Domäne von SMC1 einem sog. *Walker A*-Motiv entspricht, wäh-

rend die Kopfdomäne in SMC3 ein *Walker* B-Motiv darstellt. Im Ring dimerisieren die beiden SMC-Untereinheiten über ihre Gelenkregionen. Gleichzeitig entsteht aufgrund von Zusammenlagerung der Kopfdomänen von SMC1 und SMC3 eine gemeinsame ATPase-Domäne. Der Ringschluss erfolgt durch die gleichzeitige Wechselwirkung des N-terminalen Bereiches von Scc1 mit der Kopfdomäne von SMC3 sowie des C-Terminus von Scc1 mit der Kopfdomäne von SMC1. Scc1 stellt darüber hinaus auch die Verbindung zum peripher gebundenem Scc3 her (Nasmyth und Haering, 2005, 2009; Onn et al., 2008).

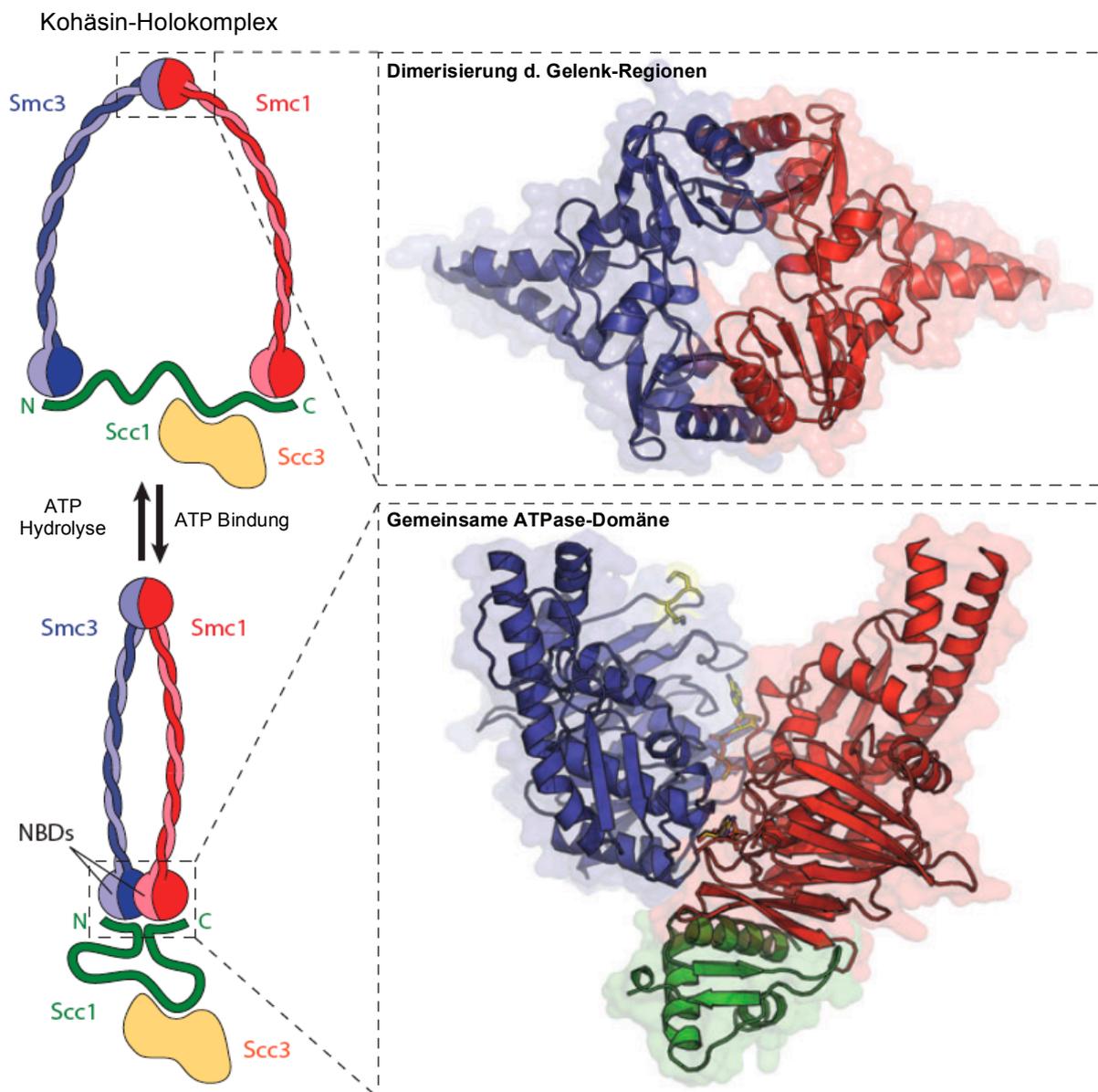


Abbildung 2: Der Kohäsion-Komplex

Der Kohäsion-Komplex hält die in S-Phase replizierten Schwesterchromatiden aufgrund ringförmiger Umschließung der beiden DNA-Doppelstränge miteinander verbunden. Die beiden

SMC-Untereinheiten (SMC1 und SMC3) zeichnen sich jeweils durch eine Gelenk-Region sowie durch eine Kopf-Domäne aus, die durch antiparallele *Coiled coil*-Regionen miteinander verbunden sind. Die Dimerisierung der beiden SMC-Untereinheiten erfolgt durch Zusammenlagerung der beiden Gelenk-Regionen sowie durch ATP-abhängige Wechselwirkung der Kopf-Domänen. Die α -Kleisin-Untereinheit Scc1 verbindet die Kopf-Domänen miteinander und bewirkt dadurch den Ringschluss. Gleichzeitig rekrutiert Scc1 die akzessorische Untereinheit Scc3 (SA2). Die Scc1-Untereinheit wird in Zellen der Keimbahn, d.h. in Oozyten und Spermatozyten durch eine alternative, in der Meiose exprimierte Form ersetzt, die als Rec8 bezeichnet wird. Des Weiteren findet man in meiotischem Kohäsion alternative Formen von Scc3 und SMC1, die als Stag3 bzw. SMC1 β bezeichnet werden. Entnommen und modifiziert aus Nasmyth und Haering, *Annu. Rev. Genet.* 43 (2009).

2.2.2.1 Etablierung der Schwesterchromatidkohäsion in S-Phase

Mit Hilfe genetischer Untersuchungen konnten in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zusätzliche Faktoren identifiziert werden, die für die Bildung von Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden erforderlich sind. Die Ausbildung von Kohäsion beinhaltet grundsätzlich zwei Schritte, zum einen die Bindung von Kohäsion an das Chromatin und zum anderen die Überführung von Chromatin-assoziiertem Kohäsion in einen „kohäsiven“ Zustand. Zwei der Faktoren, die identifiziert werden konnten, stellen Scc2 und Scc4 dar, die in *S. cerevisiae* beide für die Bindung von Kohäsion an die DNA in der späten G1-Phase benötigt werden (Ciosk et al., 2000; Watrin et al., 2006). Die eigentliche Etablierung von Kohäsion findet in S-Phase und damit zeitgleich mit der Replikation der DNA statt (Uhlmann und Nasmyth, 1998). Für diesen Prozess konnte der an die Replikationsgabel bindenden Azetyltransferase Eco1/Ctf7 eine essentielle Funktion zugeordnet werden (Kenna und Skibbens, 2003; Moldovan et al., 2006; Skibbens et al., 1999; Toth et al., 1999). Gemäß neuester Studien wirkt Eco1, indem es durch die Azetylierung der Kohäsion-Untereinheit SMC3 (Unal et al., 2008; Zhang et al., 2008) zur Dissoziation von Wpl1/Rad61, einem konservierten, der Kohäsion entgegenwirkenden Faktor, von Kohäsion führt (Ben-Shahar et al., 2008; Rowland et al., 2009; Skibbens, 2009; Sutani et al., 2009).

Sowohl der Mechanismus der Bindung von Kohäsion an das Chromatin über Scc2 und Scc4 als auch die Etablierung der Kohäsion durch Eco1-abhängige Azetylierung von SMC3 sind innerhalb der Eukaryoten vollständig konserviert. Erbliche Defekte in Scc2 oder ESCO2, einem der beiden Eco1-Homologen im Menschen, führen zu charakteristischen Krankheitsbildern wie dem Cornelia de Lange-Syndrom (Strachan, 2005; Tonkin et al., 2004), dem SC-Phokomelie- oder dem Roberts-Syndrom (Schule et al., 2005; Vega et al., 2005).

2.2.2.2 Aufhebung der Schwesterchromatidkohäsion in Mitose

Die während der S-Phase etablierte Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden muss grundsätzlich bis zum Übergang von der Metaphase zur Anaphase aufrechterhalten bleiben. Erst wenn jedes Chromosom mit den Polen der mitotischen Spindel in einer solchen Weise wechselwirkt, dass eine Zugspannung entsteht, kommt es zur Aufhebung der Kohäsion und damit zur Segregation der Schwesterchromatiden auf die entstehenden Tochterzellen.

In höheren Eukaryoten erfolgt die Aufhebung der Chromatidkohäsion in zwei voneinander getrennten Schritten (siehe Abb. 3). So dissoziiert der wesentliche Teil des Kohäsins bereits in Prophase von den Chromosomen, weshalb dieser Vorgang als Prophase-Weg bezeichnet wird (Darwiche et al., 1999; Gimenez-Abian et al., 2004; Losada et al., 1998; Sumara et al., 2000; Waizenegger et al., 2000). Der Prophase-Weg führt zur Auflösung der Chromatidkohäsion im Bereich der Chromosomenarme (Waizenegger et al., 2000), indem er durch Polo/Plk1-abhängige Phosphorylierung der Kohäsins-Untereinheit Scc3/SA2 den Kohäsins-Komplex von der DNA dissoziiert (Hauf et al., 2005; Losada et al., 2002; Sumara et al., 2002). Neben Plk1 benötigt der Prophase-Weg noch einen zusätzlichen Faktor, der als Wapl/Wpl1/Rad61 bezeichnet wird (Gandhi et al., 2006; Kueng et al., 2006).

In der Prophase verbleibt stets eine Restpopulation von Kohäsins im Bereich der sog. Zentromere zurück (Waizenegger et al., 2000). Verantwortlich dafür ist ein mit zentromerischem Chromatin assoziiertes Protein, das als Shugoshin (SGO) bezeichnet wird (Kitajima et al., 2004). Kohäsins im Bereich des Zentromers wird daher erst nach dem Übergang von Metaphase zu Anaphase abgelöst, weshalb dieser Vorgang dem zweiten Schritt in der Aufhebung der Chromatidkohäsion entspricht. Dieser beruht auf proteolytischer Spaltung der Kohäsins-Untereinheit Scc1/Rad21/Mcd1 durch eine konservierte Cystein-Protease, die als Separase bezeichnet wird (Uhlmann et al., 1999, 2000; Waizenegger et al., 2000). Erst diese Spaltung ermöglicht die Trennung der Schwesterchromatide in Anaphase und damit die Segregation des genomischen Materials auf die Tochterzellen. Die Regulation von Separase erfolgt durch einen inhibitorischen Co-Faktor, der als Securin bezeichnet wird (Yamamoto et al., 1996; Zou et al., 1999). Dieser Faktor inhibiert Separase bis zum Übertritt von Metaphase zu Anaphase aufgrund direkter Wechselwirkung (Ciosk et al., 1998; Zou et al., 1999). Diese Inhibition wird erst nach dem Eintritt in Anaphase durch die Degradation von

Securin aufgehoben (Cohen-Fix et al., 1996; Zou et al., 1999). Ein alternativer Mechanismus zur Regulation von Separase beruht auf der Ausbildung eines Komplexes zwischen zuvor phosphorylierter Separase und dem Cdk1-Cyclin B1-Komplex (Gorr et al., 2005; Stemmann et al., 2001).

Mitose:

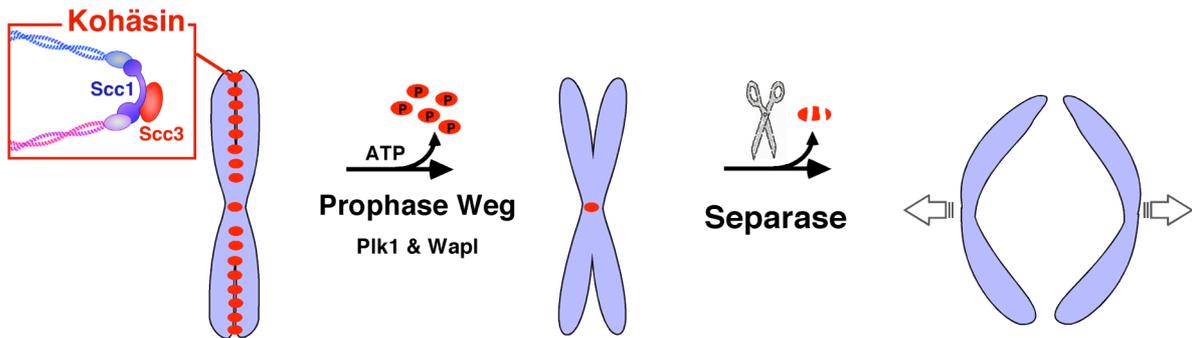


Abbildung 3: Aufhebung der Chromatidkohäsion in Mitose

In der Mitose höherer Eukaryoten (Vertebraten) dissoziiert Kohäsин in zwei Phasen von den Chromosomen. Die erste Phase findet in Prophase statt, weshalb dieser Vorgang auch als Prophase-Weg bezeichnet wird. Dieser beruht auf der Phosphorylierung der Kohäsин-Untereinheit Scc3/SA2 (rot dargestellt) im Bereich der Chromosomenarme. In Anaphase wird das Kohäsин, das im Bereich der Zentromere lokalisiert ist, durch Separase gespalten, was zur Trennung der Schwesterchromatide und dadurch zu deren Segregation auf die Tochterzellen führt.

2.2.2.3 Aufhebung der Schwesterchromatidkohäsion in Meiose

In der Meiose kommt es zu zwei aufeinander folgenden Chromosomensegregationsrunden, denen nur eine Replikation vorausgeht. Beim Eintritt in die Meiose werden die Homologen durch interchromosomale Rekombination (Chiasmata genannt) sowie durch Armkohäsion in sog. Bivalenten zusammengehalten. In der Reduktionsteilung von Meiose I werden diese Homologen dann getrennt. In einer zweiten, der Mitose relativ ähnlichen Äquationsteilung (Meiose II) werden die Schwesterchromatide dann auf die entstehenden Gameten verteilt (Lee und Amon, 2001; Nasmyth, 2001).

Die Trennung der homologen Chromosomen in Meiose I erfolgt durch proteolytische Spaltung der meiotischen Kohäsин-Untereinheit Rec8 (Buonomo et al., 2000; Kudo et al., 2006). Im Gegensatz zu der Spaltung von Scc1/Rad21 in Mitose benötigt dieser Vorgang die Phosphorylierung von Rec8 (Brar et al., 2006; Katis et al., 2010; Kudo et al., 2009). Diese Phosphorylierung liegt in Meiose I ausschließlich an den Armen der Chromosomen vor, weshalb Kohäsion im Bereich der Zentromere analog der Mitose erhalten wird (Klein et al., 1999; Watanabe und Nurse, 1999). In Anaphase I wird

phosphoryliertes Kohäsin daher nur im Bereich der Chromosomenarme durch Separase gespalten und damit die Segregation der Homologen ermöglicht (Buonomo et al., 2000; Kudo et al., 2006). In der zweiten meiotischen Teilung werden dann die Schwesterchromatide auf die Gameten segregiert. Dazu wird jenes Rec8 phosphoryliert, das im Bereich der Zentromere lokalisiert ist (Brar et al., 2006) und in Anaphase II durch Separase gespalten (Buonomo et al., 2000).

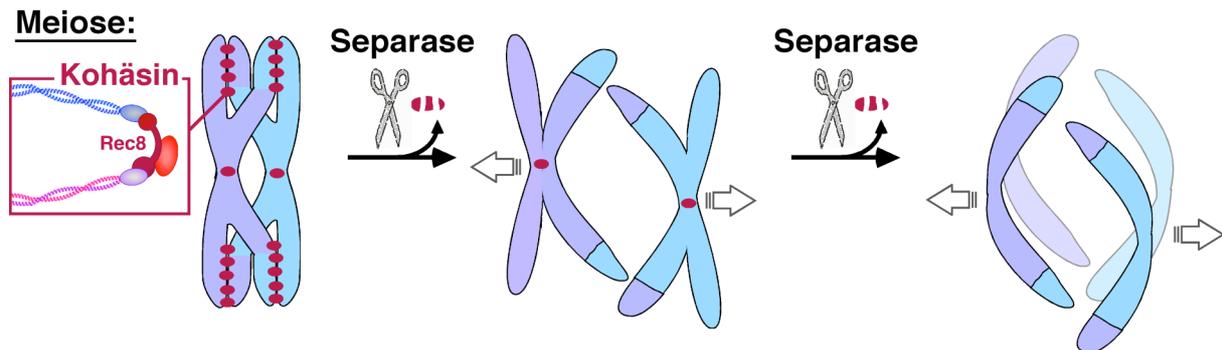


Abbildung 4: Aufhebung der Chromatidkohäsion in Meiose

In Meiose kommt es zu zwei aufeinander folgenden Runden der Chromosomensegregation, denen eine Runde der DNA-Replikation vorausgeht. In Meiose I spaltet Separase die meiotische Kohäsine-Untereinheit Rec8 (lila dargestellt) im Bereich der Chromosomenarme und löst so die Trennung der Homologen aus. In Meiose II wird zentromerisches Rec8 durch die Separase gespalten und dadurch die Schwesterchromatide auf die Gameten segregiert.

2.2.3 Shugoshin: „Schützender Geist“ der Kohäsion

Wie oben dargelegt, wird Kohäsine, das im Bereich der Zentromere lokalisiert ist, in der Mitose bis zur Anaphase und in Meiose bis zur Äquationsteilung erhalten. Das Protein, das diese Persistenz von zentromerischem Kohäsine bewirkt, wurde erstmals 1971 in *Drosophila melanogaster* identifiziert (Davis, 1971; Goldstein, 1980; Kerrebrock et al., 1992). Die Identifizierung von Homologen in Hefen im Jahre 2004 zeigte, dass Shugoshine (japan. für „Beschützergeist“) eine funktionell konservierte Proteinfamilie darstellen, die eine verfrühte Segregation des genetischen Materials in der eukaryontischen Mitose und in Meiose verhindern (Katis et al., 2004; Kitajima et al., 2004; Marston et al., 2004; Rabitsch et al., 2004). So wurde anhand verschiedener Modellsysteme gezeigt, dass Shugoshine für den Erhalt von zentromerischem Kohäsine während der frühen Mitose ebenso benötigt werden wie in der Anaphase der ersten meiotischen Reifeteilung (Katis et al., 2004; Kitajima et al., 2004; McGuinness et al., 2005; Rabitsch et al., 2004; Salic et al., 2004; Tang et al., 2004).

In Säugern, und damit auch im Menschen konnten zwei Orthologe der Shugoshin-Familie identifiziert werden, die als Shugoshin-1 und -2 (Sgo1 und Sgo2) bezeichnet werden und von denen jeweils mehrere Isoformen exprimiert werden (Kitajima et al., 2004; Watanabe, 2005). Während für Sgo1 gezeigt werden konnte, dass es für die Erhaltung der zentromerischen Kohäsion während der frühen Mitose benötigt wird (Mc Guinness et al., 2005; Salic et al., 2004; Tang et al., 2004) wurde Sgo2 durch die Verwendung von Mausmodellen eine entsprechende Funktion in Meiose zugeordnet (Lee et al., 2008; Llano et al., 2008). Die Bedeutung, die Shugoshinen im Rahmen der Segregation des genetischen Materials in Mitose und in Meiose zukommt, wird anhand von Befunden erkennbar, die zeigen, dass Sgo1 in etwa 90 % aller Arten von Brustkrebs überexprimiert ist (Scanlan et al., 2001) oder Verlust von Sgo2 zu Sterilität führt (Llano et al., 2008). Trotz dieser funktionellen Trennung von Sgo1 und Sgo2 werden beide Faktoren gleichermaßen in somatischen Zellen wie auch in Zellen der Keimbahn exprimiert (Huang et al., 2007; Lee et al., 2008). Die Lokalisation von Sgo1 und Sgo2 am Zentromer während der frühen Mitose hängt maßgeblich von der mitotischen Kinase Bub1 ab (Huang et al., 2007; Tang et al., 2004). Die Depletion von Bub1 wird deshalb mit einer Fehllokalisierung von Sgo1 an die Armbereiche der Chromosomen assoziiert, die zur Erhaltung von Armkohäsion bei gleichzeitigem Verlust von zentromerischem Kohäsion führt (Tang et al., 2004). Diese Abhängigkeit der Shugoshin-Lokalisation von Bub1 ist konserviert und konnte in mehreren Modellsystemen dargestellt werden (Boyarchuk et al., 2007; Huang et al., 2007; Kitajima et al., 2004, 2005; Tang et al., 2004). In Metazoen konnte darüber hinaus mit Aurora B einer weiteren mitotischen Kinase eine Funktion in der zentromerischen Lokalisation von Shugoshinen zugeordnet werden (Boyarchuk et al., 2007; Huang et al., 2007; Pouwels et al., 2007; Resnick et al., 2006).

Wie unter Abschnitt 2.2.2.2 dargelegt, benötigt die Dissoziation des Kohäsions vom Chromatin in der frühen Mitose die Phosphorylierung der Kohäsion-Untereinheit Scc3/SA2 (Hauf et al., 2005). Gleichsam benötigt die Spaltung von Rec8 durch Separase während der Anaphase I von Meiose essentiell die Phosphorylierung von Rec8 (Brar et al., 2006; Kudo et al., 2009). Shugoshine wirken diesen Phosphorylierungen entgegen, indem sie die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) an Zentromere rekrutieren (Kitajima et al., 2006; Riedel et al., 2006; Tang et al., 2006). Diese Rekrutierung von PP2A beruht auf einer direkten Wechselwirkung, die Shugoshine mit PP2A eingehen

und die für den durch Shugoshin vermittelten Schutz von zentromerischem Kohäsinn essentiell ist (Kitajima et al., 2006; Tang et al., 2006; Xu et al., 2009).

Wie Sgo2 inaktiviert wird, damit zentromerisches Kohäsinn in Meiose II phosphoryliert werden kann, ist noch nicht geklärt. Ein attraktives Modell besteht jedoch darin, dass Sgo2 in Metaphase II in Folge der Anlegung von Zugspannung relocalisiert wird und dadurch zentromerisches Kohäsinn „entschützt“ wird (Lee et al., 2008). So wurde u.a. beobachtet, dass Sgo2 in Metaphase II in zeitlicher Korrelation mit der Etablierung von Spannung entlang der Interkinetochorenachse vom Zentromer an Kinetochore relocalisiert (Gomez et al., 2007). Diese Relokalisation wiederum könnte zur lokalen Trennung von Sgo2 und zentromerischem Kohäsinn führen und dadurch entsprechendes Kohäsinn für Phosphorylierung zugänglich machen (Lee et al., 2008).

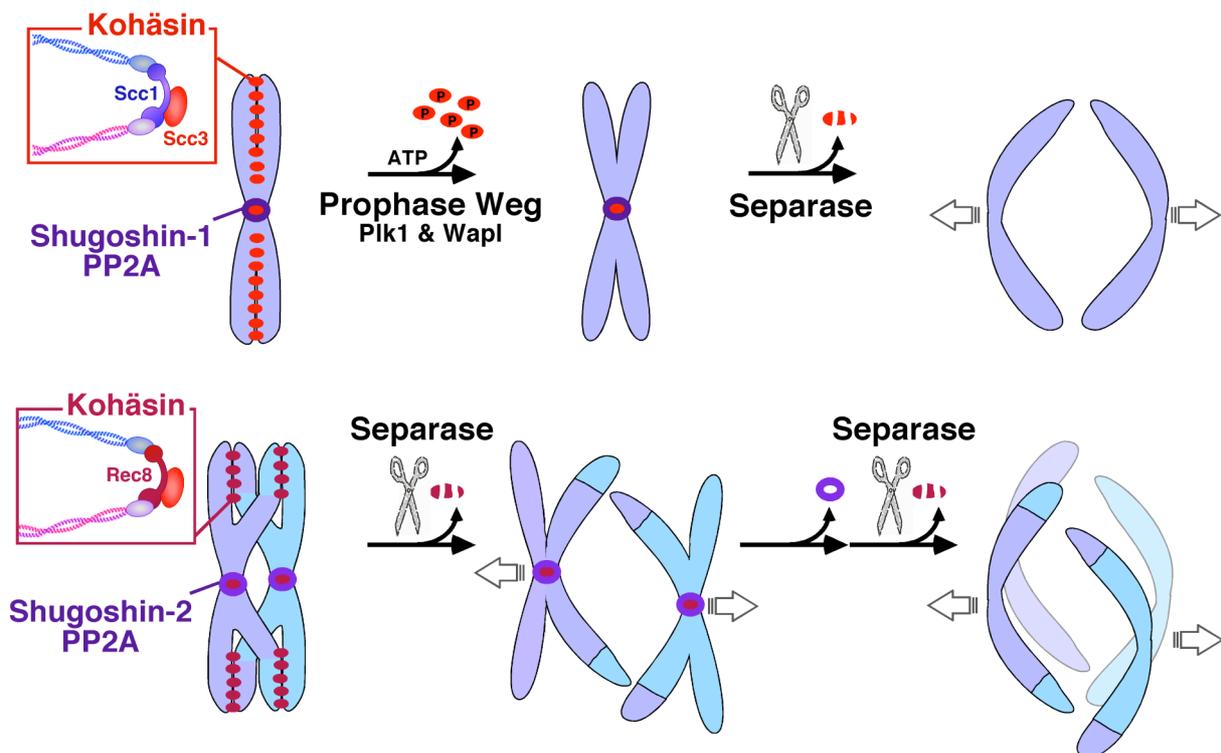


Abbildung 5: Funktion von Shugoshin-1/Shugoshin-2 in Mitose/Meiose

In höheren Eukaryoten (u.a. Vertebraten) dissoziiert der wesentliche Teil des Kohäsins durch Phosphorylierung der mitotischen Kohäsinn-Untereinheit Scc3/SA2 bereits in Prophase vom Chromatin. Shugoshin-1 lokalisiert ans Zentromer und wirkt dort der Plk1-abhängigen Phosphorylierung von Scc3 durch Rekrutierung der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) entgegen. Dadurch wird Kohäsinn im Bereich des Zentromers bis zu Beginn der Anaphase erhalten. In Anaphase I der Meiose werden durch proteolytische Spaltung von Rec8 im Bereich der Chromosomenarme die Homologen getrennt, wobei zentromerisches Rec8 erhalten wird. Die proteolytische Spaltung von Rec8 durch Separase benötigt die Phosphorylierung von Rec8. Shugoshin-2 wirkt analog zu Shugoshin-1 in der Mitose dieser Phosphorylierung entgegen, indem es die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) an Zentromere rekrutiert. In Meta-

phase II wird Shugoshin-2 inaktiviert und Kohäsine im Bereich der Zentromere geschützt. Dadurch wird die Phosphorylierung von zentromerischem Rec8 während Meiose II und damit dessen Spaltung durch Separase ermöglicht. Damit kommt es zur Segregation der Chromatiden in Anaphase II.

2.2.4 Der *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC)

Der *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) steht für einen innerhalb der Eukaryoten konservierten Mechanismus, der für die Genauigkeit der Chromosomensegregation in Mitose garantiert. Der SAC, der auch als mitotischer *Checkpoint* bezeichnet wird, verhindert die Fehlsegregation von Chromosomen und damit die Entstehung von Aneuploidien; Fehlfunktionen des SAC werden häufig mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht (Bharadway und Yu, 2004; Cahill et al., 1998; Gemma et al., 2000; Li et al., 2009).

Der *Spindle Assembly Checkpoint* umfasst v.a. zwei Gruppen von Genen, die 1991 in *S. cerevisiae* identifiziert werden konnten (Hoyt et al., 1991; Li und Murray, 1991). Diese umfassen die Gene der MAD- (*Mitotic Arrest Deficient*) und der BUB- (*Budding Uninhibited by Benzimidazole*) Familie. Bis auf Bub2 sind sie innerhalb der Eukaryoten konserviert. Die Einführung von Mutationen in diesen Genen interferiert mit der Fähigkeit wildtypischer Zellen in Anwesenheit von Mikrotubuli-depolymerisierenden Agenzien wie Benzimidazol oder Nocodazol in der Mitose zu arretieren (Hoyt et al., 1991; Li und Murray, 1991). Die Gene der MAD-Familie kodieren für die Proteine Mad1, Mad2 und Mad3 (in höheren Eukaryoten als BubR1 bezeichnet), während die Gene der BUB-Familie die Faktoren Bub1, Bub2 (nur in Hefe) und Bub3 kodieren. Neben diesen Faktoren kommt der mitotischen Kinase Mps1 (*Multipolar spindle-1*) eine essentielle und vielen weiteren Faktoren eine akzessorische Funktion innerhalb des SAC zu (Abrieu et al., 2001; Lauze et al., 1995; Weiss und Winey, 1996; Winey et al., 1991). Gemeinsam bilden diese Faktoren eine Signalkaskade, die in jeder Mitose bis zum Übergang von der Metaphase zur Anaphase aktiv ist. Dadurch wird die vorzeitige Trennung der Schwesterchromatide und der Austritt aus der Mitose verhindert (Nasmyth, 2005).

Um dies zu erreichen, inaktiviert der SAC einen Co-Faktor des *Anaphase-Promoting Komplexes* oder *Zyklosoms* (APC/C), der als Cdc20 bezeichnet wird (Hwang et al., 1998). Der APC/C stellt eine multimere Ubiquitinligase dar, die nach dem Übergang von Metaphase zu Anaphase aktiv wird. Die wichtigsten Substrate des APC/C stellen die regulatorische Untereinheit von Cdk1, CyclinB1/Cdc13, und der inhibitorische Co-

Faktor von Separase, Securin, dar. Durch die Aktivierung des APC/C werden diese Substrate kovalent mit Ketten von Ubiquitin verknüpft und dadurch für die Degradation durch das 26S Proteasom markiert (Peters, 2006). Diese Degradation führt zum einen zur Inaktivierung von Cdk1 und damit zum Austritt aus der Mitose, zum anderen zur Aktivierung von Separase und damit zur Trennung der Schwesterchromatide. Für diese Funktion des APC/C wird Cdc20 essentiell benötigt, weshalb die Inaktivierung von Cdc20 durch den SAC gleichzeitig auch den APC/C inaktiviert (Musacchio und Salmon, 2007).

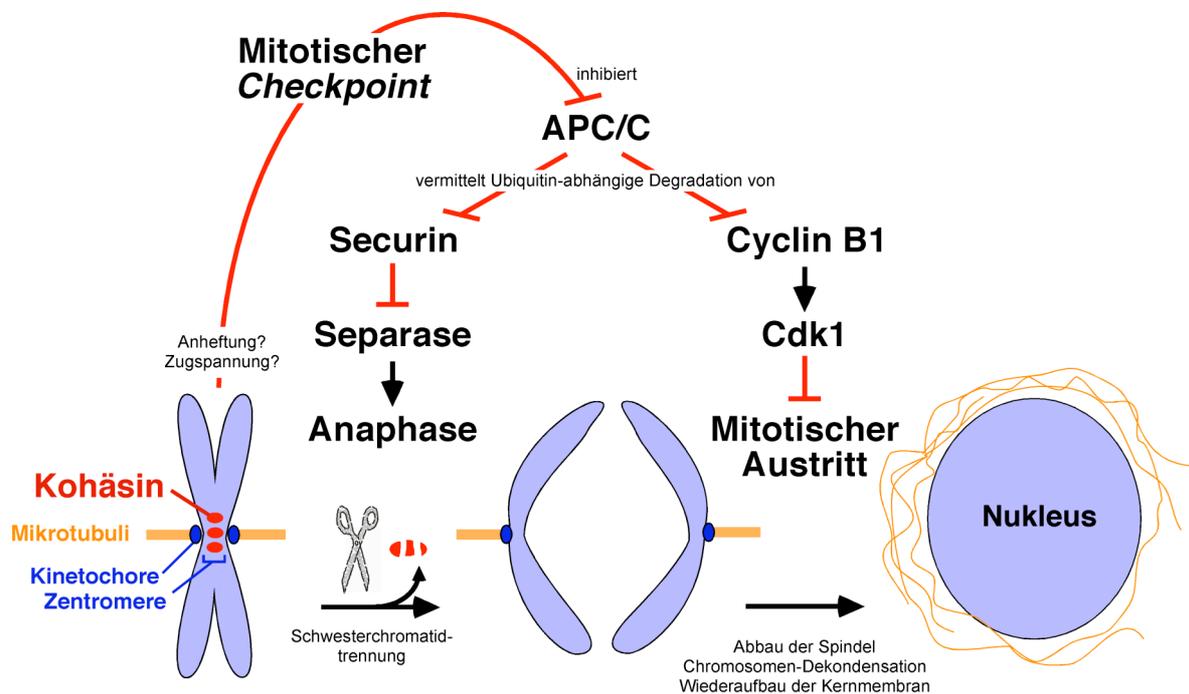


Abbildung 6: Der Spindle Assembly Checkpoint (SAC)

Der *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) stellt eine Signalkaskade dar, die von Kinetochoren ausgeht, die nicht oder fälschlich mit der Spindel verbunden sind. Der SAC inaktiviert den sog. *Anaphase-Promoting-Komplex/Zyklosom* (APC/C), der den proteolytischen Abbau der regulatorischen Untereinheit von Cdk1, Cyclin B1, und des Inhibitors der Separase, Securin, vermittelt. Dadurch verhindert der SAC gleichzeitig den Austritt aus der Mitose. Der SAC ist grundsätzlich solange aktiv bis alle Chromosomen einer Zelle amphitelisch mit der mitotischen Spindel verbunden sind.

Durch diese Inaktivierung des APC/C garantiert der SAC die erforderliche Dauer der Prometaphase, d.h. er gibt der Zelle die Zeit bis alle Chromosomen in solcher Weise mit der Spindel wechselwirken, dass Zugspannung entsteht. Dieser Zustand wird grundsätzlich dann erreicht, wenn die Schwesterkinetochore eines Chromosoms mit gegenüberliegenden Polen der Spindel verbunden sind. Unter Kinetochoren versteht

man große Proteinkomplexe, die zu Beginn von Mitose im Bereich der Zentromere assemblieren und die Wechselwirkung der Chromosomen mit Mikrotubuli der Spindel vermitteln. Neben dem oben beschriebenen Zustand, der auch als amphitelische Spindelanheftung bezeichnet wird, findet man auch die Zustände der syntelischen Anheftung, in der beide Kinetochore eines Chromosoms mit dem gleichen Spindelpol wechselwirken, sowie der merotelischen Anheftung, bei der ein einzelnes Kinetochor mit Mikrotubuli, die von beiden Spindelpolen her ausgehen, wechselwirkt (Vagnarelli und Earnshaw, 2004). Der SAC ist grundsätzlich solange aktiv, bis alle Chromosomen den Zustand amphitelischer Spindelanheftung erreicht haben, was dem Stadium der Metaphase entspricht. Erst dann kommt es zur Inaktivierung des SAC und zur Aktivierung des APC/C, was zur Trennung der Schwesterchromatide sowie zum Austritt aus der Mitose führt (Clute und Pines, 1999; Musacchio und Salmon, 2007).

2.2.4.1 Mad2 als zentraler Effektor des SAC

Der zentrale Faktor innerhalb des *Spindle Assembly Checkpoint* ist Mad2. Es zählt zu einer Familie von Proteinen, die durch eine sog. HORMA- (HOP1, REV7, MAD2) Domäne gekennzeichnet sind (Aravind und Koonin, 1998). Proteine dieser Familie unterscheiden sich von anderen Proteinen durch ihre Fähigkeit in mehreren unterschiedlich gefalteten, nativen Konformationen existieren zu können. Für Mad2 konnten zwei Konformationen determiniert werden, die als „offen“ (O-Mad2) und „geschlossen“ (C-Mad2) bezeichnet werden (Luo et al., 2004). Diese Konformationen unterscheiden sich hauptsächlich in der Positionierung sekundärer Strukturelemente in N- und C-terminalen Bereichen (siehe Abbildung 7). Der damit einhergehende Wechsel in der Struktur von Mad2 ist Voraussetzung für die Funktionsweise von Mad2 innerhalb des mitotischen *Checkpoint*. So beruht die Funktion von Mad2 auf der Ausbildung strukturell äquivalenter Komplexe von C-Mad2 mit zwei eingehend charakterisierten Bindungspartnern, die dem SAC-Faktor Mad1 zum einen, und zum anderen dem Co-Faktor des APC/C, Cdc20, entsprechen (Luo et al., 2000, 2002). Die Wechselwirkung von Mad2 mit diesen Faktoren bewirkt dabei im Fall von Mad1 die Erzeugung eines von den Kinetochoren ausgehenden „*Wait anaphase*“-Signals in Folge struktureller Aktivierung von freiem Mad2 (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Im Fall von Cdc20 bewirkt die Komplexbildung hingegen die Inaktivierung dieses Co-Faktors und

damit des APC/C^{Cdc20}. Die Wechselwirkung von Mad2 mit Mad1 und Cdc20 beruht in beiden Fällen auf einem konservierten Strukturelement in der Tertiärstruktur von Mad2, das als „Sicherheitsgurt“ von Mad2 bezeichnet wird (Sironi et al., 2002). Eine Deletion dieses Abschnitts in der Primärstruktur von Mad2 verhindert dessen Wechselwirkung mit Mad1 und Cdc20 und kompromittiert dadurch den SAC (Chen et al., 1999; Fang et al., 1998). Bereits 1998 konnte gezeigt werden, dass bakteriell exprimiertes Mad2 als Monomer und als Dimer vorliegen kann (Fang et al., 1998), wobei nur die dimere Form in Bezug auf den SAC aktiv ist. Die Dimerisierung von Mad2 beruht auf einer asymmetrischen Wechselwirkung von zwei Mad2 Molekülen, wobei stets eines der Moleküle in der offenen und das andere in der geschlossenen Konformation vorliegt (Mapelli et al., 2007). Diese Interaktion ist die Voraussetzung für die strukturelle Aktivierung von Mad2 am Kinetochor (De Antoni et al., 2005), auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

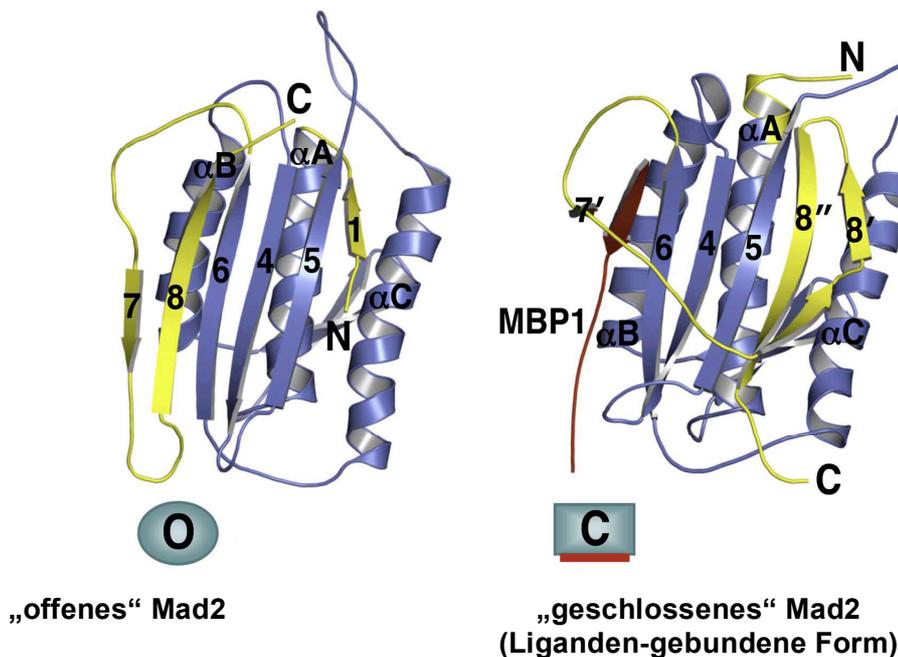


Abbildung 7: Röntgenstruktur der beiden Konformationen von Mad2

Der Faktor Mad2 (*Mitotic arrest deficient 2*) zählt zur Familie der sog. HORMA-Domänen-enthaltenden Proteine. Proteine dieser Familie unterscheiden sich von anderen Proteinen aufgrund ihrer Eigenschaft, in mehreren Konformationen existieren zu können. Gezeigt sind die beiden Konformationen von Mad2, die als „offen“ (O-Mad2, links gezeigt) und als „geschlossen“ (C-Mad2, rechts gezeigt) bezeichnet werden. Zwischen der als offen und der als geschlossen bezeichneten Konformation treten im Bereich des N-Terminus sowie des C-Terminus strukturelle Differenzen auf. Der C-Terminus, der aufgrund seiner Funktionsweise auch als Sicherheitsgurt von Mad2 bezeichnet wird, ist für die hohe chemische Stabilität der Wechselwirkungen, die Mad2 mit Mad1 und Cdc20 eingeht, verantwortlich. Der als MBP1 dargestellte Ligand bezeichnet ein optimiertes Bindungspeptid, das mittels *Phage-Display* ermittelt wurde (Luo et al., 2002) und eine maximierte Affinität gegenüber Mad2 aufweist. Entnommen und modifiziert aus Luo, X., und Yu, H., *Structure* 16 (2008).

2.2.4.2 Strukturelle Aktivierung von Mad2: Das Matrizenmodell

Während der Interphase liegt freies Mad2 hauptsächlich in der offenen Konformation vor. Für die Überführung von Mad2 in die geschlossene Konformation während der frühen Mitose und damit für die Generierung eines aktiven SAC-Signals spielt der Faktor Mad1 eine entscheidende Rolle. So konnte in verschiedenen Modellsystemen gezeigt werden, dass die Inaktivierung von Mad1 zu einem Verlust des mitotischen *Checkpoints* führt (Chen et al., 1998; Hardwick und Murray, 1995; Luo et al., 2002). Mad1 lokalisiert in Interphase als Dimer im Komplex mit zwei Mad2-Molekülen an der nukleoplasmatischen Seite von Kernporenkomplexen (Campbell et al., 2001; Iouk et al., 2002). In Mitose wird dieser Komplex an solche Kinetochore rekrutiert, die nicht mit der Spindel verbunden sind (Chen et al., 1998). In einer Studie von 2004 wurde erstmals gezeigt, dass zwei Populationen von Mad2 an den Kinetochoren vorliegen, die sich durch ihre Mobilität unterscheiden (Shah et al., 2004). Diese Pools verteilen sich auf eine stabil mit dem Kinetochor assoziierte Fraktion sowie auf eine mobile Fraktion, die mit dem zytoplasmatischen Pool in stetigem Austausch steht. Das an Mad1 gebundene Mad2 entspricht dabei der stabil mit dem Kinetochor assoziierten Population, während die mobile Population freiem Mad2 entspricht, das aufgrund von Wechselwirkung mit dem immobilen Pool transient mit Kinetochoren assoziiert (De Antoni et al., 2005; Vink et al., 2006). Von dieser Beobachtung ausgehend wurde ein Modell erstellt, das als sog. Matrizenmodell bezeichnet wird (De Antoni et al., 2005). Dabei wird angenommen, dass die Wechselwirkung von freiem Mad2 mit dem stabil am Kinetochor gebundenen Pool neben der Rekrutierung von O-Mad2 aus dem Zytoplasma auch dessen strukturelle Aktivierung aufgrund von Überführung in die geschlossene Konformation bewirkt. Mittlerweile konnte dieses Modell in verschiedenen Systemen *in vitro* nachgestellt werden (Kulukian et al., 2009; Simonetta et al., 2009; Yang et al., 2008), weshalb davon auszugehen ist, dass das Modell auch *in vivo* Relevanz besitzt.

2.2.4.3 Mitotischer Checkpoint Komplex (MCC)

Neben Mad2 spielen noch weitere Faktoren des SAC eine Rolle bei der Inaktivierung von APC/C^{Cdc20}. Zu diesen zählt neben BubR1 auch Bub3. Gemeinsam mit Cdc20 und Mad2 bilden diese Faktoren einen tetrameren Komplex aus, der als mitotischer *Checkpoint*-Komplex (MCC) bezeichnet wird (Sudakin et al., 2001). Dabei bindet zu-

nächst Mad2 an ein in Mad1 und Cdc20 konserviertes, Mad2-interagierendes Motiv (MIM) während BubR1 durch zwei, entsprechend ihrer Primärstruktur als KEN-Boxen bezeichnete Motive an Cdc20 bindet (Burton und Solomon, 2007; Luo et al., 2000, 2002; Sczanieka et al., 2008; Malureanu et al., 2009). Diese Motive entsprechen konservierten Degradationssignalen, sog. Degrons, die innerhalb der Primärstruktur von Substraten des APC/C vorkommen und deren Erkennung durch den APC/C vermitteln. Diese Erkennung bewirkt die Ubiquitinierung dieser Substrate und damit deren Degradation in der späten Mitose (Peters, 2006). Die Inhibition des Cdc20-abhängigen APC/C durch den MCC beruht entsprechend aktueller Studien auf einer Bindung von BubR1 an Cdc20, die der eines Pseudosubstrates entspricht (Burton und Solomon, 2007; Herzog et al., 2009; Sczanieka et al., 2008). Dadurch wird die Assoziation von Substraten wie Cyclin B1/Cdc13 oder Securin mit dem APC/C^{Cdc20} spezifisch verhindert, weshalb es zur Stabilisierung dieser Substrate und damit zur Arretierung der Zelle in einem der Prometaphase entsprechenden Stadium der Mitose kommt (Burton und Solomon, 2007; King et al., 2008; Sczanieka et al., 2008; Malureanu et al., 2009).

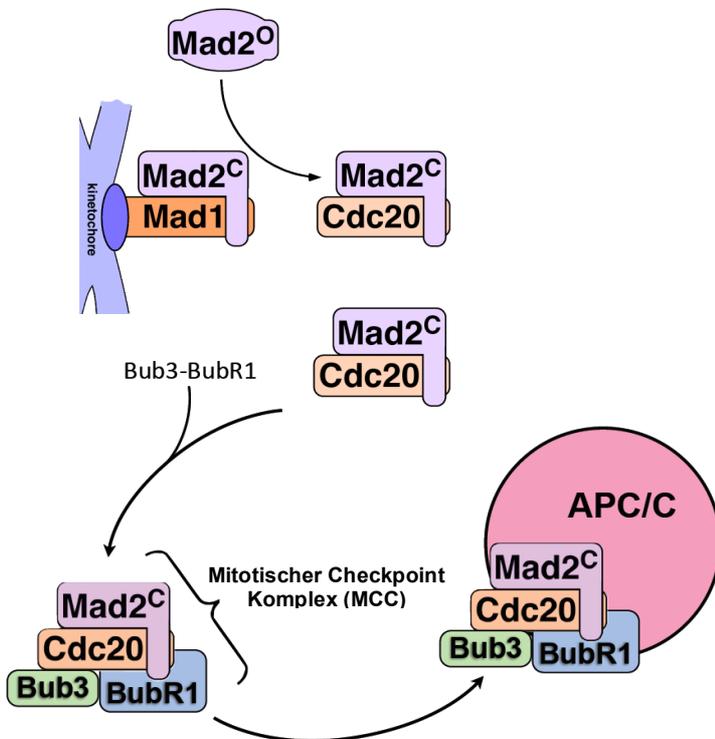


Abbildung 8: Das Matrizenmodell

Das sog. Matrizenmodell liefert einen hypothetischen Mechanismus für die strukturelle Aktivierung von Mad2 innerhalb des SAC.

Der kinetochorständige Mad1-Mad2 Komplex stellt dabei die Matrize dar. An diese wird zytosolisches Mad2 rekrutiert und gleichzeitig in die strukturell geschlossene Form überführt.

Entsprechend aktiviertes Mad2 bindet dann an Cdc20. Dadurch können weitere Faktoren des SAC wie BubR1 und Bub3 an Cdc20 binden, wodurch es letztendlich zur Ausbildung des mitotischen *Checkpoint* Komplexes (MCC) kommt.

Erst durch die Ausbildung dieses Komplexes wird eine effiziente Inhibition des APC/C^{Cdc20} erreicht.

Neben dieser von BubR1 abhängigen Inhibition des APC/C bewirkt die Ausbildung des MCC auch eine Degradation von Cdc20 während der frühen Mitose (Ge et al.,

2009; Nilsson et al., 2008; Pan und Chen, 2004). Da Cdc20 in der Mitose jedoch ständig neu synthetisiert wird, bewirkt diese Degradation, dass die Cdc20-Konzentration in der Zelle konstant bleibt, solange der SAC aktiv ist (Nilsson et al., 2008). Die Inaktivierung des SAC führt folglich zur Stabilisierung von Cdc20 und dadurch zur Aktivierung des APC/C^{Cdc20} (Nilsson et al., 2008).

2.2.4.4 Chromosomaler *Passenger* Komplex (CPC)

Der Chromosomale *Passenger* Komplex stellt einen tetrameren Proteinkomplex dar, der in der frühen Mitose am Zentromer lokalisiert und eine Vielzahl von mitotischen Vorgängen reguliert. So stellt der CPC beispielsweise sicher, dass alle Chromosomen während der Mitose in amphitelischer Weise mit Spindel in Wechselwirkung treten. Darüber hinaus besitzt der CPC Funktionen in der Regulation der Schwesterchromatidkohäsion und während der Zytokinese (Ruchaud et al., 2007).

Der CPC beinhaltet vier Untereinheiten, die als INCENP, Survivin, Borealin (Dasra B) und Aurora B bezeichnet werden (Ambrosini et al., 1997; Cooke et al., 1987; Glover et al., 1995; Sampath et al., 2004; Terada et al., 1998). Charakteristisch für den CPC ist seine Relokalisation vom Chromatin zur Spindelmitte in Anaphase (Earnshaw und Cooke, 1991). Die Kinase Aurora B, die der katalytischen Untereinheit des CPC entspricht, spielt eine entscheidende Rolle innerhalb der Gewährleistung bipolarer Anheftung der Chromosomen an die mitotische Spindel und damit für die korrekte Segregation der Chromatiden in Anaphase. Dazu rekrutiert Aurora B das Mikrotubuli-depolymerisierende Kinesin MCAK (Mitotisch Centromer-Assoziiertes Kinesin) an Zentromere (Andrews et al., 2004; Desai et al., 1999; Lan et al., 2004; Wordeman und Mitchison, 1995). Durch die Regulation dieses auch als sog. Katastrophen bezeichneten Kinesins werden nicht unter Zugspannung stehende Spindel-Kinetochor-Wechselwirkungen spezifisch gelöst und dadurch die Möglichkeit für eine erneute Anheftung betroffener Chromosomen an die Spindel geschaffen (Bakhoum et al., 2009; Kline-Smith et al., 2004; Tanaka et al., 2002).

2.2.4.5 Funktion des *Spindle Assembly Checkpoint* in Meiose

Aufgrund von Studien an X0-Mäusen, d.h. an Mäusen, denen ein X-Chromosom (Gonosom) fehlt, wurde lange Zeit angenommen, dass der *Spindle Assembly Checkpoint* in der Meiose von Vertebraten inaktiv sei. Obwohl diesen Mäusen ein

X-Chromosom fehlt und das verbleibende Gonosom somit keinen Partner für die Rekombination in Meiose I hat, sind diese Mäuse zumindest eingeschränkt fruchtbar. Die Postulation einer Abwesenheit des SAC in Meiose erfolgte dabei aufgrund der Annahme, dass ein aktiver *Spindle Assembly Checkpoint* die monopolare Anheftung vereinzelter X-Chromosomen detektieren und dadurch einen Arrest dieser Oozyten in Meiose I herbeiführen müsste (Hunt et al., 1995; LeMaire-Adkins et al., 1997).

Inzwischen konnte in verschiedenen Studien jedoch gezeigt werden, dass die Behandlung von Oozyten mit Mikrotubuli-destabilisierenden Agenzien wie zum Beispiel Nocodazol (Sentein, 1971) zu einem von Mad2 abhängigen Arrest dieser Oozyten in der Meiose I führt (Brunet et al., 2003; Wassmann et al., 2003). Die Depletion von Faktoren des mitotischen SAC in Meiose führt darüber hinaus zu einer vorzeitigen Trennung der Homologen sowie zu vorzeitigem Polkörperausstoß in Meiose I. Dies zeigt, dass der SAC vorübergehend auch in unbehandelten Oozyten aktiv wird bzw. die Dauer von Meiose I mit beeinflusst (Homer et al., 2005, 2005; McGuinness et al., 2009; Niaux et al., 2007; Tsurumi et al., 2004; Wassmann et al., 2003). Dennoch ist der SAC in Meiose I gegenüber der Mitose weniger robust. Dies wird u.a. daran deutlich, dass im Gegensatz zur Mitose während der Meiose vereinzelt Fehlanheftungen von Chromosomen an der Spindel nicht zu einem dauerhaften Arrest führen (Hunt et al., 1995; LeMaire-Adkins et al., 1997).

2.2.4.6 Inaktivierung des SAC und Austritt aus der Mitose

Der *Spindle Assembly Checkpoint* stellt ein Maß für die Anheftung der Kinetochore an Mikrotubuli der Spindel in Mitose dar. Grundsätzlich bleibt der SAC solange aktiv bis alle Chromosomen in amphitelischer Weise mit der Spindel verbunden sind. Erst beim Erreichen dieses Zustandes kommt es zur Inaktivierung des SAC und damit zur Aktivierung des APC/C^{Cdc20}. Dies wiederum bewirkt die Degradation von Securin und Cyclin B1/Cdc13 in Anaphase und damit die Trennung der Schwesterchromatide und den Mitoseaustritt (Clute und Pines, 1999; Hagting et al., 2002).

Nach der Ausbildung amphitelischer Wechselwirkungen zwischen Kinetochoren und Mikrotubuli der Spindel werden Faktoren des SAC wie z.B. Mad1, Mad2, BubR1 oder Bub3 von diesen Kinetochoren entfernt. Die Depletion des Mad1-Mad2-Komplexes an solchen Kinetochoren hängt maßgeblich von Dynein ab (Hoffmann et al., 2001; Howell et al., 2001). Dynein stellt ein Mikrotubuli-abhängiges Motorprotein dar, das

durch Komplexbildung mit Dynactin Proteine entlang von Mikrotubuli transportieren kann. In Metaphase transportiert Dynein den Mad1-Mad2-Komplex entlang der Spindelfasern zu den Polen (Hoffmann et al., 2001; Howell et al., 2001). Ein weiterer, in Metazoen vorkommender Mechanismus zur Inaktivierung des SAC beruht auf dem Faktor p31^{Comet}/CMT2, einem Mad2-bindenden Protein (Habu et al., 2002; Xia et al., 2004). Die native Faltung von p31^{Comet} entspricht weitgehend der offenen Konformation von Mad2 (Yang et al., 2007), was die Funktionsweise dieses Faktors erklärt. Demnach bindet und markiert p31^{Comet} das Mad2 des kinetochorständigen Mad1-Mad2-Komplexes und verhindert dadurch die weitere Aktivierung von zytosolischem Mad2 (Yang et al., 2007). Des Weiteren bindet p31^{Comet} an Cdc20-gebundenes Mad2 und neutralisiert dadurch dessen inhibitorische Wirkung gegenüber dem APC/C^{Cdc20} (Xia et al., 2004). Gleichzeitig stimuliert p31^{Comet} die Autoubiquitinierung von Cdc20, die für dessen Dissoziation von Mad2 und damit für die Aktivierung des APC/C^{Cdc20} benötigt wird (Reddy et al., 2007; Stegmeier et al., 2007). Zusammen mit einem weiteren Mechanismus, der auf Dissoziation des Mad1-Mad2-Komplexes in Folge von Mad2-Phosphorylierung beruht (Wassmann et al., 2003) tragen diese Mechanismen kollektiv zur Inaktivierung des SAC bei.

2.2.5 Shugoshin im spannungsabhängigen Zweig des SAC

Shugoshin schützt nicht nur zentromerische Kohäsion in mitotischer Prophase und Meiose I durch PP2A-abhängige Dephosphorylierung von Kohäsin. Darüber hinaus wurde Shugoshin eine Funktion innerhalb des SAC zugeordnet. So verlieren Hefezellen, deren einziges Shugoshingen (Sgo1) deletiert worden ist, die Fähigkeit, in Abwesenheit von amphitelischer Zugspannung in Mitose zu arretieren (Indjeian et al., 2005). Dies weist auf eine Rolle von *S. cerevisiae* Sgo1 im spannungsabhängigen Zweig des SAC hin. Kennzeichnend für *Sgo1* Δ -Zellen sind dementsprechend massive Chromosomen-Segregationsdefekte, die gleichermaßen in Mitose und in Meiose auftreten (Indjeian et al., 2005; Kiburz et al., 2008). Entsprechende Defekte wurden auch in *Sgo2* Δ -Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* gefunden, wobei die zentromerische Lokalisation von Aurora B Kinase (Ark1) in diesen Zellen gestört ist (Kawashima et al., 2007; Vanoosthuyse et al., 2007). Diese Daten liefern gleichzeitig auch den Mechanismus, über den Shugoshin in der Spaltheife die Biorientierung von Chromosomen in der Mitose vermittelt. Eine Konservierung in anderen Organismen

konnte jedoch nicht gefunden werden, da in den meisten Phyla die Lokalisierung von Aurora B unabhängig von Shugoshin erfolgt (Kiburz et al., 2008; Parra et al., 2009; Pouwels et al., 2007). In Säugern wird Sgo2 für die zentromerische Lokalisation des von Aurora B regulierten Kinesins MCAK benötigt (Huang et al., 2007; Parra et al., 2009). Dementsprechend führt die Depletion von Sgo2 in Säugerzellen ähnlich dem für Hefen beschriebenen Phänotyp zu einer verstärkten Fehlsegregation von Chromosomen in der Anaphase (Huang et al., 2007). Gleichzeitig wurde berichtet, dass Sgo2-depletierte Säugerzellen die Mitose auch dann schon verlassen, wenn manche Chromosomen noch keine bipolare Zugspannung erfahren (Huang et al., 2007). Analog den für Hefe beschriebenen Daten spricht auch diese Beobachtung für einen Defekt des SAC.

Diese Beobachtungen legen eine konservierte Funktion von Shugoshin bei der Erkennung und Korrektur nicht-amphitelischer Wechselwirkungen von Kinetochoren mit der Spindel nahe. Shugoshin könnte für die fehlerfreie Segregation der Chromosomen in Mitose und Meiose daher eine zusätzliche Bedeutung haben, die von der Beschützung zentromerischen Kohäsins unabhängig ist. In diesem Zusammenhang weisen diese Daten auch auf eine konservierte Funktion von Shugoshin innerhalb des SAC hin. Dem stehen jedoch Daten gegenüber, die bei der Untersuchung embryonaler Sgo2^{-/-} Mäuse-Fibroblasten (MEFs) erhalten wurden und die einer Funktion von Sgo2 innerhalb des SAC widersprechen (Llano et al., 2008). Ebenso konnte in diesen Zellen keine Zunahme in der Fehlsegregation von Chromosomen festgestellt werden, wie sie für Sgo2-depletierte HeLa-Zellen beschrieben worden ist (Huang et al., 2007).

2.3. Zielsetzung der Arbeit

Seit der Identifikation der Shugoshine (Kitajima et al., 2004) wurden in verschiedenen Modellsystemen Hinweise dafür erhalten, dass Shugoshin neben der Beschützung von zentromerischem Kohäsins in der frühen Mitose und in Meiose I auch eine Funktion innerhalb des SAC zukommt. So konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass Shugoshin-defiziente Zellen die Mitose in Abwesenheit von bipolarer Zugspannung verlassen, was neben Defekten in der Korrektur nicht-amphitelischer Spindel-Kinetochor-Wechselwirkungen auch auf eine Funktion von Shugoshin innerhalb des mitotischen SAC hindeutet (Indjeian et al., 2005; Vanoosthuyse et al., 2007).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den molekularen Mechanismus aufzuklären, über den Shugoshin in den SAC eingreift. Dazu wurden zunächst die Faktoren des mitotischen SAC auf Wechselwirkung mit Shugoshin untersucht, wobei eine direkte Wechselwirkung von humanem Shugoshin-2 (hSgo2) mit Mad2 identifiziert werden konnte. In Zusammenarbeit mit Dr. Kay Hofmann (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) wird gezeigt, dass Fische und Amphibien im Gegensatz zu Säugern nur über ein Shugoshin verfügen. Dennoch ist die Shugoshin-Mad2-Interaktion in diesen Vertebraten konserviert. Biochemische Untersuchungen unter Verwendung publizierter Mad2-Mutanten, Competitionsexperimenten, isothermischer Kalorimetrie sowie zwei-dimensionaler NMR-Spektroskopie in Kollaboration mit Prof. Dr. Tadeus Holak (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen Shugoshin und Mad2 mit den Wechselwirkungen, die für Mad1 bzw. Cdc20 und Mad2 beschrieben sind, vollkommen identisch ist (Luo et al., 2000, 2002). Durch die Entwicklung Mad2-binde-defizienter Mutanten von hSgo2 und RNAi-vermittelte Depletion von Mad2 wird weiterhin gezeigt, dass die Störung der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung zu einer Fehllokalisierung von hSgo2 an Randbereiche des Zentromers in der Mitose führt. Aufgrund dieser Befunde sowie publizierter Daten (Lee et al., 2008; Llano et al., 2008; Sakuno et al., 2009) wird postuliert, dass der Wechselwirkung zwischen Sgo2 und Mad2 eine wichtige Funktion innerhalb der Monoorientierung von Schwesterkinetochoren während der ersten meiotischen Reifeteilung zukommt.

Im Rahmen der zellbiologischen Untersuchung von hSgo2 in Krebszelllinien wird gezeigt, dass hSgo2 keine essentielle Funktion in der Mitose von Säugern zukommt. Ein in der Literatur bestehender Widerspruch (Huang et al., 2007; Llano et al., 2008) wird dadurch aufgeklärt. Gleichzeitig wird gezeigt, dass in Sgo2-depletierten Zellen zwar die Lokalisation des mitotischen Kinesins MCAK am Zentromer gestört ist, dennoch ist in diesen Zellen kein Anstieg in der Häufigkeit von Chromosomen-Fehlsegregationen nachweisbar. Durch RNAi-vermittelte Depletion von hSgo2 wird darüber hinaus erstmals direkt gezeigt, dass die mitotische Kinase Aurora B auch eine MCAK-unabhängige Funktion innerhalb des SAC innehaben muss.

3. Ergebnisse

3.1 Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Shugoshin und Mad2

3.1.1 Humanes Shugoshin-2 (hSgo2) wechselwirkt mit Mad2

Nach der Identifikation der Kohäsion-beschützenden Proteinfamilie der Shugoshine in *S. pombe* (Kitajima et al., 2004) wurde relativ schnell gezeigt, dass Shugoshin (SGO) für die Funktionalität des *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) bei Abwesenheit von Zugspannung zwischen den Schwesterkinetochoren einzelner Chromosomen benötigt wird (Indjeian et al., 2005; Kiburz et al., 2008). Der molekulare Mechanismus, der dieser Funktion von Shugoshin zugrunde liegt, konnte damals jedoch nicht aufgeklärt werden. Darüber hinaus konnte nicht gezeigt werden, ob eine entsprechende Funktion in höheren Eukaryoten (Vertebraten) konserviert ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden im Menschen gefundenen Orthologen der Shugoshin-familie, hShugoshin-1 (hSgo1) und hShugoshin-2 (hSgo2; siehe Abb. 10A) sowie das im südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* gefundene Shugoshin-Ortholog XShugoshin-1 (XSgo1) auf direkte Wechselwirkungen mit Faktoren des mitotischen SAC hin untersucht. Dabei konnte in humanen Zellen eine direkte Wechselwirkung zwischen hSgo2 und dem zentralen Faktor des SAC, Mad2, identifiziert werden (siehe Abb. 9). Dazu wurden transformierte, embryonale humane Nierenzellen (HEK 293T) mit Nocodazol in der Mitose arretiert (Sentein, 1979) und hSgo2 unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers immunpräzipitiert (siehe Abb. 9A). Die dabei erhaltenen Eluate wurden durch Western Blot außer auf hSgo2 auch auf die Anwesenheit der SAC-Komponente Mad2 sowie der katalytischen Untereinheit von Protein-Phosphatase 2A (PP2A_C α) untersucht, da es sich bei PP2A um einen in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner von hSgo2 handelt (Kitajima et al., 2006; Xu et al., 2009; siehe Abb. 9A). Es konnte für beide Proteine eine spezifische Co-Präzipitation mit hSgo2 nachgewiesen werden, während in einer Präzipitation mit unspezifischen IgGs beide Faktoren fehlten. Identische Ergebnisse wurden bei der Verwendung von Krebszellen erhalten, die aus einem Zervixkarzinom stammen (HeLa; siehe Abb. 9B). Die Wechselwirkung zwischen hSgo2 und Mad2 besteht demnach also generell in mitotisch arretierten, somatischen Zellen.

3.1.1.1 Die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 ist zellzyklus-unabhängig

Mad1 und Cdc20 sind zwei wichtige und eingehend charakterisierte Interaktionspartner von Mad2. Während die Mad2-Cdc20-Wechselwirkung auf die frühe Mitose beschränkt ist (Li et al., 1997; Wassmann et al., 1998), persistieren Mad2-Mad1-Komplexe während des gesamten Zellzyklus (Chen et al., 1999). Um zu untersuchen, ob die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 auf die frühe Mitose beschränkt ist oder zellzyklusunabhängig erfolgt, wurde das in Abbildung 9A beschriebene Experiment parallel in asynchronen und in Nocodazol-arretierten HEK 293T-Zellen wiederholt (siehe Abb. 9C). Die dabei erhaltenen Daten zeigen, dass die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 gleichermaßen in mitotisch arretierten Zellen wie auch in asynchronen, und damit vornehmlich in Interphase vorliegenden Zellen detektiert werden kann. Dies schließt eine zellzyklusabhängige Regulation der hSgo2-Mad2-Wechselwirkung praktisch aus. Im Bezug auf seine zeitliche Ausprägung ähnelt die hSgo2-Mad2-Wechselwirkung also eher dem Mad1-Mad2-Komplex.

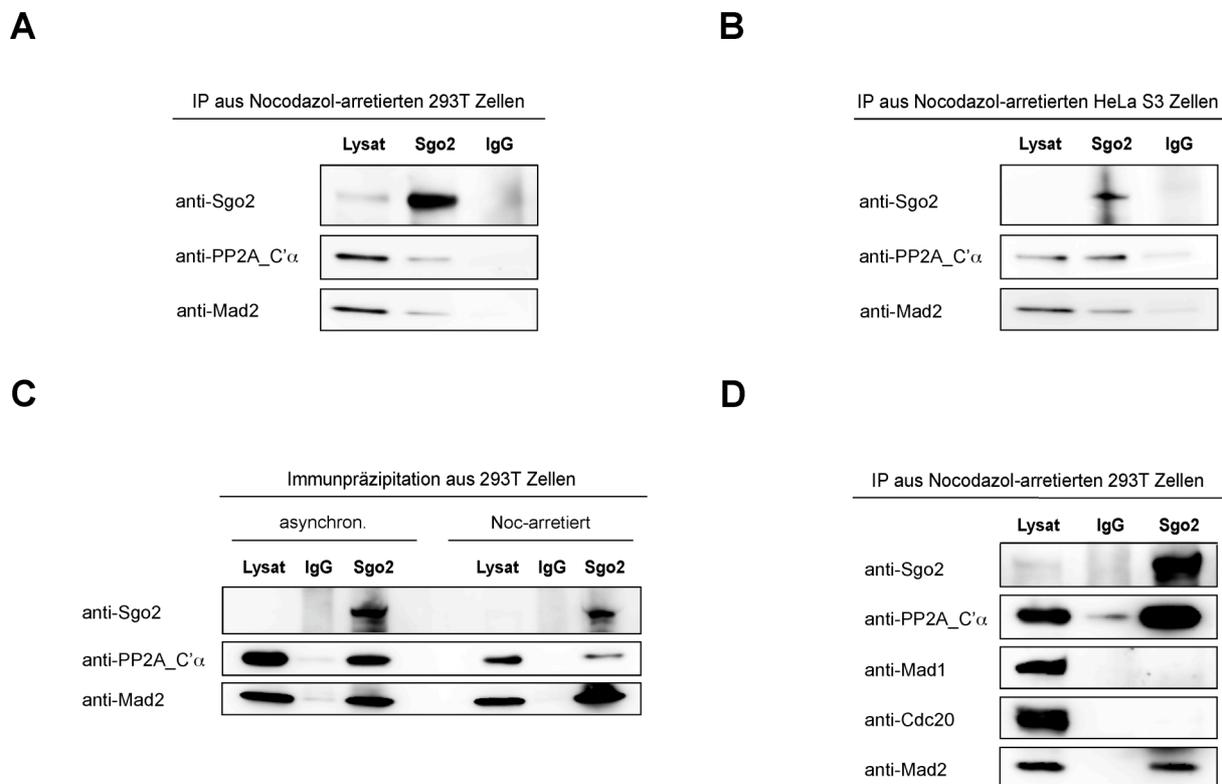


Abbildung 9: Humanes Shugoshin-2 (hSgo2) wechselwirkt mit Mad2.

(A) Immunpräzipitation von hSgo2 aus mitotisch arretierten HEK 293T-Zellen. Exponentiell wachsende HEK 293T-Zellen wurden durch Behandlung mit Nocodazol (200 ng/ml) für 15 h in Mitose arretiert, geerntet und unter Hochsalzbedingungen (400 mM NaCl) lysiert. hSgo2

wurde an Protein-G-Sepharose, die mit Kaninchen-anti-hSgo2 Antikörper (Bethyl, A301-261) oder unspez. Kaninchen-IgG beladen worden war, immunpräzipitiert. Die Sepharose wurde mit Lysepuffer gewaschen und gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert. Co-präzipitierte Proteine wurden durch Western Blot gegen hSgo2, gegen die katalytische Untereinheit der Protein-Phosphatase 2A (hPP2A_C' α) und gegen hMad2 identifiziert. **(B)** Immunpräzipitation von hSgo2 aus mitotisch arretierten HeLa S3-Zellen. Die Vorgehensweise ist der unter (A) beschriebenen identisch. **(C)** Immunpräzipitation von hSgo2 aus asynchronen oder mitotisch arretierten HEK 293T-Zellen. Exponentiell wachsende HEK 293T-Zellen wurden durch Behandlung mit Nocodazol (200 ng/ml) für 15 h in Mitose arretiert, die asynchrone Zellpopulation wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Die weitere Vorgehensweise ist der unter (A) beschriebenen identisch. **(D)** Immunpräzipitation von hSgo2 aus mitotisch arretierten HEK 293T-Zellen. Die Vorgehensweise ist der unter (A) beschriebenen identisch. Co-präzipitierte Proteine wurden durch Western Blot gegen hSgo2, hPP2A_C' α , hMad1, hCdc20 und hMad2 identifiziert.

3.1.1.2 Die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 benötigt keine Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad1 oder Cdc20

Eine weitere Frage, auf die eingegangen wurde, besteht darin, ob es sich bei der identifizierten Wechselwirkung zwischen hSgo2 und Mad2 um eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung handelt, oder ob die Wechselwirkung möglicherweise durch andere Proteine überbrückt wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde hSgo2 aus mitotisch arretierten HEK 293T immunpräzipitiert und die erhaltenen Eluate auf das Vorliegen von Mad1 und Cdc20 hin untersucht. Wie in Abbildung 9D zu erkennen ist, konnten diese beiden Faktoren in Präzipitaten, die für die Immunpräzipitation von hSgo2 erhalten wurden, nicht nachgewiesen werden, weshalb eine Überbrückung der Wechselwirkung zwischen hSgo2 und Mad2 durch Mad1 oder Cdc20 praktisch ausgeschlossen werden kann.

3.1.1.3 Die Wechselwirkung von Shugoshin mit Mad2 im Menschen ist auf hSgo2 beschränkt

Nach der Identifikation der Shugoshine wurde mit Hilfe bioinformatischer Recherchen herausgefunden, dass innerhalb des Pflanzenreichs, in Vertebraten und in *S. pombe* zwei Orthologe dieser Proteinfamilie vorkommen, während andere Organismen wie beispielsweise *S. cerevisiae* oder *Drosophila melanogaster* nur über ein Gen für Shugoshin verfügen (Kitajima et al., 2004). Die Identifizierung einer Wechselwirkung zwischen humanem Shugoshin-2 und Mad2 wirft daher die Frage auf, ob diese Wechselwirkung einer grundsätzlichen Eigenschaft der Shugoshine entspricht und damit auch in dem anderen Ortholog dieser Proteinfamilie, das im Menschen ge-

funden wurde (hSgo1; siehe Abb. 10A), konserviert ist. Um dies zu ermitteln, wurden die offenen Leserahmen (ORFs) von hSgo1 und hSgo2 von genomischen cDNA-Banken (Clontech Inc.) ausgehend amplifiziert und in pCS2-Vektoren (Rupp et al., 1994; Turner und Weintraub, 1994) kloniert. In diesen Vektoren wird die Expression von entsprechend klonierten Genen durch einen sog. CMV- (CytomeMegalo Virus) Promotor gesteuert, weshalb sie sich für die rekombinante Expression von Proteinen in Vertebraten-Zellen besonders gut eignen. Plasmide, die für hSgo1 oder hSgo2 in einer Flag-gekoppelten Form kodieren, wurden gemeinsam mit einem für HA-markiertes Mad2 kodierenden Plasmid in HEK 293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion durch die Zugabe von Nocodazol in der Mitose arretiert. Mittels anti-Flag- und anti-HA-Präzipitationen aus den entsprechenden Zelllysaten wurden anschließend die möglichen Wechselwirkungen zwischen Mad2 und den beiden humanen Shugoshinen untersucht. Dabei konnte nur für hSgo2 eine Wechselwirkung mit Mad2 detektiert werden, während für hSgo1 keine nachweisbare Affinität gegenüber Mad2 bestand (siehe Abb. 10B). Identische Daten wurden auch in einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment erhalten (siehe Abb. 10C). Diese Daten zeigen damit übereinstimmend, dass im Menschen nur Sgo2, nicht aber Sgo1 mit Mad2 wechselwirkt.

3.1.1.4 Die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 ist in Säugern konserviert

Neben der Identifizierung der Wechselwirkung zwischen dem Shugoshin-2 Ortholog im Menschen, hSgo2, und Mad2 war die Frage zu klären, ob diese Wechselwirkung auch in anderen Organismen konserviert ist. Es wurde daher zunächst untersucht, ob die Sgo2-Mad2-Wechselwirkung auch in anderen Säugern nachweisbar ist. Dazu wurden die entsprechenden Gene der Maus, mSgo1 und mSgo2, sowie das Maus-Ortholog von Mad2, mMad2, in pCS2-Vektoren kloniert und analog der oben beschriebenen Vorgehensweise auf gegenseitige Wechselwirkungen hin untersucht. Dabei konnte sowohl in Immunpräzipitationen aus transfizierten HEK 293T-Zellen als auch im Hefe-Zwei-Hybrid System eine Wechselwirkung von mSgo2 mit mMad2 nachgewiesen werden (siehe Abb. 10D, E). Dieses Ergebnis ist nicht selbstverständlich, da die Sequenzidentität zwischen hSgo2 und mSgo2 mit 49% ungewöhnlich niedrig ist (9,8% Lücken, 62,5% Ähnlichkeit). Zusammenfassend zeigen diese Daten,

dass die identifizierte Wechselwirkung zwischen Sgo2 und Mad2 in Säugern grundsätzlich konserviert ist.

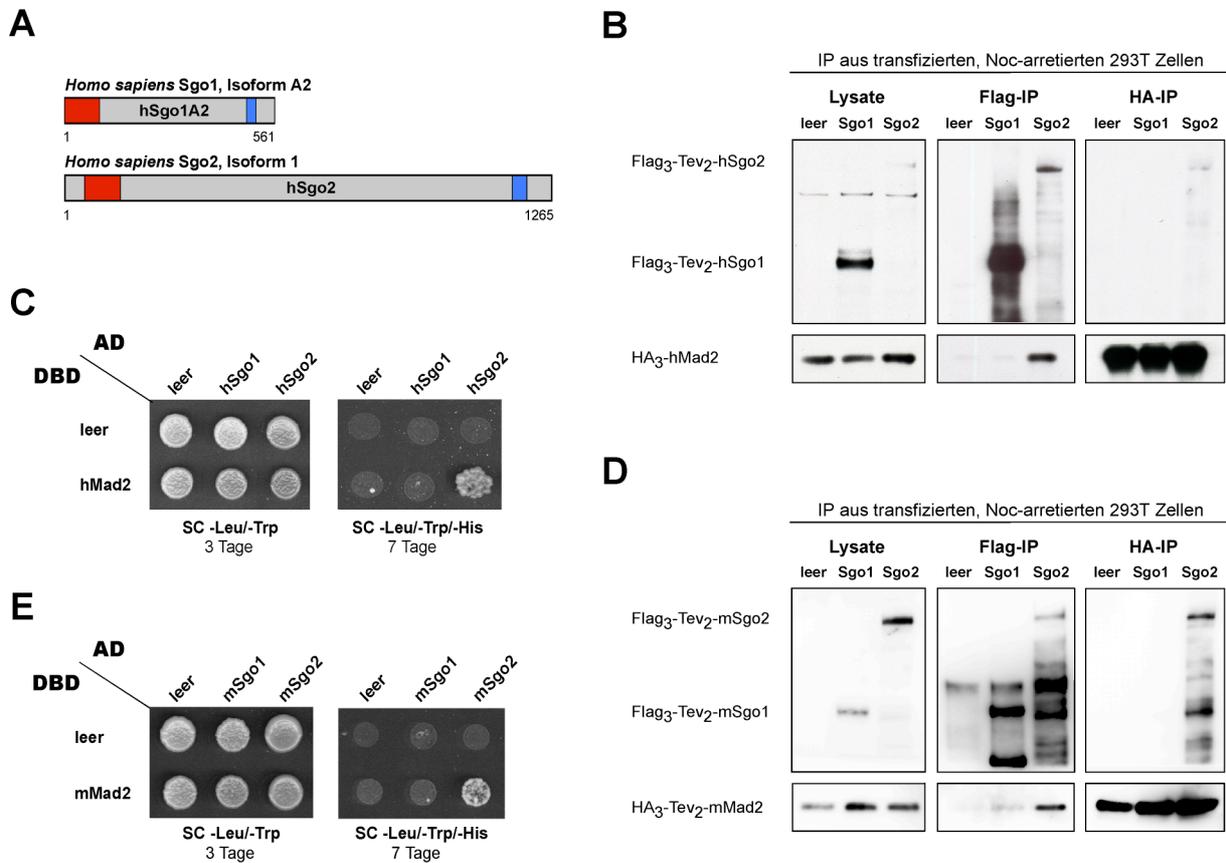


Abbildung 10: Sgo2, aber nicht Sgo1 wechselwirkt mit Mad2 in Säugern.

(A) Schematische Darstellung von humanem Sgo1 (hSgo1) und humanem Sgo2 (hSgo2). Gezeigt sind die Isoform A2 von hSgo1 (561 AS) und die Isoform 1 von hSgo2 (1265 AS). Der in Shugoshinen konservierte, N-terminale *Coiled Coil* ist in rot dargestellt und der C-terminale, basische Bereich ist in blau dargestellt. (B) Immunpräzipitation von HA₃-hMad2 an Flag₃-hSgo2 aus transient transfizierten, mitotisch arretierten HEK 293T-Zellen. HEK 293T-Zellen wurden mit Plasmiden, die für das Flag₃-Epitop und HA₃-hMad2, für Flag₃-hSgo1 und HA₃-hMad2 oder für Flag₃-hSgo2 und HA₃-hMad2 kodieren, transfiziert und nach 48 h mit Nocodazol in der Mitose arretiert. Die Zellen wurden lysiert und Flag-gekoppelte Proteine an Flag-Agarose bzw. HA-gekoppelte Proteine an HA-Agarose immunpräzipitiert. Die Agarose wurde mit Lysepuffer gewaschen und gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mittels Western Blot gegen Flag-Epitop (oben) und gegen HA-Epitop (unten) detektiert. (C) Hefe-Zwei-Hybrid-Wechselwirkung von hSgo2 mit hMad2. Kompetente Hefen wurden mit Plasmiden, die für hSgo1 oder hSgo2 in Aktivierungsdomänen- (AD) gekoppelter Form und für hMad2 in DNA-Bindedomänen- (DBD) gekoppelter Form kodieren, transformiert und auf SC-Leu/-Trp-Platten selektioniert. Identische Volumina der jeweiligen Zellsuspensionen wurden auf SC-Leu/-Trp und SC-Leu/-Trp/-His Selektionsplatten ausgebracht und für die jeweils angegebenen Zeiträume bei 30°C inkubiert. (D) Immunpräzipitation von HA₃-mMad2 an Flag₃-mSgo2 aus transient transfizierten, mitotisch arretierten HEK 293T-Zellen. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den transfizierten Plasmiden der unter (B) beschriebenen identisch. (E) Hefe-Zwei-Hybrid-Wechselwirkung zwischen mSgo2 und mMad2. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den transformierten Plasmiden der unter (C) beschriebenen identisch.

3.1.2 Die Shugoshin-Mad2-Wechselwirkung besteht auch in Organismen, die nur über ein Shugoshingen verfügen

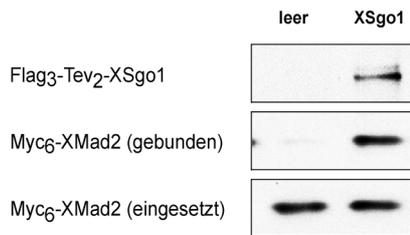
In *Xenopus laevis* konnte bisher nur ein Shugoshin identifiziert werden (Salic et al., 2004). Dieses Frosch-Shugoshin weist auf Sequenzebene 41,5% Ähnlichkeit (bei 26,1% Lücken) zu hShugoshin-1 aber nur 21,3% Ähnlichkeit (bei 55,1% Lücken) zu hShugoshin-2 auf (siehe Abb. 11C). Dass *Xenopus laevis* Shugoshin dem Säuger Sgo1 entspricht, wird auch durch eine bioinformatische Analyse gestützt, bei der die benachbarten Gene der jeweiligen Shugoshingene in verschiedenen Vertebraten miteinander verglichen wurden (Dr. Kay Hofmann, Miltenyi Biotec GmbH, persönliche Mitteilung). Obwohl humanes Sgo1 nicht mit Mad2 interagiert, wurde XSgo1 aus einer *Xenopus laevis* Oozyten-cDNA-Bank amplifiziert, kloniert und auf seine mögliche Wechselwirkung mit XMad2 hin untersucht (siehe Abb. 11A). Dazu wurde XSgo1 durch die Klonierung in einen pCS2-Vektor N-terminal mit einem Flag-Epitop gekoppelt. Parallel wurde das Mad2-Ortholog von *Xenopus laevis* (XMad2) amplifiziert und N-terminal mit einem Myc-Epitop versehen. Die Plasmide wurden transient in *Xenopus laevis* Kaulquappenzellen (XTC-Zellen) transfiziert und eine mögliche Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren mittels anti-Flag-Immünpräzipitation untersucht. Dabei zeigte sich, dass die für hSgo2 gefundene Wechselwirkung mit Mad2 tatsächlich auch in XSgo1 konserviert ist. Um zu untersuchen, ob dieses Ergebnis auch für endogene Proteine erhalten werden konnte, wurde in Kaninchen ein polyklonaler Antikörper gegen einen Sequenzabschnitt von XSgo1 generiert, der den Aminosäuren 301 bis 400 entspricht. Dieser Antikörper wurde anschließend zur Immünpräzipitation von endogenem XSgo1 aus XTC-Zellen verwendet. Die dabei erhaltenen Präzipitate wurden mittels Western Blot auf das Vorliegen von XSgo1 und XMad2 analysiert (siehe Abb. 11B). Dabei konnte die in transfizierten XTC-Zellen gefundene Wechselwirkung von XSgo1 mit XMad2 bestätigt werden. Dies zeigt, dass die in Säugern identifizierte Wechselwirkung von Sgo2 mit Mad2 in Shugoshin-1 von *Xenopus laevis* (XSgo1) tatsächlich konserviert ist. Dieses unerwartete Ergebnis veranlasste uns, in Kollaboration mit Dr. Kay Hofmann zu klären, ob Frösche überhaupt über ein Sgo2-Ortholog verfügen. Entsprechende Datenbankanalysen ergaben in der Tat, dass Säuger und Vögel zwar über zwei, Amphibien und Fische aber nur über ein Shugoshin-Ortholog verfügen (Dr. Kay Hofmann, persönliche Mitteilung). Die weit verbreitete Annahme, dass Vertebraten grundsätzlich zwei Shugoshine besitzen

Ergebnisse

(Watanabe, 2005), ist also inkorrekt. Die Interaktion von XSgo1 mit Mad2 zeigt, dass diese Wechselwirkung in Vertebraten konserviert ist, und dass Mad2-Bindung wahrscheinlich eine wichtige, urtümliche Eigenschaft von Shugoshinen darstellt.

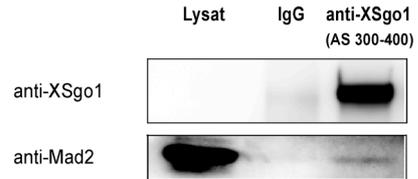
A

Flag-IP aus transfizierten, Noc-arretierten XTC Zellen



B

IP aus Nocodazol-arretierten XTC Zellen



C

Sequenzvergleich von XSgo1 gegen:

	hSgo1A2	hSgo2 (Isoform 1)
Identität	26,7%	11,9%
Ähnlichkeit	41,5%	21,3%
Lücken	26,1%	55,1%

D



Abbildung 11: Die Sgo2-Mad2-Wechselwirkung wird in Organismen, denen ein Gen für Sgo2 fehlt, durch Sgo1 übernommen.

(A) Immunpräzipitation von XMad2 an Flag₃-XSgo1 aus transient transfizierten, mitotisch arretierten XTC-Zellen. XTC-Zellen wurden mit Plasmiden die für Flag-Epitop und XMad2 oder für Flag₃-XSgo1 und XMad2 kodieren, transfiziert und nach 24 h mit Nocodazol in der Mitose arretiert. Die Zellen wurden lysiert und Flag-gekoppelte Proteine an Flag-Agarose immunpräzipitiert. Die Agarose wurde mit Lysepuffer gewaschen und gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mittels Western Blot gegen Flag-Epitop (oben) und gegen Myc-Epitop (Mitte) detektiert. (B) Immunpräzipitation von *Xenopus laevis* Shugoshin-1 (XSgo1) aus mitotisch arretierten XTC-Zellen. Exponentiell wachsende XTC-Zellen wurden durch Behandlung mit Nocodazol (200 ng/ml) in Mitose arretiert, geerntet und unter Hochsalzbedingungen (400 nM NaCl) lysiert. XSgo1 wurde an Protein-G-Sepharose, die mit Kaninchen-anti-XSgo1_{AS300-400} Antikörper oder unspezifischen Kaninchen-IgGs beladen worden war, immunpräzipitiert. Die Sepharose wurde mit Lysepuffer gewaschen und gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mittels Western Blot gegen XSgo1 und gegen Mad2 identifiziert. (C) Parameter, die für einen Sequenzvergleich von XSgo1 mit hSgo1 (Isoform A2) bzw. von XSgo1 mit hSgo2 (Isoform 1) erhalten wurden. Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Internetservices des Europäischen Molekularbiologischen Laboratoriums (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) durchgeführt (Methode: *Needle*; Matrix: Blosum62; maximale Lücke: 10,0;

maximale Verlängerung: 0,5). **(D)** Schematische Darstellung der Propagation der Shugoshin-Gene während der Evolution der Vertebraten. Gezeigt ist ein phylogenetischer Stammbaum, der basierend auf Unterschieden in der Primärstruktur von Hämoglobin erstellt worden ist. Die schematische Darstellung des evolutionären Zeitpunktes, an dem die mutmaßliche Verdopplung des Shugoshin-Gens in Vertebraten erfolgte (dargestellt durch roten Punkt), basiert auf bioinformatischen Untersuchungen, die durch Herr Dr. Kay Hofmann (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) durchgeführt wurden.

3.1.3 Bestimmung des Mad2-bindenden Motivs in *Xenopus laevis*

Shugoshin-1 (XSgo1) über Far Western Blot

Nach der Identifikation einer in Vertebraten konservierten Wechselwirkung zwischen Shugoshin und Mad2 sollte die relevante Bindestelle in Shugoshin kartiert werden. In der Hoffnung, dass es sich um ein kleines, lineares Bindemotiv handeln würde, wurde ein Far Western Blot durchgeführt. Da keinerlei strukturelle Daten über Domänen vorlagen, und da bakteriell exprimiertes Shugoshin zur Unlöslichkeit neigt, wurden jeweils 100 Aminosäuren umfassende Fragmente von XSgo1 als unlösliche Fusionen mit Ketosteroid-Isomerase (KSI) in *E. coli* exprimiert (siehe Abb. 12A). Diese wurden dann mittels eines His-tags denaturierend affinitätsgereinigt und nach SDS-PAGE und Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran mit nativem XMad2 inkubiert (siehe Abb. 12B). Die anschließende immunologische Detektion von XMad2 zeigte tatsächlich eine starke, spezifische Wechselwirkung zwischen XMad2 und einem XSgo1-Fragment, das den Aminosäuren 101 bis 200 entspricht (siehe Abb. 12C). Daneben wurden schwache Wechselwirkungen von XMad2 mit Fragmenten, die den Aminosäuren 301 bis 400 sowie dem C-Terminus von XSgo1 (Aminosäuren 554-663) entsprechen, detektiert, was auf mögliche sekundäre Mad2-Bindestellen innerhalb der Primärstruktur von XSgo1 hinweisen könnte (siehe Abb. 12C). Die Existenz derartiger sekundärer Bindemotive, die die Wechselwirkung zwischen Mad2 und seinem jeweiligen Bindepartner stabilisieren, ist u.a. für Cdc20 beschrieben (Mondall et al., 2007). Ausgehend von dem stark Mad2-bindenden XSgo1-Fragment (Aminosäuren 100-200) wurden N-terminal und C-terminal jeweils weitere 20 oder 40 Aminosäuren deletiert und die entsprechenden Fragmente erneut mittels Far Western Blot auf ihre Affinität gegenüber XMad2 hin analysiert (siehe Abb. 12D). Dabei wurde deutlich, dass eine Deletion der Aminosäuren 160 bis 180 die Wechselwirkung zerstört (siehe Abb. 12D, Spuren 2 und 3 von links), was darauf hinweist, dass dieser Abschnitt innerhalb der Primärstruktur von XSgo1 die Wechselwirkung mit XMad2 vermittelt.

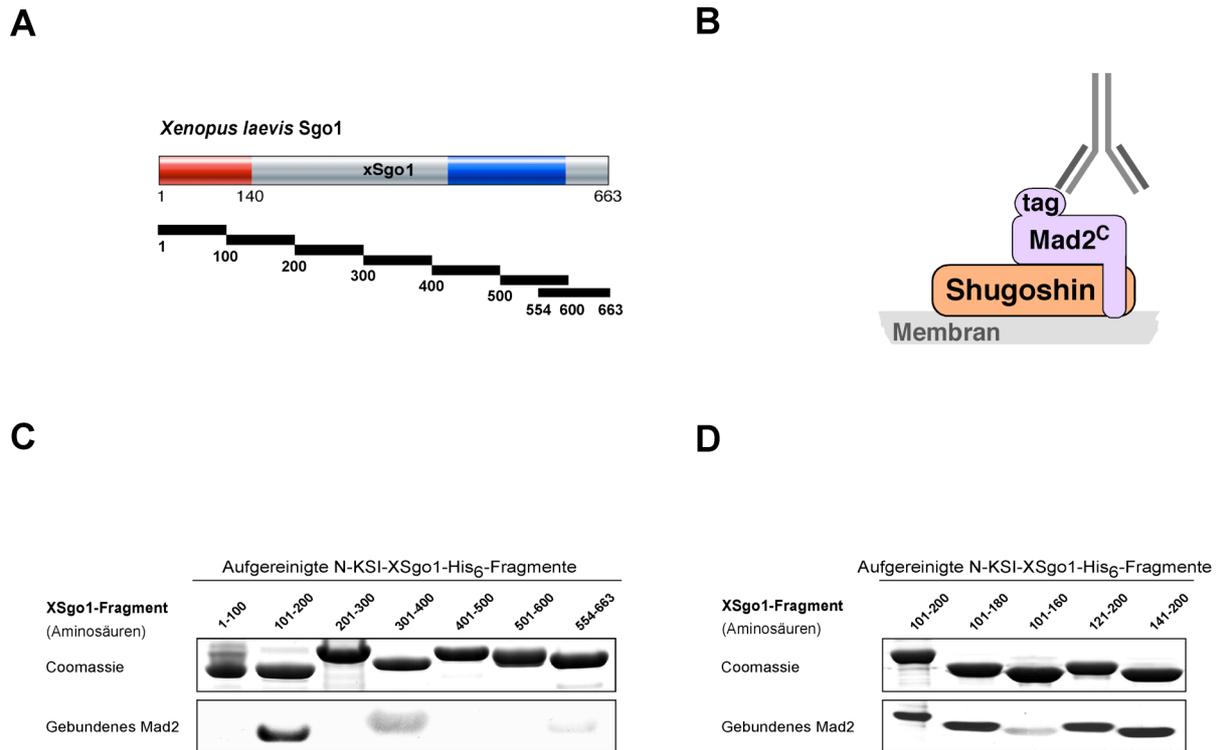


Abbildung 12: Bestimmung des Mad2-interagierenden Motivs (MIM) in *Xenopus laevis* Sgo1 (XSgo1) über Far Western Blot.

(A) Schematische Darstellung von *Xenopus laevis* Sgo1 (XSgo1). Der in Shugosin konservierte, N-terminale *Coiled Coil* ist in rot dargestellt und der C-terminale, basische Bereich ist in blau dargestellt. Die zur Bestimmung des Mad2-bindenden Motivs in XSgo1 (siehe Abb. 12C) verwendeten Proteinfragmente sind als schwarze Balken dargestellt (unten); die Zahlen entsprechen den Aminosäuren innerhalb der Primärstruktur von XSgo1. (B) Schematische Darstellung des Far Western Blot. Proteinfragmente von XSgo1 (orange dargestellt) werden auf eine Membran (grau dargestellt) gebロットet. Die Membran wird mit durch ein Epitop markiertem Mad2 (violett dargestellt) inkubiert und mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen dieses Epitop gerichtet ist, behandelt. Dieser Antikörper und damit gebundenes Mad2 wird entsprechend einem Western Blot detektiert. (C) Far Western Detektion von Proteinfragmenten von XSgo1 mit XMad2. Rekombinant in *E. coli* exprimierte Fragmente von XSgo1 wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet. Die Membran wurde anschließend in einer Lösung von gereinigtem XMad2 inkubiert. Die Detektion von gebundenem XMad2 erfolgte durch die Behandlung mit einem monoklonalem Antikörper. Die aufgetragenen Mengen der XSgo1-Fragmente wurden durch kolloidale Coomassie Färbung abgeschätzt. (D) Far Western Blot von Proteinfragmenten von XSgo1 mit XMad2. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den untersuchten XSgo1-Fragmenten der unter (C) beschriebenen identisch.

3.1.4 Shugosine besitzen ein in Mad1 und Cdc20 konserviertes Mad2-interagierendes Motiv (MIM)

Für Mad1 und Cdc20, die bisher in der Literatur beschriebenen Bindungspartner von Mad2, konnten jeweils charakteristische, innerhalb der Eukaryoten weitgehend konservierte Bindemotive (sog. MIMs) determiniert werden, die deren Wechselwirkung

mit Mad2 spezifisch vermitteln (Luo et al., 2000, 2002). Diese Motive bestehen in der Regel aus mehreren hydrophoben Aminosäureresten, die um einen basischen Rest herum angeordnet sind und C-terminal von mehreren Prolinen flankiert werden (Luo et al., 2002; siehe Abb. 13B). Durch die Ermittlung der Röntgenkristallstruktur des Mad1-Mad2-Komplexes im Jahr 2002 konnte erstmals gezeigt werden, dass dieses Motiv in der Primärstruktur von Mad1 durch einen C-terminalen *Loop* von Mad2 in einer Sicherheitsgurt-ähnlichen Weise umschlossen wird, weshalb dieser *Loop* als Sicherheitsgurt von Mad2 bezeichnet wird (Sironi et al., 2002; siehe Abb. 13A). Eine Deletion des entsprechenden Abschnitts in der Primärstruktur von Mad2 verhindert dessen Wechselwirkung mit Mad1 oder Cdc20 und kompromittiert dadurch den SAC (Chen et al., 1999; Fang et al., 1998). Umgekehrt führen Mutationen in den MIMs von Mad1 oder Cdc20 ebenfalls dazu, dass Mad2 nicht mehr gebunden werden kann (Li et al., 2009; Luo et al., 2002).

Durch biochemische Kartierung konnte ein Abschnitt von 20 Aminosäuren in XSgo1 bestimmt werden, der für die Wechselwirkung zwischen XSgo1 und XMad2 essentiell ist (siehe Abb. 12). Aufgrund dieser Daten wurde der Abschnitt von XSgo1 auf das Vorliegen eines entsprechenden, Mad1/Cdc20-ähnlichen Bindemotivs hin untersucht. Dabei konnte ein Motiv innerhalb dieses Sequenzabschnitts identifiziert werden, das den Mad2-interagierenden Motiven in Mad1 und Mad2 sehr ähnlich ist (siehe Abb. 13B). Um die Bedeutung dieses Motivs für die Wechselwirkung zwischen XSgo1 und XMad2 zu genauer untersuchen, wurden durch gerichtete Mutagenese konservierte Aminosäurereste zu Alaninen mutiert (siehe Abb. 13C) und die Wechselwirkung von wildtypischen und entsprechend mutierten XSgo1-Fragmenten mit XMad2 mittels Far Western Blot untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Mutation einzelner Aminosäurereste innerhalb dieses Motivs die Wechselwirkung von XSgo1-Fragmenten mit XMad2 verhindert (siehe Abb. 13C). Um die Bedeutung dieses vermeintlichen Mad2-Bindemotivs für die Wechselwirkung zwischen XSgo1 und XMad2 näher zu untersuchen, wurde ein künstliches Peptid (Aminosäuresequenz: 166-SAILRLPIH-174) generiert. Mit Hilfe von isothermischer Kalorimetrie konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid mit einer hohen Affinität an XMad2 bindet (siehe Abb. 13D). Die dabei erhaltene Dissoziationskonstante K_D liegt bei 0,604 μM (Kinga Brongel und Tadeus Holak, unveröffentlichte Daten), was mit den entsprechenden, für Mad1 oder Cdc20 publizierten Werten weitgehend übereinstimmt (Luo et al., 2002). Um die Abhängig-

keit der Wechselwirkung zwischen nativem XSgo1 und XMad2 von diesem Motiv zu untersuchen, wurde eine der in Abbildung 13C analysierten Punktmutanten (R170A) in ein N-terminales Fragment von XSgo1 (Aminosäuren 1-207) eingeführt und die Wechselwirkung dieser Mutante mit XMad2 im Hefe-Zwei-Hybrid System untersucht (siehe Abb. 13E). Für XSgo1₁₋₂₀₇ R170A konnte dabei eine spezifische Interferenz der XSgo1-XMad2-Wechselwirkung erhalten werden, während ein entsprechendes wildtypisches XSgo1-Fragment mit XMad2 interagiert (siehe Abb. 13E). Identische Ergebnisse wurden auch für die Einführung dieser Mutation in das Vollängenprotein von XSgo1 erhalten (Daten nicht gezeigt).

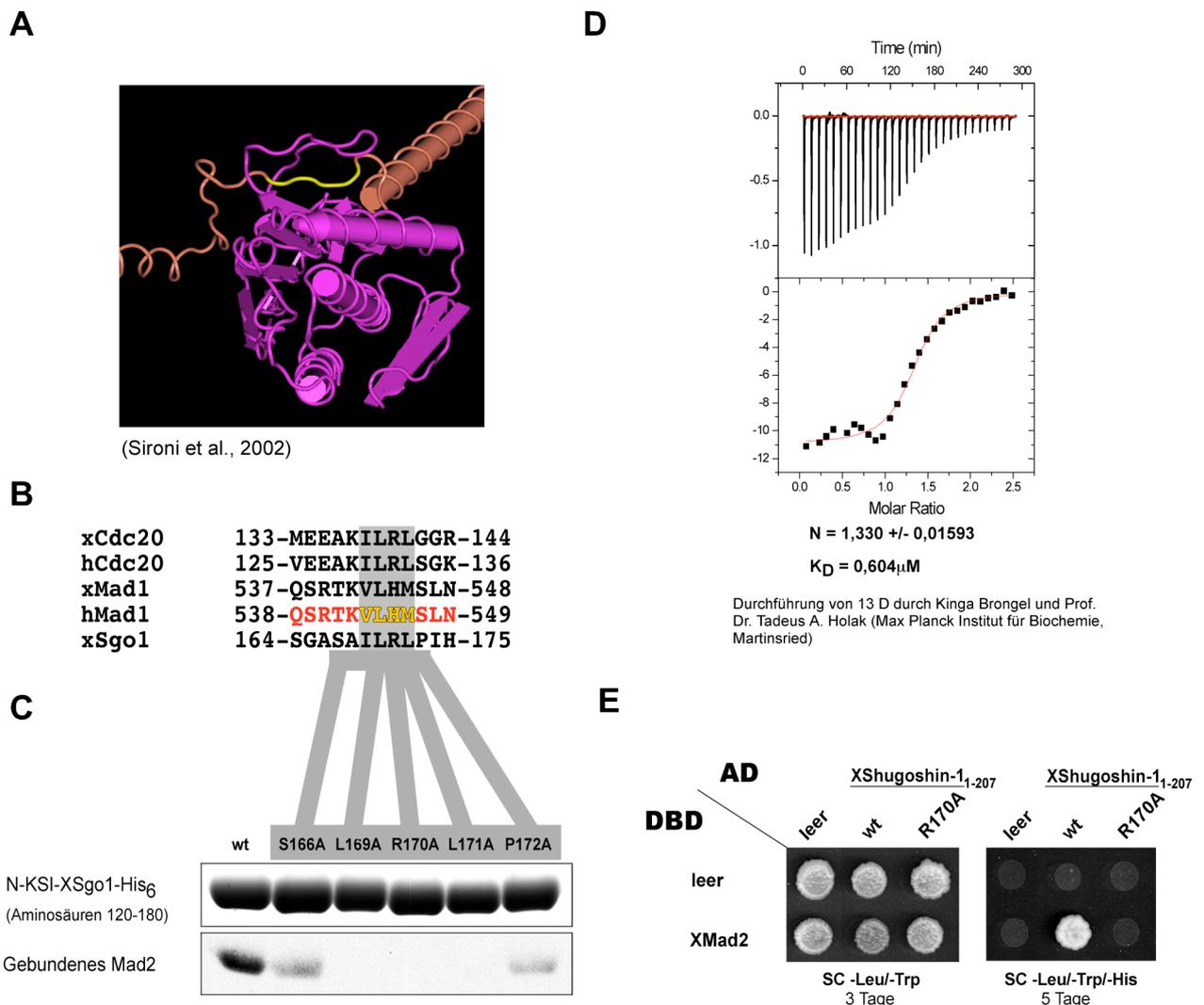


Abbildung 13: *Xenopus laevis* Sgo1 besitzt ein Mad1/Cdc20-ähnliches Bindemotiv für Mad2 (MIM).

(A) Ausschnitt der Kristallstruktur des hMad1-hMad2-Komplexes (Sironi et al., 2002). Gezeigt ist die Tertiärstruktur von hMad2 (violett dargestellt) sowie ein Abschnitt der Tertiärstruktur von hMad1 (orange dargestellt). Der Bereich innerhalb der Primärstruktur von Mad1,

der durch den Sicherheitsgurt von Mad2 umschlossen wird, ist in gelb hervorgehoben. **(B)** Sequenzvergleich von hMad1, XMad1, hCdc20, XCdc20 und XSgo1. Der innerhalb des Strukturausschnitts in (A) dargestellte Ausschnitt der Primärstruktur von hMad1 ist in rot wiedergegeben, der durch den Sicherheitsgurt von Mad2 umschlossene Bereich von hMad1 ist in gelb hervorgehoben. **(C)** Far Western Blot von wildtypischen und mutierten Fragmenten von XSgo1 mit XMad2. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den XSgo1-Fragmenten der unter Abb. 12C beschriebenen identisch. **(D)** Isothermische Kalorimetrie der Wechselwirkung von rekombinantem XMad2 mit einem XSgo1-Peptid (AS-Sequenz: 166-SAILRLPIH-174). Die Dissoziationskonstante (K_D) und die Stöchiometrie der Bindung (N) sind angegeben. Die Durchführung erfolgte durch Kinga Brongel und Prof. Dr. Tadeus Holak (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried). **(E)** Hefe-Zwei-Hybrid Wechselwirkung von einem wildtypischen und einem mutierten (R170A) N-terminalen Fragment von XSgo1 (Aminosäuren 1-207) mit XMad2. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den verwendeten Plasmiden der unter Abb. 10C beschriebenen identisch.

Diese Daten zeigen darüber hinaus, dass es sich bei dem identifizierten, Mad2-bindenden Motiv in XSgo1 tatsächlich um ein klassisches, Mad2-interagierendes Motiv (MIM) handelt, wie es ursprünglich für Mad1 und Cdc20 identifiziert werden konnte (Luo et al., 2002). So beinhaltet das in XSgo1 identifizierte MIM entsprechend den Motiven in Cdc20 und Mad1 einen basischen Rest (R170), der N-terminal von zwei hydrophoben Aminosäureresten (I168 und L169) und C-terminal von einem weiteren hydrophoben Rest (L171) flankiert ist (siehe Abb. 13B). Zusammen mit mehreren Prolinresten, die C-terminal dieses Motivs in der Primärstruktur von XSgo1 gefunden wurden, entspricht das in XSgo1 identifizierte MIM genau der Konsensus-Sequenz, die für Mad1 und Cdc20 veröffentlicht wurde (Luo et al., 2002).

Nach der Identifikation eines Mad1/Cdc20-ähnlichen Bindemotivs für Mad2 (MIM) in XSgo1 wurde als nächstes untersucht, ob dieses Motiv auch in hSgo2 konserviert ist. Aufgrund des in XSgo1 identifizierten Motivs, das sich C-terminal des N-terminalen *Coiled Coils* befindet, konnte ein entsprechendes Motiv auch für hSgo2 identifiziert werden (siehe Abb. 14A). Um zu überprüfen, ob dieses Motiv die Wechselwirkung zwischen hSgo2 und hMad2 vermittelt, wurde die, der R170A-Mutation (siehe oben) analoge Mutation (R153A) in hSgo2 eingeführt. Anschließend wurden Fragmente von hSgo2-WT oder hSgo2-R153A mittels Far Western Blot auf ihr Bindevverhalten gegenüber hMad2 hin untersucht. Dabei wurde analog den für XSgo1 erhaltenen Daten erkennbar, dass die Mutation von Arginin 153 zu Alanin die Wechselwirkung zwischen hSgo2 und Mad2 spezifisch verhindert (siehe Abb. 14B). Dieses Ergebnis zeigt wiederum, dass das identifizierte MIM in Shugoshinen verschiedener Spezies konserviert ist (siehe auch Abb. 31). Das für hSgo2 identifizierte Motiv wurde analog zu XSgo1 unter Verwendung eines künstlichen Peptids (Aminosäuresequenz: 146-

Ergebnisse

SKQCKLMRLPFA-157) mittels isothermischer Kalorimetrie auf seine Affinität gegenüber hMad2 untersucht (siehe Abb. 14C). Der dabei erhaltene K_D -Wert von $0,685 \mu\text{M}$ entspricht weitgehend dem für XSgo1 erhaltenen Wert ($0,604 \mu\text{M}$), was zeigt, dass beide Peptide mit vergleichbarer Affinität an Mad2 binden. Die Einführung der R153A Mutation in das Vollängenprotein von hSgo2 führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduzierung der Bindungsaffinität von hSgo2 gegenüber Mad2 (siehe Abb. 14D und E). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Shugoshine über ein Mad1/Cdc20-ähnliches, Mad2-bindendes Motiv (MIM) verfügen und dass dieses Motiv innerhalb der Vertebraten-Shugoshine konserviert ist (siehe Abb. 31).

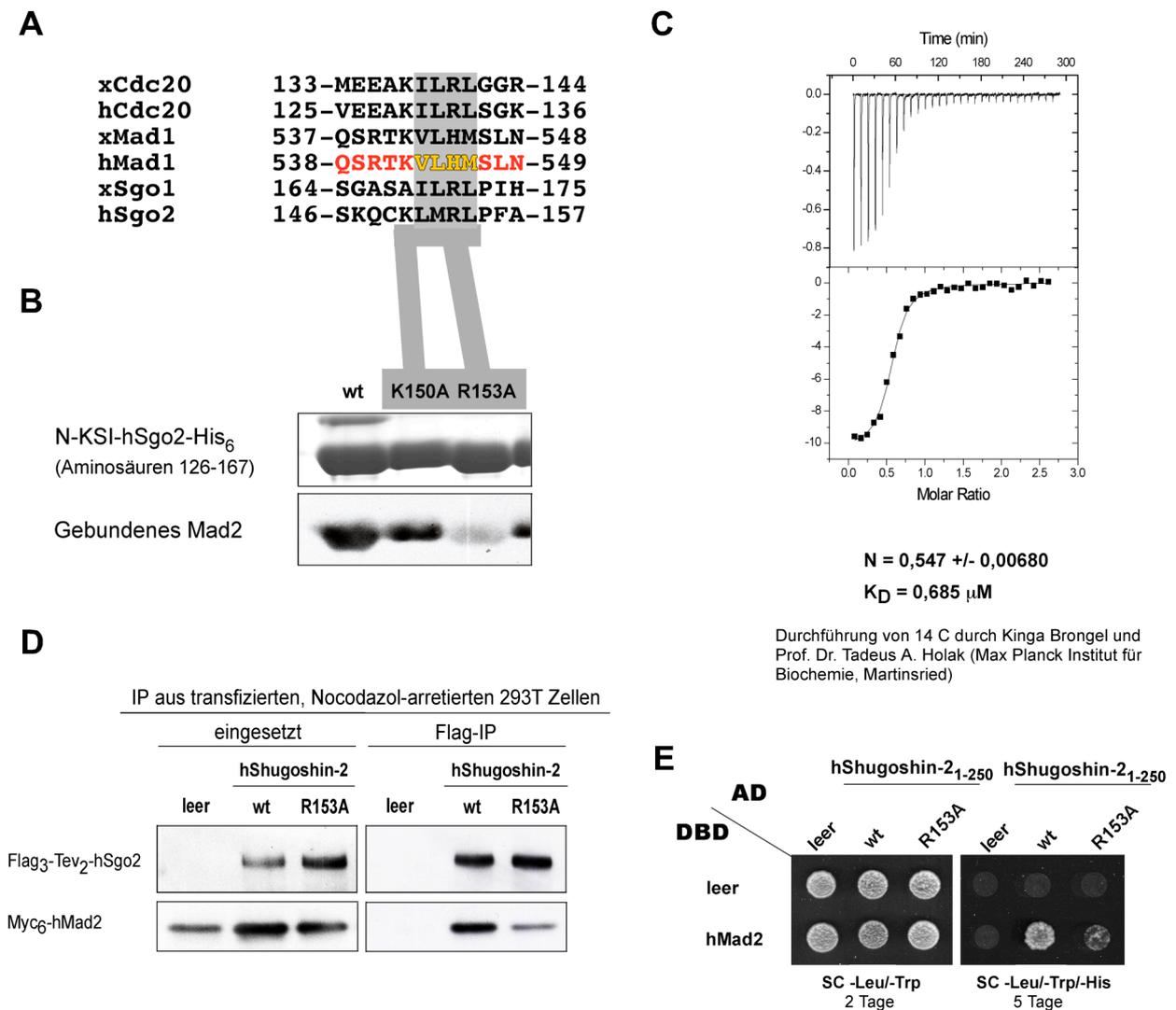


Abbildung 14: Humanes Sgo2 besitzt ebenfalls ein Mad1/Cdc20-ähnliches Bindemotiv für Mad2 (MIM).

(A) Sequenzvergleich von hMad1, XMad1, hCdc20, XCdc20, XSgo1 und hSgo2. Der innerhalb des Strukturausschnittes in Abb. 13A dargestellte Ausschnitt der Primärstruktur von hMad1 ist in rot dargestellt, der durch den Sicherheitsgurt von Mad2 umschlossene Bereich

von Mad1 ist in gelb hervorgehoben. **(B)** Far Western Blot von wildtypischen und punktmutierten Fragmenten von hSgo2 mit hMad2. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den anstelle von XSgo1- verwendeten hSgo2-Fragmenten der unter Abb. 12C beschriebenen identisch. **(C)** Isothermische Kalorimetrie der Wechselwirkung von rekombinantem hMad2 mit einem hSgo2 Peptid (Aminosäuresequenz: 146-SKQCKLMRLPFA-157). Die Dissoziationskonstante (K_D) und die Stöchiometrie der Bindung (N) sind angegeben. Die Durchführung erfolgte durch Kinga Brongel und Prof. Dr. Tadeus Holak (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried). **(D)** Immunpräzipitation von hMad2 an wildtypischem und mutiertem (R153A) Flag₃-hSgo2 aus transient transfizierten HEK 293T-Zellen. 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für folgende Proteine transfiziert: Flag₃-Epitop und hMad2, Flag₃-hSgo2-WT und hMad2 oder Flag₃-hSgo2 R153A und hMad2. Die Zellen wurden lysiert und Flag-gekoppelte Proteine an Flag-Agarose immunpräzipitiert. Die Agarose wurde mit Lysepuffer gewaschen und gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mittels Western Blot gegen Flag-Epitop (oben) und gegen Myc-Epitop (Mitte) detektiert. **(E)** Hefe-Zwei-Hybrid Wechselwirkung zwischen wildtypischem und punktmutierten (R153A) N-terminalen Fragment von hSgo2 (Aminosäuren 1-250) und hMad2. Die Vorgehensweise ist mit Ausnahme der Plasmide der unter Abb. 10C beschriebenen identisch.

3.1.5 Shugoshine wechselwirken ausschließlich mit der geschlossenen Konformation von Mad2 (C-Mad2)

Die Wechselwirkungen, die Mad2 im Rahmen des aktiven SAC einget, wurden in den vergangenen zehn Jahren ausführlich untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass Mad2 zu einer Familie von Proteinen zählt, die durch eine sog. HORMA-Domänenfaltung gekennzeichnet sind. Diese Proteine zeichnen sich maßgeblich durch ihre Eigenschaft aus, in mehreren, unterschiedlich gefalteten Konformationen existieren zu können (Aravind und Koonin, 1998). Für Mad2 konnten zwei Konformationen ermittelt werden, die als „offen“ und als „geschlossen“ bezeichnet werden (Luo et al., 2004). Diese Konformationen unterscheiden sich hauptsächlich in der Positionierung des C-terminalen Sicherheitsgurts von Mad2.

Für eine Mad2- Δ C Mutante, in der die C-terminalen zehn Aminosäuren deletiert sind, wurde gezeigt, dass sie nicht mehr mit Cdc20 interagiert (Luo et al., 2000), und dass die Überexpression dieser Mutante den SAC kompromittiert (Chen et al., 1999; Fang et al., 1998). Darüber hinaus konnte für Mad2- Δ C gezeigt werden, dass diese Mutante ihre Fähigkeit der konformationellen Umwandlung verloren hat und in der offenen Konformation arretiert ist (Luo et al., 2004). Daneben wurden auch Mad2-Mutanten identifiziert (R133A, RQ133/134EA), die konstitutiv in der geschlossenen Konformation vorliegen (De Antoni et al., 2005; Sironi et al., 2001; Yang et al., 2008). Im Gegensatz zu der Mad2- Δ C Mutante können diese Mutanten aber noch mit Mad1 oder Cdc20 in Wechselwirkung treten (De Antoni et al., 2005; Sironi et al., 2001; Yang et al., 2008). Um zu untersuchen, ob Shugoshine tatsächlich in einer Weise mit

Mad2 wechselwirken, die der von Mad1 und Cdc20 entspricht, wurde ein N-terminales Fragment von X $Sgo1$ (Aminosäuren 1-207) an einer Matrix immobilisiert und mit den oben beschriebenen Versionen von löslichem X $Mad2$ (WT, ΔC , R133A, RQ133/134EA) inkubiert. Nach dem Waschen noch an der Matrix gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt (siehe Abb. 15A). Dabei wurde erkennbar, dass X $Sgo1$ analog zu den für Mad1 und Cdc20 veröffentlichten Daten (Luo et al., 2000; Sironi et al., 2001) selektiv nur mit Mad2 in der geschlossenen Konformation wechselwirkt, nicht aber mit der offenen Konformation von Mad2 (siehe Abb. 15A). Identische Ergebnisse wurden auch in einem Hefe-Zwei-Hybrid erhalten (siehe Abb. 15C).

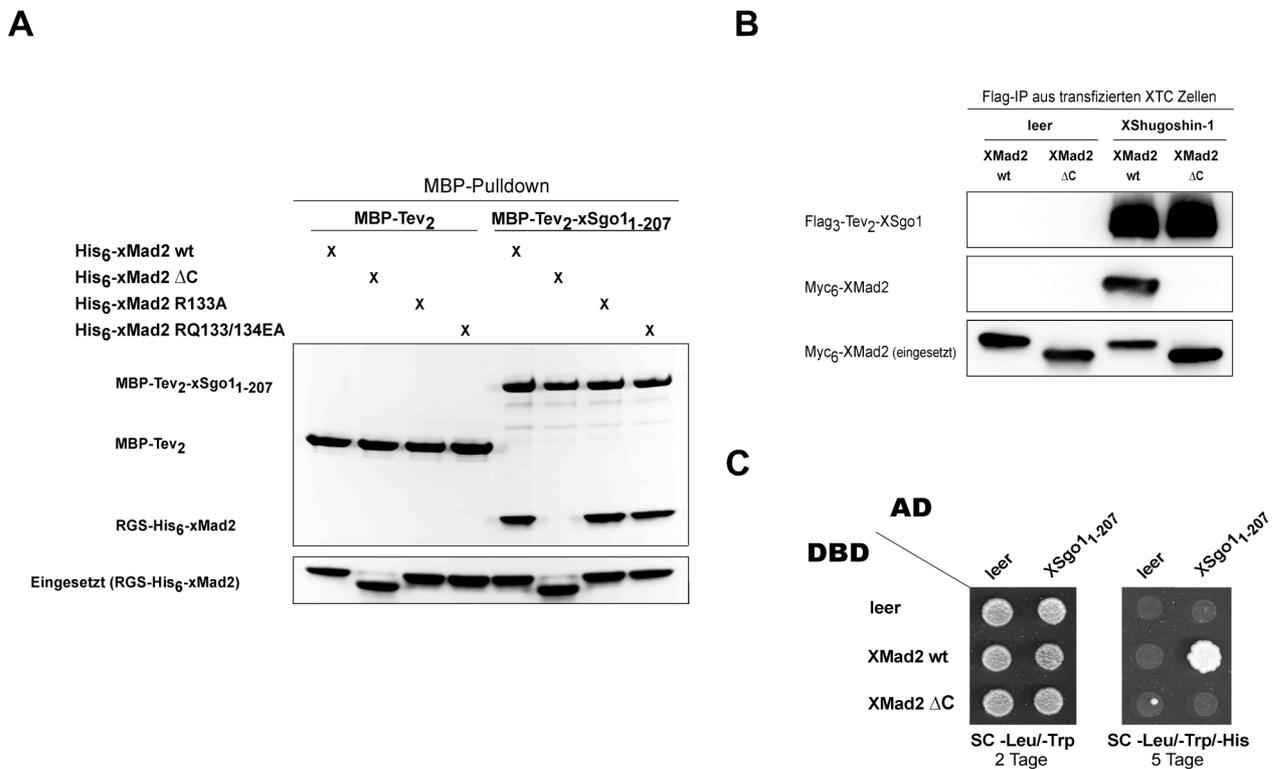


Abbildung 15: X $Sgo1$ wechselwirkt mit der geschlossenen Konformation von Mad2 (C-Mad2), nicht aber mit der offenen (O-Mad2).

(A) Gereinigtes X $Mad2$ -WT, ΔC , -R133A und -RQ133/134EA wurde jeweils mit Amylose-Sepharose, die mit MBP-X $Sgo1$ (Aminosäuren 1-207) oder MBP dekoriert worden war, inkubiert. Die Sepharose wurde mit Lysepuffer gewaschen und gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die untere Abbildung zeigt jeweils 5% der eingesetzten Mad2-Menge. (B) Immunpräzipitation von X $Mad2$ -WT und X $Mad2$ - ΔC an Flag₃-X $Sgo1$ aus transient transfizierten XTC-Zellen. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den transfizierten Plasmiden der unter Abb. 11A beschriebenen identisch. (C) Hefe-Zwei-Hybrid Wechselwirkung zwischen einem N-terminalen Fragment von X $Sgo1$ (Aminosäuren 1-207) und X $Mad2$ -WT bzw. X $Mad2$ - ΔC . Die Vorgehensweise ist abgesehen von den transformierten Plasmiden der unter Abb. 10C beschriebenen identisch.

Diese Selektivität von XSgo1 gegenüber der geschlossenen Konformation von Mad2 wurde auch für Vollängen-XSgo1 untersucht. Dazu wurden Flag-gekoppeltes XSgo1 und XMad2-WT oder XMad2-ΔC transient in XTC-Zellen überexprimiert und die Wechselwirkungen zwischen XSgo1 und XMad2-WT/-ΔC mittels anti-Flag-Immünpräzipitation analysiert (siehe Abb. 15B). Dabei zeigte sich, dass Vollängen-XSgo1 ebenfalls nicht mit XMad2 in der offenen Konformation (XMad2-ΔC) wechselwirkt (siehe Abb. 15B, Spur 4 von links), wohl aber mit wildtypischem Mad2 (XMad2-WT), das ja die Fähigkeit zum Wechsel zwischen offener und geschlossener Konformation besitzt (siehe Abb. 15B, Spur 3 von links).

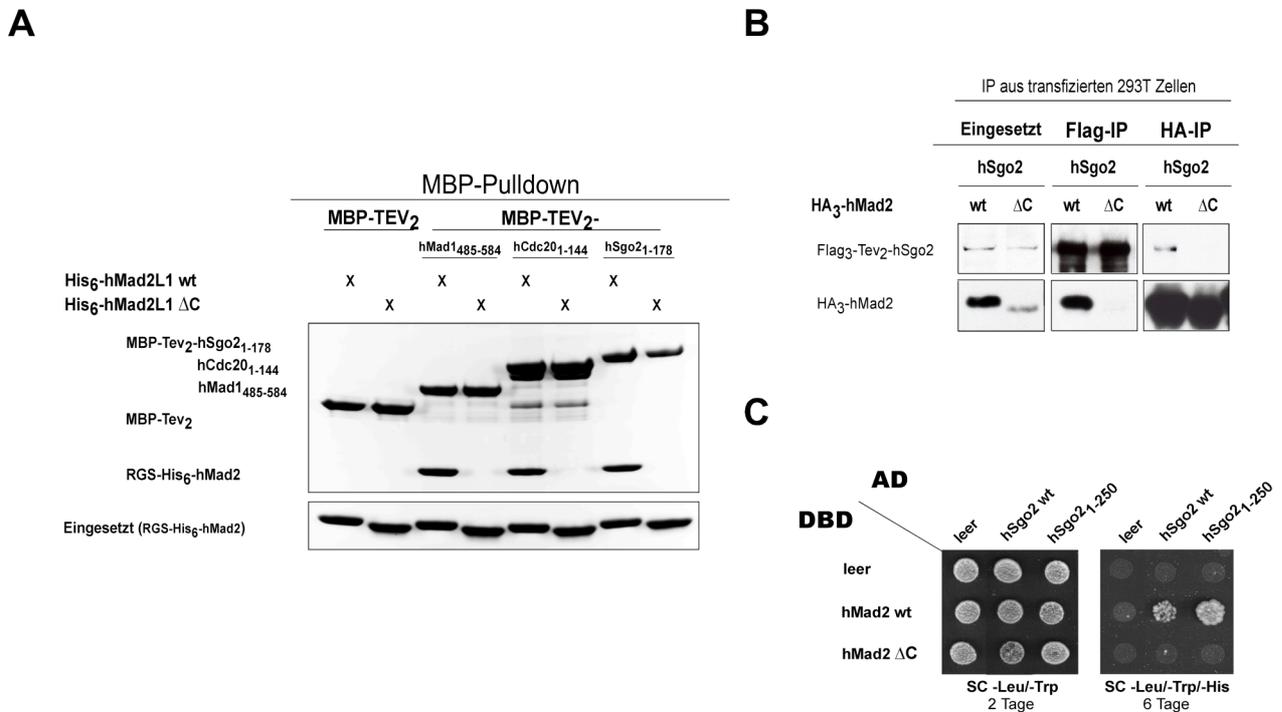


Abbildung 16: Humanes Sgo2 wechselwirkt ebenfalls mit der geschlossenen Konformation von Mad2 (C-Mad2), nicht aber mit der offenen (O-Mad2).

(A) Gereinigtes hMad2-WT, oder hMad2-ΔC wurde jeweils mit Amylose-Sepharose, die mit MBP-hSgo2 (Aminosäuren 1-178), MBP-hMad1 (Aminosäuren 585-584), MBP-hCdc20 (Aminosäuren 1-144) oder MBP dekoriert war, inkubiert. Die Sepharose wurde mit Lysepuffer gewaschen und gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die untere Abbildung zeigt jeweils 5% der eingesetzten Mad2-Menge. (B) Immunpräzipitation von HA₃-hMad2-WT und HA₃-hMad2-ΔC an Flag₃-hSgo2 aus transfizierten, mitotisch arretierten HEK 293T-Zellen. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den transfizierten Plasmiden der unter Abb. 11A beschriebenen identisch. (C) Hefe-Zwei-Hybrid Wechselwirkung zwischen Vollängen-hSgo2 bzw. einem N-terminalen Fragment (Aminosäuren 1-250) von hSgo2 und hMad2-WT oder hMad2-ΔC. Die Vorgehensweise ist abgesehen von den transformierten Plasmiden der unter Abb. 10C beschriebenen identisch.

Aufgrund des verhältnismäßig niedrigen Grades der Konservierung von Shugoshinen auf Aminosäureebene konnten trotz der Identifikation eines Mad1/Cdc20-ähnlichen Mad2-Bindemotivs in hSgo2 die für XSgo1 erhaltenen Daten nicht automatisch auf hSgo2 extrapoliert werden. So unterscheiden sich beispielsweise die Mad2-Bindemotive von XSgo1 und hSgo2 in ihrer Primärstruktur stark voneinander, während die entsprechenden Motive in Mad1 bzw. Cdc20 zwischen *Xenopus laevis* und Mensch weitgehend konserviert sind (siehe Abb. 14A). Daher wurden die im oberen Abschnitt beschriebenen Experimente in analoger Weise auch für hSgo2 durchgeführt. Das entsprechende hSgo2-Fragment (Aminosäuren 1-178) wurde dabei mit Fragmenten von hMad1 und hCdc20 in seiner Fähigkeit verglichen, wildtypisches oder konstitutiv offenes hMad2 (hMad2- Δ C) zu binden. Alle drei Fragmente verhielten sich dabei identisch und interagierten nur mit wildtypischem hMad2, nicht aber mit hMad2- Δ C (siehe Abb. 16A). Die Analyse von Vollängen-hSgo2 ergab ein identisches Bild: Es erfolgte eine wechselseitige Co-Immünpräzipitation von Flag-markiertem hSgo2 und HA-markiertem hMad2 aus transfizierten HEK 293T-Zellen, jedoch wiederum nur, wenn hMad2 vom Wildtyp war und sein C-Terminus nicht deletiert war (siehe Abb. 16B). Diese Ergebnisse konnten auch im Hefe-Zwei-Hybrid System bestätigt werden (siehe Abb. 16C). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass sich XSgo1, hSgo2, Mad1 und Cdc20 gegenüber Mad2 in einer identischen Weise verhalten. So binden alle vier Proteine ausschließlich Mad2 in der geschlossenen Konformation, zeigen jedoch keine Affinität gegenüber konstitutiv offenem Mad2 (Mad2- Δ C).

3.1.6 Shugoshin, Mad1 und Cdc20 konkurrieren um eine gemeinsame Bindestelle an Mad2

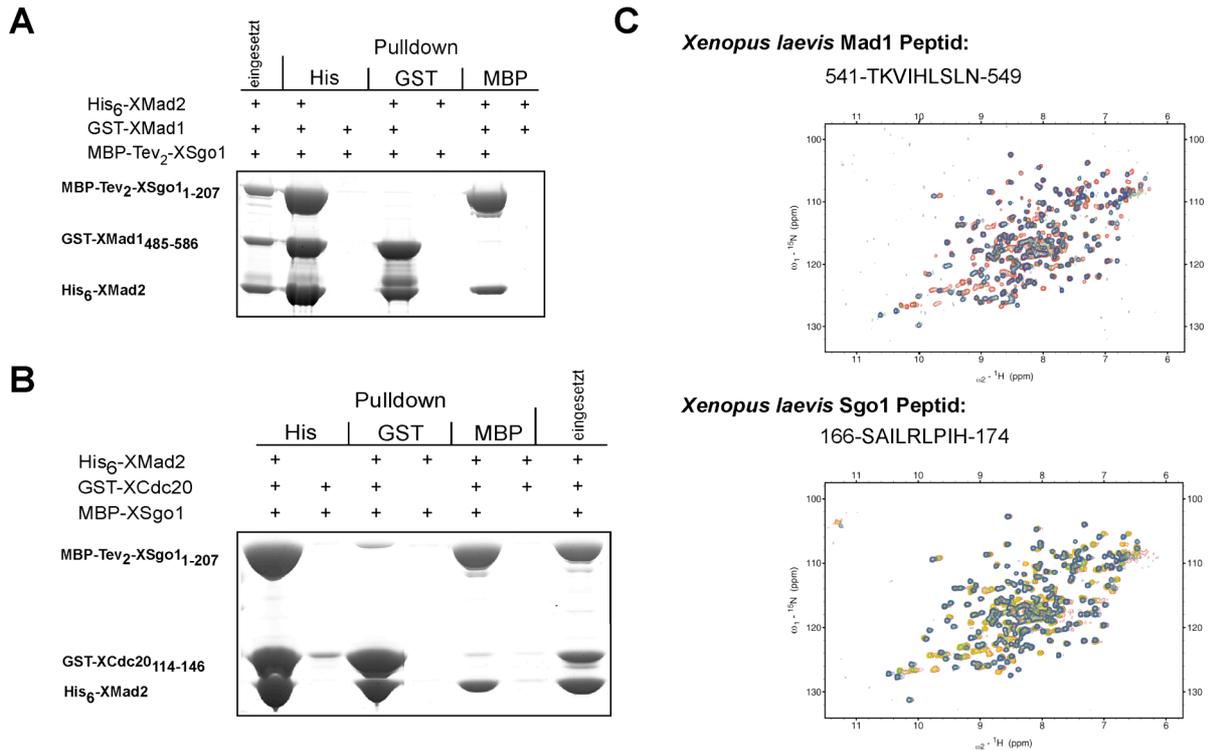
Die oben aufgeführten Daten suggerieren, dass Shugoshine auf identische Weise mit Mad2 in Wechselwirkung treten wie Mad1 und Cdc20, und damit gleichzeitig auch, dass Shugoshin mit den gleichen Strukturelementen von Mad2 interagiert wie Cdc20 und Mad1 (Sironi et al., 2002).

Wenn Shugoshin, Mad1 und Cdc20 tatsächlich auf identische Weise mit Mad2 interagieren, dann sollten diese Proteine nicht gleichzeitig mit Mad2 in Wechselwirkung treten können. Um dies zu untersuchen, wurden Mad2-bindende Fragmente von XSgo1 und XMad1 in Fusion mit N-terminalem MBP oder Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* exprimiert und dann aufgereinigt. Diese Fusionsproteine wurden

anschließend mit rekombinantem His₆-XMad2-WT gemischt. Die Proteine wurden danach unter Ausnutzung der unterschiedlichen Epitope über eine Amylose-, eine Glutathion- oder eine Ni-NTA-Matrix affinitätsgereinigt. Nach dem Waschen wurden gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE getrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt (siehe Abb. 17A). Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die verwendeten Matrices ausschließen zu können, wurde parallel aus Ansätzen präzipitiert, in denen das, der jeweiligen Affinitätsmatrix entsprechend markierte Fusionsprotein nicht vorlag. Die dabei erhaltenen Daten zeigten, dass man über XSgo1 zwar XMad2, nicht aber XMad1 reinigen kann. Umgekehrt war in der gereinigten XMad1-Präparation zwar XMad2, aber kein XSgo1 nachweisbar (siehe Abb. 17A, Spuren 4 und 6 von links). Das gleiche Experiment wurde auch mit einem XCdc20-Fragment (Aminosäuren 114-146) anstelle von XMad1 durchgeführt, wobei das identische Ergebnis erhalten werden konnte (siehe Abb. 17B). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass sich die Wechselwirkungen, die XMad2 mit XMad1, XCdc20 und XSgo1 eingeht, in der Tat gegenseitig ausschließen und damit auch, dass XSgo1 und XMad1 bzw. XCdc20 an identische Stellen innerhalb der Tertiärstruktur von XMad2 binden.

Die Bindung von Mad1 oder Cdc20 an Mad2 induziert jeweils eine charakteristische Änderung in der Konformation von Mad2, die der Konvertierung von offenem Mad2 (O-Mad2) in die geschlossene Form (C-Mad2) entspricht (Luo et al., 2002). Dieser konformationelle Wechsel des Mad2-Holo-Proteins lässt sich mittels 2-dimensionaler NMR-Spektroskopie (HSQC) in Lösung verfolgen (Luo et al., 2002). Entsprechend den bisher erhaltenen Daten müsste die Wechselwirkung von Mad2 mit Shugoshin die gleiche konformationelle Umstellung in Mad2 bewirken, wie dies für Mad1 und Cdc20 beschrieben wurde (Luo et al., 2002). Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden Peptide synthetisiert, die den Mad2-Bindemotiven von XMad1 (541-TKVIHL SLN-549) und XSgo1 (166-SAILRLPIH-174) entsprechen. Zur Untersuchung des konformationellen Wechsels von XMad2 in der Gegenwart dieser Peptide wurde ¹⁵N-markiertes XMad2 bei Titration der oben angeführten Peptide mittels Heteronukleärer Single Quanten Kohärenzspektroskopie (HSQC) untersucht. Dazu wurden die Peptide jeweils in Molaritätsverhältnissen von 2,5:1; 1,25:1; 0,8:1 und 0,2:1 zutitriert und der konformationelle Wechsel von XMad2 über die Zeit verfolgt. Die dabei erhaltenen Spektren zeigen, dass XMad2 bei der Titration des XSgo1-Peptids eine identische

konformationelle Umstellung eingeht wie bei der Titration des XMad1-Peptids (siehe Abb. 17C; Rothweiler et al., 2008). Gemeinsam mit den vorangehenden Daten zeigt dies, dass XSgo1 an identische Bereiche innerhalb der Tertiärstruktur von XMad2 bindet wie XMad1 und damit gleichzeitig auch, dass Shugoshin einen neuen Mad1/Cdc20-ähnlichen Bindepartner von Mad2 in Vertebraten darstellt.



Durchführung durch Ulli Rothweiler, Kinga Brongel, Lutz Weber und Prof. Dr. Tadeus A. Holak (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried)

Abbildung 17: Shugoshin, Mad1 und Cdc20 konkurrieren um eine identische Bindestelle an Mad2.

(A) Gereinigtes MBP-XSgo1 (Aminosäuren 1-207), GST-XMad1 (Aminosäuren 485-586) und His₆-XMad2-WT wurden gemischt und über Ni-NTA-Agarose, Glutathion-Sepharose oder Amylose-Sepharose affinitätsgereinigt. Die Matrizes wurden mit Lysepuffer gewaschen und gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt. (B) Identische Vorgehensweise wie unter (A) beschrieben, abgesehen von der Verwendung eines GST-XCdc20-Fragments (Aminosäuren 114-146) anstelle von XMad1. (C) Heteronukleäre *Single* Quanten Kohärenzspektroskopie (HSQC) von gereinigtem XMad2 in der Gegenwart von Peptiden, die den Mad2-Bindemotiven von XMad1 oder XSgo1 entsprechen. XMad2 wurde bakteriell in Minimalnährmedium mit ¹⁵N-Ammoniumchlorid exprimiert und dann gereinigt. Zur Durchführung der HSQC-Spektroskopie wurden jeweils 0,2 μM ¹⁵N-XMad2 in PBS (10% D₂O) aufgenommen und XMad1-Peptid oder XSgo1-Peptid in vier Stufen zugegeben; es wurden Molaritätsverhältnisse (XMad2 : XMad1/ XSgo1) von 2,5 : 1 / 1,25 : 1 / 0,8 : 1 und 0,2 : 1 eingestellt. Oben: HSQC-Spektrum von XMad2 in Gegenwart von XMad1. Rote Signale entsprechen ungebundenem XMad2, grüne Signale entsprechen einem Molaritätsverhältnis (XMad2 : XMad1) von 1,25:1, blaue Signale entsprechen dem Spektrum von gesättigtem XMad2. Unten: HSQC-Spektrum für XMad2 in Gegenwart von XSgo1. Rote Signale entsprechen ungebundenem XMad2, gelbe Signale

entsprechen einem XMad2 : XSgo1-Verhältnis von 2,5:1, grüne Signale entsprechen einem XMad2 : XSgo1-Verhältnis von 1,25:1 und blaue Signale entsprechen dem Spektrum von gesättigtem Mad2. Die Durchführung der NMR-Messung erfolgte durch Ulli Rothweiler, Kinga Brongel und Prof. Dr. Tadeus Holak (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried).

3.1.7 Ein Komplex bestehend aus Shugoshin und Mad2 kann analog dem Mad1-Mad2-Komplex offenes Mad2 rekrutieren

Für Mad1 und Cdc20 ist neben der spezifischen Bindung an C-Mad2 (Luo et al., 2000, 2002; Sironi et al., 2001) auch beschrieben, dass sie nach Bindung von geschlossenem Mad2 (C-Mad2) offenes Mad2 (O-Mad2) transient binden können (De Antoni et al., 2005; Mapelli et al., 2006; Yang et al., 2008). Diese Bindung beruht auf einer transienten Wechselwirkung, die offenes Mad2 mit geschlossenem Mad2 eingehen kann und die gleichzeitig die konformationelle Umwandlung des offenen Mad2-Moleküls hin zu der geschlossenen Konformation induziert (De Antoni et al., 2005; Mapelli et al., 2007). Ein entsprechender, kurzlebiger Komplex bestehend aus Mad1 bzw. Cdc20, einem C-Mad2 Molekül und einem O-Mad2 Molekül lässt sich *in vitro* rekonstituieren (Mapelli et al., 2006, 2007; Yang et al., 2008). Es stellte sich daher die Frage, ob die Assemblierung eines solchen Komplexes auch bei der Verwendung von Shugoshin anstelle von Mad1 bzw. Cdc20 möglich ist. Um dies zu untersuchen, wurde ein MBP-markiertes XSgo1-Fragment (Aminosäuren 1-207) an einer Amylosematrix immobilisiert und in einer ersten Runde mit verschiedenen Versionen von XMad2 (WT, Δ C, R133A, RQ133/134EA) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Matrix wurde in einer zweiten Runde mit XMad2- Δ C inkubiert, welches konstitutiv in der offenen Konformation vorliegt (Luo et al., 2004). Schließlich wurde die XMad2-Bindung an die XSgo1-Matrix durch denaturierende Elution, SDS-PAGE und kolloidale Coomassie-Färbung analysiert (siehe Abb. 18). Dabei wurde deutlich, dass nur ein präassemblierter Komplex bestehend aus wildtypischem XMad2 und XSgo1 die Fähigkeit hat, offenes XMad2 zu binden (siehe Abb. 18, Spur 7 von links). Offenes Mad2 alleine kann dagegen nicht mit der XSgo1-Säule interagieren (Spur 6 von links). Ebenso konnte kein heterotrimerer Komplex aus XSgo1, C-XMad2 und O-XMad2 etabliert werden, wenn anstelle von wildtypischem XMad2 die Punktmutanten R133A oder RQ133/134EA verwendet wurden (Spuren 9 und 10 von links). Dies stimmt mit den in der Literatur veröffentlichten Daten überein, da für diese Mutanten gezeigt wurde, dass sie die Fähigkeit zur homotypischen Wechselwirkung verloren haben (De Antoni et al., 2005; Mapelli et al., 2007; Yang et al., 2008). Zusammen-

gefasst belegen diese Daten, dass ein dimerer Komplex bestehend aus Shugoshin und wildtypischem Mad2 analog dem Mad1-Mad2-Komplex offenes Mad2 rekrutieren kann.

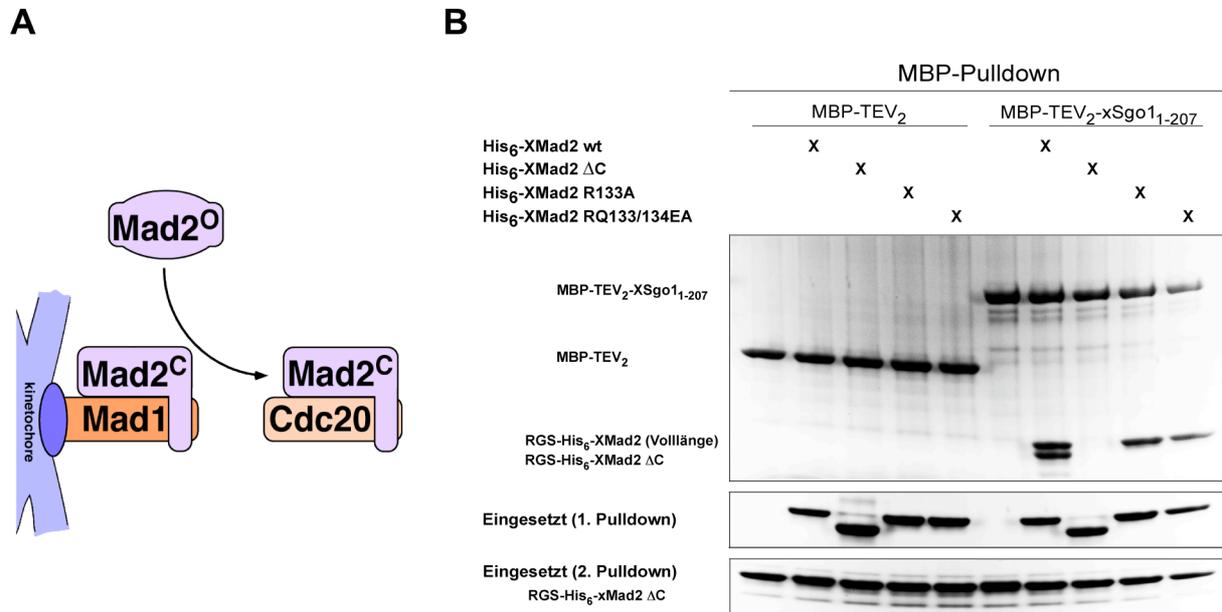


Abbildung 18: Der dimere Shugoshin-Mad2-Komplex kann offenes Mad2 (O-Mad2) im Sinne des Matrizenmodells rekrutieren.

(A) Schematische Darstellung der transienten Wechselwirkung von offenem Mad2 (O-Mad2) mit Mad1-gebundenem, geschlossenem Mad2 (C-Mad2). Ein Kinetochor-lokalisierter Mad1-Mad2-Komplex rekrutiert durch transiente Mad2-Mad2-Wechselwirkung zytosolisches Mad2 (O-Mad2) und vermittelt gleichzeitig dessen strukturelle Überführung in die geschlossene Konformation (C-Mad2). (B) Aufgereinigtes XMad2-WT, XMad2-ΔC, XMad2-R133A oder XMad2-RQ133/134EA wurde an Amylose-Sepharose, die mit MBP-XSgo1 (Aminosäuren 1-207) oder MBP dekoriert war, affinitätsgereinigt. Nach dem Waschen wurde diese Matrix in einer zweiten Affinitätsreinigung mit XMad2-ΔC inkubiert. Anschließend wurde die Matrix gewaschen, gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert und mittels kolloidaler Coomassie Färbung detektiert. Die beiden unteren Abbildungen zeigen jeweils 5% der eingesetzten Menge an XMad2.

3.1.8 Die Wechselwirkung von hSgo2 mit Mad2 entspricht biochemisch der Wechselwirkung zwischen hCdc20 und Mad2

Obwohl Mad1 und Cdc20 in nahezu identischer Weise mit Mad2 in Wechselwirkung treten, wurde in einer 2003 veröffentlichten Studie ein in einer Hinsicht unterschiedliches Verhalten von Mad1 und Cdc20 gegenüber Mad2 nachgewiesen (Wassmann et al., 2003). Diese Unterscheidung beruht auf den unterschiedlichen Affinitäten von Mad1 und Cdc20 gegenüber der Mad2-Mutante S195D, die eine Phosphorylierung im Bereich des C-terminalen Sicherheitsgurts von Mad2 simuliert. Während Mad1

eine entsprechende Mutante von Mad2 mit nahezu gleicher Affinität wie den Wildtyp bindet, interferiert diese Punktmutation mit der Wechselwirkung, die Cdc20 mit Mad2 eingeht (Dr. Katja Wassmann, persönliche Mitteilung). Um die Affinität von hSgo2 gegenüber dieser Mutante von hMad2 zu untersuchen (siehe Abb. 19), wurde MBP-hSgo2 (Aminosäuren 1-178) sowie Fragmente von hCdc20 (Aminosäuren 1-144) und hMad1 (Aminosäuren 485-584) an Amylosematrizes gereinigt. Gleichzeitig wurden wildtypisches hMad2 und hMad2-ΔC sowie mehrere Phosphorylierungsmutanten von hMad2 (siehe Legende von Abb. 19) gereinigt. Durch Affinitätsreinigung wurden die Fragmente von hMad1, hCdc20 und hSgo2 auf ihre relativen Affinitäten gegenüber hMad2-WT/-ΔC sowie gegenüber den Phosphorylierungsmutanten von hMad2 untersucht (siehe Abb. 19). Als Negativkontrolle wurde MBP verwendet.

A

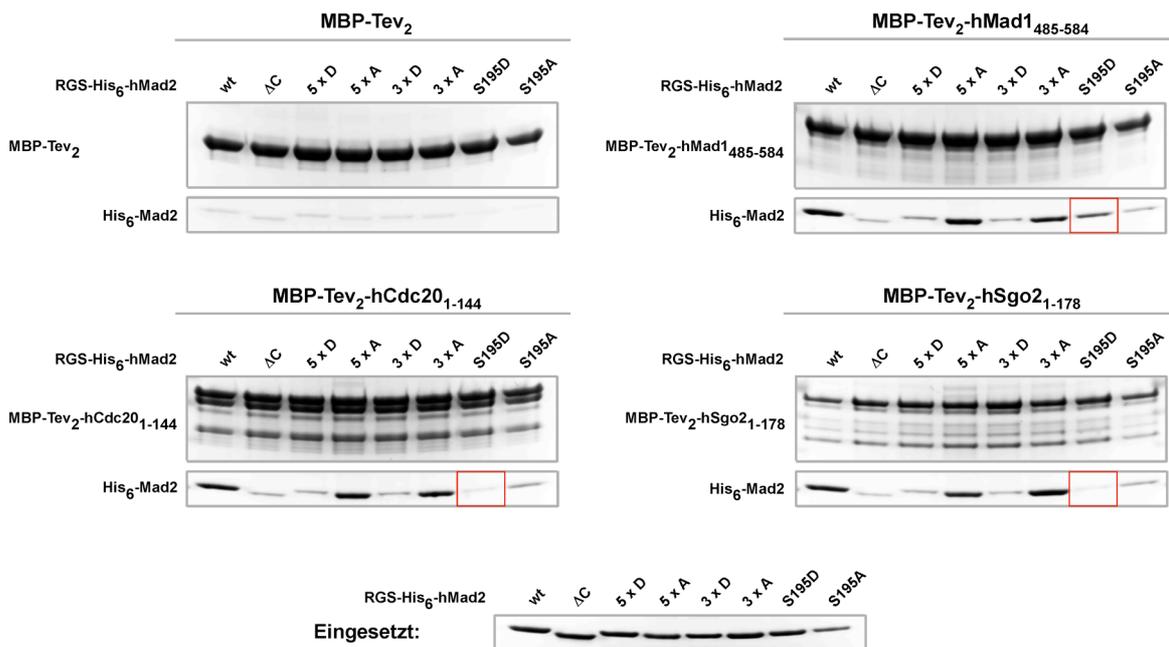


Abbildung 19: Die Shugoshin-Mad2-Wechselwirkung entspricht biochemisch der Cdc20-Mad2-Wechselwirkung.

(A) Folgende Versionen von hMad2 wurden an einer Amylose-Matrix, die mit MBP-hSgo2 (Aminosäuren 1-178), MBP-hMad1 (Aminosäuren 485-584), MBP-hCdc20 (Aminosäuren 1-144) oder MBP dekoriert war, affinitätsgereinigt: hMad2-WT, hMad2-ΔC, hMad2-T109D/S114D/S170D/S178D/S195D (5 x D), hMad2-T109A/S114A/S170A/S178A/S195A (5 x A), hMad2-S170D/S178D/S195D (3 x D), hMad2-S170A/S178A/S195A (3 x A), hMad2-S195D sowie hMad2-S195A. Die Affinitätssäule wurde mit Lysepuffer gewaschen, gebundene Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Die untere Abbildung zeigt jeweils 2,5% der eingesetzten Menge an hMad2.

Dabei zeigte sich, dass hMad1, hCdc20 und hSgo2 gleichermaßen mit wildtypischem hMad2 wechselwirken, wie auch mit Mutanten von hMad2, in denen die Phosphorylierungsstellen gegen Alanine ausgetauscht sind (siehe Abb. 19, Spuren 1, 4, 6 von links). Im Gegensatz dazu bindet keines dieser Proteine an hMad2-Mutanten, in denen mindestens drei Phosphorylierungsstellen zu Aspartaten mutiert worden sind (siehe jeweils Spuren 3 und 5 von links). Nur gegenüber der Mutante S195D war ein unterschiedliches Verhalten zu beobachten. Während hMad1 diese hMad2-Variante noch relativ gut bindet, sind hCdc20 und hSgo2 dazu nicht in der Lage (siehe jeweils Spur 7 von links, rote Markierung). In dieser Hinsicht ähnelt hSgo2 also eher dem nachgeschalteten Zielsubstrat des SAC (Cdc20) als der übergeordneten Quelle für ein aktives Wartesignal (Mad1).

3.2 Untersuchung der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung auf Funktionen innerhalb der Mitose von Säugern

In der Literatur werden hSgo2 gleichermaßen Funktionen in der Beschützung von zentromerischem Kohäsion während der Mitose als auch in der Detektion nicht-amphitelischer Spindel-Kinetochor-Wechselwirkungen zugeschrieben (Huang et al., 2007; Kitajima et al., 2006). Letztere Funktion nimmt hSgo2 angeblich durch die Rekrutierung des mitotisch Zentromer-assoziierten Kinesins (MCAK) an Zentromere wahr (Huang et al., 2007). Für dieses Kinesin wurde in *Xenopus laevis* eine wichtige Funktion bei der Korrektur fehlerhafter, d.h. nicht amphitelischer Wechselwirkungen beschrieben. Da MCAK eine Mikrotubuli- (MT-) Depolymerase (ein Katastrophen) darstellt, nimmt man an, dass es fehlerhaft mit Kinetochoren interagierende Mikrotubuli destabilisiert (Desai et al., 1999; Kline-Smith et al., 2004; Lan et al., 2004; Walczak et al., 2002). Dies, so wird angenommen, bewirkt zum einen die Aktivierung des SAC. Zum anderen ermöglicht es den entsprechenden Kinetochoren von neuem mit den Spindelfasern in Wechselwirkung zu treten. Dieser Mechanismus wird als „*Search and Capture*“ bezeichnet (Pinsky et al., 2006; Tanaka et al., 2002). Dieser Vorgang wiederholt sich grundsätzlich solange, bis alle Chromosomen einer Zelle in der Form mit der Spindel verbunden sind, dass Zugspannung entlang der Kinetochorenachse entsteht. Da Sgo2 in Säugern für die Lokalisierung von MCAK essentiell ist, wurde dementsprechend auch eine Funktion von Sgo2 in der Korrektur nicht-amphitelischer MT-Kinetochor-Anbindungen beschrieben (Huang et al., 2007).

3.2.1 Die Lokalisation von humanem Sgo2 während der Mitose

Zu Beginn der Untersuchung potenzieller mitotischer Funktionen von hSgo2 wurde die Lokalisation von hSgo2 in der Mitose analysiert. Dazu wurden wildtypische HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und für 48 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann in asynchronem Zustand fixiert und mit Antikörpern gegen hSgo2 sowie gegen das am äußeren Kinetochor lokalisierte Protein hHec1 (Chen et al., 1997), das im weiteren Verlauf dieser Arbeit generell zur Darstellung von Kinetochoren verwendet wurde, immunfluoreszenzgefärbt. Die Anfärbung der DNA erfolgte mittels Hoechst 33342 (2,0 µg/ml). Die Zellen wurden anschließend mikroskopisch untersucht, wobei die Lokalisation von hSgo2 in den verschiedenen Stadien der Mitose analysiert wurde (siehe Abb. 20A). Dabei wurde erkennbar, dass hSgo2 in Prophase erstmals im Bereich der Kinetochore/Zentromere lokalisiert und dass diese Lokalisation bis zum Übergang von der Metaphase nach Anaphase persistiert. Nach dem Eintritt in Anaphase A lokalisiert hSgo2 im Vergleich mit hHec1 an der Innenseite, d.h. an der von den Spindelpolen abgewandten Seite von Kinetochoren und migriert mit den segregierenden DNA-Massen in Richtung der Spindelpole. Etwa mit dem Eintritt in Anaphase B wird hSgo2 dann von den Kinetochoren freigesetzt und delokalisiert, ehe es im weiteren Verlauf der Anaphase B schließlich zur Degradation von hSgo2 kommt (siehe Abb. 20A).

3.2.1.1 Humanes Sgo2 relokalisiert zweifach während der Mitose

Während der Untersuchung der Lokalisation von hSgo2 innerhalb der mitotischen Teilung wurde bei genauerer Betrachtung deutlich, dass hSgo2 im Verlauf der Mitose zweimal zwischen Kinetochor und Zentromer relokalisiert (siehe Abb. 20B und C). So wurde entdeckt, dass hSgo2 während der frühen Prophase zunächst an den Kinetochoren lokalisiert, wie aufgrund der Co-Lokalisation von hSgo2 mit hHec1 in dieser Phase der Mitose zu erkennen ist (siehe Abb. 20B, oben). Erst in späteren Stadien der Prophase lokalisiert hSgo2 dann zwischen hHec1, was gleichbedeutend mit einer Lokalisation zwischen den Kinetochoren, und damit im Bereich des Zentromers ist (siehe Abb. 20B, unten). Während des Übergangs von der Metaphase zur Anaphase relokalisiert hSgo2 dann in umgekehrter Richtung vom Zentromer hin zu den Kinetochoren (siehe Abb. 20C, oben und Mitte). So konnte beobachtet werden, dass sich das in Prometaphase einheitliche hSgo2-Signal (siehe Abb. 20C, oben) während der

Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte auf zwei Einzelsignale aufteilt (siehe Abb. 20C, Mitte), die in Anaphase dann wieder an den Kinetochoren lokalisieren (siehe Abb. 20C, unten). Eine entsprechende Relokalisation von Sgo2 aus dem Bereich des inneren Zentromers hin zu den Kinetochoren in der Metaphase von Mitose sowie in Metaphase II von Meiose wurde für Sgo2 in Mäusen beschrieben (Gomez et al., 2007).

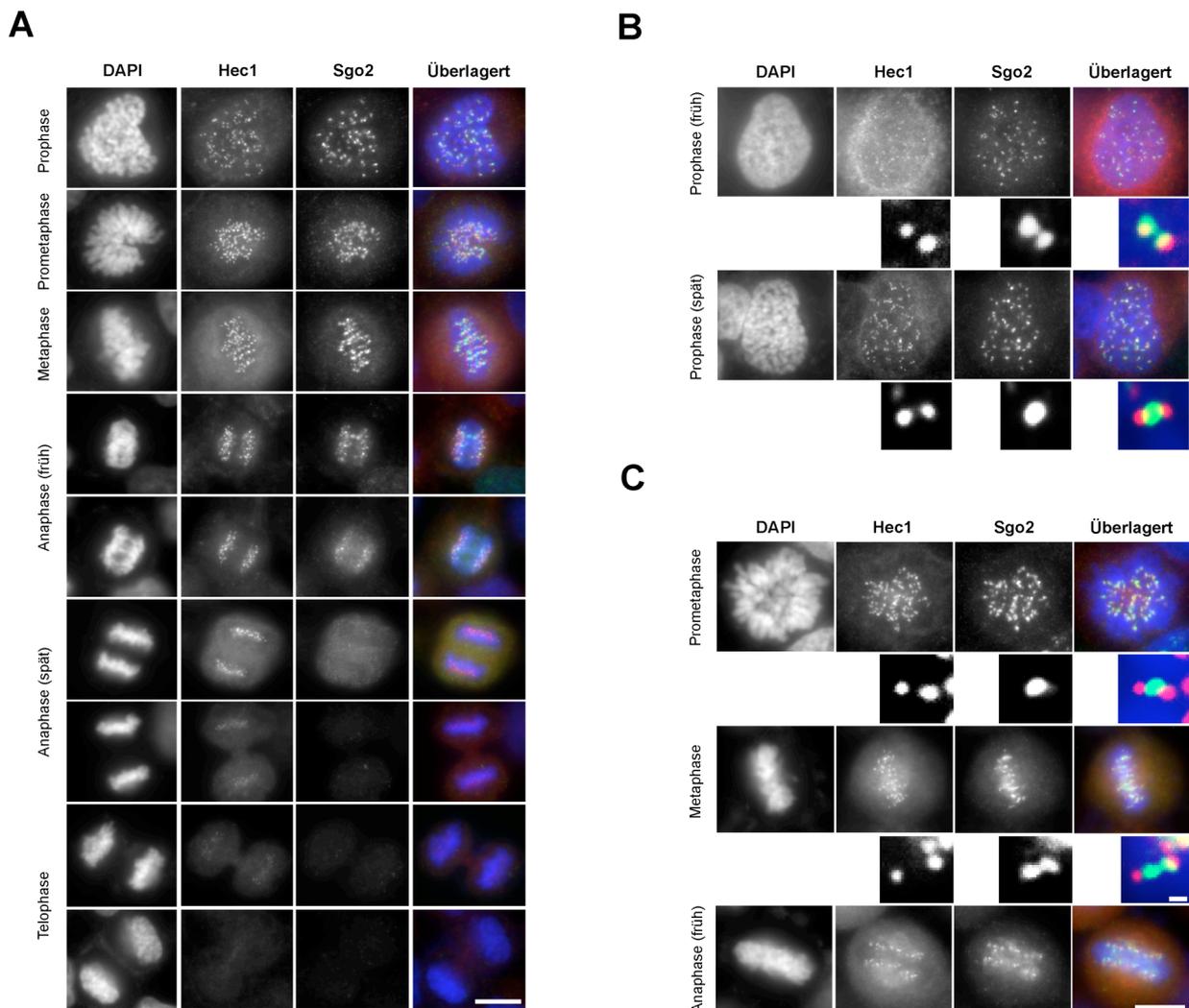


Abbildung 20: Lokalisation von humanem Sgo2 während der Mitose.

(A) Asynchrone HeLa WT-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert, fixiert, mit Antikörpern gegen hHec1 und hSgo2 sowie mittels Hoechst 33342 (2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. Gezeigt sind Bilder von Zellen in unterschiedlichen Stadien der Mitose. Der eingezeichnete Größenmaßstab entspricht 10 μm . (B) Lokalisation von hSgo2 in der frühen und in der späten Prophase. Die Vorgehensweise ist der unter (A) beschriebenen identisch. Gezeigt ist je eine Zelle in der frühen (oben) und in der späten Prophase (unten). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen jeweils die Kinetochor/Zentromer-Region eines einzelnen Chromosoms und heben Veränderungen in der Feinlokalisierung von hSgo2 hervor. (C) Lokalisation von hSgo2 während des Metaphase-Anaphase-Überganges. Die Vorgehens-

weise ist der unter (A) beschriebenen identisch. Gezeigt ist je eine Zelle in Prometaphase (oben), in Metaphase (Mitte) und in der frühen Anaphase (unten). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen jeweils die Kinetochor/Zentromer-Region eines einzelnen Chromosoms. Die eingezeichneten Maßstäbe entsprechen 10 μm bzw. 0,5 μm in den Ausschnitten.

3.2.2 Die Lokalisation von hSgo2 am zentralen Zentromer benötigt Mad2

Die Identifikation einer direkten, Mad1/Cdc20-ähnlichen Wechselwirkung von hSgo2 mit hMad2 legt eine möglicherweise neue Funktion von hSgo2 oder des SAC innerhalb der Mitose nahe. Um diese aufzuklären, wurde als erstes die gegenseitige Abhängigkeit beider Faktoren bezüglich ihrer Lokalisation während der Mitose untersucht. Einen Hinweis auf eine Abhängigkeit der Lokalisation von Shugoshinen von Faktoren des mitotischen SAC liefern u.a. veröffentlichte Daten, die in verschiedenen Modellorganismen übereinstimmend zeigen, dass der SAC-Kinase Bub1 (Williams et al., 2007) eine essentielle Funktion innerhalb der Rekrutierung von Shugoshinen an Zentromere zukommt (Kitajima et al., 2004, 2005; Tang et al., 2004). Nachdem diese Bub1-Abhängigkeit der zentromerischen Lokalisation auch für hSgo2 gezeigt werden konnte (Huang et al., 2007), bestand daher die Möglichkeit, dass auch hMad2, und damit der SAC per se, für die zentromerische Lokalisation von hSgo2 benötigt wird.

3.2.2.1 Die grundsätzlichen Lokalisationen von hSgo2 und hMad2 während der Mitose sind unabhängig voneinander

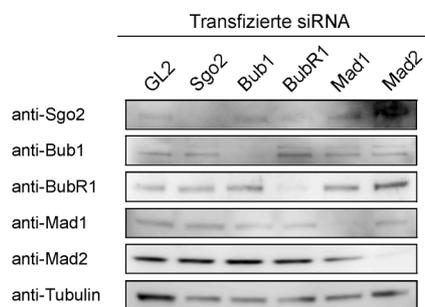
Um die Abhängigkeit der Lokalisation von hSgo2 während der Mitose von Faktoren des SAC im Allgemeinen und von hMad2 im Besonderen zu untersuchen, wurden in HeLa-Zellen die wichtigsten Faktoren des mitotischen SAC (Bub1, BubR1, Mad1, Mad2) mittels RNA Interferenz depletiert (siehe Abb. 21A) und die Auswirkungen auf die Lokalisation von hSgo2 während Prometaphase analysiert (siehe Abb. 21B und C). Dabei wurde erkennbar, dass innerhalb der depletierten SAC-Faktoren nur die Depletion von hBub1 zu einer offensichtlichen Störung in der Lokalisation von hSgo2 führt, während für die anderen SAC-Faktoren keine offensichtliche Delokalisation von hSgo2 nachzuweisen war (siehe Abb. 21B und C). Dennoch konnten in Mad1- und in Mad2-freien Zellen verbreiterte hSgo2-Signale im Bereich der Kinetochore bzw. der Zentromere beobachtet werden, auf die in den folgenden Abschnitten detailliert eingegangen wird (siehe u.a. Abb. 22 und 26).

In einem reziproken Ansatz wurde gleichzeitig ein möglicher Effekt der Depletion von hSgo2 auf die mitotische Lokalisation von hMad2 an Kinetochoren untersucht. Dafür

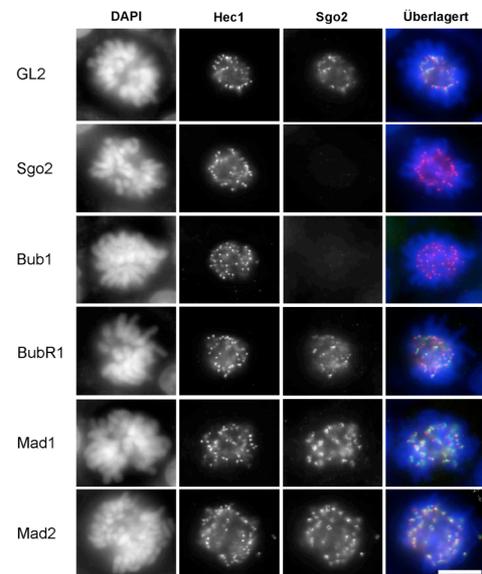
Ergebnisse

wurde hSgo2, oder alternativ die oben angeführten Faktoren des SAC, mittels RNAi in HeLa-Zellen depletiert und die Lokalisation von hMad2 in den entsprechenden Zellen analysiert (siehe Abb. 21D und E). Dabei konnten keine Defekte in der Lokalisation von hMad2 in hSgo2-depletierten Prometaphase-Zellen beobachtet werden, während die Depletion von Bub1 oder Mad1 in Übereinstimmung mit in der Literatur veröffentlichten Daten (Chen et al., 1998; Sharp-Baker und Chen, 2001; Vigneron et al., 2004) die Kinetochor-Lokalisation von hMad2 während der Prometaphase nahezu vollständig verhindert (siehe Abb. 21D, E).

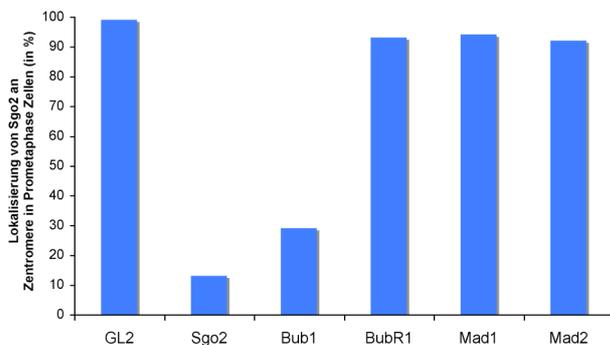
A



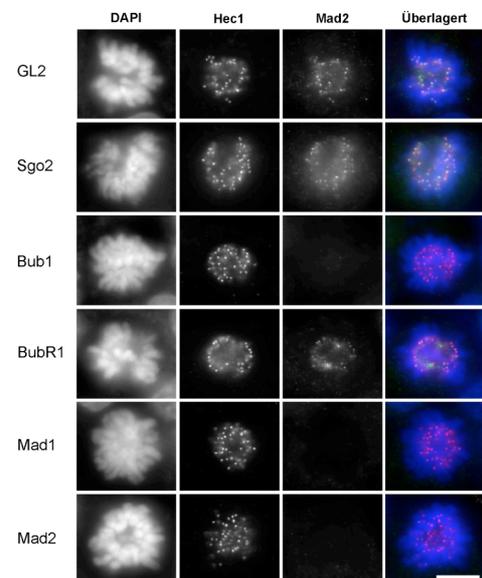
B



C



D



E

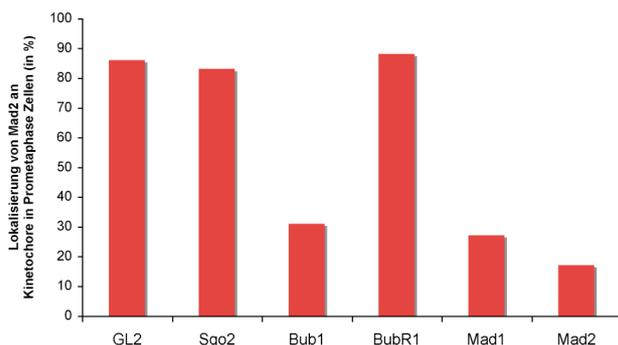


Abbildung 21: Bei niedriger Auflösung betrachtet lokalisieren hSgo2 und hMad2 unabhängig voneinander an Kinetochore/Zentromere.

(A) Western Blot zur Kontrolle der Depletion von hSgo2, hBub1, hBubR1, hMad1 und hMad2 in HeLa-Zellen. Von den transfizierten Zellen wurden Aliquots entnommen, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Western Blot gegen hSgo2, hBub1, hBubR1, hMad1, hMad2 und α -Tubulin analysiert. (B) Lokalisation von endogenem hSgo2 in verschiedenen RNAi-Hintergründen. Asynchrone HeLa-Zellen wurden mit GL2-/hSgo2-/hBub1-/hBubR1-/hMad1- oder hMad2-spezifischen siRNAs transfiziert. 48 h später wurden die Zellen fixiert, mit Antikörpern gegen hHec1 und hSgo2 sowie mit Hoechst 33342 fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. (C) Quantifizierung der Lokalisation von hSgo2 in den unter (B) beschriebenen RNAi Hintergründen. Aufgetragen ist jeweils die zentromerische Lokalisation von hSgo2 (in Prozent) gegen die jeweilige RNAi. Gezählt wurden jeweils 100 prometaphasische Zellen. (D) Lokalisation von endogenem hMad2 in verschiedenen RNAi-Hintergründen. Die Vorgehensweise entspricht abgesehen von der Verwendung eines hMad2-Antikörpers zur Fluoreszenzfärbung der unter (B) beschriebenen. (E) Quantifizierung der Lokalisation von hMad2 in den unter (B) beschriebenen RNAi Hintergründen. Aufgetragen ist die Lokalisation von hMad2 am Kinetochor (in Prozent) gegen die jeweilige RNAi. Gezählt wurden jeweils 100 prometaphasische Zellen. Die eingezeichneten Größenmaßstäbe entsprechen 10 μm .

Humanes Sgo2 hat demzufolge also keinen Einfluss auf die Lokalisation von hMad2 besitzt, während hMad1 und hMad2 die Feinlokalisierung von hSgo2 im Bereich von Kinetochoren/Zentromeren beeinflussen (siehe unten).

3.2.2.2 Mad2-bindedefizientes hSgo2 lokalisiert an Randbereiche des Zentromers

Während der biochemischen Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen hSgo2 und hMad2 wurden Mutanten von hSgo2 erzeugt, deren Affinität gegenüber hMad2 reduziert ist (siehe Abb. 14). Diese Mutanten wurden auf ihre jeweilige Lokalisation in mitotisch arretierten HeLa-Zellen untersucht (siehe Abb. 22). Dazu wurde endogenes hSgo2 mittels RNAi depletiert und durch eine Myc₆-gekoppelte Variante ersetzt, die von einem siRNA-resistenten Expressionsplasmid exprimiert wurde. Die dabei untersuchten hSgo2-Allele entsprachen neben dem Wildtyp einer PP2A-bindedefizienten Punktmutante (N58I; Bernd Mayer und Olaf Stemmann, unveröffentlichte Daten) sowie einer Punktmutante, deren Affinität gegenüber hMad2 reduziert ist (R153A, siehe Abb. 14D). Nach der Arretierung der Zellen in Mitose durch Nocodazol wurden diese mechanisch von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst, auf Deckgläser zentrifugiert und mit Antikörpern gegen hHec1 und Myc-Epitop fluoreszenzgefärbt. Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation konnte für alle drei rekombinanten hSgo2-Allele eine Assoziation mit dem Zentromer nachgewiesen werden (siehe Abb. 22B). Diese Signale kamen nicht durch Reste von endogenem hSgo2 zustande, da

sie in siRNA-behandelten Zellen, die mit einem leeren Expressionsvektor transfiziert worden waren, vollständig fehlten (siehe Abb. 22B, oben).

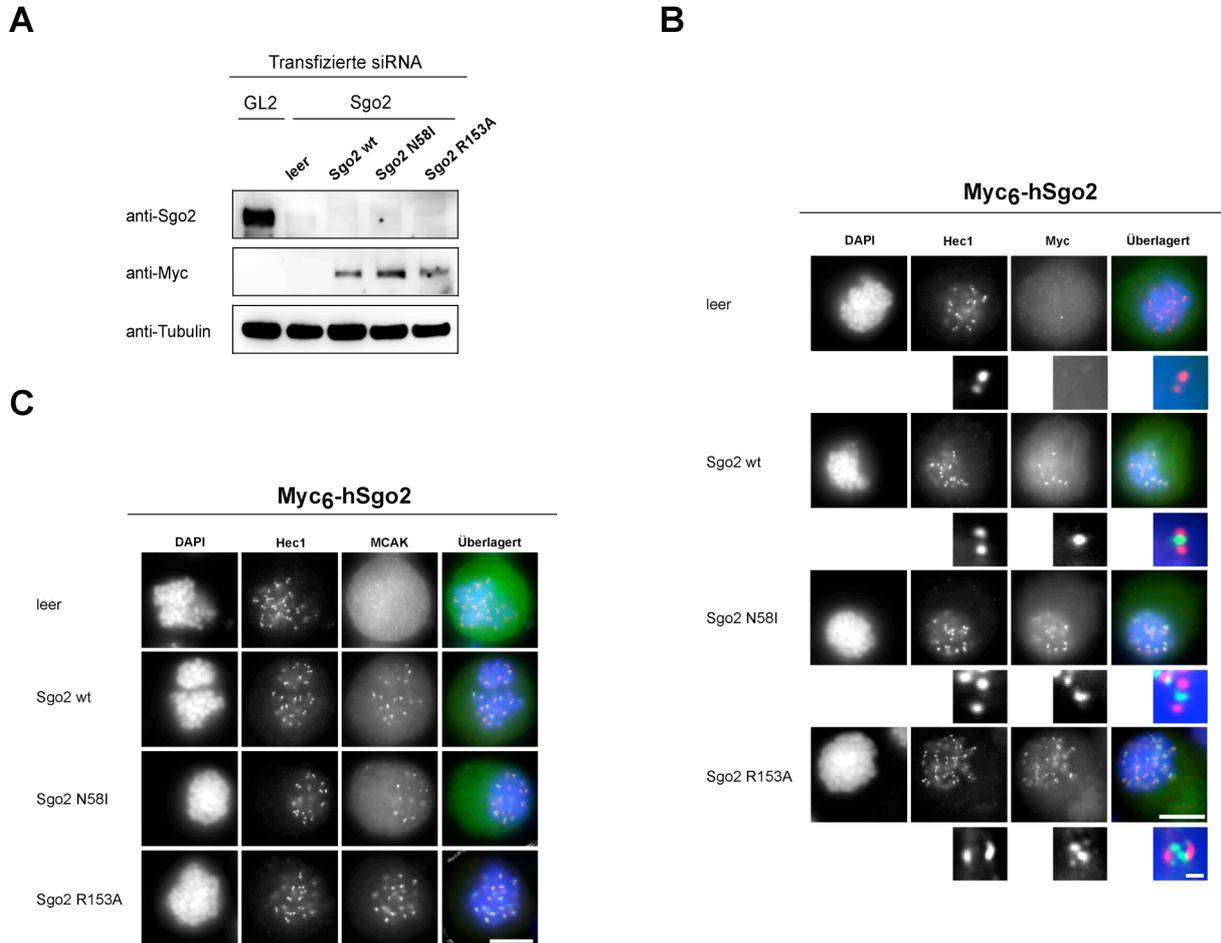


Abbildung 22: Eine Mad2-bindedefiziente Mutante von Sgo2 zeigt eine Fehllokalisation an zentromerische Randbereiche.

(A) Western Blot zur Kontrolle der Depletion von endogenem hSgo2 sowie der Expression der untersuchten Versionen von hSgo2 (WT, N58I, R153A) in HeLa-Zellen. Von den transfizierten Zellen wurden Aliquots entnommen, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Western Blot gegen hSgo2, Myc-Epitop sowie gegen α -Tubulin analysiert. (B) Lokalisation von rekombinantem hSgo2-WT, hSgo2-N58I und hSgo2-R153A im hSgo2-freien Hintergrund. Wildtypische HeLa-Zellen wurden mit GL2- oder hSgo2-spezifischen siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden dann mit Plasmiden, die für siRNA-resistente, Myc₆-gekoppelte Versionen von hSgo2-WT, -N58I oder -R153A kodieren, transfiziert. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Nocodazol für 12 h in Mitose arretiert, mechanisch von der Zellkulturschale abgelöst, auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser zentrifugiert und fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen hHec1 und Myc-Epitop sowie mittels Hoechst 33342 fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. Gezeigt sind Bilder von Zellen, die den leeren Expressionsvektor (oben), hSgo2-WT, hSgo2-N58I oder hSgo2-R153A (unten) exprimieren. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen jeweils die Kinetochor/Zentromer-Region eines einzelnen Chromosoms und heben Unterschiede in der innerzentromerischen Lokalisation von hSgo2 hervor. Die eingezeichneten Maßstäbe entsprechen 10 μ m bzw. 0,5 μ m für die vergrößerten Ausschnitte. (C) Lokalisation von MCAK in Abwesenheit von hSgo2. Die Vorgehensweise ist abgesehen von der Verwendung

eines hMCAK-Antikörpers zur Fluoreszenzfärbung der unter (B) beschriebenen identisch. Der eingezeichnete Größenmaßstab entspricht 10 μm .

Eine genaue Untersuchung der zentromerischen Lokalisation von hSgo2 bei hoher Auflösung zeigte, dass im Gegensatz zu wildtypischem und PP2A-bindedefizientem hSgo2, die beide an den inneren Bereich des Zentromers binden, Mad2-bindedefizientes hSgo2 verstärkt mit Außenbereichen des Zentromers assoziiert (siehe Abb. 22B, vergrößerte Ausschnitte). Diese veränderte Lokalisation von hSgo2-R153A bestand darin, dass sich das normalerweise fokussierte Einzelsignal von hSgo2 in zwei Signale auftrennte, die interessanterweise im rechten Winkel zur Kinetochorenachse stehen (siehe Abb. 22B, unten). Eine derartige Lokalisation wurde weder für hSgo2-WT noch für PP2A-bindedefizientes hSgo2-N58I beobachtet. Die Assoziation mit hMad2 scheint demnach für die Fokussierung von hSgo2 am inneren Zentromer benötigt zu werden.

3.2.2.3 Mad2-bindedefizientes hSgo2 bleibt fähig, das Kinesin MCAK an Zentromere zu rekrutieren

In mehreren Säugersystemen wurde übereinstimmend gezeigt, dass zentromerische Lokalisation des mitotischen Kinesins MCAK direkt von Sgo2 abhängt (Huang et al., 2007; Parra et al., 2009). Es ist daher denkbar, dass die hSgo2-hMad2-Wechselwirkung die von Sgo2 abhängige Rekrutierung von MCAK ans Zentromer beeinflusst. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die Wiederherstellung der zentromerischen Lokalisation von MCAK in hSgo2-depletierten HeLa-Zellen durch ektopische Expression RNAi-resistenter hSgo2 Allele analysiert (siehe Abb. 22C). Dabei zeigte sich, dass sowohl wildtypisches wie auch PP2A- oder Mad2-bindedefizientes hSgo2 in der Lage sind, die zentromerische Lokalisation von MCAK zu vermitteln, während in einer entsprechenden Leervektor-Kontrolle MCAK wie erwartet delokalisiert bleibt. Dies wiederum zeigt, dass weder PP2A noch Mad2 für diese Funktion von hSgo2 benötigt werden.

3.2.3 Humanes Sgo2 wird für den Erhalt der Schwesterchromatidkohäsion in der frühen Mitose nicht benötigt

Eine weitere mitotische Funktion, die für hSgo2 beschrieben wurde, besteht in der Beschützung von zentromerischem Kohäsion vor dem Prophaseweg aufgrund der

Rekrutierung von PP2A an Zentromere (Kitajima et al., 2006). In dieser Studie wurde gleichzeitig gezeigt, dass die von Shugoshin abhängige Rekrutierung von PP2A an Zentromere ausschließlich von hSgo2, nicht jedoch von hSgo1 abhängt (Kitajima et al., 2006). Um in diesem Zusammenhang eine mögliche Beteiligung der hSgo2-hMad2-Wechselwirkung zu untersuchen, wurden hSgo2 und hMad2 mittels RNAi in HeLa-Zellen depletiert. Als Kontrollen fungierten Depletionen von hSgo1 und hBub1, da für beide Proteine Funktionen in der Aufrechterhaltung der Schwesterchromatidpaarung beschrieben sind (McGuinness et al., 2005; Tang et al., 2004). Die Zellen wurden mit Thymidin (2 mM) in der frühen S-Phase vorsynchronisiert, nach 20 h aus diesem Arrest entlassen und mittels Nocodazol dann in der nachfolgenden Mitose arretiert. Um eine Arretierung Bub1- und Mad2-freier Zellen in Mitose zu erreichen, wurden die Zellen 9 h nach dem Entlassen aus dem Thymidinblock mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Diese Behandlung verhindert u.a. die proteolytische Degradation des Separase-Inhibitors Securin (Yamamoto et al., 1996; Zou et al., 1999) und damit auch eine mögliche, durch Separase vermittelte Trennung der Schwesterchromatiden. Dies erst ermöglicht eine selektive Untersuchung der Einflussnahme von hSgo2- oder hMad2-Depletion auf die Schwesterchromatidkohäsion während der frühen Mitose.

Um die Kohäsion der Schwesterchromatiden in entsprechend behandelten Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst in hypotonischem Puffer geschwollen und auf Deckgläsern ausgebracht. Anschließend wurde die DNA mittels Hoechst 33342 angefärbt und die zentromerische Kohäsion mikroskopisch untersucht (siehe Abb. 23). Dabei wurde erkennbar, dass die Depletion von hSgo2 oder hMad2 keinen negativen Einfluss auf die Persistenz von zentromerischer Kohäsion hat, d.h. die Schwesterchromatide in hSgo2- oder hMad2-depletierten, MG132-arretierten HeLa-Zellen sind genauso wie bei der Negativkontrolle (GL2) im Bereich der Zentromere miteinander gepaart (siehe Abb. 23B, D, F und G). Im Gegensatz dazu führt die Depletierung von hSgo1 zu einem vollständigen Verlust der Schwesterchromatidkohäsion während der frühen Mitose (siehe Abb. 23C und G).

Für die Depletion von hBub1 wurde ebenfalls ein Verlust der Kohäsion im Bereich der Zentromere beobachtet, wobei im Gegensatz zu der Depletion von hSgo1 die Paarung der Schwesterchromatiden erhalten bleibt (siehe Abb. 23E und G). Diese Beobachtung stimmt mit publizierten Daten überein, die zeigen, dass die Depletion

Ergebnisse

von Bub1 in humanen Zellen zu einer Delokalisation von Sgo1 an die Armbereiche der Chromosomen führt (Tang et al., 2004). Diese Delokalisation von hSgo1 bewirkt einen Verlust der Kohäsion im Bereich der Zentromere bei gleichzeitiger Persistenz von Armkohäsion (Tang et al., 2004). Da weder die Depletion von hSgo2 noch von hMad2 zu einem Verlust der Schwesterchromatidkohäsion führt, kann eine Funktion der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung innerhalb der Beschützung zentromerischen Kohäsions während der frühen Mitose praktisch ausgeschlossen werden. Diese Daten falsifizieren darüber hinaus veröffentlichte Daten, gemäß derer hSgo2 eine Funktion beim Erhalt von zentromerischer Kohäsion während der Teilung somatischer Säugerzellen zukommt (Kitajima et al., 2006).

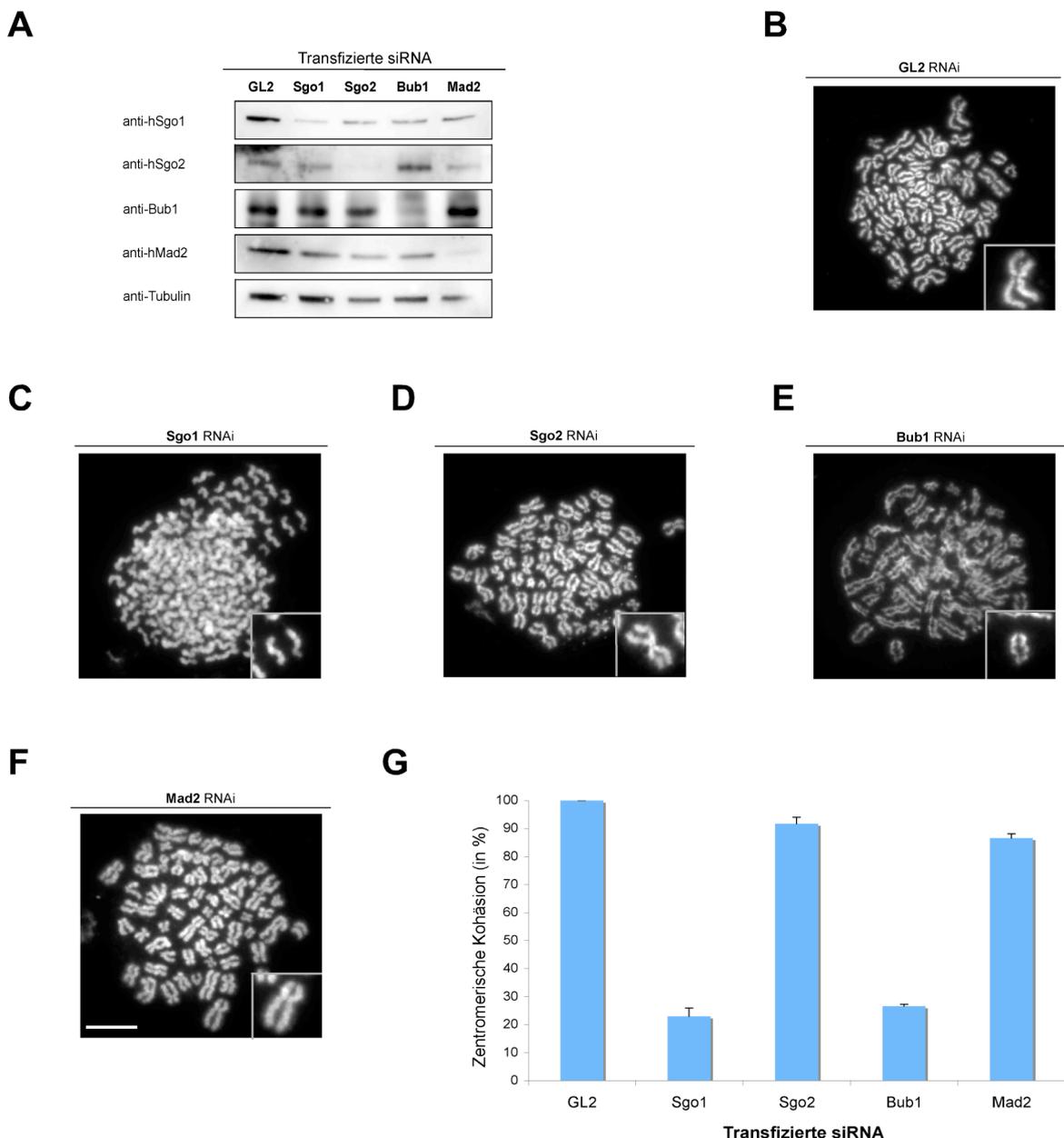


Abbildung 23: Sgo2 und Mad2 werden für den Schutz von zentromerischer Kohäsion in der frühen Mitose nicht benötigt.

(A) Western Blot zur Kontrolle der Depletion von hSgo1, hSgo2, hBub1 und hMad2 in HeLa-Zellen. Aliquots transfizierter Zellen wurden zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Western Blot gegen hSgo1, hSgo2, hBub1, hMad2 und α -Tubulin analysiert. (B, C, D, E, F) Chromosomen-Spreads von HeLa-Zellen, die mit GL2-, hSgo1-, hSgo2-, hBub1- und hMad2-siRNA transfiziert worden waren. HeLa-Zellen wurden mit den jeweiligen siRNAs transfiziert, mit Thymidin (2,0 mM) für 20 h in der frühen S-Phase arretiert, aus dem Arrest freigesetzt und durch Zusetzung von Nocodazol (200 ng/ml) sowie MG132 (60 μ M) in der frühen Mitose arretiert. Die Zellen wurden anschließend in hypotonischem Puffer geschwollen, auf Deckgläsern ausgebracht, mit Hoechst 33342 angefärbt und mikroskopisch untersucht. Der eingezeichnete Größenmaßstab entspricht 25 μ m. (G) Quantifizierung der Kohäsion in GL2-, hSgo1-, hSgo2-, hBub1- und hMad2-depletierten, prometaphasischen Zellen. Aufgetragen ist die zentromerische Kohäsion (in Prozent) gegen die jeweilige RNAi. Gezählt wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Serien, die jeweils mindestens 80 Spreads beinhalteten. Die Fehlerbalken entsprechen der jeweiligen Standardabweichung (SD).

3.2.4 Humanes Sgo2 wird für die mitotische Progression in unbehandelten Zellen nicht benötigt

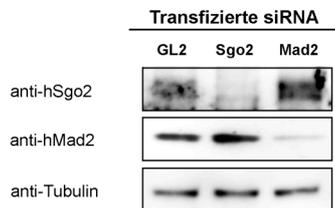
Huang et al. (2007) berichteten, dass hSgo2-depletierte Zellen bis zu viermal länger in der Mitose verweilen wie Kontrollzellen, dann aber die Mitose trotz fehlangehefter Chromosomen verlassen. Diese Beobachtungen legen einerseits nahe, dass in Abwesenheit von hSgo2 der SAC aufgrund fälschlicher MT-Kinetochorverbindungen hyperaktiviert wird. Gleichzeitig scheint der SAC aber weniger robust und daher nicht in der Lage zu sein, in Folge persistierender Fehlanheftungen einen fortwährenden mitotischen Arrest zu gewährleisten.

Um die Richtigkeit dieser Daten zu überprüfen, wurde hSgo2 in HeLa K-Zellen mittels RNAi depletiert und die mitotische Progression durch Lebend-Zell-Mikroskopie analysiert (siehe Abb. 24). Die Zellen wurden dafür über 16 h hinweg mikroskopisch gefilmt, wobei in 8-minütigen Intervallen Bilder aufgenommen wurden. Die jeweilige Zeitspanne, die die Zellen zum Durchlaufen der Mitose benötigten, wurde statistisch analysiert (siehe Abb. 24B). Dabei wurde deutlich, dass die mittlere Zeitdauer, die hSgo2-depletierte Zellen zum Durchlaufen einer Zellteilung benötigen, gegenüber der für Kontrollzellen ermittelten nicht signifikant erhöht war. Dies zeigt, dass die Depletion von hSgo2 keinen Einfluss auf die normale mitotische Progression ausübt (siehe Abb. 24B, C und D), was im Widerspruch zu den in der Literatur veröffentlichten Daten steht (Huang et al., 2007). Diese Studie ordnete hSgo2-depletierten Zellen eine bis zu viermal längere Verweildauer in der Mitose zu wie Kontrollzellen. Zur Kontrolle wurden auch Zellen analysiert, in denen Mad2 depletiert worden war. In

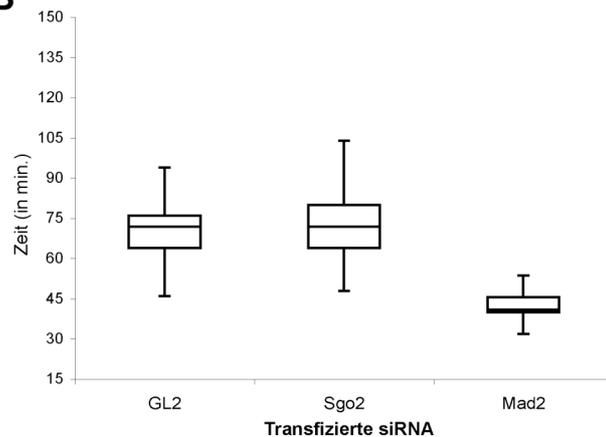
Ergebnisse

Übereinstimmung mit der existierenden Literatur ergab diese Untersuchung, dass Mad2-freie Zellen die Mitose statt in den üblichen 70 Minuten in durchschnittlich etwa 35 Minuten durchliefen. Zusammenfassend zeigen diese Daten damit, dass hSgo2-depletierte Zellen die Mitose in einer von Kontrollzellen nicht zu unterscheidenden Weise durchlaufen. Die Depletion von hSgo2 führt demnach nicht zu Defekten, die eine Hyperaktivierung des SAC hervorrufen. In Übereinstimmung hiermit konnte das gehäufte Auftreten von sog. „*lagging chromosomes*“, d.h. von Chromosomen, die in Folge fehlerhafter Spindelanheftung in Anaphase im Bereich des Spindeläquators persistieren, ebenfalls nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das gehäufte Auftreten derartiger Chromosomen in hSgo2-depletierten Zellen wurde durch Huang und Kollegen beschrieben. Schließlich konnten für hSgo2-freie Zellen auch keine Defekte in der Aufrechterhaltung eines durch den SAC vermittelten, mitotischen Arrests nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.2.6).

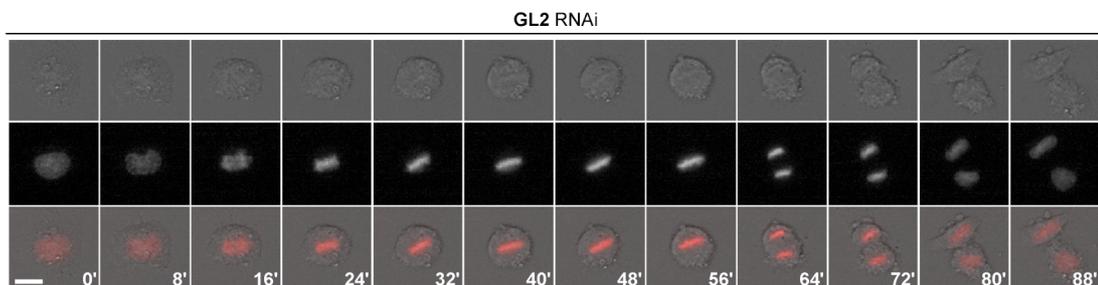
A



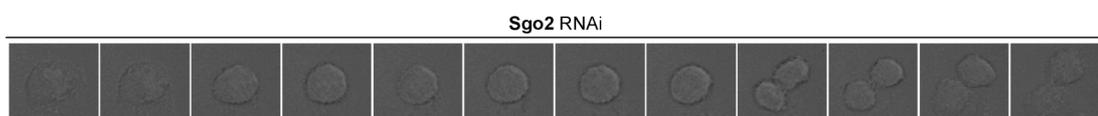
B



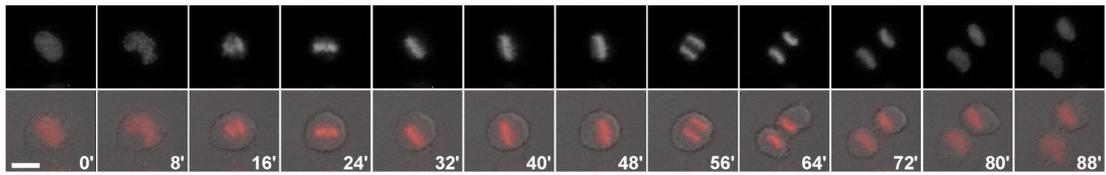
C



D



Ergebnisse



E

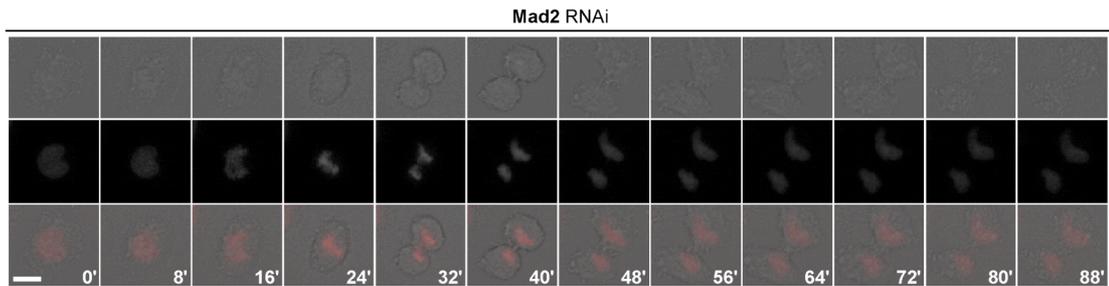


Abbildung 24: Sgo2 wird für normale Progression in Mitose nicht benötigt.

(A) Western Blot zur Kontrolle der RNAi-Depletion von hSgo2 und hMad2 in HeLa K-Zellen. Von transfizierten Zellen wurden Aliquots entnommen, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Western Blot gegen hSgo2, hMad2 und α -Tubulin analysiert. (B) Box- und Whisker Blot zur statistischen Darstellung der Zeitdauer, die GL2-, hSgo2- oder hMad2-depletierte HeLa K-Zellen zum Durchlaufen einer mitotischen Teilung benötigen. Aufgetragen ist die zwischen der Kondensation der DNA und der Dekondensation der DNA gemessene Zeit (in min.) gegen die jeweilige RNAi. Für jede siRNA-Behandlung wurde die Kinetik der mitotischen Progression für mindestens 30 Zellen gemessen. (C) Mitotische Progression einer mit GL2-siRNA transfizierten Zelle. HeLa K-Zellen wurden 32 h vor Beginn der mikroskopischen Aufnahme mit GL2-siRNA transfiziert. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte über 16 h, wobei Bilder in 8 Minuten-Intervallen aufgenommen wurden. Gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen der Zelle über einen Zeitraum von 88 Minuten (obere Reihe), Fluoreszenzaufnahmen der durch die Expression von mCherry-Histon H2B detektierbaren chromosomalen DNA (mittlere Reihe) sowie die jeweilige Überlagerung beider Bilder (untere Reihe). (D) Mitotische Progression einer mit hSgo2-RNAi transfizierten Zelle. (E) Mitotische Progression einer mit hMad2-RNAi transfizierten Zelle. Die eingezeichneten Größenmaßstäbe entsprechen jeweils 10 μ m.

Diese Daten stehen in Widerspruch zu denen, die durch Huang und Kollegen veröffentlicht worden sind (Huang et al., 2007). So konnten die Effekte einer verstärkten fehlerhaften Anheftung von Chromosomen an die Spindel ebenso wie die damit einhergehende Hyperaktivierung des SAC, die diese Studie hSgo2-depletierten Zellen zuordnet, nicht reproduziert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer niedrigeren Effizienz der hSgo2-Depletion gegenüber den durch Huang und Kollegen publizierten Experimenten liegen. Diese Möglichkeit ist jedoch relativ unwahrscheinlich, da in praktisch allen Experimenten, in denen entsprechende Sachverhalte untersucht wurden, eine äußerst effiziente Depletion von hSgo2 erreicht werden konnte

(siehe u.a. Abb. 24A, 25G und 28A). Da zur Durchführung entsprechender Experimente außerdem identische siRNAs wie in der durch Huang und Kollegen veröffentlichten Studie verwendet worden sind, können unbeabsichtigte Co-Depletionen anderer Faktoren im Fall von Huang und Kollegen als Ursache für diese Diskrepanz ebenfalls praktisch ausgeschlossen werden.

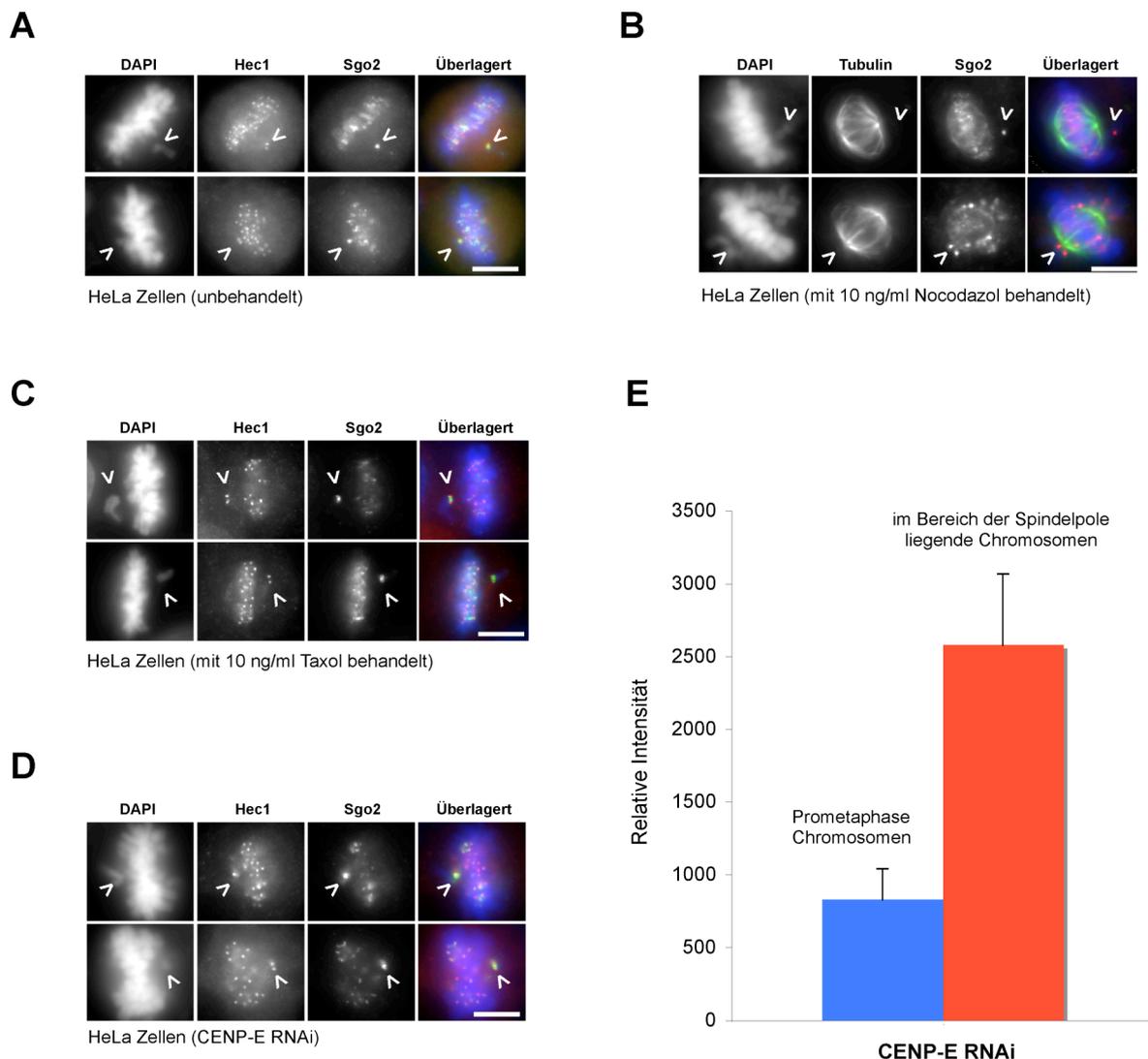
3.2.5 Humanes Sgo2 akkumuliert an Chromosomen, die in Metaphase außerhalb der Äquatorialebene liegen

Während der zellbiologischen Untersuchung von hSgo2 in humanen Zellen wurde festgestellt, dass hSgo2 spezifisch an solchen Chromosomen akkumuliert, welche in Metaphase außerhalb der Äquatorialebene, d.h. im Bereich der Spindelpole liegen (siehe Abb. 25A). Solche Fehlanordnungen von Chromosomen entstehen normalerweise durch die Ausbildung nicht-amphitelischer Wechselwirkungen zwischen den Schwesterkinetochoren eines Chromosoms und Mikrotubuli der mitotischen Spindel. Ihre mikroskopische Untersuchung ist jedoch relativ schwierig, da solche Fehlanordnungen kurzlebig sind und rasch korrigiert werden. Aus diesem Grund wurde diese Situation artifiziell durch die Behandlung von HeLa-Zellen mit niedrigen Dosen der Spindeltoxine Nocodazol oder Taxol (Fuchs et al., 1978; Sentein, 1979; Wani et al., 1971) erzeugt. Die Zellen wurden anschließend mit Antikörpern gegen hHec1 und hSgo2 fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. Dabei wurde deutlich, dass hSgo2 auch in Nocodazol/Taxol-behandelten Zellen an entsprechend fehlorientierten Chromosomen akkumuliert (siehe Abb. 25B und C). Diese Akkumulation von hSgo2 wurde bisher nicht beschrieben und wird deshalb in den nachfolgenden Abschnitten detailliert untersucht.

Um die Akkumulation von hSgo2 an fehlorientierten Chromosomen eingehender zu untersuchen, wurde eine andere Methode zur Generierung solcher Chromosomen gewählt. So vermittelt Depletion des in Mitose am Kinetochor lokalisierten Kinesins CENP-E (Yen et al., 1991) spezifisch das Auftreten einzelner Chromosomen, die in Metaphase außerhalb der Äquatorialebene liegen (Schaar et al., 1997; Wood et al., 1997; Yao et al., 2000; Yucel et al., 2000). Wie anhand der Abbildungen 25D und F erkennbar wird, akkumuliert hSgo2 auch in hCENP-E-depletierten Zellen spezifisch an polnahen Chromosomen. Um diese Akkumulation quantitativ zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit hCENP-E-spezifischer siRNA behandelt und gegen hHec1

Ergebnisse

und hSgo2 fluoreszenzgefärbt. Die Fluoreszenzintensität von hSgo2 an Zentromeren entsprechender polnaher Chromosomen wurden gemessen und mit den Intensitäten, die für hSgo2 an Zentromeren prometaphasischer Chromosomen erhalten werden konnten, verglichen. Dabei wurde erkennbar, dass im Bereich der Zentromere polnahe liegender Chromosomen eine um den Faktor 3 höhere Fluoreszenzintensität für hSgo2 erhalten werden konnte als an den Chromosomen von prometaphasischen Zellen (siehe Abb. 25E). Dies bestätigt, dass hSgo2 spezifisch an den Zentromeren solcher Chromosomen hyperakkumuliert, die als Folge falscher Spindelanheftung in Metaphase im Bereich der Spindelpole liegen. Diese Hyperakkumulation von hSgo2 könnte auf eine Funktion von hSgo2 bei der Generierung oder der Amplifikation eines aktiven SAC-Signals an diesen Chromosomen hinweisen, weshalb sowohl die Funktion von hSgo2 wie auch die Funktionalität des SAC an entsprechenden Metaphasechromosomen eingehend untersucht wurde (siehe u.a. Abb. 27 und 30).



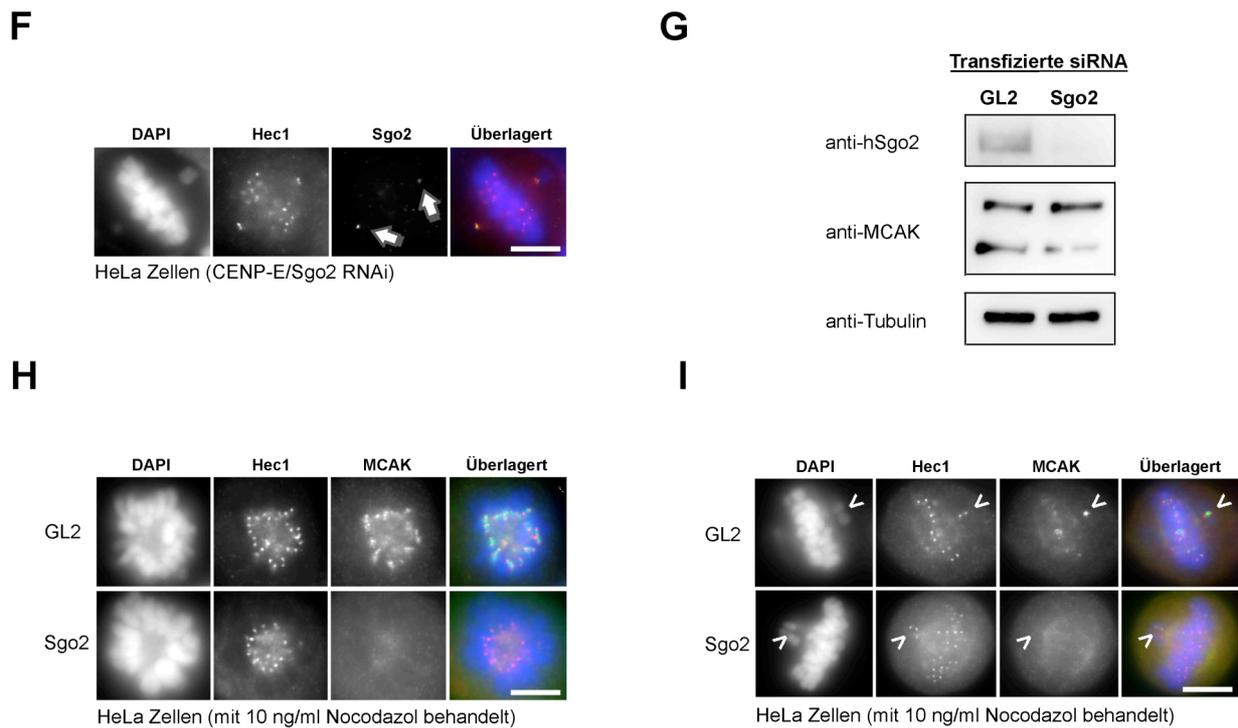


Abbildung 25: Sgo2 akkumuliert an Chromosomen, die außerhalb der Metaphaseplatte liegen.

(A) Akkumulation von hSgo2 an Metaphasechromosomen, die außerhalb der Äquatorialebene liegen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert, fixiert, gegen hHec1 und hSgo2 fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. (B) Akkumulation von hSgo2 an Metaphasechromosomen, die in Nocodazol-behandelten Zellen außerhalb der Äquatorialebene liegen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert, 3h mit Nocodazol (10 ng/ml) behandelt, fixiert, gegen hSgo2 und β -Tubulin fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. (C) Akkumulation von hSgo2 an Metaphasechromosomen, die in Taxol-behandelten Zellen außerhalb der Äquatorialebene liegen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert, 3h mit Taxol (10 ng/ml) behandelt, fixiert, gegen hHec1 und hSgo2 fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. (D) Akkumulation von hSgo2 an Metaphasechromosomen, die in hCENP-E depletierten Zellen außerhalb der Äquatorialebene liegen. HeLa-Zellen wurden 48h mit hCENP-E-spezifischen siRNAs transfiziert, fixiert und fluoreszenzgefärbt. (E) Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensitäten von hSgo2 an den Zentromeren in prometaphasischen Zellen (blau) oder an den Zentromeren fehlorientierter Chromosomen (rot). HeLa-Zellen wurden 48 h mit hCENP-E-spezifischer siRNA behandelt, fixiert, fluoreszenzgefärbt und unter Verwendung eines *Delta Vision* Dekonvolutionsmikroskops untersucht. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurde die Hintergrundintensität an 5 Punkten in der Zelle gemessen und der erhaltene Mittelwert von der am Zentromer gemessenen Signalintensität für hSgo2 abgezogen. Die dadurch erhaltenen, korrigierten Fluoreszenzwerte wurden graphisch aufgetragen; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD). Sowohl für prometaphasische Chromosomen als auch für außerhalb der Äquatorialebene liegende Metaphasechromosomen wurde die hSgo2-Signalintensität an mindestens 30 Zentromeren gemessen. (F) Akkumulation von hSgo2 an Metaphasechromosomen, die in nicht vollständig hSgo2-depletierten Zellen außerhalb der Äquatorialebene liegen. HeLa-Zellen wurden 48h mit hCENP-E- und hSgo2-spezifischer siRNA transfiziert, fixiert und fluoreszenzgefärbt. Die Pfeile zeigen restliches lokalisiertes hSgo2 an den fehlorientierten Chromosomen. (G) Western Blot zur Kontrolle der Depletion von hSgo2 in HeLa-Zellen. Von transfizierten Zellen wurden Aliquots entnommen, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Western Blot gegen hSgo2, hMCAK und α -

Tubulin analysiert. (H) Die Lokalisation von MCAK ist abhängig von hSgo2. HeLa-Zellen wurden 48h mit GL2- oder hSgo2-spezifischer siRNA transfiziert, fixiert, gegen hHec1 und hMCAK fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. (I) Die Akkumulation von MCAK an Metaphasechromosomen, die außerhalb der Äquatorialebene liegen, ist abhängig von hSgo2. HeLa-Zellen wurden 48h mit GL2- oder hSgo2-spezifischen siRNAs transfiziert, 3h mit Nocodazol (10 ng/ml) behandelt, fixiert, gegen hHec1 und hMCAK fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. Die Größenmaßstäbe entsprechen jeweils 10 µm.

3.2.5.1 Humanes Sgo2 vermittelt die Akkumulation von MCAK an Chromosomen, die außerhalb der Metaphaseplatte liegen

Eine Frage, die sich in Folge der Entdeckung einer spezifischen Akkumulation von hSgo2 an fehlangeordneten Metaphasechromosomen ergibt, ist, ob hSgo2 auch eine mögliche Hyperakkumulation von MCAK an diesen Chromosomen vermittelt. Eine solche Funktion würde insofern Sinn machen, als solche Chromosomen sehr häufig merotelisch mit der Spindel verbunden sind. Um diese Verbindungen zu lösen, wird MCAK (Desai et al., 1999; Wordeman und Mitchison, 1995) an solchen Chromosomen verstärkt benötigt. Um eine entsprechende Funktion von hSgo2 zu untersuchen, wurde hSgo2 mittels RNAi in HeLa-Zellen depletiert und die Zellen mit niedrigen Dosen (10 ng/ml) von Nocodazol behandelt. Nach einer Immunfluoreszenzfärbung gegen hHec1 und hMCAK wurde die Akkumulation von hMCAK an fehlorientierten Chromosomen mikroskopisch analysiert. Dabei wurde deutlich, dass hSgo2 nicht nur für die grundsätzliche Rekrutierung von MCAK an Zentromere benötigt wird (Huang et al., 2007; siehe Abb. 22C und 25H) sondern auch für dessen Hyperakkumulation an fehlorientierten Chromosomen (siehe Abb. 25I).

3.2.5.2 Die Akkumulation von hSgo2 und MCAK an polnahen Metaphasechromosomen ist abhängig von Bub1 und Aurora B

Die in den vorausgehenden Abschnitten beschriebenen Chromosomen, die als Folge nicht-amphitelischer Anheftung an die Spindel außerhalb der Metaphaseplatte liegen, stellen in zweierlei Hinsicht eine besondere Situation dar. Zum einen ist an solchen Chromosomen das SAC-Signal lokal maximiert (Rieder et al., 1995), zum anderen muss die Anheftung derartiger Chromosomen durch MT-depolymerisierende Kinesine (MCAK) aktiv getrennt werden. Sowohl bei der Generierung eines entsprechenden SAC-Signals als auch bei der Rekrutierung/Regulation von MCAK konnten der mitotischen Kinase Aurora B essentielle Funktionen zugeordnet werden (Ruchaud et al., 2009). Die Rekrutierung von Komponenten des mitotischen SAC an Kinetochore

hängt darüber hinaus direkt von der Kinase Bub1 ab (Sharp-Baker und Chen, 2001; Vigneron et al., 2004).

Die Hyperakkumulation von hSgo2 an Chromosomen, die in Metaphase außerhalb der Äquatorialebene liegen, wirft daher die Frage auf, ob diese möglicherweise auch durch Aurora B bzw. Bub1 beeinflusst wird. So wurden hSgo2 sowohl bei der Rekrutierung von MCAK als auch bei der Aufrechterhaltung eines aktiven SAC-Signals Funktionen zugeordnet (Huang et al., 2007). Um dies zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen entweder mit Kontroll- (GL2) oder Bub1-spezifischen siRNAs behandelt und die Akkumulation von hSgo2 an fehlorientierten Chromosomen analysiert. Um den Einfluss von Aurora B auf die Lokalisierung von hSgo2 zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Aurora B-spezifischen Kinase-Inhibitor ZM447439 (Ditchfield et al., 2003) behandelt. Dabei wurde erkennbar, dass hSgo2 vermutlich selbst ein Substrat von Aurora B oder einer nachgeschalteten Kinase darstellt, da die Behandlung von Zellen mit ZM447439 zu einem vollständigen Verschwinden der oberen der beiden im Western Blot für hSgo2 erhaltenen Banden führt (siehe Abb. 26A, mittlere Spur). Dieser Befund war in Bub1-depletierten Zellen hingegen nicht zu erkennen, weshalb davon auszugehen ist, dass die Regulation von hSgo2 durch Bub1 während Mitose nicht durch direkte Phosphorylierung von hSgo2 durch Bub1 erfolgt (siehe Abb. 26A, rechte Spur). Alternativ wäre denkbar, dass die Phosphorylierung von hSgo2 durch Bub1 zu einer nicht detektierbaren Änderung der elektrophoretischen Mobilität von hSgo2 führt. Um den Einfluss der Depletion von Bub1 bzw. der Inhibition von Aurora B auf die Hyperakkumulation von hSgo2 an fehlorientierten Chromosomen zu untersuchen, wurden entsprechend behandelte Zellen (s.o.) gegen hHec1 und hSgo2 immunfluoreszenzgefärbt und die Lokalisation von hSgo2 mikroskopisch analysiert. Die dabei erhaltenen Daten zeigten, dass die Inhibition von Aurora B Kinase zu einer Relokalisation von hSgo2 vom Zentromer an die Schwesterkinetochore des fehlorientierten Chromosoms führt (siehe Abb. 26C, mittlere Reihe). Gleichzeitig führt die Inhibition von Aurora B zu einem vollständigen Verlust von hSgo2 im Bereich der Metaphaseplatte. Dies zeigt abermals, dass die Rekrutierung von hSgo2 an polnahe Metaphasechromosomen im Vergleich mit ordnungsgemäß angehefteten Chromosomen massiv verstärkt ist. Ähnliche Daten wurden auch für die Depletion von Bub1 erhalten. So führt die Depletion von Bub1 ebenfalls zu einem vollständigen Verlust von hSgo2 im Bereich der Metaphaseplatte bei gleichzeitiger Persistenz an den

Zentromeren fehlangehefteter Chromosomen (siehe Abb. 26C, untere Reihe). Eine Relokalisierung von hSgo2 an Kinetochore wie im Fall von Aurora B Inhibition war aber nicht zu beobachten. Die an den fehlorientierten Chromosomen Bub1-depletierter Zellen gemessene Fluoreszenzintensität für hSgo2 war zwar gegenüber der in Kontrollzellen gemessenen stark reduziert (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache einer selektiven Präsenz von hSgo2 an den Zentromeren entsprechender Chromosomen zeigt jedoch erneut, dass die Rekrutierung von hSgo2 an solche Chromosomen gegenüber der an normalen Prometaphasechromosomen massiv verstärkt ist.

Identische Daten in Bezug auf Abhängigkeiten der Hyperakkumulation an polnahen Chromosomen wurden auch für MCAK erhalten (siehe Abb. 26D). So führt die Inhibition von Aurora B Kinase ebenso wie die Depletion von Bub1 zu einer signifikanten Reduzierung des MCAK-Signals an den Zentromeren entsprechender Chromosomen. Dies ist nicht überraschend, da wie in Abbildung 25I gezeigt ist, die Akkumulation von MCAK an fehlorientierten Chromosomen direkt von hSgo2 abhängt. Diese Daten stimmen mit den publizierten Daten überein, nach denen die Lokalisation von Shugoshinen gleichermaßen in Mitose als auch in der Meiose von Bub1 und Aurora B abhängig ist (Boyarchuk et al., 2007; Huang et al., 2007; Kitajima et al., 2004, 2005; Parra et al., 2009; Pouwels et al., 2007; Resnick et al., 2006; Tang et al., 2004). Ferner lassen diese Daten darauf schließen, dass Bub1 und Aurora B miteinander kollaborieren, um Sgo2 und MCAK spezifisch an solche Chromosomen, die in Metaphase aufgrund fälschlicher Spindel-Kinetochor-Wechselwirkungen außerhalb der Äquatorialebene liegen, zu rekrutieren.

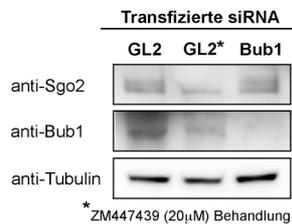
3.2.5.3 Die Depletion von Mad2 führt zu einer Fehllokalisierung von hSgo2 an Randbereiche des Zentromers

Sowohl für die Depletion von hMad2 als auch für die Expression einer Mad2-bindedefizienten Mutante von hSgo2 bei gleichzeitiger Depletion von endogenem hSgo2 konnte eine verstärkte Streuung der hSgo2-Signale im Bereich der Zentromere nachgewiesen werden (siehe Abb. 21B und 22B). Um diesen Sachverhalt eingehender zu untersuchen, wurde die Hyperakkumulation von hSgo2 an deplatzierten Metaphasechromosomen genutzt. Dazu wurde hMad2 in HeLa-Zellen mittels RNAi depletiert (siehe Abb. 26B) und die zentromerische Lokalisation von hSgo2 an fehlorientierten Chromosomen untersucht.

Ergebnisse

Dabei bestätigte sich die Beobachtung, dass Mad2-bindedefizientes hSgo2 verstärkt an die Randbereiche von Zentromeren bindet (siehe 22B). So wurde erkennbar, dass die Depletion von hMad2 ebenfalls zu einer verstärkten Lokalisation von hSgo2 an Randbereiche von Zentromeren fehlorientierter Metaphasechromosomen führt (siehe Abb. 26E). Um diesen Effekt statistisch zu analysieren, wurden jeweils mehr als 150 fehlorientierte Metaphasechromosomen mikroskopisch untersucht (siehe Abb. 26F). Dabei wurde deutlich, dass die Depletion von hMad2 zu einer statistisch signifikanten Zunahme von hSgo2-Signalen in den Randbereichen der Zentromere entsprechender Chromosomen (rot) bei gleichzeitiger Abnahme von innerzentromerisch lokalisiertem hSgo2 (blau) führt. Diese Beobachtung zusammen mit den in Abschnitt 3.2.2 dargelegten Daten offenbart eine neue Funktion für Mad2. Diese besteht demnach in der spezifischen Fokussierung von hSgo2 am inneren Zentromer. Eine mögliche Relevanz dieser neuen Funktion von Mad2 könnte während der ersten Reifeteilung der Meiose von Säugern vorliegen (siehe Diskussion).

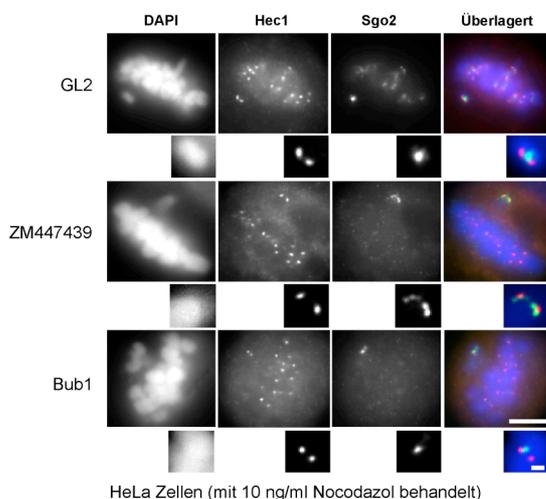
A



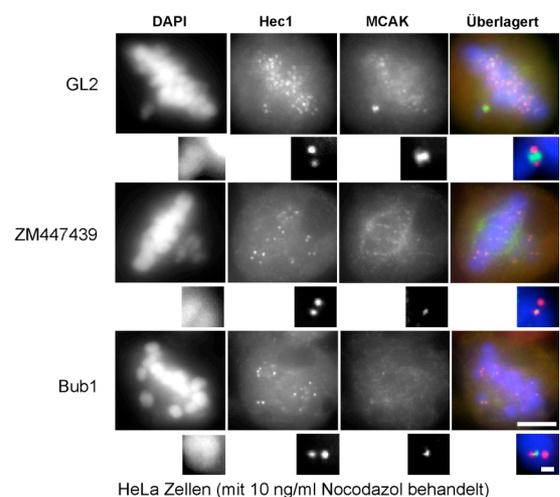
B



C



D



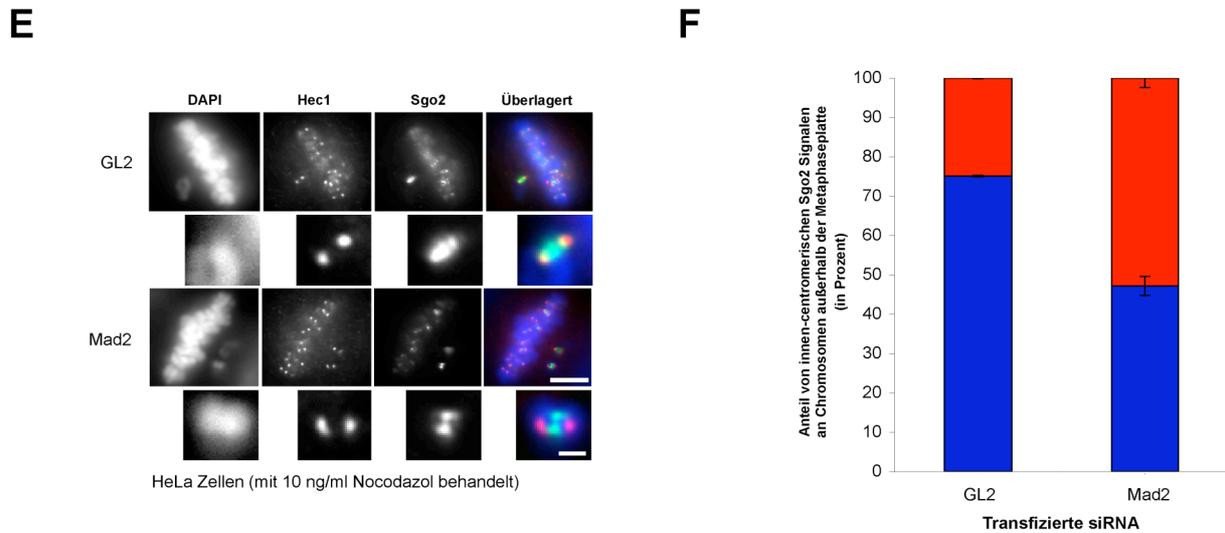


Abbildung 26: Die Akkumulation von Sgo2 an Chromosomen, die außerhalb der Metaphaseplatte liegen, ist abhängig von Bub1 und Aurora B.

(A) Western Blot zur Kontrolle der RNAi-Depletion von hBub1 in HeLa-Zellen. Von RNAi-transfizierten bzw. ZM447439-behandelten Zellen wurden Aliquots entnommen, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Western Blot gegen hSgo2, hBub1 und α -Tubulin analysiert. (B) Western Blot zur Kontrolle der RNAi-Depletion von hMad2 in HeLa-Zellen (Vorgehensweise identisch der unter (A) beschriebenen) (C) Abhängigkeiten der Lokalisation von hSgo2 an fehlorientierten Metaphasechromosomen. HeLa-Zellen wurden mit GL2- oder hBub1-spezifischen siRNAs transfiziert, 3h mit Nocodazol (10 ng/ml) behandelt, fixiert, fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. Alternativ wurden GL2-depletierte Zellen 20 min. vor der Fixierung mit 20 μ M ZM447439 behandelt. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen jeweils die Kinetochor/Zentromer-Region des fehlorientierten Chromosoms und heben Veränderungen der innerzentromerischen Lokalisation von hSgo2 hervor. Die Maßstäbe entsprechen 10 μ m bzw. 0,5 μ m in den vergrößerten Ausschnitten. (D) Abhängigkeiten der Lokalisation von MCAK an fehlorientierten Chromosomen (Vorgehensweise identisch der unter (C) beschriebenen). (E) Abhängigkeit der innerzentromerischen Lokalisation von hSgo2 von hMad2. HeLa-Zellen wurden mit GL2- oder hMad2-spezifischen siRNAs transfiziert, 3h mit Nocodazol (10 ng/ml) behandelt, fixiert, fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen die Kinetochor/Zentromer-Region des fehlorientierten Chromosoms und heben Veränderungen der innerzentromerischen Lokalisation von hSgo2 hervor. Die Größenmaßstäbe entsprechen 10 μ m bzw. 0,5 μ m in den vergrößerten Ausschnitten. (F) Quantifizierung der innerzentromerischen Lokalisation von hSgo2 (blau) gegen die Lokalisation von hSgo2 in den Randbereichen des Zentromers (rot). HeLa-Zellen wurden entsprechend der unter Abb. 26E beschriebenen Vorgehensweise behandelt. Die Lokalisation von hSgo2 zum inneren bzw. zum äußeren Zentromer wurde für GL2- und Mad2-depletierte Zellen in zwei Serien zu jeweils mindestens 80 Chromosomen bestimmt, zueinander ins Verhältnis gebracht und graphisch aufgetragen; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD).

3.2.5.4 Die Akkumulation von Faktoren des mitotischen SAC an fehlorientierten Chromosomen ist unabhängig von hSgo2

An Chromosomen, die in Metaphase als Folge nicht-amphitelischer Wechselwirkung mit der Spindel außerhalb der Äquatorialebene liegen, ist das SAC-Signal grund-

sätzlich maximiert (Nezi und Musacchio, 2009). Eine Modellvorstellung, die seit mehreren Jahren kontrovers diskutiert wird, besteht darin, ob das durch ein derart fehlangeordnetes, einzelnes Chromosom erzeugte SAC-Signal ausreicht, um einen robusten mitotischen Arrest der entsprechenden Zelle hervorzurufen (Rieder et al., 1995). Dies stünde mit Beobachtungen im Einklang, die übereinstimmend gezeigt haben, dass Faktoren des mitotischen SAC an derartigen Chromosomen besonders stark akkumulieren (Gorbsky und Ricketts, 1993; Martinez-Exposito et al., 1999; Waters et al., 1998). Im Zusammenhang mit veröffentlichten Daten, die zeigen, dass hSgo2-depletierte HeLa-Zellen die Mitose in Gegenwart solcher Chromosomen verlassen (Huang et al., 2007), ist daher zu postulieren, dass hSgo2 für die Generierung bzw. für den Aufrechterhalt eines aktiven SAC-Signals an fehlerhaft angehefteten Chromosomen benötigt wird. Die Beobachtung, dass hSgo2 an diesen Chromosomen ebenfalls hyperakkumuliert (siehe Abb. 25) wäre in der Tat konsistent mit einer besonderen *Checkpoint*-Funktion von hSgo2. Demnach bestünde die Möglichkeit, dass hSgo2 eine selektive Rolle bei der Hyperrekrutierung von *Checkpoint*-Faktoren an die Kinetochore entsprechend delokalierter Chromosomen zukommt.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die Signalintensitäten, die für verschiedene SAC-Faktoren an fehlorientierten Metaphasechromosomen gemessen werden konnten, zwischen Kontroll- und hSgo2-depletierten Zellen verglichen. Dazu wurden in HeLa-Zellen durch hCENP-E RNAi artifiziell Chromosomen erzeugt, die in der Metaphase im Bereich der Spindelpole persistieren. Gleichzeitig wurden diese Zellen mit Kontroll- (GL2) oder hSgo2-spezifischen siRNAs behandelt. Nach Immunfluoreszenzfärbung gegen hHec1 und hMad2 wurden die an den Kinetochoren entsprechender Chromosomen messbaren Mad2-Signalintensitäten für Kontroll- und hSgo2-depletierte Zellen miteinander verglichen (siehe Abb. 27B und C). Dabei wurde erkennbar, dass die Depletion von hSgo2 keinen statistisch signifikanten Einfluss (Studentischer T-Test: $P < 0,05$) auf die für hMad2 messbare Signalintensität an entsprechenden Chromosomen ausübt (siehe Abb. 27C).

Es ist also davon auszugehen, dass hSgo2 (und damit auch die Wechselwirkung von hSgo2 mit hMad2) für die Akkumulation von hMad2 an den Kinetochoren delokalierter Metaphasechromosomen nicht benötigt wird. Weitgehend identische Ergebnisse wurden für die Untersuchung von hBub1 und hBubR1 erhalten (siehe Abb. 27D

und E), weshalb postuliert werden kann, dass hSgo2 in dieser besonderen Situation für die Erzeugung eines aktiven SAC-Signals nicht benötigt wird.

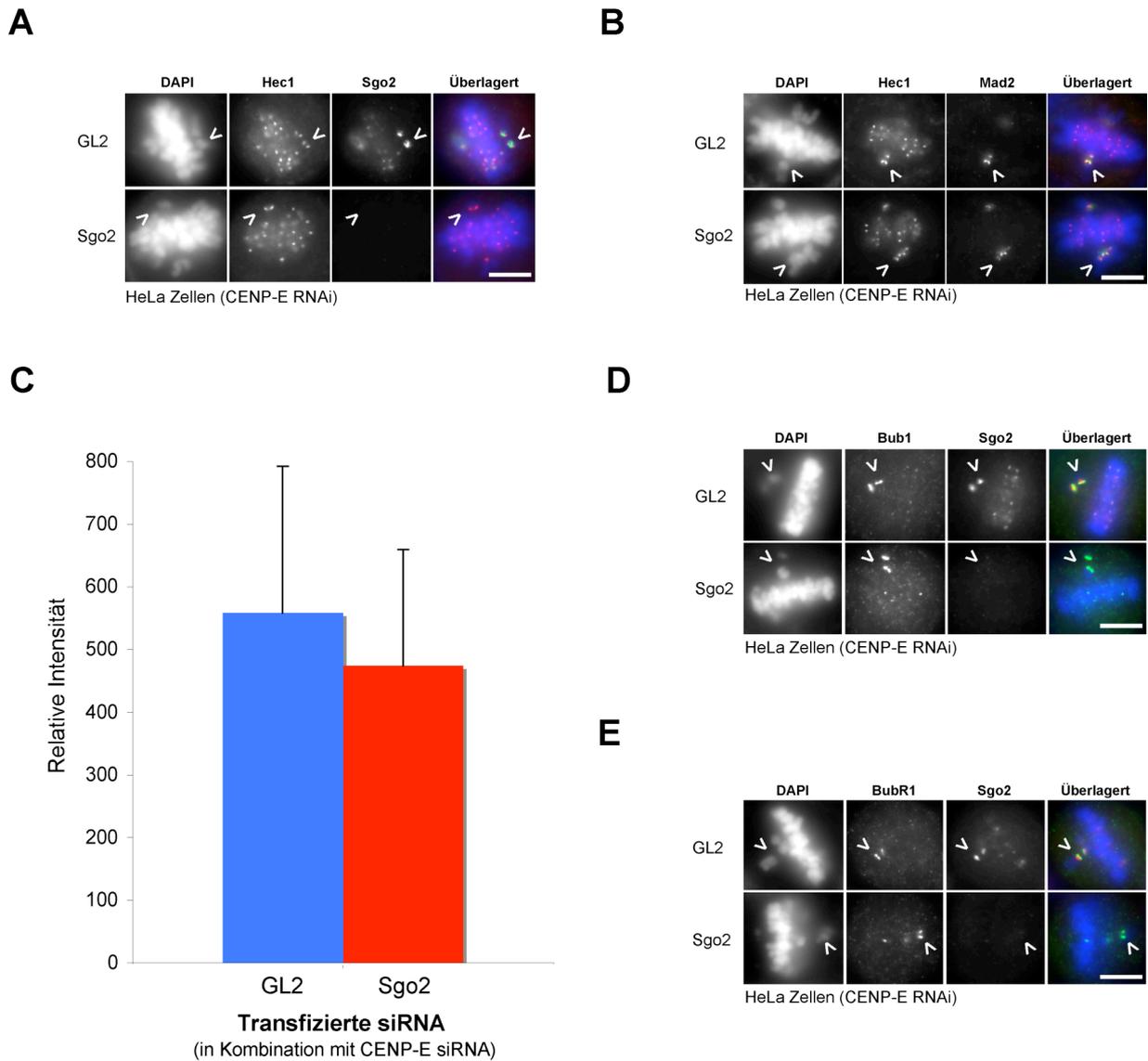


Abbildung 27: Shugoshin-2 wird für die Akkumulation von Faktoren des SAC an fehlorientierten Metaphasechromosomen nicht benötigt.

(A) Immunfluoreszenz zur Kontrolle der RNAi-Depletion von hSgo2 in HeLa-Zellen. hCENP-E/GL2- oder hCENP-E/hSgo2-siRNA transfizierte Zellen wurden fixiert, gegen hHec1 und hSgo2 fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch analysiert. (B) Die Akkumulation von Mad2 an Metaphasechromosomen, die außerhalb der Äquatorialebene liegen, erfolgt unabhängig von hSgo2. HeLa-Zellen wurden mit hCENP-E- und GL2- bzw. mit hCENP-E- und hSgo2-spezifischen siRNAs transfiziert, fixiert, gegen hHec1 und hMad2 fluoreszenzgefärbt und mikroskopisch untersucht. (C) Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensitäten von hMad2 an den Kinetochoren von außerhalb der Äquatorialebene liegenden Metaphasechromosomen in hCENP-E-/GL2-RNAi Zellen (blau) und hCENP-E-/hSgo2-RNAi Zellen (rot). HeLa-Zellen wurden entsprechend der unter Abb. 27B beschriebenen Vorgehensweise behandelt. Zur Bestimmung von Fluoreszenzintensitäten wurde die Hintergrundintensität an 5 Punkten in der Zelle gemessen und der Mittelwert von der an den Kinetochoren für Mad2 gemessenen Signalintensität abgezogen. Die dadurch erhaltenen, korrigierten Fluoreszenzwerte wurden

graphisch aufgetragen; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD). Für hCENP-E/GL2-RNAi Zellen wurde die hMad2-Signalintensität an insgesamt 59 Kinetochoren gemessen, für hCENP-E/hSgo2-RNAi Zellen wurde die Signalintensität an 85 Kinetochoren gemessen (**D**) Sgo2-Unabhängigkeit der Akkumulation von hBub1 an fehlorientierten Metaphasechromosomen. Die Vorgehensweise ist abgesehen von der Verwendung eines hBub1 Antikörpers zur Immunfluoreszenzfärbung der unter (B) beschriebenen identisch. (**E**) Sgo2-Unabhängigkeit der Akkumulation von hBubR1 an fehlorientierten Metaphasechromosomen. Die Vorgehensweise ist abgesehen von der Verwendung eines hBubR1 Antikörpers zur Immunfluoreszenzfärbung der unter (B) beschriebenen identisch. Die Größenmaßstäbe entsprechen jeweils 10 μm .

3.2.6 Humanes Sgo2 wird für die generelle Funktion des SAC in Mitose nicht benötigt

Das unter Abschnitt 3.2.5 ff. beschriebene Experiment stellt eine besondere Situation innerhalb der Mitose dar, da das SAC-Signal nur an wenigen Chromosomen erzeugt wird. Obwohl unter diesen Bedingungen keine Funktion von hSgo2 bei der Erzeugung des SAC-Signals nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 27), gibt es einen Bericht, gemäß dessen Sgo2 in Säugern dennoch eine Funktion innerhalb des SAC zukommt (Huang et al., 2007). Um zu testen, ob hSgo2 unter anderen Umständen tatsächlich doch als eine SAC-Komponente fungieren kann, wurden HeLa-Zellen mit Kontroll- oder hSgo2-spezifischen siRNAs und anschließend für 12 h mit variablen Konzentrationen der Spindeltoxine Nocodazol (Sentein, 1979) oder Taxol (Fuchs et al., 1978; Wani et al., 1971) behandelt. Um das mitotische Arrestverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden diese anschließend mit Propidiumjodid angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (siehe Abb. 28). Dabei konnte eine von der Dosis der Spindeltoxine abhängige Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase und damit ein Arrest dieser Zellen in G2/M nachgewiesen werden (siehe Abb. 28C und D, obere Reihen). Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass mit steigender Toxin-Dosis die Robustheit dieses Arrestes ansteigt. Der Vergleich der für Kontrollzellen erhaltenen Profile (obere Reihen) mit denen, die für hSgo2-depletierte Zellen erhalten werden konnten (untere Reihen), zeigt, dass das mitotische Arrestverhalten beider Zellpopulationen praktisch identisch ist. So konnte unabhängig von der Dosis weder für Nocodazol, noch für Taxol ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und hSgo2-depletierten Zellen nachgewiesen werden, weshalb anzunehmen ist, dass Sgo2 in humanen Zellen für die Funktion des mitotischen SAC nicht benötigt wird. Dieser Befund, zusammen mit den unter Abschnitt 3.2.5.4 dargelegten Daten, steht im Widerspruch zu den von *Huang et al.* (2007) veröffentlichten Daten, da diese

Ergebnisse

Studie hSgo2 eine Funktion innerhalb des SAC zuordnet. Die hier gezeigten Daten widerlegen diese Befunde, da in keiner der untersuchten Situationen eine Funktion für hSgo2 innerhalb des mitotischen SAC nachzuweisen war. Dies steht im Einklang mit einer im Jahre 2008 veröffentlichten Studie (Llano et al., 2008), laut derer Sgo2-freie embryonale Fibroblasten (MEFs) ebenfalls *checkpoint*-kompetent bleiben.

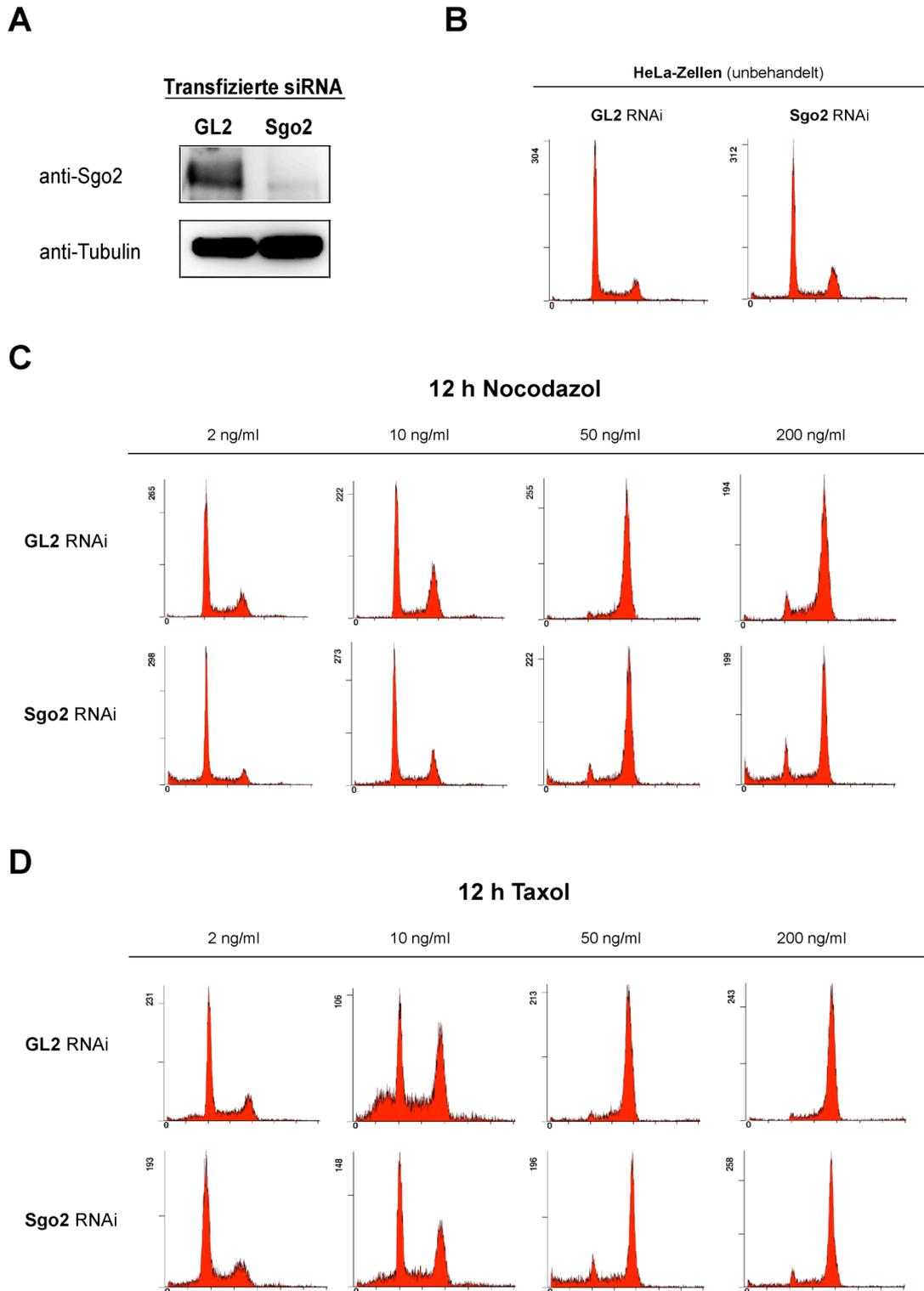


Abbildung 28: Shugoshin-2 wird für die Funktion des SAC in somatischen Zellen nicht benötigt.

(A) Western Blot zur Kontrolle der RNAi-Depletion von hSgo2 in HeLa-Zellen. Von transfizierten Zellen wurden Aliquots zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Western Blot gegen hSgo2 und gegen α -Tubulin analysiert. (B) Profile der DNA-Inhalte von GL2- und hSgo2-RNAi behandelten Zellen. HeLa-Zellen wurden für 48 h mit GL2- oder hSgo2-spezifischen siRNAs transfiziert, mit Ethanol (70%) fixiert und die genomische DNA mittels Propidiumjodid angefärbt. Die Erstellung der DNA-Profile erfolgte unter Verwendung eines Beckmann Coulter Cytomics FC 500. (C) Profile der DNA-Inhalte von GL2- und hSgo2-RNAi behandelten Zellen in der Gegenwart variabler Konzentrationen von Nocodazol. Die Vorgehensweise ist der unter (B) beschriebenen mit Ausnahme der Nocodazol-Behandlung identisch. (D) Profile der DNA-Inhalte von GL2- und hSgo2-RNAi behandelten Zellen in Gegenwart variabler Konzentrationen von Taxol. Die Vorgehensweise ist der unter (B) beschriebenen mit Ausnahme der Taxol-Behandlung identisch.

3.2.7 Ein *in vitro* System zum Studium des SAC bestätigt seine Unabhängigkeit von Shugoshin

Nachdem *in vivo* keine Funktion für hSgo2 innerhalb des mitotischen *Checkpoint* nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob dieser Befund auch in einem hiervon unabhängigen *in vitro* System bestätigt werden konnte. Dazu wurden Extrakte aus abgelaichten Eiern des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet (Murray, 1991). Diese Extrakte sind natürlicherweise in Metaphase II der Meiose arretiert. Durch die Zugabe von Ca^{2+} kann dieser Arrest aufgehoben und die Extrakte in Interphase entlassen werden (Tunquist und Maller, 2003). Darüber hinaus kann in diesen Extrakten durch die Zugabe von Spermienkernen in hoher Konzentration (≥ 10.000 Kerne/ μ l) ein für somatische Zellen typisches Verhältnis zwischen DNA und Zytoplasma eingestellt werden. Unter diesen Bedingungen kann durch die Zugabe von Nocodazol ein SAC-Arrest etabliert werden, der den Übertritt in die Interphase bei Ca^{2+} -Zugabe verhindert (Minshull et al., 1994).

Zur Untersuchung der Funktionen von *Xenopus laevis* Sgo1 (XSgo1) in Meiose II-Extrakt wurde zunächst die Immundepletion von XSgo1 aus Ei-Extrakt etabliert. Dazu wurden unter Verwendung zweier rekombinanter Fragmente von XSgo1 (Aminosäuren 300-400 / 500-600; siehe Abb. 12C) polyklonale Antikörper gegen XSgo1 in Kaninchen generiert. Zur Durchführung der Immundepletion wurden diese Antikörper an magnetische Protein G-Partikel gekoppelt und frisch präparierte Ei-Extrakte anschließend für 60 min. mit den Partikeln inkubiert. Nach der Abtrennung der Partikel mittels eines Magneten wurde die Depletion der Extrakte durch Western Blot gegen XSgo1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit beiden verwendeten Antikörpern eine

nahezu vollständige Depletion von XSgo1 aus Ei-Extrakten erreicht werden konnte (siehe Abb. 29A).

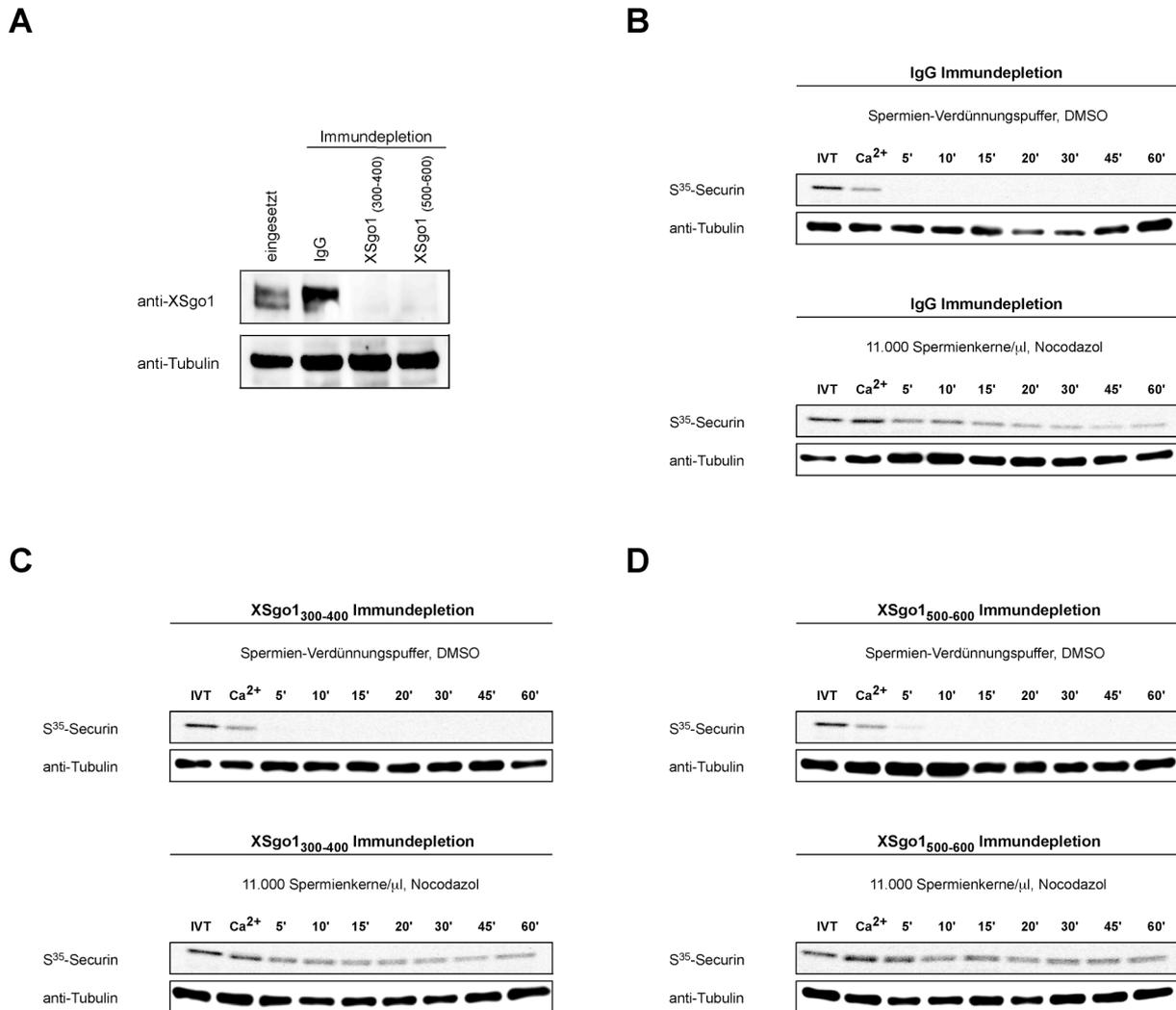


Abbildung 29: Shugoshin wird für die Funktion des SAC in *Xenopus laevis* Ei-Extrakten nicht benötigt.

(A) Western Blot zur Kontrolle der Immundepletion von XSgo1 aus Ei-Extrakten. Frisch präparierte Ei-Extrakte (100 μl) wurden mit 4 μg Kaninchen-anti-XSgo1 Antikörper oder äquivalenten Mengen unspezifischer Kaninchen-IgGs für 1 h bei 18°C immundepletiert. Zur Überprüfung der Depletion wurden jeweils 0,2 μl der Extrakte auf SDS-PAGE aufgetragen und gegen XSgo1 und α-Tubulin geblottet. (B) SAC-Etablierung in kontroll-depletierten Ei-Extrakten. Frisch präparierte Extrakte wurden mit unspezifischen Kaninchen-IgGs depletiert und mit ³⁵S-markiertem hSecurin versetzt. In diesen Extrakten wurde durch Zusetzung von Nocodazol (10 ng/μl) und Spermienkernen (11.000 Kerne/μl) für 20 min. ein SAC etabliert und die Extrakte danach durch Zugabe von CaCl₂ (0,6 mM) aus dem CSF-Arrest freigesetzt. Als Kontrolle wurden DMSO und Spermien-Verdünnungspuffer verwendet. Nach Entlassung der Extrakte aus dem natürlichen Meiose II-Arrest durch Ca²⁺-Zugabe wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Diese Proben wurden in SDS-Probenpuffer denaturiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie der Abbau von ³⁵S-

hSecurin analysiert. Die aufgetragenen Extraktmengen wurden über Western Blot gegen α -Tubulin verglichen. **(C)** SAC-Etablierung in XSgo1-depletierten Ei-Extrakten. Die Vorgehensweise ist abgesehen von der Verwendung eines Kaninchen-anti-XSgo1₃₀₀₋₄₀₀-Antikörpers zur Immundepletion der unter (B) beschriebenen identisch. **(D)** SAC-Etablierung in XSgo1-depletierten Ei-Extrakten. Die Vorgehensweise ist abgesehen von der Verwendung eines Kaninchen-anti-XSgo1₅₀₀₋₆₀₀-Antikörpers zur Immundepletion der unter (B) beschriebenen identisch. Die gezeigten Experimente wurden von Katharina Ruhnke (Universität Bayreuth) im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt.

Um eine mögliche Funktion von XSgo1 innerhalb eines künstlich etablierten SAC zu testen, wurde nun in XSgo1-depletierten bzw. kontrollbehandelten Extrakten eine Spermienkern-Konzentration von 11.000 Kernen/ μ l eingestellt. Gleichzeitig wurde Nocodazol (10 ng/ μ l) zugesetzt. Für Kontrollzwecke wurden äquivalente Volumina an Sperminenverdünnungspuffer sowie DMSO verwendet. Nach einer Inkubation der Extrakte für 20 min. bei 20°C wurden diese durch Zugabe von Ca^{2+} aus dem Metaphase II-Arrest entlassen. Um die Aktivität des APC/C in entsprechend behandelten Extrakten und damit gleichzeitig auch die Funktionalität des SAC überprüfen zu können, wurde den Extrakten jeweils *in vitro* transliertes, ^{35}S -markiertes hSecurin zugesetzt und dessen Degradation mittels SDS-PAGE und Autoradiographie verfolgt. Dabei wurde erkennbar, dass der SAC in allen untersuchten Extrakten, d.h. sowohl in kontroll-depletierten wie auch in XSgo1-depletierten Extrakten mit praktisch identischer Effizienz etabliert werden konnte. So persistiert ^{35}S -Securin sowohl in XSgo1-haltigen wie auch in XSgo1-freien Extrakten über den gesamten untersuchten Zeitraum von 60 min., wenn der SAC zuvor etabliert worden war (siehe Abb. 29B, C, D, unten). Daneben konnte sowohl für kontroll-depletierte Extrakte als auch für XSgo1-depletierte Extrakte ein effizienter Abbau von ^{35}S -Securin erhalten werden, wenn die Extrakte mit Spermienverdünnungspuffer und DMSO behandelt wurden (siehe Abb. 29B, C, D, oben). Diese Kontrollen zeigen, dass die Entlassung der Extrakte aus ihrem natürlichen Metaphase II-Arrest durch Ca^{2+} -Zugabe erfolgreich war, weshalb die beobachtete Persistenz von ^{35}S -Securin (siehe Abb. 29B, C, D, unten) auf einen erfolgreich etablierten SAC-Arrest in den zurückgeführt werden kann. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Vertebraten-Shugoshin auch für die Etablierung des SAC *in vitro* entbehrlich ist.

3.2.8 Die Depletion von Sgo2 weist auf eine aktive Funktion von Aurora B Kinase innerhalb des mitotischen SAC hin

Die Akkumulation des Mikrotubuli-depolymerisierenden Kinesins MCAK (Desai et al., 1999; Wordeman und Mitchison, 1995) an den Zentromeren solcher Chromosomen, die in Metaphase außerhalb der Äquatorialebene liegen, hängt direkt von hSgo2 ab (siehe Abb. 25I). Darüber hinaus wird diesem Kinesin eine wichtige Funktion bei der Destabilisierung von merotelischen oder syntelischen Kinetochor-Spindel-Wechselwirkungen zugeordnet (Kline-Smith et al., 2004; Walczak et al., 2002).

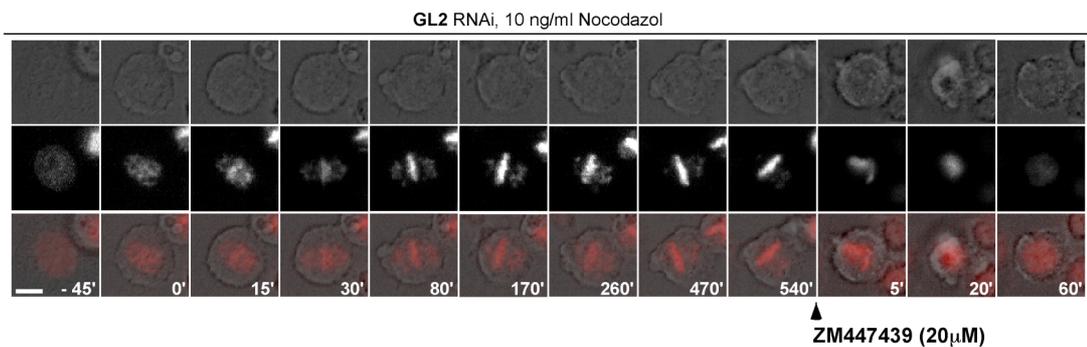
Der mitotischen Kinase Aurora B, die u.a. MCAK am Zentromer reguliert (Andrews et al., 2004; Lan et al., 2004), konnte in verschiedenen Modellsystemen eine Funktion innerhalb des mitotischen SAC zugeordnet werden. So aktivieren syntelisch mit der Spindel verbundene Kinetochore beispielsweise den SAC in einer von Aurora B abhängigen Weise (Lampson et al., 2004). Darüber hinaus wird Aurora B für die Arretierung von HeLa-Zellen in der Prometaphase in Gegenwart von Taxol sowie für Akkumulation von Mad2 und BubR1 an Kinetochoren in Gegenwart von Nocodazol benötigt (Ditchfield et al., 2003; Hauf et al., 2003; Morrow et al., 2005; Murata-Hori et al., 2002). Wie Aurora B genau in den SAC eingreift, ist aber nicht bekannt. Eine Vorstellung besteht darin, dass der Beitrag, den Aurora B Kinase zum mitotischen SAC leistet, auf der Aktivierung von MCAK beruht. Dies, so wird angenommen, führt dann zur Destabilisierung falscher Spindel-Kinetochor-Wechselwirkungen und dadurch zur Entstehung freier Kinetochore, an die dann wieder Mad1, Mad2 sowie BubR1 rekrutiert werden (Pinsky et al., 2006; Tanaka et al., 2002). In diesem Modell wäre der Beitrag von Aurora B zum mitotischen SAC indirekt und abhängig von MCAK.

Die durch hSgo2 vermittelte Rekrutierung von MCAK an Zentromere ermöglicht auf einzigartige Weise diese Abhängigkeit zu untersuchen, da die Depletion von hSgo2 in humanen Zellen selektiv die Rekrutierung und damit die Funktion von MCAK an Zentromeren verhindert, ohne dabei die Lokalisation von MCAK an die Spindel sowie an die Spindelpole zu beeinträchtigen (siehe u.a. Abb 25I). Um die Abhängigkeit der Funktion von Aurora B innerhalb des SAC von MCAK zu untersuchen, wurde daher hSgo2 in HeLa K-Zellen depletiert und der mitotische Arrest dieser Zellen in Gegenwart niedriger Konzentrationen von Nocodazol oder Taxol (10 ng/ml) mittels Lebend-Zell-Mikroskopie untersucht (siehe Abb. 30). Die Zellen wurden dabei vom Zeitpunkt des Zusammenbruchs der Kernhülle (0 min.) ausgehend über mehrere Stunden hinweg analysiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl kontroll-depletierte Zellen als auch hSgo2-depletierte Zellen in Gegenwart niedriger Dosen der Spindeltoxine Nocodazol

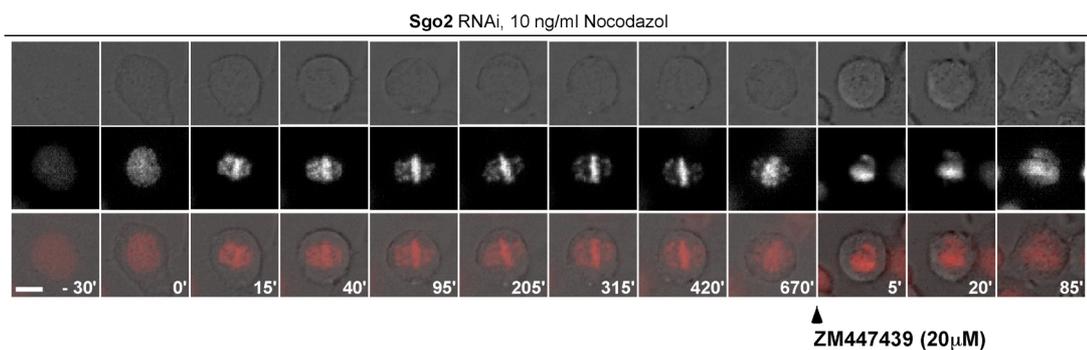
Ergebnisse

und Taxol in der Mitose zu arretieren vermochten (siehe Abb. 30A, B, C und D). So wiesen beide Zellpopulationen über mehrere Stunden hinweg eine abgerundete Morphologie sowie einen hohen Grad von Kondensation des Chromatins auf. Beide Merkmale sind gleichsam charakteristisch für mitotische Zellen. Dies zeigt erneut, dass HeLa-Zellen unabhängig von der Gegenwart/Abwesenheit von hSgo2 in Mitose zu arretieren vermögen (siehe Abb. 30A, B, C und D; Bilder links des Pfeils) und damit abermals, dass hSgo2 für den SAC nicht benötigt wird. Gleichzeitig zeigt dieser Befund, dass eine Lokalisation des mitotischen Kinesins MCAK am Zentromer für die Funktion des mitotischen SAC ebenfalls nicht benötigt wird. (siehe Abb. 25I; Abb. 30A, B, C und D; Bilder links des Pfeils).

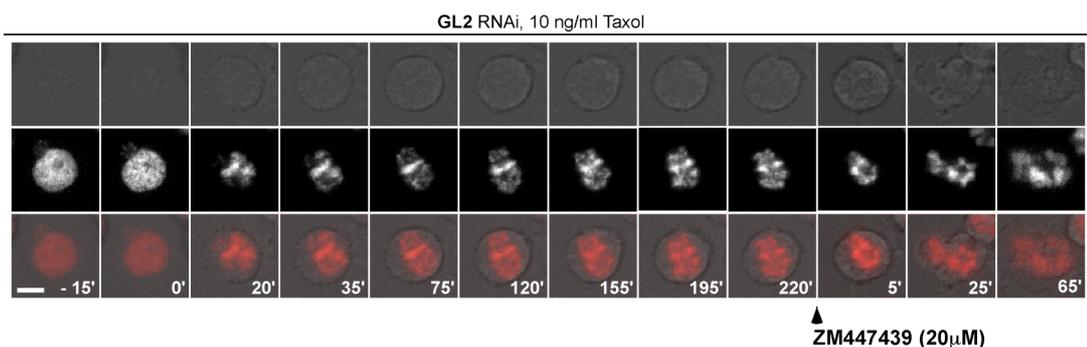
A



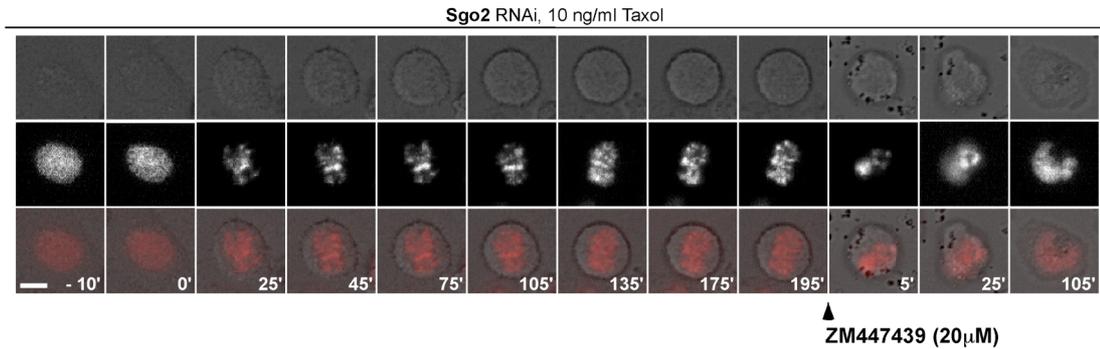
B



C



D



E

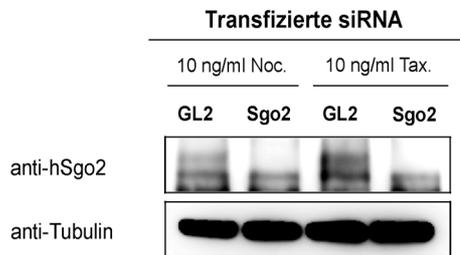


Abbildung 30: Aurora B aber nicht zentromerisch lokalisiertes MCAK wird für den mitotischen SAC benötigt.

(A) HeLa K-Zellen wurden mit GL2-spezifischer siRNA transfiziert und 3h vor Beginn der Mikroskopie mit Nocodazol (10 ng/ml) behandelt. Die erste Dokumentation erfolgte über 16 h, wobei Bilder in 5 Minuten-Intervallen aufgenommen wurden. Danach wurde ZM447439 (20 μ M) zugegeben und die Zellen für weitere 6h mikroskopisch gefilmt. Gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen einer Zelle über einen Zeitraum von 600 Minuten (obere Reihe), die durch die stabile Expression von mCherry-Histon H2B detektierte chromosomale DNA (mittlere Reihe) sowie die Überlagerung von Phasenkontrast und DNA (untere Reihe). Die angegebenen Zahlen entsprechen der Zeit in Minuten bezogen auf den Zeitpunkt des mitotischen Eintritts (0', links) bzw. der ZM447439-Zugabe (0', rechts). (B) Die Vorgehensweise ist abgesehen von der Transfektion von hSgo2-spezifischer siRNA der unter (A) beschriebenen identisch. Gezeigt sind Aufnahmen der Zelle über einen Zeitraum von 755 Minuten. (C) HeLa K-Zellen wurden mit GL2-spezifischer siRNA transfiziert und 3h vor Beginn der Mikroskopie mit Taxol (10 ng/ml) behandelt. Die erste Dokumentation erfolgte über 16 h, wobei Bilder in 5 Minuten-Intervallen aufgenommen wurden. Danach wurde ZM447439 (20 μ M) zugegeben und die Zelle für weitere 6h mikroskopisch gefilmt. Gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen einer Zelle über einen Zeitraum von 285 Minuten (obere Reihe), die durch die stabile Expression von mCherry-Histon H2B detektierte chromosomale DNA (mittlere Reihe) sowie die Überlagerung der Phasenkontrast und DNA (untere Reihe). Die angegebenen Zahlen entsprechen der Zeit in Minuten bezogen auf den Zeitpunkt des mitotischen Eintritts (0', links) bzw. der ZM447439-Zugabe (0', rechts). (D) Die Vorgehensweise ist abgesehen von der Transfektion von hSgo2-spezifischen siRNA der unter (C) beschriebenen identisch. Die Größenmaßstäbe entsprechen 10 μ m. (E) Western Blot zur Kontrolle der Depletion von hSgo2 in HeLa K-Zellen. Von transfizierten Zellen wurden Aliquots entnommen, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Lysate wurden durch Western Blot gegen hSgo2 und α -Tubulin analysiert.

Um nachzuweisen, dass die Kinase-Aktivität von Aurora B für den SAC hingegen essentiell ist, wurde nach mehreren Stunden der Aurora B-spezifische Inhibitor ZM 447439 (Ditchfield et al., 2003) zugegeben und die Zellen weiter beobachtet. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition von Aurora B innerhalb relativ kurzer Zeit (ca. 40 bis 120 min.) zu einer Dekondensation des Chromatins sowie zu Abflachen der Zellen führt (siehe Abb. 30A, B, C und D; Bilder rechts des Pfeils). Dies lässt darauf schließen, dass die Inhibition von Aurora B Kinase-Aktivität zu einer Freisetzung der Zellen aus dem SAC-Arrest und damit zum Austritt aus der Mitose führt. Dieses Ergebnis in Verbindung mit einem in Abwesenheit von hSgo2 funktionsfähigen SAC zeigt erstmals, dass die Funktion von Aurora B innerhalb des SAC unabhängig von zentromerisch lokalisiertem MCAK ist. Demnach beruht diese Funktion von Aurora B innerhalb des mitotischen SAC nicht auf der Generierung freier Kinetochore aufgrund von Rekrutierung des Mikrotubuli-destabilisierenden Kinesins MCAK an Zentromere, sondern auf einem anderen, alternativen Mechanismus. Diese Aussage wird durch eine in 2007 veröffentlichte Studie gestützt, in der die SAC-Funktion von Aurora B ebenfalls von der Korrektur fälschlicher Spindel-Kinetochor-Anheftungen entkoppelt werden konnte (Vader et al., 2007).

4. Diskussion

4.1 Humanes Shugoshin-2 besitzt keine essentiellen Funktionen während der Mitose

Im Rahmen der ursprünglichen Beschreibung von Shugoshin konnten im Menschen zwei Orthologe der Shugoshin-Familie (hSgo1 und hSgo2) identifiziert werden, die beide sowohl in Mitose als auch in Meiose exprimiert werden (Kitajima et al., 2004). Durch Charakterisierung von Depletions-Phänotypen in humanen Zellkulturen konnte zunächst gezeigt werden, dass hSgo1 für die Aufrechterhaltung der Chromatidkohäsion im Bereich des Zentromers während der frühen Mitose essentiell benötigt wird (McGuinness et al., 2005; Salic et al., 2004). Im Jahre 2006 wurde dann berichtet, dass hSgo2 angeblich analog zu hSgo1 für den Erhalt von zentromerischer Kohäsion in Prophase von Mitose benötigt werde (Kitajima et al., 2006). Weiterhin wurde behauptet, dass hSgo2 eine besondere Stellung während der Erhaltung von Kohäsion zukäme, da ausschließlich hSgo2 die zentromerische Lokalisation von Protein-Phosphatase 2A (PP2A) vermitteln könne (Kitajima et al., 2006). Bei der funktionellen Untersuchung von hSgo2 im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine Defekte in der Schwesterchromatidkohäsion von hSgo2-depletierten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 23D, G). Dieser Befund wird durch mehrere Publikationen gestützt, die eine Funktion von Sgo2 in der Aufrechterhaltung der Chromatidkohäsion in Mitose von Säugern ebenfalls verneinen (Huang et al., 2007; Llano et al., 2008). Da PP2A für den Erhalt von zentromerischer Kohäsion von essentieller Bedeutung ist, folgt weiterhin, dass entgegen anderer Behauptungen die Rekrutierung von PP2A an Zentromere nicht nur von hSgo2 abhängen kann.

Eine andere, in der Literatur beschriebene Funktion von hSgo2 besteht in der Korrektur nicht-amphitelischer Spindel-Kinetochor-Wechselwirkungen (Huang et al., 2007). In somatischen Säugerzellen nimmt Sgo2 diese Funktion angeblich durch die Rekrutierung des Mikrotubuli-depolymerisierenden Kinesins MCAK an Zentromere wahr. Ein Wegfall dieser Funktion führt laut *Huang et al.* (2007) zu einer signifikanten Verlängerung der Zeitdauer, die Sgo2-depletierte Zellen zum Durchlaufen der Mitose benötigen. Diese Daten stehen im Widerspruch mit den Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurden, da bei der Untersuchung der mitotischen Progression von hSgo2-depletierten Zellen praktisch keine Zeit-Unterschiede gegenüber Kontroll-

zellen detektiert werden konnten (siehe Abb. 24). Darüber hinaus hinterfragen diese Daten die postulierte Schlüsselfunktion von hSgo2 innerhalb des Mechanismus, über den amphitelische Wechselwirkungen zwischen der Spindel und Kinetochoren erreicht werden. Für eine entsprechende Funktion von hSgo2 spricht zwar, dass hSgo2 für die zentromerische Lokalisation von MCAK benötigt wird (Huang et al., 2007; Parra et al., 2009), und dass diesem Kinesin laut Literatur eine wichtige Funktion bei der Korrektur nicht-amphitelischer Wechselwirkungen zukommt (Kline-Smith et al., 2004; Walczak et al., 2002). Durch die von MCAK abhängige Destabilisierung nicht-amphitelischer Spindel-Kinetochor-Interaktionen werden diese gelöst, d.h. es entstehen wieder freie Kinetochore, die dann erneut mit der Spindel in Wechselwirkung treten können. Dieser Mechanismus wird als *Search and Capture* bezeichnet. Eine Abhängigkeit der zentromerischen Lokalisation von MCAK von hSgo2 konnte in dieser Arbeit zwar bestätigt werden (siehe Abb. 25G, H, I), die in der Literatur beschriebenen Segregationsdefekte, die durch die Depletion von MCAK hervorgerufen werden (Kline-Smith et al., 2004; Maney et al., 1998; Walczak et al., 2002) konnten durch die Depletion von hSgo2 aber nicht reproduziert werden. Eine Erklärung hierfür könnte darin bestehen, dass im Gegensatz zu der Depletion von MCAK die Depletion von hSgo2 nur mit der zentromerischen Lokalisation von MCAK interferiert, während die Lokalisation von MCAK an die Spindel und an Zentrosomen nicht beeinträchtigt wird (siehe Abb. 25I und nicht gezeigte Daten). Da MCAK auch Funktionen bei der Etablierung der Spindel zugeordnet werden (Ganem et al., 2004), könnte diese Entkopplung in der Lokalisation von MCAK eine Erklärung dafür liefern, weshalb hSgo2-depletierte Zellen nicht die selben Defekte zeigen, die für MCAK-depletierte Zellen beschrieben sind. Ob MCAK per se für die akkurate Segregation des genetischen Materials in der Mitose benötigt wird, ist allerdings offen, da mehrere Arbeitsgruppen beobachtet haben, dass die Depletion von MCAK keine nennenswerten Segregationsdefekte hervorruft (Stefan Hümmer und Thomas U. Mayer; Ulf Klein und Erich Nigg, persönliche Mitteilungen).

Schließlich wurde beschrieben, dass hSgo2-depletierte Zellen die Mitose auch in der Gegenwart von Chromosomen verlassen, deren Kinetochore in Folge nicht-amphitelischer Spindelanheftung keine Zugspannung erfahren (Huang et al., 2007). Dies deutet auf Defekte entsprechender Zellen in ihrer Fähigkeit hin, ein persistierendes SAC-Signal aufrechterhalten zu können. Bei der Untersuchung der Funktionalität

des SAC in hSgo2-depletierten Zellen konnten jedoch keine Defekte im Ansprechverhalten des SAC detektiert werden (siehe Abb. 28). Stattdessen arretieren hSgo2-depletierte HeLa-Zellen in Gegenwart variabler Konzentrationen von Nocodazol oder Taxol mit identischer Effizienz wie Kontrollzellen. Dem entsprechend konnten auch keine Defekte in der Lokalisation von SAC-Faktoren in Abwesenheit von hSgo2 festgestellt werden (siehe Abb. 21 und 27). Diese Daten werden darüber hinaus durch die Untersuchung des SAC anhand eines *in vitro* Systems bestätigt, die ebenfalls ergaben, dass Vertebraten-Shugoshin für die Funktionalität des SAC nicht benötigt wird (siehe Abb. 29). Zusammengenommen stellen diese Daten eine Funktion von hSgo2 innerhalb des SAC zumindest in somatischen Säugerzellen in Frage. Ferner stimmen die, in dieser Arbeit erhaltenen Daten mit einer in 2008 veröffentlichten Studie überein, in der anhand von embryonalen Sgo2^{-/-} Mäuse-Fibroblasten ebenfalls gezeigt wurde, dass Sgo2 keine essentielle Funktion in der Mitose von Säugern zukommt (Llano et al., 2008). Diese Studie berücksichtigte jedoch nicht, dass die Maus im Gegensatz zu anderen Säugern, in denen Shugoshin-2 beschrieben wurde, über zwei voneinander unabhängige Gene für zwei eng verwandte Versionen von Sgo2 verfügt, die auf den Chromosomen 1 bzw. 8 kodiert sind (Zugriffs-Nummer: NM_199007 und XP_146372 in der Datenbank des „*National Centers for Biotechnology Information*“; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Gene sowohl in somatischen Geweben als auch in Geweben der Keimbahn (Hoden) exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Sachverhalt blieb bei der oben erwähnten Studie unberücksichtigt, da hier nur die beiden Allele des auf Chromosom 1 gelegenen Sgo2-Gens ausgeschaltet wurden. Obwohl in dieser Studie bestätigt wurde, dass das Fehlen von Sgo2 die Lokalisation von MCAK an Zentromeren verhindert (Llano et al., 2008), kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass mögliche zusätzliche Funktionen von mSgo2 aufgrund von Komplementation durch das zweite mSgo2-Ortholog nicht detektiert werden konnten.

4.2 Identifikation von Shugoshin als Mad1/Cdc20-ähnlichen

Bindepartner von Mad2 in Vertebraten

In der vorliegenden Arbeit wird eine molekulare Wechselwirkung zwischen dem 2004 identifizierten Kohäsion-beschützenden Protein Shugoshin und dem zentralen Faktor des *Spindle Assembly Checkpoint*, Mad2, in Vertebraten beschrieben. Da Shugo-

shine in Vertebraten sowohl in der Mitose als auch in der Meiose exprimiert werden, wurde die biochemische Charakterisierung dieser Wechselwirkung vornehmlich unter Verwendung somatischer Säugerzellkulturen durchgeführt. Diese eignen sich aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit und einfachen Handhabung grundsätzlich besser für biochemische und zellbiologische Untersuchungen als Keimbahnzellen. Durch die Anwendung vielfältiger biochemischer Techniken wird gezeigt, dass die Wechselwirkung zwischen Shugoshin und Mad2 mit denen, die in der Literatur für Mad2 beschrieben sind, extrem ähnlich ist. So wird u.a. gezeigt, dass Shugoshine analog den für Mad1 und Cdc20 publizierten Daten (Luo et al., 2000, 2002) eine direkte Wechselwirkung ausschließlich mit der geschlossenen Konformation von Mad2 eingehen können, nicht jedoch mit der offenen. Weiterhin wird gezeigt, dass Shugoshin, Mad1 oder Cdc20 nicht gleichzeitig mit einem Molekül von Mad2 wechselwirken können. Darüber hinaus besitzt ein Komplex bestehend aus einem N-terminalen Fragment von Shugoshin sowie geschlossenem Mad2 die Fähigkeit, offenes Mad2 zu rekrutieren, genauso wie das ein entsprechender Mad1-Mad2-Komplex vermag. Schließlich wird gezeigt, dass die Shugoshin-Mad2 Wechselwirkung gleichermaßen in Phyla, die über zwei Shugoshine verfügen (Säuger) wie auch in solchen, in denen nur ein Shugoshin vorliegt (Amphibien), konserviert ist. Dem entsprechend konnte sowohl in humanem Sgo2 als auch in *Xenopus laevis* Sgo1 jeweils ein Mad1/Cdc20-ähnliches Mad2-interagierendes Motiv (MIM) identifiziert werden, das sich an den in allen Shugoshinen enthaltenen N-terminalen *Coiled Coil*-Bereiches anschließt. Mit Hilfe von bioinformatischen Datenbankrecherchen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass dieses Motiv innerhalb der Vertebraten konserviert ist (siehe Abb. 31). Folgerichtig konnte auch in Shugoshin-2 aus *Mus musculus* ein Mad2-Interaktionsmotiv nachgewiesen werden.

Diese Daten hinterfragen das zentrale Dogma, das dem SAC ursprünglich zugrunde gelegt wurde. Dieses Dogma beschreibt den Mechanismus, über den der SAC ein aktives *Wait Anaphase*-Signal erzeugt und dadurch die Aktivität des APC/C^{Cdc20} in Prometaphase effizient blockiert. Dabei wird von *einer* „Signalquelle“ ausgegangen, die dem kinetochorständigen Mad1-Mad2-Komplex entspricht, und von *einem* „Zielsubstrat“, das dem Co-Faktor des APC/C in der frühen Mitose, Cdc20, entspricht, (Musacchio und Salmon, 2007). Die Identifizierung einer Mad1/Cdc20-ähnlichen Wechselwirkung von Shugoshin mit Mad2 ist daher überraschend. Gleichzeitig ergibt

sich die Frage, ob es sich bei Shugoshin-Mad2 um eine, dem Mad1-Mad2-Komplex analoge Quelle für ein *Wait Anaphase*-Signal handelt, oder ob Shugoshin einem Cdc20-ähnlichen Zielsubstrat des SAC entspricht. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, diese Frage mit Hilfe biochemischer Ansätze zu beantworten. So konnte gezeigt werden, dass hSgo2 in einer Hinsicht Cdc20 noch mehr ähnelt als Mad1: Während ein N-terminales Fragment von hMad1 eine best. Punktmutante von hMad2 (S195D) noch binden kann, vermögen entsprechende Fragmente von hSgo2 und hCdc20 dies nicht mehr (siehe Abb. 19).

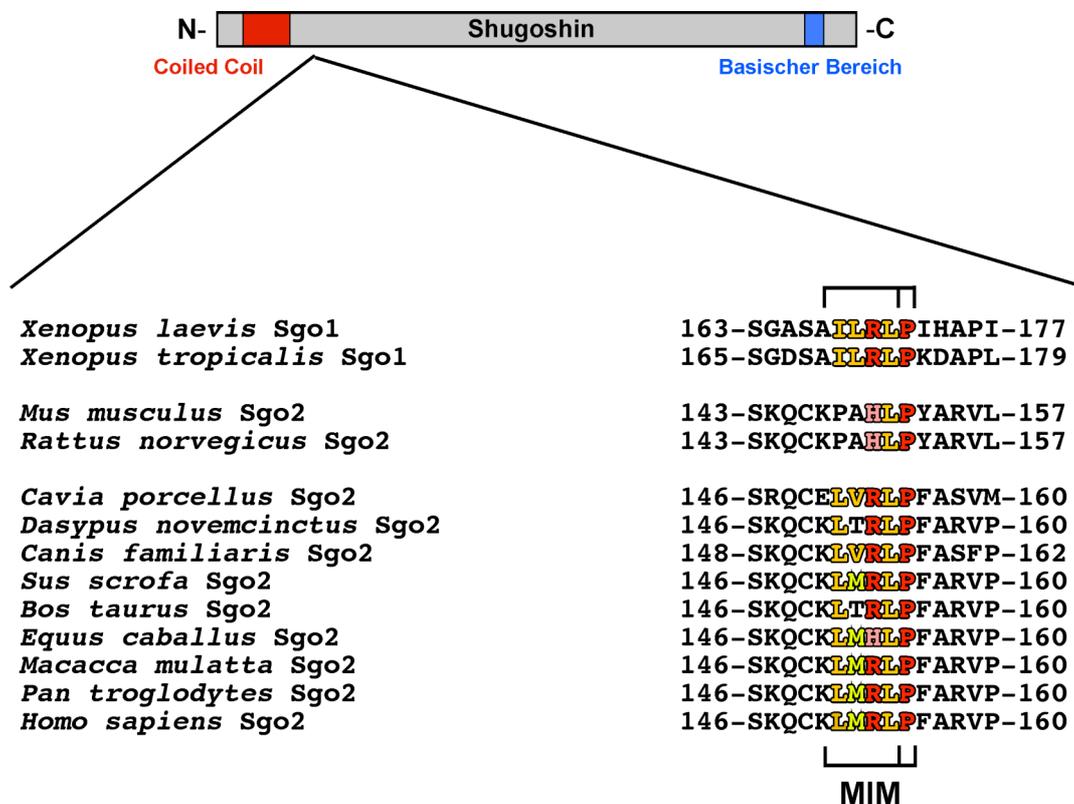


Abbildung 31: Konservierung des Mad2-Bindemotivs in Vertebraten Shugoshin.

Das Mad2-bindende Motiv (MIM) in Shugoshin befindet sich grundsätzlich C-terminal der N-terminalen *Coiled Coil*-Region (rot), die ein Charakteristikum für alle Vertreter der Shugoshin-Familie darstellt. Entsprechend den für Mad1 und Cdc20 beschriebenen Mad2-Bindemotiven (Luo et al., 2000, 2002) beinhaltet das in Shugoshinen gefundene Bindemotiv grundsätzlich einen basischen Aminosäurerest (rot), der N-terminal von zwei und C-terminal von einem hydrophoben Aminosäurerest (gelb) flankiert ist. An diese vier Aminosäuren schließen sich in der Regel C-terminal mehrere Proline an, was mit den für Mad1 und Cdc20 veröffentlichten Daten (Luo et al., 2002) ebenfalls übereinstimmt. Das dargestellte Alignment zeigt die Konservierung dieses Motivs innerhalb der Vertebraten; die dargestellten Daten sind aus der Gemeinschaftsdatenbank des „European Bioinformatics Institutes“ und des „Wellcome Trust Sanger Institutes“ (<http://www.ensembl.org/>) entnommen.

Andere Befunde zeigen hingegen besondere Parallelen zwischen Mad1 und Shugoshin. So ist die Wechselwirkung zwischen hShugoshin-2 und Mad2 beispielsweise

nicht zellzyklusabhängig (siehe Abb. 9C). Während entsprechende Daten für die Wechselwirkung zwischen Mad1 und Mad2 beschrieben sind (Chen et al., 1999), ist die Assoziation von Cdc20 mit Mad2 auf die frühe Mitose beschränkt (Li et al., 1997; Wassmann et al., 1998). Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen Shugoshinen und Mad1 besteht in der Eigenschaft beider Proteine, über *Coiled Coil*-Domänen zu dimerisieren (Gregan et al., 2007; Sironi et al., 2002; Xu et al., 2009). Ferner sind sowohl die relative Anordnung als auch der Abstand zwischen den *Coiled Coil*-Domänen und den MIMs in beiden Proteinen nahezu gleich. Aufgrund dieser *in vitro* Analysen kann also nicht entschieden werden, ob Shugoshin am Anfang oder am Ende der Signaltransduktionskaskade des SAC steht. Die biochemischen Experimente sind sogar am ehesten mit einem Modell in Einklang zu bringen, bei dem Shugoshin sowohl als Quelle als auch als Substrat des *Wait Anaphase*-Signals fungiert. In der Tat schließen sich diese möglichen Funktionen gegenseitig nicht aus (siehe unten).

4.3 Potenzielle Funktionen der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung in Meiose

Aufgrund des hier nachgewiesenen Fehlens essentieller Funktionen von Sgo2 in der Mitose von Säugern sowie von veröffentlichten Daten (Lee et al., 2008; Llano et al., 2008), ist davon auszugehen, dass die primäre Funktion von Sgo2 in Säugern in der Meiose vorliegt. So wurde sowohl anhand eines *Knock Out* (KO) als auch eines *Knock Down* (KD) Ansatzes gezeigt, dass Sgo2 für den Erhalt von zentromerischer Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden während der ersten Reifeteilung von Mäuse-Oozyten benötigt wird (Lee et al., 2008; Llano et al., 2008). Es besteht daher die theoretische Möglichkeit, dass der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Schwesterchromatidkohäsion in Meiose I zukommt, die ja erwiesenermaßen von Sgo2 abhängig ist. Für diesen Fall wäre anzunehmen, dass die Verhinderung der Interaktion zwischen Sgo2 und Mad2 und damit auch eine Depletion von Mad2 zu einer frühzeitigen Trennung der Schwesterchromatide schon in der ersten Reifeteilung führen würde. Da ein entsprechender Phänotyp jedoch für Mad2-depletierte Oozyten nicht nachgewiesen werden konnte (Homer et al., 2005, 2005; Niaux et al., 2007), ist anzunehmen, dass Mad2 nicht als Co-Faktor der Sgo2-abhängigen Protektion von Kohäsion fungiert und dass der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung eine andere Funktion innerhalb der Meiose zukommt.

Interessanterweise führt die Depletion von Mad2 oder die Expression Mad2-bindedefizienter Mutanten von hSgo2 zu einer Fehllokalisierung von hSgo2 an die Randbereiche des Zentromers. Ausgehend von diesen Daten kann eine mögliche Rolle von hSgo2 und des SAC innerhalb der Monoorientierung von Schwesterkinetochoren während der ersten Reifeteilung vermutet werden. Um eine ordnungsgemäße Segregation der Homologen in Meiose I zu gewährleisten, müssen die Schwesterkinetochore eines jeden homologen Chromosoms fusionieren und mit Mikrotubuli, die von ein und demselben Spindelpol ausgehen, Verbindung aufnehmen (Monoorientierung). Demgegenüber erfordert die Verteilung der Schwesterchromatiden in Meiose II eine Wechselwirkung der nun als eigene Einheiten agierenden Schwesterkinetochore mit den gegenüberliegenden Spindelpolen (Biorientierung) (Page und Hawley, 2003). Der Mechanismus der Monoorientierung von Kinetochoren wurde in den vergangenen Jahren ausführlich untersucht. Bereits im Jahre 2000 wurde anhand der Spermatozyten von Grashüpfern gezeigt, dass das Segregationsmuster der Chromosomen während beider meiotischer Reifeteilungen (und damit die Unterscheidung zwischen Monoorientierung in Meiose I und Biorientierung in Meiose II) durch intrinsische Eigenschaften der Chromosomen determiniert werden (Paliulis und Nicklas, 2000). In der Bäckerhefe konnte darüber hinaus ein Meiose-spezifischer Proteinkomplex identifiziert werden, der in der ersten Reifeteilung an Kinetochoren lokalisiert und entsprechend seiner Funktion als Monopolin-Komplex bezeichnet wird. Dieser Komplex wird für monopolare Spindelanheftung von Schwesterkinetochoren in Meiose I essentiell benötigt (Rabitsch et al., 2003; Toth et al., 2000). Für die Spalthefe wurde hingegen gezeigt, dass die räumliche Verteilung von Kohäsin innerhalb des Zentromers für die Diskriminierung zwischen monopolarer und bipolarer Spindelanheftung der Schwesterkinetochore während Meiose I eine entscheidende Rolle spielt (Sakuno et al., 2009). In dieser Studie wurde gezeigt, dass Kohäsin, das im zentralen Bereich des Zentromers lokalisiert ist, spezifisch die Monoorientierung von Kinetochoren vermittelt, während perizentromerisches, d.h. in den Randbereichen des Zentromers lokalisiertes Kohäsin die Biorientierung von Kinetochoren vermittelt (Sakuno et al., 2009). Diese Beobachtung wird durch verschiedene Daten gestützt. So wurde gezeigt, dass das Scc1-Homolog Rad21 in *S. pombe* bevorzugt an perizentromerisches Chromatin lokalisiert, während die meiotische Kohäsin-Untereinheit Rec8 gleichermaßen an perizentromerische wie auch an zentrale Bereiche des Zen-

tromers lokalisiert (Yokobayashi et al., 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Austausch von Rec8 durch Rad21 während der ersten Reifeteilung zu einer Äquationsteilung anstelle der sonst üblichen Reduktionsteilung führt (Yokobayashi et al., 2003) und dass der spezifische Verlust von Kohäsion im Bereich des inneren Zentromers die Monoorientierung von Schwesterkinetochoren in Meiose I verhindert (Yokobayashi und Watanabe, 2005). Identische Daten wurden auch für Pflanzen und damit für weitere Organismen erhalten, die analog zu *S. pombe* über ein Meiose-spezifisches Shugoshin-Homolog verfügen (Cai et al., 2003; Chelysheva et al., 2005; Yu und Dawe, 2000).

Die Persistenz von zentromerischer Kohäsion während Meiose I hängt maßgeblich von Shugoshin ab (Katis et al., 2004; Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004). In der Meiose von Säugern kommt diese Funktion Sgo2 zu (Lee et al., 2008; Llano et al., 2008). Unter Einbeziehung der oben dargelegten Daten ist zu postulieren, dass eine spezifische Protektion von Rec8 im Bereich des inneren Zentromers durch Sgo2 eine Voraussetzung für die monopolare Anheftung von Schwesterkinetochoren an die Meiose I-Spindelfasern darstellt. Die Beobachtung, dass in Mitose sowohl wild-typisches hSgo2 in Abwesenheit von Mad2 als auch Mad2-bindedefiziente hSgo2-Mutanten an Randbereiche des Zentromers fehllokalisieren (siehe Abb. 22B und 26E), impliziert eine Funktion von Mad2 in der Feinlokalisierung von Sgo2 und damit möglicherweise in der Monoorientierung von Schwesterkinetochoren in der Meiose I von Säugern. Die Wechselwirkung zwischen hSgo2 und Mad2 könnte demnach für die spezifische und fortgesetzte Lokalisation von hSgo2 an zentrale Bereiche des Zentromers benötigt werden. Tatsächlich wurde berichtet, dass die Delokalisation von Sgo2 in *S. pombe* zu Biorientierung von Schwesterkinetochoren in Meiose I führt (Hauf et al., 2007; Rabitsch et al., 2004; Vanoosthuyse et al., 2007; Vaur et al., 2005).

Eine weitere Funktion von Sgo2 in der Meiose von Säugern könnte der eines Mad1-ähnlichen Co-Faktors von Mad2 innerhalb des SAC entsprechen. Ein entsprechender Hinweis wird durch die Literatur angegeben (Llano et al., 2008). In dieser Studie wurde gezeigt, dass etwa 60 % der Spermatozyten von Sgo2 KO Mäusen die Meiose II durchlaufen und zu allerdings aneuploiden Spermien maturieren. Da jedoch in Folge des Verlusts von zentromerischer Kohäsion im Verlauf der ersten Reifeteilung keine amphitelische Spannung zwischen Schwesterkinetochoren etabliert werden

kann, wäre in diesem Fall zu erwarten, dass entsprechende Spermatozyten mit aktiviertem SAC in der Meiose II arretieren. Dieser Befund deutet auf eine zumindest teilweise Kompromittierung des SAC hin. Einen weiteren Hinweis auf eine Funktion von Shugoshin innerhalb des meiotischen SAC geben Daten, die gleichermaßen in Spalthefe und in Bäckerhefe erhalten wurden. Diese Daten zeigen übereinstimmend, dass Shugoshin-defiziente Zellen einen Defekt im spannungsabhängigen Zweig des SAC aufweisen und ihre Fähigkeit zur Korrektur nicht-amphitelischer Spindel-Kinetochor-Wechselwirkungen verloren haben (Fernius und Hardwick, 2007; Indjeian et al., 2005; Kawashima et al., 2007; Kiburz et al., 2008; Vanoosthuyse et al., 2007). Für Spalthefe konnte dabei gezeigt werden, dass Sgo2 für die Lokalisation der Aurora B Kinase am Zentromer benötigt wird, und dass deren Fehllokalisierung den Defekt von Sgo2-freien Zellen erklärt (Kawashima et al., 2007; Vanoosthuyse et al., 2007). Obwohl Yu und Koshland 2007 die gleiche Abhängigkeit in Bäckerhefe beobachteten, widersprechen dem mehrere andere Gruppen, die keinen Einfluss von *S. cerevisiae* Sgo1 auf die Lokalisation von Ipl1, dem Aurora B-Homolog in *S. cerevisiae*, sehen (Fernius und Hardwick, 2007; Kiburz et al., 2008; Zuzana Storchova, persönliche Mitteilung). Es kann also nicht entschieden werden, ob Hefe-Shugoshin seine Rolle im spannungsabhängigen Zweig des SAC nur durch Rekrutierung von Aurora B ausübt oder aufgrund einer von dieser SAC-Kinase unabhängigen, zusätzlichen Funktion. Letztere wäre besonders interessant, da sie möglicherweise in der Wechselwirkung mit Mad2 bestehen könnte. Erste Hinweise auf eine Konservierung der Shugoshin-Mad2-Wechselwirkung in Bäckerhefe wurden durch Far Western Blots erhalten (Anna Karlsson, Bernd Mayer und Olaf Stemmann, unveröffentlichte Daten).

4.4 Experimentelle Ansätze zur Bestimmung der Funktion der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung in der Meiose von Säugern

Die Untersuchung der oben angeführten Funktionen, die für die Wechselwirkung von Sgo2 mit Mad2 während der Meiose in Säugern vorstellbar sind, erfolgt gegenwärtig in Zusammenarbeit mit Dr. Mary Herbert (Universität Newcastle, UK).

Dazu wurde zunächst die durch Morpholino-Oligonukleotide vermittelte Depletion von mSgo2 aus Mäuse-Oozyten etabliert (Lisa Lister und Mary Herbert, unveröffentlichte Daten). Diese Technik ermöglicht sowohl die Analyse des Depletions-Phänotyps von mSgo2 als auch die Untersuchung von Mad2-bindedefizienten Mutanten, die nach

Injektion entsprechender mRNAs in depletierten Oozyten exprimiert werden können. Auf der Basis der hier für humanes Sgo2 gezeigten Daten (siehe Abb. 14) werden gegenwärtig entsprechende Mutanten von mSgo2 generiert, die dann für die beschriebenen *Rescue*-Experimente verwendet werden sollen. Zur Untersuchung der Abhängigkeit des meiotischen SAC von mSgo2 werden entsprechend depletierte Oozyten mit Spindelgiften in verschiedenen Dosen behandelt. Dabei können sowohl Effekte auf das Ansprechverhalten des SAC in Abwesenheit von Spindelanheftung der Kinetochore als auch auf nicht unter Spannung stehende Spindelanheftungen untersucht werden. Dies geschieht durch die Behandlung der Oozyten mit Spindeltoxinen wie Nocodazol bzw. Taxol. Darüber hinaus ermöglicht das Maussystem die Untersuchung beider meiotischer Reifeteilungen und damit der möglichen Bedeutung von mSgo2 für den SAC in Meiose I gegenüber Meiose II.

Die Untersuchung einer möglichen Funktion der Sgo2-Mad2-Wechselwirkung innerhalb der Monoorientierung von Schwesterkinetochoren während der Meiose I (siehe oben) erfolgt durch Morpholino-vermittelte Depletion von Mad2 in Meiose I-Oozyten. Dazu wird zunächst die Feinlokalisierung von mSgo2 an Zentromeren in entsprechend behandelten Oozyten analysiert und damit überprüft, ob die in somatischen Zellen für hSgo2 beobachtete Störung der innerzentromerischen Lokalisation auch in Meiose I auftritt. In weiteren Experimenten wird untersucht werden, ob die Depletion von Mad2 in Oozyten zu einer verstärkten Fehlsegregation von Homologen während der ersten Reifeteilung in Folge von Biorientierung führt.

Wie in Abschnitt 4.1 bereits angeführt wurde, verfügt die Maus im Gegensatz zu allen anderen Säugern, in denen Shugoshin-2 beschrieben wurde, über zwei voneinander unabhängige Gene für Sgo2. Dieser Sachverhalt wurde von den beiden bisher zum Thema veröffentlichten Studien nicht berücksichtigt, da sich beide Studien nur auf das Gen mit der Zugriffsnummer NM_199007 konzentrieren. Obwohl in beiden Studien Defekte in der Aufrechterhaltung von zentromerischer Kohäsion während der Meiose I nachgewiesen wurden, kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund redundanter Funktionen des zweiten mSgo2 zusätzliche Defekte maskiert waren. Da während dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass beide Gene sowohl in somatischen Geweben als auch in Geweben der Keimbahn (Hoden) exprimiert werden, wird ebenfalls eine Analyse des zweiten Orthologs von mSgo2 (XP_146372) sowie eines kombinierten *Knockdowns* beider mSgo2s angestrebt.

5. Material und Methoden

5.1. Materialien

5.1.1 Hard- und Software

Die vorliegende Arbeit wurde auf einem Apple „Powerbook G4“ mit der Software Microsoft Word 2004 (Microsoft Corp.) angefertigt. Alle dargestellten Western Blots, SDS-Gele oder Hefepplatten wurden entweder mit Hilfe eines CCD-Kamerasystems vom Typ LAS-3000 bzw. LAS-4000 (Fuji Corp.) oder eines Scanners vom Typ Scan Maker i900 (Microtec Inc.) digitalisiert. Die weitergehende Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.). Die endgültige Darstellung erfolgte mit dem Programm Canvas 9.0 (Deneba Software Inc.). Mikroskopische Bilder wurden unter Verwendung einer Kamera des Typs 23.0 1.4 MP Monochrome (Diagnostic Instruments Inc.) sowie der Software Spot 4.5.9.1 (Visitron Systems GmbH) an einem Zeiss Axio Imager A1 Mikroskop (Carl Zeiss AG) aufgenommen und mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Mikroskopische Untersuchungen an lebenden Zellen (*Live cell imaging*) wurden mit einem Leica DMI 6000B Mikroskop (Leica AG) durchgeführt. Quantitative Messungen von Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem Delta Vision RT Dekonvolutionsmikroskop (Applied Precision Inc.) durchgeführt. Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2004 (Microsoft Corp.) vorgenommen. Zur Analyse von DNA- oder Proteinsequenzen wurde das Programm DNA-Star 6.00 (DNA Star Inc.) verwendet. Literatur- sowie Datenbankrecherchen wurden mit Hilfe des Internetservices des *National Centers for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oder des gemeinschaftlichen Internetservices des *European Bioinformatics Institutes (EBI)* sowie des *Welcome Trust Sanger Institutes* (<http://www.ensembl.org/>) durchgeführt.

5.1.2 Protokolle

Die in der Folge beschriebenen molekularbiologischen und biochemischen Methoden basieren hauptsächlich auf standardisierten Techniken (entnommen aus Ausubel et al., 1994; Sambrook et al., 1989) oder entsprechen den Anleitungen der Hersteller. Modifikationen dieser Protokolle sind ausführlich beschrieben. Für ausnahmslos alle Anwendungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

5.1.3 Chemische und biochemische Materialien

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Appli Chem, Biomol, Biorad, Calbiochem, Fermentas, Fisher Scientific, Fluka, GE Healthcare, Grüssing, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Roche, Riedel de Haen, Roth, Serva oder Sigma-Aldrich verwendet.

5.1.4 Molekularbiologische Materialien

5.1.4.1 Vektoren

Für alle in der Folge aufgeführten Vektoren ist anzumerken, dass die sog. Multiple Klonierungsstelle (MCS) deletiert und durch Schnittstellen der Restriktionsenzyme FseI und AseI (New England Biolabs) ersetzt worden ist. Die zur Expression von Proteinen in *Escherichia coli* verwendeten Vektoren sind in der folgenden Tabelle alphabetisch aufgeführt.

Vektor	Epitop-Anhang	Resistenzgen
pET31 (Novagen)	N-Ketosteroid-Isomerase, C-His ₆	Ampicillin
pGEX-4T1 (GE Healthcare)	N-Glutathion-S-Transferase	Ampicillin
pMAL-Tev ₂ (New England Biolabs)	N-Maltose-bindendes-Protein-Tev ₂	Ampicillin
pQE80 (Qiagen)	N-RGS-His ₆	Ampicillin

Die zur Expression von Proteinen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendeten Vektoren sind in der folgenden Tabelle alphabetisch aufgeführt.

Vektor	Epitop-Anhang	Resistenzgen
pACT2 (Clontech)	N-GAL4-Aktivierungsdomäne	Ampicillin
pAS2-1 (Clontech)	N-GAL4-DNA-Bindungsdomäne	Ampicillin

Die zur Expression von Proteinen in Säugerzellen nach transienter Transfektion verwendeten Vektoren sind in der folgenden Tabelle alphabetisch aufgeführt.

Vektor	Epitop-Anhang	Resistenzgen
pCS2 (Rupp et al., 1994; Turner und Weintraub, 1994)	ohne Epitop-Anhang	Ampicillin
pCS2-Flag ₃	N-Flag ₃	Ampicillin
pCS2-Flag ₃ -Tev ₂	N-Flag ₃ -Tev ₂	Ampicillin
pCS2-HA ₃	N-HA ₃	Ampicillin
pCS2-HA ₃ -Tev ₂	N-HA ₃ -Tev ₂	Ampicillin
pCS2-Myc ₆	N-Myc ₆	Ampicillin
pCS2-Myc ₆ -Tev ₂	N-Myc ₆ -Tev ₂	Ampicillin

5.1.4.2 Oligonukleotide

Die zur Klonierung von Genen oder DNA-Fragmenten verwendeten Oligonukleotide wurden grundsätzlich von MWG Biotech oder Metabion bezogen. Die zur Klonierung von hSgo1, hSgo2, hMad2, *Mus musculus* Sgo1 (mSgo1), mSgo2, mMad2, *Xenopus laevis* Sgo1 (XSgo1) und XMad2 sowie ausnahmslos alle zur Erzeugung von Punktmutanten oder Proteinfragmenten verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Kloniertes Gen	Oligonukleotid
Humanes Shugoshin-1 (Isoform A2)	5'-AATGGCCGCGCCAGGCATGGCCAAGGAAAGATGCCT-3' 5'-TTAGGCGCGCCTTACCTCAAGCAGATGTGGTT-3'
Humanes Shugoshin-2 (Isoform 1)	5'-AATGGCCGCGCCAGGCATGGAGTGCCAGTGATGGAA-3' 5'-TTAGGCGCGCCTCATCTTCTCATCTTGTCTCTGAGG-3'

Material und Methoden

Humanes Shugoshin-2 K150A	5'-GAATTAGTAAACAGTGCGCGTTGATGCGTCTTC-3'
Humanes Shugoshin-2 R153A	5'-AGTGCAAGTTGATGGCTCTTCCATTTGCAAG-3'
Humanes Shugoshin-2 N58I	5'-TATCTTTAAAGCACAAACATCAGGGCATTAGTCA-3'
	5'-TGAGCTAATGCCCTGATGTTGTGCTTTAAAGATA-3'
Humanes Shugoshin-2 (siRNA-resistent)	5'AGAAACTGAATTTTGAAGAATACGTTTCTTCGGCTTAAGCTAAATAACTTGA-3'
Humanes Shugoshin-2 (1-178)	5'-TCAAGTTATTTAGCTTAAGCCGAAGAAACGTATTCTCAAATTCAGTTTCT-3'
	5'-AATGGCCGGCCAGGCATGGAGTGCCAGTGATGGAA-3'
	5'-ATTGGCGCGCCCTAGTTGTCACACTGCATTTTCTC-3'
Humanes Shugoshin-2 (126-167)	5'-GCAGGCCGGCCAGTCTTCTGAGTTCC-3'
	5'-TTAGGCGCGCCCTTCATCATCATTGAAGTTAAT-3'
Humanes Mad1 (485-584)	5'-TAAGGCCGGCCTAGCTCTGCCGAACAGAGCTT-3'
	5'-TCAGGCGCGCCTTAGACGGTGCCTCCTCTCTC-3'
Humanes Cdc20 (1-144)	5'-TTAGGCCGGCCCATGGCACAGTTCGCGTT-3'
	5'-GGCGCGCCTAACCCCTTGCGCATTTTT-3'
Humanes Mad2	5'-TTTGGCCGGCCCATGGCGCTGCAGCTCT-3'
	5'-TTAGGCGCGCCTCAGTCATTGACAGGAATTTGTGA-3'
Humanes Mad2 ΔC_{10}	5'-TTTGGCCGGCCCATGGCGCTGCAGCTCT-3'
	5'-TTAGGCGCGCCTTAGCTATTTACTTTGTGGATTG-3'
Humanes Mad2 T109A/S114A	5'-GAGTGTGACAAGGCTGCAAAAGATGACGCTGCACCCAGAGAAAAG-3'
Humanes Mad2 T109D/S114D	5'-TGAGTGTGACAAGGATGCAAAAGATGACGATGCACCCAGAGAAAAG-3'
Humanes Mad2 S170A	5'-GAAAAATGGGAAGAGGCGGGACCACAGT-3'
Humanes Mad2 S170D	5'-CCTGAAAAATGGGAAGAGGACGGACCACAGTTT-3'
Humanes Mad2 S178A	5'-TTATTACCAATGCTGAGGAAGTCCG-3'
Humanes Mad2 S178D	5'-ATTACCAATGATGAGGAAGTCCGCCTT-3'
Humanes Mad2 S195A	5'-CCACAAAGTAAATGCCATGGTGGCCTACAA-3'
Humanes Mad2 S195D	5'-CCACAAAGTAAATGACATGGTGGCCTACAA-3'
<i>Mus musculus</i> Shugoshin-1	5'-AATGGCCGGCCCATGGCTAAGGAAAGGTGTCAG-3'
	5'-CTTGGCGCGCCTTACTGTGTTTGTCTTGGTTCTTCT-3'
<i>Mus musculus</i> Shugoshin-2	5'-TAAGGCCGGCCAGAAATGGAGTACCCAGGGATAAA-3'
	5'-TCAGGCGCGCCTATCTCCTCATCTTGCTTCTAAGG-3'
<i>Mus musculus</i> Mad2	5'-AATGGCCGGCCCATGGCACAGCAGCTCGC-3'
	5'-ATTGGCGCGCCTCAGTCATTGACAGGGTTTTGTGA-3'
<i>Xenopus laevis</i> Shugoshin-1	5'-ATAGGCCGGCCCATGGTAAAGGAAAGATGCCCAAAGCA-3'
	5'-TTAGGCGCGCCTCATCTGCGGCAGCCAACAAACT-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 S166A	5'-CTTCTGGGGCAGCTGCCATTTTGAG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 L169A	5'-GCATCTGCCATTGCGAGATTGCCAATC-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 R170A	5'-TCTGCCATTTTGGCATTGCCAATCCATG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 L171A	5'-GCATCTGCCATTGCGAGATTGCCAATCC-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 P172A	5'-ATTTTGGAGATTGGCAATCCATGCTC-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (1-207)	5'-ATAGGCCGGCCCATGGTAAAGGAAAGATGCCCAAAGCA-3'
	5'-GAAGGCGCGCCTATCTGTTGGCTTCCAAAACC-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (1-100)	5'-ATAGGCCGGCCCATGGTAAAGGAAAGATGCCCAAAGCA-3'
	5'-TTAGGCGCGCCCCCGTAAACATAAATATTTCAAATATCAACCTCTG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (101-200)	5'-ATAGGCCGGCCCCGAGGCTGCAG-3'
	5'-TTAGGCGCGCCCTTTGTCTTTGAAATTCCTTTG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (201-300)	5'-ATAGGCCGGCCCCGTGGTTTTGGAAGCCAAC-3'
	5'-TTAGGCGCGCCCCGTCGCTACTTTTCATT-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (301-400)	5'-ATAGGCCGGCCCCGAGAAATAGACAATGTTGA-3'
	5'-TTAGGCGCGCCCAGAATTCAGGGAAGAATTC-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (401-500)	5'-ATAGGCCGGCCCCGAGATGCCTTTGAC-3'
	5'-TTAGGCGCGCCCTTTGTAATTTCTTTTCATTGG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (501-600)	5'-ATAGGCCGGCCCAACGGCTTGAAAAGGAAA-3'
	5'-TTAGGCGCGCCCCGCTTGGGGTACTGG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (554-663)	5'-TAATGGCCGGCCTACAGCAGATGAACCC-3'
	5'-TTAGGCGCGCCCTCTGCGGCAGCCAACAAACTTTC-3'

Material und Methoden

<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (101-160)	5'-ATAGGCCGCCCCATGGTAAAGGAAAGATGCCCAAAGCA-3' 5'-TTAGGCGCGCCCTTTTCTTCTACTTTTGATGGATT-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (101-180)	5'-ATAGGCCGCCCCATGGTAAAGGAAAGATGCCCAAAGCA-3' 5'-TTAGGCGCGCCCTGTGTCTGAAATAGGAGC-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (121-200)	5'-ATAGGCCGCCCCGACATAATTGCCAAAGTTACG-3' 5'-TTAGGCGCGCCCTTTGTCTTTGAAATTCCTTTG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Sgo1 (141-200)	5'-ATAGGCCGCCCCACTTGCTATGTTCCAGT-3' 5'-TTAGGCGCGCCCTTTGTCTTTGAAATTCCTTTG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Mad1 (485-586)	5'-TAAGGCCGGCCTATGGGCTCATCAGATCAAACA-3' 5'-TCAGGCGCGCCTTATGGGATTTGGGCTCCC-3'
<i>Xenopus laevis</i> Mad2	5'-AATGGCCGGCCGATGGCGGGGCAGCTAACACGT-3' 5'-TTAGGCGCGCCTTAGAAAGTGTCTATCTTTTGTAT-3'
<i>Xenopus laevis</i> Mad2 ΔC ₁₀	5'-AATGGCCGGCCGATGGCGGGGCAGCTAACACGT-3' 5'-TTAGGCGCGCCTAACTATTTACTTTGTGGATGGTGG-3'
<i>Xenopus laevis</i> Mad2 R133A	5'-CGATCAGTTATAGCGCAGATTACTGC-3'
<i>Xenopus laevis</i> Mad2 R133E/ Q134A	5'-CGATCAGTTATAGAGCGATTACTGCTACTGTAAC-3'

5.1.4.3 *E. coli*-Stämme

Die zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA oder zur rekombinanten Expression von Proteinen verwendeten *E. coli*-Stämme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

XL1-Blue (Stratagene)	<i>E. coli</i> supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac ⁻ [F' pro AB lacI ^q , Lac ZdM15, Tn10 (Tet ^r)]
Rosetta 2 (Novagen)	<i>E. coli</i> F, ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm, λ Cam ^R
Rosetta 2 DE3 (Novagen)	<i>E. coli</i> F, ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm, λ (DE3 [lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5]) Cam ^R

5.1.4.4 Puffer und Medien

LB-Medium	1% Trypton (Difco) (w/v) 0,5% Hefeextrakt (Difco) (w/v) 1% NaCl (w/v)
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% Agar (w/v)

5.1.4.5 Small interfering RNAs (siRNAs)

Die zur Unterdrückung der Expression entsprechender Faktoren in Säugerzellen verwendeten *small interfering RNAs* (siRNAs) sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Unterdrücktes Gen	Verwendete <i>small interfering RNA</i>	Referenz
Luciferase (GL2)	5'-CGUACGCGGAUACUUCGAUU-3'	Elbashir et al., 2001
Humanes Shugoshin-1	5'-CAGUAGAACCUGCUAGAA-3'	McGuinness et al., 2005
Humanes Shugoshin-2	5'-GAACACAUUUUCUUGCCUAUU-3' 5'-UCGGAAGUGUUUUUUCUUAUU-3'	Huang et al., 2007 Huang et al., 2007
Humanes Bub1	5'-CCAGUGAGUUCUUAUCCAAUU-3'	Kitajima et al., 2005
Humanes BubR1	5'-CAGAAACGGGCAUUUGAAU-3'	v. Dr. S. Müller z. Vfg. gestellt
Humanes Mad1	5'-AACCAGCGGCUCAAGGAGGUU-3'	Martin-Lluesma et al., 2002
Humanes Mad2	5'-GAGUCGGGACCACAGUUUAUU-3'	Stucke et al., 2004
Humanes CENP-E	5'-ACACUUACUGCUCUCCAGUUU-3'	Stucke et al., 2004

5.1.5 Kultivierung von Säuger- bzw. *Xenopus laevis*-Zellen

5.1.5.1 Zelltypen

Die zur Expression von Proteinen, Immunpräzipitation von endogenen Proteinen sowie für mikroskopische Untersuchungen verwendeten Säugerzelllinien und *Xenopus laevis* Zelllinien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

HEK 293T	Humane, embryonale Nierenzellen; durch das sog. <i>large T Antigen</i> des Simian Virus 40 transformierte Variante der 293-Zelllinie
HeLa WT	Humane Zervix-Adenokarzinomzellen; transformiert durch humanpathogene Papillomaviren
HeLa S3	Humane Zervix-Adenokarzinomzellen; transformiert durch humanpathogene Papillomaviren; Subklon S3
HeLa K	Humane Zervix-Adenokarzinomzellen; transformiert durch humanpathogene Papillomaviren; Subklon K (stabil exprimierend: mCherry-Histon H2B und GFP-Tubulin alpha)
XTC	Embryonale <i>Xenopus laevis</i> Kaulquappen-Zellen

5.1.5.2 Puffer und Medien

FCS	Fötales Kälberserum (Biochrom)
Trypsin/EDTA (1 x konz.)	0,5 mg/ml Trypsin, 0,2 mg/ml EDTA, in PBS (PAA)
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml Penicillin G Natriumsalz 10.000 µg/ml Streptomycinsulfat, in 0,85% PBS (PAA)
Fungizone/Amphotericin B	250 µg/ml Amphotericin B (Gibco-BRL)
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH-Wert 7,4 (eingestellt mit NaOH)
Zellkulturmedien	DMEM Medium, mit 4,5 g/l Glukose (Gibco-BRL, PAA), 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin Leibovitz L15 Medium (Gibco-BRL, Sigma-Aldrich), 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B Opti-MEM Medium (Gibco-BRL)

5.1.6 Antikörper

Polyklonale Antikörper gegen humanes Shugoshin-2 (hSgo2) wurden von Bethyl (A301-261A/A301-262A) bezogen. Der Antikörper A301-261A wurde zur Durchführung von Immunpräzipitationen verwendet, während der Antikörper A301-262A für Western Blot und Immunfluoreszenz-Mikroskopie benutzt wurde. Antikörper gegen humanes Mad2 (hMad2) wurden von Bethyl (A 300-300A) bzw. von Santa Cruz (sc-47747) bezogen.

Polyklonale Antikörper gegen *Xenopus laevis* Shugoshin-1 (XSgo1) wurden unter Verwendung von gereinigten Proteinfragmenten, die den Aminosäuren 301 bis 400 oder 501 bis 600 innerhalb der Primärstruktur von XSgo1 entsprechen, in Kaninchen generiert (siehe Abschnitt 5.2.2.7).

Polyklonaler Antikörper gegen humanes MCAK wurde mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Dr. Thomas U. Mayer (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt. Polyklonale Antikörper gegen humanes BubR1 und humanes Shugoshin-1 (hSgo1) wurden durch Prof. Dr. Steven S. Taylor (Universität Manchester) und Prof. Dr. Erich Nigg (Biozentrum Basel) zur Verfügung gestellt.

Weitere verwendete Antikörper und Affinitätsmatrizes waren: Maus-anti-humane PP2A (katalytische Untereinheit C α ; Millipore, 05-421), Maus-anti-humanes Hec1 (Genetex, GTX23393), Maus-anti-humanes Bub1 (Sigma Aldrich, B0561), Maus-anti-humanes BubR1 (Sigma Aldrich, B9310), Maus-anti-humanes Mad1 (Sigma Aldrich, M8069), Maus-anti-humanes Cdc20 (Santa Cruz, sc-13162), Maus-anti-humanes Tubulin alpha (Hybridoma-Überstand, Klon 12G10), Maus-anti-Myc-Epitop (Santa Cruz, sc-789; Upstate, 05-724), Maus-anti-Myc-Agarose (Upstate, 16-219), Maus-anti-Flag-Epitop (Sigma Aldrich, F1804), Maus-anti-Flag-Agarose (Sigma Aldrich, A2220), Maus-anti-HA-Epitop (Santa Cruz, sc-805), Maus-anti-HA-Agarose (Roche, 1815016), Maus-anti-RGS-His₆-Epitop (Qiagen, 34610) sowie Protein G-Sepharose (GE Healthcare, 17-0618-01).

Unspezifische Mäuse- oder Kaninchen-IgGs wurden zu Kontrollzwecken verwendet und von Sigma-Aldrich oder Bethyl bezogen. Polyklonale, mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte Antikörper gegen Mäuse-, Kaninchen-, oder Schafs-IgG wurden von Sigma-Aldrich (A9917/A0545/A3415) oder KPL (474-1802) bezogen.

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die Klonierung von DNA-Fragmenten, die offenen Leserahmen (sog. ORFs) von Genen oder Fragmenten derselben entsprechen, erfolgte ausgehend von kommerziell erwerblichen cDNA-Banken (Clontech) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch den Verdau mit Restriktionsenzymen und anschließende enzymatische Ligation in Plasmid-Vektoren kloniert.

5.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR erfolgte unter Verwendung eines Thermocyclers vom Typ Techne TC-512. Dazu wurden 50 oder 100 ng Plasmid-DNA oder 2 μ l einer kommerziellen cDNA Bibliothek (Clontech) mit 0,25 μ l der jeweiligen 5'- und 3'-Primer (100 μ M), 1,0 μ l Desoxyribonukleotid-Mix (10 mM), 10 μ l des vom

Hersteller angegebenen Reaktionspuffers (5x) sowie 0,5 bis 1,0 µl der DNA-Polymerasen Pfu turbo (Fermentas) oder Phusion (Finnzymes) in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt. Das Reaktionsprofil der PCR-Reaktion wurde entsprechend der beabsichtigten Quantität und der Länge der zu erwartenden Produkte eingestellt.

5.2.1.2 DNA-Fragmentierung durch Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische enzymatische Restriktion von DNA wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt. Dazu wurde 0,5 bis 3 µg Plasmid-DNA mit 2 bis 10 U des/der jeweiligen Restriktionsenzym(s)/-enzyme in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50 µl gemischt. Gleichzeitig wurde eine 1-fache Konzentration des vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffers (10x) sowie gegebenenfalls von Rinderserum-Albumin (BSA) eingestellt. Der Restriktionsansatz wurde bei der enzymespezifischen Temperatur für mindestens 30 min. inkubiert.

5.2.1.3 Enzymatische Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Minimierung der Religation von Vektor-DNA während der enzymatischen Ligation wurden Vektoren nach der enzymatischen Restriktion an ihren 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde nach Hitze-Inaktivierung der Restriktionsenzyme (10 min. bei 70°C) 1 bis 5 U Alkalische Garnelen-Phosphatase (SAP; Roche) zugesetzt und der entsprechende Reaktionsansatz für mindestens 30 min. bei 37°C inkubiert.

5.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer jeweiligen Größe erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde die Agarosekonzentration zwischen 0,8 % und 2,5 % (w/v) in TBE- oder TPE-Puffer variiert. Die DNA wurde unter Anlegung einer Spannung von 10 V/cm Gellänge aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Zugabe von Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1,0 µg/ml und Beleuchtung des Gels mit UV-Licht.

TBE Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
TPE Puffer	90 mM Tris 90 mM Phosphorsäure 2,5 mM EDTA
DNA-Ladepuffer	0,25% Orange G (w/v) 25% Glycerin (v/v) 25 mM EDTA, pH 8,0

5.2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QiaEx II Gel Extraction Kits“ (Qiagen) gemäß den Vorgaben des Herstellers.

5.2.1.6 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/ New England Biolabs) in einen Vektor kloniert. Die entsprechende Reaktion wurde in einem Volumen von 10 µl mit 1 µl des vom jeweiligen Hersteller angegebenen Reaktionspuffers (10x), 1 mM ATP sowie 1 U T4 DNA-Ligase angesetzt und für mindestens 30 min. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

5.2.1.7 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien wurden Bakterien in 500 ml LB-Medium bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (Messung bei 600 nm; kurz: OD₆₀₀) von 0,6 bis 0,7 expandiert. Die Zellen wurden anschließend für 15 min. auf Eis inkubiert und danach bei 3.500 rpm für 5 min. (4°C) abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 90 ml Tfb1 Puffer resuspendiert und für weitere 15 min. auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (4.000 rpm, 5 min., 4°C) wurden die Bakterien in 15 ml Tfb2 Puffer resuspendiert und für weitere 5 min. auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TfBI Puffer	30 mM KOAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerin (v/v)
TfBII Puffer	10 mM MOPS/NaOH, pH 7,0 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15% Glycerin (v/v)

5.2.1.8 Herstellung transformationskompetenter Hefen

Die Herstellung von transformationskompetenter Bäckerhefe erfolgte entsprechend dem Protokoll nach *Knop et al.*, (1999). Dazu wurde 500 ml YPD-Medium (mit 0,02 mg/ml Adeninsulfat) mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 bei 30°C inkubiert. Nach der Zentrifugation von Aliquots zu je 50 ml (500 x g, 5 min.) wurden die Zellen einmal in Wasser und einmal in SORB gewaschen. Danach wurden die Zellen bei gleichzeitiger Zusetzung von 40 µl denaturierter Lachsspermien-DNA (Invitrogen; Denaturierung: 5 min. bei 95°C) in 360 µl SORB resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

SORB	100 mM LiOAc 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 1 M Sorbitol
------	--

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

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* wurden zwischen 20 und 50 µl kompetente *E. coli*-Bakterien mit 1 µl Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes gemischt und für mindestens 10 min. auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock (45 sec. bei 42°C) vorgenommen, gefolgt von einer erneuten Inkubation für 2 min. auf Eis. Nach Zugabe des 5- oder 10-fachen Volumens an LB-Medium wurden die Bakterien für etwa 20 min. bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Agarplatten ausgebracht, die Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml enthielten, und für mindestens 16 h bei 37°C inkubiert.

5.2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in Hefen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in Bäckerhefe wurden 15 bis 20 µl kompetente Hefezellen mit 1 µl DNA-Lösung und dem 6-fachen Volumen PEG gemischt und für 30 min. unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Vornahme eines Hitzeschocks (15 min. bei 42°C) wurden die Zellen für 3 min. bei 2.000 x g abzentrifugiert und in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert. Danach wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert und für mindestens 3 Tage bei 30°C inkubiert.

PEG	100 mM LiOAc 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 40 % PEG 3350 (w/v)
-----	---

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

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien wurde je nach Verwendungszweck zwischen 3 und 500 ml LB-Medium, dem Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt worden war, mit transformierten Bakterien beimpft und die Bakterien für mindestens 8 h bei 37°C expandiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte unter Anwendung des „Plasmid Mini Kits“ (Qiagen) oder des „Plasmid Maxi Kits“ (Qiagen).

5.2.1.12 Einführung von Mutationen durch gezielte Mutagenese

Die Einführung von Mutationen in DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des *Gene Editor* Systems (Promega). Das Prinzip dieser Methode besteht in der Verwendung von zwei Oligonukleotiden, von denen das eine für die beabsichtigte Mutation kodiert, während das andere eine Punktmutation in das Ampicillin-Resistenzgen des Vektors einführt. Dadurch entsteht eine spezifische Resistenz der Bakterien gegen ein durch den Hersteller (Promega) verkaufte Antibiotikum (*Gene Editor*), bei dem es sich um ein Ampicillinderivat handelt.

Neben der *GeneEditor* Methode wurden noch zwei weitere, auf PCR beruhende Methoden zur Erzeugung von Mutationen verwendet. Die erste wird weitläufig als *Ex Site*-Mutagenese bezeichnet und beruht auf der Replikation eines Plasmids ausgehend von zwei gegenläufigen Oligonukleotiden, die für die beabsichtigte Mutation kodieren. Der Matrizen-Plasmid wird anschließend mit der methylierungsspezifischen Restriktionsendonuklease DpnI (New England Biolabs) über einen Zeitraum von min-

destens 60 min. bei 37°C verdaut. Die zweite Methode beruht auf der vollständigen Replikation des zu mutierenden Gens mittels PCR, wobei die Replikation ausgehend von der zu mutierenden Stelle in beide Richtungen erfolgt. Die Oligonukleotide, die die Reaktion stoppen, kodieren gleichzeitig für die beabsichtigte Mutation. Durch eine zweite PCR werden die erhaltenen Genfragmente wieder miteinander fusioniert. Das mutierte Gen wird anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten und wieder in einen Vektor kloniert.

5.2.1.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte unter Anwendung des „DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kits“ entsprechend den Angaben des Herstellers (GE Healthcare). Ein Reaktionsansatz enthielt 1 µg der zu sequenzierenden DNA sowie 20 pmol des jeweiligen Oligonukleotids. Die Sequenzierung erfolgte durch die *Core Facility* des Max Planck Instituts für Biochemie, Martinsried unter Verwendung eines *AbiPrism 377 DNA-Sequenzierers* (Perkin Elmer). Alternativ wurden die DNA-Proben zu Seqlab, Göttingen geschickt.

5.2.2 Proteinbiochemische Methoden

5.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Dazu wurden kommerziell erwerbliche Gradientengele vom Typ „Sera Gel™ Neutral pH 7,4“ (Sera) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einfach konzentriertem Laufpuffer (entsprechend dem Protokoll nach *Laemmli*, 1970) bei einer Stromstärke von 20 bis 30 mA je Gel und über einen Zeitraum von etwa 1,5 h durchgeführt. Zur Auftragung der Proben wurde einfach konzentrierter Probenpuffer und als Größenstandard *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas) verwendet.

Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 3,5 mM SDS
Probenpuffer	100 mM Tris/HCl, pH 6,8 140 mM SDS 20 % Glycerin (v/v) 0,2 % Bromphenolblau (w/v)

5.2.2.2 Kolloidale Coomassie-Blau-Färbung

Die Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit kolloidalem Coomassie erfolgte entsprechend dem Protokoll nach *Candiano et al.*, (2004). Dabei wurden SDS-Gele für mindestens 8 h in kolloidalem Coomassie, dem Methanol in einer Konzentration von 20% (v/v) zugesetzt worden war, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch mehrtägige Inkubation in deionisiertem Wasser.

Kolloid. Coomassie	0,1% Coomassie G-250 (w/v) 10% (NH ₄) ₂ SO ₄ (w/v) 12% Phosphorsäure (v/v)
--------------------	--

5.2.2.3 Detektion von Proteinen mittels Western Blot

Die Überführung von Proteinen auf Membranen erfolgte entsprechend dem Protokoll nach *Tovey und Baldo* (1989). Die Proteine wurden dabei nach dem Prinzip des Trockenblots unter Verwendung einer Blotapparatur der Firmen Peqlab oder Biorad auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran (Millipore, Serva), die zuvor mit analysenreinem Methanol benetzt worden war, oder auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell) transferiert. Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 1,67 h unter Anlegung einer maximalen Spannung von 12 V. Nach dem Transfer wurde die Membran in 5 %ige Magermilchpulverlösung überführt (Lösung in TBSW; w/v) und für mindestens 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Inkubation mit Primärantikörpern, deren Verdünnung stets in PBS (mit 1,0 % BSA) vorgenommen wurde, erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran mehrfach in TBSW gewaschen und für mindestens 1 h mit Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern, deren Verdünnung in 5 %iger Magermilchpulverlösung erfolgte (s.o.), bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der Western Blot unter Verwendung von Röntgenfilmen des Typs ECLTM Hyperfilm (GE Healthcare) oder eines CCD-Kamerasystems vom Typ LAS-4000 (Fuji Corp.) entwickelt. Die Visualisierung der Western-Signale erfolgte dabei unter Verwendung kommerziell erwerblicher Chemolumineszenz-Reagenzien (ECLTM Advance Western Blotting Detection Kit; GE Healthcare).

Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 3,5 mM SDS 20 % Methanol (v/v)
TBSW-Puffer	25 mM Tris/HCl, pH 7,5 137 mM NaCl 2,6 mM KCl 0,05 % Tween-20 (v/v)

5.2.2.4 Rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli*-Bakterien

Die rekombinante Expression von Proteinen wurde generell in *E. coli*-Bakterien vom Stamm Rosetta 2 oder Rosetta 2 DE3 (Novagen) durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert und über Nacht bei 37°C in LB-Medium, dem Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt worden war, inkubiert. Die Bakterien wurden am darauffolgenden Morgen in frisches LB-Medium überimpft, dem neben Ampicillin zusätzlich noch Chloramphenicol in einer Konzentration von 34 µg/ml zugesetzt worden war. Dabei wurde eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Für die Expression von MBP-gekoppelten Proteinen wurde zusätzlich D-Glukose in einer Konzentration von 2,0 g/l zugegeben. Die Bakterien wurden bis zum Erreichen einer

OD₆₀₀ von 0,7 bei 37°C expandiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 1,0 mM induziert und die Bakterien für weitere 2 bis 3 h bei 37°C inkubiert. Nach der Expression wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min., 6.000 x g, 4°C, Rotor: JA-10) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE von jeweils 0,1 OD₆₀₀-Einheiten der Bakteriensuspension sowie kolloidaler Coomassie-Färbung überprüft.

5.2.2.5 Native Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli*-Bakterien

Zur nativen Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli*-Bakterien wurde grundsätzlich ein Gramm Bakterienmasse in 10 ml Lysepuffer (PBS mit 400 mM NaCl, 10 mM DTT) resuspendiert und unter Verwendung eines EmulsiFlex C5-Microfluidizers (Avestin Inc.) lysiert. Die erhaltenen Lysate wurden 30 min. bei 40.000 x g (4°C, Rotor: JA 25-50) zentrifugiert. Entsprechend dem verwendeten Affinitäts-Epitop wurde Glutathion-Sepharose (GE Healthcare, 17-5132-02), Amylose-Sepharose (New England Biolabs, E8021L) oder Nickel-NTA-Agarose (Qiagen, 1018244) in doppelt destilliertem Wasser gewaschen und in Lysepuffer äquilibriert. Anschließend wurden diese Partikel zu den Lysaten gegeben und die Affinitätsreinigung für mindestens 8 h bei 4°C durchgeführt. Die Abtrennung der Partikel erfolgte mittels Kunststoffsäulen (BioRad), in denen die Partikel anschließend mehrfach mit Lysepuffer gewaschen wurden. Die Proteinaufreinigung wurde mittels SDS-PAGE sowie kolloidaler Coomassie-Färbung überprüft.

Die Aufreinigung von RGS-His₆-gekoppeltem, humanem oder *Xenopus laevis* Mad2 erfolgte entsprechend dem Protokoll nach *Sironi et al.*, (2002). Dazu wurden die Bakterien nach der Proteinexpression in Lysepuffer (PBS mit 400 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und unter Anwendung des Microfluidizers (s.o.) lysiert. Nach Zentrifugation (30 min., 40.000 x g, 4°C, Rotor: JA25-50) wurde 1 ml Nickel-NTA-Agarose zu jeweils 50 ml Zelllysat gegeben und Mad2 über Nacht bei 4°C gebunden. Nach der Abtrennung der Agarosepartikel über Kunststoffsäulen (BioRad) wurden die Partikel mit Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert. Das Protein wurde entweder in Dialysepuffer dialysiert oder unter Verwendung einer Superdex 75 *Prep grade* Säule (GE Healthcare) weiter gereinigt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Programms *Protean* (DNA Star Inc.) der molare Extinktionskoeffizient von RGS-His₆-gekoppeltem Mad2 ermittelt und durch photometrische Messung der Extinktion bei 280 nm Wellenlänge die Konzentration des gereinigten Proteins bestimmt.

Waschpuffer	50 mM HEPES/KOH, pH 7,0 100 mM NaCl 20 mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol 0,1 % Tween-20 (v/v)
Elutionspuffer	50 mM HEPES/KOH, pH 7,0 100 mM NaCl 200 mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol 0,1 % Tween-20 (v/v)

Dialysepuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM Dithiothreitol 0,5 mM EDTA
---------------	---

5.2.2.6 Denaturierende Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli*-Bakterien

Zur denaturierenden Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli* wurden die Bakterien im 20-fachen Volumen Lysepuffer (s.u.) resuspendiert und für mindestens 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellyse wurde durch Ultraschallbehandlung unter Verwendung eines Bandelin Sonoplus Ultraschallgenerators (Sonotrode MS73) für 2 min. durchgeführt. Die Lysate wurden bei 20.000 x g für 20 min. (RT, Rotor: JA 25-50) zentrifugiert und mit 1 ml Nickel-NTA-Agarose versetzt. Nach der Affinitätsreinigung (60 min. bei Raumtemperatur) wurden die Agarosepartikel über Kunststoffsäulen (BioRad) abgetrennt und mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer bei 95°C.

Lysepuffer	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris/HCl, pH 7,6 10 mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol
Waschpuffer	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris/HCl, pH 7,6 20 mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol

5.2.2.7 Generierung polyklonaler Antikörper gegen *Xenopus laevis* Sgo1

Zur Generierung von polyklonalen Antikörpern gegen *Xenopus laevis* Shugoshin-1 (XSgo1) wurden Proteinfragmente, die den Aminosäuren 301 bis 400 bzw. 501 bis 600 innerhalb der Primärstruktur von XSgo1 entsprechen (siehe Abb. 12), durch die Klonierung in pGEX-4T1 mit einem Glutathion-S-Transferase-Epitop versehen und in *E. coli* exprimiert. Nach der Aufreinigung an Glutathion-Sepharose wurde das Protein mit GST-Elutionspuffer eluiert und gegen PBS dialysiert. Jeweils etwa ein Milligramm des gereinigten Proteins wurde mit TiterMaxTM Gold Adjuvanz (Sigma-Aldrich) gemischt und zur Immunisierung in Kaninchen injiziert. Nach 10-wöchiger Inkubation, in der die Immunisierung noch zweimal wiederholt wurde, wurden die Kaninchen ausgeblutet und das Serum gereinigt. Dazu wurde das Blut für eine Stunde bei 37°C und danach über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (30 min., 10.000 x g, 4°C, Rotor: Ja-25.50) wurde das Serum erhalten. Die Aufreinigung des Antikörpers erfolgte mit N-Hydroxy-Succinimid- (NHS-) Säulen (GE Healthcare) entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu wurden bakteriell exprimierte Proteine (s.o.) kovalent an die Affinitätssäule gekoppelt und das Serum über Nacht kontinuierlich bei 4°C über die Säule gepumpt (Flussrate < 0,5 ml/min.). Nach dem Waschen der Säule mit PBS wurde der gebundene Antikörper mit 10 ml Glycin/HCl-

Puffer (pH 2,5) eluiert, wobei der pH-Wert unmittelbar nach der Elution mit 1,0 M Tris/HCl, pH 8,5 neutralisiert wurde. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die aufgereinigten Antikörper wurden gegen XB-Puffer (siehe Abschnitt 5.2.5.1), dessen Glycerin-Konzentration auf 50 % (v/v) eingestellt worden war, dialysiert und im Western Blot gegen CSF-Extrakt sowie gegen *in vitro* translatiertes XSgo1 überprüft.

GST-Elutionspuffer	50 mM Glutathion 1 mM Dithiothreitol 0,1 % Triton T X-100 (w/v) in CSF-XB (siehe Abschnitt 5.2.5.1) pH 7,0; eingestellt mit KOH
Kopplungspuffer	200 mM NaHCO ₃ , pH 8,3 500 mM NaCl
Elutionspuffer	100 mM Glycin, pH 2,5 100 mM NaCl

5.2.2.8 Immunpräzipitation von Proteinen aus Zelllysaten

Zur Immunpräzipitation von überexprimierten oder endogenen Proteinen aus Säugerkellen wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen Lysepuffer 2, dem zusätzlich eine Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette (Roche) auf 50 ml zugesetzt worden war, resuspendiert und durch mindestens 10 Stöße mit einem sog. *Dounce Homogenizer* (Wheaton) lysiert. Nach einer Inkubation von 30 min. auf Eis wurden die Lysate für 30 min. bei 16.000 x g (4°C) zentrifugiert. Die Immunpräzipitation wurde über einen Zeitraum von 4 h (bei 4°C) für überexprimierte Proteine oder über Nacht (bei 4°C) für endogene Proteine durchgeführt. Die zur Präzipitation verwendete Affinitätsmatrix wurde über Mobicol-Säulen (Mobictec) abgetrennt und mehrfach mit Lysepuffer 2, dessen NaCl-Konzentration auf bis zu 500 mM erhöht worden war, gewaschen. Eine analoge Anpassung der NaCl-Konzentration des Lysepuffers 2 auf 400 mM wurde auch zur Durchführung endogener Immunpräzipitationen von Shugoshinen (hSgo2/XSgo1) vorgenommen, da unterhalb dieser NaCl-Konzentration keine ausreichende Ablösung des Shugoshins vom Chromatin zu erreichen war. Die Elution erfolgte in zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer bei 95°C.

Lysepuffer 2	20 mM Tris/HCl, pH 7,7 100 mM NaCl 10 mM NaF 20 mM β-Glycerophosphat 5 mM MgCl ₂ 0,1 % Triton T X-100 (w/v) 5 % Glycerin (v/v)
--------------	---

5.2.2.9 Affinitätsreinigung von Proteinen im gereinigten System

Für Affinitätsreinigungen von Proteinen im gereinigten System wurden rekombinante, und aufgereinigte Proteine, die auf ihre Wechselwirkungen hin untersucht werden sollten, in Dialysepuffer gemischt und für mindestens 4 h bei 4°C inkubiert. Zur Untersuchung der Protein-Protein-Wechselwirkung von Mad2 mit Shugoshin, Mad1 oder Cdc20 wurde Mad2 in seiner freien Form verwendet, während die anderen Proteine in einer, an ihrer jeweiligen Matrix gekoppelten Form eingesetzt wurden. Nach der Zusetzung von 50 oder 60 µg gereinigten RGS-His₆-Mad2s wurde das Volumen mit Dialysepuffer (siehe Abschnitt 5.2.2.5) auf 500 µl aufgefüllt und die Präzipitation für 4 h bei 4°C durchgeführt. Die Affinitätsmatrix wurde viermal mit PBS (mit 400 mM NaCl, 10 mM DTT, 0,2 % Triton X-100) gewaschen und gebundene Proteine in zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer bei 95°C eluiert.

5.2.2.10 Affinitätsreinigung zur Darstellung der konkurrierenden Bindung von Shugoshin, Mad1 und Cdc20 an Mad2

Zur Darstellung des gegenseitigen Ausschluss der Shugoshin-Mad2-Wechselwirkung gegenüber der Mad1-Mad2-Wechselwirkung wurde XSgo1 aufgrund von Klonierung N-terminal mit einem MBP-Tev₂-Epitop und XMad1 mit einem GST-Epitop versehen. Nach der Reinigung wurde XSgo1 in PBS (mit 50 mM Maltose) und XMad1 in GST-Elutionspuffer (siehe Abschnitt 5.2.2.7) eluiert. Die Proteine wurden zusammen mit RGS-His₆-gekoppeltem XMad2 gemischt und gemeinsam gegen Dialysepuffer (siehe Abschnitt 5.2.2.5) dialysiert. Die Dialysate wurden mit Glutathion-Sepharose (GE Healthcare), Amylose-Sepharose (New England Biolabs) oder Nickel-NTA-Agarose (Qiagen) versetzt und die Proteine für 4 h bei 4°C affinitätsgereinigt. Die Affinitätsmatrizes wurden mit Dialysepuffer (mit 0,2 % Tween-20) gewaschen und gebundene Proteine in zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer bei 95°C eluiert.

5.2.2.11 Far Western Blot

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Mad2 und Fragmenten von XSgo1 oder hSgo2 über Far Western Blot wurden Shugoshin-Fragmente, die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt worden waren (siehe Abschnitt 5.2.2.6) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) geblottet. Die Membran wurde nach dem Blotten für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 %iger Magermilchpulverlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Lösung von rekombinantem, gereinigtem, RGS-His₆-gekoppeltem XMad2 oder hMad2 überführt, wobei für Mad2 eine Konzentration von 10 µg/ml in PBS (1 % BSA) eingestellt wurde. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht wurde die Membran mehrfach mit TBSW gewaschen und danach für mindestens 4 h bei Raumtemperatur mit monoklonalem Maus-anti-RGS-His₆-Epitop-Antikörper (Qiagen) inkubiert. Dieser wurde in einem Verhältnis von 1:2.000 in PBS (mit 1 % BSA) verdünnt. Nach mehrfachem Waschen wurde die Membran mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert und unter Verwendung von Röntgenfilmen des Typs ECLTM Hyperfilm (GE Healthcare) sowie kommerziell erwerblicher Chemolumineszenz-Reagenzien (ECLTM Western Blotting Detection Kit; GE Healthcare) entwickelt.

5.2.2.12 Hefe-Zwei-Hybrid System

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems wurden kompetente Hefen vom Stamm PJ69-7a entsprechend dem unter Abschnitt 5.2.1.10 beschriebenen Protokoll mit jeweils zwei Plasmiden (pACT2 und pAS2-1) transformiert, wobei jeweils ein Plasmid eines der beiden, auf Wechselwirkung zu untersuchenden Proteine kodierte. Nach einer Selektion auf SC-Leu/-Trp-Platten von mindestens 3 Tagen bei 30°C wurden mehrere Kolonien von der Platte entnommen und in sterilem Wasser resuspendiert. Nach der Bestimmung der OD₆₀₀ wurden unter Verwendung einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten durch Verdünnung identische OD₆₀₀-Werte (genau: OD₆₀₀ = 0,1) eingestellt. Von diesen Verdünnungen wurden identische Volumina auf SC-Leu/-Trp/-His oder SC-Leu/-Trp/-Ade Selektionsplatten ausgebracht und für 2 bis 7 Tage bei 30°C inkubiert.

YPD	1 % Bacto Hefeextrakt (Difco) (w/v) 2 % Bacto Pepton (Difco) (w/v) 2 % Glukose (w/v)
SC-Platten	2 % Glukose (w/v) 0,67 % Hefe-Stickstoffbasis (Difco) (w/v) 0,2 % <i>Drop Out</i> Aminosäure-Mix (w/v) 40 µg/ml Leucin 20 µg/ml Lysin 20 µg/ml Histidin 20 µg/ml Tryptophan 20 µg/ml Uracil 5 µg/ml Adenin 2 % Agar (Difco) (w/v)

5.2.2.13 Isothermische Kalorimetrie (ITC)

Die Untersuchung von Bindungsaffinitäten zwischen Mad2 und Peptiden, die den Mad2-Bindemotiven von humanem Mad1 (hMad1), humanem Shugoshin-2 (hSgo2) oder *Xenopus laevis* Shugoshin-1 (XSgo1) entsprachen, mittels isothermischer Kalorimetrie (ITC) wurde durch die Abteilung von Prof. Dr. Tadeus A. Holak am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Die Herstellung der entsprechenden Peptide erfolgte durch die *Core Facility* des Max Planck Instituts für Biochemie, Martinsried.

5.2.2.14 Zweidimensionale ¹H-¹⁵N NMR-Spektroskopie (HSQC)

Die Untersuchung von strukturellen Veränderungen in der Tertiärstruktur von Mad2 aufgrund von Bindung der oben angeführten Peptide mittels 2-dimensionaler ¹H-¹⁵N Heteronukleärer Single Quanten Koheränz-Spektroskopie (HSQC) wurde durch die Abteilung von Prof. Dr. Tadeus A. Holak am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

5.2.3 Zellkultur

5.2.3.1 Kultivierung von HEK 293T-, HeLa WT-, und HeLa S3-Zellen

Alle, im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Säugerzelllinien (HEK 293T, HeLa WT, HeLa K, HeLa S3) wurden bei 37°C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre und 92 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten (Standardbedingungen). Als Nährmedium wurde Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) verwendet (Gibco-BRL, PAA). Adhäsive Zellen (HEK 293T, HeLa WT, HeLa K) wurden dreimal wöchentlich mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco-BRL, PAA) von der Oberfläche der Zellkulturschale (Greiner) abgelöst und in einem Verhältnis von 1:5 oder 1:10 auf neue Zellkulturschalen überimpft. In Suspension wachsende Zellen (HeLa S3) wurden in sog. Spinnerflaschen inkubiert und wöchentlich in neues Medium (DMEM) überimpft. Zur langfristigen Lagerung von Säugerzellen wurden diese in FCS, dem 10 % DMSO (v/v) zugesetzt worden war, aufgenommen und bei -80°C eingefroren; nach 3 Tagen erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff. Zur Aufnahme in Kultur wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut, zentrifugiert (1.200 rpm), in DMEM resuspendiert und auf Zellkulturschalen ausgebracht.

5.2.3.2 Kultivierung von XTC-Zellen

Xenopus laevis Kaulquappenzellen (XTC-Zellen) wurden bei 27°C und 92%iger Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Medium wurde L15 Leibovitz-Medium (Gibco-BRL od. Sigma-Aldrich) verwendet, das mit sterilem Wasser auf 70% verdünnt wurde. Die Zellen wurden einmal wöchentlich mit einfach konzentrierter Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco-BRL, PAA) von der Zellkulturschale abgelöst und im Verhältnis 1:5 auf neue Schalen überimpft. Die Vorgehensweise zur langfristigen Einlagerung von XTC-Zellen ist der von Säugerzellen identisch.

5.2.3.3 Calciumphosphat-abhängige Transfektion von HEK 293T-Zellen

Zur Calciumphosphat-abhängigen Transfektion von DNA in HEK 293T-Zellen wurde dem Zellkulturmedium 1 h vor der Transfektion Chloroquin (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 25 µM zugesetzt. Zur Transfektion einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 150 mm wurde 40 µg Plasmid-DNA unter Einstellung von 125 mM CaCl₂ in 2 ml sterilem, bidestilliertem Wasser verdünnt und unter Vortexen mit dem gleichen Volumen 2 x HBS gemischt. Der daraus hervorgehende Transfektionsansatz wurde 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben.

2 x HBS	40 mM HEPES/NaOH, pH 7,05
	270 mM NaCl
	10 mM KCl
	10 mM D-(+)-Glukose
	1,5 mM Na ₂ HPO ₄

Je nach dem, ob die Transfektion morgens oder abends durchgeführt worden war, wurde 8 bis 12 h nach Transfektion oder am darauffolgenden Morgen ein Medien-

wechsel vorgenommen. Die Zellen wurden anschließend für weitere 36 h bei 37°C inkubiert. Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen während Mitose wurden die Zellen 15 h vor der Ernte mit 200 ng/ml Nocodazol (Sigma-Aldrich) in der Mitose arretiert.

5.2.3.4 Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte unter Anwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu wurden HeLa-Zellen 24 h vor der Transfektion auf Mikrotiterplatten mit 6 oder 12 Kavitäten ausgebracht, wobei eine solche Zelldichte eingestellt wurde, dass zum Transfektionszeitpunkt vollständige Konfluenz vorlag. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion in einem Verhältnis von 1:2 oder 1:4 geteilt und gemäß den experimentellen Vorgaben weiter behandelt.

5.2.3.5 Transfektion von XTC-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von XTC-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte unter Anwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu wurden XTC-Zellen 24 h vor der Transfektion auf Mikrotiterplatten mit 6 oder 12 Kavitäten ausgebracht, wobei eine solche Zelldichte eingestellt wurde, dass zum Transfektionszeitpunkt vollständige Konfluenz vorlag. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mittels Nocodazol (200 ng/ml; Sigma-Aldrich) in der Mitose arretiert und nach weiteren 16 h geerntet.

5.2.3.6 Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit sog. *small interfering* RNAs (siRNAs) erfolgte unter Anwendung der Transfektionsreagenzien Hiperfect™ (Qiagen) oder Oligofectamine™ (Invitrogen) entsprechend den jeweiligen Vorgaben der Hersteller. Dazu wurden HeLa WT-Zellen 24 h vor der Transfektion auf Mikrotiterplatten mit 6 oder 12 Kavitäten ausgebracht. Die Zellen wurden mit siRNA-Konzentrationen, die zwischen 40 und 100 nM lagen, transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für einen Zeitraum zwischen 24h und 72h unter Standardbedingungen inkubiert und danach mikroskopisch oder biochemisch untersucht.

5.2.3.7 Untersuchung von hSgo2-Mutanten mittels RNAi/-Rescue

Zur Untersuchung von Mad2- oder PP2A-bindedefizienten Mutanten von hSgo2 in HeLa WT-Zellen wurden die Zellen unter Verwendung von Hiperfect™ (Qiagen) mit Sgo2-spezifischen siRNAs in einer Endkonzentration von 90 nM transfiziert und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für siRNA-resistente Versionen von hSgo2 (WT, N58I, R153A) in N-terminal Myc₆-gekoppelter Form kodierten. Nach 16 h wurden die Zellen mittels Nocodazol (200 ng/ml; Sigma-Aldrich) mitotisch arretiert und durch mechanische Ablösung von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden anschließend auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser aufzentrifugiert (2 min., 1.200 rpm) und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie sowie Western Blot gegen hSgo2, Myc-Epitop und Tubulin alpha analysiert.

5.2.3.8 Zellzyklus-Synchronisation von 293T- oder HeLa-Zellen

Zur Synchronisation von HEK 293T/HeLa-Zellen in S-Phase wurde Thymidin (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 2 mM zum Medium gegeben. Die Zellen wurden anschließend für etwa 20 h unter Standardbedingungen kultiviert und danach durch zweimaliges Waschen in auf 37°C erwärmtem PBS aus dem Arrest freigesetzt. Um eine exakte Fokussierung von Zellen zu Beginn der S-Phase zu erreichen, wurde ein sog. Doppel-Thymidinblock angewendet. Dabei wurden die Zellen für 18 h mit 2 mM Thymidin arretiert und danach für 9 h aus dem Arrest freigesetzt. Anschließend wurde ein zweiter, 17-stündiger Arrest durch erneute Zugabe von Thymidin (2 mM) vorgenommen, aus dem die Zellen analog entlassen wurden. Die Synchronisation von HEK 293T-/HeLa-Zellen in der Mitose erfolgte grundsätzlich durch die Zusetzung von Nocodazol (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 200 ng/ml.

5.2.3.9 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Zellzyklusphase von HEK 293T-/HeLa-Zellen wurden diese zunächst mit 70%igem Ethanol (-20°C) fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (mit 0,1% BSA) wurde für 30 min. die Anfärbung der DNA mit 69 µM. Propidiumjodidlösung (Sigma-Aldrich; Lösung in 38 mM Tri-Natriumzitat) durchgeführt. Gleichzeitig wurde zelluläre RNA durch Einstellung einer RNase A Konzentration von 0,1 mg/ml (Qiagen) und Inkubation der Zellen für mindestens 30 min. bei 37°C abgebaut. Die Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen erfolgte unter Verwendung eines Beckmann Coulter Cytomics FC 500; zur Auswertung wurde das Programm CXP Analysis (Beckmann) verwendet.

5.2.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

5.2.4.1 Herstellung Poly-L-Lysin-beschichteter Deckgläser

Zur Herstellung von Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern, die für die Sedimentation von mitotischen Zellen benötigt wurden, wurden Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm (Marienfeld) für mindestens 20 min. mit einfach konzentrierter Poly-L-Lysinlösung (Sigma-Aldrich) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Deckgläser viermal in bidestilliertem Wasser gewaschen und mit Ethanol (98 %) sterilisiert.

5.2.4.2 Zentrifugation von HeLa-Zellen auf Deckgläser

Zur Sedimentation von mitotisch arretierten HeLa-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser wurden die Zellen zunächst mechanisch von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten, die zuvor mit Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern versehen worden waren, gebracht und bei 1.200 rpm für 2 min. zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach fixiert (siehe ff.). Alternativ wurden HeLa-Zellen auch auf unbehandelten Deckgläsern, die zuvor mit 98%igem Ethanol sterilisiert worden waren, ausgesät und über einen Zeitraum von bis zu 72 h unter Standardbedingungen inkubiert.

5.2.4.3 Fixierung und Permeabilisierung von HeLa-Zellen

Die Fixierung von HeLa-Zellen zur Durchführung von Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte grundsätzlich unter Verwendung von Paraformaldehyd. Die Zellen wurden nach Abnahme des Zellkulturmediums einmal mit PBS gewaschen und danach in 3,7%iger Paraformaldehydlösung (in PBS) über einen Zeitraum von etwa 8 min. fixiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurde die Permeabilisierung der Zellen mit 0,5%iger Triton X-100-Lösung (in PBS) für 5 min. vorgenommen. Zuweilen wurde eine Permeabilisierung auch während der Fixierung durchgeführt, indem dem Fixierpuffer zwischen 0,1 und 0,3 % Triton X-100 (w/v) zugesetzt wurde. Unspezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen wurden durch Inkubation der Zellen in PBS (mit 3% BSA; 0,1% Triton X-100) für mindestens 60 min. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C blockiert.

5.2.4.4 Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in HeLa-Zellen

Entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll fixierte und permeabilisierte Zellen wurden für mikroskopische Untersuchungen mit Antikörpern angefärbt. Dazu wurden die Antikörper in unterschiedlichen Verhältnissen mit PBS, dem 3 % BSA (w/v) sowie 0,1 % Triton X-100 (w/v) zugesetzt worden waren, verdünnt, und die mit den Zellen beschichteten Deckgläser für mindestens 2 h bei Raumtemperatur damit inkubiert. Nach mehrfachem Waschen in PBS (mit 0,1 % Triton X-100) wurden die Deckgläser mit Alexa 488- oder Alexa 546-gekoppelten Sekundärantikörpern (Invitrogen), die je nach den verwendeten Primärantikörpern gegen Maus- oder Kaninchen IgG gerichtet waren, für mindestens 60 min. inkubiert. Anschließend wurde eine Anfärbung der DNA durch Behandlung mit Hoechst 33342 (2,0 µg/ml; Sigma-Aldrich) für 10 min. bei Raumtemperatur vorgenommen. Die Deckgläser wurden danach mehrfach mit PBS (mit 0,1 % Triton X-100) gewaschen und unter Zusetzung von 2 µl sog. *Mounting Mediums* umgekehrt auf Objektträgern (Marienfeld) montiert. Die Abdichtung erfolgte mit handelsüblichem Nagellack.

<i>Mounting Medium</i>	2,33 % Diaza-bizylo-(2,2,2)-oktan (w/v)
	20 mM Tris/HCl, pH 8,0
	78 % Glycerin (v/v)

5.2.4.5 Immunfluoreszenzfärbung von Chromosomen-Spreads

Zur Präparation von Chromosomen-Spreads wurden Zellen zunächst in steigenden Volumina von hypotonischem Puffer I resuspendiert und dadurch geschwollen. Nach einer 7-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen für 3 min. bei 1.400 rpm zentrifugiert und in hypotonischem Puffer II resuspendiert. Die dadurch erhaltene Zellsuspension wurde auf Deckgläsern aufgebracht und fixiert. Nach der Trocknung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unspezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen durch Blockierung in PBS (mit 3 % BSA; 0,1 % Triton X-100) eliminiert. Die weitere Vorgehensweise ist der in Abschnitt 5.2.4.4 beschriebenen identisch.

Hypoton. Puffer I	30 mM Tris/HCl, pH 8,2 50 mM Saccharose 17 mM Natriumcitrat 400 ng/ml Nocodazol
Hypoton. Puffer II	100 mM Saccharose 400 ng/ml Nocodazol
Fixierpuffer	1 % Paraformaldehyd (v/v) 5 mM Natriumborat, pH 9,2 0,15 % Triton X-100 (w/v)

5.2.4.6 Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten

Zur Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten wurde ein Delta Vision RT Dekonvolutionsmikroskop (Applied Precision Inc.) verwendet. Dabei wurde zunächst auf die Z-Ebene fokussiert, in der das zu quantifizierende Signal die höchste Intensität zeigte. In dieser Ebene wurde der Hintergrund innerhalb der Zelle an insgesamt 5 verschiedenen Punkten gemessen und daraus der Mittelwert berechnet. Die somit erhaltene mittlere Hintergrundintensität wurde von der gemessenen Signalintensität abgezogen. Durch mehrfache Wiederholung dieses Vorgangs wurde eine Datenserie generiert. Damit Effekte, die in Folge von Variationen in der Fluoreszenzanfärbung verursacht werden, ausgeschlossen werden konnten, wurden Vergleiche von Signalintensitäten zwischen verschiedenen Zellen ausschließlich innerhalb eines Präparats durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Microsoft Excel 2004 (Microsoft Corp.) durchgeführt.

5.2.4.7 Lebend-Zell-Mikroskopie

Zur mikroskopischen Untersuchung von lebenden Zellen wurden HeLa K-Zellen verwendet, die stabil mCherry-gekoppeltes Histon H2B und GFP-gekoppeltes Tubulin alpha exprimieren. Zur funktionellen Untersuchung von Proteinen während der Mitose wurden die Zellen 32 h vor Beginn der Filmaufnahme (bzw. 20 h im Fall von Mad2) mit entsprechenden siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden 8 h vor Beginn der Aufnahme auf Objektträgersysteme (Ibidi) aufgebracht und für weitere 6 h inkubiert; die eventuelle Zusetzung von Spindeltoxinen erfolgte 2 h vor Aufnahmebeginn. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte unter Verwendung eines Leica DMI 6000 B Mikroskops über einen Zeitraum von 16 h hinweg, wobei in 5- bzw. 8-Minuten-Intervallen Bilder aufgenommen wurden (6 Z-Ebenen; Abstand: 5 µm) wurden. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Microsoft Excel 2004 (Microsoft Corp.) durchgeführt.

5.2.5 *Xenopus laevis* Ei-Extrakte

5.2.5.1 Herstellung von Meiose II-arretierten Ei-Extrakten

Die Präparation von Meiose II- (CSF-) arretierten Extrakten aus den Eiern des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* erfolgte entsprechend dem Protokoll

nach Murray (Murray, 1991). Dazu wurde weiblichen Fröschen etwa 20 h vor der Präparation 1,0 ml Choriongonadotropin (1.000 U/ml; Sigma-Aldrich) subkutan in den dorsalen Lymphsack injiziert. Die Frösche wurden 4 bis 8 h nach der Applikation in 1-fach konzentrierten MMR-Puffer eingebracht und für 12 bis 16 h bei 18°C inkubiert. Die Eier wurden entsprechend ihrer Morphologie sortiert und durch 5 bis 10-minütige Inkubation in 2 %iger Cysteinlösung (w/v) von ihrer Gallerthülle befreit. Nach mehrfachem Waschen in CSF-XB wurden die Eier in Zentrifugenröhrchen eingebracht, in denen 1,0 ml CSF-XB und 10 µl Zytochalin B-Lösung (10 mg/ml; Sigma-Aldrich) vorgelegt worden waren. Die Eier wurden durch Zentrifugation (1 min. bei 200 x g / 1 min. bei 600 x g; 18°C) verdichtet und die überstehende Flüssigkeit abgenommen. Der Aufschluss der Eier erfolgte durch Zentrifugation (10 min. bei 13.000 x g; 18°C; Rotor: JS13.1). Nach Abnahme der zytosolischen Phase durch Punktierung mit einer Spritze (Kanülen-Nr. 18 G) wurde Zytochalin B in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Zur Überprüfung des Metaphase II Arrests (CSF-Arrest) wurden Aliquots entnommen und mit membranfreien *Xenopus laevis* Spermienkernen gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 30°C wurde einem Aliquot CaCl₂ in einer Konzentration von 0,6 mM zugesetzt. Anschließend wurden die Extrakte für weitere 30 min. bei 30°C inkubiert. Zur Überprüfung des CSF-Arrests wurden jeweils 2 µl der Extrakte mit 5 µl DAPI-Fix auf einem Objektträger gemischt und die Morphologie der Spermien mikroskopisch untersucht. Zur Durchführung von Experimenten wurden ausschließlich Extrakte verwendet, in denen die Spermienmorphologie in Abwesenheit von CaCl₂ der von kondensierten Spermien entsprach.

MMR (1 x)	100 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 2 mM CaCl ₂ 0,1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 5 mM HEPES/NaOH, pH 7,8 pH 7,8; eingestellt mit NaOH
CSF-XB	100 mM KCl 0,1 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES/KOH, pH 7,7 50 mM Saccharose 5 mM EGTA/KOH, pH 8,0 pH 7,7; eingestellt mit KOH
XB-Salze (20 x)	2 M KCl 2 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂
DAPI-Fix	48 % Glycerin (v/v) 11 % Formaldehyd (v/v) 1 µg/ml Hoechst 33342 in 1 x MMR (siehe oben)

Cysteinlösung	2 % Cystein (w/v) 0,5 x XB-Salze pH 7,8; eingestellt mit KOH
---------------	--

5.2.5.2 Depletion von XShugoshin-1 (XSgo1) aus Ei-Extrakten

Um die Depletion von XSgo1 aus CSF-arretierten Ei-Extrakten zu erreichen, wurden 4,0 µg polyklonaler Kaninchen-anti-XSgo1-Antikörper über Nacht bei 4°C an 20 µl magnetische Protein-G Dynapartikel (DYNAL) gekoppelt. Nach dem Waschen der Partikel in CSF-XB wurden diese in CSF-Extrakt resuspendiert und der Ansatz für 60 min. unter permanenter Drehung bei 18°C inkubiert. Anschließend wurden die Partikel mit Hilfe eines Magneten abgetrennt und der depletierte Extrakt für weiterführende Experimente verwendet. Die Überprüfung der Depletion erfolgte mittels Western Blot gegen XSgo1 und Tubulin alpha.

5.2.5.3 Etablierung des SAC in Ei-Extrakten

Die Etablierung eines *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) in Meiose II-arretierten Ei-Extrakten erfolgte durch die Zusetzung von membranfreien Spermienkernen in einer Konzentration von mindestens 11.000 Kernen je Mikroliter Extrakt. Gleichzeitig wurde eine geringe Menge von Nocodazol (Sigma Aldrich; 0,1 µl einer 5 mg/ml Lösung in DMSO) zugesetzt und der Extrakt für 20 min. bei 20° inkubiert. Als Kontrolle wurde Spermien-Verdünnungspuffer und DMSO verwendet. Anschließend wurden die Extrakte durch Einstellung einer 0,6 mM CaCl₂-Konzentration aus dem natürlichen Meiose II-Arrest freigesetzt und der Abbau von ³⁵S-markiertem hSecurin, das zu Beginn zugegeben worden war, mittels Autoradiographie verfolgt.

Spermien-Verd. Puffer	5 mM HEPES/KOH, pH 7,7 100 mM KCl 150 mM Saccharose 1 mM MgCl ₂
-----------------------	---

5.2.5.3 *In vitro* Translation (IVT)

Die gekoppelte Transkription und Translation von Plasmid-DNA *in vitro* wurde unter Verwendung des „TNT SP6 Quick Systems“ (Promega), bei dem es sich um ein auf Kaninchen-Retikulozytenlysate basierendes, von SP6 RNA-Polymerase abhängiges System handelt, durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung von Proteinen wurde dem Reaktionsmix ³⁵S-markiertes Methionin zugesetzt.

5.2.5.4 Autoradiographie

Zur Detektion von radioaktiv markierten Proteinen wurden diese mittels SDS-PAGE getrennt. Nach Inkubation des Gels für mindestens 20 min. in Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) wurde dieses auf WhatmanTM Papier (Schleicher & Schuell) getrocknet und durch Auflegen eines Phosphorimager-Schirms (Fuji Corp.) für mindestens 4 h exponiert. Die autoradiographische Entwicklung erfolgte unter Verwendung eines FLA 7.000 Phosphorimagers (Fuji Corp.).

6. Literatur

- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D. W., und Labbe, J. C. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 106, 83-93.
- Ambrosini, G., Adida, C., und Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3, 917-921.
- Andrews, P. D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L., und Swedlow, J. R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev. Cell* 6, 253-268.
- Aravind, L., und Koonin, E. V. (1998). The HORMA domain: a common structural denominator in mitotic checkpoints, chromosome synapsis and DNA repair. *Trends Biochem. Sci.* 23, 284-286.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K. (1998). *Current protocols in molecular biology* (Greene publishing associates).
- Bakhom, S. F., Thompson, S. L., Manning, A. L., und Compton, D. A. (2009). Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat. Cell Biol.* 11, 27-35.
- Ben-Shahar, T. R., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Shekel, M., und Uhlmann, F. (2008). Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321, 563-566.
- Bharadway, R., und Yu, H. (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Ocogene* 23, 2016-2027.
- Biggins, S., und Murray, A. W. (2001). The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 15, 3118-3129.
- Boyarchuk, Y., Salic, A., Dasso, M., und Arnaoutov, A. (2007). Bub1 is essential for assembly of the functional inner centromere. *Jour. Cell Biol.* 176, 919-918.
- Brar, G. A., Kiburz, B. M., Zhang, Y., Kim, J. E., White, F., und Amon, A. (2006). Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. *Nature* 441, 532-536.
- Brunet, S., Pahlavan, G., Taylor, S., und Maro, B. (2003). Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction* 126, 443-450.
- Buonomo, S. B. C., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., und Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 103, 387-398.
- Burton, J. L., und Solomon, M. J. (2007). Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APC^{Cdc20} in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev.* 21, 655-667.

- Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**, 300-303.
- Cai, X., Dong, F., Edelman, R. E., und Makaroff, C. A. (2003). The *Arabidopsis* SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *Jour. Cell Sci.* **116**, 2999-3007.
- Campbell, M. S., Chan, G. K., und Yen, T. J. (2001). Mitotic checkpoint proteins HsMAD1 and HsMAD2 are associated with nuclear pore complexes in interphase. *Jour. Cell Sci.* **114**, 953-963.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., und Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327-1333.
- Cassimeris, L. U., Walker, R. A., Pryer, N. K., und Salmon, E. D. (1987). Dynamic instability of microtubules. *BioEssays* **7**, 149-154.
- Chen, R. H., Shevchenko, A., Mann, M., und Murray, A. W. (1998). Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *Jour. Cell Biol.* **143**, 487-496.
- Chen, R. H., Brady, D. M., Smith, D., Murray, A. W., und Hardwick, K. G. (1999). The spindle checkpoint of budding yeast depends on a tight complex between the Mad1 and Mad2 proteins. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2607-2618.
- Chen, Y., Riley, D. J., Chen, P. L., und Lee, W. H. (1997). HEC, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6049-6056.
- Cheslysheva, L., Diallo, S., Vezon, D., Gendrot, G., Vrielynck, N., Belcram, K., Rocques, N., Marquez-Lema, A., Bhatt, A. M., Horlow, C., Mercier, R., Mezard, C., und Grelon, M. (2005). AtREC8 and AtSCC3 are essential for the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *Jour. Cell Sci.* **118**, 4621-4632.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., und Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* **93**, 1067-1076.
- Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., und Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol. Cell* **5**, 243-254.
- Clute, P., und Pines, J. (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat. Cell Biol.* **1**, 82-87.
- Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W., und Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* **10**, 3081-3093.
- Cooke, C. A., Heck, M. M., und Earnshaw, W. C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *Jour. Cell Biol.* **105**, 2053-2067.

- Darwiche, N., Freeman, L. A., und Strunnikov, A. (1999). Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene* 233, 39-47.
- Davis, B. K. (1971). Genetic analysis of a meiotic mutant resulting in precocious sister-centromere separation in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 113, 251-272.
- De Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E. D., und Musacchio, A. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* 15, 214-225.
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J., und Walczak, C. E. (1999). Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96, 69-78.
- Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., und Taylor, S. S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2 and CENP-E to kinetochores. *Jour. Cell Biol.* 161, 267-280.
- Earnshaw, W. C. und Cooke, C. A. (1991). Analysis of the distribution of the INCENPs throughout mitosis reveals the existence of three distinct substages of metaphase and early events in cleavage furrow formation. *Jour. Cell Sci.* 98, 443-461.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., und Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Fang, G., Yu, H., und Kirschner, M. W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* 12, 1871-1883.
- Fuchs, D. A., und Johnson, R. K. (1978). Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent, from *Taxus brevifolia*, acts as a mitotic spindle poison. *Cancer Treat. Rep.* 62, 1219-1222.
- Gandhi, R., Gillespie, P. J., und Hirano, T. (2006). Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr. Biol.* 16, 2406-2417.
- Ganem, N. J., und Compton, D. A. (2004). The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *Jour Cell Biol.* 166, 473-478.
- Ge, S., Skaar, J. R., und Pagano, M. (2009). APC/C- and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation. *Cell Cycle* 8, 167-171.
- Gemma, A., Seike, M., Seike, Y., Uematsu, K., Hibino, S., Kurimoto, F., Yoshimura, A., Shibuya, M., Harris, C. C., und Kudoh, S. (2000). Somatic mutation of the hBUB1 mitotic checkpoint gene in primary lung cancer. *Genes Chrom. Canc.* 29, 213-218.
- Gimenez-Abian, J. F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J., und Peters, J. M. (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr. Biol.* 14, 1187-1193.
- Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A., und Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95-105.

- Goldstein, L. S. (1980). Mechanisms of chromosome orientation revealed by two meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **78**, 79-111.
- Gomez, R., Valdeolmillos, A., Parra, M. T., Viera, A., Carreiro, C., Roncal, F., Rufas, J. S., Barbero, J. L., und Suja, J. A. (2007). Mammalian Sgo2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep.* **8**, 173-180.
- Gorbsky, G. J., und Ricketts, W. A. (1993). Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *Jour. Cell Biol.* **122**, 1311-1321.
- Gorr, I. H., Boos, D., und Stemmann, O. (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol. Cell* **19**, 135-141.
- Gregan, J., Riedel, C. G., Petronczki, M., Cipak, L., Rumpf, C., Poser, I., Buchholz, F., Mechtler, K., und Nasmyth, K. (2007). Tandem affinity purification of functional TAP-tagged proteins from human cells. *Nat. Protocols* **2**, 1145-1151.
- Gruber, S., Haering, C. H., und Nasmyth, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**, 765-777.
- Guacci, V., Koshland, D. E., und Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of *MCD1* in *S. cerevisiae*. *Cell* **91**, 47-57.
- Habu, T., Kim, S. H., Weinstein, J., und Matsumoto, T. (2002). Identification of a Mad2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis. *EMBO Jour.* **21**, 6419-6428.
- Haering, C. H., Farcas, A. M., Arumugam, P., Metson, J., und Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* **454**, 297-301.
- Hagting, A., Den Elzen, N., Vodermaier, H. C., Waizenegger, I. C., Peters, J. M., und Pines, J. (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *Jour. Cell Biol.* **157**, 1125-1137.
- Hardwick, K. G., und Murray, A. W. (1995). Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *Jour. Cell Biol.* **131**, 709-720.
- Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walther, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L., und Peters, J. M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *Jour. Cell Biol.* **161**, 281-294.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C. M., Mechtler, K., und Peters, J. M. (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* **3**, e69.
- Hauf, S., Biswas, A., Langegger, M., Kawashima, S. A., Tsukahara, T., und Watanabe, Y. (2007). Aurora controls sister kinetochore mono-orientation and homolog bi-orientation in meiosis-I. *EMBO Jour.* **26**, 4475-4486.
- Heald, R., und McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* **61**, 579-589.

Herzog, F., Primorac, I., Dube, P., Lenart, P., Sander, B., Mechtler, K., Stark, H., und Peters, J. M. (2009). Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science* 323, 1477-1481.

Hirano, T. (2005). Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr. Biol.* 15, R265-R275.

Hoffmann, D. B., Pearson, C. G., Yen, T. J., Howell, B. J., und Salmon, E.D. (2001). Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores. *Mol. Biol. Cell* 12, 1995-2009.

Homer, H. A., McDougall, A., Levasseur, M., Yallop, K., Murdoch, A. P., und Herbert, M. (2005). Mad2 prevents aneuploidy and premature proteolysis of cyclin B and securin during meiosis I in mouse oocytes. *Genes Dev.* 19, 202-217.

Homer, H. A., McDougall, A., Levasseur, M., Murdoch, A. P., und Herbert, M. (2005). Mad2 is required for inhibiting securin and cyclin B degradation following spindle depolymerization in meiosis I mouse oocytes. *Reproduction* 130, 829-843.

Howell, B. J., McEwen, B. F., Canman, J. C., Hoffmann, D. B., Farrar, E. M., Rieder, C. L., und Salmon, E. D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *Jour. Cell Biol.* 155, 1159-1172.

Hoyt, M. A., Totis, L., und Roberts, B. T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.

Huang, H., Feng, J., Famulski, J., Rattner, J. B., Liu, S. T., Kao, G. D., Muschel, R., Chan, G. K. T., und Yen, T. J. (2007). Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *Jour. Cell Biol.* 177, 413-424.

Hudson, D. F., Marshall, K. M., und Earnshaw, W. C. (2009). Condensin: Architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* 17, 131-144.

Hunt, P., LeMaire, R., Embury, P., Sheean, L., und Mroz, K. (1995). Analysis of chromosome behaviour in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of an univalent chromosome during female meiosis. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2007-2012.

Hwang, L. H., Lau, L. F., Smith, D. L., Mistrot, C. A., Hardwick, K. G., Hwang, K. G., Amon, A., und Murray, A. W. (1998). Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* 279, 1041-1044.

Indjeian, V. B., Stern, B. M., und Murray, A. W. (2005). The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* 307, 130-137.

Iouk, T., Kerscher, O., Scott, R. J., Basrai, M. A., und Wozniak, R. W. (2002). The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint. *Jour. Cell Biol.* 159, 807-819.

Ivanov, D., und Nasmyth, K. (2005). A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* 122, 849-860.

Ivanov, D., und Nasmyth, K. (2007). A physical assay for sister chromatid cohesion *in vitro*. *Mol. Cell* 27, 300-310.

- Katis, V. L., Galova, M., Rabitsch, K. P., Gregan, J., und Nasmyth, K. (2004). Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr. Biol.* *14*, 560-572.
- Katis, V. L., Lipp, J. J., Imre, R., Bogdanova, A., Okaz, E., Habermann, B., Mechtler, K., Nasmyth, K., und Zachariae, W. (2010). Rec8 phosphorylation by casein kinase 1 and Cdc7-Dbf4 kinase regulates cohesin cleavage by separase during meiosis. *Dev. Cell* *18*, 397-409.
- Kawashima, S. A., Tsukahara, T., Langeegger, M., Hauf, S., Kitajima, T. S., und Watanabe, Y. (2007). Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev.* *21*, 420-435.
- Kenna, M. A., und Skibbens, R. V. (2003). Mechanical link between cohesion establishment and DNA replication: Ctf7p/Eco1p, a cohesion establishment factor, associates with three different replication factor C complexes. *Mol. Cell Biol.* *23*, 2999-3007.
- Kerrebrock, A. W., Miyazaki, W. Y., Birnby, D., und Orr-Weaver, T. L. (1992). The *Drosophila* mei-S332 gene promotes sister-chromatid cohesion in meiosis following kinetochore differentiation. *Genetics* *130*, 827-841.
- Kiburz, B. M., Amon, A., und Marston, A. L. (2008). Shugoshin promotes sister kinetochore biorientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1199-1209.
- King, E. M., van der Sar, S. J., und Hardwick, K. G. (2007). Mad3 KEN boxes mediate both Cdc20 and Mad3 turnover, and are critical for the spindle checkpoint. *PLoS ONE* *2*, e342.
- Kitajima, T. S., Kawashima, S. A., und Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* *427*, 510-517.
- Kitajima, T. S., Hauf, S., Ohsugi, M., Yamamoto, T., und Watanabe, Y. (2005). Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting shugoshin localization. *Curr. Biol.* *15*, 353-359.
- Kitajima, T. S., Sakuno, T., Ishiguro, K. I., Iemura, S. I., Natsume, T., Kawashima, S. A., und Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* *441*, 46-52.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S. B., Michaelis, C., Nairz, K., und Nasmyth, K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* *98*, 91-103.
- Kline-Smith, S. L., Khodjakov, A., Hergert, P., und Walczak, C. E. (2004). Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1146-1159.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., und Schiebel, E. (1999). Epitope-tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved routine. *Yeast* *15*, 963-972.
- Kudo, N. R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K. G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., McKay, M., Maro, B., Ellenberg, J., de Boer, P., und Nasmyth, K. (2006). Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* *126*, 135-146.

- Kudo, N. R., Anger, M., Peters, A. H. F. M., Stemmann, O., Theussl, H. C., Helmhardt, W., Kudo, H., Heyting, C., und Nasmyth, K. (2009). Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *Jour. Cell Sci.* *122*, 2686-2698.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B. H., Lipp, J. J., Schleiffer, A., Mechtler, K., und Peters, J. M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* *127*, 955-967.
- Kulukian, A., Han, J. S., und Cleveland, D. W. (2009). Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev. Cell* *16*, 105-117.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lampson, M. A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., und Kapoor, T. M. (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat. Cell Biol.* *6*, 232-237.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S. L., Rosasco, S. E., Barrett-Wilt, G. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Walczak, C. E., und Stukenberg, P. T. (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr. Biol.* *14*, 273-286.
- Lauze, E., Stoelker, B., Luca, F. C., Weiss, E., Schutz, A. R., und Winey, M. (1995). Yeast spindle pole body duplication gene MPS1 encodes an essential dual specificity protein kinase. *EMBO Jour.* *14*, 1655-1663.
- Lee, B., und Amon, A. (2001). Meiosis: how to create a specialized cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*(6), 770-777.
- Lee, J., Kitajima, T. S., Tanno, Y., Yoshida, K., Morita, T., Miyano, T., Miyake, M., und Watanabe, Y. (2008). Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat. Cell Biol.* *10*, 42-52.
- LeMaire-Adkins, R., Radke, K., und Hunt, P. A. (1997). Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *Jour. Cell Biol.* *139*, 1611-1619.
- Li, M., Fang, X., Wei, Z., York, J. P., und Zhang, P. (2009). Loss of spindle assembly checkpoint-mediated inhibition of Cdc20 promotes tumorigenesis in mice. *Jour. Cell Biol.* *185*, 983-994.
- Li, R., und Murray, A. W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* *66*, 519-531.
- Li, Y., Gorbea, C., Mahaffey, D., Rechsteiner, M., und Benezra, R. (1997). Mad2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* *94*, 12431-12436.
- Llano, E., Gomez, R., Gutierrez-Caballero, C., Herran, Y., Sanchez-Martin, M., Vazques-Quinones, L., Hernandez, T., de Alava, E., Cuadrado, A., Barbero, J. L., Suja, J. A., und Pendas, A. M. (2008). Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev.* *22*, 2400-2413.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., und Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology. W. H. Freeman and Company, New York, 5th Edition.*

Losada, A., Hirano, M., und Hirano, T. (1998). Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* *12*, 1986-1997.

Losada, A., Hirano, M., und Hirano, T. (2002). Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev.* *16*, 3004-3016.

Luo, X., Fang, G., Coldiron, M., Lin, Y., Yu, H., Kirschner, M. W., und Wagner, G. (2000). Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 224-229.

Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., und Yu, H. (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol. Cell* *9*, 59-71.

Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., und Yu, H. (2004). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 338-345.

Luo, X., und Yu, H. (2008). Protein metamorphosis: The two-state behaviour of Mad2. *Structure* *16*, 1616-1625.

Malureanu, L. A., Jeganathan, K. B., Hamada, M., Wasilewski, L., Davenport, J., und van Deursen, J. M. (2009). BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. *Dev. Cell* *16*, 118-131.

Maney, T., Hunter, A. W., Wagenbach, M., und Wordeman, L. (1998). Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *Jour Cell Biol.* *142*, 787-801

Mapelli, M., Filipp, F. V., Rancati, G., Massimiliano, L., Nezi, L., Stier, G., Hagan, R. S., Confalonieri, S., Piatti, S., Sattler, M., und Musacchio, A. (2006). Determinants of conformational dimerization of Mad2 and its inhibition by p31^{Comet}. *EMBO Jour.* *25*, 1273-1284.

Mapelli, M., Massimiliano, L., Santaguida, S., und Musacchio, A. (2007). The Mad2 conformational dimer: structure and implication for the spindle assembly checkpoint. *Cell* *131*, 730-743.

Marston, A. L., Tham, W. H., Shah, H., und Amon, A. (2004). A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* *303*, 1367-1370.

Martin-Lluesma, S., Stucke, V. M., und Nigg, E. A. (2002). Role of Hec1 in spindle checkpoint signalling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science* *297*, 2267-2270.

Martinez-Exposito, M. J., Kaplan, K. B., Copeland, J., und Sorger, P. K. (1999). Retention of the Bub3 checkpoint protein on lagging chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 8493-8498.

Mattison, C. P., und Winey, M. (2006). The centrosome cycle. *Results Probl. Cell Differ.* *42*, 111-146.

- McGuinness, B. E., Hirota, T., Kudo, N. R., Peters, J. M., und Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* 3, e86.
- McGuinness, B. E., Anger, M., Kouznetsova, A., Gil-Bernabe, A. M., Helmhart, W., Kudo, N. R., Wuensche, A., Taylor, S., Hoog, C., Novak, B., und Nasmyth, K. (2009). Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* 19, 369-380.
- McIntosh, J. R. (1985). Spindle structure and the mechanism of chromosome movement. *Aneuploidy, Etiology and Mechanisms*, 197-229.
- Michaelis, C., Ciosk, R., und Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91, 35-45.
- Minshull, J., Sun, H., Tonks, N. K., und Murray, A. W. (1994). A MAP-kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 79, 475-486.
- Moldovan, G. L., Pfander, B., und Jentsch, S. (2006). PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol. Cell* 23, 723-732.
- Mondall, G., Baral, R. N., und Roychoudhury, S. (2006). A new Mad2-interacting domain of Cdc20 is critical for the function of Mad2-Cdc20 complex in the spindle assembly checkpoint. *Biochem. Jour.* 396, 243-253.
- Morrow, C. J., Tighe, A., Johnson, V. L., Scott, M. I., Ditchfield, C., und Taylor, S. S. (2005). Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/C Cdc20. *Jour. Cell Sci.* 118, 3639-3652.
- Murata-Hori, M., Tatsuka, M., und Wang, Y. L. (2002). Probing the dynamics and functions of Aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 13, 1099-1108.
- Murray, A. W. (1991). Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* 36, 581-605.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Musacchio, A., und Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(5), 379-393.
- Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 35, 673-745.
- Nasmyth, K. (2005). How do so few control so many? *Cell* 120, 739-746.
- Nasmyth, K., und Haering, C. H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 595-648.
- Nasmyth, K., und Haering, C. H. (2009). Cohesin: Its roles and mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 43, 525-558.

- Nezi, L., und Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 1-11.
- Niault, T., Hached, K., Sotillo, R., Sorger, P. K., Maro, B., Benezra, R., und Wassmann, K. (2007). Changing Mad2 levels affects chromosome segregation and spindle assembly checkpoint in female mouse meiosis I. *PLoS One* *2*, e1165.
- Nilsson, J., Yekezare, M., Minshull, J., und Pines, J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1411-1420.
- Onn, I., Heidinger-Pauli, J. M., Guacci, V., Ünal, E., und Koshland, D. E. (2008). Sister chromatid cohesion: A simple concept with a complex reality. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *24*, 105-129.
- Page, S. L., und Hawley, R. S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* *301*, 785-789.
- Paliulis, L. V., und Nicklas, R. B. (2000). The reduction of chromosome number in meiosis is determined by properties built into the chromosomes. *Jour Cell Biol.* *150*, 1223-1232.
- Pan, J., und Chen, R. H. (2004). Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *18*, 1439-1451.
- Parra, M. T., Gomez, R., Viera, A., Llano, E., Pendas, A. M., Rufas, J. S., und Suja, J. A. (2009). Sequential assembly of centromeric proteins in male mouse meiosis. *PLoS Genet.* *5*, e1000417.
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., und Nigg E. A. (1990). *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by Cdc2 kinase. *Cell* *61*, 591-602.
- Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 644-656.
- Pinsky, B. A., und Biggins, S. (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol.* *15*, 486-493.
- Pinsky, B. A., Kung, C., Shokat, K. M., und Biggins, S. (2006). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat. Cell Biol.* *8*, 78-83.
- Pouwels, J., Kukkonen, A. M., Lan, W., Daum, J. R., Gorbsky, G. J., Stukenberg, T., und Kallio, M. J. (2007). Shugoshin-1 plays a central role in kinetochore assembly and is required for kinetochore targeting of Plk1. *Cell Cycle* *6*, e1-e7.
- Rabitsch, K. P., Petronczki, M., Javerzat, J. P., Genier, S., Chwalla, B., Schleiffer, A., Tanaka, T. U., und Nasmyth, K. (2003). Kinetochore recruitment of two nucleolar proteins is required for homolog segregation in meiosis I. *Dev. Cell* *4*, 535-548.
- Rabitsch, K. P., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J. P., Eisenhaber, F., und Nasmyth, K. (2004). Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Curr. Biol.* *14*, 287-301.

- Reddy, S. K., Rape, M., Margansky, W. A., und Kirschner, M. W. (2007). Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* **446**, 921-925.
- Resnick, T. D., Satinover, D. L., MacIsaac, F., Stukenberg, T., Earnshaw, W. C., Orr-Weaver, T. L., und Carmena, M. (2006). INCENP and Aurora B promote meiotic sister chromatid cohesion through localization of the shugoshin MEI-S332 in *Drosophila*. *Dev. Cell* **11**, 57-68.
- Riedel, C. G., Katis, V. L., Katou, Y., Mori, Y., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., Mudrak, I., Ogris, E., Mechtler, K., Pelletier, L., Buchholz, F., Shirahige, K., und Nasmyth, K. (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* **441**, 53-61.
- Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A., und Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *Jour. Cell Biol.* **130**, 941-948.
- Rothweiler, U., Czarna, A., Weber, L., Popowicz, G. M., Brongel, K., Kowalska, K., Orth, M., Stemmann, O., und Holak, T. A. (2008). NMR screening for lead compounds using tryptophan-mutated proteins. *Jour. Med. Chem.* **51**, 5035-5042.
- Rowland, B. D., Roig, M. B., Nisino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouet, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R., Mechtler, K., Katis, V. L., und Nasmyth, K. (2009). Building sister chromatid cohesion: Smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol. Cell* **33**, 763-774.
- Ruchaud, S., Carmena, M., und Earnshaw, W. C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** (10), 798-812.
- Rupp, R. A., Snider, L., und Weintraub, H. (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XmyoD. *Genes Dev.* **8**, 1311-1323.
- Sakuno, T., Tada, K., und Watanabe, Y. (2009). Kinetochores geometry is defined by cohesion within the centromere. *Nature* **458**, 852-858.
- Sakuno, T., und Watanabe, Y. (2009). Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. *Chromosome Res.* **17**, 239-249.
- Salic, A., Waters, J. C., und Mitchison, T. J. (2004). Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochores microtubule stability in mitosis. *Cell* **118**, 567-578.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampath, S. C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., und Funabiki, H. (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* **118**, 187-202.
- Scanlan, M. J., Gout, I., Gordon, C. M., Williamson, B., Stockert, E., Gure, A. O., Jäger, D., Chen, Y. T., Mackay, A., O'Hare, M. J., und Old, L. J. (2001). Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun.* **1**, 4-20.

- Schaar, B.T., Chan, G. K., Maddox, P., Salmon, E. D., und Yen, T. J. (1997). CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *Jour. Cell Biol.* **139**, 1373-1382.
- Schule, B., Oviedo, A., Johnston, K., Pai, S., und Francke, U. (2005). Inactivating mutations in ESCO2 cause SC phocomelia and Roberts syndrome: no phenotype-genotype correlation. *Am. Jour. Hum. Genet.* **77**, 1117-1128.
- Sczanieka, M., Feoktistova, A., May, K. M., Chen, J. S., Blyth, J., Gould, K. L., und Hardwick, K. G. (2008). The spindle checkpoint functions of Mad3 and Mad2 depend on a Mad3 KEN box-mediated interaction with Cdc20-anaphase-promoting complex (APC/C). *Jour. Biol. Chem.* **283**, 23039-23047.
- Sentein, P. (1979). Nocodazole, an antitubulin substance, whose action is different from that of colchicine. Effects on segmentation mitoses. I.—Light microscopy. *Arch. Biol. (Liege)*. **90**, 459-479.
- Shah, J. V., Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M., und Cleveland, D. W. (2004). Dynamics of centromere and kinetochore proteins: implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr. Biol.* **14**, 942-952.
- Sharp, D. J., Rogers, G. C., und Scholey, J. M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* **407**, 41-47.
- Sharp-Baker, H., und Chen, R. H. (2001). Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity. *Jour. Cell Biol.* **153**, 1239-1250.
- Simonetta, M. A., Manzoni, R., Mosca, R., Mapelli, M., Massimiliano L., Vink, M., Novak, B., Musacchio, A., und Ciliberto, A. (2009). The influence of catalysis on Mad2 activation dynamics. *PLoS Biol.* **13**, e10.
- Sironi, L., Melixetian, M., Faretta, M., Prosperini, E., Helin, K., und Musacchio, A. (2001). Mad2 binding to Mad1 and Cdc20, rather than oligomerization, is required for the spindle checkpoint. *EMBO Jour.* **20**, 6371-6382.
- Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De Antoni, A., Jeang, K. T., und Musacchio, A. (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: Implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO Jour.* **21**, 2496-2506.
- Skibbens, R. V., Corson, L. B., Koshland, D. E., und Hieter, P. (1999). Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev.* **13**, 307-319.
- Skibbens, R. V. (2009). Establishment of sister chromatid cohesion. *Curr. Biol.* **19**, R126-R132.
- Stegmeier, F., Rape, M., Draviam, V. M., Nalepa, G., Sowa, M. E., Ang, X. L., McDonald, E. R. 3rd, Li, M. Z., Hannon, G. J., Sorger, P. K., Kirschner, M. W., Harper, J. W., und Elledge, S. J. (2007). Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and de-ubiquitination activities. *Nature* **446**, 876-881.
- Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P., und Kirschner, M. W. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**, 715-726.

- Strachan, T. (2005). Cornelia de Lange syndrome and the link between chromosomal function, DNA repair and developmental gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 258-264.
- Stucke, V. M., Baumann, C., und Nigg, E. A. (2004). Kinetochore localization and microtubule interaction of the human spindle checkpoint kinase Mps1. *Chromosoma* **113**, 1-15.
- Sudakin, V., Chan, G. K., und Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *Jour. Cell Biol.* **154**, 925-936.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H., und Peters, J. M. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *Jour. Cell Biol.* **151**, 749-762.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A., und Peters, J. M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* **9**, 515-525.
- Sutani, T., Kawaguchi, T., Kanno, R., Itoh, T., und Shirahige, K. (2009). Budding yeast Wpl1 (Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr. Biol.* **19**, 492-497.
- Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J., und Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole corrections. *Cell* **108**, 317-329.
- Tang, Z., Sun, Y., Harley, S. E., Zou, H., und Yu, H. (2004). Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through shugoshin during mitosis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101**, 18012-18017.
- Tang, Z., Shu, H., Qi, W., Mahmood, N., Mumby, M. C., und Yu, H. (2006). PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev. Cell* **10**, 1-11.
- Terada, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Yasuda, Y., Fujita, S., und Otsu, M. (1998). AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO Jour.* **17** (3), 667-676.
- Tonkin, E. T., Wang, T. J., Lisgo, S., Bamshad, M. J., und Strachan, T. (2004). NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat. Genet.* **36**, 636-641.
- Toth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A., und Nasmyth, K. (1999). Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p (Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev.* **13**, 320-333.
- Toth, A., Rabitsch, K. P., Galova, M., Schleiffer, A., Buonomo, S. B., und Nasmyth, K. (2000). Functional genomics identifies monopolin: a kinetochore protein required for segregation of homologs during meiosis I. *Cell* **103**, 1155-1168.
- Tovey, E. R., und Baldo, B. A. (1989). Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting. *Jour. Biochem. Biophys. Methods* **19**, 169-183.

- Tsurumi, C., Hoffmann, S., Geley, S., Graeser, R., und Polanski, Z. (2004). The spindle assembly checkpoint is not essential for CSF arrest in mouse oocytes. *Jour. Cell Biol.* *167*, 1037-1050.
- Tunquist, B. J., und Maller, J. L. (2003). Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* *17*, 683-710.
- Turner, D. L., und Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev.* *8*, 1434-1447.
- Uhlmann, F., und Nasmyth, K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr. Biol.* *8*, 1095-1101.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., und Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* *400*, 37-42.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V., und Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* *103*, 375-386.
- Unal, E., Heidinger-Pauli, J. M., Kim, W., Guacci, V., Onn, I., Gygi, S. P., und Koshland, D. E. (2008). A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* *321*, 566-569.
- Vader, G., Medema, R. H., und Lens, S. M. (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *Jour. Cell Biol.* *173*, 833-837.
- Vader, G., Cruijssen, C. W. A., van Harn, T., Vromans, M. J. M., Medema, R. H., und Lens, S. M. A. (2007). The chromosomal passenger complex controls spindle checkpoint function independent from its role in correcting microtubule-kinetochore interactions. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4553-4564.
- Vagnarelli, P., und Earnshaw, W. C. (2004). Chromosomal passengers: The four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* *113*, 211-222.
- Vanoosthuyse, V., Prykhozhij, S., und Hardwick, K. G. (2007). Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1657-1669.
- Vaur, S., Cubizolles, F., Plane, G., Genier, S., Rabitsch, P. K., Gregan, J., Nasmyth, K., Vanoosthuyse, V., Hardwick, K. G., und Javerzat, J. P. (2005). Control of shugoshin function during fission-yeast meiosis. *Curr. Biol.* *15*, 2263-2270.
- Vega, H., Waisfisz, Q., Gordillo, M., Sakai, N., Yanagihara, I., Yamada, M., van Gosliga, D., Kayserili, H., Xu, C., and Ozono, K., Jabs, E. W., Inui, K., und Joenje, H. (2005). Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat. Genet.* *37*, 468-470.
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbe, J. C., Castro, A., und Lorca, T. (2004). Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: Who controls whom? *Mol. Biol. Cell* *15*, 4584-4596.
- Vink, M., Simonetta, M., Transidico, P., Ferrari, K., Mapelli, M., De Antoni, A., Massimiliano, L., Ciliberto, A., Faretta, M., Salmon, E. D., und Musacchio, A. (2006). In vitro FRAP identifies the minimal requirements for Mad2 kinetochore dynamics. *Curr. Biol.* *16*, 755-766.

- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., und Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399-410.
- Walczak, C. E., Gan, E. C., Desai, A., Mitchison, T. J., und Kline-Smith, S. L. (2002). The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 is required for chromosome positioning during spindle assembly. *Curr. Biol.* 12, 1885-1889.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., und McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Jour. Am. Chem. Soc.* 93, 2325-2327.
- Wassmann, K., und Benezra, R. (1998). Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11193-11198.
- Wassmann, K., Liberal, V., und Benezra, R. (2003). Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *EMBO Jour.* 22, 797-806.
- Wassmann, K., Nault, T., und Maro, B. (2003). Metaphase I arrest upon activation of the Mad2-dependent spindle checkpoint in mouse oocytes. *Curr. Biol.* 13, 1596-1608.
- Watanabe, Y., und Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 400, 461-464.
- Waters, J. C., Chen, R. H., Murray, A. W., und Salmon, E. D. (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *Jour. Cell Biol.* 141, 1181-1191.
- Watrin, E., Schleiffer, A., Tanaka, K., Eisenhaber, F., Nasmyth, K., und Peters, J. M. (2006). Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression. *Curr. Biol.* 16, 863-874.
- Weiss, E., und Winey, M. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *Jour. Cell Biol.* 132, 11-123.
- Williams, G. L., Roberts, T. M., und Gjoerup, O. V. (2007). Bub1: escapades in a cellular world. *Cell Cycle* 6, 1699-1704.
- Winey, M., Goetsch, L., Baum, P., und Byers, B. (1991). MPS1 and MPS2: novel genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *Jour. Cell Biol.* 114, 745-754.
- Wittmann, T., Hyman, A., und Desai, A. (2001). The spindle: A dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3, E28-E34.
- Wood, K. W., Sakowitz, R., Goldstein, L. S., und Cleveland, D. W. (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell* 91, 357-366.
- Wordeman, L., und Mitchison, T. J. (1995). Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *Jour. Cell Biol.* 128, 95-104.

- Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T., und Yu, H. (2004). Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *EMBO Jour.* **23**, 3133-3143.
- Xu, Z., Cetin, B., Anger, M., Cho, U. S., Helmhardt, W., Nasmyth, K., und Xu, W. (2009). Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Mol. Cell* **35**, 426-441.
- Yamamoto, A., Guacci, V., und Koshland, D. (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Jour. Cell Biol.* **133**, 85-97.
- Yang, M., Li, B., Tomchick, D. R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H., und Luo, X. (2007). p31^{Comet} blocks Mad2 activation through structural mimicry. *Cell* **131**, 744-755.
- Yang, M., Li, B., Liu, C. J., Tomchick, D. R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H., und Luo, X. (2008). Insights into Mad2 regulation in the spindle checkpoint revealed by the crystal structure of the symmetric Mad2 dimer. *PLoS Biol.* **6**, e50.
- Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K. F., und Cleveland, D. W. (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat. Cell Biol.* **2**, 484-491.
- Yen, T. J., Compton, D. A., Wise, D., Zinkowski, R. P., Brinkley, B. R., Earnshaw, W. C., und Cleveland, D. W. (1991). CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO Jour.* **10**, 1245-1254.
- Yokobayashi, S., Yamamoto, M., und Watanabe, Y. (2003). Cohesins determine the attachment manner of kinetochores to spindle microtubules at meiosis I in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* **23**, 3965-3973.
- Yokobayashi, S., und Watanabe, Y. (2005). The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* **123**, 803-817.
- Yu, H. G., und Dawe, R. K. (2000). Functional redundancy in the maize meiotic kinetochore. *Jour. Cell Biol.* **151**, 131-142.
- Yu, H. G., und Koshland, D. (2007). The Aurora kinase Ipl1 maintains the centromeric localization of PP2A to protect cohesin during meiosis. *Jour. Cell Biol.* **176**, 911-918.
- Yucel, J. K., Marszalek, J. D., McIntosh, J. R., Goldstein, L. S., und Cleveland, D. W., (2000). CENP-meta, an essential kinetochore kinesin required for the maintenance of metaphase chromosome alignment in *Drosophila*. *Jour. Cell Biol.* **150**, 1-11.
- Zhang, J., Shi, X., Li, Y., Kim, B. J., Jia, J., Huang, Z., Yang, T., Fu, X., Jung, S. Y., Wang, Y., Zhang, P., Kim, S. T., Pan, X., und Qin, J. (2008). Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol. Cell* **31**, 143-151.
- Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T., und Kirschner, M. W. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* **285**, 418-422.

7. Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Azetat
AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
Ade	Adenosin
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
Amp	Ampicillin
APC/C	Anaphase Promoting Komplex od. Cyclosome (E3-Ubiquitinligase)
ATP	Adenosin-Triphosphat
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Bub	Budding uninhibited by benzimidazole
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
Cdk	Cyclin abhängige Kinase
C-Mad2	„Geschlossene“ Konformation von Mad2
CMV	CytoMegalo-Virus
CPC	Chromosomaler Passenger Komplex
CSF	Zytostatischer Faktor
CSF-Extrakt	Durch CSF-Aktivität in Metaphase II arretierter <i>Xenopus laevis</i> -Oozytenextrakt
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DBD	GAL4-DNA-Bindungsdomäne
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-Aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum
Flag	Epitop-Anhang (AS-Sequenz: DYKDDDDK)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²) oder Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein (eGFP: „ <i>enhanced ...</i> “)
GST	Glutathion S-Transferase
h	human oder Stunde

Abkürzungen

HA	Hämagglutinin, Epitop-Anhang (AS-Sequenz: YPYDVPDYA)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'(2-Ethansulfonsäure)
His	Histidin
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i> (aus Meerrettich isolierte Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IVT	<i>In vitro</i> Translation
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani (<i>E. coli</i> -Nährmedium)
Leu	Leucin
μ	mikro
m	milli oder Maus
M	Molar (mol/l)
Mad	<i>Mitotic arrest deficient</i>
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MCAK	Mitotisches Zentromer-Assoziiertes Kinesin
MCC	Mitotischer <i>Checkpoint</i> Komplex
MCS	Multiple Klonierstelle (engl. „ <i>Multiple Cloning Site</i> “)
MG132	Proteasomen-Inhibitor
MMR	Marc's Modifizierte(r) Ringer (-lösung)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
min.	Minuten
MOPS	Morpholinoethansulfonsäure
MT	Mikrotubuli
Myc	c-Myc Onkogen, Epitop-Anhang (AS-Sequenz: EQKLISEEDL)
n	nano
Noc	Nocodazol
NTA	Nitrilo-Triessigsäure
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
O-Mad2	„Offene“ Konformation von Mad2
ORF	Offener Leserahmen (engl. „ <i>Open Reading Frame</i> “)
p. a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Plk1	Polo-ähnliche Kinase 1 (engl. „ <i>Polo-like kinase 1</i> “)

Abkürzungen

PP2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm.	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
SAP	Alkalische Phosphatase (engl. „ <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> “)
S. c.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	Synthetisch vollständig (engl. „ <i>Synthetic Complete</i> “)
SDS	Natriumdodezylsulfat
Sgo1	Shugoshin-1
Sgo2	Shugoshin-2
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
sog.	sogenannt
S. p.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TBS	Tris gepufferte Saline
TBSW	TBS mit 0,05 % Tween-20
TEV	Protease des <i>Tobacco Etch Virus</i>
Tev	Spez. Erkennungssequenz der TEV-Protease (AS-Sequenz: EXXYXQ(G/S))
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Trp	Tryptophan
U	Unit
V	Volt
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
Wapl	engl. „ <i>Wings apart-like</i> “
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
X	<i>Xenopus laevis</i>
YPD	Hefe Pepton (D-) Glukose (engl. „ <i>Yeast Peptone Glucose</i> “)
z.B.	zum Beispiel
zw.	zwischen

8. Danksagung

Als erstes möchte ich meinen Eltern, Rüdiger und Gudrun Orth (geb. Lachenmaier), danken, denen ich diese Doktorarbeit widme. Ohne ihre Unterstützung wären mein Studium der Biologie und die Erstellung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Als zweites danke ich Herrn Prof. Dr. Olaf Stemmann (Universität Bayreuth) für die Bereitstellung der Doktorandenstelle sowie für die stete wissenschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit, ohne die der gegenwärtige Stand des bearbeiteten Projektes niemals hätte erreicht werden können. In diesem Zusammenhang möchte ich mich gleichzeitig auch bei der deutschen Krebshilfe (Mildred Scheel Stiftung) sowie bei der Minerva-James-Heinemann Stiftung für finanzielle Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Stefan Jentsch (Max Planck Institut f. Biochemie, Martinsried) möchte ich für eine wundervolle und wissenschaftlich stets stimulierende Arbeitsatmosphäre sowie für die Bereitstellung mannigfaltiger Geräte und Reagenzien während der Zeit in seiner Abteilung am Max Planck Institut danken.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Alexander Strasser und Monika Ohlraun für hervorragende technische Assistenz, Markus Hermann für Assistenz bei der Durchführung der Lebend-Zell-Mikroskopie, Bernd Mayer für Zusammenarbeit innerhalb des Shugoshin-Projektes, Prof. Dr. Tadeus Holak (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) und seiner Arbeitsgruppe für die Durchführung der NMR- und der ITC-Experimente, Dr. Kay Hofmann (Miltenyi Biotec GmbH) für bioinformatische Untersuchungen, Prof. Dr. Thomas U. Mayer (Universität Konstanz) sowie Prof. Dr. Steven S. Taylor (Universität Manchester) für die Bereitstellung von Antikörpern, Katharina Ruhnke für Assistenz im Rahmen einer Bachelor-Arbeit, Manuel Kaulich (Biozentrum Basel) für den Austausch von unveröffentlichten Daten und schließlich bei allen weiteren Mitgliedern des Lehrstuhls von Herrn Prof. Dr. Olaf Stemmann.

Abschließend bedanken möchte ich mich erneut bei Herrn Prof. Dr. Stefan Jentsch sowie bei Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer (Ludwig Maximilians Universität München) für ihre Beurteilung dieser Doktorarbeit als Gutachter. Gleichzeitig möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern der Promotionskommission bedanken.

9. Lebenslauf

Name: Michael Orth
Geburtsdatum: 6. Juni 1977
Geburtsort: Mannheim

Schulbildung

1983-1987 Albert Schweitzer Grundschule in Weinheim/
Uhland Grundschule in Hemsbach
1987-1996 Heinrich Sigmund Gymnasium in Schriesheim
Abschluss mit Abitur im Juni 1996

Berufsausbildung

1996-1999 Berufsausbildung zum Biologielaborant
Ausbildungsbetrieb: BASF AG, Ludwigshafen a. Rhein
Abschluss mit IHK-Zeugnis im Juli 1999

Studium

1999-2003 Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls
Universität, Heidelberg
2003-2004 Diplomarbeit am ZMBH der Ruprecht-Karls Universität,
Heidelberg in der Gruppe von Prof. Dr. Oliver J. Gruss
Thema: „Identifikation nukleärer Proteine mit Funktion
in der Etablierung der mitotischen Spindel“
Abschluss mit Diplom im Oktober 2004

Doktorarbeit

2005-2010 Doktorarbeit am Max Planck Institut für Biochemie,
Martinsried/Universität Bayreuth in der Arbeitsgruppe
von Prof. Dr. Olaf Stemmann