

Studien zur Regulation und Funktion der
Phosphatase Cdc14 in *S. cerevisiae*



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Nina-Maria Weber

aus

Deggendorf

im Jahr 2017

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Unterschrift: _____

There is nothing more wonderful than being a scientist.

Nowhere I would rather be than in my lab, staining up my clothes and getting paid to play.

- Marie Curie

Inhaltsverzeichnis	
1	Zusammenfassung1
2	Abstract3
3	Einleitung5
3.1	Der Zellteilungszyklus in <i>S. cerevisiae</i>5
3.2	Die Rolle von Kinasen und Phosphatasen in der Zellteilung7
3.3	Die Klassifizierung der Phosphatase Cdc14.....10
3.3.1	Aufbau von Cdc14 in <i>S. cerevisiae</i>10
3.3.2	Freisetzung und Regulation von Cdc14.....13
3.3.2.1	Der Nukleolus als Ort der Verankerung von Cdc1414
3.3.2.2	Net1- Inhibitor von Cdc1416
3.3.2.3	Die Freisetzung von Cdc14 über FEAR und MEN17
3.3.2.4	Die Regulation der Lokalisation von Cdc1420
3.3.3	Funktionen und Substrate von Cdc14 im Zellzyklus von <i>S. cerevisiae</i>21
4	Ergebnisse25
4.1	Lokalisation von Cdc14 im Zellzyklus.....25
4.2	Regulation von Cdc14 durch Net1.....27
4.2.1	Analyse der Cdc14-Bindedomänen von Net1.....31
4.2.2	Analyse der Cdc14-Inhibitionsdomänen in Net1.....37
4.3	Analyse der CTD von Cdc14 durch Lokalisationsstudien39
4.3.1	Lokalisation C-terminal verkürzter Cdc14-Derivate.....41
4.3.2	Regulation des Kerntransports über die CTD49
4.4	Ein essentieller Bereich in der CTD von Cdc14.....51
4.4.1	Bedeutung der katalytischen Domäne für die biologische Funktion.....53
4.4.2	Wiederherstellung der <i>in vivo</i> -Funktion nach Co-Expression von NTD und CTD54
4.4.3	Komplementationsstudien zur Eingrenzung des essentiellen Bereiches.....57
4.4.3.1	Komplementationsstudien mit internen Mutationen.....59
4.4.3.2	Komplementationsstudien mit internen Deletionen.....62
4.4.3.3	Statistische Auswertung der Komplementationsanalysen.....63
4.5	Charakterisierung der essentiellen Region in der CTD65
4.5.1	Charakterisierung im Zellzyklus und Wachstumstest65
4.5.2	Manipulation der CTD führt zu einer veränderten Freisetzung68
4.5.3	Verlängerung der Anaphase nach Manipulation des essentiellen Bereichs71
4.5.3.1	Zunehmende Dauer der Spindelelongation71
4.5.3.2	Beeinflussung der Ase1-Lokalisation durch Cdc14(Δ 426-430)75
4.5.3.3	Lokalisation von Ase1 in Δ <i>hct1</i> -Zellen.....79
4.5.4	Dephosphorylierung von Ase1 durch Cdc14(Δ 426-430)82
4.5.5	Dephosphorylierung von Hct1 durch Cdc14(ASAA).....83

4.5.6	Hemmung des Kernimports von Hct1 durch Cdc14(Δ 426-430)	86
4.6	Unterstützung der Phosphataseaktivität <i>in vitro</i> durch die CTD.....	91
4.6.1	Einfluss der CTD von Cdc14 auf die Net1-vermittelte Inhibition.....	93
4.6.2	Geringere <i>in vitro</i> -Aktivität der katalytischen Domäne ohne CTD	96
5	Diskussion	98
5.1	Regulation von Cdc14 über Lokalisationssignale	98
5.1.1	Wildtyp-Lokalisation durch Selbstinteraktion?	98
5.1.2	Rolle der Lokalisationssequenzen von Cdc14 in <i>S. cerevisiae</i>	99
5.2	Die Net1-vermittelte Regulation von Cdc14	102
5.2.1	Einfluss von Net1 auf die Lokalisation von Cdc14	102
5.2.2	Trennung der Cdc14-Bindung und Inhibition durch Net1	104
5.2.2.1	Beitrag mehrerer Domänen von Net1 zur Bindung von Cdc14	104
5.2.2.2	Die Cdc14-Inhibitionsdomäne von Net1	107
5.2.2.3	Modell zur Bindung und Inhibition von Cdc14	109
5.3	Das essentielle Funktionselement in der CTD von Cdc14.....	110
5.3.1	Abhängigkeit der katalytischen Domäne von der CTD	110
5.3.2	Charakterisierung der CTD	111
5.3.3	Regulation von Cdc14 durch die CTD.....	114
6	Methoden	118
6.1	Arbeiten mit Bakterien	118
6.1.1	Kultivierung von Bakterien	118
6.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	118
6.2	Arbeiten mit der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	118
6.2.1	Die Kultivierung von Hefen in Flüssigmedium.....	119
6.2.2	Konservierung von Hefestämmen	119
6.2.3	Wachstumstest mittels Verdünnungsreihe.....	119
6.2.4	Kreuzung haploider Hefestämme	119
6.2.5	Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse	119
6.2.6	Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode	120
6.2.7	Expression eines Gens mittels <i>pGAL1</i> -Induktion	121
6.3	Fixierung und Färbung von Hefezellen zur durchflusszytometrischen Analyse.....	121
6.3.1	Ethanol-Fixierung von Hefezellen.....	121
6.3.2	Färbung von Hefezellen zur durchflusszytometrischen Analyse	122
6.3.3	Durchflusszytometrische Analyse.....	122
6.4	Mikroskopie von lebenden Hefezellen	122
6.4.1	Bearbeitung der Mikroskopiedaten.....	124
6.4.1.1	Quantifizierung der Hct1-Phosphorylierungsbande	124
6.4.1.2	Quantifizierung von Hct1(1-257)-GFP	125

6.5	Genetische und molekularbiologische Methoden	125
6.5.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	125
6.5.1.1	Herstellung von Kochlysaten	125
6.5.1.2	Plasmidpräparation über kommerzielle Reinigungssäulen	126
6.5.1.3	Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse (<i>low-copy</i> Plasmide)	126
6.5.2	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	126
6.5.3	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	127
6.5.3.1	PCR für Epitopmarkierungen und Deletionen	127
6.5.3.2	PCR mit genomischer oder Plasmid-DNA.....	128
6.5.3.3	Mutagenese-PCR.....	128
6.5.3.4	MAT-PCR.....	129
6.5.4	Agarosegelelektrophorese	130
6.5.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	130
6.5.5.1	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	130
6.5.5.2	Aufreinigen von DNA-Fragmenten nach PCR	131
6.5.6	Restriktionsverdau von DNA	131
6.5.7	Ligation von DNA-Fragmenten	131
6.5.8	Sequenzierung	132
6.6	Proteinanalytische Methoden.....	132
6.6.1	Zellaufschluss und Reinigung von Proteinen aus <i>Escherichia Coli</i>	132
6.6.1.1	Testexpression und Expression zur Proteinaufreinigung	132
6.6.1.2	Zellaufschluss mittels French Press.....	133
6.6.1.3	Reinigung von MBP-Fusionsproteinen	133
6.6.1.4	Bradford-Test für Proteinreinigungen.....	133
6.6.2	Proteinlysate aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	134
6.6.2.1	Bradford-Test.....	135
6.6.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	135
6.6.2.3	Western Blot mit Proteinnachweis	136
6.6.2.4	Co-Immunpräzipitation	136
6.6.2.5	Coomassie-Färbung.....	137
6.6.2.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinbanden mittels <i>ImageJ</i>	138
6.7	Phosphatase-Assay	138
6.8	Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H).....	139
7	Material	141
7.1	Hefestämme.....	141
7.2	Vektoren und Plasmide.....	145
7.3	Oligonukleotide	146
7.3.1	Mutagenese-Primer	146

7.3.2	Oligos zur Epitopmarkierung und Deletion von <i>CDC14</i>	147
7.4	Antikörper	148
7.5	Medien, Puffer und Lösungen	149
7.5.1	Bakterienmedien	149
7.5.2	Hefemedien	150
7.5.3	Puffer und Lösungen	152
7.6	Programme und Software.....	155
8	Literaturverzeichnis	156
9	Anhang	164
9.1	Ergänzungen zu den Ergebnissen	164
9.1.1	Proteinwechselwirkung N-terminaler Fragmente von Net1 mit Cdc14.....	164
9.1.2	Western Blot-Analyse als Ergänzung zu Cdc14(1-374)-HA3.....	165
9.1.3	Komplementationsstudien mit Cdc14-Flag3-Derivaten.....	165
9.1.3.1	Expression von <i>CDC14</i> mit internen Deletionen der CTD und Flag3-Fusion	165
9.1.3.2	Komplementationsanalysen mit Flag3-Proteinfusionen.....	166
9.1.4	Proteinexpression von <i>GFP-CDC14(342-551)</i>	166
9.1.5	Selbsinteraktion von Cdc14 im N-Terminus	167
9.1.6	Proteinwechselwirkungen zwischen Bmh1 und Cdc14.....	167
9.1.6.1	Co-Immünpräzipitation von Bmh1 mit Cdc14 und Cdc14(342-551).....	167
9.1.6.2	Proteinbindung von Bmh1 mit Cdc14 im Y2H	168
9.2	Abbildungsverzeichnis	169
9.3	Tabellenverzeichnis	172
9.4	Abkürzungsverzeichnis	173
10	Lebenslauf	177
11	Danksagung	179

1 Zusammenfassung

Die konservierte Phosphatase Cdc14, eine Vertreterin der Protein-Tyrosin-Phosphatasen-Superfamilie, spielt in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eine essentielle Rolle während der Mitose und der Zytokinese. Die Phasen des Zellzyklus werden durch die oszillierende Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinase Cdk1 gesteuert. In der Mitose ist diese Aktivität im Vergleich zur Interphase hoch. Für den Austritt aus der Mitose muss die Aktivität der mitotischen Zyklin-Cdk-Komplexe herunterreguliert werden. Diese wird durch gezielte Dephosphorylierungen von Cdk1-Substraten in der Anaphase durch den Hauptantagonisten Cdc14 inhibiert. Die biologische Aktivität von Cdc14 wird durch ihre subzelluläre Lokalisation kontrolliert: Bis zur Interphase wird Cdc14 im Nukleolus inaktiv gehalten. Diese Verankerung wird über ihren Inhibitor Net1 vermittelt. Die Bindung an Net1 findet durch eine Proteinwechselwirkung mit der katalytischen Domäne von Cdc14 statt. In dieser Arbeit konnte anhand co-immunologischer Bindungsstudien, Wachstumstests und *in vitro*-Analysen gezeigt werden, dass zwischen Binde- und Inhibitionsdomänen in N-terminalen Net1-Fragmenten differenziert werden kann.

In der Anaphase wird Cdc14 aus dem Nukleolus in den Zellkern und das Zytoplasma freigesetzt, um dort Zielproteine für den Austritt aus der Mitose zu dephosphorylieren. Diese Freisetzung von Net1 erfolgt über die zwei regulatorischen Netzwerke FEAR und MEN. Cdc14 besteht aus einer N-terminalen katalytischen Domäne und aus einer variablen Domäne im C-terminalen Anteil. Letztere enthält eine Kernexportsequenz, eine kurze *Tandem Repeat*-Sequenz von bisher unbekannter Funktion, sowie eine Kernimportsequenz die durch MEN reguliert wird.

Aufgrund der hohen Konservierung in höheren Eukaryoten wurde in der Literatur im Besonderen die N-terminale katalytische Domäne intensiv untersucht. Zusätzliche Regulationsmechanismen der Lokalisation von Cdc14 im Zellzyklus werden jedoch über die variable Domäne erreicht. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die durch MEN kontrollierte Kernimportsequenz überflüssig für die Lokalisation und die Funktion von Cdc14 ist. So wies ein N-terminales Derivat der Phosphatase in Abwesenheit der Kernimportsequenz ein vollkommen typisches Lokalisationsmuster auf.

Ergänzend konnte in dieser Arbeit beschrieben werden, dass die variable Domäne zwar hinreichend ist, um den Kerntransport zu unterstützen, jedoch weitere Lokalisationsdomänen abseits der C-terminalen Domäne vorliegen müssen.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Cdc14 ohne einen Teil der *Tandem Repeat*-Sequenz nicht mehr in der Lage ist, eine Deletion von *CDC14* zu komplementieren, was auf eine essentielle Funktion dieses Motivs hinweist. Dieser Bereich in der C-terminalen Domäne konnte präzise eingegrenzt werden. In dieser Sequenz befinden sich ein Cdk1-Konsensusmotiv, sowie eine in anderen Hefen kurze konservierte Region. Zudem wurde festgestellt, dass diese Sequenz die

Phosphatase-Aktivität *in vitro* unterstützt. Dieser Bereich wurde durch Lokalisationsstudien anhand bekannter Substrate von Cdc14 näher analysiert, was eine verlängerte Anaphasedauer und eine verminderte Phosphatasefunktion *in vivo* offenbarte.

Die Identifizierung einer die Phosphatasefunktion unterstützenden Sequenz in der variablen Domäne von Cdc14 könnte in Zukunft interessante Einblicke über weitere regulatorische Mechanismen von Cdc14 in *S. cerevisiae* in der Mitose bieten.

2 Abstract

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the conserved phosphatase Cdc14, a member of the protein tyrosine phosphatase superfamily, fulfills an essential function in mitosis and cytokinesis. The cell cycle is determined by the oscillatory activity of the cyclin-dependent kinase Cdk1. This activity is high during mitosis, compared to interphase. For the exit from mitosis the activity of mitotic cyclin-Cdk-complexes has to be downregulated. In anaphase this is mediated by dephosphorylation of Cdk1 substrates by its major antagonist Cdc14.

The biological activity of Cdc14 is controlled by its subcellular localization: During interphase Cdc14 is sequestered in the nucleolus. This anchoring is obtained by its inhibitor Net1. Binding to Net1 is mediated *via* direct protein interaction with the catalytic domain of Cdc14. This work revealed through co-immunological binding, growth assays and *in vitro* tests, there can be differentiated between binding and inhibitory domains within N-terminal Net1 fragments.

At anaphase onset Cdc14 is set free from the nucleolus, where it disperses over the nucleus and cytoplasm dephosphorylating target proteins necessary for exit from mitosis. This release from Net1 is controlled by two signalling pathways called FEAR and MEN. Cdc14 consists of a N-terminal catalytic domain and a variable domain in the C-terminal portion. The latter contains a nuclear export sequence, a short tandem repeat sequence of unknown function and nuclear localization sequence controlled by MEN.

Due to its strong conservation among higher eucaryotes, literature dominantly focused on the N-terminal catalytic domain. Further cell cycle control of Cdc14 localization is obtained by its variable part. This work revealed that the MEN-controlled nuclear localization sequence is dispensable for localization and function of Cdc14. Hence, a N-terminal truncation of the phosphatase without the nuclear localization sequence presented a typical localization pattern.

In addition, this work reports, even though the variable domain is sufficient to support nuclear shuttling, other regulatory mechanisms for its localization in absence of the C-terminal domain have to be existent.

In contrast, this work showed that a truncation mutant lacking a part of the tandem repeat sequence of Cdc14 was no longer sufficient to complement a deletion of *CDC14* pointing to an essential role of this motif. The essential property of this C-terminal portion was narrowed down. Within this region resides a Cdk1 recognition motif and a short conserved sequence along yeasts. Moreover it was discovered this region was crucial to support phosphatase activity *in vitro*. It was further analyzed by localization studies with known Cdc14 substrates, which exhibited an extended anaphase and a decreased phosphatase activity *in vivo* during cell cycle.

Identification of a phosphatase activity stimulating feature of the variable domain of Cdc14 might reveal interesting insights of additional mechanisms of Cdc14 in *S. cerevisiae* during mitosis in future.

3 Einleitung

Für die Analysen der vorliegenden Arbeit wurden die Phosphatase Cdc14 und ihr Inhibitor Net1 in *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Cdc14 ist ein in Eukaryoten konserviertes Protein, dessen Orthologe in allen bisher untersuchten höheren Eukaryoten bis hin zum Menschen zu finden sind. Die Funktion der Cdc14-Phosphatasen scheint auf den ersten Blick jedoch nicht konserviert zu sein, bzw. ist teilweise noch nicht vollständig geklärt (Mocciaro und Schiebel, 2010).

In *S. cerevisiae* ist Cdc14 ein Schlüsselprotein, welches vielfältige Aufgaben während der Mitose erfüllt und für den Austritt aus der Mitose essentiell ist. So wurde sie bereits 1973 im berühmten Hartwell-Screen in Zellzyklusmutanten identifiziert. Die Inhibition der Phosphataseaktivität durch Net1 erfolgt ebenfalls exklusiv in der Bäckerhefe.

Da *S. cerevisiae* nicht nur als diploider, sondern auch als haploider Organismus vorliegen kann und sie zudem unter optimalen Wachstumsbedingungen eine äußerst kurze Generationszeit aufweist, ist es möglich, phänotypische Auswirkungen von Mutationen einfacher und schneller zu analysieren als in höheren Eukaryoten. Die vollständige Sequenzierung des Genoms der Bäckerhefe (Goffeau *et al.*, 1996), sowie elegante genetische Methoden, machen sie zu einem wertvollen Modellorganismus in der Zellzyklusforschung (Chen *et al.*, 2000).

3.1 Der Zellteilungszyklus in *S. cerevisiae*

Leben ist gekennzeichnet durch Vermehrung. Diese Kontinuität beruht auf dem Prozess der Zellteilung. Durch sie entsteht eine der Mutterzelle genetisch identische Tochterzelle.

Hinsichtlich der Zellteilung kann der Lebenszyklus einer Zelle in zwei Hauptphasen eingeteilt werden: eine Interphase und eine Mitosephase. In der Interphase wächst die Zelle und verdoppelt ihr genetisches Material, während sie in der vergleichsweise kurzen Mitosephase das Genom kondensiert und anschließend mit der neu entstehenden Zelle teilt.

Innerhalb der Interphase wird zwischen den Phasen G1, S und G2 unterschieden (Abb. 1). Der Buchstabe G bezeichnet eine Lücke, englisch *gap*, da lange Zeit angenommen wurde, dass in diesen Phasen keine teilungsrelevanten Prozesse ablaufen. Der Buchstabe S bezeichnet die Synthese-Phase, in der das genetische Material repliziert wird.

Im Falle von *S. cerevisiae* besteht in der G1-Phase ein Kontrollpunkt namens START (Abb. 1). Hier wird je nach Umweltbedingungen, z.B. dem Nahrungsangebot, entschieden, ob die Zelle in den Zellzyklus eintritt oder arretiert bis sich die exogenen Faktoren verbessern.

Falls die Voraussetzungen günstig sind und eine kritische Zellgröße erreicht ist, beginnt der Zellzyklus. Nach START beginnen etwa zeitgleich unabhängige Prozesse wie die Knospung, die DNA-Replikation,

sowie der Replikation des Spindelpolkkörperchens (SPK) in der S-Phase (Abb. 1). Der SPK entspricht dabei dem Zentrosom höherer Eukaryoten.

Bei ungünstigen Voraussetzungen oder bei zu geringer Zellgröße arretiert die Zelle: Haploide Hefezellen haben bei Vorhandensein einer geeigneten Partnerzelle die Möglichkeit, sich miteinander zu paaren, wobei ein diploider Organismus entsteht oder sie verharren als haploide Zellen. Diploide Hefen können ebenfalls verharren oder sporulieren, d.h. sie bilden Überdauerungsformen (Tetraden) bis günstigere Bedingungen eintreten.

Nach der Genomreplikation in der S-Phase schließt sich die zweite Hauptphase, die Mitosephase an, da eine typische G2-Phase bei *S. cerevisiae* nicht existiert (Lew *et al.*, 1997). Die Mitose lässt sich in Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese einteilen. Insgesamt wird während der Mitose das DNA-Material der Zelle kompaktiert, damit es aufgetrennt werden kann. Zu Beginn der Prophase wandern die beiden SPKs zu einander gegenüber liegenden Positionen innerhalb des Zellkerns und definieren dadurch zwei Pole. Die vormals sehr langen und miteinander verschlungenen, bereits duplizierten Chromosomen kondensieren. An den Chromosomenarmen und an ihren Zentromerregionen werden die Schwesterchromatiden von Kohäsinkomplexen zusammengehalten. Kleine Proteinkomplexe an dieser Zentromerregion, sogenannte Kinetochore, bieten eine Anheftungsstelle für die Mikrotubulispindeln. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten wird bei *S. cerevisiae* gegen Ende der Prophase die Kernhülle nicht aufgelöst. Dies wird als geschlossene Mitose bezeichnet. In der Metaphase werden die Zentromerregionen zusammengelagert, wobei keine Äquatorialplatte wie in höheren Eukaryoten gebildet wird (Straight *et al.*, 1997, Tanaka *et al.*, 2005). Im Übergang zur Anaphase werden die Kohäsinkomplexe der Schwesterchromatiden gespalten (Cohen-Fix und Koshland, 1999). Die Spindeln elongieren. Die Schwesterchromatiden werden voneinander getrennt und mit Hilfe der Mikrotubuli (MT) zu den gegenüber liegenden Polen gezogen. In der Telophase depolymerisiert die mitotische Spindel. Die Chromosomen beginnen wieder zu decondensieren. Die Mitose endet durch die Kontraktion des Aktin-Myosin-Rings und der Synthese neuer Zellwand in der Zytokinese (Cabib und Roberts, 1982). Die Entstehung einer Mutter- und einer Tochterzelle ist hiermit abgeschlossen (Abb. 1). Beide Zellen befinden sich nun wieder in der G1-Phase.

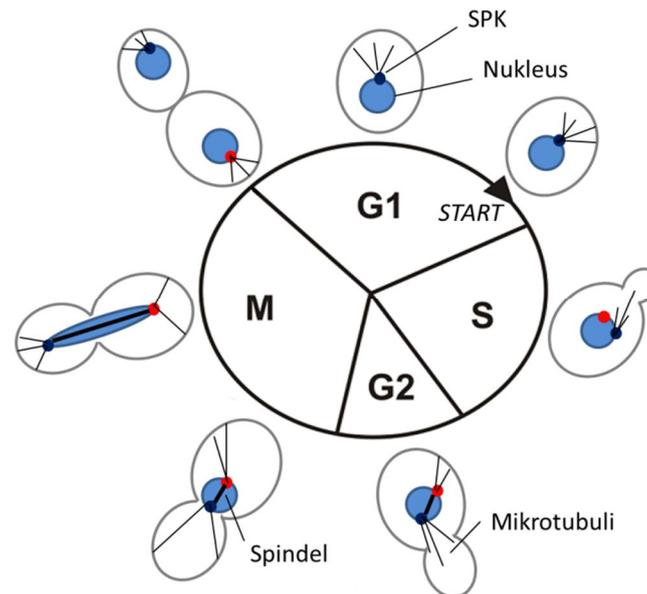


Abb. 1: Zellzyklus der Hefe *S. cerevisiae*. In der G1-Phase liegt der Kontrollpunkt START, bei dem der Zellzyklus beginnt, sofern günstige Voraussetzungen herrschen und eine kritische Zellgröße überschritten ist. Es folgt die S-Phase mit Knospung, DNA-Replikation und der SPK-Duplikation. Eine typische G2-Phase gibt es im Falle der Bäckerhefe nicht. In der M(itose)-Phase finden DNA- und Zellteilung in zwei genetisch identische Zellen statt.

3.2 Die Rolle von Kinasen und Phosphatasen in der Zellteilung

Im Zellzyklus müssen vielschichtige Ereignisse wie das Zellwachstum, die DNA-Replikation und die Verteilung der chromosomalen DNA auf zwei Zellen koordiniert werden. Dies geschieht durch komplexe und verwobene Kontrollmechanismen. Essentiell sind in diesem Geflecht Proteinkinasen (PKs) und Proteinphosphatasen (PPs), die durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Zielproteinen die Vorgänge in Interphase und Mitose reversibel steuern und vorantreiben. Diese Phosphorylierungen ermöglichen Konformationsänderungen der Proteine, führen zu subzellulären Lokalisierungsveränderungen oder bieten Andockstellen für weitere Proteine (Stoker, 2005). In Eukaryoten gibt es meist deutlich mehr PKs als PPs (Terrak *et al.*, 2004). Lange Zeit ging man deshalb davon aus, dass PPs eine geringe Substratspezifität aufweisen, um den Phosphorylierungen entgegen zu steuern. Phosphatasen werden jedoch vielfältig reguliert, um die Substratspezifität zu gewährleisten. Manche Phosphatasen, wie Cdc14 in *Saccharomyces cerevisiae*, werden räumlich und zeitlich durch ihre subzelluläre Lokalisation oder ihre Aktivierung zu bestimmten Zellzyklusphasen gesteuert. Außerdem bestehen Phosphatasen oft aus Multiproteinkomplexen, deren Bindung an verschiedene Untereinheiten zur Substratspezifität beiträgt (Terrak *et al.*, 2004).

Die Aktivität von PKs und PPs wird dabei oft durch Phosphorylierungsereignisse an sich selbst reguliert, was zu positiven oder negativen Rückkopplungsmechanismen führt. In *S. cerevisiae* gibt es mehrere wichtige Kinasen, die in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus diverse mitotische Ereignisse steuern. Wichtige Vertreter davon sind Cdk1 (*cyclin dependent kinase*), auch bekannt als

Cdc28 in *S.cerevisiae*, die Polokinese Cdc5 und Aurora B (in *S. cerevisiae* Ipl1), die im Zellzyklus miteinander kooperieren (Nigg, 2001).

Cdk1 nimmt auch in der Mitose eine Schlüsselrolle ein und wird durch unterschiedliche regulatorische Untereinheiten, den Zyklinen, im Zellzyklus reguliert. Die Phasen des Zellzyklus werden durch die oszillierende Aktivität der sogenannten Zyklin-Cdk-Komplexe eingeleitet. Cdks sind ausschließlich nach Bindung an Zykline aktiv (Morgan, 1995). In der Hefe sind neun unterschiedliche Zykline bekannt, die in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus agieren und dadurch die Übergänge der Mitosephasen steuern. Das Vorhandensein der Zykline wird durch einen Wechsel zwischen deren Transkription sowie ihrer Degradation über das Proteasom reguliert. In den jeweiligen Zellzyklusphasen sind unterschiedliche Zykline vorhanden. Cdk1 bindet während der G1-Phase an Cln3, das den Zellzyklus durch die Aktivierung der Transkription weiterer Zykline vorantreibt. Im G1/S-Phase-Übergang werden Komplexe mit Cln1 und Cln2 gebildet, in der S-Phase wird die Aktivität von Cdk1 durch Clb5 bzw. Clb6 reguliert, wobei insbesondere Clb5 zur effizienten DNA-Replikation notwendig ist. Die Mitose wird durch Cdk-Komplexe mit den Zyklinen Clb1, Clb2, Clb3 und Clb4 eingeleitet, die die Trennung der Schwesterchromatiden sowie deren Aufteilung unterstützen (Enserink und Kolodner, 2010). Die Aktivität der Cdk wird vielfältig über Phosphorylierungen auf mehreren Ebenen gesteuert. Dafür werden zum einen zwei Reste in der ATP-Bindedomäne von Cdk dephosphoryliert (Nigg, 2001). Nun kann ein Zyklin binden und ein aktiver Zyklin-Cdk-Komplex gebildet werden. Zum anderen wird zusätzlich ein Threoninrest in der katalytischen Domäne von Cdk phosphoryliert, was zur weiteren Aktivierung beiträgt (Hunter, 1995). Diese Phosphorylierung erfolgt durch CDK-aktivierende Kinasen (*CDK-activating kinase*, CAK). Nach ihrer Aktivierung phosphoryliert Cdk Zielproteine an deren Erkennungssequenz S/TPxK/R (x= beliebige Aminosäure), wobei auch S/TP als Minimalkonsensus erkannt wird (Enserink und Kolodner, 2010). Neuere Studien lassen vermuten, dass auch dieses Prolin nicht zur Motiverkennung essentiell ist, sofern nach S/T ein Arginin oder Lysin folgt (Suzuki *et al.*, 2015). Die negative Regulation von Cdk wird durch CDK-Inhibitoren (CKI) vermittelt, die einerseits die Zyklin-Cdk-Komplexe binden und dadurch inhibieren, aber auch die CAK-Phosphorylierungen verhindern (Morgan, 1995).

Das Voranschreiten des Zellzyklus wird durch mehrere Kontrollsysteme (*Checkpoints*) zu verschiedenen Phasen in der Bäckerhefe kontrolliert. Ist die kritische Zellgröße erreicht, wird zunächst der erste Kontrollpunkt START am G1/S-Übergang durchlaufen (Kapitel 3.1)

Die Mps1-Kinase unterstützt nun die Replikation der SPKs in der S-Phase (Nigg, 2001). Im anschließenden G2/M-Phaseübergang wird durch den zweiten Kontrollpunkt, dem *DNA-damage Checkpoint*, geprüft, ob die Chromosomen fehlerfrei repliziert wurden. Ist dies nicht der Fall, wird Cdk durch die Kinase Wee1 (Swe1 in *S. cerevisiae*) phosphoryliert und dadurch inaktiv gehalten. Auf diese Weise wird ein verfrühtes Eintreten in die Mitose verhindert und somit den Zellen Zeit zur

Reparatur zu geben. Diese Phosphorylierungsereignisse werden durch die Phosphatase Cdc25 (Mih1 in der Bäckerhefe) jedoch antagonisiert (Hunter, 1995, Wurzenberger und Gerlich, 2011). War die Replikation erfolgreich, wird Swe1 durch den in der Mitose nun aktiven Cdk1-Clb2-Komplex und zugleich von der Polokinase Cdc5 phosphoryliert, was zur Proteindegradation von Swe1 und zur Fortsetzung des Zellzyklus führt (Hunter, 1995, Liang *et al.*, 2009).

Um die Auflösung der Kohäsine im Metaphase/Anaphase-Übergang zu induzieren, werden diese durch Cdk1-Clb2 phosphoryliert. Denn noch sind die beiden replizierten Schwesterchromatiden über Kohäsine miteinander verbunden. Zudem wird der *anaphase promoting complex/ cyclosome* (APC/C), eine E3-Ubiquitinligase, mit dem Aktivatorprotein Cdc20 aktiviert. Ist die mitotische Spindel fehlerfrei assembliert, wird der Zellzyklus nicht durch das Spindelkontrollsystem angehalten. Dieses wird hier durch den *spindle assembly checkpoint* (SAC) und später in der Mitose durch den *spindle position checkpoint* kontrolliert. Im SAC wird die korrekte bipolare Spindelanheftung an den Kinetochoren über die Zugspannung der mitotischen Spindel gemessen (Lew und Burke, 2003). Für die Funktion des SAC spielen die PKs Mps1, der Komplex Bub1-Bub3 und ein Komplex der Proteine Mad1, Mad2 und Mad3 eine wichtige Rolle. Fehlt diese Zugspannung wird ein Signal zur Inhibition der Cdc20-vermittelten APC/C-Aktivierung generiert (Lew und Burke, 2003, Weiss, 2012). Dies erfolgt unter Bindung von Mad2 und wahrscheinlich auch Mad3 an Cdc20 (Musacchio und Hardwick, 2002, Lew und Burke, 2003). Die Aktivierung von APC/C-Cdc20 führt zur Degradation von Securin, das die Protease Separase (Esp1 in *S. cerevisiae*) bis zu diesem Kontrollpunkt inaktiv gehalten hat (Weiss, 2012). Nun wird der Übergang zur Anaphase durch Inaktivierung der PP2A induziert (Wurzenberger und Gerlich, 2011). Dies führt zu einer sukzessiven Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus mit beginnender Anaphase. Für den Austritt aus der Mitose ist es nicht ausreichend die Cdk-Aktivität zu inhibieren, sondern Cdc14 muss aktiviert werden (Wurzenberger und Gerlich, 2011, Weiss, 2012). Cdc14 ist der Hauptantagonist der Cdk1 in der Mitose. In höheren Eukaryoten wird diese Rolle jedoch von anderen PP, PP1 und PP2A übernommen (Wurzenberger und Gerlich, 2011). In *S. cerevisiae* erfolgt die Aktivierung über zwei Netzwerke. Beide Netzwerke sind komplexe Geflechte, die durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsmechanismen die vollständige Aktivierung der Phosphatase Cdc14 fördern (Kapitel 3.3.2.3). Eine Deletion von *CDC14* ist für die Zellen letal, da es zu einem Arrest in der späten Mitose mit ungetrennten Chromosomen und einer bestehenden Anaphasespindel führt (Weiss, 2012). Die korrekte Spindelorientierung entlang der Mutter- zur Tochterzelle wird durch den *spindle position checkpoint* unter Beteiligung von Cdc14 kontrolliert (Lew und Burke, 2003).

Die aktive Separase spaltet nun die Kohäsine-Untereinheiten. Dies löst die Kohäsion der Schwesterchromatidarme. Neben Cdk1 trägt die Kinase Aurora B nun zur vollständigen Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase bei (Nigg, 2001).

Das Ende der Mitose wird durch Cdc14 über mehrere regulatorische Mechanismen eingeleitet. Sind die Schwesterchromatiden in Mutter- und Tochterzelle aufgeteilt, wird die Aktivität des Cdk1-Clb2-Komplexes inhibiert.

Dazu werden Cdc14-vermittelt der CKI Sic1 und gleichzeitig dessen Transkriptionsfaktors Swi5 aktiviert. Die Expression von *SIC1* wird aufgrund von Rückkopplung durch die Dephosphorylierung von Swi5 erneut angeregt und führt zu einem irreversiblen Austritt aus der Mitose (Weiss, 2012).

Möglicherweise wird Cdc14 auch selbst durch Cdk1 reguliert, da Cdc14 sechs putative Cdk1-Konsensussequenzen enthält und zumindest S429 in *in vitro*-Analysen nachweislich phosphoryliert wird (Li *et al.*, 2014). Gleichzeitig erfolgt die Cdc14-vermittelte Aktivierung des APC/C, mit dessen zweiter Untereinheit Hct1 (auch bekannt als Cdh1), die im Vergleich zu Cdc20 später in der Mitose gebunden wird. Cdc20 ist selbst ein Zielprotein des nun aktiven APC/C-Cdh1-Komplexes (Weiss, 2012). Die Assoziation mit Cdh1 unterstützt zeitlich und räumlich die Substratspezifität des APC/C in der Mitose und führt damit zur Induktion der Degradation von Clb2 mittels ubiquitin-vermittelter Proteolyse (Cockell und Gasser, 1999). Der nun erfolgende Austritt aus der Mitose führt zum erneuten Beginn der Interphase.

3.3 Die Klassifizierung der Phosphatase Cdc14

Phosphatasen erfüllen viele regulatorische Funktionen im Zellzyklus. Eine wichtige Phosphatase während der Mitose in der Bäckerhefe ist Cdc14. Wie diese in die Vielfalt der Phosphatasen eingeordnet wird, wie die Struktur von Cdc14 aufgebaut ist sowie auf welche Weise die Regulation ihrer enzymatischen Aktivität erfolgt wird im weiteren Verlauf näher erläutert.

3.3.1 Aufbau von Cdc14 in *S. cerevisiae*

Cdc14 in *S. cerevisiae* mit einer Länge von insgesamt 551 Aminosäuren (AS) besteht aus einem katalytischen Anteil in der N-terminalen Domäne (NTD) und einer variablen C-terminalen Domäne (CTD). Innerhalb der katalytischen NTD befindet sich das enzymatisch aktive Cystein. Die katalytische Domäne ist stark konserviert und ist allen bisher bekannten Cdc14-Phosphatasen gemeinsam. Cdc14 ist eine Vertreterin aus der Superfamilie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP).

Die Einteilung der PTPs in Untergruppen erfolgt anhand von Sequenzvergleichen hinsichtlich der Aminosäuresequenzen ihrer katalytischen Domänen (Patterson *et al.*, 2009). Cdc14 wird zu den dualspezifischen PTPs (DUSPs) gezählt (Abb. 2).

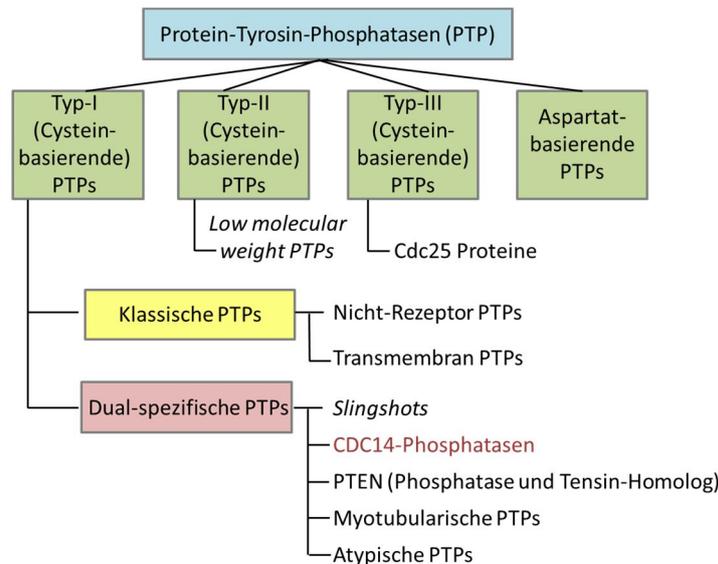


Abb. 2: Klassifikation der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Superfamilie mit anschließender Unterteilung. Die Einteilung in die Untergruppe von Cdc14 ist hervorgehoben. Die Auflistung der genannten PPs dient deren Gliederung innerhalb der PTPs und ist auf bekanntere PPs beschränkt. Adaptiert von Patterson *et al.*, 2009.

DUSPs können Phosphate an Tyrosinresten sowie Serin- und Threoninreste ihrer Substrate hydrolysieren (Patterson *et al.*, 2009). Die hochkonservierte katalytischen Domäne enthält das PTP-Motiv HCxxxxR(S/T), wobei x jede beliebige Aminosäure darstellen kann. Interessanterweise weist Cdc14 als DUSP dennoch eine Präferenz für Phosphoserin und Phosphothreonin auf, wenn anschließend ein Prolin in +1 Position folgt (Gray *et al.*, 2003). Neuere Studien zeigen sogar, dass zur Substraterkennung der katalytischen Domäne von Cdc14 Phosphoserin deutlich bevorzugt wird. Neben dem Prolin an der +1 Position sind zudem basische AS in +3 Position notwendig. Lysin wird gegenüber Arginin deutlich bevorzugt. Die katalytische Aktivität von Cdc14 wird durch weitere folgende basische AS an der Position +4 zusätzlich verstärkt (Bremmer *et al.*, 2012, Eissler *et al.*, 2014). Dies zeigt, dass Cdc14 enorme Substratspezifität gegenüber Cdk-Konsensussequenzen aufweist. Insofern ist Cdc14 nicht nur temporal der Hauptantagonist von Cdk1 während der Mitose, sondern dephosphoryliert gleichzeitig speziell Zielproteine der Cdk1.

Klassische PTPs haben im Gegensatz zu DUSPs eine engere katalytische Tasche, wodurch eine besondere Spezifität bezogen auf ihre Substrate entsteht (Patterson *et al.*, 2009). Alle Cdc14-Phosphatasen sind eng mit den Cdc25-Phosphatasen verwandt (Patterson *et al.*, 2009).

Einen interessanten Einblick in die Familie der PPs gelang durch die Strukturaufklärung von Gray *et al.* (2003) durch die bis dahin erste Kristallstruktur der humanen Isoform hCDC14B (Abb. 3 a). hCDC14B weist eine starke Ähnlichkeit zu Cdc14 in der Bäckerhefe auf. Sie zeigte, dass die katalytische Domäne aus zwei fast identischen Domänen (Domäne A und B) besteht, die über eine α -Helix verbunden sind (Abb. 3 b). Das PTP-Motiv befindet sich innerhalb der Domäne B, wobei

Domäne A die Substratspezifität unterstützt (Gray *et al.*, 2003). Die variable CTD konnte nicht kristallisiert werden.

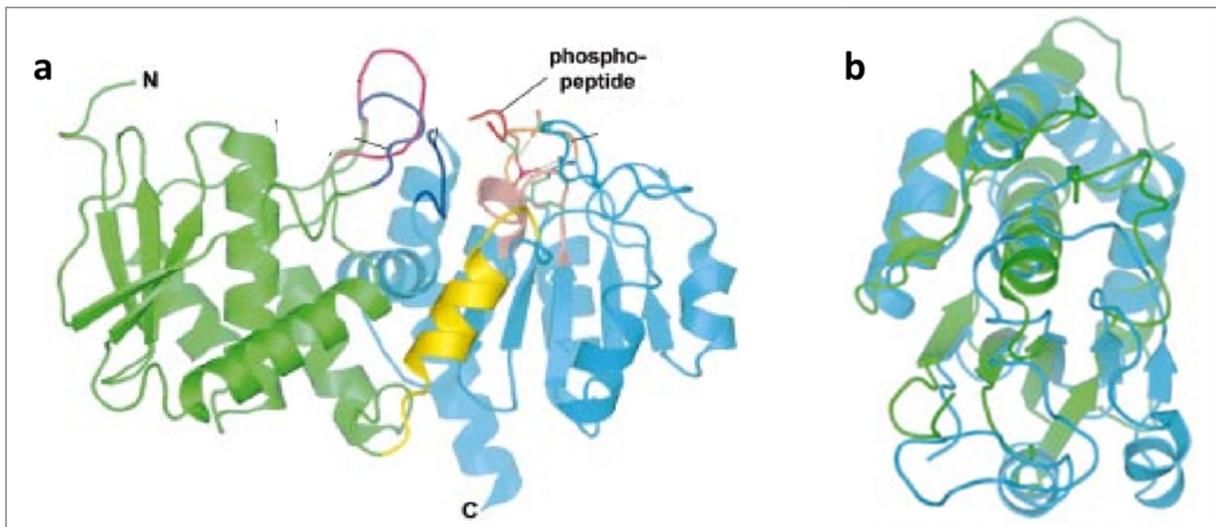


Abb. 3: Bändermodell der katalytischen Domäne des humanen CDC14B. a, Die katalytische Domäne von hCDC14B besteht aus zwei besonders ähnlichen Domänen (Domäne A: grün, Domäne B: blau), die über eine α -Helix als Linkerdomäne (gelb) verknüpft sind. In rot dargestellt: ein Phosphopeptid als Substrat von hCDC14B. b, Überlagerung der Domänen A und B. Abbildung verändert nach Gray *et al.*, 2003.

Im Menschen sind drei Orthologe von Cdc14 der Bäckerhefe zu finden: hCdc14A, hCdc14B und hCdc14C (Rosso *et al.*, 2008, Mocciaro und Schiebel, 2010). hCdc14A und hCdc14 weisen eine Sequenzähnlichkeit von 50% zueinander auf (Mocciaro und Schiebel, 2010). hCdc14B kann die Deletion von *CDC14* in Hefe komplementieren, was auf die besondere Ähnlichkeit zu Cdc14 aus *S. cerevisiae* hinweist (Mocciaro und Schiebel, 2010). Werden die Proteinsequenzen von hCDC14B mit Cdc14 aus *S. cerevisiae* (Cdc14_Sc) verglichen, stellt man eine Homologie mit 36% fest (vgl. Abb. 4). Der Aufbau des PTP-Motivs und das enzymatisch aktive Cystein sind dabei identisch (Abb. 4). hCDC14B enthält jedoch im Gegensatz zu Cdc14 in Hefe noch eine nukleoläre Lokalisationssequenz im N-Terminus (AS 1-44) (Gray *et al.*, 2003, Mocciaro und Schiebel, 2010).

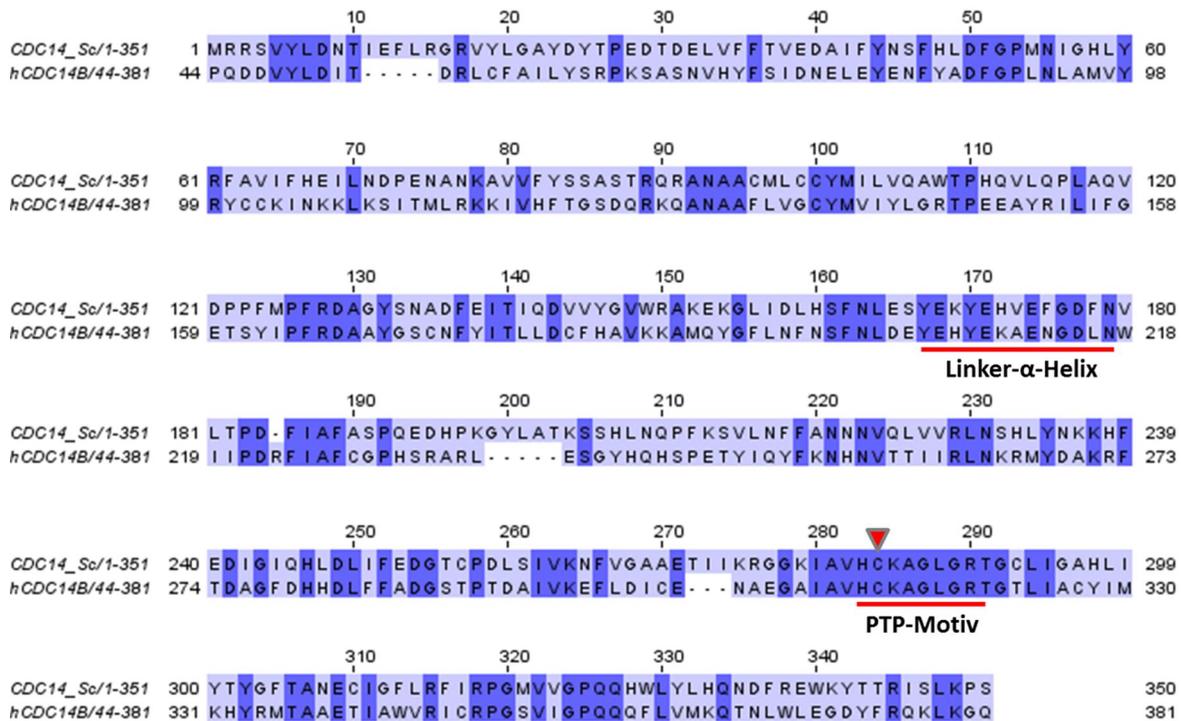


Abb. 4: Sequenzalignment von Cdc14 aus *S. cerevisiae* (Sc) mit hCDC14B. Der Vergleich dieser Sequenzen wurde mit dem *open source* Programm Jalview erstellt. Es wurden die N-terminalen Sequenzen Cdc14_Sc: AS 1-350, hCdc14B: AS 44-381 analysiert. Identische Aminosäuren (AS) sind dunkelblau, AS mit einer Ähnlichkeit von mind. 40% sind hellblau dargestellt. Die A- und B-Domäne verbindende Linker- α -Helix, sowie das konservierte PTP-Motiv sind angedeutet. Davon ist das enzymatisch aktive Cystein durch einen roten Pfeil hervorgehoben.

Die variable Domäne von Cdc14 der Bäckerhefe enthält u.a. Sequenzen, die einen Beitrag zum Kerntransport enthalten. Sie schließt eine Kernexportsequenz der AS 353-367 (*nuclear export sequence*, NES, Bembenek *et al.*, 2005), eine Tandem-Repeat-Sequenz von bisher unbekannter Funktion (AS 400-420 und AS 423-443, Taylor *et al.*, 1997) und eine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localizing sequence*, NLS, Mohl *et al.*, 2009) am Ende des C-Terminus ein (Abb. 5).

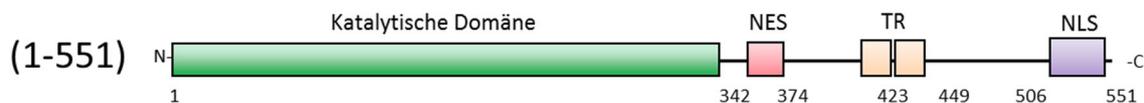


Abb. 5: Schematischer Aufbau von Cdc14 in *S. cerevisiae*. Dargestellt sind die Domänen, die von Cdc14 in der Bäckerhefe bereits charakterisiert wurden. Neben der N-terminalen katalytischen Domäne enthält der variable Anteil in Richtung Carboxy-Terminus eine NES, eine TR-Sequenz, sowie eine NLS.

3.3.2 Freisetzung und Regulation von Cdc14

Die subzelluläre Lokalisation und dadurch auch die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus werden in *S. cerevisiae* besonders präzise im Zellzyklus reguliert.

3.3.2.1 Der Nukleolus als Ort der Verankerung von Cdc14

In eukaryotischen Zellen müssen komplexe biologische Prozesse genau reguliert werden. Eine Möglichkeit, diese Vorgänge räumlich zu steuern, besteht in einer Separierung in unterschiedliche Zellorganellen, wie beispielsweise in Zellkern und Zytoplasma. Im Zellkern befindet sich ein Subkompartiment: der Nukleolus. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* nimmt er eine sichelförmige Struktur ein, die fast ein Drittel des Kernvolumens beträgt (Yang *et al.*, 1989). Interessanterweise ist der Nukleolus nicht durch eine Membran vom Zellkern abgetrennt (Léger-Silvestre *et al.*, 1999). Der Nukleolus wird durch die ribosomale DNA (rDNA) und rDNA-assoziierte Proteine, die sich nahe der inneren Kernmembran befinden, festgelegt (Mekhail und Moazed, 2010). Er kann im Menschen weiter in fibrilläre Zentren, dichte fibrilläre Komponenten und granuläre Komponenten unterteilt werden (Boisvert *et al.*, 2007). Vergleichbare Subkompartimente sind auch in Hefe zu finden (Léger-Silvestre *et al.*, 1999). In diesen Subkompartimenten des Nukleolus werden Transkription, Prozessierung und Modifizierung, sowie die Vervollständigung des Assemblierungsprozesses der Ribosomenbiogenese separiert (Boisvert *et al.*, 2007). Die rDNA wird als 35S Vorläufer-ribosomaler RNA (rRNA) von der Polymerase I (Pol I) transkribiert, wodurch nach deren Spleißen und Reifung die ribosomalen Unterheiten 18S, 5,8S und 25S entstehen (Abb. 6). Zusammen mit der unabhängig transkribierten 5S rRNA werden auf diese Weise die Ribosomenuntereinheiten prozessiert (Tschochner und Hurt, 2003; Kobayashi, 2011). In Hefe befindet sich der rDNA-Lokus auf Chromosom XII und setzt sich aus ca. 150 je 9,1 kb großen repetitiven rDNA-Sequenzen zu einer Gesamtlänge von ca. 1,4 Mb zusammen (Abb. 6; Mekhail und Moazed, 2010, Kobayashi, 2011).

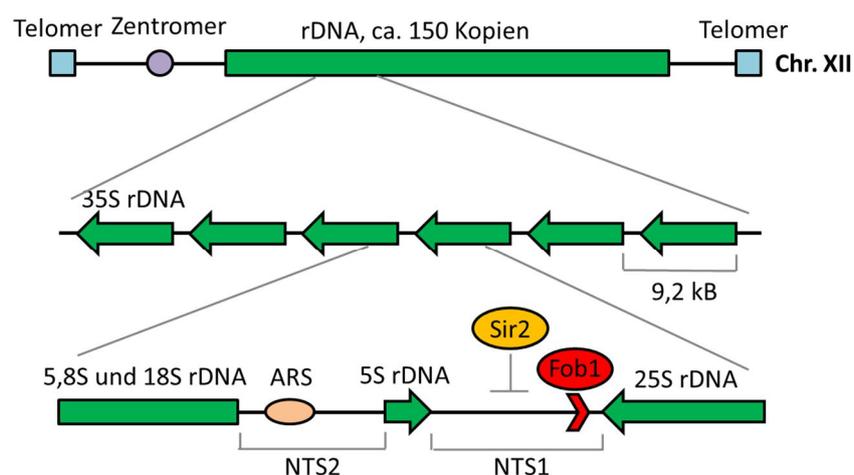


Abb. 6: Schematischer Aufbau der rDNA-Region auf Chromosom XII in *S. cerevisiae*. Die rDNA besteht aus ca. 150 einzelnen Wiederholungen, die jeweils ca. 9,2 kb groß sind. Eine rDNA-Einheit setzt sich aus der 5S und der 35S rDNA zusammen. Aus dieser 35S rDNA entstehen nach der Reifung die 18S, 25S und 5,8S rRNA. Die Assoziationen der Proteine Sir2 und Fob1 sind eingezeichnet. Die beiden NTS-Regionen wurden gekennzeichnet. Verändert nach Huang und Moazed (2003), Kobayashi (2011).

Der rDNA-Lokus macht Chromosom XII zugleich zum größten der insgesamt 16 Hefechromosomen, was dadurch zusätzliche regulatorische Mechanismen zur Segregation in der Mitose erfordert (Kapitel 3.3.3).

Werden die nukleolären Proteine in Mensch und Hefe miteinander verglichen, so stellt man eine große Konservierung fest. Über 90% der Nukleolusproteine in Hefe besitzen ein humanes Ortholog des Proteins im Menschen (Boisvert *et al.*, 2007). Während in Hefe nur ein Nukleolus existiert der mit der Kernhülle assoziiert ist, sind im Menschen mehrere Nukleoli innerhalb des Zellkerns zu finden. Als Ort der ribosomalen Transkription und damit als Maß für rege Zellteilung wird der Nukleolus auch mit einigen Krankheiten des Menschen wie Alzheimer und Krebs in Verbindung gebracht (Boisvert *et al.*, 2007).

Da im Nukleolus die Transkription der rDNA und die Assemblierung der Ribosomen stattfinden, wurde lange Zeit angenommen, dass die einzige Funktion des Nukleolus in der Ribosomenbiogenese liegt (Cockell und Gasser, 1999). Der Nukleolus hat jedoch vielfältigere Aufgaben. Es gibt immer mehr Hinweise, dass diese Organelle zur gezielten Sequestrierung von Proteinen im Zellzyklus genutzt wird, um diese, bis zu ihrer Aktivierung, zu inhibieren (Visintin und Amon, 2000, Amon, 2008, Lam und Trinkle-Mulcahy, 2015). Mdm2, ein Inhibitor des Tumorsuppressors p53, wird erst nach DNA-Schäden aus dem Nukleolus freigesetzt um den Zellzyklus anzuhalten (Weber *et al.*, 1999, Bernardi *et al.*, 2004). Ebenso wird Pch2 erst nach synaptischen Defekten der Chromosomen in der Meiose aus dem Nukleolus freigesetzt um die meiotische Teilung zu unterbrechen (San-Segundo und Roeder, 1999).

Die in Hefe essentielle Phosphatase Cdc14 ist ein weiteres Protein, welches im Nukleolus bis zu deren Aktivierung inhibiert wird. In einer Proteinbindungsstudie wurde Net1, ein nukleoläres Protein, als Inhibitor von Cdc14 identifiziert (vgl. Kapitel 3.3.2.2 und Kapitel 3.3.2.3). Net1 ist zugleich die Kernkomponente des Netzwerkes RENT (*nucleolar silencing establishing factor and telophase regulator*), welches durch Net1 an die rDNA gebunden wird, den Austritt aus der Mitose reguliert und zur Stilllegung der rDNA beiträgt (Straight *et al.*, 1999, Shou *et al.*, 2001, Ryu und Ahn, 2014). Der RENT-Komplex setzt sich aus mindestens vier Proteinen zusammen- Net1, Cdc14, sowie aus den Proteinen Fob1 und Sir2. Die hohe Anzahl an rDNA-Kopien macht die rDNA zu einem Bereich in dem viele Rekombinationen auftreten könnten. Da eine Rekombination der rDNA zur genomischen Instabilität und damit zu einer Zellalterung führen würde, wird diese unterdrückt (Cockell und Gasser, 1999, Kobayashi, 2011). Dazu tragen wenigstens zwei Proteine des RENT-Komplexes bei: Fob1 (*fork blocking less*) führt zum *Silencing* der NTS (*nontranscribed spacer*)-Regionen innerhalb der einzelnen rDNA-Wiederholungen und rekrutiert Sir2 an die rDNA (Abb. 6, Huang und Moazed, 2003, Ryu und Ahn, 2014, Buck *et al.*, 2016). Funktionen der Histon-Deacetylase Sir2 (*silent information regulator*) bestehen neben der Stilllegung von Genen und Repression der

RNA-Polymerase II (Pol II)-Aktivität auch in der aktiven Unterdrückung der Rekombination dieser repetitiven rDNA-Sequenzen (Abb. 6, Cockell und Gasser, 1999, Straight *et al.*, 1999, Shou *et al.*, 2001, Ryu und Ahn, 2014). Die Aktivität der RNA-Pol I-Transkription wird durch Sir2 nicht inhibiert (Straight *et al.*, 1999), sondern wird möglicherweise Cdc14-abhängig in der Anaphase gehemmt (Clemente-Blanco *et al.*, 2009). Neben der Sir2-vermittelten rDNA-Stillegung, ist zudem ein Sir2-unabhängiger Mechanismus bekannt, der u.a. das nukleoläre Protein Tof2 mit einschließt (Ryu und Ahn, 2014, Buck *et al.*, 2016). Die rDNA wird direkt und indirekt von Net1 beeinflusst. Da temperatursensitive Mutanten von *net1-1* nicht mehr in der Lage sind, die rDNA stillzulegen, leistet Net1 vermutlich selbst einen Beitrag zum *Silencing* der rDNA (Straight *et al.*, 1999).

3.3.2.2 Net1- Inhibitor von Cdc14

Net1 (auch als Cfi1 bezeichnet) ist mit 1189 AS ein großes Protein welches im Zellzyklus stets im Nukleolus lokalisiert ist. Obwohl die Deletion von *NET1* in der Bäckerhefe nicht letal ist, wachsen haploide Mutanten äußerst langsam und weisen abnorme, hyphenartige Zellstrukturen mit einer veränderten nukleolären Struktur auf (Garcia und Pillus, 1999, Straight *et al.*, 1999, Shou *et al.*, 2001). Cdc14 wird während der Interphase und der Metaphase durch Net1 im Nukleolus inhibiert. Ist *NET1* deletiert, ist zugleich ist auch die Lokalisation von Cdc14 beeinflusst. In diesen Zellen ist Cdc14 im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert, was zu einem verfrühten Eintritt in die Mitose führt (Visintin *et al.*, 1999). Obwohl Net1 hinreichend zur Inhibition der katalytischen Domäne von Cdc14 ist, ist es jedoch nicht in der Lage die orthologen Isoformen von humanem CDC14A und CDC14B zu inhibieren (Traverso *et al.*, 2001). Net1 kann funktional in mehrere Domänen unterteilt werden. Die NTD von Net1 ist hinreichend für die Lokalisation von Net1 im Nukleolus, zur Bindung von DNA sowie zur Bindung und Inhibition von Cdc14. Die CTD von Net1 ist dagegen in der Lage das zelluläre Wachstum zu unterstützen und mit der RNA-Pol I zu interagieren (Dissertation Katharina Hannig, 2015). Zudem konnte die Fähigkeit von Net1 voller Länge zur Selbstinteraktion nachgewiesen werden (Dissertation Katharina Hannig, 2015). Innerhalb der NTD von Net1 liegt ein interessantes Element, das *pFAM10407*-Motiv (AS 70-143). Eine Sequenzanalyse zeigte eine starke Ähnlichkeit zu Tof2 (Position AS 81-153), ein positiver Regulator von Cdc14 im Nukleolus, jedoch eine geringe Konservierung zu Dnt1 (Position AS 18-79) aus *S. pombe* (Jin *et al.*, 2007, Geil *et al.*, 2008). Diesen Proteinen ist gemeinsam Cdc14 binden zu können. Daher wurde dieses Motiv in der *Saccharomyces Genome Database* als *Cdc14 phosphatase binding protein N-terminus* eingetragen (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Dieser Begriff scheint jedoch irreführend zu sein. Tof2 und Net1 sind zwar zur Regulation von Cdc14 fähig, die *pFAM*-Sequenz scheint jedoch keinen Beitrag zur Cdc14-Bindung mit Net1 zu leisten. Wahrscheinlicher dagegen ist ein Beitrag der *pFAM* zur Selbstinteraktion von Net1 (Dissertation Katharina Hannig, 2015).

Die Verankerung von Cdc14 durch Net1 im Nukleolus findet auf diese Art nur in *S. cerevisiae* statt. In der Spalthefe wird das homologe Protein von Cdc14 als Clp1 (*Cdc14 like protein*) bezeichnet. Beide Phosphatasen lokalisieren vor ihrer Freisetzung im Nukleolus. Ob Clp1 vergleichend zu Cdc14 im Nukleolus durch einen Inhibitor verankert ist, ist bislang nicht geklärt, da Dnt1 aus *S. pombe* nur eine geringfügige homologe Sequenz zu Net1 aufweist (Bardin und Amon, 2001).

Net1 ist ein Phosphoprotein, das an multiplen Stellen durch Phosphorylierungen modifiziert wird. Es konnten bereits 19 Phosphorylierungen durch Cdk1 belegt werden (Azzam *et al.*, 2004, Holt *et al.*, 2009) und eine Phosphorylierungsstelle durch die Polokinase Cdc5 nachgewiesen werden (Azzam *et al.*, 2004). Die Bindung zwischen Net1 und Cdc14 wird durch sukzessive Phosphorylierungen geschwächt, was folgend zur vollständigen Aktivierung von Cdc14 führt. Welche Phosphorylierungen in Net1 exakt zur Freisetzung von Cdc14 beitragen ist derzeit noch unklar. Da für Net1 äußerst viele Modifikationen durch Phosphorylierungen bekannt sind, konzentrierten sich Azzam *et al.* (2004) vorerst auf das N-terminale Fragment von Net1 (1-600), welches von Traverso *et al.* (2001) bereits als hinreichend zur Cdc14-Bindung beschrieben wurde. In Net1 (1-600) wurden 13 Phosphorylierungsstellen von Serin zu Alanin mutiert (Net1-13m) und die Auswirkung auf Cdc14 untersucht. Diese Ergebnisse von Azzam *et al.* (2004) zeigten, dass Net1 keinen Defekt in der Lokalisation aufwies, Cdc14 im Nukleolus binden konnte, jedoch die Freisetzung von Cdc14 in der frühen Anaphase beeinträchtigt war. Zur weiteren Analyse der relevanten Phosphorylierungsstellen wurden Net1-Fragmente (1-341) mit jeweils drei bzw. sechs mutierten Cdk-Konsensusstellen untersucht (Net1-3Cdk, Net1-6Cdk). Alle Konstrukte zeigten einen vergleichbaren Phänotyp mit verzögerter Cdc14-Freisetzung in der Anaphase, jedoch keine vollständige Inhibition von Cdc14 über den Zellzyklus. Dies lässt vermuten, dass weitere Phosphorylierungen von Net1 zur vollständigen Freisetzung von Cdc14 beitragen.

3.3.2.3 Die Freisetzung von Cdc14 über FEAR und MEN

Nach der Anaphase wird die Aktivität der mitotischen Zyklin-Cdk-Komplexe inhibiert, um dadurch den Austritt aus der Mitose zu gewährleisten (Visintin *et al.*, 1997). Für diesen müssen die korrekte Ausbildung der mitotischen Spindel, das Überwachen von DNA-Schäden, die vollständige DNA-Replikation und die Zytokinese miteinander abgestimmt werden. Viele Zellzyklusvorgänge, sowohl der Austritt aus der Mitose als auch die Morphogenese der neuen Knospe sind mit Beginn der Anaphase indirekt oder direkt von Cdc14 in *S. cerevisiae* abhängig (Rock und Amon, 2009, Miller *et al.*, 2015, vgl. Kapitel 3.3.3).

Während der Interphase ist Cdc14 als Teil des RENT-Komplexes durch Net1 inhibiert und im Nukleolus verankert. Cdc14 ist bis zur Anaphase nicht phosphoryliert und Net1 befindet sich in einem hypophosphorylierten Zustand, welcher vermutlich durch Fob1, ebenfalls ein Protein des RENT und

Spo12 stabilisiert wird (Stegmeier *et al.*, 2004, Weiss, 2012). Die Freisetzung von Cdc14 wird während der Anaphase von zwei ineinandergreifenden Netzwerken gesteuert- über das FEAR-Netzwerk (*Cdc14 fourteen early anaphase release*) und das MEN (*mitotic exit network*) (Abb. 7).

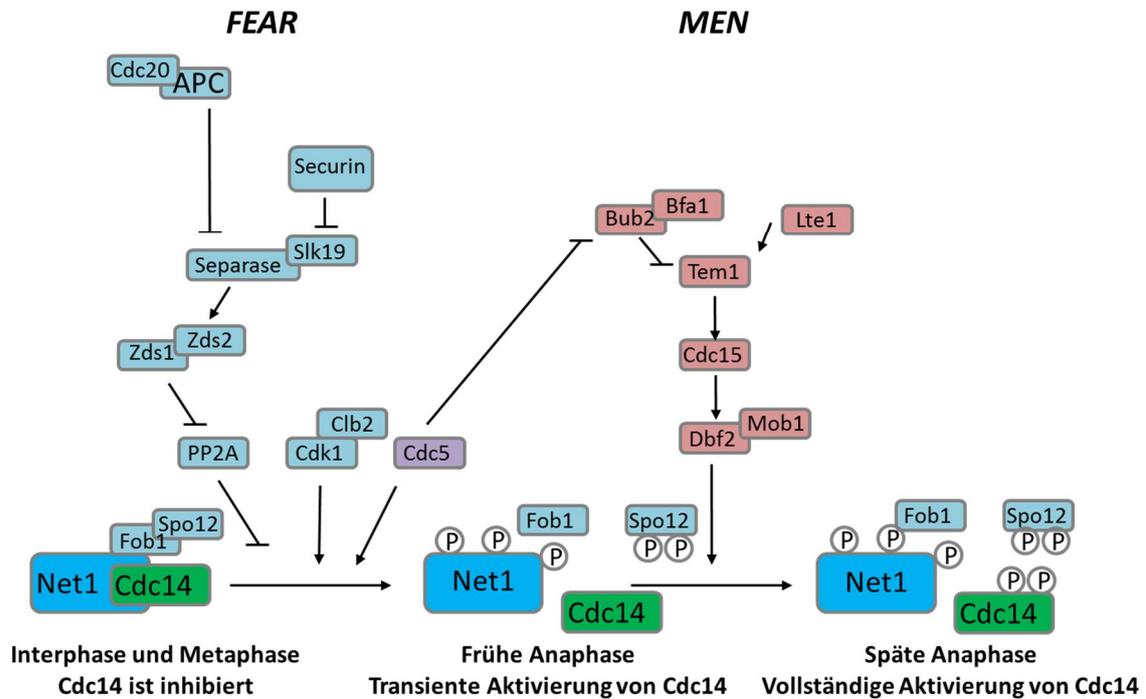


Abb. 7: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten der Netzwerke FEAR und MEN. Während der Interphase und bis zur Metaphase ist die Phosphatase Cdc14 vollständig durch Net1 im Nukleolus inaktiviert. In der frühen Anaphase wird Cdc14 in einer ersten Freisetzungswelle durch das FEAR transient aktiviert. Vollständige Aktivierung von Cdc14 in der späten Anaphase erfolgt durch das MEN, was zum Austritt aus der Mitose führt. Die Polokinase Cdc5 als Bindeglied zwischen FEAR und MEN ist hervorgehoben (lila hinterlegt). Verändert nach Rock und Amon, 2009.

In einer ersten Welle wird die Phosphatase Cdc14 in der frühen Anaphase über das FEAR-Netzwerk temporär in den Zellkern und zu einem sehr geringen Teil in das Zytoplasma freigesetzt (Rock und Amon, 2009). Die Komponenten des FEAR setzen sich aus Separase mit Slk19, der Polokinase Cdc5, Spo12, Fob1, der Phosphatase PP2A mit dem Regulatorprotein Cdc55, Zds1, Zds2 und Cdk1 mit den regulatorischen Untereinheiten Clb1 und Clb2 zusammen (Rock und Amon, 2009, vgl. Abb. 7). Die Proteine Zds1 und Zds2 interagieren mit PP2A um dessen Aktivitätsverminderung zu Gunsten der Net1-Phosphorylierung zu unterstützen (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2016).

Die Freisetzung von Cdc14 in der frühen Anaphase könnte durch Nur1, ein Protein abseits des FEAR-Signalweges phosphorylierungsabhängig unterstützt werden. Es zeichnet sich ab, dass Nur1, ein Protein welches die rDNA an der Kernhülle verankert, vermutlich durch eine direkte Interaktion mit Net1 die Freisetzung von Cdc14 reguliert (Godfrey *et al.*, 2015). Nach der APC/C-Aktivierung in der frühen Anaphase wird durch die Degradation von Securin der Separase-Slk19-Komplex aktiviert was

zur Freisetzung von Cdc14 notwendig ist (Weiss, 2012). Durch die nicht-proteolytische Aktivität der Separase wird folgend die Phosphataseaktivität der PP2A mit deren regulatorischer Untereinheit Cdc55 abgeschwächt (Queralt *et al.*, 2006, Godfrey *et al.*, 2015). Diese verringerte Aktivität von PP2A ermöglicht die Phosphorylierung von Net1 durch Cdk1-Clb1 und Cdk1-Clb2 (Rock und Amon, 2009). Eine zusätzliche Phosphorylierung von Net1 und die Phosphorylierung von Cdc14 erfolgen durch die Polokinase Cdc5, ein Bindeglied zwischen FEAR und MEN welches zur Regulation beider Netzwerke beiträgt (Shou *et al.*, 2002, Rahal und Amon, 2008, Weiss, 2012). Rodriguez-Rodriguez *et al.* (2016) stellten fest, dass für die Cdc5-vermittelte Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus zusätzlich die Separaseaktivität unabdingbar ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass N-terminale Net1-Fragmente (AS 1-600) hinreichend zur Cdc5-vermittelten Cdc14-Freisetzung waren. Die stetige Zunahme der Phosphorylierungen von Net1 durch Cdc5, Cdk1 und MEN-Kinasen wie Dbf2 in der Anaphase führen zu einer reduzierten Proteinbindung mit Cdc14, was in der Freisetzung der Phosphatase resultiert (Godfrey *et al.*, 2015). Obwohl Net1 an mindestens sechs Cdk-Sequenzen in der NTD phosphoryliert werden kann, ist diese Cdk-vermittelte Phosphorylierung möglicherweise für die Aktivierung von Cdc14 nicht notwendig (Weiss, 2012, Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2016).

Nach der ersten Aktivierung von Cdc14 wird das essentielle MEN aktiviert. Das MEN besteht aus einer GTPase-Signal-transduktionskaskade mit den Hauptkomponenten Tem1, der Kinase Cdc15 und den Kinasen Dbf2 und Dbf20 zusammen mit Mob1 als Aktivatorprotein (Weiss, 2012). Ts-Mutanten von MEN wie *cdc15-2* führen analog zu *cdc14-1* zu einem Anaphase-Arrest (Eissler *et al.*, 2014). Cdc14 interagiert mit der Kinase Cdc15 am SPK, was nach dessen Phosphorylierung zur Aktivierung des MEN führt (Bloom *et al.*, 2011). Auch für Nur1 konnte gezeigt werden, dass es nach Cdc14-vermittelter Dephosphorylation in der frühen Anaphase in der Lage ist, die weitere Cdc14-Freisetzung zu stimulieren (Godfrey *et al.*, 2015). Die Cdc14-Freisetzung wird dabei durch die Aufrechterhaltung von phosphoryliertem Net1 unterstützt (Rahal und Amon, 2008, Weiss, 2012). Die Orientierung der mitotischen Spindel (*spindle orientation checkpoint*) entlang der Teilungsebene beeinflusst MEN ebenfalls durch die Cdc14-Aktivität (Lew und Burke, 2003, Rock und Amon, 2009). Hier wird sichergestellt, dass einer der beiden SPKs vor dem Austritt aus der Mitose in das Zytoplasma der Tochterzelle eingetreten ist (Weiss, 2012). Die Aktivierung von Tem1 erfolgt erst nach korrekter Spindelorientierung und Elongation (Wurzenberger und Gerlich, 2011). Tem1, ein G-Protein welches an der Spitze des MEN wirkt, wird vermutlich durch Bub2-Bfa1 (*GTPase activating protein*, GAP) reguliert. Möglicherweise ist Tem1 jedoch selbst in der Lage GTP zu hydrolysieren und GDP auszutauschen (Weiss, 2012). Daher ist derzeit ebenfalls unklar, ob die Funktion von Lte1 darin besteht, als entsprechender Guanin-Nukleotidaustauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) für Tem1 zu wirken (Caydasi *et al.*, 2017). Dies wird zunehmend unwahrscheinlicher. Teilweise wird davon ausgegangen, dass Lte1 eher die Lokalisation von Bfa1 an den SPKs bestimmt, eine zur

Aktivierung der MEN-Komponenten übliche und notwendige Lokalisation (Geymonat *et al.*, 2009, Weiss, 2012). Es wäre auch möglich, dass Lte1 die PK Kin4 inhibiert, welche in der Lage ist die MEN-Aktivität zu inhibieren (Geymonat *et al.*, 2009). Der Bub2-Bfa1-Komplex ist an mehreren *Checkpoints* im Zellzyklus wie dem SAC und dem *spindle orientation checkpoint* beteiligt und wird bis zur Aktivierung von MEN durch Cdc5 inhibiert (Kapitel 3.2, Rock und Amon, 2009). Bereits durch FEAR aktiviertes Cdc5 phosphoryliert Bfa1, was die Bub2-Bfa1 GAP-Aktivität senkt und zur MEN-Aktivierung führt. Im MEN induziert Tem1 nachfolgend die Kinase Cdc15, was dann den Kinasekomplex Dbf2-Mob1 aktiviert und hier für die korrekte Positionierung der mitotischen Spindel notwendig ist (Weiss, 2012). Durch FEAR freigesetztes Cdc14 selbst dephosphoryliert die Kinase Cdc15, was den MEN-Signalweg weiter vorantreibt (Rock und Amon, 2009). Rodriguez-Rodriguez *et al.* (2016) postulierten für die späte Anaphase einen MEN-unabhängigen Mechanismus von Cdc5 zur Freisetzung von Cdc14. Die Überexpression von *CDC5* in der MEN-Mutante *dbf2-2* bei restriktiver Temperatur führte zur Aktivierung von Cdc14 und damit zur Wiederherstellung des Zellwachstums. Das Protein Nud1 dient als wichtiges Gerüstprotein der MEN-Komponenten am SPK (Rock und Amon, 2009, Weiss, 2012). Die Aktivierung von Dbf2-Mob1 führt zur Phosphorylierung der NLS von Cdc14 was zusätzlich die weitere Aufrechterhaltung der Phosphataseaktivität in Zellkern und Zytoplasma unterstützt und damit durch die Dephosphorylierung von Zielproteinen zum Austritt aus der Mitose führt (Mohl *et al.*, 2009).

3.3.2.4 Die Regulation der Lokalisation von Cdc14

Die subzelluläre Lokalisation von Cdc14-Phosphatasen kann auf verschiedene Art und Weise reguliert werden. Im Menschen gibt es drei unterschiedliche Isoformen von Cdc14: hCdc14A, hCdc14B und hCdc14C, letztere ist durch eine genomische Reduplikation entstanden (Mocciaro und Schiebel, 2010). hCdc14B ist dem Cdc14 der Bäckerhefe im Aufbau des Proteins am ähnlichsten und vorwiegend im Nukleolus lokalisiert (Kapitel 3.3.1, Mocciaro und Schiebel, 2010). Rosso *et al.* (2008) konzentrierten sich aufgrund der Konservierung auf die Analyse des Tochtergens von hCdc14B in Hominiden und bezeichneten es als CDC14Bretro (=hCDC14C, Mocciaro und Schiebel, 2010). Interessanterweise gibt es von CDC14Bretro vier unterschiedliche Spleiß-Varianten (CDC14Bpar [=parental], B1, B2 und B3), die unterschiedliche Lokalisationen aufweisen. CDC14Bpar, B1, B2 und B3 werden in jedem untersuchten Gewebe exprimiert, CDC14Bretro hingegen nur im Gehirn und den Testes. CDC14B1 lokalisiert im Nukleolus und CDC14B2 in Subkompartimenten des Kerns in sog. *nuclear speckles*. CDC14Bpar und CDC14B3 co-lokalisieren mit den MT. Ohne die NLS lokalisieren CDC14B1 und CDC14B2 zunehmend ebenfalls mit den MT. In Hominiden tragen, ähnlich zu Cdc14 in *S. cerevisiae*, sowohl die N- als auch die CTD, zur Lokalisation der unterschiedlichen Isoformen bei. Die Abweichungen in der Lokalisation der hCDC14B-Formen kommen vermutlich durch ein

alternatives Startcodon, das zum Überschreiben der NLS von CDC14Bpar und CDC14B3 in der NTD führt, zustande. Die vier Spleiß-Varianten unterscheiden sich in der CTD interessanterweise nur durch sieben AS.

Cdc14 in *S. cerevisiae* wird im Zellzyklus durch seine subzelluläre Lokalisation im Nukleolus reguliert. Nach ihrer Freisetzung in der Anaphase ist Cdc14 im Zellkern, im Zytoplasma und für einen kurzen Zeitpunkt auch mindestens an einem SPK und am Knospenhals zu visualisieren (Bembenek *et al.*, 2005). Zudem ist Cdc14 nachweislich mit dem Bub2-Bfa1-Komplex am SPK der Tochterzelle assoziiert, obwohl es oft an beiden SPKs lokalisiert ist (Pereira und Schiebel, 2003). Darüber hinaus ist eine Lokalisation von Cdc14 am Knospenhals bekannt (Weiss, 2012).

Die Translokation von Cdc14 aus dem Zellkern scheint über mehrere Wege reguliert zu sein. Die NLS in der CTD von Cdc14 wird über Phosphorylierungen des Dbf2-Mob1-Kinasekomplexes des MEN gesteuert, was zu einer Abschwächung der NLS führt (Mohl *et al.*, 2009). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die NLS durch Bindung an das Karyopherin Kap121 (auch bekannt als Pse1) auch aktiv reguliert werden könnte (Kobayashi *et al.*, 2015). Innerhalb der CTD befinden sich noch weitere Lokalisationssequenzen von Cdc14. Eine leucinreiche Sequenz deutet auf eine NES hin (Bembenek *et al.*, 2005, vgl. Kapitel 3.3.1). Um dies zu prüfen, führten Bembenek *et al.* (2005) unterschiedliche Lokalisationsstudien mit hCdc14A, hCdc14B und Cdc14 aus *S. cerevisiae* in HeLa-Zellen durch. Da bereits bekannt war, dass hCdc14A mit dem Exportin Crm1 interagiert (Mailand *et al.*, 2002), lag die Vermutung nahe, dass auch für hCdc14B und Cdc14 ein Crm1-vermittelter Export möglich wäre. Diese Interaktion konnte durch Lokalisationsveränderungen in *crm1*-Mutanten sowie im Hefe-zwei-Hybrid-System nachgewiesen werden. Dennoch wurde festgestellt, dass in Zellen, in denen die putative NES mutiert wurde, der Kernexport nicht vollständig unterdrückt werden konnte (Bembenek *et al.*, 2005).

3.3.3 Funktionen und Substrate von Cdc14 im Zellzyklus von *S. cerevisiae*

Von Cdc14 sind viele Funktionen und über hundert Interaktionspartner bekannt, die eine vielfältige Rolle während der Mitose und Zytokinese spielen (*Saccharomyces Genome Database* (SGD), Mocchiari und Schiebel, 2010, Bloom *et al.*, 2011, Kuilman *et al.*, 2015, Miller *et al.*, 2015). Derzeit wird angenommen, dass die Cdc14-abhängigen Abläufe im Zellzyklus durch effektivere und ineffektivere Dephosphorylierung von Substraten im Zellzyklus erfolgen. Substrate mit höherer Affinität werden früher dephosphoryliert, Zielproteine mit geringerer Affinität werden später und unvollständiger modifiziert (Weiss, 2012). Einige dieser Substrate wurden bereits präziser auf ihre biologische Funktion hin untersucht.

Cdc14 hat in *Saccharomyces cerevisiae* neben der Inaktivierung der Cdk1 bis zum Ende der Anaphase multifunktionelle Aufgaben bereits während der Mitose. Durch die erste Freisetzungswelle in der

frühen Anaphase über das FEAR-Netzwerk unterstützt Cdc14 die Segregation der rDNA, trägt zur Stabilisierung der mitotischen Spindel und zur Positionierung des Zellkerns bei. Mittlerweile wurde auch ein Beitrag zu Reparatur der DNA bekannt. Für Yen1, eine *Holliday junction* Resolvase konnte gezeigt werden, dass deren Aktivität direkt abhängig von der Dephosphorylierung durch Cdc14 ist. Yen1 repariert Doppelstrangbrüche der DNA nach Schäden und löst noch verbundene Intermediate nach der Rekombination auf (Eissler *et al.*, 2014). Bis zum Beginn der Anaphase wird Yen1 durch Cdk-vermittelte Phosphorylierungen inaktiv gehalten und ist im Zytoplasma verteilt. Die FEAR-vermittelte Aktivierung von Cdc14 führt zu einer Anreicherung von Yen1 im Zellkern um dort seine Funktion erfüllen zu können (Eissler *et al.*, 2014). Dennoch ist der Beitrag von FEAR während der Mitose teilweise umstritten. Yellman und Roeder (2015) sehen als einzige Funktion von FEAR eine Rolle während der rDNA-Segregation.

Während der Elongation und der Stabilisierung der Spindel spielen die Cdc14-Substrate Sli15, Fin1, Ask1 und Ase1 eine wichtige Rolle (Mocciaro und Schiebel, 2010, Bloom *et al.*, 2011, Machin *et al.*, 2016). Diese Elongation und Stabilisierung der mitotischen Spindel wird dabei direkt und indirekt durch Cdc14 reguliert. Die Assemblierung der Zentralspindel (*spindle midzone*) erfolgt durch Ase1 und setzt die vorherige Dephosphorylierung durch Cdc14 in der frühen Anaphase voraus. Durch die Cdc14-vermittelte Modifikation des Kinetochorproteins Ask1 wird die MT-Dynamik unterdrückt (Weiss, 2012). Indirekt erfolgt die Stabilisierung der Spindel über die Aktivierung von Ipl1 (Aurora B in höheren Eukaryoten) nach Dephosphorylierung des chromosomalen Begleitproteins Sli15, einer Untereinheit des Komplexes, was durch die Rekrutierung weiterer Proteine durch den Ipl1-Slk19-Komplex unterstützt wird (Khmelniskii *et al.*, 2007, Rock und Amon, 2009, Mirchenko und Uhlmann, 2010, Roccuzzo *et al.*, 2015). Für Fin1, ein Protein welches u.a. entlang der mitotischen Spindel lokalisiert, konnte gezeigt werden, dass es neben Ase1 als spezifisches Cdk1-Clb5-Substrat in der Anaphase von Cdc14 dephosphoryliert wird, um die Spindelstabilisation zu unterstützen. Fin1 und Ase1 scheinen im Signalweg parallel zu agieren, da die Deletion beider Protein zu synthetischer Letalität führte (Woodbury und Morgan, 2017).

Die Trennung der rDNA in der Mitose unterscheidet sich von der Segregation der übrigen Chromosomen. Sie wird erst später getrennt als die übrigen Schwesterchromatiden (Granot und Snyder, 1991). In der Mitose wird während der Metaphase die DNA kompaktiert und zu Beginn der Anaphase die Kohäsinkomplexe nach Aktivierung der Separase gespalten, was zur Trennung der Schwesterchromatiden führt (Kapitel 3.1). Alle Chromosomen bis auf Chromosom XII, welches die repetitiven rDNA-Einheiten beherbergt, sind nun bereits kompaktiert. Zur rDNA-Trennung tragen Tof2 als positiver Regulator von Cdc14 im Nukleolus und die FEAR-vermittelte Cdc14-Aktivierung bei (Geil *et al.*, 2008). Die Segregation der rDNA ist direkt abhängig von der Phosphataseaktivität von Cdc14 im Zellkern (Granot und Snyder, 1991, Rock und Amon, 2009). Die Beteiligung an der rDNA-

Trennung bedeutet, dass Cdc14 nicht nur im Nukleolus verankert wird, sondern auch gezielt Aufgaben im Nukleolus erfüllt (Visintin und Amon, 2001). In *cdc14-ts*-Mutanten kommt es zu einer sogenannten Anaphase-Brücke des rechten Armes von Chromosom XII, also zu einer unzureichenden Segregation. Ein vergleichbarer Phänotyp tritt auch in manchen Telomerregionen auf, was auf die fehlende Cdc14-Aktivität zurückzuführen ist (Machin *et al.*, 2016). Als Vorbereitung für die Trennung wird die rDNA zunächst in der Anaphase Cdc14-vermittelt kondensiert, was zur zeitlich verzögerten Teilung des Nukleolus in der Anaphase führt. Zugleich wird durch Cdc14 die Transkription der RNA-Pol I herunterreguliert was die Assoziation des Kondensinkomplexes an die rDNA ermöglicht (Machin *et al.*, 2016). Die dafür notwendige rDNA-Kompaktierung sowie die folgende Segregation werden durch Cdc14 auf zwei unterschiedliche Arten gesteuert: zum einen dephosphoryliert Cdc14 in der Anaphase Untereinheiten des Ipl1-Kinase Komplexes, was dadurch zu einer Zunahme der rDNA-Kompaktierung führt, zum anderen vermittelt Cdc14 Kondensin-abhängig die vollständige Auflösung der Kohäsion-unabhängigen rDNA-Verbindungen (Sullivan *et al.*, 2004). Möglicherweise ist die unzureichende rDNA-Trennung auch eine Folge der verminderten Zugkraft der mitotischen Spindel, deren Spannung ausreicht, die anderen Chromosomen zu trennen. Die Ausbildung der Spindel ist in Cdc14-Mutanten stark beeinträchtigt ist (Machin *et al.*, 2016).

FEAR-Mutanten zeigen einen verzögerten Austritt aus der Mitose, was auf die fehlende transiente Aktivierungswelle von Cdc14 zurückzuführen zu sein scheint (Rock und Amon, 2009). In der Publikation von Ross und Cohen-Fix (2004) konnte gezeigt werden, dass in FEAR-Mutanten außerdem die Aufteilung der DNA in Mutter- und Tochterzelle verändert war. In der Tochterzelle befand sich fast vollständig die chromosomale DNA, wodurch nur ein geringer Teil in der Mutterzelle verblieb. Möglicherweise war dies die Folge einer unzureichenden Aktivierung von Motorproteinen durch Cdc14 (Ross und Cohen-Fix, 2004). Cdc14 trägt vermutlich mitunter zu einem DNA-Rückhalte Mechanismus in der Mutterzelle bei.

Der Austritt aus der Mitose erfolgt nach vollständiger Aktivierung von Cdc14 durch das MEN in der späten Anaphase (Kapitel 3.3.2.3). Dies führt zur Inaktivierung der mitotischen Zyklin-Cdk-Komplexe über drei separate Wege: durch die Cdc14-vermittelte Dephosphorylierung von Hct1 (Vintin *et al.*, 1998), dem Aktivatorprotein des APC/C, das erst nach dessen Dephosphorylierung durch Cdc14 gebunden werden kann und somit zur Degradation der mitotischen Zykline führt. Außerdem wird der CKI Sic1 durch Cdc14 stabilisiert und durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Swi5 die Expression von *SIC1* weiter stimuliert (vgl. Kapitel 3.2, Visintin *et al.*, 1998, Bloom *et al.*, 2011).

Die Mitose wird durch die Zytokinese nach Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes abgeschlossen. Die Assemblierung und die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes sind zwei unterschiedliche Ereignisse die zusammen gesteuert werden müssen. Wichtige Proteine zur Gewährleistung dieser Funktionen sind beispielsweise Iqg1 und Inn1. Zur zeitlichen Kontrolle der Ausbildung des kontraktiven Ringes

nach abgeschlossener Kernteilung erfolgt dessen Regulation in Abhängigkeit der Cdk- und Cdc14-Aktivität. Die Dephosphorylierung des essentiellen Iqg1 durch Cdc14 ist dabei notwendig und hinreichend zur Ausbildung des Aktin-Myosin-Ringes (Miller *et al.*, 2015). Eine Inhibition der Phosphataseaktivität von Cdc14 verhindert dessen Assemblierung. Ein Zusammenspiel von MEN-Komponenten wie Cdc14, die Kinase Cdc15 und Dbf2-Mob1, die zudem am Ende der Mitose am auch am Knospenhals akkumulieren, regulieren diese Abläufe. Es konnte gezeigt werden, dass Tem1 nicht zur Ausbildung, jedoch für die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes essentiell ist (Miller *et al.*, 2015). Cdc14 und die MEN-Kinase Dbf2 regulieren zudem die Septumformation. Die Dephosphorylierung von Cdc14 der dafür notwendigen Proteine unterstützt auf diese Weise die Rekrutierung von Proteinen an den Knospenhals und ermöglicht gleichzeitig deren Assoziation miteinander zur weiteren Regulation. So wird nach der Dephosphorylierung von Inn1, welches das Einschnüren am Knospenhals unterstützt, Chs2 (Chitin Synthase 2) rekrutiert, welches die Formation des Septums durch Bildung eines Kanals unter Einbringung von Chitin vorantreibt (Weiss, 2012, Kuilman *et al.*, 2015). Die Tatsache, dass die Aktivität von MEN neben der Inaktivierung der Cdk-Aktivität eine Rolle in der Zytokinese spielt, konnte durch die Überexpression von *SIC1* gezeigt werden. Diese Überexpression machte es möglich den mitotischen Arrest zu umgehen, Zytokinesedefekte blieben jedoch bestehen (Miller *et al.*, 2015).

Zusammengefasst nimmt Cdc14 Einfluss auf sehr viele Proteine im Zellzyklus, obwohl sie nur während einer einzigen Phase, der Anaphase, aktiv ist.

4 Ergebnisse

Die in *Saccharomyces cerevisiae* essentielle Phosphatase Cdc14 wird durch die N-terminale Domäne von Net1 im Nukleolus bis zur Freisetzung in der Anaphase verankert. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob eine Trennung der Cdc14-Binde- und Inhibitionsdomänen innerhalb von Net1 möglich sind. Experimentell wurde dies mittels Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Hefezellen und durch unterschiedliche Bindungsanalysen sowie anhand biochemischer Methoden untersucht.

Eine weitere Aufgabe war es, die variable C-terminale Domäne von Cdc14 präziser zu charakterisieren. Es konnte festgestellt werden, dass neben der katalytischen Domäne in der NTD auch eine kurze Sequenz in der CTD liegt, die essentiell für die biologische Funktion von Cdc14 ist. Diese Region sollte genau eingegrenzt und analysiert werden. Zur Charakterisierung der CTD wurden Veränderungen in Cdc14 eingeführt. Anschließend wurde die so modifizierte Phosphatase in Lokalisationsstudien und hinsichtlich ihrer *in vivo*- und *in vitro*-Funktion untersucht. Um die Relevanz der CTD besser verstehen zu können, wurden als Ergänzung bekannte Cdc14-Substrate mit Hilfe der Mikroskopie im Zellzyklus analysiert, um tiefere Einblicke zur Funktionsanalyse gewinnen zu können.

4.1 Lokalisation von Cdc14 im Zellzyklus

Cdc14 ist in *S. cerevisiae* ein notwendiges Protein zur Regulation des Austritts aus der Mitose. Dabei ist Cdc14 während der gesamten Interphase und Metaphase an den Inhibitor Net1 gebunden und im Nukleolus verankert (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1999). In der frühen Anaphase wird Cdc14 über das FEAR in einer ersten Welle in den Zellkern freigesetzt (Stegmeier *et al.*, 2002; D'Amours und Amon, 2004; Yellman und Roeder, 2015, Kapitel 3.3.2.3). In der späten Anaphase erfolgt die vollständige Freisetzung in den Zellkern und das Zytoplasma über MEN (Stegmeier und Amon, 2004, Kapitel 3.3.2.3).

Zur Visualisierung von Cdc14 im Zellzyklus wurde ein diploider Stamm generiert, in dem Cdc14(1-551) voller Länge PCR-vermittelt mit GFP fusioniert wurde (Longtine *et al.*, 1998) und durch homologe Rekombination in das Hefegenom des diploiden Wildtyp-Stammes (K842) integriert wurde. Als Co-Lokalisationsmarker diente hierbei Nop56, ein nukleoläres Protein, das mit einem 3mCherry-Fluoreszenzprotein fusioniert wurde. Mittels Tetradenanalyse wurde aus dem für *CDC14-GFP* heterozygot diploiden Stamm ein haploider Nachkomme mit endogenem Expressionslevel erzeugt und beide vergleichend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 8). Für alle Aufnahmen, wenn nicht explizit anders angegeben, wurden Projektionen mit z-Stapel erstellt (Kapitel 6.4.1).

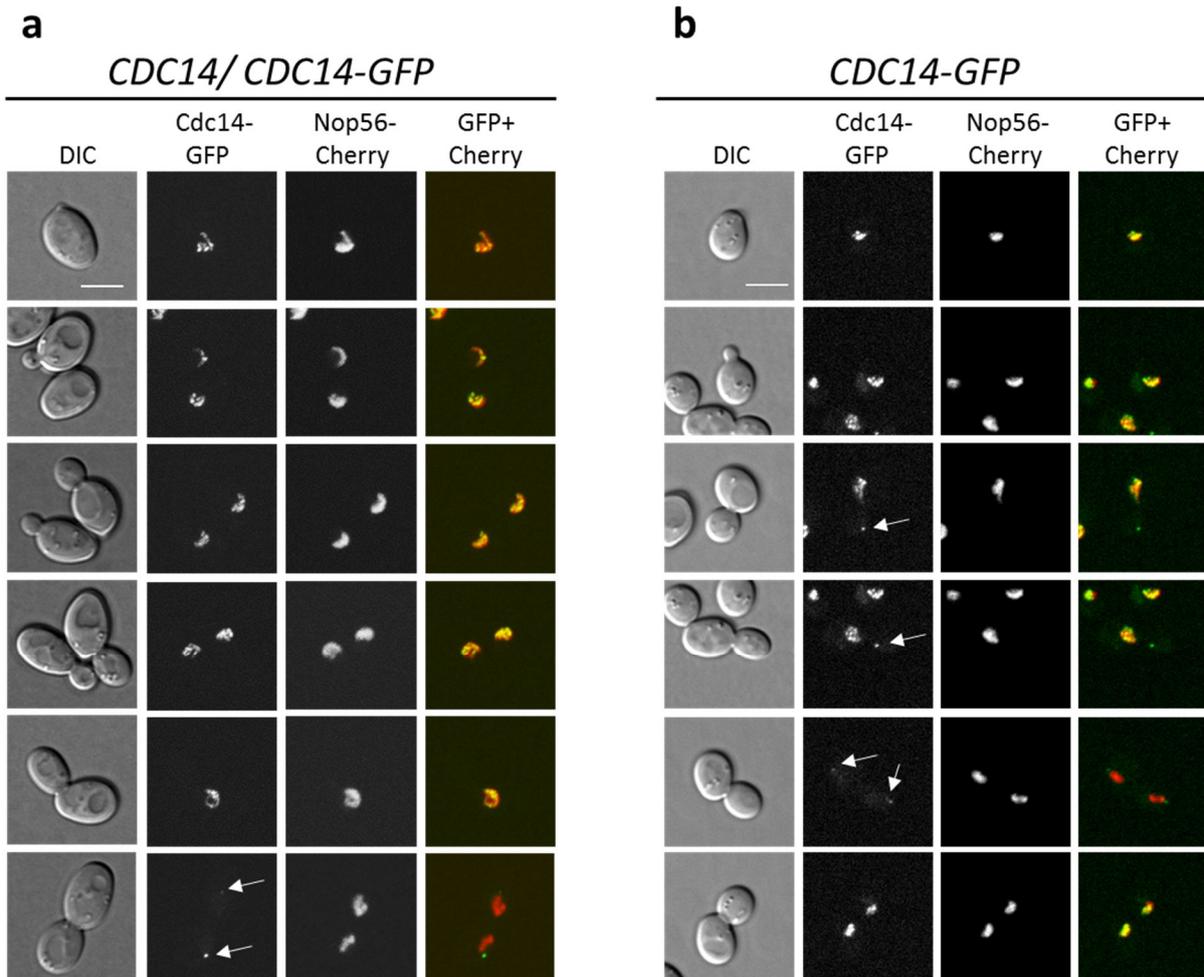


Abb. 8: Lokalisation von Cdc14 in diploiden und haploiden Hefezellen. In den Fluoreszenzaufnahmen wurde die Lokalisation von Cdc14 in asynchronen diploiden und haploiden Zellen analysiert. Hierzu wurde der diploide Stamm mit dem Genotyp **a**, *CDC14/CDC14-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3* (W13300) und ein haploider Nachkomme davon **b**, *CDC14-GFP-HIS3MX6 ura3::NOP56-3mCherry-URA3* gezeigt (W13439). In der ersten Spalte: Zellmorphologie im Durchlichtkanal (Differentialinterferenzkontrast, DIC), zweite Spalte: Lokalisation von Cdc14, dritte Spalte: das nukleoläre Protein Nop56 als Co-Marker fusioniert an ein rotes Fluoreszenzprotein, vierte Spalte: beide Fluoreszenzkanäle GFP und Cherry überlagert. Der Maßstabsbalken misst eine Länge von 5 μ m.

Cdc14 ist in diploiden und haploiden Zellen bis zur Interphase im Nukleolus zu erkennen (Abb. 8 a, b). Festzustellen ist dies an der halbmondförmigen Struktur und der Überlagerung mit dem nukleolären Markerprotein. Cdc14 war im Vergleich zu Nop56 etwas filigraner zu erkennen (Abb. 8 a, b, jeweils erste Zeile). In der ersten Freisetzungswelle der frühen Anaphase war Cdc14 noch im Nukleolus, aber gleichzeitig auch am SPK der Tochterzelle zu sehen (Abb. 8 b, dritte und vierte Zeile), bis es in der späten Anaphase nur noch an beiden SPKs erkennbar war (Abb. 8 a, sechste Zeile, b, fünfte Zeile). Cdc14 war prominenter am SPK der Tochterzelle festzustellen (Abb. 8 a, sechste Zeile, b, fünfte Zeile). Die Proteinmenge von Cdc14 im Zellzyklus ist dabei konstant (Visintin *et al.*, 1999). Das Fluoreszenzsignal von endogenem Cdc14 im Zytoplasma während der Anaphase fällt vermutlich unter die Detektionsgrenze.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird zur Vereinfachung der Genschreibweise die Angabe in AS beibehalten. Daher wird auf die Angabe in Basenpaaren verzichtet.

4.2 Regulation von Cdc14 durch Net1

Von der G1-Phase bis zum Beginn der Anaphase ist die Lokalisation von Cdc14 durch die Bindung an den Inhibitor Net1 in der NTD bestimmt. Das multifunktionelle Protein Net1 ist ein Teil des RENT-Komplexes. Net1 bindet an die rDNA im Nukleolus und ist über den Zellzyklus im Nukleolus lokalisiert. Um Cdc14 zu inhibieren, bindet Net1 die katalytische Domäne von Cdc14, wodurch das aktive Zentrum von Cdc14 besetzt und somit die Phosphataseaktivität supprimiert wird (Traverso *et al.*, 2001).

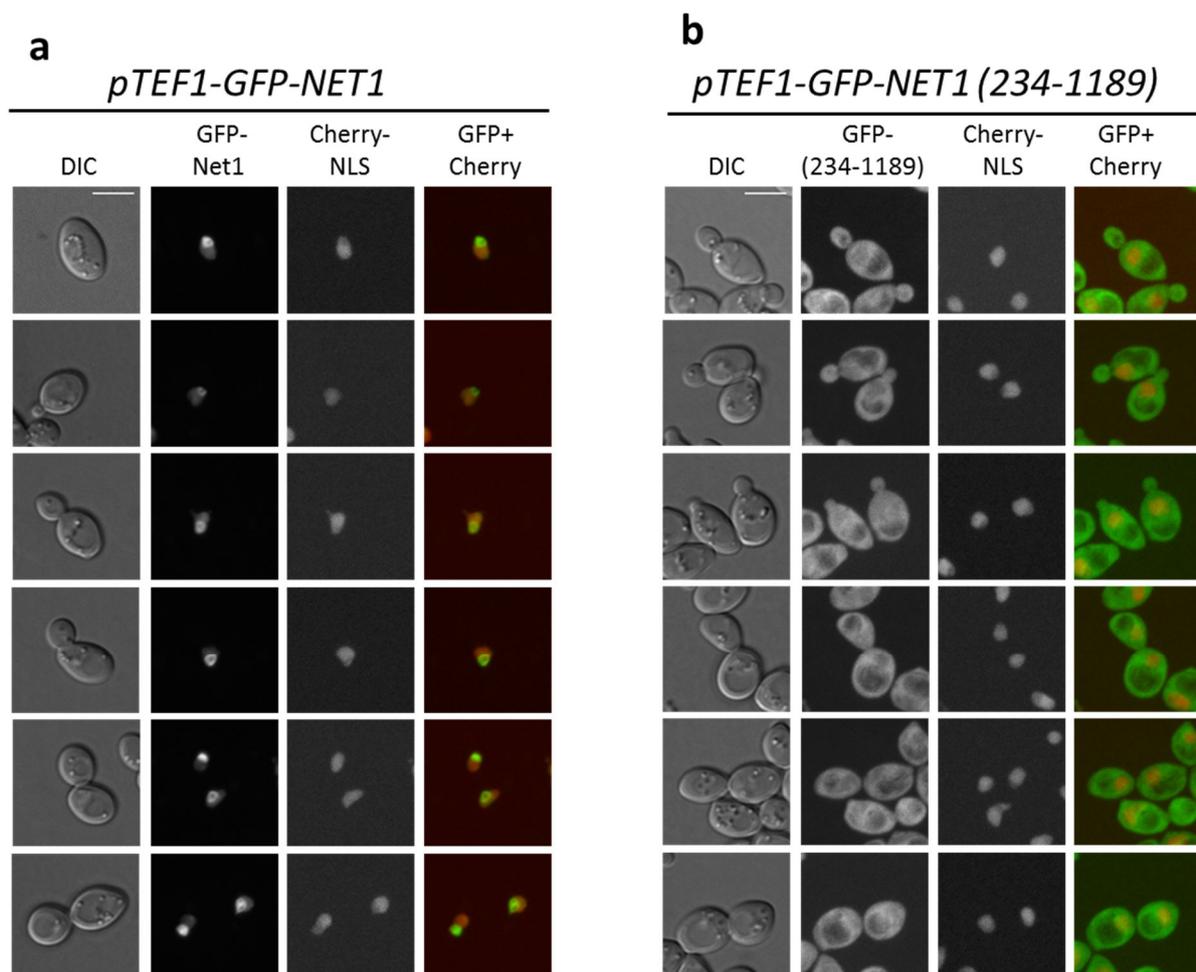


Abb. 9: Lokalisation von Net1 und Net1(234-1189) mit N-terminalen GFP-Fusionen. Es wurde die Lokalisation von **a**, W12125 (*NatNT2-pTEF1-GFP-NET1 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) verglichen mit **b**, W12126 (*NatNT2-pTEF1-GFP-NET1(234-1189) his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Erste Spalte: Zellmorphologie im Durchlichtkanal (Differentialinterferenzkontrast, DIC), zweiten Spalte: Lokalisation von Net1 bzw. Net1(234-1189), dritte Spalte: das Fusionsprotein aus einer NLS und einem roten Fluoreszenzprotein als Co-Marker zur Visualisierung des Zellkerns, vierte Spalte: die beiden Fluoreszenzkanäle GFP und Cherry überlagert. Der Maßstabsbalken ist 5 µm lang.

Die Lokalisation von Net1 im Nukleolus ist dabei abhängig von der NTD. In einer Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte dies bereits für Net1(234-455) festgestellt werden (Dissertation Katharina Hannig, 2015). Um dies mit *NET1(1-1189)* und *NET1* ohne den N-Terminus, *NET1(234-1189)* zu zeigen, wurden beide Derivate mittels *TEF1*-Promotor und N-terminaler GFP-Fusion (Sheff *et al.*, 2004) konstitutiv in haploiden Hefezellen exprimiert. Gleichzeitig exprimierten die Zellen zur Visualisierung des Zellkerns in der Mikroskopie zusätzlich einen roten Kernmarker (Arnold *et al.*, 2015), der sich aus dem roten, monomeren Fluoreszenzprotein mCherry und der Kernlokalisationssequenz des Transkriptionsfaktors Swi5 zusammensetzte (Moll *et al.*, 1991). Im Verlauf dieser Arbeit wird dieser Kernmarker als Cherry-NLS bezeichnet.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich Net1 während des gesamten Zellzyklus im Nukleolus befindet, jedoch war Net1 in geringerem Maß ebenfalls im Zellkern zu visualisieren (Abb. 9 a). Die Ausdehnung in den Zellkern ist vermutlich auf die konstitutive Überexpression des *TEF1*-Promotors zurückzuführen. Werden die AS 1-233 deletiert, ist Net1 diffus im Zellkern und Zytoplasma gleichermaßen detektierbar (Abb. 9 b).

Die Deletion der NTD von Net1 führte somit zu einer Verteilung des Proteins in der Hefezelle.

Es stellte sich die Frage, inwieweit sich die Lokalisation von Cdc14 in Zellen ändert, in denen Cdc14 nicht durch Net1 verankert wird. Eine Analyse von Cdc14 in $\Delta net1$ -Zellen ist aufgrund des auftretenden abnormen Zellwachstums und einer veränderten nukleolären Struktur durch die Deletion schwer interpretierbar (Dissertation Katharina Hannig, 2015). Um dies zu umgehen wurde Cdc14 in Stämmen mit konstitutiver *pTEF1*-Expression von *NET1(1-1189)* und *NET1(234-1189)* (Abb. 9) mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und damit Cdc14-GFP mit Net1 als Kontrolle, im Vergleich zu Net1 ohne NTD, analysiert (Abb. 10 a, b). Zur Co-Lokalisation mit dem Zellkern exprimierten die Hefezellen Cherry-NLS.

Trotz der Überexpression von *Net1(1-1189)* war Cdc14-GFP nicht auffällig verändert, da Cdc14 im Zellzyklus vergleichbar mit der endogenen Expression von *NET1(1-1189)* lokalisierte (Abb. 10 a, vgl. Abb. 8 b). Eine geringfügig homogenere Verteilung von Cdc14 ist jedoch feststellbar, die möglicherweise ebenfalls auf die Überexpression von *NET1* zurückzuführen ist. Cdc14 war in Zellen mit kleiner Knospe als halbmondförmige Struktur zu erkennen (Abb. 10 a, erste und zweite Zeile). Mit beginnender Anaphase, die durch den Eintritt in die Kernteilung erkennbar ist, war Cdc14 bereits teilweise im Zellkern der Mutterzelle zu sehen (Abb. 10 a, dritte Zeile). In der späten Anaphase, die durch die fortschreitende Kernteilung mit bestehender Nukleoplasmabrücke charakterisiert wird, war Cdc14 als Punkt zu visualisieren. Dies wurde in der Tochterzelle besonders deutlich (Abb. 10 a, vierte und sechste Zeile). In Zellen, in denen der N-Terminus von Net1 deletiert wurde, änderte sich die Lokalisation von Cdc14 (Abb. 10 b). Cdc14 war mit *Net1(234-1189)* teilweise noch im Nukleolus angereichert, war allerdings auch im Zellkern vor Beginn der Anaphase zu erkennen (Abb. 10 b, erste

und zweite Zeile). Auffällig war die punktförmige Struktur von Cdc14-GFP in Zellen mit kleiner Knospe. Dieses Muster trat nur am Rand des Zellkerns von Hefezellen auf, in denen Net1(234-1189) delokalisiert war (Abb. 10 b, erste bis vierte Zeile).

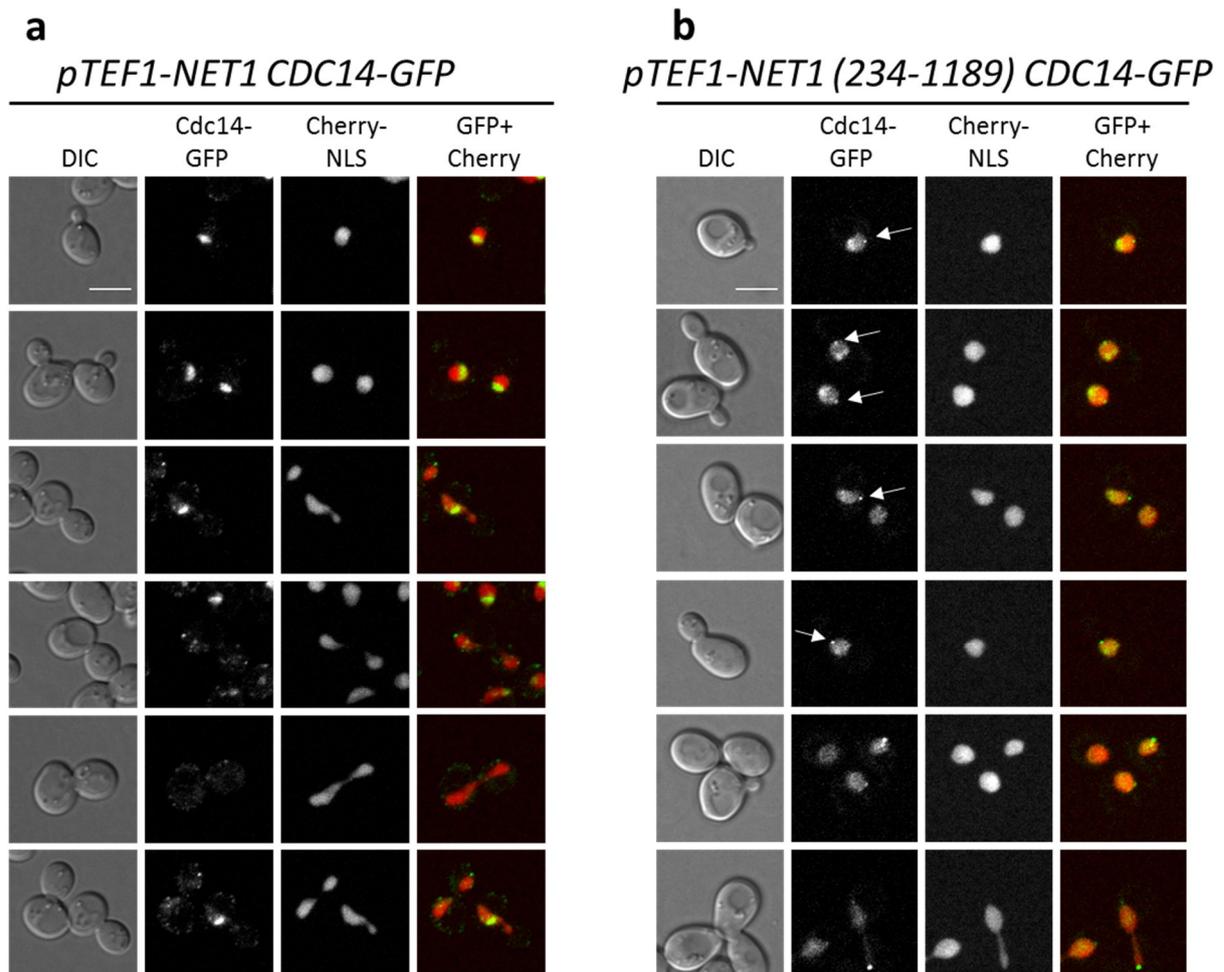


Abb. 10: Die Lokalisation von Cdc14 ist abhängig von Net1. Mittels *live-cell imaging* wurde der Einfluss eines N-terminal verkürzten Net1-Fragmentes in haploiden Zellen auf die Lokalisation von Cdc14 untersucht. Dazu wurde der Stamm mit dem Genotyp **a**, *natNT2-pTEF1-NET1 CDC14-GFP-HIS3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1* (W13309) als Kontrolle mit dem N-terminal verkürzten Net1-Stamm mit dem Genotyp **b**, *natNT2-pTEF1-NET1(234-1189) CDC14-GFP-HIS3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1* (W13310) verglichen. Erste Spalte: Zellmorphologie im Durchlichtkanal (Differentialinterferenzkontrast, DIC), zweite Spalte: die Lokalisation von Cdc14, dritte Spalte: zur Co-Lokalisation des Zellkerns die NLS fusioniert an ein rotes Fluoreszenzprotein (Cherry-NLS) vierte Spalte: beide Fluoreszenzkanäle GFP und Cherry überlagert. Die Maßstabsbalkenlänge beträgt 5 μm .

Es war interessant zu überprüfen, ob diese auftretende punktförmige Struktur von Cdc14, die am Rand des Zellkerns in Zellen mit Net1(234-1189) bereits in der Interphase zu sehen war, mit dem SPK co-lokalisiert. Um dies zu klären wurde in den Hefestamm mit Cdc14 und Net1(234-1189) (Abb. 10 b) zusätzlich ein Spindelpolmarker eingebracht. Dafür wurde ein Fusionskonstrukt bestehend aus dem Spindelpolprotein Spc42 mit dem Fluoreszenzprotein 3mCherry gewählt (Spc42-3mCherry) und stabil in das Hefegenom integriert.

Cdc14 zeigte in Zellen ohne Knospe und in Zellen mit kleiner Knospe tatsächlich bereits vor Beginn der Anaphase eine Fluoreszenzüberlagerung mit dem Spindelpolprotein Spc42 am Zellkernrand (Abb. 11, erste bis dritte Zeile). Während der Anaphase, die durch Spc42 anhand der Auftrennung in zwei SPKs visualisiert wurde, lokalisierte Cdc14 für diese Zellzyklusphase typisch, ebenfalls mit dem SPK der Tochterzelle (Abb. 11, fünfte Zeile).

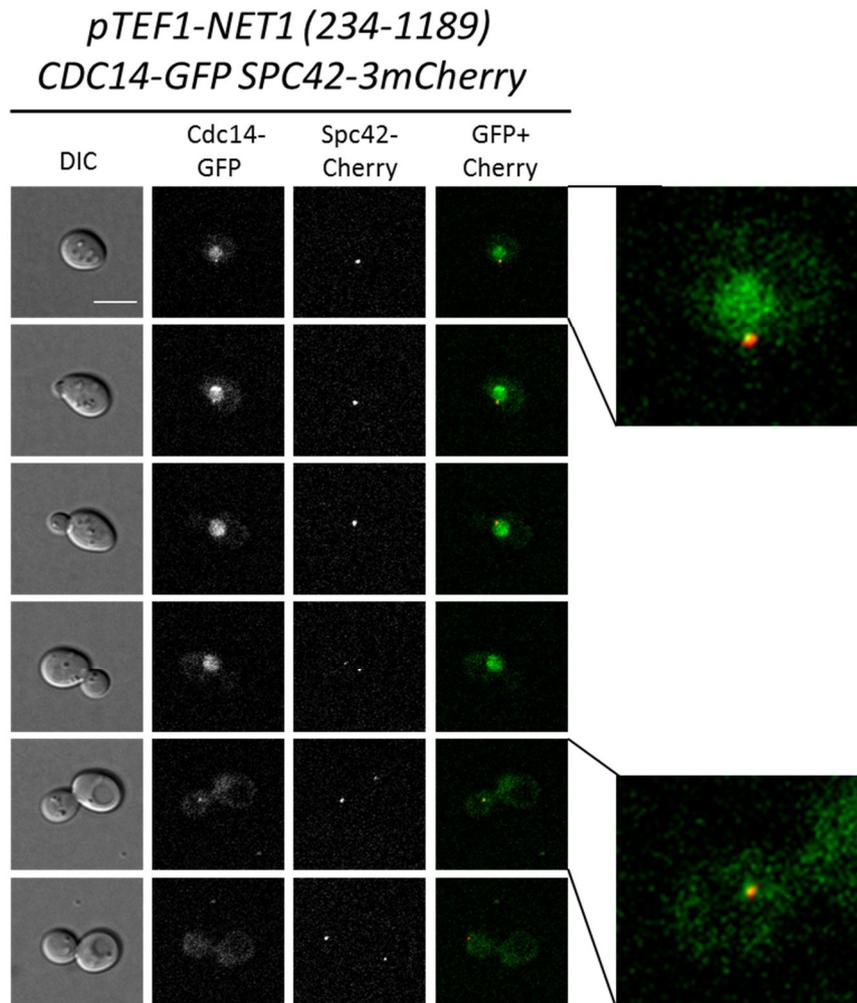


Abb. 11: Lokalisation von Cdc14 am SPK in *NET1(234-1189)*-Zellen. In asynchronen Zellen wurde die Lokalisation von Cdc14 in Zellen mit N-terminal verkürztem NET1 mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Der Hefestamm mit *natNT2-pTEF1-NET1(234-1189) CDC14-GFP-HIS3MX6 SPC42-3mCherry-URA3 (W13307)* wurde zur Lokalisation verwendet. Erste Spalte: die jeweilige Zelle im Differentialinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: das Fluoreszenzsignal von Cdc14-GFP, dritte Spalte: zur Co-Lokalisation das Spindelpolprotein Spc42 fusioniert mit einem roten Fluoreszenzprotein (3mCherry; Spc42-3mCherry, kurz: Spc42-Cherry), vierte Spalte: beide Fluoreszenzsignale überlagert. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 μm .

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Lokalisation von Cdc14 bis zur Freisetzung in der Anaphase direkt abhängig von Net1 ist. In Zellen, in denen Net1 nicht im Nukleolus verankert war, änderte sich auch das Fluoreszenzsignal von Cdc14-GFP prominent. Die Delokalisation von Net1 führte zu einer Ausdehnung von Cdc14 in den Zellkern. Die bestehende, geringfügige Anreicherung von Cdc14 im Nukleolus könnte durch eine noch teilweise vorhandene Verankerung von Net1 im

Nukleolus erklärt werden. Möglicherweise befinden sich in Net1 nach AS 234 noch Sequenzen, die durch direkte oder indirekte Bindung an Proteine oder die rDNA die Verankerung im Nukleolus gewährleisten. In Wildtyp-Zellen befindet sich Cdc14 erst in der Anaphase am SPK. Cdc14 war jedoch in Zellen mit delokalisiertem Net1 bereits vor der Anaphase am SPK zu erkennen. Dies lässt auf eine verfrühte Freisetzung von Cdc14 schließen.

Zur Eingrenzung der Bereiche von Net1, die zur Interaktion von Cdc14 beitragen, wurden Analysen mit N-terminalen Fragmenten von Net1 durchgeführt.

4.2.1 Analyse der Cdc14-Bindedomänen von Net1

Die Inhibition der Phosphataseaktivität von Cdc14 durch Net1 setzt die wechselseitige Bindung im Nukleolus voraus. Es wird angenommen, dass das katalytische Zentrum von Cdc14 durch die Bindung an Net1 abgeschirmt und dadurch inhibiert wird (Traverso *et al.*, 2001). Das N-terminale Fragment von Net1(1-341) war dabei hinreichend für diese Bindung, wobei Net1(1-600) eine noch stärkere Affinität zu Cdc14 zeigte (Traverso *et al.*, 2001). Allerdings ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob unterschiedliche Sequenzen von Net1 jeweils für die Bindung und für die Inhibition verantwortlich sind, oder ob die Inhibition ausschließlich durch die Bindung erreicht wird. Da Net1 mit 1189 AS ein großes Protein ist, wurde, um diesen Sachverhalt leichter analysieren zu können, eine Serie mit Subfragmenten hergestellt, um die Regionen für die Interaktion von Net1 mit Cdc14 einzugrenzen (Abb. 12).

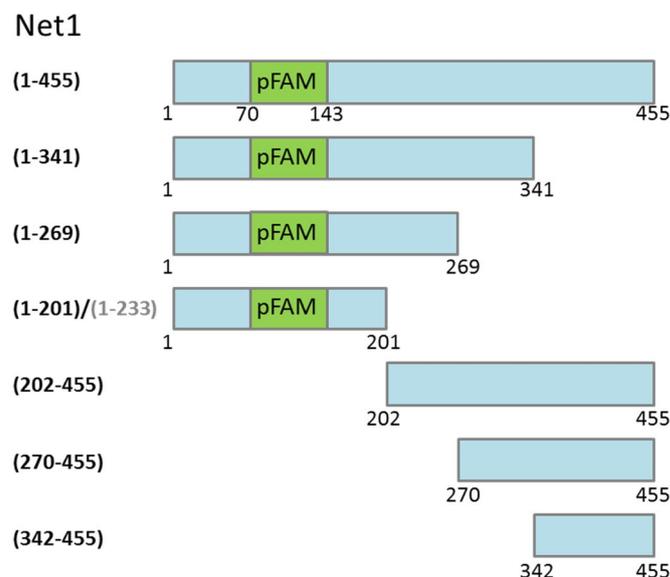


Abb. 12: Schematische Darstellung der erstellten Net1-Fragmente zur Analyse auf die Interaktion mit Cdc14. Zur erleichterten Charakterisierung auf die Bindefähigkeit von Net1 mit Cdc14 wurden die N-terminalen Subfragmente Net1(1-455), Net1(1-341), Net1(1-269), Net1(1-201) bzw. Net1(1-233), Net1(202-455), Net1(270-455) und Net1(342-455) erstellt. Das *pFAM10407*(pFAM)-Motiv ist in den entsprechenden Derivaten gekennzeichnet.

In den Derivaten von Net1 mit intakter NTD befindet sich das eingetragene *pFAM10407*-Motiv, welches den Cdc14-Bindeproteinen Tof2 und Dnt1 aus *S. pombe* gemeinsam ist (Marchler-Bauer *et al.*, 2015, s. Kapitel 3.3.2.2). Aufgrund der Bindefähigkeit dieser Proteine an Cdc14, war es wahrscheinlich, dass diese Region einen Einfluss auf die Proteininteraktion zwischen Cdc14 und Net1 haben könnte.

Um diesen Sachverhalt zu analysieren, wurden *in vivo*-Bindungsstudien von Cdc14 mit Net1 durchgeführt. Dazu wurde mittels Hefe-zwei-Hybrid-System (*yeast two hybrid*, Y2H) und Co-Immunpräzipitation (CoIP) die Bindung von unterschiedlichen N-terminalen Fragmenten von Net1 an Cdc14 untersucht.

Um herauszufinden, welche N-terminalen Fragmente von Net1 zur Bindung an Cdc14 hinreichend sind, wurde als erster qualitativer Test ein Y2H durchgeführt. Dazu wurden die NTD-Fragmente von Net1(1-233), Net1(1-341) und Net1(1-455) in einem Bindedomänenvektor (BD) und die beiden Derivate Net1(1-341) und Net1(1-455) in einem Vektor mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD) verwendet. Zusätzlich wurde das katalytisch inaktive Cdc14(C283A), das jeweils an die AD und die BD fusioniert wurde, eingesetzt, da eine Überexpression von Cdc14 im Y2H für die Zellen toxisch ist. Der Reporterstamm W276 wurde mit den N-terminalen Net1-Derivaten, sowie Cdc14(C283A) co-transformiert. Dieser Hefestamm enthält dabei ein *lacZ*-Reportergen sowie eine chromosomal integrierte Kopie des *LEU2*-Gens. Interagieren Cdc14 und Net1 miteinander, bilden die AD- und BD-Fusionsproteine einen aktiven Transkriptionsfaktor, wodurch die *lacZ*-Expression aktiviert wird. Diese Expression ist durch die β -Galaktosidase-Aktivität mit X-Gal als Substrat nachweisbar. Zugleich werden die Zellen nach Interaktion der Proteine prototroph für Leucin. Als Negativkontrollen wurden die Vektoren mit der AD bzw. BD ohne Fusionsproteine gewählt. Als Positivkontrolle wurde AD-Cdc14(C283A) mit BD-Cdc14(C283A) verwendet, da Cdc14 nachweislich mit sich selbst interagiert (Taylor *et al.*, 1997; Diplomarbeit Andreas Pickl, 2009) (Abb. 13 a, fünfte Reihe). Für den Wachstumstest im Y2H wurden Selektivplatten mit Raffinose und Galaktose ohne Histidin, Tryptophan und Leucin (SRG-HTL) verwendet bzw. für den Galaktosidasetest Platten mit Raffinose bzw. mit Sucrose und Galaktose ohne Histidin und Tryptophan (SRG-HT, SSG-HT) eingesetzt. Sucrose ist ein Disaccharid, das sich aus Fruktose und Glukose zusammensetzt. Durch die Glukose als Kohlenstoffquelle wird der Galaktosepromotor reprimiert, dadurch die Expression der Net1-Konstrukte im Y2H etwas abgeschwächt, sodass die Expression weniger toxisch für die Zellen ist. Dies war wichtig, da im Experiment beobachtet wurde, dass die Überexpression von N-terminalen Net1-Derivaten letal für die Zellen war (Abb. 13 a, vierte Reihe).

Net1(1-455) und Net1(1-341) zeigten eine Proteinwechselwirkung mit Cdc14 im Galaktosidasetest, erkennbar durch eine Blaufärbung der Kolonien, sowie durch die Prototrophie im Wachstumstest (Abb. 13 a, zweite und vierte Reihe, Abb. 13 b zweite Reihe). Dies war allerdings nur in der

Orientierung AD-Net1(1-455) bzw. AD-Net1(1-341) mit BD-Cdc14(C283A) und nicht umgekehrt zu erkennen (vgl. Abb. 13 a zweite und vierte Reihe mit erster und dritter Reihe). Die Auswertung zur Bindung von Net1(1-233) mit Cdc14(C283A) war nicht aussagekräftig und gibt somit nur einen Hinweis darauf, dass auch dieses Fragment noch mit Cdc14 interagieren könnte. In den Zellen mit AD-Net1(1-233) und BD-Cdc14(C283A) war im Galaktosidasetest eine Kolonie deutlich blau gefärbt. Im Wachstumstest wuchsen vier von insgesamt sechs Kolonien an (Abb. 13 b, dritte Reihe). Allerdings wies auch Cdc14(C283A) fusioniert an die BD zusammen mit dem AD-Leervektor bereits geringe Autoaktivierung im Wachstums- und Galaktosidasetest auf (Abb. 13 b, erste Reihe). Die übrigen mitgeführten Negativkontrollen zeigten im Gegensatz dazu keine Autoaktivierung im Galaktosidase- oder Wachstumstest an (Abb. 13 a, sechste und siebte Reihe, Abb. 13 b, vierte und fünfte Reihe).

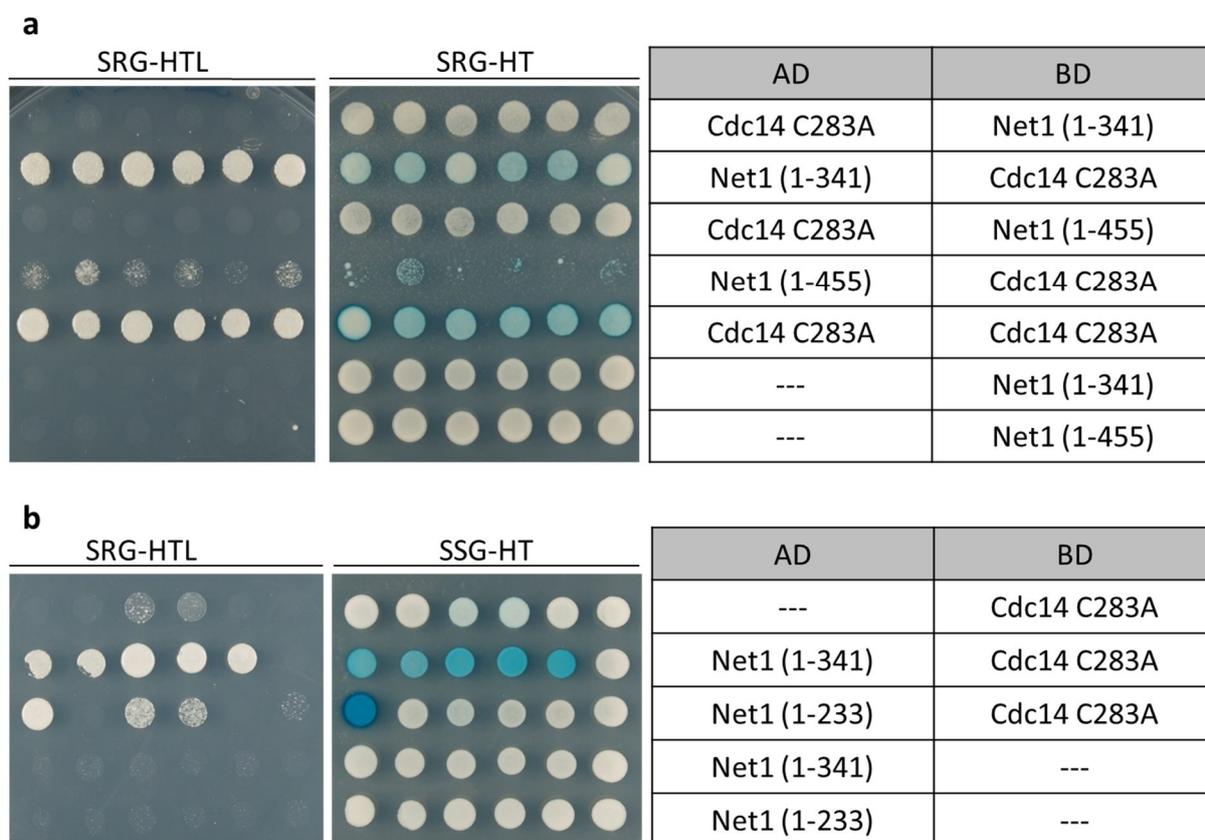


Abb. 13: Proteinbindung zwischen Cdc14 und N-terminalen Net1-Derivaten im Y2H. Gezeigt sind die Ergebnisse der Proteininteraktion zwischen dem katalytisch inaktiven Cdc14(C283A) und den N-terminalen Net1-Fragmenten Net1(1-455), Net1(1-341) und Net1(1-233) mittels Wachstums- und β -Galaktosidasetest im Y2H. Nach einer Co-Transformation des Reporterstammes W276 (*ura3::URA3-lexA-op-lacZ leu2::pLEU2-lexA-op*) mit jeweils einem Protein fusioniert mit der Aktivierungsdomäne (AD, pJG4-5-Derivate) und einem Protein fusioniert an die Bindedomäne (BD, pEG202-Derivate), bzw. pJG4-5-Leervektor oder pEG202-Leervektor als Kontrollen, wurden pro Transformation sechs Kolonien auf die entsprechenden Selektivplatten aufgebracht. Die Kolonien auf den beiden zusammengehörigen Selektivplatten (SRG-HTL und SRG-HT, bzw. SRG-HTL und SSG-HT) pro Reihe sind identisch. Zur Co-Transformation verwendete Plasmide in **a**, pWS2753 (*pJG4-5-CDC14(C283A)*), pWS4281 (*pEG202-NET1(1-341)*), pWS4284 (*pJG4-5-NET1(1-341)*), pWS2752 (*pEG202-CDC14(C283A)*), pWS4282 (*pEG202-NET1(1-455)*), pWS4285 (*pJG4-5-NET1(1-455)*), pJG4-5-Leervektor und für **b**, pJG4-5 Leervektor, pWS2752 (*pEG202-CDC14(C283A)*), pWS4284 (*pJG4-5-NET1(1-341)*), pWS4063 (*pJG4-5-NET1(1-233)*), pEG202-Leervektor. Für den Galaktosidasetest wurden die gewachsenen Kolonien mit X-Gal enthaltendem Agar überschichtet und bei 30°C inkubiert.

Zusätzlich zur Analyse der Domänen von Net1, die zur Bindung von Cdc14 hinreichend sind, wurden CoIPs als weitere Bindungsstudie *in vivo* durchgeführt. Dazu wurden C-terminal verkürzte Fragmente von *NET1* mit einem durch Galaktose induzierbaren Promotor (*pGAL1*) bzw. mit einem Promotor, der in Vollmedium moderate Mengen an *NET1* exprimiert (*pMET25*) verwendet. Als erstes wurde ein *CDC14-MYC13*-Hefestamm mit Plasmiden mit *NET1(1-455)-FLAG3*, *NET1(1-341)-FLAG3*, *NET1(1-269)-FLAG3*, *NET1(1-201)-FLAG3*, *NET1(342-455)-FLAG3*, *NET1(270-455)-FLAG3* und *NET1(202-455)-FLAG3* transformiert und diese durch Induktion des *GAL1*-Promotors exprimiert. Der immunologische Nachweis von Net1 erfolgte über das Flag-Epitop, der Nachweis von Cdc14 über das Myc-Epitop.

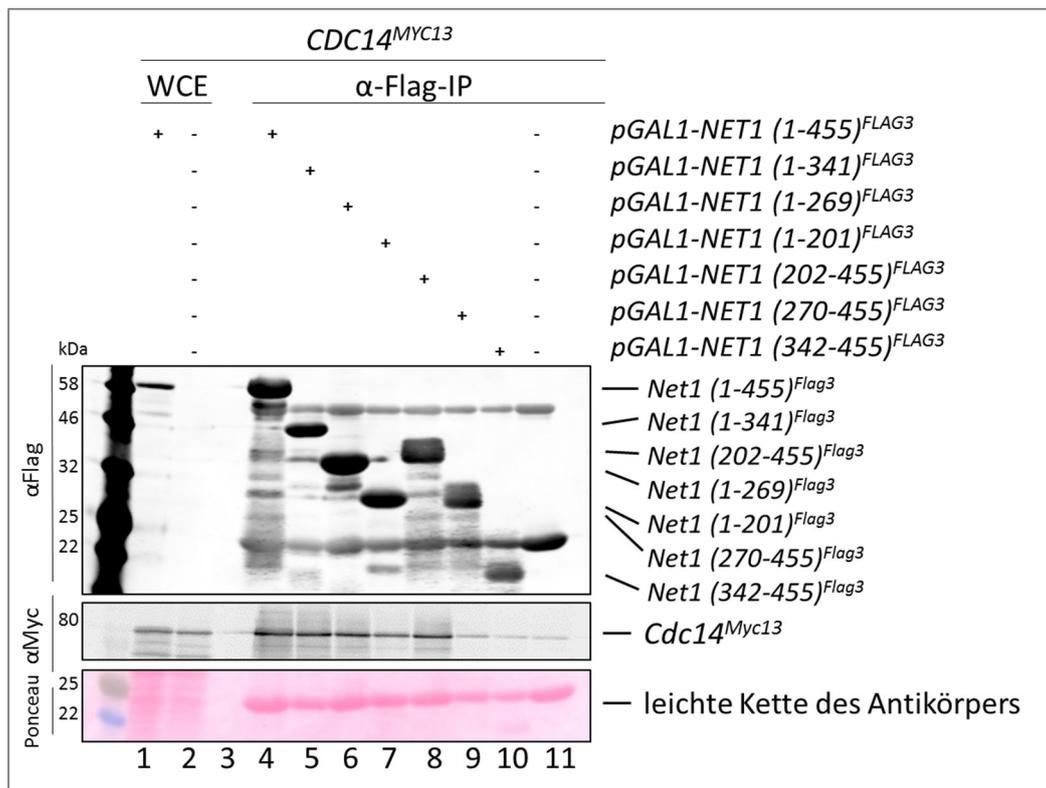


Abb. 14: Proteininteraktion N-terminaler Net1-Fragmente mit Cdc14. Die N-terminalen Net1-Derivate Net1(1-455), Net1(1-341), Net1(1-269), Net1(1-201), Net1(202-455), Net1(270-455), Net1(342-455) wurden auf ihre *in vivo*-Bindung mit Cdc14 in einer CoIP untersucht. Die in *XYR2%* exponentiell wachsenden Hefestämme wurden zur Expression der *NET1*-Konstrukte für zwei Stunden (25°C) mit 2%Galaktose induziert. Dazu wurden in Testexpressionen ausgewählte Stämme mit den Genotypen *leu2::pGAL1-NET1(1-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-Myc13-kanMX6* (W14486), *leu2::pGAL1-NET1(1-341)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14491), *leu2::pGAL1-NET1(1-269)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14489), *leu2::pGAL1-NET1(1-201)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14487), *leu2::pGAL1-NET1(202-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14488), *leu2::pGAL1-NET1(270-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14490), *leu2::pGAL1-NET1(342-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14491) und als Negativkontrolle der Stamm W11398 mit *CDC14-MYC13-kanMX6* verwendet. Die Präzipitation erfolgte mittels α -Flag gekoppelteten Beads und deren Nachweis mit dem α -Flag-Antikörper M2. Cdc14-Myc13 wurde mit dem α -Myc-Antikörper A14 nachgewiesen. Zusätzlich zu den aufgereinigten Proben wurden die Gesamtllysate (WCE) von Net1 (1-455)-Flag3, sowie die Negativkontrolle Cdc14-Myc13 (erste und zweite Spur) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Als Ladekontrolle ist die mittels Ponceau gefärbte, leichte Kette des α -Flag-Antikörpers gezeigt. Errechnete Proteingrößen: Net1(1-455)-Flag3: 54 kDa, Net1(1-341)-Flag3: 42 kDa, Net1(1-269)-Flag3: 34 kDa, Net1(1-201)-Flag3: 27 kDa, Net1(202-455)-Flag3: 32 kDa, Net1(270-455)-Flag3: 25 kDa, Net1(342-455)-Flag3: 17 kDa, Cdc14-Myc13: 78 kDa.

Die CoIP zeigte, dass Net1(1-455) und Net1(1-341) Cdc14 vergleichbar gut binden (Abb. 14, vierte und fünfte Spur). Net1(1-269) und Net1(202-455) präzipitierten Cdc14 auch, jedoch geringfügiger im Vergleich zu Net1(1-455) und Net1(1-341) (Abb. 14, sechste Spur, achte Spur vgl. mit vierter und fünfter Spur). Ebenfalls schien das kürzeste getestete Fragment Net1(1-201) noch eine Bindung mit Cdc14 einzugehen (Abb. 14, siebte Spur), da das detektierte Signal deutlich über dem Signal der Negativkontrolle (Abb. 14, elfte Spur) lag. Cdc14 zeigte jedoch nur besonders schwache Bindung mit Net1(270-455) (Abb. 14, neunte Spur). Die Wechselwirkung von Net1(342-455) mit Cdc14 scheint gänzlich verloren gegangen zu sein (Abb. 14, zehnte Spur), da das Signal auf dem Intensitätsniveau der Negativkontrolle lag (Abb. 14, letzte Spur). Die Proteinanreicherungen von Net1 über die Antikörper-gekoppelten *Beads* schienen gut funktioniert zu haben. Dies wird an der Zunahme des Proteinsignals von Net1(1-455) in der IP erkennbar. Dabei waren die *Beads* offenbar nicht absolut regelmäßig verteilt, was an der unterschiedlichen Intensität der leichten Kette des Antikörpers in der Ponceau-Färbung zu erkennen ist. Zur Präzipitation von Net1(1-341), Net1(270-455) und Net1(342-455) wurden erkennbar weniger *Beads* verwendet. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde die CoIP reproduziert und die gewonnenen Daten bestätigt (Anhang, Abb. 65). Diese Ergebnisse lassen auf eine untergeordnete Rolle des *pFAM*-Motivs zur Interaktion von Net1 mit Cdc14 schließen. Da in Net1(202-455) dieses Motiv nicht enthalten ist, jedoch eine robuste Interaktion nachweisbar war. Auf den Effekt auf das Zellwachstum dieser Net1-Fragmente unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors wird separat in Kapitel 4.2.2 eingegangen.

Die noch vorhandene Wechselwirkung von Net1(1-201) mit Cdc14 in der CoIP war zunächst überraschend, da die Ergebnisse im Y2H mit dem längeren Derivat Net1(1-233) keinen aussagekräftigen Hinweis auf eine Interaktion lieferten (Abb. 13 b). Um zu überprüfen, ob diese Bindung möglicherweise durch die Überexpression von *NET1* durch den Galaktosepromotor zustande kam, wurden Konstrukte mit *pMET25* zur Expression in geringeren Mengen gewählt (Mumberg *et al.*, 1994). Um eine genauere Einschätzung des N-Terminus von Net1 zu gewinnen, wurden *NET1(1-455)-FLAG3*, *NET1(1-341)-FLAG3* und *NET1(1-201)-FLAG3* zur co-immunologischen Analyse verwendet. Vorher sollte ausgeschlossen werden, dass die Proteinexpressionslevel des *pMET25* bereits in Vollmedium inhibitorisch wirken. Zu diesem Zweck wurden die zur CoIP verwendeten Stämme auf eine Vollmediumsplatte in einer Verdünnungsreihe aufgebracht (Abb. 15). Als Negativkontrolle diente der Cdc14-Myc13-Stamm ohne die verwendeten *pMET25-NET1*-Derivate.

Die Analyse des Wachstumstests zeigte, dass die Stämme mit diesen N-terminalen Derivaten von Net1 (*pMET25-NET1(1-455)*, *pMET25-NET1(1-341)* und *pMET25-NET1(1-201)*) wie der Kontrollstamm wuchsen. Ein geringeres Zellwachstum und somit eine Inhibition konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 15).

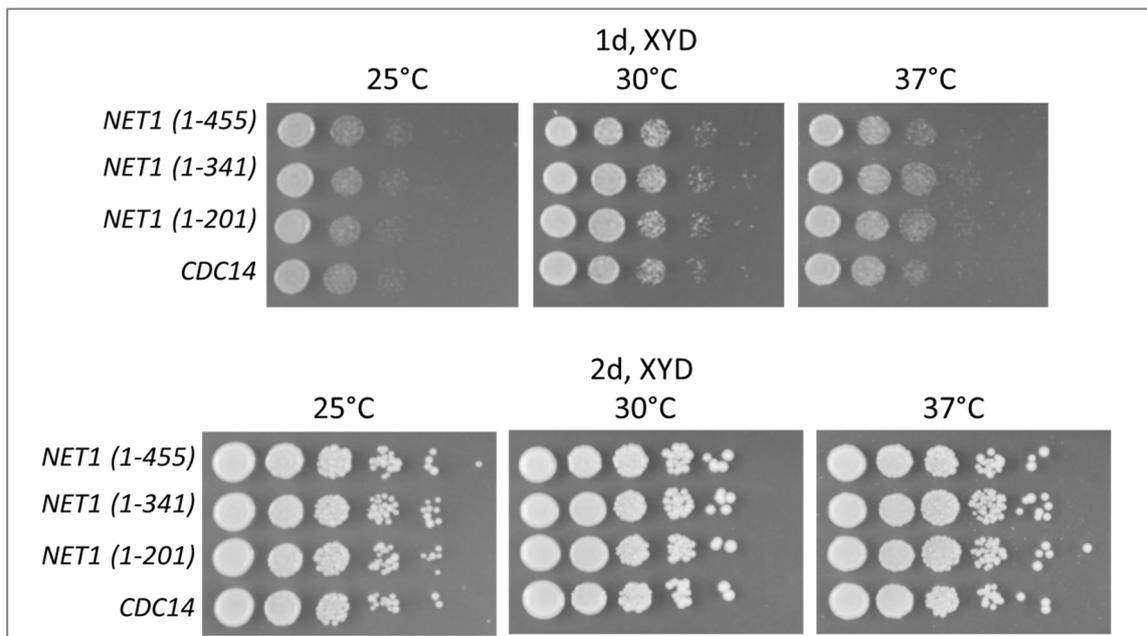


Abb. 15: Wachstumstest N-terminaler Net1-Fragmente unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors. Es wurden die exponentiell in XYD wachsenden Hefestämme W14694 (*ura3::pMET25-NET1(1-455)-FLAG3-tCYC1-URA3 CDC14-MYC13-kanMX6*), W14695 (*ura3::pMET25-NET1(1-341)-FLAG3-tCYC1-URA3 CDC14-MYC13-kanMX6*), W14696 (*ura3::pMET25-NET1(1-201)-FLAG3-tCYC1-URA3 CDC14-MYC13-kanMX6*) mit der Negativkontrolle W11398 (*CDC14-MYC13-kanMX6*) zusammen in einer Verdünnungsreihe auf drei XYD-Vollmediumsplatten aufgebracht. Die Platten wurden bei jeweils 25°C, 30°C und 37°C für ein bis zwei Tage inkubiert und auf ihr Wachstum überprüft.

In der CoIP zeigte sich durch den α -Flag-Nachweis des Gesamtlysates (WCE), dass die Net1-Konstrukte *NET1(1-455)*, *NET1(1-341)* und *NET1(1-201)* unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors in äußerst ähnlichen Mengen exprimiert wurden (Abb. 16). Die Wechselwirkung zwischen Net1(1-455) und Cdc14 war am stärksten, da am meisten Cdc14 präzipitiert wurde (Abb. 16, fünfte Spur). Die Proteinwechselwirkung zwischen Cdc14 und Net1(1-341) war robust, aber geringfügig schwächer als mit dem längeren Net1-Derivat (Net1(1-455)) (Abb. 16, sechste Spur). Auch mit niedrigerem Expressionslevel von Net1(1-201) war immer noch eine robuste Wechselwirkung mit Cdc14 erkennbar (Abb. 16, siebte Spur). Die Intensität des Signals von präzipitiertem Cdc14 war dabei über dem Signal der Negativkontrolle (Abb. 16, achte Spur). Daher wäre es denkbar, dass die Sequenzen von Net1(1-201) immer noch zu einer Bindung mit Cdc14 beitragen. Somit ist nicht auszuschließen, dass das *pFAM*-Motiv zumindest einen Beitrag zur Proteininteraktion leisten könnte.

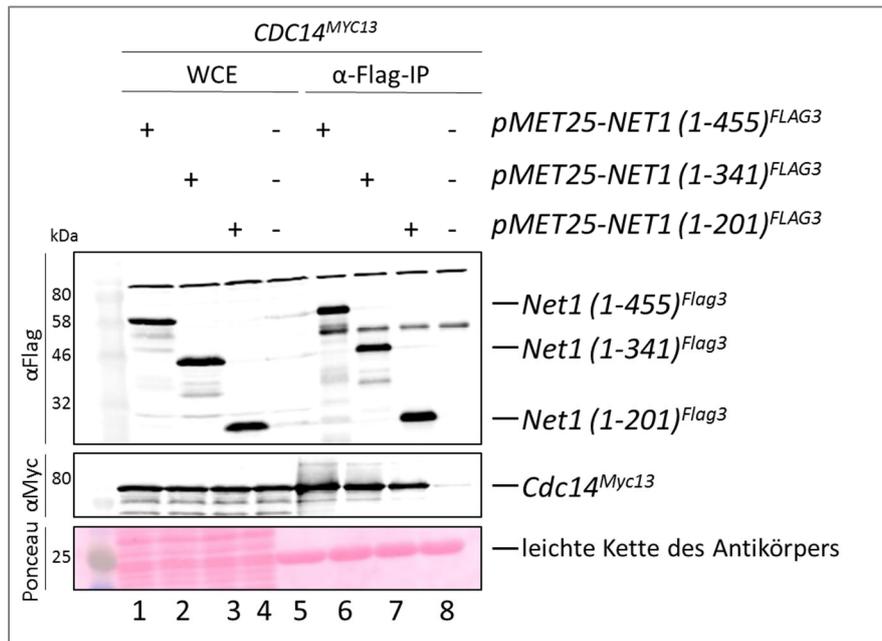


Abb. 16: Interaktion N-terminaler *pMET25-NET1*-Fragmente mit *Cdc14*. Mittels Co-Immunpräzipitation wurde die Proteinwechselwirkung von Net1(1-455), Net1(1-341) und Net1(1-201) mit *Cdc14* analysiert. Dazu wurden die exponentiell wachsenden haploiden Hefestämme W14694 (*ura3::pMET25-NET1(1-455)-FLAG3-tCYC1-URA3 CDC14-MYC13-kanMX6*), W14695 (*ura3::pMET25-NET1(1-341)-FLAG3-tCYC1-URA3 CDC14-MYC13-kanMX6*), W14696 (*ura3::pMET25-NET1(1-201)-FLAG3-tCYC1-URA3 CDC14-MYC13-kanMX6*) in XYD-Vollmedium angezogen und für die ColP aufgearbeitet. Zur Aufreinigung der Proteine wurden sie mittels α -Flag-Beads präzipitiert. Die Proben wurden zusammen mit dem Gesamtlysate (WCE) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Der Net1-Nachweis erfolgte mit einem α -Flag-Antikörper (M2) und der immunologische Nachweis von *Cdc14*-Myc13 mit dem α -Myc-Antikörper A14. Als Ladekontrolle ist die mittels Ponceau gefärbte, leichte Kette des α -Flag-Antikörpers gezeigt. Errechnete Proteingrößen: Net1(1-455)-Flag3: 54 kDa, Net1(1-341)-Flag3: 42 kDa, Net1(1-201)-Flag3: 27 kDa, *Cdc14*-Myc13: 78 kDa.

Die Ergebnisse der ColPs zeigen, inwieweit N-terminale Fragmente von Net1 *Cdc14* binden können. Die NTD von Net1(1-269) schien zunächst hinreichend für eine Proteinwechselwirkung mit *Cdc14* zu sein. Sequenzen in Net1(1-201) trugen ebenso noch zur Bindung an *Cdc14* bei. Net1(202-455) ohne das *pFAM*-Motiv ist für eine robuste Präzipitation von *Cdc14* hinreichend, was auf eine untergeordnete Rolle der *pFAM* zur Proteinbindung hinweist. Bereiche der NTD von Net1 nach AS 270 scheinen ebenfalls nur noch einen äußerst geringen Beitrag zu leisten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das *pFAM*-Motiv einen Beitrag zur Proteininteraktion leisten könnte, jedoch auch Bereiche abseits des Motivs dafür relevant sind.

Interessant war nun, diejenigen Net1-Derivate, die *Cdc14* besonders effizient präzipitierten auf deren Hemmung auf das Zellwachstum zu überprüfen.

4.2.2 Analyse der *Cdc14*-Inhibitionsdomänen in Net1

Durch die Ergebnisse der Bindungsstudien von *Cdc14* mit den N-terminalen Net1-Fragmenten konnte ein Einblick gewonnen werden, welche Regionen für die Bindung der Phosphatase hinreichend sind

(Kapitel 4.2.1). Diese Sequenzen sollten nun auf deren Hemmwirkung des Zellwachstums überprüft werden.

Eine Überexpression des Cdc14-Inhibitors *NET1* ist für die Zellen durch die Inhibition der Phosphatase letal (Visintin *et al.*, 1999). Um die bereits in der CoIP (Abb. 14) untersuchten Fragmente auch auf deren Wirkung auf Cdc14 zu testen, wurden die verwendeten Hefestämme auf Vollmediumsplatten (XY) mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (D, Glukose; R, Raffinose) in einer Verdünnungsreihe aufgebracht. Falls die untersuchten N-terminalen Net1-Fragmente hinreichend zur Inhibition von Cdc14 sind, sollte sich demnach ein vermindertes bzw. kein Zellwachstum zeigen. Als Kontrolle wurde der Cdc14-Ausgangsstamm ohne ein *NET1*-Konstrukt verwendet.

Es bestätigte sich reproduzierbar ein starker inhibitorischer Effekt von Net1(1-455), Net1(1-341) und Net1(202-455) im Wachstumstest (Abb. 17). Eine dagegen etwas verminderte Hemmwirkung auf das Zellwachstum war mit Net1(270-455) und im Kontrast dazu keinerlei Einfluss auf das Wachstum der Zellen war mit Net1(1-201) und Net1(342-455) feststellbar. Für Net1(1-269) konnte nur eine geringe Reduktion des Wachstums gezeigt werden (Abb. 17).

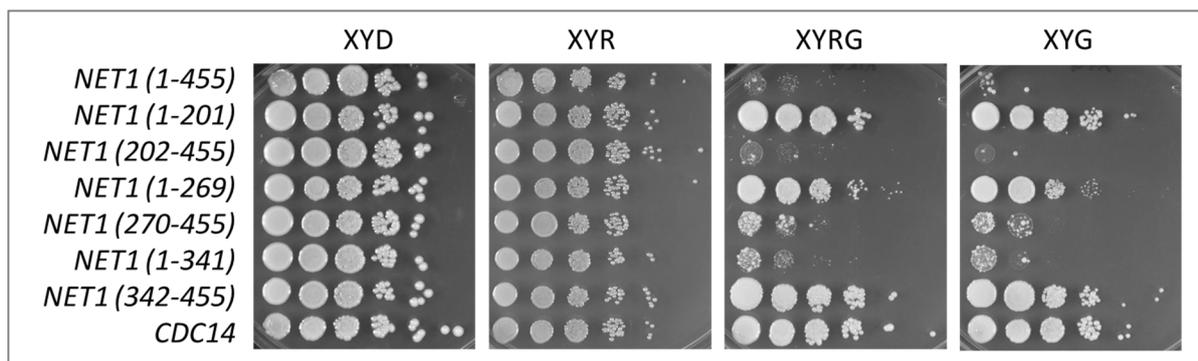


Abb. 17: Inhibition von Cdc14 durch N-terminale Net1-Fragmente. Die N-terminalen Net1 Derivate Net1(1-455), Net1(1-201), Net1(202-455), Net1(1-269), Net1(270-455), Net1(1-341) und Net1(342-455) wurden auf ihre inhibitorische Wirkung auf Cdc14 überprüft. Dazu wurden die Stämme W14486 (*leu2::pGAL1-NET1(1-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-Myc13-kanMX6*), W14487 (*leu2::pGAL1-NET1(1-201)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6*), W14488 (*leu2::pGAL1-NET1(202-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6*), W14489 (*leu2::pGAL1-NET1(1-269)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6*), W14490 (*leu2::pGAL1-NET1(270-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6*), W14491 (*leu2::pGAL1-NET1(1-341)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6*) und als Negativkontrolle der Stamm W11398 (*CDC14-MYC13-kanMX6*) zusammen auf eine XYD-Vollmediumsplatte, auf eine Platte mit XYR, XYRG und XYG in einer Verdünnungsreihe aufgebracht. Nach einer zwei-tägigen Inkubation bei 30°C erfolgte die Dokumentation.

Werden die Ergebnisse zur Analyse der Bindungsdomänen von Net1 mit Cdc14 (Kapitel 4.2.1) mit deren Inhibitionswirkung auf Cdc14 miteinander verglichen, ergeben sich interessante Unterschiede zur möglichen Differenzierung zwischen Binde- und Inhibitionsdomänen in Net1. Das längste untersuchte Fragment von Net1(1-455) zeigte sowohl die stärkste Binde- als auch Inhibitionswirkung, vergleichbar mit Net1(1-341) und Net1(202-455) (Abb. 14, Abb. 16, Abb. 17). Für diese Konstrukte

konnte bereits in der CoIP eine starke Proteinwechselwirkung nachgewiesen werden (Abb. 14, Abb. 16). Für Net1(342-455) konnte weder eine Bindung noch eine Inhibition festgestellt werden. Net1(1-201), welches in beiden CoIPs (Abb. 14, Abb. 16) noch hinreichend für eine schwache Präzipitation von Cdc14 war, zeigte keine Inhibition im Vergleich zur Kontrolle, obwohl das *pFAM*-Motiv enthalten ist. Für die Inhibition scheint diese Sequenz vollkommen verzichtbar zu sein, da sie Net1(202-455) nicht beinhaltet, dieses Derivat jedoch einen äußerst robusten Hemmeffekt auf das Zellwachstum aufwies. Einen prominenten Unterschied veranschaulichten die Fragmente Net1(1-269) und Net1(270-455). Net1(1-269) konnte Cdc14 in der CoIP robust präzipitieren (Abb. 14), im Kontrast dazu war dagegen kaum eine inhibitorische Wirkung nachweisbar (Abb. 17). In der Bindungsanalyse durch die CoIP wurde Cdc14 von Net1(270-455) äußerst geringfügig präzipitiert. Die Beladung von Net1(270-455) in der CoIP war im Vergleich zu den anderen untersuchten Net1-Derivaten zwar ebenfalls geringer, jedoch lag das Signal von präzipitiertem Cdc14 kaum über der Negativkontrolle. Eine größere Proteinmenge von Net1(270-455) hätte vermutlich auch mehr Cdc14 präzipitieren können, jedoch zeigte auch die Reproduktion eine ebenfalls geringe Präzipitationsfähigkeit (Abb. 65). So war es unvorhergesehen, dass Net1(270-455) das Zellwachstum in diesem Maß inhibieren konnte, was auf eine Inhibition von Cdc14 schließen lässt. Net1(270-455) inhibierte somit Cdc14 vergleichbar mit Net1(1-341). Dies veranschaulicht zum einen, dass die Bindungsdomänen und die Inhibitionsdomänen in der NTD von Net1 tatsächlich voneinander abgrenzbar sind. Zum anderen, dass eine Rolle des *pFAM*-Motivs auf die Inhibition von Cdc14 unwahrscheinlich ist. Ein Beitrag zur Bindung über die *pFAM* konnte nicht eindeutig geklärt werden (Kapitel 4.2.1).

Nach der Charakterisierung der Binde- und Inhibitionsdomänen von Cdc14 durch Net1, wurde die variable Domäne von Cdc14 analysiert.

4.3 Analyse der CTD von Cdc14 durch Lokalisationsstudien

Cdc14 kann in eine konservierte katalytische Domäne in der NTD und eine variable Domäne in der CTD unterteilt werden (Kapitel 3.3.1). Im Vergleich zur katalytischen Domäne ist über die Funktion des variablen Teils von Cdc14 wenig bekannt. Studien zeigen, dass sich in der CTD von Cdc14 Domänen zum Kerntransport, eine durch Proteinbindung vermittelte NES (Bembenek *et al.*, 2005) und eine MEN-regulierte NLS (Mohl *et al.*, 2009) befinden. Zusätzlich kommt zwischen der NES und NLS eine *Tandem Repeat* (TR) Sequenz (TR1 und TR2) von bisher unbekannter Funktion vor (Taylor *et al.*, 1997).

Um die Funktion der CTD von Cdc14 weiter zu klären, wurden sukzessive Verkürzungen der CTD von Cdc14 erstellt und PCR-vermittelt mit GFP fusioniert (nach Longtine *et al.*, 1998). Dazu wurde der diploide Wildtyp-Hefestamm (K842) mit den GFP-fusionierten Amplifikaten von Cdc14(1-551),

Cdc14(1-506), Cdc14(1-449), Cdc14(1-437), Cdc14(1-434), Cdc14(1-431), Cdc14(1-423), Cdc14(1-374) und Cdc14(1-340) transformiert (vgl. Abb. 18). Durch die homologe Rekombination werden diese GFP-Versionen endogen im Hefegenom exprimiert. Anschließend wurden Tetradenanalysen durchgeführt auf die später explizit Bezug genommen wird.

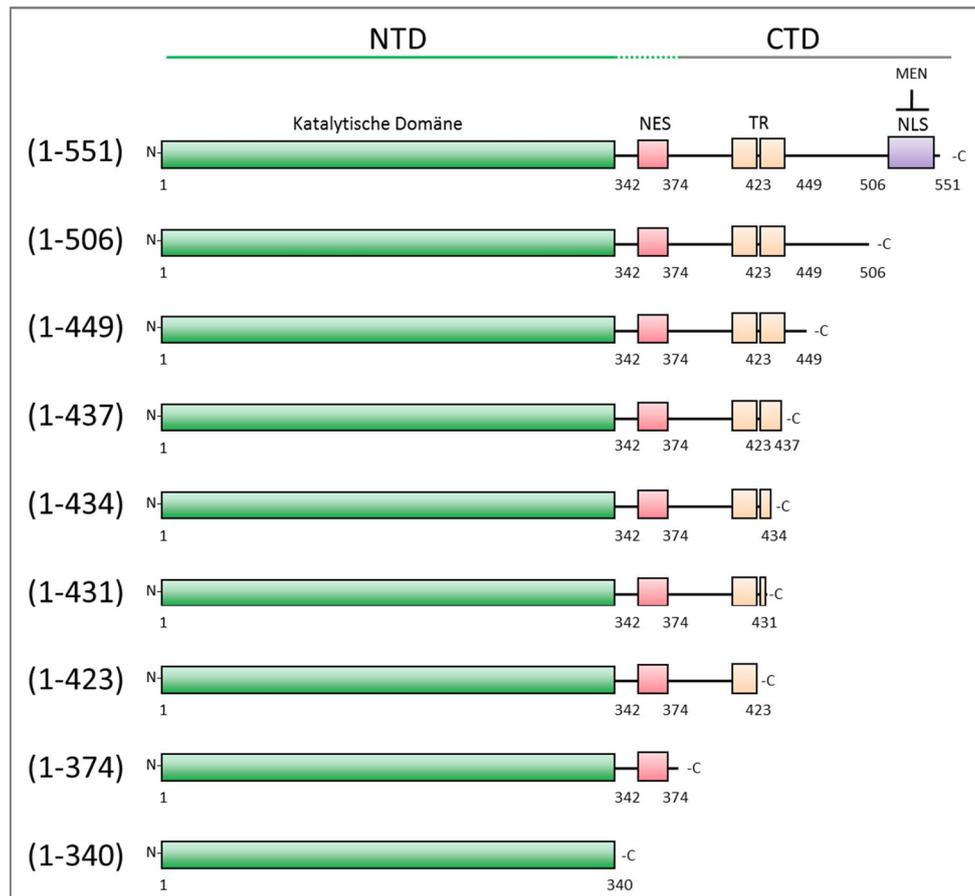


Abb. 18: Schematische Darstellung der C-terminalen Verkürzungen von Cdc14. Cdc14 in voller Länge (1-551) beinhaltet eine N-terminale katalytische Domäne (1-374, grün dargestellt), eine Kernexportsequenz (NES, ca. 353-367, rot dargestellt), eine *tandem repeat* (TR) Region (400-443, orange dargestellt) sowie eine MEN-abhängige Kernlokalisationssequenz (NLS, 517-551, lila dargestellt). Die zur Analyse der CTD GFP-markierten Konstrukte Cdc14(1-506), Cdc14(1-449), Cdc14(1-437), Cdc14(1-434), Cdc14(1-431), Cdc14(1-423), Cdc14(1-374) und Cdc14(1-340) wurden der Größe nach aufgelistet.

Die Konstrukte wurden so gewählt, dass diese C-terminalen Derivate von Cdc14 die CTD sukzessiv verkürzen und so die Regionen unbekannter Funktion weiter unterteilen, um diese analysieren zu können. In Cdc14(1-506) sind die katalytische Domäne, die NES, die TR-Sequenz, nicht mehr aber die NLS enthalten. Cdc14(1-449) schließt ebenfalls noch die selben Bereiche mit ein. Die Region, in der sich die NLS befindet, ist jedoch weiträumiger deletiert. Die folgenden Derivate verkürzen die TR-Sequenz weiter, die katalytische Domäne und die NES sind dabei intakt. Cdc14(1-437) verkürzt die TR2-Sequenz in C-terminaler Richtung um sechs AS, Cdc14(1-434) und Cdc14(1-431) unterteilen die TR2. Cdc14(1-423) schließt die TR2 vollständig aus. Cdc14(1-374) wird in der Literatur als katalytische

Domäne von Cdc14 bezeichnet (Taylor *et al.*, 1997, Traverso *et al.*, 2001), obwohl es streng genommen noch die NES mit einschließt. Cdc14(1-340) besteht ausschließlich aus der hochkonservierten katalytischen Domäne, die alle Cdc14 Phosphatasen miteinander teilen (Mocciaro und Schiebel, 2010)(zusammengefasst: Abb. 18).

Um sicherzustellen, dass die C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 in allen heterozygot diploiden Hefestämmen exprimiert wurden, wurden sie im Western Blot überprüft (Abb. 19). Der Nachweis erfolgte über den GFP-Anteil.

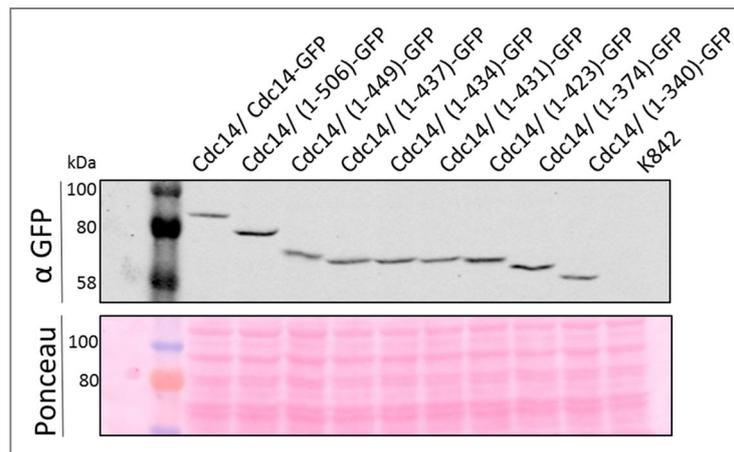


Abb. 19: Western Blot-Analyse von C-terminal verkürztem Cdc14. C-terminal verkürzte und zugleich mit GFP-fusionierte Cdc14-Derivate (nach Longtine *et al.*, 1998) wurden im Western Blot auf die Proteinexpression überprüft. Dazu wurden Proteinlysate von heterozygot diploiden Hefestämmen W12990 (*CDC14/CDC14-GFP-HIS3MX6*), W13436 (*CDC14/CDC14(1-506)-GFP-HIS3MX6*), W13433 (*Cdc14/Cdc14(1-449)-GFP-HIS3MX6*), W14088 (*CDC14/CDC14(1-437)-GFP-HIS3MX6*), W14092 (*CDC14/CDC14(1-434)-GFP-HIS3MX6*), W14091 (*CDC14/CDC14(1-431)-GFP-HIS3MX6*), W13543 (*CDC14/CDC14(1-423)-GFP-HIS3MX6*), W12989 (*CDC14/CDC14(1-374)-GFP-HIS3MX6*), W14093 (*CDC14/CDC14(1-340)-GFP-HIS3MX6*) gemacht und mit dem diploiden Hefestamm K842 als Negativkontrolle zusammen auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mittels α -GFP-Antikörper. Als Ladekontrolle ist die Ponceau-gefärbte Membran gezeigt. Errechnete Proteingrößen: Cdc14-GFP: 89 kDa, Cdc14(1-506)-GFP: 84 kDa, Cdc14(1-449)-GFP: 78 kDa, Cdc14(1-437)-GFP: 76 kDa, Cdc14(1-434)-GFP: 76 kDa, Cdc14(1-431)-GFP: 76 kDa, Cdc14(1-423)-GFP: 75 kDa, Cdc14(1-374)-GFP: 70 kDa, Cdc14(1-340)-GFP: 66 kDa.

4.3.1 Lokalisation C-terminal verkürzter Cdc14-Derivate

Cdc14 wird in der Anaphase aufgrund der zunehmend verringerten Bindung von Net1 freigesetzt. In der späten Anaphase wird die NLS (AS 517-551) in der CTD von Cdc14 durch MEN-Komponenten moduliert. Dies geschieht nach Aktivierung des Kinasekomplexes Dbf2-Mob1, welcher mehrere basische AS in der NLS von Cdc14 phosphoryliert und damit die NLS-Wirkung vermindert (Mohl *et al.*, 2009). Dbf2-Mob1 lokalisiert während der Telophase im Nukleus und co-lokalisiert zusammen mit Cdc14 an den Kinetochoren (Mohl *et al.*, 2009) und den SPKs (Bardin und Amon, 2001).

Um zunächst die Bedeutung der MEN-regulierten NLS im Vergleich zur Publikation von Mohl *et al.* (2009) zu untersuchen, wurde die Lokalisation von Cdc14(1-506)-GFP in asynchronen diploiden und haploiden Hefezellen in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus mittels Fluoreszenzmikroskopie

analysiert (Abb. 20). Die Zellen co-exprimierten zusätzlich ein Konstrukt zur Visualisierung des Nukleolus, um die Lokalisation von Cdc14(1-506) in diesem Zellkompartiment genau erfassen zu können.

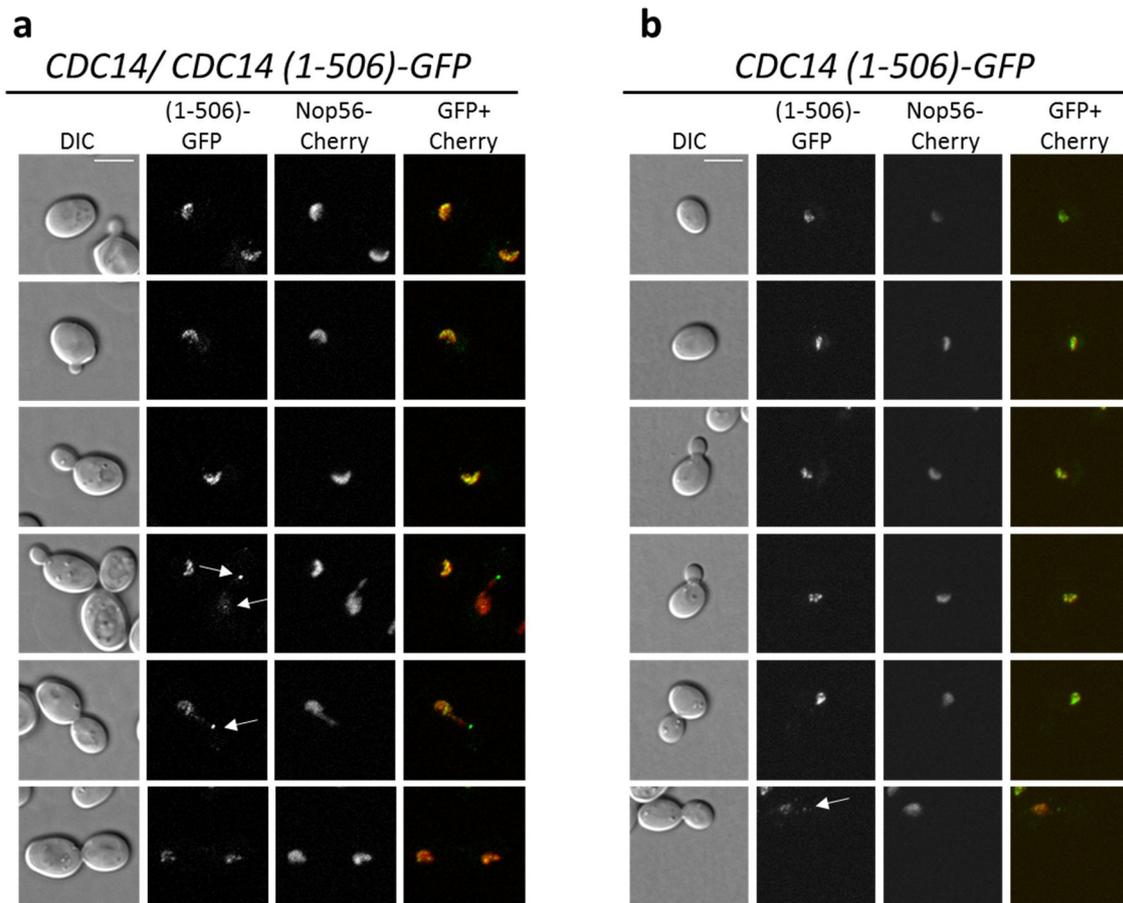


Abb. 20: Einfluss der C-terminalen NLS-Sequenz auf die Lokalisation in diploiden und haploiden Hefezellen. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von asynchronen diploiden und haploiden Zellen mit einer endogenen C-terminalen GFP-Fusion von Cdc14 (1-506). Das Lokalisationsmuster des diploiden Hefestammes **a**, W13575 (*CDC14/ CDC14(1-506)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*) und des haploiden Stammes **b**, W13576 (*CDC14(1-506)-GFP-HIS3MX6 NOP56-3mCherry-URA3*) in verschiedenen Stadien im Zellzyklus sind exemplarisch gezeigt. Ersten Spalte: Zellmorphologie im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: Lokalisation von Cdc14(1-506)-GFP, dritte Spalte: zur Co-Lokalisation das fluoreszenzproteinmarkierte Nukleolusprotein Nop56, vierte Spalte: Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsstabsbalken ist 5 μm lang.

Cdc14(1-506) lokalisierte in diploiden Hefezellen wie Wildtyp-Cdc14 (Abb. 20 a, vgl. Abb. 8 a). Während der Interphase zeigte Cdc14(1-506) eine Co-Lokalisation mit dem nukleolären Marker in einer charakteristischen halbmondförmigen Struktur, was auf die Lokalisation im Nukleolus schließen ließ. In der Anaphase wurde Cdc14(1-506) vom Nukleolus in den Zellkern und das Zytoplasma freigesetzt, da es mindestens einmal als punktförmige Struktur außerhalb des Nukleolus (Abb. 20 a, vierte und fünfte Zeile, Abb. 20 b, sechste Zeile) festzustellen war. Dieses Fluoreszenzsignal von Cdc14(1-506) war innerhalb der Tochterzelle prominenter zu erkennen (Abb. 20 a, vierte Zeile), was auf die Wildtyp-Lokalisation von Cdc14 an den SPKs in dieser Zellzyklusphase schließen ließ (Abb. 8 a,

sechste Zeile, Abb. 8 b, fünfte Zeile). Diese Beobachtung in diploiden Hefezellen war nicht überraschend, da durch Taylor *et al.* (1997) bereits eine Selbstinteraktion von Cdc14 beschrieben wurde und dies auch durch Versuche der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt wurden (Diplomarbeit Andreas Pickl, 2009). Als mögliche Erklärung wäre es denkbar, dass Cdc14(1-506), also in Abwesenheit der NLS in der CTD, mit dem Wildtyp-Cdc14-Protein des diploiden Hefestammes interagiert und dies somit zur Wildtyp-Lokalisation von Cdc14(1-506) beitrug. Unerwartet war jedoch die Visualisierung von Cdc14(1-506) in haploiden Hefezellen. Auch ohne Vorhandensein der C-terminalen NLS lokalisierte Cdc14(1-506) während der Interphase in Abwesenheit des Wildtyp-Proteins wie Cdc14 voller Länge (Abb. 20 b, vgl. Abb. 8 b). Dies konnte mit Hilfe des nukleolären Co-Markers verdeutlicht werden (Abb. 20 b, erste bis fünfte Zeile). Mit beginnender Anaphase, die durch die Fluoreszenzintensitätsabnahme von Cdc14(1-506) im Nukleolus mit gleichzeitigem punktförmigem Fluoreszenzsignal erkennbar war (Abb. 20 b, sechste Zeile), wurde Cdc14(1-506) aus dem Nukleolus freigesetzt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Kerntransport, insbesondere der Kernexport von Cdc14, unabhängig von der MEN-regulierten NLS in der CTD zu sein scheint. Möglicherweise befinden sich in Cdc14 weitere Kernlokalisationssequenzen, die hinreichend für die Lokalisation im Zellkern sind. In der Tat kann mit einem informatischen Programm, welches auf der Aktivität von Importin-abhängigen Kernlokalisationssequenzen beruht, eine bipartite NLS mit einer Wertigkeit von 4,4 (Skala 1-10) voraus gesagt werden (Kosugi *et al.*, 2009). Diese errechnete NLS schließt die AS von Cdc14 344 bis 374 ein. Interessanterweise überlappt dieser Bereich die von Bembek *et al.* (2005) postulierte NES-Domäne (AS ca. 353-367).

Zur weiteren Analyse der CTD wurden Mikroskop-Aufnahmen mit Verkürzungen der CTD von Cdc14 in zunächst heterozygot diploiden Hefezellen durchgeführt (Abb. 21). Die C-terminal verkürzten Derivate Cdc14(1-449), Cdc14(1-437), Cdc14(1-434), Cdc14(1-431), Cdc14(1-423), Cdc14(1-374) und Cdc14(1-340), ebenso im Vergleich zu Cdc14(1-506), zeigten in diploiden Zellen während der Interphase die für die Lokalisation im Nukleolus typische halbmondförmige Struktur (Abb. 21, vgl. mit Abb. 20 a). Dies war in Zellen ohne Knospe und in Zellen mit mittlerer Knospe erkennbar (Abb. 21, a-g). In der Anaphase änderte sich das nukleoläre Lokalisationsmuster der CTD-Verkürzungen von Cdc14 aufgrund deren Freisetzung.

Die Lokalisation nach der Freisetzung schien in den diploiden Hefezellen ebenfalls unbeeinträchtigt zu sein. Von Cdc14(1-374) in dem die katalytische Domäne und die NES enthalten sind, bis hin zu Cdc14(1-449), in welchem zusätzlich noch die vollständige TR-Sequenz enthalten ist, waren diese Derivate in den Zellen als punktförmige Strukturen außerhalb des Zellkerns der Mutterzelle visualisierbar (Abb. 21 a, sechste Spalte, f, dritte, vierte und sechste Spalte). Auffällig war jedoch, dass Cdc14(1-340), obwohl die Proteinexpression im Western Blot nachgewiesen werden konnte (Abb. 19), nur diffus zu erkennen war. Die Ursache dafür konnte bisher nicht geklärt werden.

Die untersuchten Verkürzungen der CTD von Cdc14 in diploiden Hefezellen zeigten eine mit Wildtyp-Cdc14 vergleichbar typische Lokalisation. Dies könnte auf eine Selbstinteraktion der N-terminalen Fragmente bis einschließlich Aminosäure 374 mit dem Wildtyp-Protein von Cdc14 hinweisen. Vermutlich ist die Selbstinteraktion mit Cdc14(1-340) nicht mehr ausreichend möglich, was eine Erklärung für das äußerst diffuse Fluoreszenzsignal (Abb. 21 g) darstellen könnte.

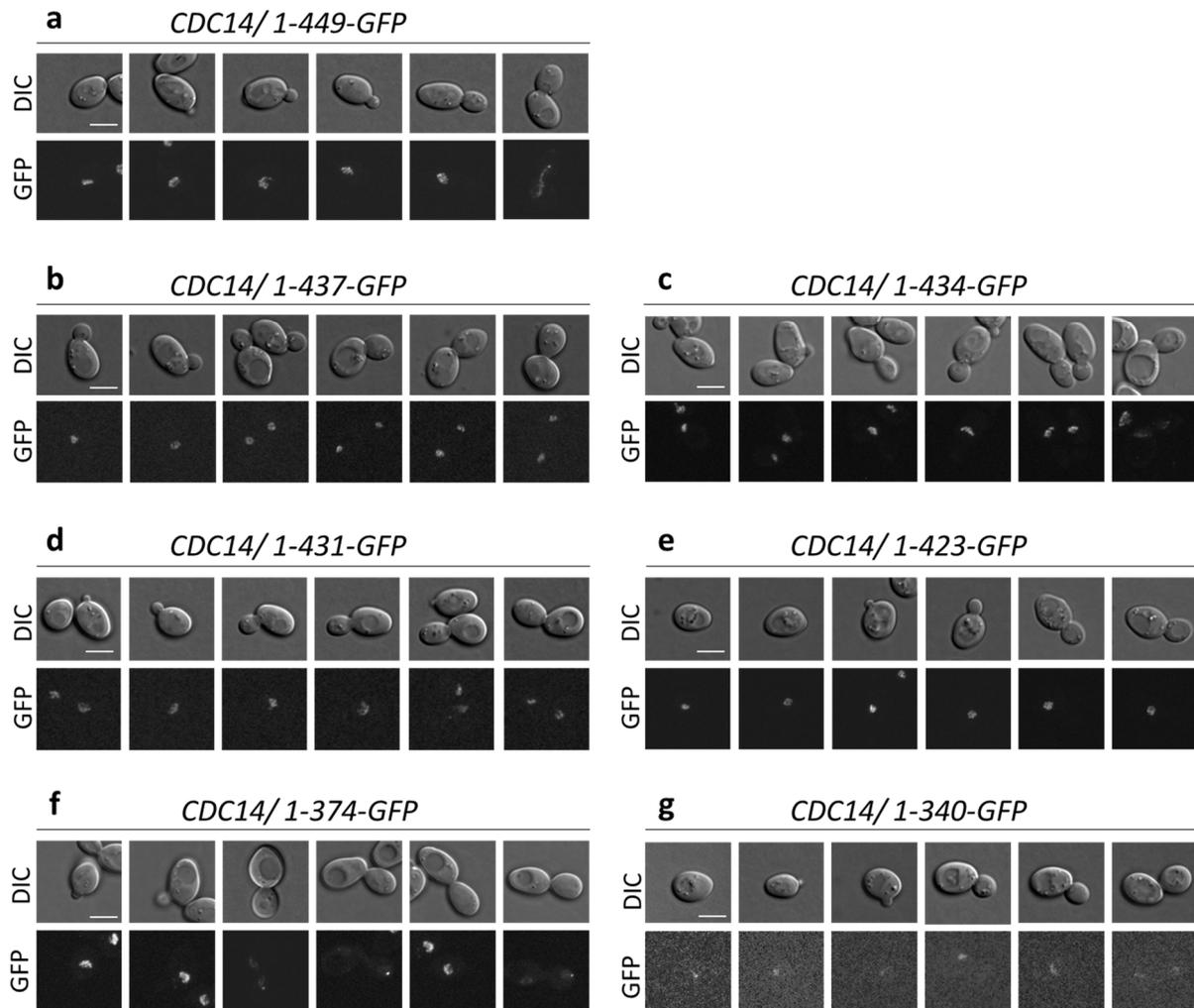


Abb. 21: Lokalisation der C-terminal verkürzten Cdc14-Derivate in diploiden Hefezellen. Dargestellt sind asynchrone diploide Zellen mit unterschiedlichen Verkürzungen der CTD von Cdc14. Cdc14 wurde durch C-terminale GFP-Fusionen mittels Fluoreszenzmikroskopie in verschiedenen Stadien des Zellzyklus visualisiert. **a**, W13433 (*Cdc14/ Cdc14(1-449)-GFP-HIS3MX6*), **b**, W14088 (*CDC14/ CDC14(1-437)-GFP-HIS3MX6*), **c**, W14092 (*CDC14/ CDC14(1-434)-GFP-HIS3MX6*), **d**, W14091 (*CDC14/ CDC14(1-431)-GFP-HIS3MX6*), **e**, W13543 (*CDC14/ CDC14(1-423)-GFP-HIS3MX6*), **f**, W12989 (*CDC14/ CDC14(1-374)-GFP-HIS3MX6*), **g**, W14093 (*CDC14/ CDC14(1-340)-GFP-HIS3MX6*). Erste Zeile: Jeweils die Zellmorphologie im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Zeile: Visualisierung der entsprechenden C-terminalen *CDC14-GFP*-Fusion. Maßstab= 5µm.

Um die nun vermutete Selbstinteraktion der CTD-Verkürzungen von Cdc14 mit dem Wildtyp-Allel auszuschließen, wurden von den diploiden Hefestämmen haploide Nachkommen untersucht.

Zur näheren Analyse der mit GFP-fusionierten Cdc14-Konstrukte, wurde zur Co-Lokalisation der Kernmarker Cherry-NLS durch Transformation (Plasmid: pWS2954) des Hefestammes bzw. durch Kreuzung (Hefestamm: W8458) und anschließender Tetradenanalyse eingebracht. Die folgenden

Cdc14-Derivate beziehen sich auf die Charakterisierung der TR2-Sequenz unter Ausschluss der NLS in der CTD. Für diese Lokalisationsstudien wurden Cdc14(1-449)-GFP, Cdc14(1-437)-GFP und Cdc14(1-434) in haploiden Hefezellen in verschiedenen Zellzyklusstadien analysiert. Cdc14(1-449)-GFP (Abb. 22 a) und Cdc14(1-437)-GFP (Abb. 22 b) lokalisierten wie bereits für Cdc14(1-506) (Abb. 20 b) beschrieben, vergleichbar mit Wildtyp-Cdc14 (Abb. 8 a).

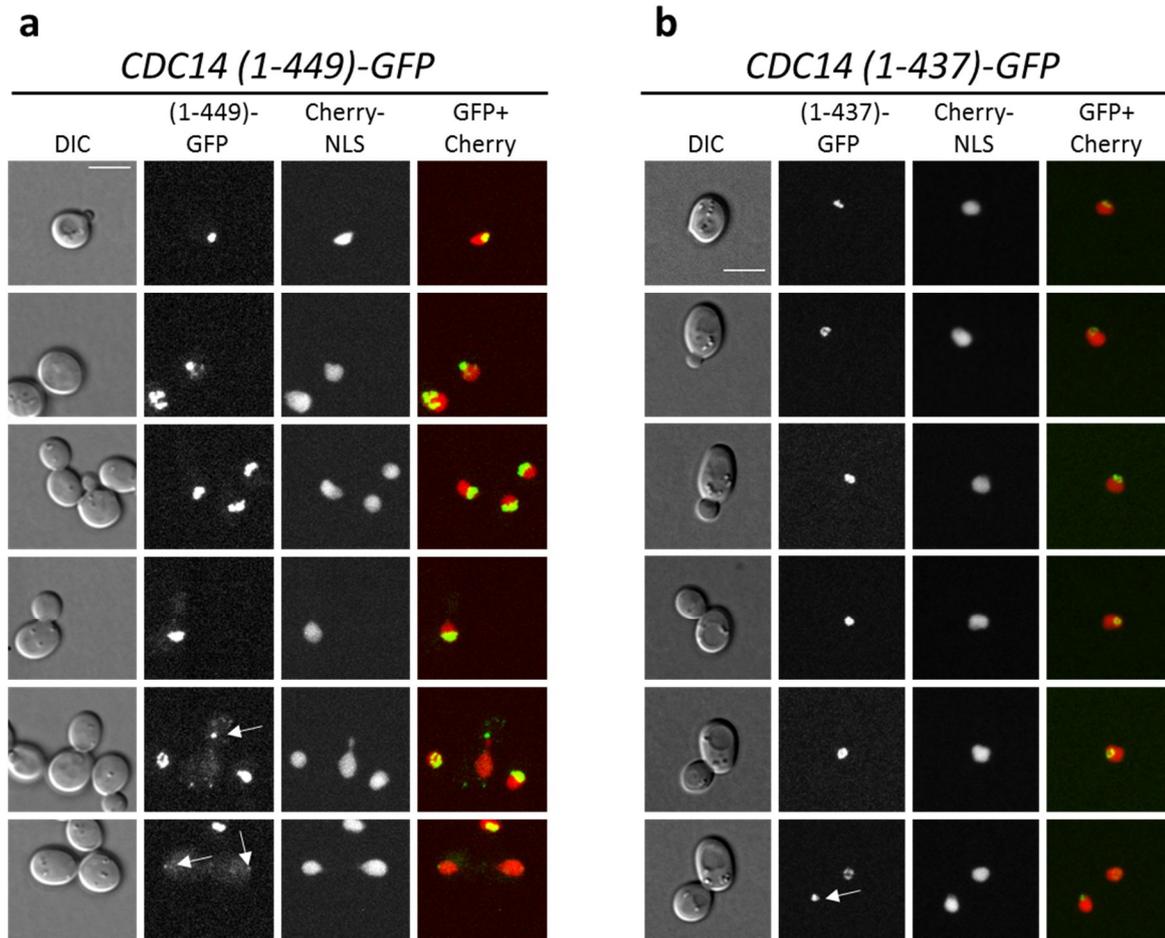


Abb. 22: Lokalisation von Cdc14(1-449) und Cdc14(1-437) in unterschiedlichen Zellzyklusstadien. Gezeigt sind mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführte Aufnahmen asynchroner, haploider Hefezellen von Cdc14(1-449) und Cdc14(1-437). In **a**, der Stamm W13446 (*CDC14(1-449)-GFP-HIS3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) und in **b**, W14095 (*CDC14(1-437)-GFP-HIS3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*). Erste Spalte: Zellen im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: Lokalisation der entsprechenden C-terminalen Verkürzung von Cdc14 fusioniert an GFP, dritte Spalte: zur Visualisierung des Zellkerns Cherry-NLS vierte Spalte: Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 5 μ m.

Bis zur Interphase waren Cdc14(1-449) und Cdc14(1-437) innerhalb des Zellkerns als halbmondförmige Struktur zu erkennen. In der Anaphase, die durch die Kernteilung sichtbar gemacht werden konnte, befanden sich diese C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 nicht mehr im Nukleolus, sondern waren auch im Zellkern (Abb. 22 a, sechste Zeile) und als punktförmige Struktur (Abb. 22 a, fünfte und sechste Zeile, b, sechste Zeile) festzustellen. Zur präziseren Untersuchung von Cdc14(1-

434)-GFP wurde ein Film mit Intervallen von fünf Minuten aufgenommen und die Lokalisation von Cdc14(1-434) über den Zellzyklus verfolgt (Abb. 23).

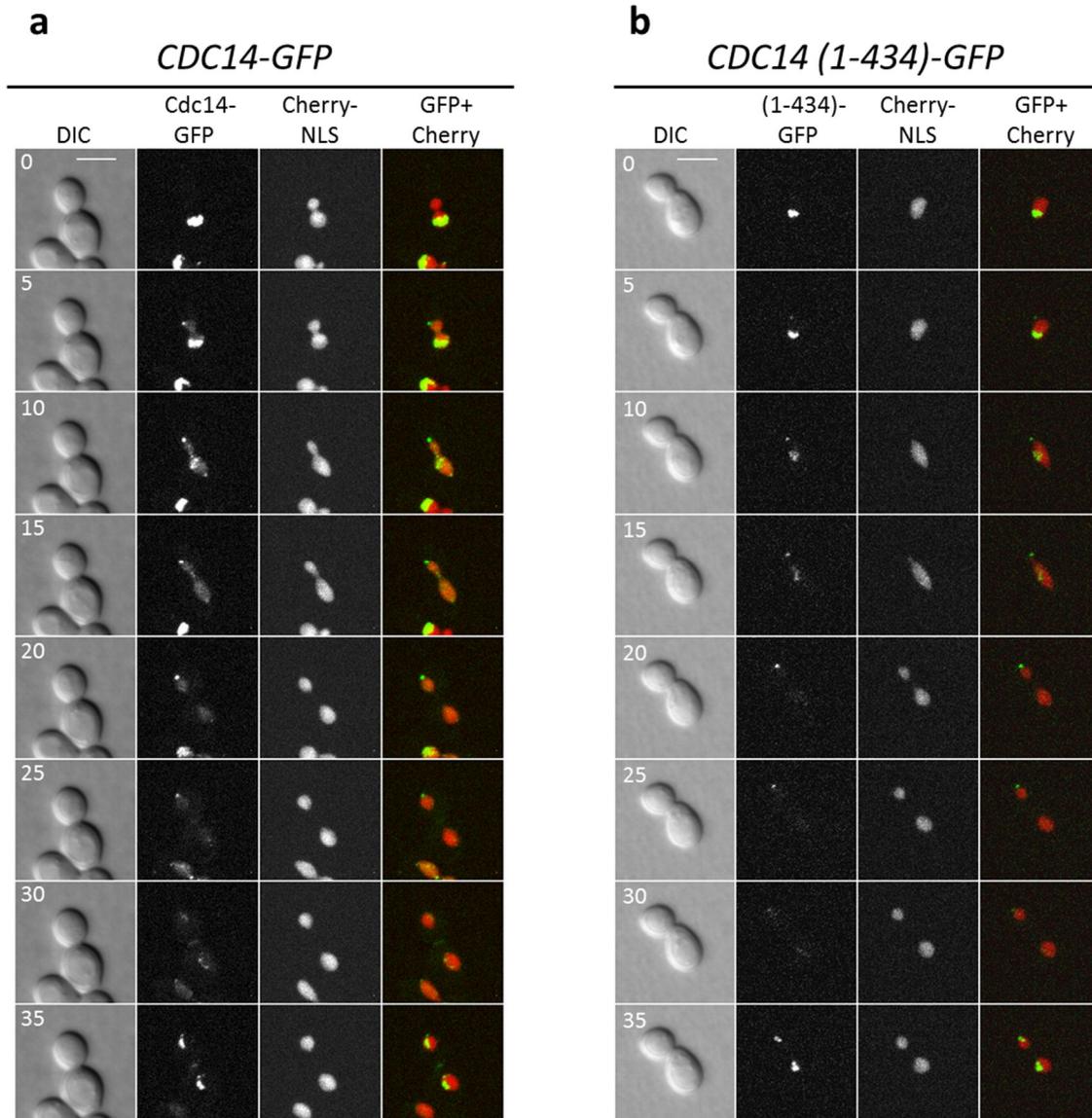


Abb. 23: Lokalisation von Cdc14(1-434)-GFP im Zellzyklus. In fluoreszenzmikroskopischen Zeitrafferaufnahmen wurde das Lokalisationsmuster von Cdc14(1-434)-GFP mit Cdc14-GFP als Kontrolle im Zellzyklus analysiert. Dargestellt sind zwei Filme von **a**, Cdc14-GFP (W13423, *CDC14-GFP-HIS3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) als Kontrolle mit **b**, Cdc14(1-434) (W14138, *CDC14-(1-434)-GFP-HIS3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*). Die Filme wurden in einem Intervall von fünf Minuten aufgenommen. Als Zeitpunkt t=0 wurde die beginnende Kernteilung, erkennbar durch den Co-Lokalisationsmarker zur Visualisierung des Zellkerns Cherry-NLS, gewählt. Die Filme enden wenn Cdc14-GFP bzw. Cdc14(1-434) nach der Anaphase wieder im Nukleolus lokalisiert sind. Erste Spalte: Zellen im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: Cdc14-GFP bzw. Cdc14(1-434)-GFP, dritte Spalte: Cherry-NLS zur Visualisierung des Zellkerns zur Co-Lokalisation, vierte Spalte: Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle. Die Länge des Maßstabalkens entspricht 5 μ m.

Vergleichend dazu wurde eine Zeitrafferaufnahme von Wildtyp-Cdc14 als Kontrolle erstellt. Cdc14(1-434) befand sich wie das unverkürzte Protein während der Interphase im Nukleolus (Abb. 23 a, t= 0, b, t= 0). Zu Beginn der Anaphase, visualisiert anhand der Kerntrennung, war Cdc14(1-434)

noch im Nukleolus sichtbar, aber zusätzlich punktförmig am Rand des Zellkerns der Tochterzelle (Abb. 23 b, t= 5). Frühere Beobachtungen mit Cdc14 voller Länge zeigten durch die Co-Visualisierung mit dem Spindelpolprotein Spc42, dass Cdc14 in diesem Zellzyklusstadium prominent am SPK der Tochterzelle zu sehen ist (Abb. 11). In der späten Anaphase, erkennbar durch die bereits getrennten Zellkerne und einer noch bestehenden Nukleoplasmabrücke zwischen den Kernen, lokalisierte Cdc14(1-434) prominent am SPK der Tochterzelle (Abb. 23 b, t= 20), um nach kurzer Zeit wieder im Nukleolus zu lokalisieren (Abb. 23 b, t= 35).

Neben Cdc14(1-506), Cdc14(1-449) und Cdc14(1-437) scheint auch Cdc14(1-434)-GFP verglichen mit Wildtyp-Cdc14 die typische Lokalisation zu zeigen. Eine Deletion der CTD bis zur AS 434 beeinflusst somit weder die Lokalisation dieser Proteine im Zellzyklus, noch die Dauer des Zellzyklus und damit dessen Funktion. Die NLS in der CTD von Cdc14 scheint zudem redundant zu sein.

Weitere C-terminale Analysen von Cdc14 verkürzt bis in die TR2-Sequenz (AS 434) waren in haploiden Hefezellen nicht möglich, da diese letal waren. Nach der Sporulation eines diploiden Hefestammes werden durch die Tetradenanalyse vier haploide Nachkommen (Sporen) generiert. Wird in einem diploiden Hefestamm eines der beiden Allele eines Gen verändert, so kommt es nach der meiotischen Teilung zu einer 2:2-Verteilung dieses Allels in den Sporen. Jeweils zwei Sporen enthalten das entsprechende Gen des Wildtyp-Allels, die beiden anderen Sporen das veränderte Gen. Hier entspricht das mutierte Gen den verkürzten CTD-Fragmenten von Cdc14 fusioniert an GFP. Wenn die eingeführte Manipulation des Gens letal ist, wachsen ausschließlich die Wildtyp-Sporen an. Sofern der Eingriff die Lebensfähigkeit nicht beeinträchtigt, wachsen alle vier Sporen an. Mittels Tetradenanalyse konnten haploide Nachkommen von Cdc14 verkürzt bis zur TR-Sequenz erzeugt werden. Für Cdc14(1-551)-GFP, Cdc14(1-506)-GFP, Cdc14(1-449)-GFP, Cdc14(1-437)-GFP und Cdc14(1-434)-GFP war daher keine Beeinträchtigung der biologischen Funktion feststellbar. Haploide Zellen mit den Derivaten Cdc14(1-431), Cdc14(1-423)-GFP, Cdc14(1-374) und Cdc14(1-340)-GFP waren dagegen letal (Abb. 24 a-d, vgl. e, f), da nur zwei der vier Sporen anwuchsen. Durch die genetische Überprüfung mittels Markertest wurde bestätigt, dass keine Spore mit der entsprechenden CTD-Verkürzung anwuchs. Auf die Tetradenanalysen von Cdc14(1-434), Cdc14(1-431) und Cdc14(1-374) wird in den Kapiteln 4.4 (Abb. 28) und 4.4.1 (Abb. 31) genauer eingegangen. Diese sind deshalb in Abb. 24 nicht aufgeführt.

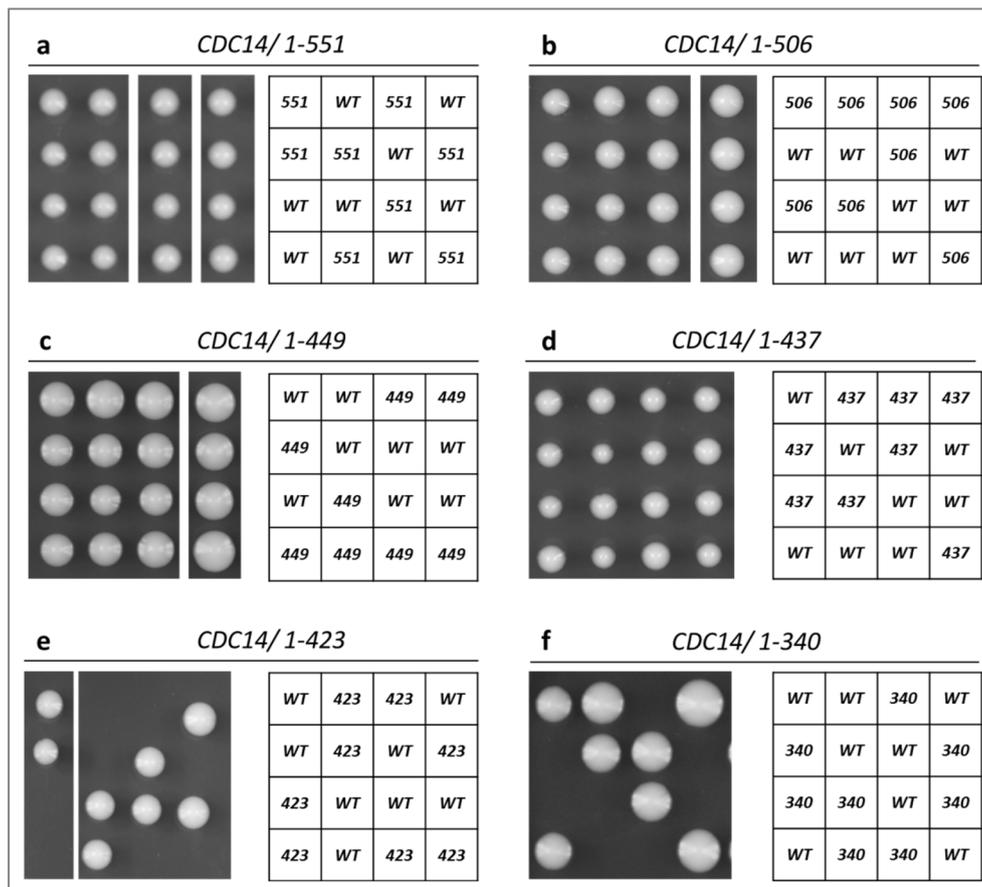


Abb. 24: Tetradenanalyse der C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 mit GFP-Fusionen. Zur Gewinnung haploider Nachkommen zur mikroskopischen Analyse der C-terminalen GFP-Fusionen von Cdc14 wurden Tetradenanalysen der diploiden Hefestämme von **a**, W12990 (*CDC14/ CDC14-GFP-HIS3MX6*), **b**, W13436 (*CDC14/ CDC14(1-506)-GFP-HIS3MX6*), **c**, W13433 (*CDC14/ CDC14(1-449)-GFP-HIS3MX6*), **d**, W14088 (*CDC14/ CDC14(1-437)-GFP-HIS3MX6*), **e**, W13543 (*CDC14/ CDC14(1-423)-GFP-HIS3MX6*) und **f**, W14093 (*CDC14/ CDC14(1-340)-GFP-HIS3MX6*) durchgeführt.

Zum Ausschluss möglicher Defekte des Zellwachstums wurde ein Wachstumstest von allen haploid lebensfähigen Hefezellen mit den C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 durchgeführt. Dazu wurden diese Stämme in einer Verdünnungsreihe zusammen mit einer Wildtyp-Kontrolle (K699) auf eine Vollmediumsplatte aufgebracht und über zwei Tage inkubiert.

Der Vergleich mit der Kontrolle zeigte in allen untersuchten Stämmen mit C-terminal verkürztem Cdc14 keinerlei Wachstumsdefekt. (Cdc14 voller Länge, Cdc14(1-506), Cdc14(1-449), Cdc14(1-437) und einschließlich Cdc14(1-434), Abb. 25).

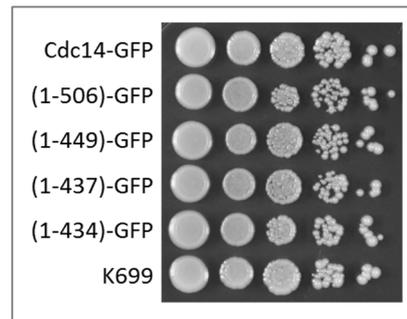


Abb. 25: Wachstumstest der haploid lebensfähigen C-terminalen Verkürzungen von Cdc14. In einer Verdünnungsreihe wurden die C-terminal verkürzten Konstrukte von Cdc14 auf ihr Wachstum überprüft. Dazu wurden die haploiden Hefestämme W13173 (*CDC14-GFP-HIS3MX6*) als Referenz, W13437 (*CDC14(1-506)-GFP-HIS3MX6*), W13434 (*CDC14(1-449)-GFP-HIS3MX6*), W14090 (*CDC14(1-437)-GFP-HIS3MX6*), W14137 (*CDC14(1-434)-GFP-HIS3MX6*) mit jeweils C-terminaler GFP-Fusion in einer Verdünnungsreihe auf eine XYD-Vollmediumsplatte aufgebracht. Der haploide Wildtyp-Hefestamm K699 diente als Referenz. Nach zwei Tagen wurde die Platte dokumentiert.

4.3.2 Regulation des Kerntransports über die CTD

Zur weiteren Funktionsanalyse der CTD wurde ein C-terminales Cdc14-Fragment, in dem die katalytische Domäne nicht enthalten war, untersucht. Dazu wurde *CDC14(342-551)* N-terminal mit GFP fusioniert und durch den konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimiert. Dieses Konstrukt wurde am *URA3*-Lokus in das Genom integriert, sodass noch eine intakte Wildtyp-Kopie von Cdc14 in diesem haploiden Hefestamm vorlag.

Zur Analyse von Cdc14(342-551) mittels Mikroskopie wurden Zeitrafferaufnahmen in Intervallen von jeweils zwei Minuten aufgenommen. Zur Co-Lokalisation exprimierten die Zellen Cherry-NLS zur Visualisierung des Zellkerns (Arnold *et al.*, 2015).

Bis zum Beginn der Anaphase war das Fluoreszenzsignal von GFP-Cdc14(342-551) mit dem Kernmarker im Zellkern überlagert (Abb. 26, $t = 0$). In der späten Anaphase, die durch die Nukleoplasmabrücke zwischen den Zellkernen mittels Cherry-NLS visualisiert wurde, wurde Cdc14(342-551) in das Zytoplasma freigesetzt (Abb. 26, $t = 16$ bis $t = 24$) und relokalierte anschließend wieder abrupt im Zellkern (Abb. 26, $t = 26$). Die CTD von Cdc14 mit N-terminaler GFP-Fusion unter der Kontrolle des konstitutiven *TEF2*-Promotors war im Vergleich zu Wildtyp-Cdc14 während der Interphase nicht im Nukleolus (Abb. 8 b), sondern stets im Zellkern lokalisiert.

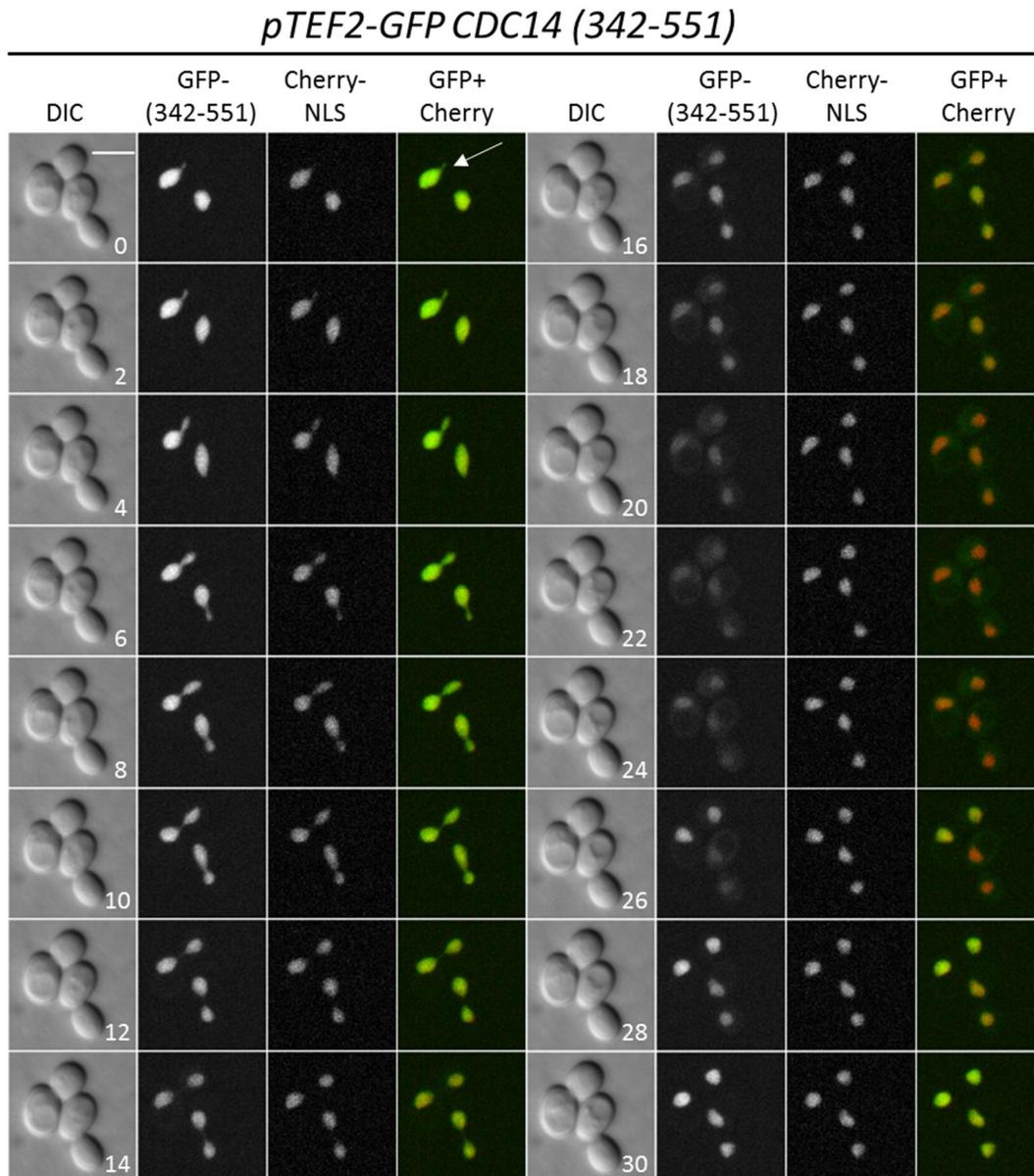


Abb. 26: Bedeutung der CTD von Cdc14 für den Kernttransport. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von GFP-Cdc14(342-551) in Zeitrafferaufnahmen im Zellzyklus verfolgt. Dazu wurden Zellen einer exponentiell gewachsenen Kultur von W13544 (*ura3::pTEF2-GFP CDC14(342-551)-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) für Mikroskoptaufnahmen verwendet. Der Film wurde mit einem Intervall von zwei Minuten aufgenommen. Als Zeitpunkt t=0 wurde die beginnende Kernteilung, die durch den roten Kernmarker Cherry-NLS visualisiert wurde, als Beginn der Anaphase festgelegt. Der Film endet mit der Relokalisation von GFP-Cdc14(342-551) im Zellkern. Im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC) ist die Zellmorphologie dargestellt (erste Spalte), zweite Spalte: die Fluoreszenzaufnahmen von GFP-Cdc14(342-551), dritte Spalte: die Fluoreszenzaufnahmen von Cherry-NLS zur Visualisierung des Zellkerns, vierte Spalte: Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken ist 5 μm lang.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die CTD hinreichend für den zellzyklus-regulierten Kernttransport von Cdc14 ist. Die Funktion der variablen Domäne von Cdc14 in *S. cerevisiae* passt somit mit den bekannten Lokalisationsdomänen NES und NLS überein. Bis zur Anaphase ist Cdc14 jedoch durch Net1 inhibiert und dadurch im Nukleolus verankert (Kapitel 4.1,

Abb. 10). Dies veranschaulicht, dass NTD und CTD zusammen einen Beitrag zur korrekten Lokalisation von Cdc14 im Zellzyklus leisten.

Um den Einfluss der MEN-regulierten NLS in dem vorliegenden C-terminalen Fragment zu klären, wurden in der CTD zusätzlich die AS nach Position 506 deletiert. Dies führte zu einer Verteilung von Cdc14(342-506) in der ganzen Zelle (Abb. 27). Cdc14(342-506) war in allen Stadien des Zellzyklus im Zellkern und im Zytoplasma gleichermaßen lokalisiert und es war kein Kerntransport mehr festzustellen (Abb. 27, Einzelebenen). Dies lässt den Schluss zu, dass die NLS in diesem Konstrukt notwendig für den regulierten Kerntransport ist und sich in diesem Bereich keine weitere NLS befindet.

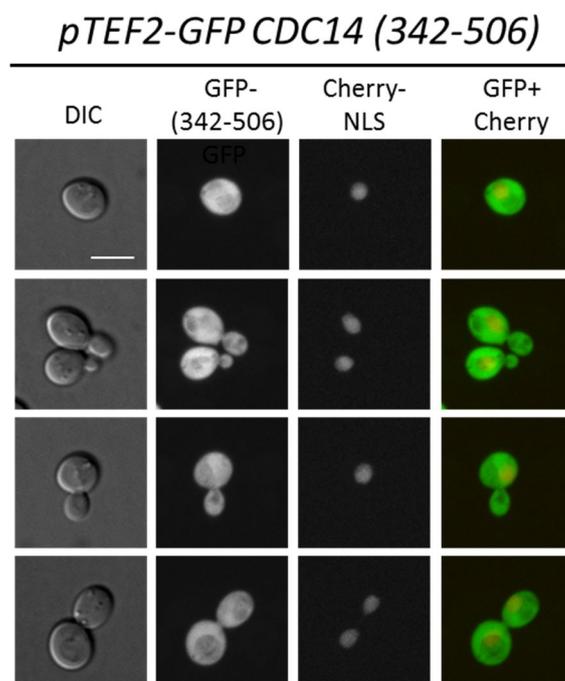


Abb. 27: Delokalisation von GFP-Cdc14(342-506). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden, haploiden Hefezellen mit GFP-Cdc14(342-506). In der Darstellung werden Einzelebenen gezeigt. Analysiert wurde der Stamm W13726 (*ura3::pTEF2-GFP CDC14(342-506)-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*). Erste Spalte: Die Zellmorphologie im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: Visualisierung von GFP-Cdc14(342-506), dritte Spalte: Zur Co-Lokalisation die Visualisierung des Zellkerns durch Cherry-NLS, vierte Spalte: beide Fluoreszenzkanäle überlagert. Maßstab= 5 μ m.

4.4 Ein essentieller Bereich in der CTD von Cdc14

Während der Analyse der CTD von Cdc14 durch Lokalisationsstudien war auffällig, dass in haploiden Hefezellen die zunehmende C-terminale Verkürzung von Cdc14 zum Verlust der *in vivo*-Funktion führte, obwohl die katalytische Domäne intakt blieb (Kapitel 4.3.1).

Daher war es interessant diesen, neben der katalytischen Domäne weiteren, essentiellen Bereich in der CTD einzugrenzen und zu charakterisieren.

Um hervorzuheben wie präzise der Bereich der zum Verlust der *in vivo*-Funktion von Cdc14 führte einzugrenzen ist, werden die Tetradenanalysen mit Cdc14(1-434)-GFP und der weiteren Verkürzung innerhalb der TR2, Cdc14(1-431)-GFP, separat an dieser Stelle gezeigt. Beide Derivate wurden durch PCR-vermittelte GFP-Fusion erstellt (Longtine *et al.*, 1998). Nach der Transformation des diploiden Wildtypstammes K842 mit den Amplifikaten erfolgten anschließend die Tetradenanalysen (Abb. 28 a, b).

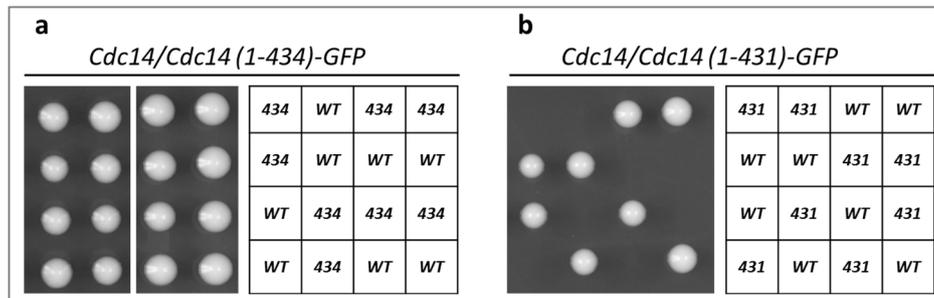


Abb. 28: Tetradenanalysen von *CDC14/ CDC14(1-434)* und *CDC14/ CDC14(1-431)*. Für die Lokalisationsstudien der C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 wurden Tetradenanalysen von *CDC14/ CDC14(1-434)-GFP* (W14092) (a) und *CDC14/ CDC14(1-431)-GFP* (W14091) (b) durchgeführt um haploide Nachkommen zu erzeugen. Sporen mit Cdc14(1-434)-GFP waren lebensfähig (a), Cdc14(1-431)-GFP war dagegen letal in Hefezellen (b). Sporen mit dem Wildtypallel von *CDC14* waren immer lebensfähig. WT: Wildtyp-Allel

Die CTD von Cdc14 ist im Kontrast zur NTD mit ihrer konservierten katalytischen Domäne auch in Hefen äußerst variabel. Um herauszufinden, ob sich möglicherweise ein kurzer konservierter Bereich in der CTD befindet, wurde ein Sequenzalignment von Cdc14 in *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc14_SC) im Vergleich mit Cdc14 in anderen Hefen durchgeführt (Abb. 29). Dazu wurden die Aminosäuresequenzen von *Torulaspora*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Ashbya* sowie *Kluyveromyces* untersucht.

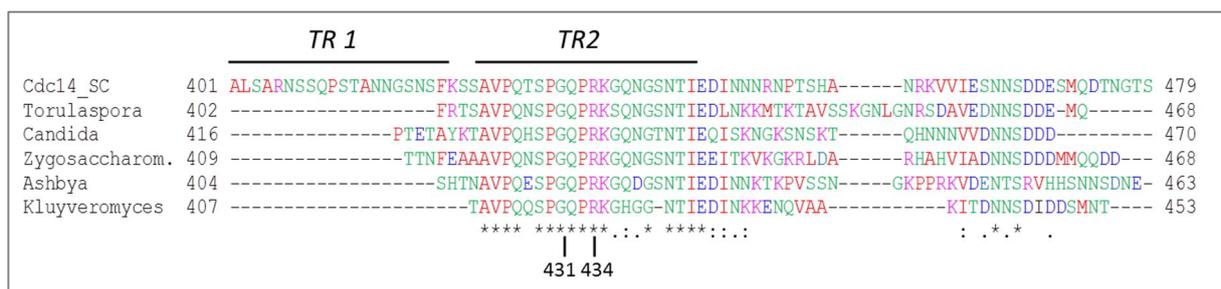


Abb. 29: Sequenzanalyse von Cdc14-Orthologen in Hefen. Cdc14 Orthologe von *Saccharomyces cerevisiae* (SC), *Torulaspora delbrueckii*, *Candida albicans*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Ashbya gossypii* und *Kluyveromyces lactis* wurden mit Hilfe von *Clustal Omega* aligniert. Die Tandem Repeat-Sequenz in *S. cerevisiae* wurde mit TR1 und TR2 angedeutet. Die AS 431 und 434 wurden entsprechend gekennzeichnet. In allen sechs Spezies konservierte AS wurden mit (*), die Konservierung besonders ähnlicher AS mit (:), und weniger konservierte AS mit (.) markiert. Farbcode: Rot: kleine und hydrophobe AS, Blau: Saure AS, Magenta: Basische AS, Grün: Hydroxyl, Sulfhydryl, Amine und G (aus *Clustal Omega*).

Die Analyse der Sequenz ergab eine kleine konservierte Region von Cdc14 innerhalb der variablen Domäne in allen untersuchten Hefen (Abb. 29). Identische AS wurden durch (*) gekennzeichnet. Taylor *et al.* (1997) wurden bereits auf diese Region aufmerksam. Durch einen Sequenzvergleich stellten sie zwei jeweils 21-Aminosäure lange asparagin- und serinreiche Regionen fest, die sie folgend als *Tandem Repeat*-Sequenz (TR) bezeichneten. In dieser Arbeit wird zwischen *Tandem Repeat 1* (TR1) und *Tandem Repeat 2* (TR2) unterschieden. Die Funktion dieser TR-Sequenzen ist bislang unbekannt.

Die Tetradenanalyse (Abb. 28) deutet darauf hin, dass sich in TR2 eine wichtige Region für die biologische Funktion von Cdc14 verbirgt.

Als Grundlage für die nachfolgenden Analysen wird die katalytische Domäne von Cdc14 in *S. cerevisiae* alleinstehend auf die biologische Funktion getestet. In der Literatur wird diese oftmals bis einschließlich AS 374 gefasst (Taylor *et al.*, 1997, Traverso *et al.*, 2001).

4.4.1 Bedeutung der katalytischen Domäne für die biologische Funktion

Cdc14 ist notwendig, um zum Austritt aus der Mitose Zyklin-Cdk-Komplexe und andere Zielproteine zu dephosphorylieren um sie dadurch zu inhibieren. Der katalytisch aktive Cysteinrest (AS 283) befindet sich innerhalb der N-terminalen Domäne B von Cdc14 (Kapitel 3.3.1). Je nach Literatur reicht diese Domäne bis ca. AS 340 (Gray *et al.*, 2003, Mocciaro und Schiebel, 2010) oder bis AS 374 (Taylor *et al.*, 1997, Traverso *et al.*, 2001). Die katalytische Domäne bis AS 340 bezieht sich dabei auf die besonders starke Konservierung, die alle Cdc14-Phosphatasen gemeinsam haben. Cdc14(1-374) schließt noch eine protein-vermittelte NES (Bembenek *et al.*, 2005) mit ein und wurde somit weitreichender gefasst (Abb. 30).

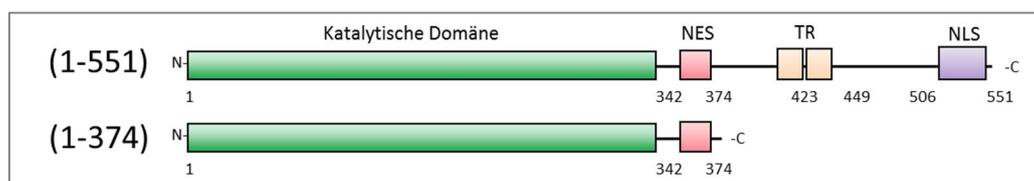


Abb. 30: Schematischer Aufbau von Cdc14(1-551) und Cdc14(1-374). Zur Veranschaulichung der Vergleich von Cdc14(1-551) und Cdc14(1-374) mit den entsprechenden enthaltenen Domänen. Cdc14(1-551) in voller Länge enthält eine katalytische Domäne (grün), eine Kernexportsequenz (NES, rot), eine Tandem Repeat Sequenz (TR, orange) sowie eine Kernlokalisationssequenz (NLS, lila). Cdc14(1-374) enthält neben der N-terminalen katalytischen Domäne (grün) zusätzlich die NES (rot).

Während den Lokalisationsstudien der C-terminal verkürzten Cdc14-Serie mit GFP-Fusionen, wurde auch eine Tetradenanalyse des Hefestammes heterozygot für das Cdc14-Derivat bestehend aus der katalytischen Domäne (AS 1-374) durchgeführt (Abb. 31).

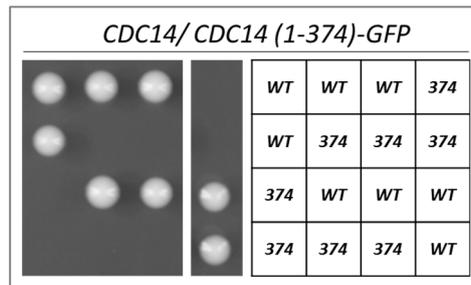


Abb. 31: Die Deletion der CTD ist letal. Zur Erzeugung haploider Nachkommen des Hefestammes W12989 mit dem Genotyp *CDC14/ CDC14(1-374)-GFP-HIS3MX6* wurde eine Tetradanalyse durchgeführt. Sporen mit *Cdc14(1-374)-GFP* sind nicht lebensfähig. Ausschließlich Sporen mit dem Wildtypallel von *CDC14* wuchsen nach der Tetradanalyse an. *WT*: Wildtyp-Allel.

Die Tetradanalyse des Hefestammes mit dem genetischen Hintergrund *CDC14/ CDC14(1-374)-GFP* führte zu einer 2:2-Verteilung. Nach Überprüfung der Markerverteilung wurde festgestellt, dass *CDC14(1-374)* nicht hinreichend für die biologische Funktion war, da Sporen mit *Cdc14(1-374)* nach der Tetradanalyse niemals anwuchsen (Abb. 31).

Eine Deletion von *CDC14* ist letal (Abb. 33, Abb. 35). Umso überraschender war die Beobachtung, dass *Cdc14(1-374)-GFP* mit vollständig intakter katalytischer Domäne die *in vivo*-Funktion verlor (n= 12 vollständige Tetraden, Erwartung: 24 haploide Nachkommen mit *CDC14(1-374)-GFP*). GFP ist mit ca. 27 kDa für eine Proteinfusion mit *Cdc14(1-374)* (43 kDa) ein vergleichsweise großes Protein, das mit *Cdc14(1-374)* ca. ein Drittel des Gesamt-molekulargewichtes beträgt. Als Erklärung für den Verlust der biologischen Funktion sollte in Erwägung gezogen werden, dass sich zusammen mit GFP für *CDC14(1-374)* möglicherweise Probleme bei der Proteinfaltung ergeben könnten.

4.4.2 Wiederherstellung der *in vivo*-Funktion nach Co-Expression von NTD und CTD

In den Tetradanalysen zur Erzeugung haploider Nachkommen mit *CDC14(1-374)-GFP* wurde festgestellt, dass *Cdc14(1-374)-GFP* trotz vollständiger katalytischer Domäne der Phosphatase nicht hinreichend für die Lebensfähigkeit von *S. cerevisiae* war (Kapitel 4.4.1). Um mögliche Probleme in der Proteinfaltung aufgrund der Fusion mit GFP zu prüfen, wurde eine *CDC14(1-374)*-Fusion mit 3xHämagglutinin (HA3, 3kDa) erstellt, erneut der diploide Wildtyp-Hefestamm K842 transformiert und Tetradanalysen durchgeführt (Abb. 32). Die HA3-markierte Version bestätigte, dass die Sequenz jenseits von AS 374 erforderlich ist, um die biologische Funktion zu unterstützen (5 unterschiedliche Transformanten, n= 46 vollständige Tetraden, Erwartung: 92 Sporen mit *CDC14(1-374)-HA3*). Im Western Blot konnte die Proteinexpression von *CDC14(1-374)-HA3* in diploiden Hefezellen bestätigt werden (Abb. 66).

Demnach scheint der Verlust der biologischen Funktion unabhängig von einer GFP- (Abb. 31) oder einer HA3-Fusion (Abb. 32) zu sein.

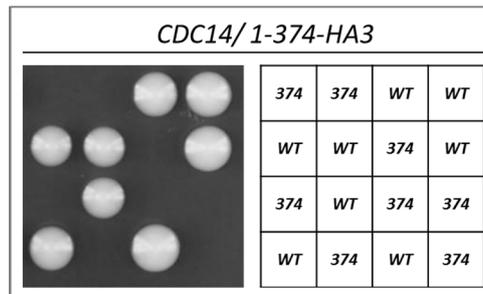


Abb. 32: Tetradenanalyse von *CDC14/ CDC14(1-374)-HA3*. Die Epitopmarkierung erfolgte nach Longtine *et al.* (1998). Zur Erzeugung haploider Nachkommen von W14584 (*CDC14/ CDC14(1-374)-HA3-His3MX6*) wurden Tetradenanalysen durchgeführt. Nur die haploiden Wildtyp-Sporen von Cdc14, nicht aber Sporen mit Cdc14(1-374), wuchsen nach der Tetradenanalyse an. WT: Wildtyp-Allel.

Diese Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass sich zusätzlich zur katalytischen Domäne in der CTD von Cdc14 Bereiche befinden, die für die *in vivo*-Funktion von Cdc14 essentiell sind und somit die NTD von Cdc14 nicht alleinstehend dafür hinreichend ist. Nun war interessant zu prüfen, ob die möglicherweise separate Funktion der NTD und der CTD die biologische Funktion wiederherstellen können. Dafür wurde mit dem Konstrukt *pTEF2-GFP-CDC14(342-551)-URA3* der diploide Hefestamm, der heterozygot für *CDC14(1-374)-HA3* war, transformiert und dieses dabei am *URA3*-Lokus ins Genom integriert (Abb. 32). Als Kontrolle wurde dasselbe Konstrukt in einen diploiden Stamm, der heterozygot für $\Delta cdc14$ war, transformiert und für beide Hefestämme durch Western Blot-Analysen geeignete Transformanten gewählt (Abb. 69). Zur Analyse des Kontrollstammes wurden Transformanten für die niedrige Expression (Abb. 33 a) und für eine starke Expression (Abb. 33 b, Abb. 69 a) gewählt.

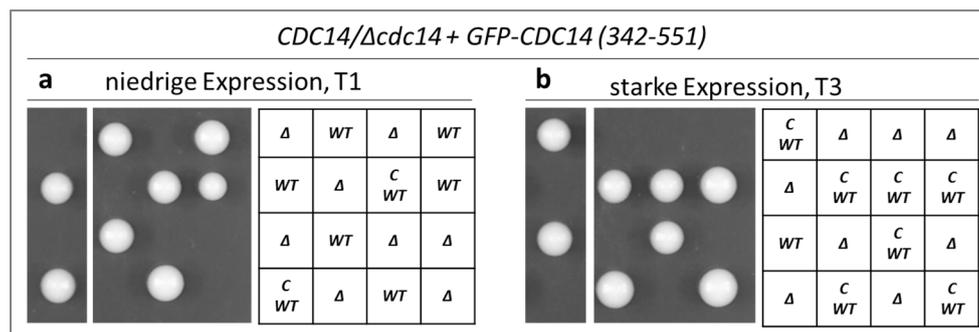


Abb. 33: Keine Komplementation nach Co-Expression der CTD von Cdc14 mit $\Delta cdc14$. Es wurde analysiert, ob die CTD von Cdc14 hinreichend für die Komplementation von $\Delta cdc14$ ist. Dafür wurde der Komplementationsstamm W14087 (*CDC14/ delta-cdc14-kanMX6*) mit dem Plasmid mit N-terminal GFP-markiertem Cdc14(342-551) (*pWS4289, pTEF2-GFP-CDC14(342-551)-URA3 =C*) transformiert und anschließend Komplementationsanalysen durchgeführt. **a**, In der Komplementationsanalyse von Transformant Nr. 1 (niedriges Expressionslevel von *GFP-CDC14(342-551) =C*) kann $\Delta cdc14$ nicht komplementiert werden. **b**, In der Analyse von Transformant Nr. 3 (starkes Expressionslevel von *GFP-CDC14(342-551) =C*) kann die Deletion von *CDC14* ebenfalls nicht komplementiert werden. WT: Wildtyp-Allel, Δ : $\Delta cdc14$.

Die Tetradenanalyse ergab eine erwartete 2:2-Verteilung. Die Expression der CTD von Cdc14 war nicht hinreichend, um die *in vivo*-Funktion von $\Delta cdc14$ wieder herzustellen. Dies war zudem unabhängig von der exprimierten Proteinmenge des C-terminalen Fragmentes Cdc14(342-551) (Abb. 33 a, b).

Wurde dagegen die CTD (*CDC14(342-551)*) zusammen mit der NTD (*CDC14(1-374)*) von Cdc14 co-exprimiert, komplementierte die CTD die katalytische Domäne und die Sporen wuchsen zu Kolonien an. Für diese Analyse wurden jeweils ein Klon mit niedriger Expression und ein Klon mit starker Expression von Cdc14(342-551) gewählt (Abb. 69 b). Nur nach hoher Expression der CTD konnte die NTD mit der katalytischen Domäne komplementiert werden (Abb. 34 a, vgl. b).

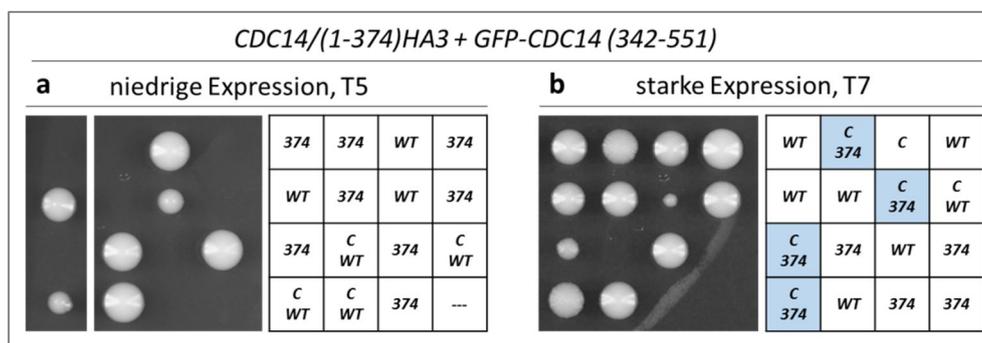


Abb. 34: Wiederherstellung der biologischen Funktion von Cdc14 nach Co-Expression von NTD und CTD. Es wurde analysiert, ob die Expression des C-terminalen Fragmentes GFP-Cdc14(342-551) die NTD von Cdc14(1-374) komplementieren kann. Dafür wurde der diploide Hefestamm *CDC14/ CDC14(1-374)-HA3-HIS3MX6* (W14584) mit dem Plasmid *pTEF2-GFP-CDC14(342-551)-URA3* (=C; pWS4289) transformiert. Transformant Nr. 5, niedrige Expression (**a**) und Transformant Nr. 7 (starke Expression) (**b**) getestet. Eine niedrige Expression der CTD von Cdc14 ist nicht ausreichend um Cdc14(1-374) zu komplementieren (**a**), eine starke Expression der CTD kann Cdc14(1-374) komplementieren (**b**, blau hinterlegt). WT: Wildtyp-Allel.

Das Ergebnis zeigte eine dosisabhängige Komplementation mit gewisser Variabilität. Sporen mit einer niedrigen Gendosis von *CDC14(342-551)* komplementierten die NTD nicht und wuchsen folglich nicht an. Sporen mit einer hohen Gendosis der CTD zeigten eine Komplementation mit der NTD. Die angewachsenen Sporen bildeten jedoch Kolonien variabler Größe. Zwei Sporen waren auffällig klein, zwei komplementierende Sporen wuchsen in der Größe von Wildtyp-Kolonien an (Abb. 34 b).

Nach Co-Expression beider Domänen lässt sich die biologische Funktion von Cdc14 wiederherstellen, was auf eine wichtige Rolle des variablen Anteils hinweist. Zusammenfassend könnte dies auf eine jeweils separate Funktion von NTD und CTD hindeuten. Eine direkte Wechselwirkung der katalytischen Domäne mit der variablen Domäne wäre somit denkbar.

4.4.3 Komplementationsstudien zur Eingrenzung des essentiellen Bereiches

Innerhalb der CTD befindet sich neben den Lokalisationsdomänen zusätzlich eine essentielle Region. Die Tetradenanalysen mit den C-terminalen Verkürzungen Cdc14(1-434) und Cdc14(1-431) (Kapitel 4.4) veranschaulichten, dass die Deletion von nur drei AS zum Verlust der Funktion von Cdc14 *in vivo* führten. Um für weitere Studien auszuschließen, dass die Deletion der CTD zum Funktionsverlust des gesamten Proteins führt, wurden minimale Manipulationen dieser Region durchgeführt um diese weitreichender analysieren zu können.

Zur Charakterisierung des Bereiches, der essentiell für die *in vivo*-Funktion von Cdc14 ist, war es interessant Komplementationsstudien durchzuführen um damit die Wiederherstellung der biologischen Funktion testen zu können. Für die Analysen wurde in ein Hefe-Wildtyp-Stamm (K842) verwendet, in dem vorausgehend ein Allel des *CDC14*-Gens deletiert (*CDC14/ Δcdc14*) wurde. Alle Konstrukte wurden am *URA3*-Lokus integriert und verteilen sich unabhängig.

Als erste Kontrolle wurden Tetradenanalysen mit dem Ausgangsstamm ohne Transformation eines *CDC14*-Konstruktes durchgeführt. Die resultierende Tetradenanalyse zeigte, wie erwartet, eine 2:2-Verteilung, da die Deletion von *CDC14* letal ist (Abb. 35).

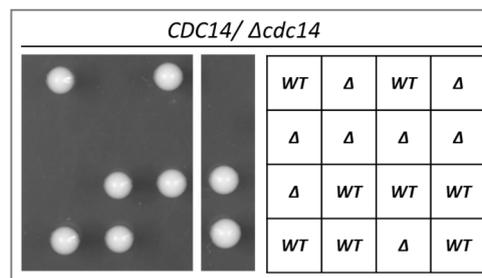


Abb. 35: Die Deletion von *CDC14* ist letal. Als Ausgangsstamm für die nachfolgenden Komplementationsanalysen wurde ein diploider Hefestamm, der heterozygot für die Deletion von *CDC14* (*Δcdc14*) war, generiert (W14087, *CDC14/ delta cdc14-kanMX6*). Da Cdc14 in Hefe essentiell und somit *Δcdc14* letal ist, wurde dieser Stamm verwendet, um unterschiedliche Derivate von Cdc14 auf ihre Komplementation von *Δcdc14* zu testen. Nach dieser Tetradenanalyse kam es zu einer 2:2-Verteilung, da nur die beiden Sporen mit dem Wildtyp-Allel von *CDC14*, nicht aber Sporen mit *Δcdc14*, lebensfähig sind. WT: Wildtyp-Allel, Δ: *Δcdc14*.

Um den Effekt auf die Wiederherstellung der *in vivo*-Funktion zu testen, wurden verschiedene Konstrukte mit endogenem *CDC14*-Promotor (*pCDC14*), *CDC14* fusioniert an *GFP* und einem *tCYC1*-Terminator erstellt. Durch die GFP-Fusion war es möglich, die jeweiligen Cdc14-Derivate im Western Blot nachzuweisen und auf die Proteinexpressionsmenge hin zu überprüfen.

Gewählt wurden dazu Cdc14 voller Länge und jeweils zwei Konstrukte mit internen Mutationen bzw. mit internen Deletionen innerhalb der CTD. Der Stamm mit dem Genotyp *CDC14/ Δcdc14* wurde nachfolgend mit den für die Komplementationsanalysen erstellten Konstrukten transformiert.

Für die internen Mutationen wurde eine in dieser Region befindliche Cdk1-Phosphorylierungsstelle mit der Minimalkonsensussequenz T/SP mutagenisiert. Dafür wurden Threonin und Serin (AS

428/429) durch zwei Alanine ausgetauscht, um den nicht-phosphorylierten Zustand zu imitieren (Kapitel 4.4.3.1). Des Weiteren erfolgte eine Mutation des in Hefen konservierten QPRK-Motivs in der CTD zu ASAA (AS 432-435) (Kapitel 4.4.3.1, vgl. Abb. 29). Für die internen Deletionen wurden die Bereiche der AS 426-430 und 430-434 deletiert und Komplementationsanalysen durchgeführt (Kapitel 4.4.3.2). Die Deletionen wurden so gewählt, dass in dieser Region immer Bereiche zwischen Prolin und Prolin deletiert wurden (vgl. Abb. 29).

Zur Komplementationsanalyse sollten jeweils Klone mit einer Proteinexpression vergleichbar mit dem endogenen Expressionslevel (niedrig) und auf hohem Expressionsniveau (stark) ausgewählt werden (Abb. 36).

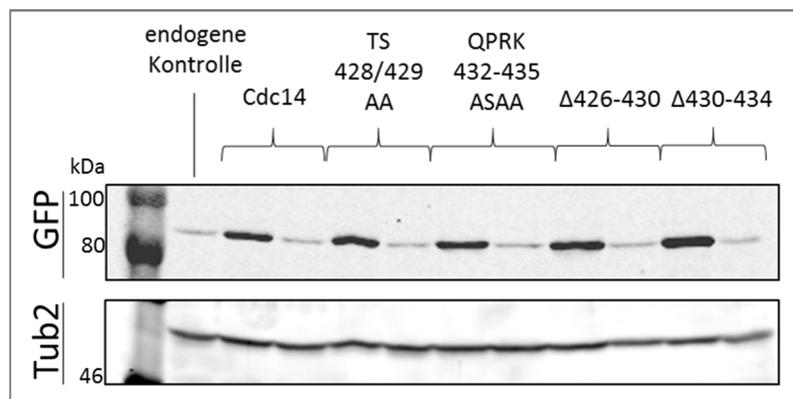


Abb. 36: Proteinexpression der Stämme für die Komplementationsanalysen zur Charakterisierung des essentiellen Bereiches in der CTD von Cdc14. Zur Übersicht für die zu Komplementationsstudien verwendeten Stämme wurde die Proteinexpression im Western Blot analysiert. Als Referenz wurde ein diploider Stamm mit endogenem Cdc14 mit einer C-terminalen GFP-Fusion verwendet (W12990, *CDC14/ CDC14-GFP-HIS3MX6*). Folgend wurden die untersuchten Stämme mit jeweils hoher und niedriger Gendosis der Cdc14-Derivate auf das 9%ige SDS-Gel aufgetragen. Für die Analysen wurden entsprechende diploide Hefestämme mit *CDC14-GFP* bzw. mit Mutationen in der CTD von Cdc14, *CDC14(TS 428/429 AA)* und *CDC14(QPRK 432-435 ASAA)*, sowie mit internen Deletionen in der CTD, *CDC14(Δ426-430)* und *CDC14(Δ430-434)*, erstellt. Die entsprechenden Plasmide wurden dafür in einen diploiden Hefestamm der heterozygot für *Δcdc14* (W14087, Genotyp: *CDC14/delta cdc14-kanMX6*) war, transformiert. Die Integration der Plasmide erfolgte am *URA3*-Lokus. Der Reihenfolge nach die verwendeten Hefestämme: Cdc14: (*CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14-GFP-URA3*), W14219 (starke Expression), W14218 (niedrige Expression). Für Cdc14(TS 428/429 AA): (*CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(TS 428/429 AA)-GFP-URA3*), W14225 (starke Expression) und W14224 (niedrige Expression). Für Cdc14(QPRK 432-435 ASAA): (*CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP-URA3*), W14228 (starke Expression) und W14226 (niedrige Expression). Stämme mit internen Deletionen: Cdc14(Δ426-430): (*CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-GFP-URA3*), W14383 (starke Expression) und W14229 (niedrige Expression), sowie Cdc14(Δ430-434): (*CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ430-434)-GFP-URA3*) W14378 (hohe Expression) und W14231 (niedrige Expression). Der Nachweis im Western Blot erfolgte mit dem α -GFP-Antikörper. Errechnete Proteingrößen: Cdc14-GFP: 89 kDa, Cdc14(TS 428/429 AA)-GFP: 89 kDa, Cdc14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP: 89 kDa, Cdc14(Δ426-430)-GFP: 88 kDa, Cdc14(Δ430-434)-GFP: 88 kDa. Als Ladekontrolle wurde Tubulin (Tub2) mit dem α -Tub-Antikörper nachgewiesen, errechnete Proteingröße Tubulin: 51 kDa.

Es wuchsen die *CDC14*-Wildtyp-Sporen an, aber niemals die Sporen mit deletiertem *CDC14*-Gen. Als Kontrolle wurden zur Tetradenanalyse zwei Klone mit *pCDC14-CDC14-GFP* je mit niedriger und starker Proteinexpression gewählt (Abb. 36). Diese wurden verwendet, um zu überprüfen, ob das

eingebachte Konstrukt $\Delta cdc14$ erfolgreich komplementieren kann und die Sporen demnach wieder wachsen können.

Die Komplementationanalysen mit $CDC14-GFP$ zeigten, dass die integrierten $CDC14$ -Konstrukte (=C) unabhängig von der Stärke der Proteinexpression die Deletion von $CDC14$ komplementieren konnten. $CDC14-GFP$ trat sowohl zusammen mit Wildtyp-Cdc14 als auch mit der Deletion auf. Das Anwachsen der Sporen von $\Delta cdc14$, die durch die Komplementation gerettet wurden, wird in den Analysen durch eine blaue Hervorhebung angedeutet (Abb. 37).

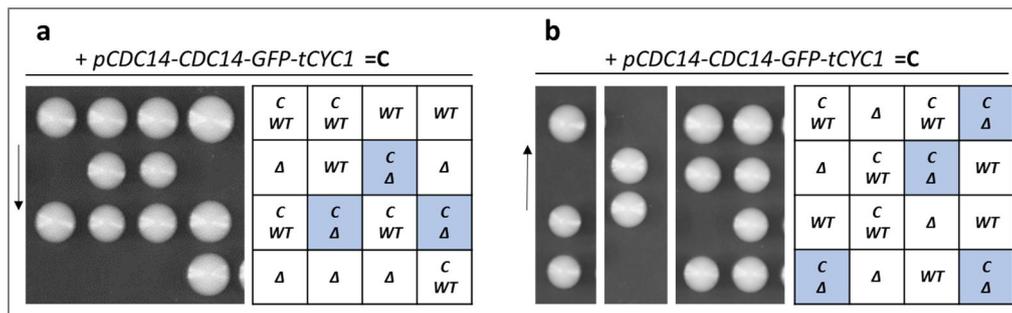


Abb. 37: Komplementation von $\Delta cdc14$ mit Cdc14-GFP. Als Kontrolle für weitere Komplementationsstudien wurde überprüft, ob Cdc14-GFP mit niedriger und hoher Proteinexpression die Deletion von $CDC14$ komplementieren konnte. Dafür wurden zwei Hefestämme ausgewählt die $Cdc14-GFP$ (=C) niedrig (a, W14218, angedeutet durch einen Pfeil nach unten) bzw. stark (b, W14219, angedeutet durch einen Pfeil nach oben) exprimierten (vgl. Western Blot Abb. 36; Genotyp: $CDC14/cdc14\text{-delta}::kanMX4\ ura3::pCDC14-CDC14-GFP-URA3$). Die Komplementation von $\Delta cdc14$ war für $CDC14-GFP$ unabhängig von der Genodosis. $CDC14-GFP$ komplementierte $\Delta cdc14$ auf niedrigem und starkem Expressionsniveau (angedeutet durch blaue Hervorhebung). WT: Wildtyp-Allel, Δ : $\Delta cdc14$.

Zur konkreten Analyse des essentiellen Bereiches in der CTD von Cdc14 wurden nun zunächst Komplementationsstudien mit internen Mutationen in der zu untersuchenden Region durchgeführt.

4.4.3.1 Komplementationsstudien mit internen Mutationen

Durch die Serie der Lokalisationsstudien kristallisierte sich in haploiden Hefezellen eine Grenze für die *in vivo*-Funktion der C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 heraus, da Proteinfusionen kleiner als Cdc14(1-434) letal waren (Abb. 28, ergänzend Abb. 24). In der Nähe dieser Region befindet sich eine Cdk1-Phosphorylierungsstelle. Die Erkennungssequenz, die von Cdk1 phosphoryliert wird, beschränkt sich im Minimalmotiv auf S/TP (Enserink und Kolodner, 2010). Untersuchungen von Li *et al.* (2014) bestätigten bereits, dass Cdc14 tatsächlich an SP der Positionen AS 429/430 *in vitro* von Cdk1 phosphoryliert wird. Obwohl die Cdk-Phosphorylierungsstelle noch in Cdc14(1-431) vorliegt, dieses Derivat jedoch bereits letal ist, wäre es dennoch denkbar, dass diese Region durch die Verkürzung des Proteins negativ beeinflusst sein könnte. Um gezielt zu überprüfen, ob der Verlust dieser Phosphorylierungsstelle möglicherweise die Ursache für die beobachtete Letalität der CTD-Verkürzungen von Cdc14 war, wurden in dieser Region gezielt Punktmutationen von Threonin und

Serin zu zwei ungeladenen Alaninen (TS 428/ 429 AA) eingeführt. So wurde ausgeschlossen, dass Cdk1 möglicherweise Threonin (AS 428) phosphorylieren konnte. In einer weiteren Herangehensweise, wurden vier AS des konservierten Bereiches in der CTD (Abb. 29) von QPRK 432-435 zu ASAA mutagenisiert (wird im Weiteren Verlauf dieser Arbeit als Cdc14(ASAA) bezeichnet). Beide Konstrukte wurden so kloniert, dass sie in Hefe durch den endogenen *CDC14*-Promotor (*pCDC14*) exprimiert wurden. Die Integration erfolgte am *URA3*-Lokus stabil ins Genom von *S. cerevisiae*.

Um in einem ersten Schritt zu überprüfen, ob die Konstrukte bereits in Gegenwart des Wildtyp-Allels zu einem Phänotyp führen, wurde vor der Komplementationsanalyse eine durchflusszytometrische Analyse der diploiden Ausgangsstämme durchgeführt (Abb. 38). Untersucht wurden diejenigen Stämme, in denen die integrierten Konstrukte jeweils wenig und viel Protein exprimierten (vgl. Abb. 36). Als Referenz dienten die in den diploiden Stamm eingebrachten *pCDC14-CDC14*-Konstrukte. In der G1-Phase (2C-Peak, unreplizierter Chromosomensatz) sowie im G2-M-Phaseübergang (4C-Peak, replizierter Chromosomensatz) zeigten sich keine Abweichungen von der Kontrolle in den untersuchten Komplementationsstämmen. Dies zeigt, dass die Punktmutationen in dieser Region zu keinem dominanten Phänotyp in diploiden Hefezellen führten (Abb. 38).

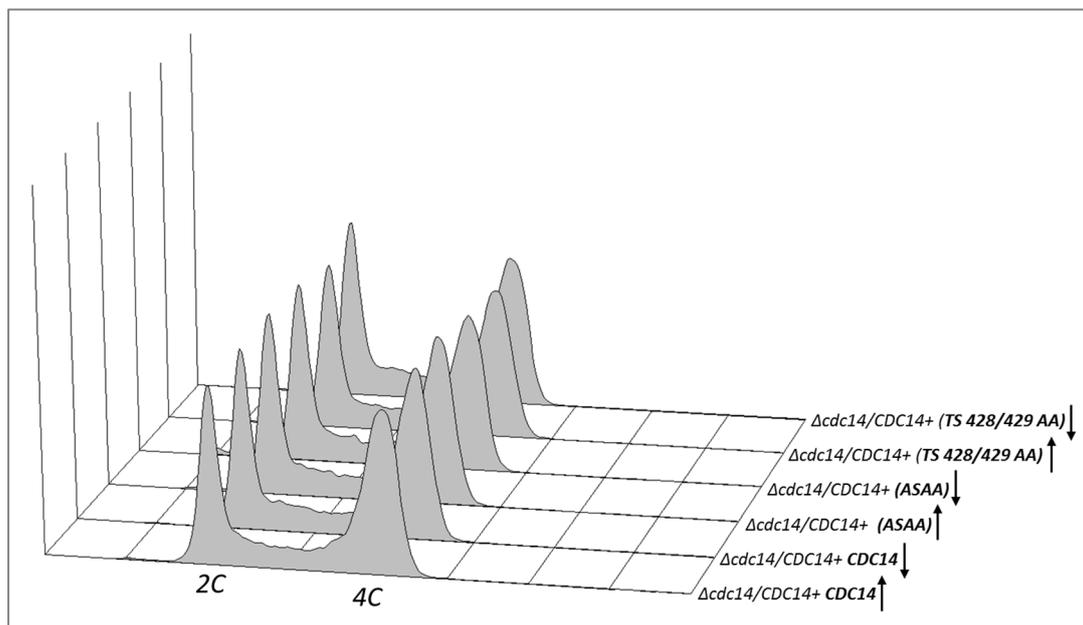


Abb. 38: Durchflusszytometrische Analyse der zur Komplementationsanalyse verwendeten Stämme mit Punktmutationen in der CTD. Kulturen von exponentiell wachsenden Zellen mit Cdc14, Cdc14(ASAA) und Cdc14(TS 428/429 AA) wurden für die durchflusszytometrische Analyse aufgearbeitet und die Zellzyklusprofile miteinander verglichen. Analytierte Hefestämme: Cdc14 W14219 (starke Expression, Pfeil nach oben), W14218 (niedrige Expression, Pfeil nach unten; Genotyp: *CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14-GFP-URA3*), Cdc14(ASAA): W14228 (starke Expression, Pfeil nach oben) und W14226 (niedrige Expression, Pfeil nach unten; Genotyp: *CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP-URA3*), Cdc14(TS 428/429 AA): W14225 (starke Expression, Pfeil nach oben) und W14224 (niedrige Expression, Pfeil nach unten; Genotyp: *CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(TS 428/429 AA)-GFP-URA3*), mit K842 als Kontrolle. 2C-Peak: unreplizierter Chromosomensatz im G1-S-Phaseübergang, 4C-Peak: replizierter Chromosomensatz im G2-M-Phaseübergang.

In den Komplementationsanalysen schien die Mutation der Cdk1-Phosphorylierungssequenz keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu haben (Abb. 39 a, b). In geringen sowie in hohen Proteinexpressionsraten konnte die Deletion von *CDC14* durch *pCDC14-CDC14(TS 428/429 AA)-GFP* komplementiert werden (angedeutet durch blaue Hervorhebung, Abb. 39).

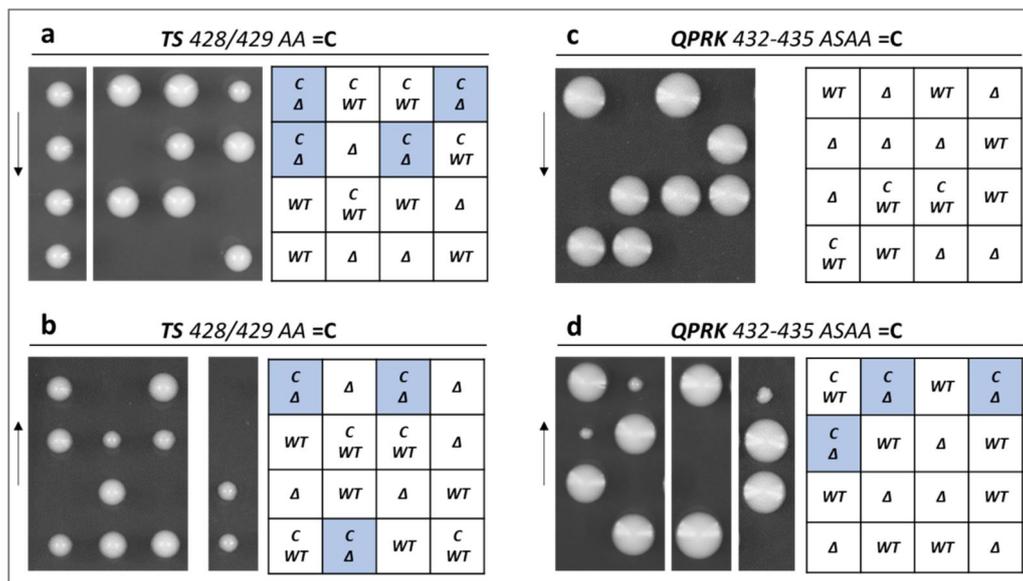


Abb. 39: Komplementationsstudien mit Cdc14(TS 428/429 AA) und Cdc14(ASAA). Hefestämme mit den Mutationen Cdc14(TS 428/429 AA) und Cdc14(ASAA) wurden auf ihre Komplementationsfähigkeit von $\Delta cdc14$ durch Tetradenanalysen überprüft. Dazu wurden Stämme mit jeweils niedrigerem (angedeutet durch einen Pfeil nach unten) und hohem Expressionsniveau (angedeutet durch einen Pfeil nach oben) gewählt. Verwendete Stämme: **a**, W14224 (niedrige Expression), **b**, W14225 (starke Expression; Genotyp **a** und **b**: *CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(TS 428/429 AA)-GFP-URA3*), **c**, W14226 (niedrige Expression), **d**, W14228 (starke Expression, Genotyp **c** und **d**: *CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP-URA3*). Cdc14(TS 428/429 AA) komplementierte $\Delta cdc14$ unabhängig vom Expressionslevel (**a** und **b**, Komplementation angedeutet durch blaue Hervorhebung), Cdc14(ASAA) komplementierte $\Delta cdc14$ mäßig und nur nach einer Überexpression, erkennbar durch kleine Kolonien (vgl. **c** mit **d**, Komplementation angedeutet durch blaue Hervorhebung). Expressionsniveau: siehe Abb. 36. WT: Wildtyp-Allel, Δ : $\Delta cdc14$.

Sollte die Cdk-Erkennungssequenz einen Einfluss auf die *in vivo*-Funktion von Cdc14 haben, könnte angenommen werden, dass *CDC14(TS 428/429 AA)* die Deletion nicht komplementiert hätte. Außerdem zeigte sich in der Tetradenanalyse, dass eine Überexpression der *CDC14*-Derivate teilweise zu einem Wachstumsdefekt führte. Sporen mit Wildtyp-*CDC14* zusammen mit dem Komplementationskonstrukt auf hohem Expressionsniveau zeigten geringfügig schlechteres Wachstum. Drei von vier Kolonien mit dem Genotyp *CDC14 pCDC14-CDC14(TS 428/429 AA)-GFP-tCYC1* waren kleiner als Sporen ohne die Co-Expression (Abb. 39 b). Im Vergleich dazu zeigte sich mit Cdc14(ASAA) ein dosisabhängiger Phänotyp. Eine geringe Expressionsrate konnte die Deletion von *CDC14* nicht komplementieren, jedoch konnte die *in vivo*-Funktion nach stärkerer Expression von *CDC14(ASAA)* teilweise wieder hergestellt werden. Die Sporen bildeten Kolonien, die deutlich kleiner als Kolonien mit Cdc14(ASAA) und Wildtyp-Cdc14 waren (Abb. 39 c, d). Da *CDC14(ASAA)* eine

Deletion von *CDC14* erst nach Überexpression geringfügig komplementieren konnte, könnte dies auf eine essentielle Funktion dieser Region hinweisen.

Die Komplementationsanalysen zeigten, dass die Cdk-Phosphorylierungsstelle am ehesten nicht die Ursache für den Verlust der biologischen Funktion von Cdc14 war. Die konservierte Region mit QPRK könnte ein notwendiges Motiv sein. Beide Sequenzbereiche sollten dennoch weiter analysiert werden.

4.4.3.2 Komplementationsstudien mit internen Deletionen

Prolinreiche Sequenzen sind ein beliebtes Protein-Bindemotiv die auch an der Signalübertragung beteiligt sein können. Proline sind jedoch nicht besonders flexibel in ihrer Konformation. Hieraus ergibt sich, dass prolinreiche Sequenzbereiche eines Proteins eher nach außen zeigen und diese exponierten Stellen daher gut als Bindemotiv erreichbar sind (Kay *et al.*, 2000).

In den vorangegangenen Komplementationsstudien wurden eine in dieser Region befindliche Cdk-Phosphorylierungsstelle und ein in Hefen besonders konserviertes QPRK-Motiv untersucht. Zur Analyse des essentiellen Bereiches wurden an diesen Positionen gezielt Punktmutationen eingeführt (Kapitel 4.4.3.1). In dieser Region befinden sich zudem drei Proline an den Positionen AS 426, 430, 434. Die Cdk-Phosphorylierungsstelle wird dabei von zwei Prolinen eingeschlossen, das QPRK-Motiv wird in N-terminaler Richtung von einem Prolin eingegrenzt. Das dritte Prolin befindet sich innerhalb des durch Punktmutationen veränderten QPRK-Motivs zu ASAA (Kapitel 4.4.3.1).

Um zu überprüfen, ob die drei Proline im untersuchten Bereich (vgl. Abb. 29) einen Einfluss auf die biologische Funktion haben, wurden kurze interne Deletionen in der CTD von Cdc14 eingeführt. Im ersten Ansatz wurde eine Deletion der AS 426-430 ($\Delta PQQSP$) und im zweiten Ansatz eine Deletion der AS 430-434 ($\Delta PGQPR$) eingebracht. Zur ersten Einschätzung der erfolgreichen Mutagenese mittels Restriktionsenzymverdau wurde in *CDC14*($\Delta 426-430$) ein Alanin eingefügt. In *Cdc14*($\Delta 430-434$) wurde keine AS eingefügt.

Wurden *CDC14*($\Delta 426-430$) und *CDC14*($\Delta 430-434$) in den Komplementationsstudien vergleichbar mit endogenem Expressionsniveau exprimiert (Abb. 36), konnte die Deletion von *CDC14* nicht gerettet werden (Abb. 40 a, c). Diese Kombinationen traten in den Tetradenanalysen niemals auf. Erst nach einer Überexpression waren beide Konstrukte hinreichend, um $\Delta cdc14$ zu komplementieren. Sporen mit *CDC14*($\Delta 426-430$) $\Delta cdc14$ und *CDC14*($\Delta 430-434$) $\Delta cdc14$ wuchsen zu Kolonien vergleichbar mit der Größe von Kolonien mit Wildtyp-Cdc14 heran (Abb. 40 b, d).

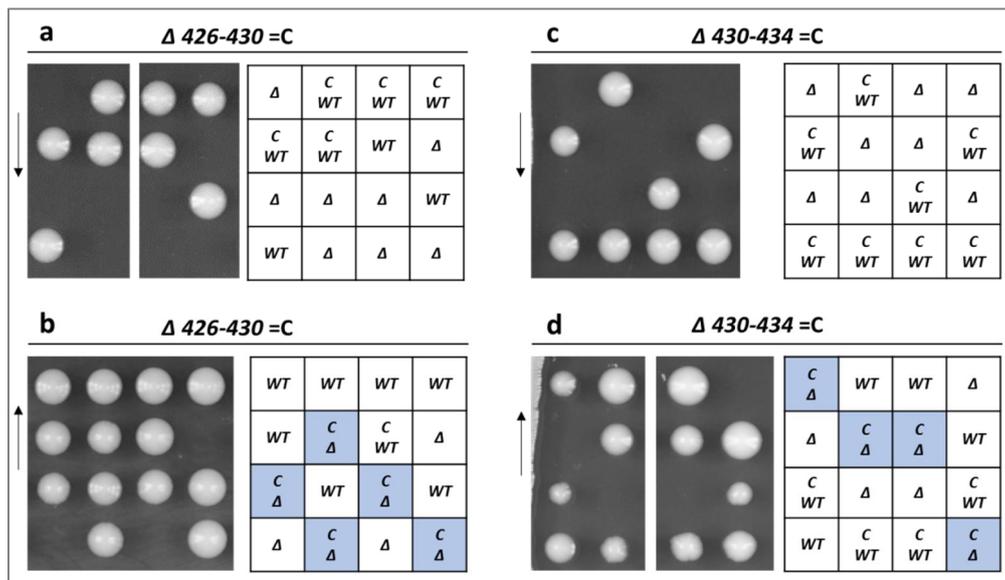


Abb. 40: Komplementationsstudien mit Deletionen in der TR-Sequenz von Cdc14. Hefestämme mit den Deletionen in der CTD Cdc14($\Delta 426-430$) und Cdc14($\Delta 430-434$) wurden in Tetradenanalysen auf die Komplementation von $\Delta cdc14$ getestet. Dafür wurden Stämme mit jeweils niedrigem (angedeutet durch einen Pfeil nach unten) und hohem Expressionsniveau (angedeutet durch einen Pfeil nach oben) gewählt. Verwendete Stämme: **a**, W14229 (niedrige Expression), **b**, W14383 (starke Expression; Genotyp a und b: $CDC14/ cdc14\text{-}delta::kanMX4\ ura3::pCDC14\text{-}CDC14(\Delta 426-430)\text{-}GFP\text{-}URA3$), **c**, W14231 (niedrige Expression), **d**, W14378 (starke Expression, Genotyp c und d: $CDC14/ cdc14\text{-}delta::kanMX4\ ura3::pCDC14\text{-}CDC14(\Delta 430-434)\text{-}GFP\text{-}URA3$). Proteinexpression vergleichbar mit endogenem Expressionslevel von Cdc14 war nicht hinreichend zur Komplementation von $\Delta cdc14$ (vgl. a und c). Erst nach einer Überexpression von $CDC14(\Delta 426-430)$ und $CDC14(\Delta 430-434)$ konnte die Deletion von $CDC14(\Delta cdc14)$ komplementiert werden (vgl. b und d, Komplementation angedeutet durch blaue Hervorhebung (Expressionsniveau: siehe Abb. 36). WT: Wildtyp-Allel, Δ : $\Delta cdc14$.

Bei genauer Betrachtung war feststellbar, dass sich die Co-Expression von $CDC14(\Delta 430-434)$ mit endogenem $CDC14$, negativ auf die Größe der Kolonien auswirkte (Abb. 40 d). Dies veranschaulichte, dass nicht nur die Überexpression von $CDC14$ (Visintin *et al.*, 1999), sondern auch von $CDC14(\Delta 430-434)$ einen negativen Einfluss auf die Zellen hat.

Als Ergänzung zu den GFP-Proteinfusionen wurden Komplementationsstudien mit Flag3-Epitopfusionen von Cdc14 durchgeführt, was diese Ergebnisse vergleichbar bestätigen konnte (Abb. 68).

4.4.3.3 Statistische Auswertung der Komplementationsanalysen

Alle untersuchten Konstrukte $pCDC14\text{-}CDC14\text{-}GFP$, $pCDC14\text{-}CDC14(TS\ 428/429\ AA)\text{-}GFP$, $pCDC14\text{-}CDC14(ASAA)\text{-}GFP$, $pCDC14\text{-}CDC14(\Delta 426-430)\text{-}GFP$ und $pCDC14\text{-}CDC14(\Delta 430-434)\text{-}GFP$ wurden am $URA3$ -Lokus stabil in das Genom eines diploiden Hefestammes integriert. Der für alle Komplementationsanalysen verwendete Stamm war heterozygot für die Deletion von $CDC14$. Die integrierten Konstrukte verteilen sich dabei unabhängig und können somit entweder mit dem Wildtyp-Allel von $CDC14$ oder mit $\Delta cdc14$ zusammenfallen. Zur statistischen Berechnung war das

Ereignis $\Delta cdc14$ mit entsprechendem integrierten Cdc14-Konstrukt von Interesse. Hierfür galt, dass die theoretische Wahrscheinlichkeit für diese Kombination in einem Viertel aller Sporen nach einer erfolgreichen Komplementation auftreten sollte (25%). Statistisch sollte folglich eine Spore aus einer Tetrade diesen Genotyp aufweisen. Für die Statistik wurden mehrere Tetraden gelegt und das Auftreten des Ereignisses $\Delta cdc14$ mit eingebrachtem Konstrukt (Tab. 1, das Auftreten dieses Ereignisses ist gekennzeichnet durch ein (+)-Zeichen) gezählt. Komplementierte das Konstrukt die Deletion nicht, so fand dieses Ereignis nicht statt (Tab. 1, das Auftreten dieses Ereignisses ist gekennzeichnet durch ein (-)-Zeichen).

CDC14-GFP als Kontrolle konnte in der Tetradenanalyse stets die Deletion von *CDC14* komplementieren (Kapitel 4.4.3). Dies war unabhängig von einer niedrigen Expression (21 von 34 erwarteten Sporen) oder von einer hohen Expression (14 von 12 erwarteten Sporen, Tab. 1).

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.4.3.1 und 4.4.3.2 zeigten, dass *CDC14(TS 428/429 AA)* ebenfalls, wenn es auf endogenem (11 von 12 erwarteten Sporen) sowie starkem Expressionsniveau (23 von 24 erwarteten Sporen) exprimiert wurde, $\Delta cdc14$ komplementieren konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass die Cdk1-Phosphorylierungsstelle nicht der Grund für den Verlust der *in vivo*-Funktion von Cdc14 gewesen sein dürfte. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse von *CDC14(ASAA)*, *CDC14($\Delta 426-430$)* und *CDC14($\Delta 430-434$)* miteinander, war auffällig, dass diese Konstrukte auf niedrigem Proteinniveau $\Delta cdc14$ nicht komplementieren konnten (Tab. 1, niedrige Expression). Erst nach starker Proteinexpression waren diese Konstrukte hinreichend zur Komplementation von $\Delta cdc14$ (Tab. 1, starke Expression).

Tab. 1: Quali- und quantitative Auswertung der Cdc14-Komplementationsanalysen mit C-terminalen GFP-Markierungen.

<i>pCDC14-...</i>	Niedrige Expression		Starke Expression	
<i>Cdc14-GFP</i>	+	21 von 34	+	14 von 12
<i>TS 428/429 AA-GFP</i>	+	11 von 12	+	23 von 24
<i>QPRK 432-435 ASAA-GFP</i>	-	0 von 33	+ (kleine Kolonien)	4 von 10
<i>$\Delta 426-430$-GFP</i>	-	0 von 22	+	12 von 12
<i>$\Delta 430-434$-GFP</i>	-	0 von 25	+	14 von 21

Nach höherer Expression komplementierten mit Cdc14(Δ 426-430) alle erwarteten Sporen (12 von 12). Die Komplementationsrate von Cdc14(Δ 430-434) (14 von 21 erwarteten Sporen) und Cdc14(ASAA) (4 von 10 erwarteten Sporen) war deutlich geringer. Außerdem war für CDC14(ASAA) ein intermediärer Phänotyp visualisierbar. Nach der Komplementation von Δ cdc14 waren die Kolonien deutlich kleiner als die Kolonien mit dem Wildtyp-Allel. Cdc14(ASAA) konnte im Vergleich zu den anderen untersuchten Derivaten, in denen Bereiche in der CTD entweder mutiert oder deletiert wurden, Δ cdc14 weniger gut komplementieren. Dies spricht für eine besondere Bedeutung für Cdc14 in dieser Region. Eine Relevanz im Bereich der AS 426-430 für die Funktion von Cdc14 konnte jedoch dennoch nicht ausgeschlossen werden.

4.5 Charakterisierung der essentiellen Region in der CTD

Die C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 (Kapitel 4.4) zusammen mit den Komplementationsanalysen (Kapitel 4.4.3.1, 4.4.3.2) wiesen darauf hin, dass es neben der katalytischen Domäne zusätzlich eine notwendige Region von Cdc14 in der CTD gab. Diese Region war auf zehn AS genau eingrenzbar und liegt in einem in Hefe konservierten Bereich, der die AS-Positionen 426-435 einschließt.

4.5.1 Charakterisierung im Zellzyklus und Wachstumstest

Um zu überprüfen, ob die Sporen mit Δ cdc14 und den integrierten Konstrukten *pCDC14-CDC14-GFP*, *pCDC14-CDC14(TS 428/429 AA)-GFP*, *pCDC14-CDC14(ASAA)-GFP*, *pCDC14-CDC14(Δ 426-430)-GFP* und *pCDC14-CDC14(Δ 430-434)-GFP* Auffälligkeiten im Zellzyklus zeigen, wurden eine durchflusszytometrische Analyse und ein Wachstumstest durchgeführt.

Für diese Analysen wurden die Stämme verwendet, die das entsprechende Konstrukt von *pCDC14-CDC14* überexprimierten (vgl. Abb. 36) und dadurch hinreichend waren Δ cdc14 zu komplementieren. Zur Charakterisierung der haploid lebensfähigen Komplementationsstämme wurde zunächst ein Wachstumstest mittels Verdünnungsreihe durchgeführt (Abb. 41). Dazu wurden die Zellen auf Vollmediumsplatten aufgebracht und jeweils bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert. Dokumentiert wurden die Platten nach einem und nach zwei Tagen.

Δ cdc14 mit *pCDC14-CDC14* diente dabei als Referenz. Sowohl Δ cdc14 zusammen mit dem mutierten Cdk-Motiv (*CDC14(TS 428/429 AA)*) als auch zusammen mit der Deletion der größeren Region die es miteinschließt (*CDC14(Δ 426-430)*), wuchsen vergleichbar mit dem Kontrollstamm. Geringfügig langsames Wachstum zeigten Δ cdc14 mit *CDC14(ASAA)* und mit *CDC14(Δ 430-434)*. Dieser Effekt war am ersten Tag bei 25°C (2. Verdünnung) und 30°C (3. Verdünnung), sowie nach zwei Tagen bei 25°C (3. und 4. Verdünnung) und 30°C (4. Verdünnung) am deutlichsten zu erkennen (Abb. 41).

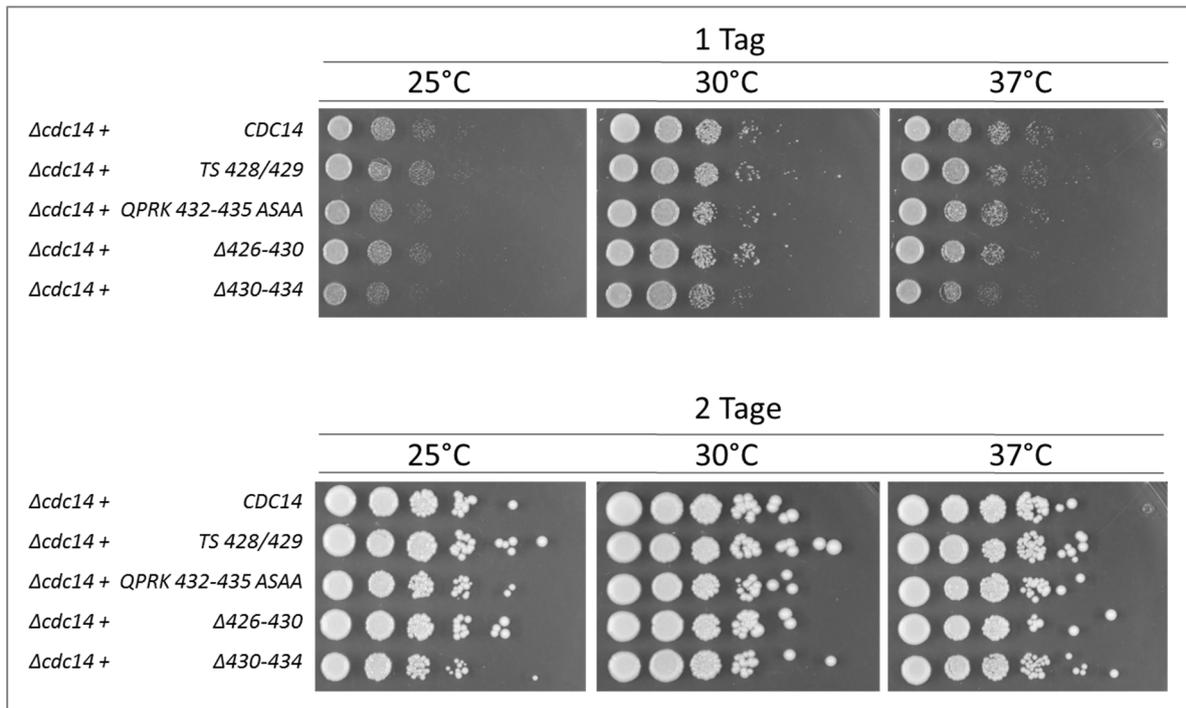


Abb. 41: Wachstumstest der haploiden Hefestämme mit veränderter TR-Sequenz von Cdc14. Zur Überprüfung der Cdc14-Konstrukte, die die Deletion von *CDC14* ($\Delta cdc14$) komplementierten, wurde ein Wachstumstest mittels Verdünnungsreihe durchgeführt. Dazu wurden die Sporen aus den Komplementationsstudien (Kapitel 4.4.3, 4.4.3.1 und 4.4.3.2), die durch die Überexpression die Deletion von $\Delta cdc14$ komplementierten, W14377: *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14-GFP-URA3*, W14577: *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(TS 428/429 AA)-GFP-URA3*, W14376: *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP-URA3*, W14385: *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14($\Delta 426-430$)-GFP-URA3* und W14586: *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14($\Delta 430-434$)-GFP-tCYC1-URA3* in einer Verdünnungsreihe auf Vollmediumsplatten aufgebracht und jeweils bei 25°C, 30°C und 37°C für ein bzw. zwei Tage inkubiert.

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit haploiden exponentiell wachsenden, asynchronen Zellen, angezogen in Raffinosemedium, durchgeführt (Abb. 42 a). Zur Erfassung der Zellen, die sich in der G1-Phase (1C-Peak) bzw. in der M-Phase (2C-Peak) des Zellzyklus befanden, wurden die jeweiligen Peaks quantifiziert und über die Gesamtzellzahl (20 000 Zellen) die Zellzahl in der jeweiligen Zellzyklusphase berechnet. Zur Auswertung wurde die Gesamtzellzahl auf 100 Prozent normiert und der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase (zwischen 1C und 2C) davon abgezogen (Abb. 42 b).

Die Auswertung der Durchflusszytometrie (Abb. 42 b) zeigte, dass sich 20% der Kontrollzellen ($\Delta cdc14+$ *CDC14*) in der G1-Phase und 56% in der M-Phase befanden. Zellen mit $\Delta cdc14$ und Cdc14(TS 428/429 AA) zeigten eine vergleichbare Verteilung, da sich 19% aller Zellen in der G1-Phase und 65% in der M-Phase (9% mehr als in der Kontrolle) befanden.

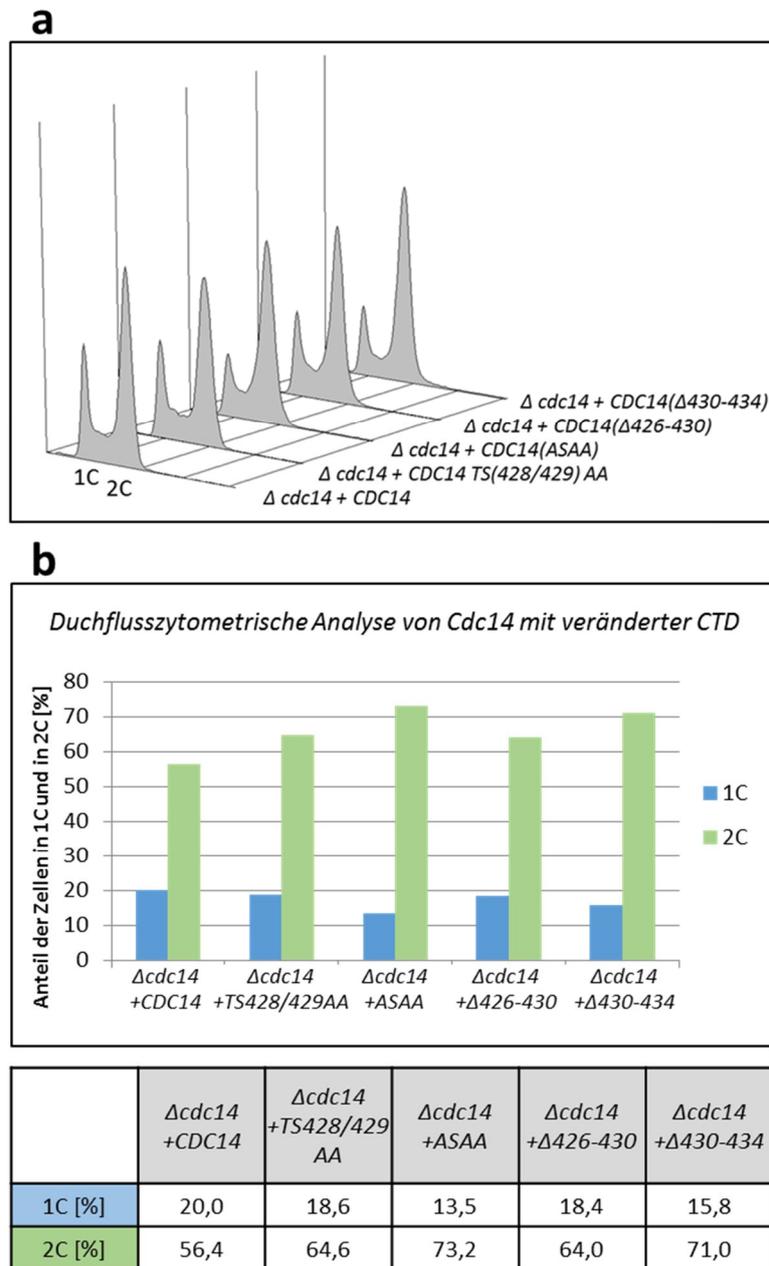


Abb. 42: Durchflusszytometrische Analyse der $\Delta cdc14$ komplementierenden $CDC14$ -Konstrukte. Die Sporen, die die Deletion von $CDC14(\Delta cdc14)$ komplementieren konnten, wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden exponentiell in XYR-Medium wachsende, asynchrone Hefezellen zur Durchflusszytometrie aufgearbeitet. **a**, Durchflusszytometrisches Profil der $CDC14$ -GFP Konstrukte, die nach einer Überexpression $\Delta cdc14$ komplementierten. Untersuchte Stämme: W14377 ($cdc14$ -delta::*kanMX4 ura3*::*pCDC14-CDC14-GFP-URA3*), W14577 ($cdc14$ -delta::*kanMX4 ura3*::*pCDC14-CDC14(TS 428/429 AA)-GFP-URA3*), W14376 ($cdc14$ -delta::*kanMX4 ura3*::*pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP-URA3*), W14385 ($cdc14$ -delta::*kanMX4 ura3*::*pCDC14-CDC14(Δ426-430)-GFP-URA3*) und W14586 ($cdc14$ -delta::*kanMX4 ura3*::*pCDC14-CDC14(Δ430-434)-GFP-tCYC1-URA3*). 1C-Peak: unreplizierter Chromosomensatz, 2C-Peak: replizierter Chromosomensatz der haploiden Hefezellen. **b**, Graphische Darstellung aller zur durchflusszytometrischen Analyse verwendeten Zellen (Stämme mit den jeweiligem Genotyp aus (a)) mit unrepliziertem Chromosomensatz (1C, G1-Phase) bzw. repliziertem Chromosomensatz (2C, G2-M-Phase) in Prozent [%]. Für diese Auswertung wurde über die Fläche des 1C- und des 2C-Peaks die Summe der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase berechnet. Zellen in der S-Phase (zwischen 1C und 2C) wurden ausgeschlossen.

Δcdc14 mit *Cdc14(Δ426-430)* wies im Vergleich zu *Cdc14(TS 428/429 AA)* ein sehr ähnliches Zellzyklusprofil auf, da 18% der Zellen in der G1-Phase und 64% in der M-Phase waren (8% mehr als die Kontrollzellen). Auffälligere Abweichungen zeigten jedoch *Δcdc14 Cdc14(ASAA)* und *Δcdc14 Cdc14(Δ430-434)*. 16% der Zellen mit *Δcdc14 Cdc14(Δ430-434)* befanden sich in der G1-Phase, jedoch nur 14% der Zellen mit *Δcdc14 Cdc14(ASAA)*. In diesen Zellen dauerte dadurch die M-Phase länger, da sich 71% der Zellen mit *Δcdc14 Cdc14(Δ430-434)* und 73% der Zellen mit *Δcdc14 Cdc14(ASAA)* in dieser Zellzyklusphase befanden. Alle untersuchten *Δcdc14* komplementierenden Sporen zeigten eine Verschiebung hin zur Mitosephase. In Zellen mit *Cdc14(Δ430-434)* dauerte die M-Phase 15% und in Zellen mit *Cdc14(ASAA)* 17% länger als die der Kontrollzellen.

Die Ergebnisse des Wachstumstests und der durchflusszytometrischen Analyse zeigten, dass insbesondere Zellen mit dem mutierten QPRK-Motiv (432-435) und der internen Deletion in diesem Bereich ($\Delta 430-434$) langsamer wuchsen und sich im Speziellen länger in der Mitosephase befanden. Dieser Effekt war weniger deutlich in Zellen mit *Cdc14(TS 428/429 AA)* und *Cdc14(Δ426-430)*, jedoch zeigten auch diese Zellen eine längere Mitosephase als Zellen mit unverändertem *Cdc14*.

4.5.2 Manipulation der CTD führt zu einer veränderten Freisetzung

Für alle in den Komplementationsstudien untersuchten Konstrukte mit Veränderungen der TR2-Region (*pCDC14-CDC14 (TS 428/429 AA)-GFP*, *pCDC14-CDC14(ASAA)-GFP*, *pCDC14-CDC14(Δ426-430)-GFP* und *pCDC14-CDC14(Δ430-434)-GFP*), wurde in der durchflusszytometrischen Analyse im Vergleich zur Referenz *pCDC14-CDC14-GFP* eine verlängerte Mitosephase festgestellt (Kapitel 4.5.1). Da dadurch bereits gezeigt werden konnte, dass diese Region wichtig ist, war es interessant Einblicke in dessen Funktion zu gewinnen. So war denkbar, dass die Veränderung dieser Sequenz einen Einfluss auf die Lokalisation haben könnte. Zur Analyse wurden in einem Vergleich haploide Hefezellen mit *CDC14(Δ426-430)-GFP Δcdc14* und *CDC14(Δ426-430)-GFP* zusammen mit dem Wildtyp-*CDC14*-Allel mikroskopiert (Abb. 43).

Während der Interphase war *Cdc14(Δ426-430)-GFP* neben der zu erwartenden nukleolären, sichelförmigen Struktur auch als zusätzlicher Punkt zu sehen. Dieses Fluoreszenzsignal zeigte sich sowohl in Abwesenheit (Abb. 43 a) als auch in Anwesenheit von *Cdc14* (Abb. 43 b). In der Anaphase lokalisierte *Cdc14(Δ426-430)-GFP* als einzelner prominenter Punkt in der Tochterzelle und mit geringerer Intensität in der Mutterzelle, was mit der Lokalisation von Wildtyp-*Cdc14* in dieser Zellzyklusphase vergleichbar ist (Abb. 8 b).

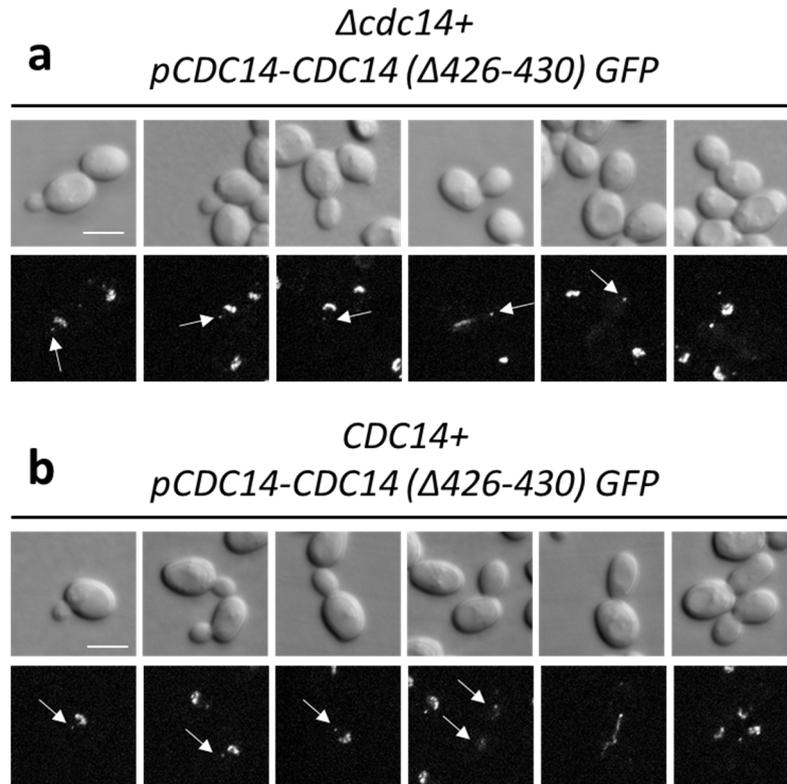


Abb. 43: Lokalisation von Cdc14(Δ426-430) im Zellzyklus. Die Lokalisation von Cdc14(Δ426-430)-GFP wurde mittels konfokaler Spinning Disk-Mikroskopie in Zellen mit *Δcdc14* und dem Wildtyp-Allel *CDC14* untersucht. Beide haploiden Hefestämme kamen aus der selben Tetrade und unterschieden sich nur durch das Allel, *Δcdc14* bzw. *CDC14*. *CDC14(Δ426-430)-GFP*, exprimiert durch den endogenen *CDC14*-Promotor, wurde in beiden Stämmen im *URA3*-Marker integriert und konnte durch die Überexpression von *CDC14(Δ426-430)* *Δcdc14* komplementieren. Zur Kontrolle wurde die Lokalisation von Cdc14(Δ426-430)-GFP in Zellen mit dem Wildtyp-Allel von *CDC14* verglichen. **a**, Lokalisation von W14385 (*cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-GFP-URA3*) verglichen mit **b**, W14384 (*CDC14 cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-GFP-URA3*). Erste Zeile: Zellen im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Zeile: die Lokalisation von Cdc14 (Δ426-430)-GFP. (Maßstabsbalken = 5 µm).

In der Anaphase konnte kein Unterschied zwischen Cdc14(Δ426-430) mit *Δcdc14* oder dem Wildtyp-Allel von *CDC14* festgestellt werden (Abb. 43 a, fünfte Spalte vgl. mit b vierte Spalte und a, vierte Spalte vgl. mit b fünfte Spalte).

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte Cdc14(ASAA) die auffälligste Verlängerung der Mitosephase (Kapitel 4.5.1). Fraglich war deshalb, ob Cdc14(ASAA) ebenfalls eine punktförmige Lokalisation in Interphasezellen zeigt. So war interessant zu prüfen, ob Cdc14(ASAA) vergleichbar mit Cdc14(Δ426-430) lokalisiert und zusätzlich, ob Cdc14(ASAA) am SPK co-lokalisiert. Dafür exprimierten die Zellen zusätzlich ein Konstrukt zur Visualisierung des SPK (*Spc42-3mCherry*).

Cdc14(ASAA)-GFP wies ebenfalls das punktförmige Muster während der Interphase auf. Nach Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle zeigte sich tatsächlich eine Co-Lokalisation von Cdc14(ASAA)-GFP mit dem Spindelpolprotein (Abb. 44). Außerdem war Cdc14(ASAA), analog zu

Cdc14(Δ 426-430), bereits in Prä-Anaphasezellen als punktförmiges Signal gegenüber der nukleolären halbmondförmigen Struktur detektierbar.

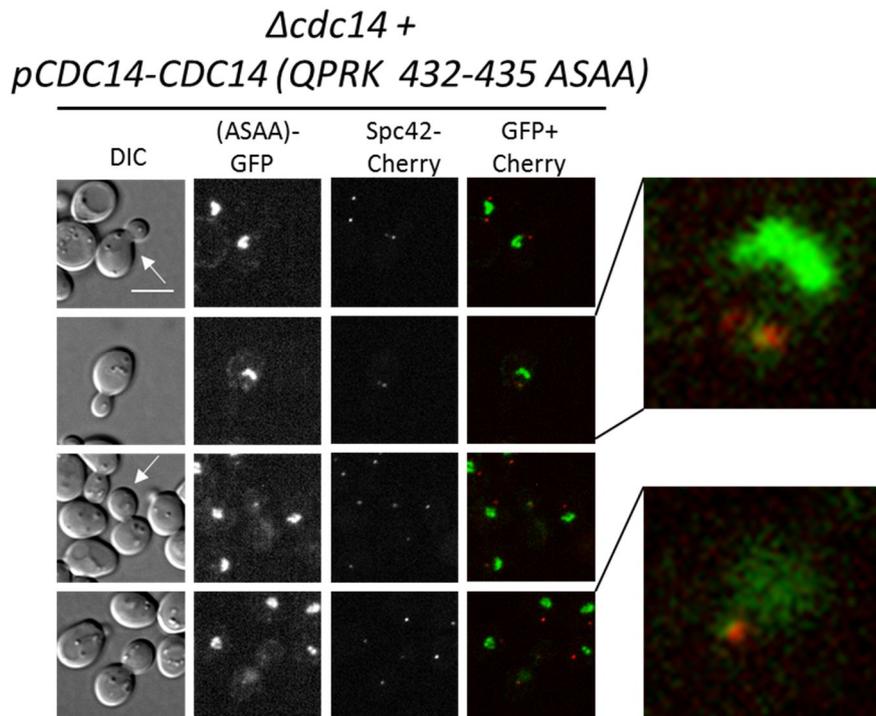


Abb. 44: Co-Lokalisation von Cdc14(ASAA) mit dem SPK der Tochterzelle. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen asynchroner, haploider Hefzellen von Cdc14(QPRK 432-435 ASAA) mit $\Delta cdc14$ (W14505, *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mcherry-tCYC1-TRP1*). Zur Co-Lokalisation wurde das Spindelpolprotein Spc42 fusioniert an ein rotes Fluoreszenzprotein (Abgekürzt: Spc42-Cherry, genau: Spc42-3mCherry) verwendet. Cdc14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP lokalisierte zusammen mit dem SPK der Tochterzelle (intensiveres Fluoreszenzsignal von Spc42) in jeder Zellzyklusphase. Erste Spalte: die Zellmorphologie im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: das Fluoreszenzsignal von Cdc14(ASAA)-GFP, dritte Spalte: zur Co-Lokalisation Spc42-3mCherry (Spc42-Cherry), vierte Spalte: die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Der Maßstab ist 5 μ m lang.

Nun sollte getestet werden, ob das veränderte Lokalisationsmuster von Cdc14(Δ 426-430)-GFP (Kapitel 4.5.2) und Cdc14(ASAA)-GFP durch die Überexpression dieser Konstrukte verursacht wurde. Um dies zu überprüfen, wurden statische Auswertungen von Cdc14(ASAA)-GFP zusammen mit Cdc14-GFP als Kontrolle mit vergleichbarem Proteinexpressionslevel durchgeführt (Abb. 36) und absolute Zahlen für die Statistik verwendet (Abb. 45). Von den 143 untersuchten Zellen war in insgesamt 9 Zellen Cdc14 am SPK lokalisiert (6,3%). Dabei war das Signal von Cdc14-GFP in einer Zelle während der Interphase am SPK detektierbar (0,7%). Deutlich anders war der Effekt mit Cdc14(ASAA)-GFP. Von insgesamt 89 untersuchten Zellen, war Cdc14(ASAA)-GFP in 39 Zellen am SPK visualisierbar (43,8%), wobei Cdc14 in 23 Zellen vor der Anaphase am SPK lokalisierte (25,8%).

Da Wildtyp-Cdc14, als Referenz, auf einem vergleichbaren Niveau exprimiert wurde (vgl. Abb. 36), kann dieses Muster nicht durch eine erhöhte Expression erklärt werden. So kann gezeigt werden, dass die Integrität dieser Region essentiell für die Lokalisation von Cdc14 ist.

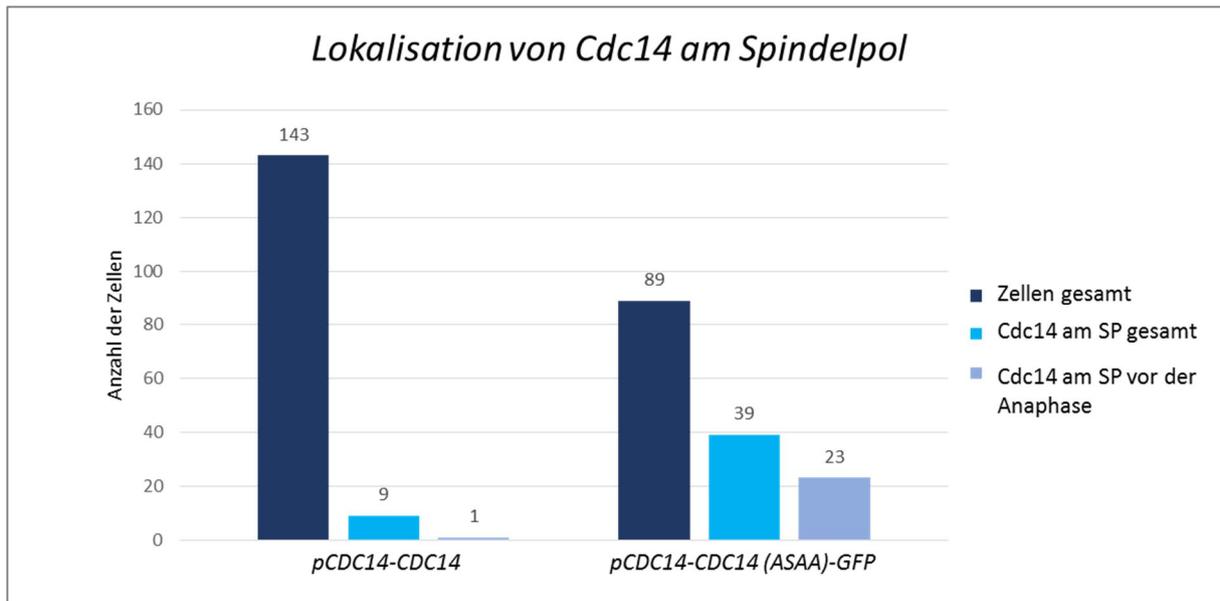


Abb. 45: Verstärkte Lokalisation von Cdc14(ASAA) am SPK. Statistische Erfassung der mikroskopierten Hefezellen, die eine Lokalisation am SPK zeigten. Aufgetragen wurde die Summe der beobachteten Zellen (dunkelblau, Zellen gesamt), die insgesamt eine Spindelpollokalisation (SP) zeigten (türkis, Cdc14 am SP gesamt) und davon die Zellen, die bereits vor der Anaphase am SPK lokalisierten (hellblau, Cdc14 am SP vor der Anaphase). Als Zeitpunkt vor der Anaphase wurde die bestehende Lokalisation von Cdc14 im Nukleolus festgesetzt. Verglichen wurden dabei Cdc14-GFP (W14377, *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14-GFP-URA3*) als Kontrolle mit Cdc14(ASAA)-GFP (W14376, *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP-URA3*).

4.5.3 Verlängerung der Anaphase nach Manipulation des essentiellen Bereichs

4.5.3.1 Zunehmende Dauer der Spindelelongation

Nun war interessant zu untersuchen, inwieweit Cdc14(Δ 426-430) den Zellzyklus in *S. cerevisiae* beeinflusst. Dazu wurden Zeitrafferaufnahmen mit Tubulin als Zellzyklusmarker für die Spindelelongation angefertigt.

Zur Analyse von Cdc14(Δ 426-430) mit weiteren Proteinen im Zellzyklus, wurde eine Cdc14-Version ohne GFP-Fusion erstellt (*pCDC14-CDC14(Δ 426-430)-FLAG3*). Dieses Konstrukt mit Flag3-Epitop wurde in den *URA3*-Marker des Komplementationsausgangsstammes (*CDC14/ Δ cdc14*) integriert, mittels SDS-PAGE ein Klon mit einer geeigneten Proteinmenge (Abb. 67) gewählt und anschließend Komplementationsstudien durchgeführt. Dabei wurde ein Klon mit einer Expressionsstärke gewählt, der *Δ cdc14* komplementierte (Abb. 46, Komplementation hervorgehoben durch blaue Hinterlegung).

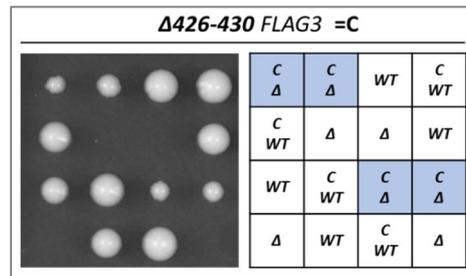


Abb. 46: Komplementation von $\Delta cdc14$ nach Expression von $CDC14(\Delta 426-430)$ -FLAG3. Zur Komplementationsanalyse wurde das Plasmid pWS4777 ($pCDC14$ - $CDC14(\Delta 426-430)$ - $FLAG3$ - $URA3$ =C) am $URA3$ -Lokus des Komplementationsausgangsstammes W14087 ($CDC14/\delta$ $cdc14$ - $kanMX6$) integriert und anschließend eine Tetradenanalyse mit diesem diploiden Hefestamm (W14495, $CDC14/cdc14$ - $\delta::kanMX4$ $ura3::pCDC14$ - $CDC14(\Delta 426-430)$ - $FLAG3$ - $tCYC1$ - $URA3$) durchgeführt. $Cdc14(\Delta 426-430)$ -Flag3 komplementierte $\Delta cdc14$ (angedeutet durch blaue Hervorhebung), die Sporen wuchsen jedoch zu kleineren Kolonien im Vergleich zu den Sporen mit dem Wildtyp-Allel von $CDC14$ ($CDC14$ bzw. $CDC14 + C$) heran. WT: Wildtyp-Allel, Δ : $\Delta cdc14$.

Während der Zellteilung ist die Formation der MT-spindeln essentiell zur Aufteilung der Chromosomen von der Mutter- in die Tochterzelle. Die Formation der Spindel ist dabei komplex: In *S. cerevisiae* werden die Spindeln von einem Mikrotubuli-Organisationszentrum (*microtubuli-organizing center*, MTOC) dem sogenannten SPK assembliert (Khmelinskii *et al.*, 2007). Während der späten G1-Phase bzw. der frühen S-Phase wird der SPK für die spätere Chromosomentrennung dupliziert (Winey und O'Toole, 2001). Die Spindel in der Mitose setzt sich dabei aus MT zusammen, die entweder vom SPK aus mit dem Kinetochor assoziiert sind oder ausgehend vom SPK der Mutterzelle mit den MT ausgehend vom SPK der Tochterzelle überlappen (Khmelinskii *et al.*, 2007). Treten die Zellen in die Metaphase ein, nimmt die Dynamik der MTs zu, bis sie in der Anaphase stabilisiert werden (Pereira und Schiebel, 2003). Nach erfolgreicher Chromosomentrennung depolymerisieren die Spindeln wieder.

Zur Visualisierung im Zellzyklus wurde α -Tubulin (Tub1) als Marker verwendet. Dabei bildet Tub1 zusammen mit β -Tubulin (Tub2) ein Dimer, um die MT zu formen. Dazu wurde ein Hefestamm mit einer GFP-Fusion an Tub1 zur Visualisierung der Spindel zusammen mit dem roten Kernmarker Cherry-NLS verwendet. Zur Erstellung eines geeigneten Stammes für die Mikroskopie wurde der Hefestamm mit Tub1-GFP Cherry-NLS mit einer Spore, die $\Delta cdc14$ komplementierte (Abb. 46) verkreuzt, eine Tetradenanalyse durchgeführt und daraus eine geeignete Spore gewählt (Abb. 48 c, blaue Hervorhebung). Wie zuvor bereits in den Komplementationsanalysen mit den GFP-Fusionen beobachtet, waren auch hier die Kolonien der $\Delta cdc14$ komplementierenden Sporen mit $CDC14(\Delta 426-430)$ - $FLAG3$ kleiner als Wildtyp-Kolonien. Dieser Phänotyp tritt ebenfalls zusammen mit $TUB1$ und $Cherry$ -NLS auf (Abb. 48 c). Als Referenz diente der Hefestamm mit $TUB1$ -GFP $Cherry$ -NLS mit dem Wildtyp-Allel von $CDC14$.

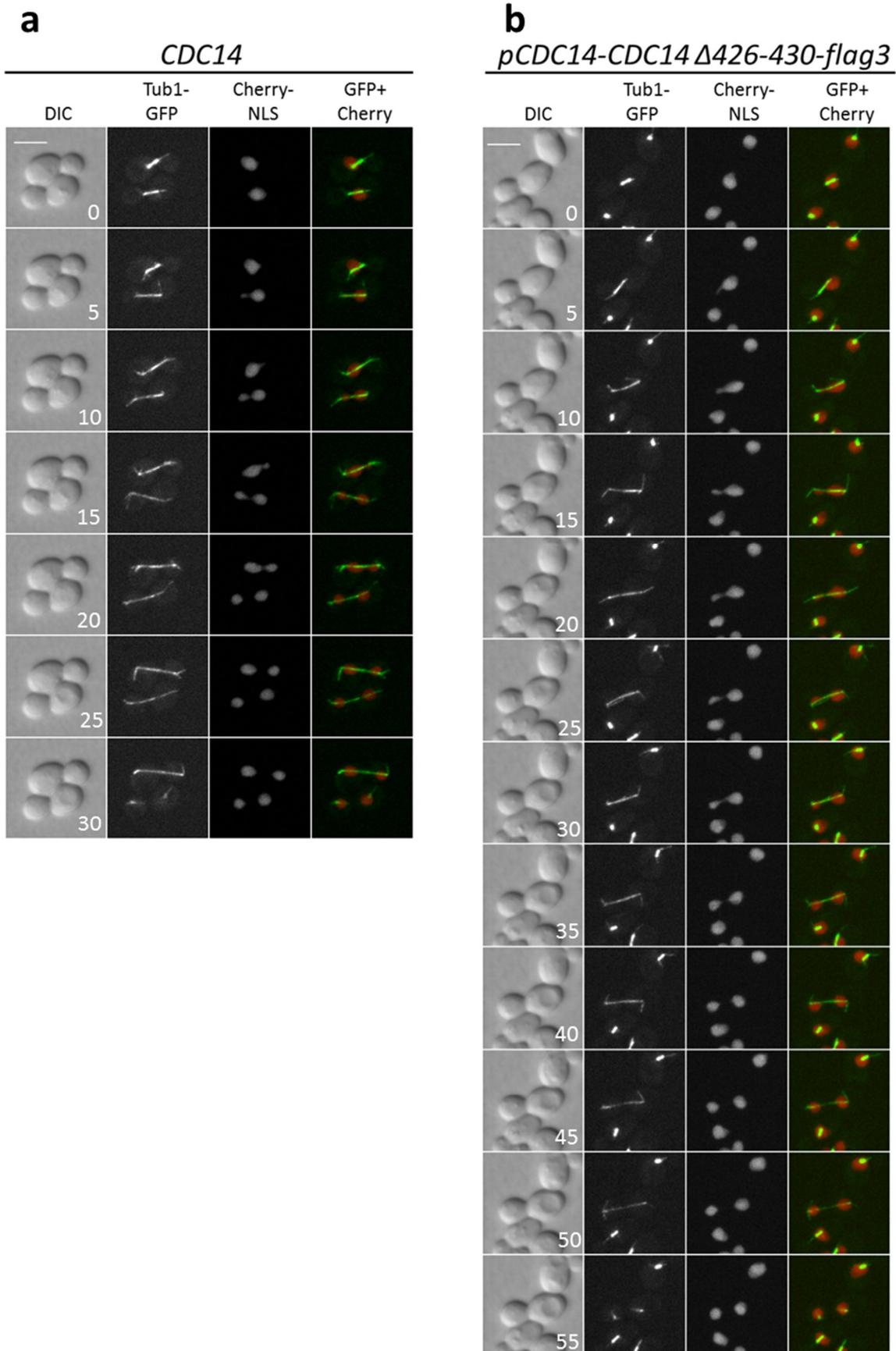


Abb. 47: Beeinträchtigung der Spindelelongation in Zellen mit *Cdc14(Δ426-430)*. Die Dauer der Spindelelongation visualisiert durch das Spindelprotein Tubulin (Tub1-GFP) in Zellen mit endogenem *Cdc14* im Vergleich zu Zellen mit $\Delta cdc14$ komplementiert durch *CDC14(Δ426-430)* wurde analysiert. Dargestellt sind

Zeitrafferaufnahmen von haploiden Hefezellen von **a**, W12996 (*trp1::TUB1-GFP-TRP1 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) mit **b**, W14718 (*cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ 426-430)FLAG3-tCYC1-URA3 trp1::TUB1-GFP-TRP1 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*, haploider Nachkomme nach Tetradenanalyse von W14495 vgl. Abb. 46, verkeuzt mit W12996. Die Filme wurden in Intervallen von fünf Minuten aufgenommen. Zeitpunkt $t=0$ ist der Beginn der Kernteilung und somit als Beginn der Anaphase festgesetzt. Die Filme enden jeweils nach der Depolymerisation des Tubulin. Erste Spalte: die Zellen im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: die Lokalisation von Tubulin, dritte Spalte: als Marker für die Kernlokalisierung Cherry-NLS, vierte Spalte: die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Die Maßstabballenlänge beträgt 5 μm .

Die Zeitrafferaufnahmen wurden in Intervallen von fünf Minuten über den ganzen Zellzyklus aufgenommen und so die Lokalisation von Tubulin während der Kernteilung verfolgt. In den Kontrollzellen elongierte die Spindel mit der beginnenden Kernteilung. Als Zeitpunkt $t=0$ wurde der Beginn der Kernteilung als beginnende Anaphase im Zellzyklus definiert. In der späten Anaphase, die an der bestehenden Nukleoplasmabrücke zwischen den beiden Zellkernen erkennbar ist, elongierte die Spindel weiter und depolymerisierte anschließend abrupt (Abb. 47 a, $t=30$, b, $t=55$). In den Zellen mit *CDC14(Δ 426-430)* dauerte die Kernteilung und die Spindelelongation im Vergleich zur Kontrolle deutlich länger (Abb. 47 a, vgl. mit Abb. 47 b). Die Spindel in *CDC14(Δ 426-430)*-Zellen dehnte sich während der Kernteilung aus (Abb. 47 b, $t=20$ min), verkürzte sich anschließend (Abb. 47 b, $t=30$ min) und wurde schließlich wieder länger (Abb. 47 b, $t=45$ min). Die zunehmende Dauer der Kernteilung sowie der Spindelelongation deuten somit gleichzeitig auf eine Verlängerung der Anaphase hin.

Um die in der Mikroskopie beobachtete Zunahme der Spindelelongationsdauer statistisch zu erfassen, wurde die Spindelelongation von Einzelzellen zeitabhängig graphisch dargestellt (Abb. 48 a, Grüntöne: Cdc14 Kontrolle, $n=10$, Blautöne: Cdc14(Δ 426-430), $n=7$). Dafür wurde pro Zelle zu jedem Zeitwert ab der beginnenden Kernteilung die Länge des Tubulin-GFP-Signals mit ImageJ drei Mal gemessen und davon der Mittelwert gebildet.

Zur weiteren Analyse wurden als Markerpunkte die erreichte Gesamtspindellänge und die Gesamtdauer der Spindelelongation festgesetzt (Abb. 48 b).

Die Daten zeigen, dass die Gesamtspindellänge in Zellen mit *CDC14(Δ 426-430)* nicht zunimmt, sondern im Vergleich zur Kontrolle ($7,1 \mu\text{m} \pm 1,0$, Abb. 48 b) sogar etwas kürzer war ($6,5 \mu\text{m} \pm 0,9$, Abb. 48 b). Die Gesamtdauer der Spindelelongation in Zellen mit *CDC14(Δ 426-430)*, im Vergleich zur Kontrolle ($33,0 \text{ min} \pm 2,6$), nahm dabei deutlich zu ($54,3 \text{ min} \pm 12,0$, Abb. 48 b). Zudem war auffällig, dass auch die Schwankungsbreite zunahm. Diese Ergebnisse werden durch Studien unterstützt, die eine veränderte Cdc14-Aktivität mit einer längeren Spindelelongation korrelieren konnten (Khmelniskii *et al*, 2007). Somit kann durch die deutliche Zunahme der Spindelelongation von *CDC14(Δ 426-430)*-Zellen auf eine längere Anaphase geschlossen werden.

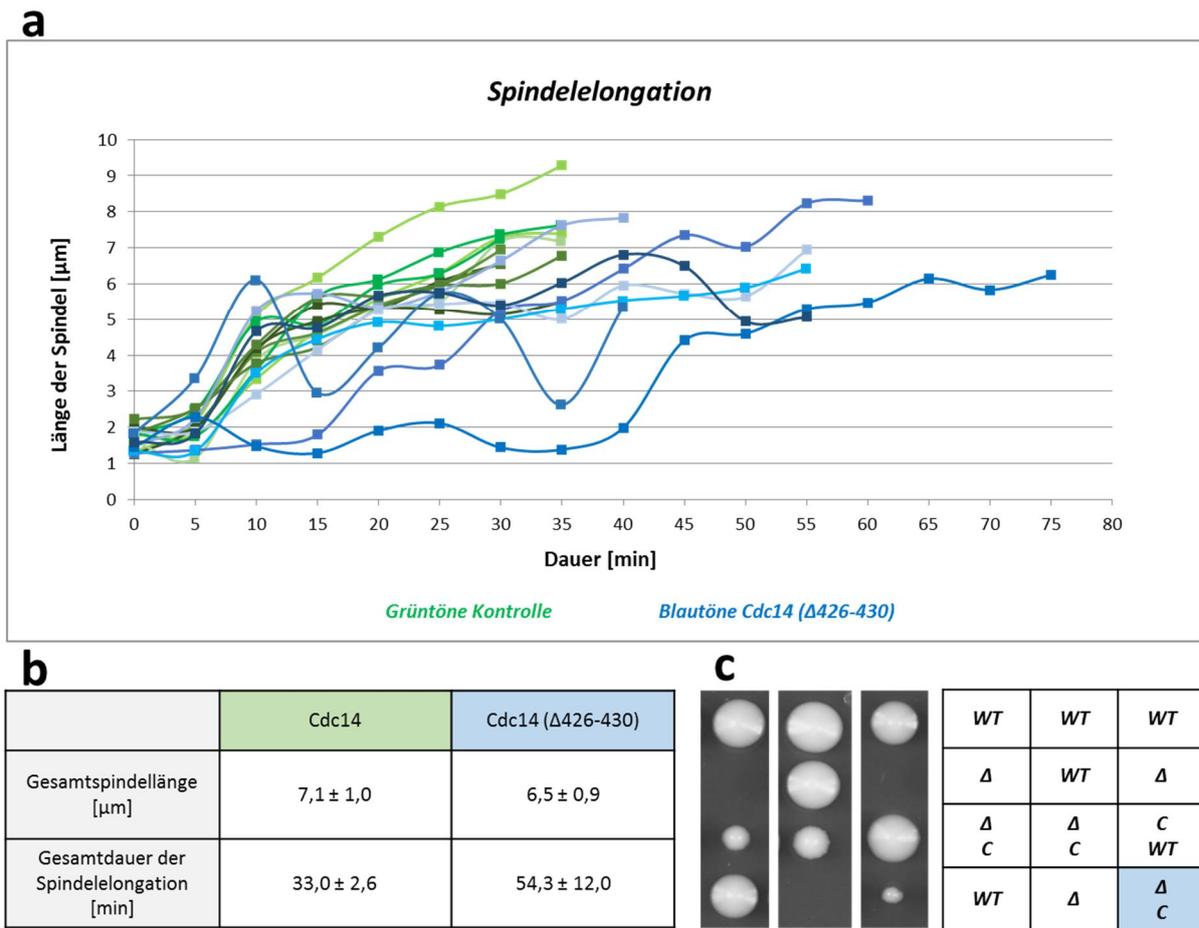


Abb. 48: Graphische und statistische Auswertung der Spindelelongation in Zellen mit Cdc14(Δ426-430) Δcdc14. Graphische Darstellung der Spindelelongation in Kontrollzellen mit endogenem Cdc14 (W12996, *trp1::TUB1-GFP-TRP1 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*, „Grüntöne Kontrolle“, n=10) und in Zellen mit Cdc14(Δ426-430), die Δcdc14 komplementierten (W14718, *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)FLAG3-tCYC1-URA3 trp1::TUB1-GFP-TRP1 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*, „Blautöne Cdc14 (Δ426-430)“, n=7) mit zugehöriger Tetradenanalyse **a**, Aufgetragen sind die Dauer [min] der Spindelelongation vom Beginn der Kernteilung (t=0) gegen die Länge der Tubulinspindel [µm]. **b**, Statistische Auswertung der Gesamtspindellänge [µm] mit deren Standardabweichung sowie die Gesamtdauer [min] der Spindelelongation mit der entsprechenden Standardabweichung in Zellen mit endogenem Cdc14 bzw. in Zellen mit Cdc14(Δ426-430) Δcdc14. **c**, Die zur Mikroskopie verwendete Spore (blaue Hervorhebung) zur Visualisierung des Phänotyps der kleinen Kolonien in Zellen mit *CDC14(Δ426-430) Δcdc14* (W14718). C: Cdc14(Δ426-430), WT: Wildtyp-Allel, Δ: Δcdc14.

4.5.3.2 Beeinflussung der Ase1-Lokalisation durch Cdc14(Δ426-430)

Die Analyse der Spindelelongation visualisiert durch Tubulin (Kapitel 4.5.3.1) lässt auf eine verlängerte Anaphase in Zellen schließen, die eine interne Deletion von Cdc14 im essentiellen Bereich der CTD trugen (Δ426-430). Ein weiteres Protein, das mit der Spindel assoziiert, aber zugleich ein direktes Substrat von Cdc14 ist, ist Ase1 (Khmelinskii *et al*, 2007).

Ase1 ist notwendig zur Assemblierung der *spindle midzone* in der Mitose. Das ist der Bereich, in dem sich die MT-Spindeln, ausgehend von den beiden SPKs, überlappen. Zusammen mit dem Separase Esp1-Slk19-Komplex ist Ase1 notwendig, um die *spindle midzone* zu fokussieren und sie anschließend

zu stabilisieren. Zu diesem Zweck muss die korrekte Dephosphorylierung von Ase1 durch Cdc14 in der frühen Anaphase gewährleistet werden (Khmelniskii *et al.*, 2007). Wird Ase1 nicht ausreichend dephosphoryliert, kommt es zu einer veränderten Lokalisation der Proteine in der *spindle midzone* und die Spindel elongation in der späten Anaphase ist verlangsamt. Die Regulation der *spindle midzone* durch Cdc14 läuft zum einen direkt über die Dephosphorylierung von Ase1 ab, zum anderen indirekt durch den Separase Esp1-Slk19-Komplex (Khmelniskii *et al.*, 2007). Nach der Depolymerisation der mitotischen Spindel erfolgt die Degradation von Ase1 APC/C-vermittelt mit dem Aktivatorprotein Hct1 (Khmelniskii *et al.*, 2007).

Nun stellte sich die Frage, ob auch die Lokalisation von Ase1 als direktes Substrat von Cdc14 durch die Deletion der AS 426-430 in der TR2-Sequenz innerhalb der CTD beeinflusst ist.

Dafür wurde ein Hefestamm mit einer GFP-Fusion von Ase1 (Ase1-GFP) mit *CDC14(Δ426-430)-FLAG3 Δcdc14* (Abb. 46) verkreuzt und eine Tetradenanalyse durchgeführt. Nach der Auswertung der Tetradenanalyse wurde eine Spore mit dem geeigneten Genotyp gewählt (Abb. 50 d).

Zur Visualisierung von Ase1-GFP mit dem Kernmarker in Zellen mit dem genetischen Hintergrund *CDC14(Δ426-430) Δcdc14* wurde ein Film in Intervallen von fünf Minuten angefertigt und der Zellzyklus verfolgt. In Zellen mit dem Wildtyp-Allel von *CDC14* war Ase1 bereits zu Beginn der Kernteilung im Zellkern der Mutterzelle zu erkennen (Abb. 49 a, t=0 bis t=5 min). Mit zunehmender Kernteilung, während die Nukleoplasmabrücke sichtbar war, akkumulierte Ase1 zwischen den beiden Zellkernen, was auf eine erfolgreiche Assemblierung der *spindle midzone* hinwies (Abb. 49 a, t= 20 min). Anschließend wurde das Ase1-GFP Signal immer kürzer (Abb. 49 a, t=35 min), bis es ganz verschwand (Abb. 49 a, t=40 min). Das Fluoreszenzsignal von Zellen mit *Cdc14(Δ426-430)* wich dabei deutlich von der Kontrolle ab. Mit beginnender Kernteilung (Abb. 49 b, t=0 min) war das Ase1-Signal ausgedehnter als in der Kontrolle (vgl. Abb. 49 a, t=0 bis 15 min mit Abb. 49 b, t=0 min). Dieser Phänotyp lässt zwei mögliche Schlüsse zu: Die veränderte Ase1-Lokalisation könnte bedeuten, dass in diesen Zellen insgesamt die Assemblierung der *spindle midzone* beeinträchtigt ist. Möglich wäre auch, dass die *spindle midzone* intakt ausgebildet wird, jedoch nur die Lokalisation von Ase1 beeinflusst ist. Diese Ausdehnung von Ase1 in Zellen mit *Cdc14(Δ426-430)* über den gesamten Zellzyklus (Abb. 49 b) kann durch eine unzureichende Dephosphorylierung von Ase1 durch *Cdc14(Δ426-430)* zustande kommen. Das würde bedeuten, dass *Cdc14(Δ426-430)* *in vivo* eine schlechtere Phosphatasefunktion aufweist. Khmelniskii *et al.* (2007) beobachteten bereits einen sehr ähnlichen Phänotyp in temperatursensitiven *cdc14-3* Mutanten. In ihrem Experiment erstreckte sich Ase1 entlang der elongierten Spindel oder war zu einem der beiden SPKs verschoben und damit nicht mittig lokalisiert. Dieser Phänotyp ist vergleichbar auch in Zellen mit *Cdc14(Δ426-430)* zu erkennen (Abb. 49 b, Abb. 50 b unten).

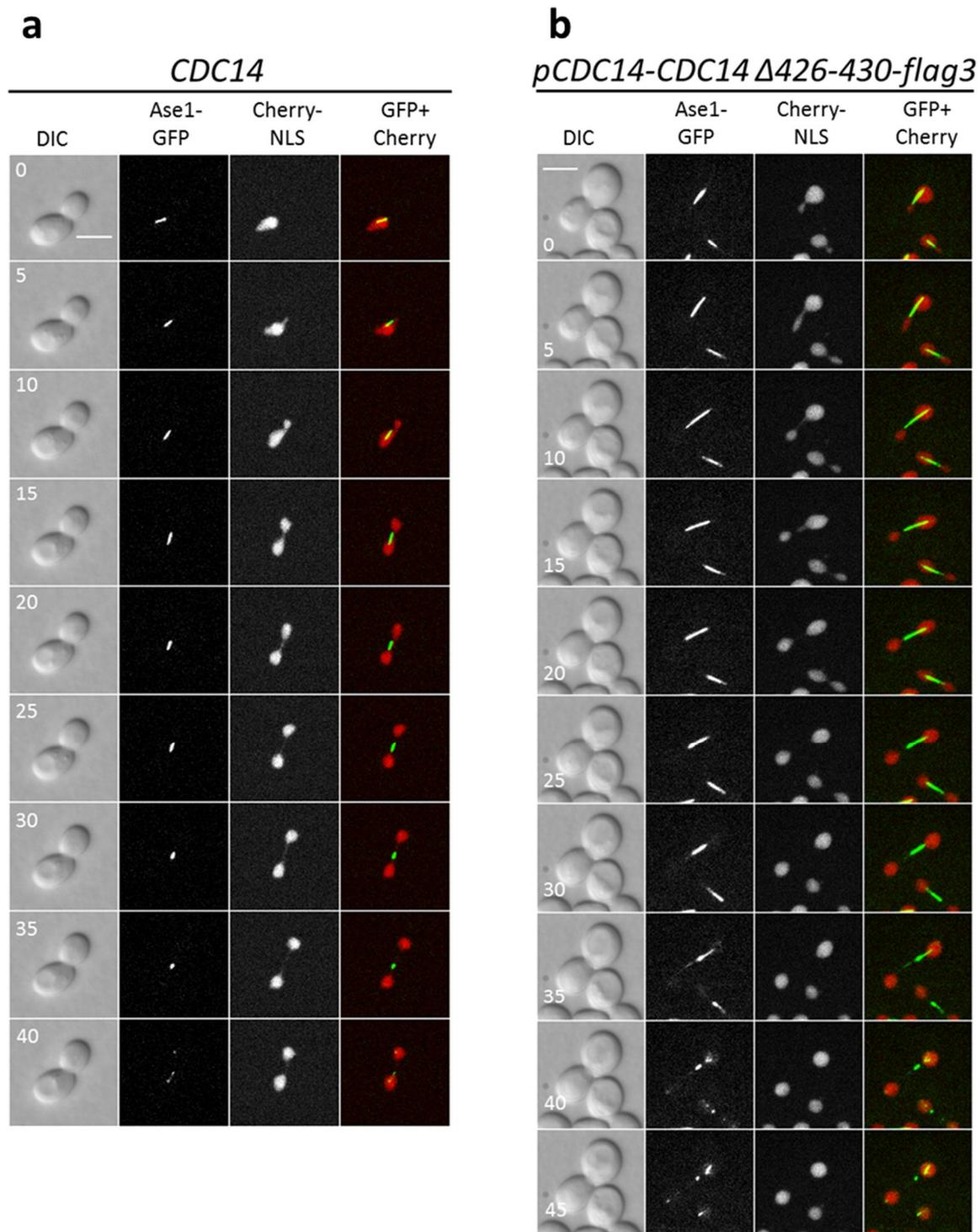


Abb. 49: Beeinträchtigung der *spindle midzone* in Zellen mit *Cdc14(Δ426-430)*. Die Lokalisation der *spindle midzone* visualisiert durch Ase1-GFP wurde durch Zeitrafferaufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie in Zellen mit endogenem *CDC14* und Zellen mit *CDC14(Δ426-430) Δcdc14* untersucht. Dargestellt sind Filme von haploiden Hefezellen von **a**, W14715 (*ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) und **b**, W14882 (*cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)FLAG3-tCYC1-URA3 ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*, haploider Nachkomme nach Tetradenanalyse von W14715 verkreuzt mit dem Nachkommen von W14495 vgl. Abb. 46). Die Filme wurden in einem Intervall von fünf Minuten aufgenommen. Zeitpunkt t=0 ist der Beginn der Kernteilung und wurde gleichzeitig als Beginn der Anaphase festgesetzt. Die Filme enden jeweils nach der Depolymerisation von Ase1. Erste Spalte: die Zellmorphologie im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: die Lokalisation von Ase1-GFP, dritte Spalte: als Marker für die Kernlokalisierung zur Co-Lokalisation Cherry-NLS, vierte Spalte: die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Maßstab= 5 μ m.

Zur präziseren Erfassung wurde die Länge des Ase1-Signals in Einzelzellen der Kontrolle und in *Cdc14(Δ426-430)*-Zellen über die Zeit graphisch aufgetragen. Dazu wurde der Beginn der Kernteilung erneut als Beginn der Anaphase festgelegt und als Zeitpunkt $t=0$ gesetzt (Abb. 50 a). Danach wurde zu jedem Zeitpunkt die Länge von Ase1 jeweils drei Mal für jede Zelle der Kontrolle ($n=10$) sowie für Zellen mit *CDC14(Δ426-430) Δcdc14* ($n=10$) mittels ImageJ gemessen und davon der Mittelwert gebildet.

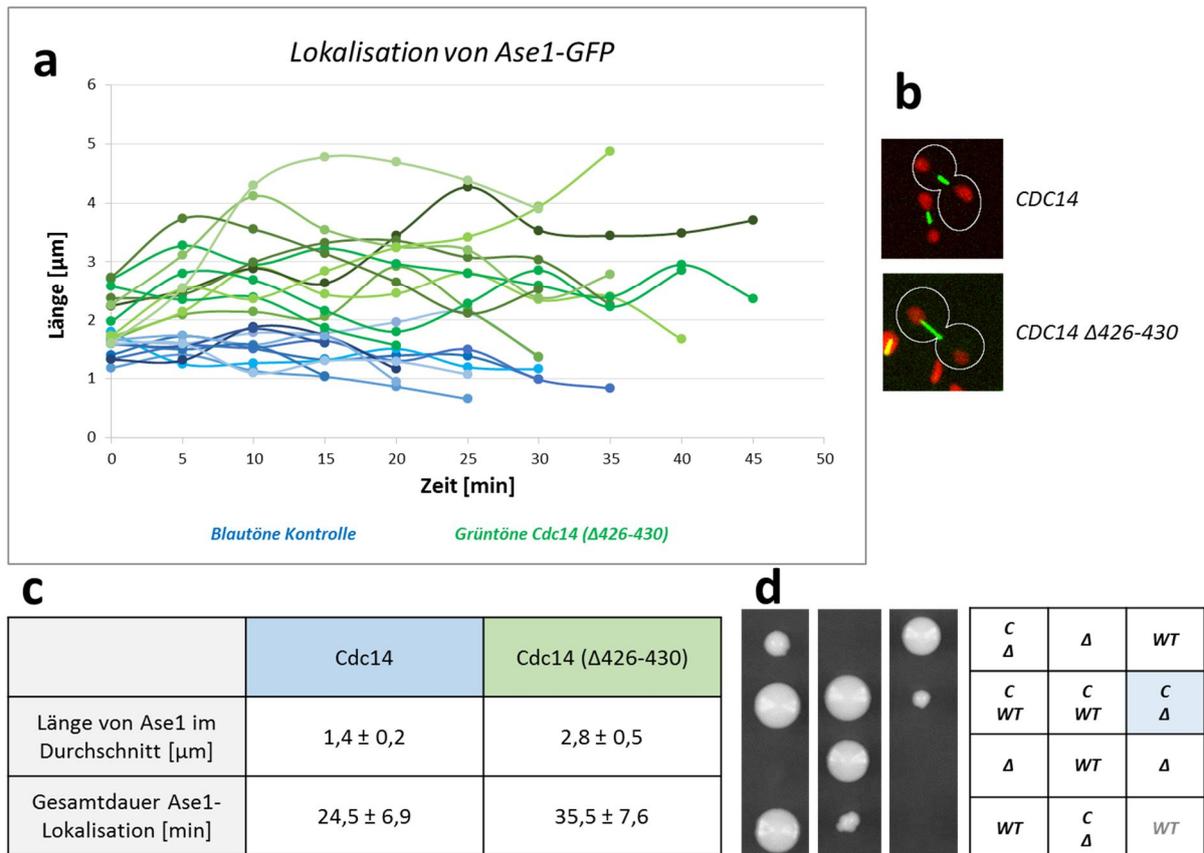


Abb. 50: Graphische und statistische Auswertung der Ase1-Lokalisation in Zellen mit *Cdc14(Δ426-430) Δcdc14*. Graphische Darstellung der Ase1-GFP-Lokalisation in Zellen mit endogener *CDC14*-Expression als Kontrolle (W14715, *ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*, „Grüntöne Kontrolle“, $n=10$) und mit Ase1-GFP in Zellen mit *Cdc14 (Δ426-430) Δcdc14* (W14882, *cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)FLAG3-tCYC1-URA3 ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*). **a**, Lokalisation von Ase1-GFP über die Zeit [min] mit der Länge des Ase1-GFP-Signals [μm] aufgetragen. Als Zeitpunkt $t=0$ wurde der Beginn der Kernteilung gewählt und dadurch der Beginn der Anaphase definiert. **b**, Zur Veranschaulichung die Lokalisation von Ase1-GFP überlagert mit dem roten Kernmarkerprotein Cherry-NLS in einer Zelle mit endogener *CDC14*-Expression (Kontrolle) und in einer Zelle mit *Cdc14(Δ426-430) Δcdc14*. **c**, Statistische Auswertung zu (a). Die gemittelte Länge von Ase1 [μm] zusammen mit der detektierbaren Gesamtdauer der Ase1-Lokalisation [min], jeweils mit der Standardabweichung in Kontrollzellen (*Cdc14*) und Zellen mit der Deletion in der CTD und $\Delta cdc14$. **d**, Tetradenanalyse zur Visualisierung des Phänotyps der Spore die zur Mikroskopie verwendet wurde (W14882, blaue Hervorhebung). C: *Cdc14(Δ426-430)*, WT: Wildtyp-Allel, Δ : $\Delta cdc14$.

In dieser Auswertung spiegelte sich die starke Abweichung der Ase1-Lokalisation in Zellen mit verändertem *Cdc14* und den Kontrollzellen wieder (Abb. 50 a). Die Länge von Ase1 in Zellen mit

Cdc14(Δ 426-430) dehnte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen ($1,4 \mu\text{m} \pm 0,2$) auf die doppelte Länge aus ($2,8 \mu\text{m} \pm 0,5$). Die Ase1-Lokalisation in Zellen mit verändertem Cdc14 dauerte vergleichend mit der Kontrolle ($24,5 \text{ min} \pm 6,9$) länger ($35,5 \text{ min} \pm 7,6$) (Abb. 50 c). In Zellen mit Cdc14(Δ 426-430) war Ase1 folglich über zehn Minuten länger visualisierbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cdc14(Δ 426-430) einen direkten Einfluss auf die Assemblierung der *spindle midzone* haben könnte.

4.5.3.3 Lokalisation von Ase1 in Δ *hct1*-Zellen

Der APC/C wird durch die Co-Aktivatoren Cdc20 und Hct1 zeitlich gesteuert und dadurch eine spezifische Substraterkennung im Zellzyklus gewährleistet (Visintin *et al.*, 1998). Vor dem Austritt aus der Mitose muss sichergestellt werden, dass die Chromosomen vollständig getrennt und präzise in Mutter- und Tochterzelle aufgeteilt wurden, um eine Fehlverteilung der Chromosomen zu vermeiden. Dabei führt das Aktivatorprotein Hct1 zur Substratspezifität des APC/C und folglich zur Induktion der Proteindegradation. Hct1 ist in *S. cerevisiae* kein essentielles Protein, jedoch wachsen Zellen mit einer Deletion von *HCT1* (Δ *hct1*) langsamer (Schwab *et al.*, 1997).

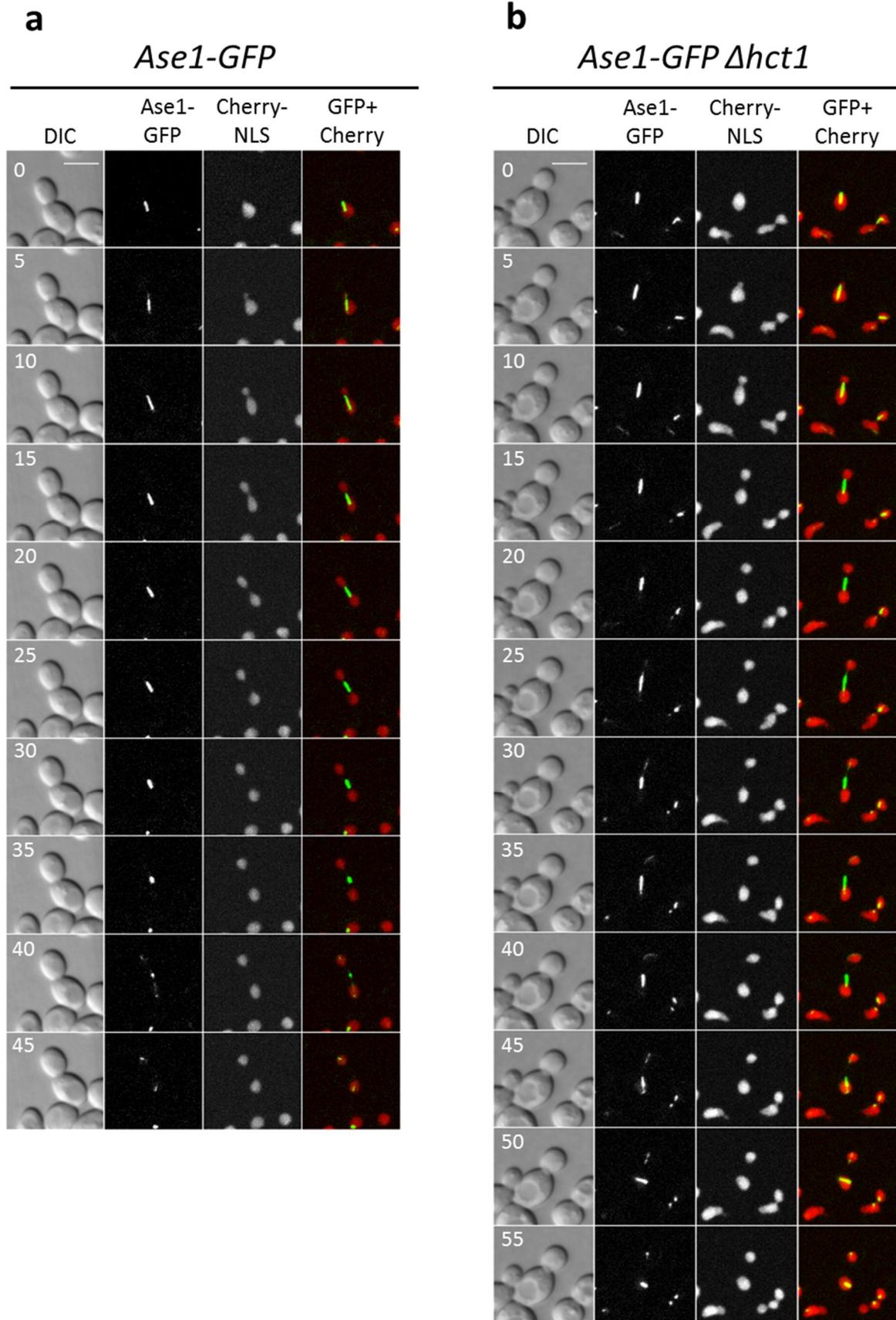
Ase1 trägt mit der Assemblierung der *spindle midzone* zur Spindelelongation und Spindelstabilisation bei und ist gleichzeitig ein direktes Zielprotein des Hct1-vermittelten APC/C. In Kapitel 4.5.3.2 wurde bereits eine veränderte Ase1-Lokalisation in Hefezellen, in denen kurze Bereiche der CTD von Cdc14 deletiert (Cdc14(Δ 426-430)) wurden, gezeigt. Hct1 ist ebenfalls ein direktes Zielprotein von Cdc14, welches durch dieses dephosphoryliert wird. Analog dazu wirkt Hct1 APC/C-vermittelt auf Ase1 und steuert dessen Abbau über Ubiquitinierung (Visintin *et al.*, 1997).

Nun war es interessant zu klären, ob die räumlich und zeitlich verlängerte Ase1-Lokalisation direkt Cdc14-vermittelt, oder indirekt durch eine verminderte Dephosphorylierung von Hct1 zustande kam. Um dies zu überprüfen, wurde Ase1-GFP in Δ *hct1*-Zellen untersucht. Dafür wurden vergleichende Zeitrafferaufnahmen von haploiden Hefezellen mit Ase1-GFP und Ase1-GFP in Δ *hct1*-Zellen in Intervallen von fünf Minuten erstellt. Die Filme dokumentieren die asynchronen Zellen beginnend mit der Kernteilung. Der Zeitpunkt der Kernteilung wurde dabei als Beginn der Anaphase festgesetzt ($t = 0$). Das Ase1-GFP Fluoreszenzsignal begann sich in den Kontrollzellen während der Kernteilung zunehmend auszudehnen und war schließlich mittig, zwischen beiden getrennten Kernen, welche noch über die bestehende Nukleoplasmabrücke verbunden waren, zu visualisieren (späte Anaphase) (Abb. 51 a, $t = 20$ bis $t = 30$). Anschließend reduzierte sich die Länge von Ase1 (Abb. 51 a, $t = 25$ auf $t = 30$), bis es zwischen den beiden Zellkernen nicht mehr detektiert werden konnte (Abb. 51 a, $t = 45$, vgl. Abb. 49 a). In Zellen in den *HCT1* deletiert war, war die Lokalisation von Ase1 verändert. Zuerst nahm die Länge des Ase1-Fluoreszenzsignals, ebenso wie in den Kontrollzellen, mit beginnender

Anaphase zu (Abb. 51 a,b, von $t=0$ auf $t=5$), lokalisierte während der späten Anaphase jedoch nicht mittig zwischen beiden Zellkernen, sondern war zum Zellkern der Mutterzelle hin verlagert (Abb. 51 b, $t=35$). Gleichzeitig war Ase1, vorwiegend in der Mutterzelle, länger detektierbar (Abb. 51 b, $t=50$), als in den Kontrollzellen.

Um die veränderte Lokalisation von Ase1-GFP in Zellen ohne Hct1 präziser zu erfassen, wurde die Länge des Ase1-Signals in den Kontrollzellen ($n=10$) und in Zellen mit *ASE1-GFP $\Delta hct1$* ($n=10$) über die Zeit mit ImageJ gemessen. Als Zeitpunkt 0 ($t=0$) wurde der Beginn der Anaphase gewählt und die detektierbare Ase1-Fluoreszenz jeweils drei Mal für jeden Zeitwert gemessen, davon der Mittelwert gebildet und mit der Zeit graphisch für jede Einzelzelle aufgetragen (Abb. 51 c). Diese Auswertung zeigte auf, dass die Gesamtlokalisationsdauer von Ase1 in $\Delta hct1$ -Zellen mit beginnender Kernteilung deutlich zunahm (Kontrolle: $30 \text{ min} \pm 8,5$, $\Delta hct1$: $43,5 \text{ min} \pm 19,0$, Abb. 51 d). Zudem fiel eine zunehmende Schwankungsbreite auf. Im Kontrast zur Ase1-Lokalisation aus Kapitel 4.5.3.2, war feststellbar, dass sich die Ase1-Lokalisationsdauer erhöhte, die Länge des Ase1-GFP-Signals jedoch nicht zunahm (Abb. 51 c, d, vgl. Abb. 50 a, c). Beiden gemeinsam war die Fehllokalisierung von Ase1 zum Mutterzellkern hin, folglich war Ase1 in Zellen mit *Cdc14($\Delta 426-430$)* und in Zellen mit deletiertem *HCT1* nicht mittig zwischen den Zellkernen gelegen (Abb. 49 a, $t=20$ und Abb. 51 a, $t=20$).

Beides könnte auf einen Hct1-abhängigen Phänotyp hinweisen. Vermutlich kann *Cdc14($\Delta 426-430$)* Hct1 nicht ausreichend dephosphorylieren, was zu einer fehlenden APC/C-Aktivierung durch Hct1 führen und folglich die Stabilisation von Ase1 als direktes Substrat beeinflussen würde (Kapitel 4.5.3.2). In Zellen mit einer Deletion von *HCT1* wäre somit Ase1 durch eine fehlende APC/C-Aktivierung ebenso beeinflusst. Ase1 zeigte in Zellen mit *Cdc14($\Delta 426-430$)* neben der zeitlichen Ausdehnung, jedoch zusätzlich eine prominente räumliche Ausdehnung, was für Ase1 in Zellen ohne Hct1 nicht der Fall war. Da dieser Effekt in Zellen ohne Hct1 weniger stark ausgeprägt war, deutet dies eher auf einen direkten Effekt von *Cdc14($\Delta 426-430$)* auf Ase1 hin. Dennoch könnte die von den Kontrollzellen abweichende Ase1-Lokalisation teilweise, aber zumindest nicht ausschließlich von Hct1 abhängig sein.



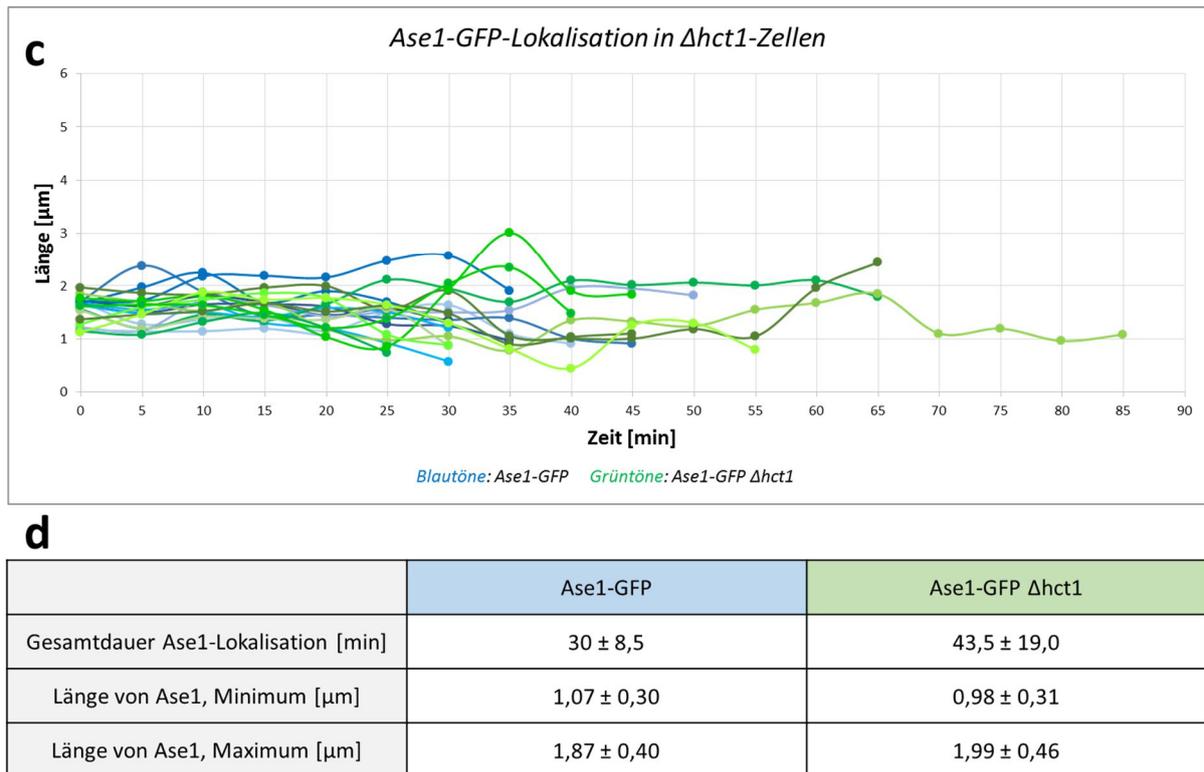


Abb. 51: Lokalisation von Ase1-GFP in $\Delta hct1$ -Zellen. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie erstellte Zeitrafferaufnahmen der Ase1-GFP Lokalisation und deren graphische, sowie statistische Auswertung. Darstellung von Zeitrafferaufnahmen mit einem Intervall von fünf Minuten haploider, asynchroner Hefezellen von **a**, W14715 (*ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) als Kontrolle zum Vergleich mit **b**, W14951 (*hct1 Δ ::kanMX4 ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) in denen die Lokalisation von Ase1-GFP im Zellzyklus verfolgt wurde. Als Zeitpunkt t= 0 wurde der Beginn der Anaphase durch den Beginn der Kernteilung festgelegt. Erste Spalte: die Zellmorphologie im Durchlichtinterferenzkontrast (DIC), zweite Spalte: die Lokalisation von Ase1-GFP, dritte Spalte: Zur Co-Lokalisation die Visualisierung des Zellkerns durch Fusion des roten Fluoreszenzproteins mit einer konstitutiven NLS (Cherry-NLS), vierte Spalte: Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Maßstab= 5 μ m. **c**, Graphische Darstellung der Länge des Ase1-GFP-Fluoreszenzsignals über die Zeit aller Einzelzellen von (**a**, n= 10, Blautöne) und (**b**, n= 10, Grüntöne). Die Länge von Ase1 wurde zu jedem Zeitwert und für jede Zelle jeweils drei Mal mit ImageJ vermessen und davon ein Mittelwert für jeden Datenpunkt gebildet. **d**, statistische Auswertung der Zellen aus (**c**) mit der detektierbaren Gesamtdauer der Lokalisation ab beginnender Kernteilung, der minimalen Länge des Ase1-GFP-Signals, sowie die maximale Länge des Ase1-GFP-Signals.

4.5.4 Dephosphorylierung von Ase1 durch Cdc14($\Delta 426-430$)

Zellen, in denen die CTD von *CDC14* durch eine Deletion der AS 426-430 verändert war, zeigten eine Zunahme der Anaphasedauer. Dies konnte durch Lokalisationsstudien mit Tubulin und Ase1 durch Zeitrafferaufnahmen gezeigt werden (Kapitel 4.5.3.1. und 4.5.3.2.). Ase1 wird im Zellzyklus von Cdc14 zur Assemblierung der *spindle midzone* dephosphoryliert (Khmelinskii *et al.*, 2007) und ist somit ein direktes Zielprotein von Cdc14.

Sollte Ase1 durch Cdc14($\Delta 426-430$) ineffizienter dephosphoryliert werden als durch Wildtyp-Cdc14, könnte dies möglicherweise anhand einer veränderten Proteinmobilität von Ase1 im Western Blot zu erkennen sein. Ase1 könnte damit in Zellen mit Cdc14($\Delta 426-430$) aufgrund der mangelnden

Dephosphorylierung und durch die damit verbundene erhöhte negative Ladung im Western Blot von der dephosphorylierten Kontrolle diskriminierbar sein.

Es war interessant diese Hypothese nun zu prüfen. Hierfür wurden die verwendeten Stämme (Abb. 49) zur Western Blot-Analyse aufgearbeitet und Ase1-GFP mittels α -GFP-Antikörper immunologisch nachgewiesen (Abb. 52).

Ase1 zeigte im Western Blot mit verändertem Cdc14 (*CDC14*(Δ 426-430)) eine äußerst leicht verminderte Proteinmobilität, was auf eine geringere Dephosphorylierung durch die Phosphatase hinweisen könnte. Im Vergleich dazu war die Proteinmobilität von Ase1-GFP mit endogener Expression von *CDC14* etwas erhöht (Abb. 52). Da eine veränderte Phosphorylierung jedoch nicht eindeutig nachzuweisen war, bleibt derzeit offen, inwieweit ein nachhaltiger Effekt auf eine direkte Wirkung von Cdc14 zurückzuführen ist.

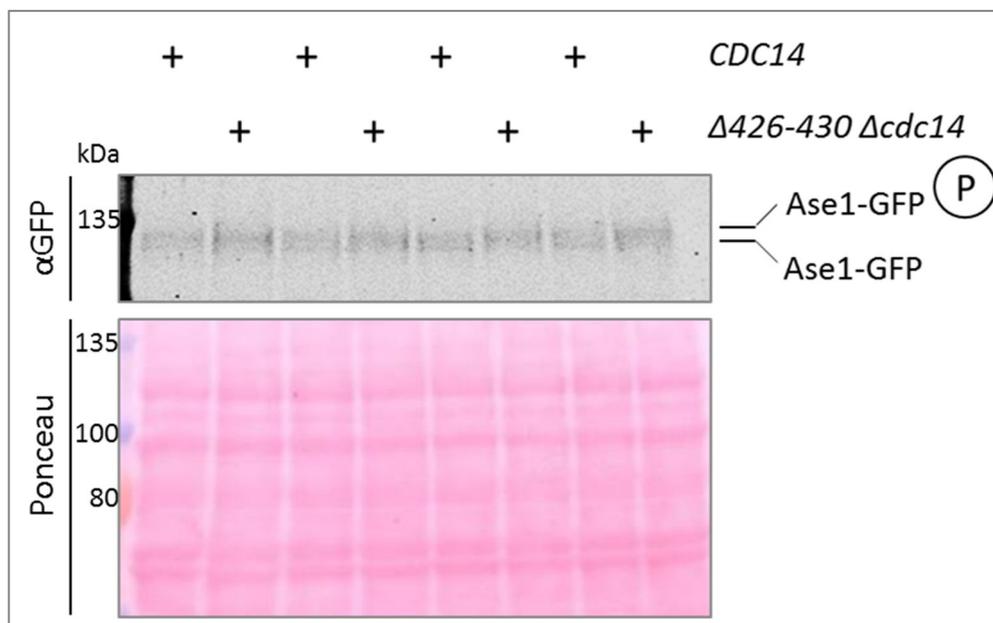


Abb. 52: Dephosphorylierung von Ase1 durch Cdc14(Δ 426-430). Western Blot zur Analyse der Phosphorylierung von Ase1-GFP in asynchronen haploiden Hefezellen mit endogener *CDC14*-Expression und in Zellen mit Cdc14(Δ 426-430) Δ *cdc14*. Dafür wurden die Hefestämme W14715 (*ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) und W14882 (*cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ 426-430)FLAG3-tCYC1-URA3 ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) zu Proteinlysaten aufgearbeitet. Für den Western Blot wurden jeweils vier OD₆₀₀-Zellen dieser Proteinlysate je vier Mal abwechselnd auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis von Ase1-GFP erfolgte über den α -GFP-Antikörper. Errechnete Proteingröße: Ase1-GFP: 129 kDa. Als Ladekontrolle wurde das Gesamtprotein visualisiert durch die unspezifische Ponceau-Färbung des Gesamtproteins auf der Membran gezeigt.

4.5.5 Dephosphorylierung von Hct1 durch Cdc14(ASAA)

Von Hct1, ein Co-Aktivator des APC/C in der späten Anaphase ist bekannt, dass es als direktes Substrat von Cdc14 dephosphoryliert wird (Visintin *et al.*, 1998). In mitotischen Zellen ist Hct1 dabei

maximal phosphoryliert. Da Hct1 ein Zielprotein von Cdc14 ist, war es interessant zu untersuchen, ob sich ein direkter Effekt von Cdc14(ASAA) auf den Phosphorylierungsgrad von Hct1 nachweisen lässt.

Dazu wurden Cdc14 und Cdc14(ASAA) jeweils mit dem Flag3-Epitop zur Detektion im Western Blot fusioniert, stabil in das Genom integriert und unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors exprimiert. Der hierfür verwendete Hefestamm exprimiert endogen *HCT1*, das zusätzlich zur Analyse im Western Blot mit dem HA3-Epitop fusioniert war. Die exponentiell wachsenden Zellen ($OD_{600} = \text{ca. } 0,5$, XYR-Medium) wurden mit Nocodazol (NOC) in einem der Metaphase ähnlichem Zellzyklusstadium arretiert. Die Expression der Konstrukte *pGAL1-CDC14-FLAG3* und *pGAL1-CDC14(ASAA)-FLAG3* wurde durch die Zugabe von Galaktose induziert. Über einen Zeitraum von zwei Stunden wurden die Zellen in Intervallen von 15 bis 30 Minuten aus der Kultur entnommen und zu Proteinlysaten weiterverarbeitet. Durch die Integration beider *pGAL1*-Konstrukte am *URA3*-Lokus ist im Genom eine noch intakte Kopie des *CDC14*-Allels vorhanden. Endogenes Cdc14 ist jedoch während der Metaphase durch den NOC-Arrest noch im Nukleolus inhibiert und sollte somit keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung von Hct1 in diesem Versuchsaufbau haben. Am Ende des Experiments wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western Blot-Analyse immunologisch nachgewiesen. Die Detektion von Hct1 erfolgte mit dem α -HA-Antikörper, der Nachweis von Cdc14 und Cdc14(ASAA) mit dem α -Flag-Antikörper. Als Ladekontrolle wurde Tubulin (Tub2) zusätzlich mitdetektiert (α -Tub2-Antikörper).

Die Phosphorylierungsbande von Hct1 nahm in Zellen, die *CDC14* exprimierten, über die Zeit deutlich ab (Abb. 53). Nach 45-minütiger Expression von *CDC14* zeigte sich eine zunehmende Reduktion der phosphorylierten Hct1-Spezies, nach 90 und 120 Minuten war die Phosphorylierung nur noch in geringem Ausmaß detektierbar. Parallel dazu nahm die untere dephosphorylierte Bande von Hct1 immer mehr zu. Die Ergebnisse der Hct1-Dephosphorylierung mit der in TR-Sequenz veränderten Cdc14 unterschieden sich klar von der Referenz. Die Phosphorylierung von Hct1 nahm zwar auch in Zellen mit Cdc14(ASAA) über die Zeit ab und die Dephosphorylierungsbande zu. Die Phosphorylierung von Hct1 in Zellen, die *CDC14(ASAA)* exprimierten, nahm jedoch nicht im selben Umfang wie in den Kontrollzellen ab (Abb. 53 a, $t = 90$ und $t = 120$). In Zellen mit Cdc14(ASAA) war deutlich mehr Restphosphorylierung von Hct1 detektierbar. Um die Reduktion der Phosphorylierungsbande von Hct1 besser bewerten zu können, wurde der Phosphorylierungsstatus mittels ImageJ quantifiziert (Kapitel 6.4.1.1).

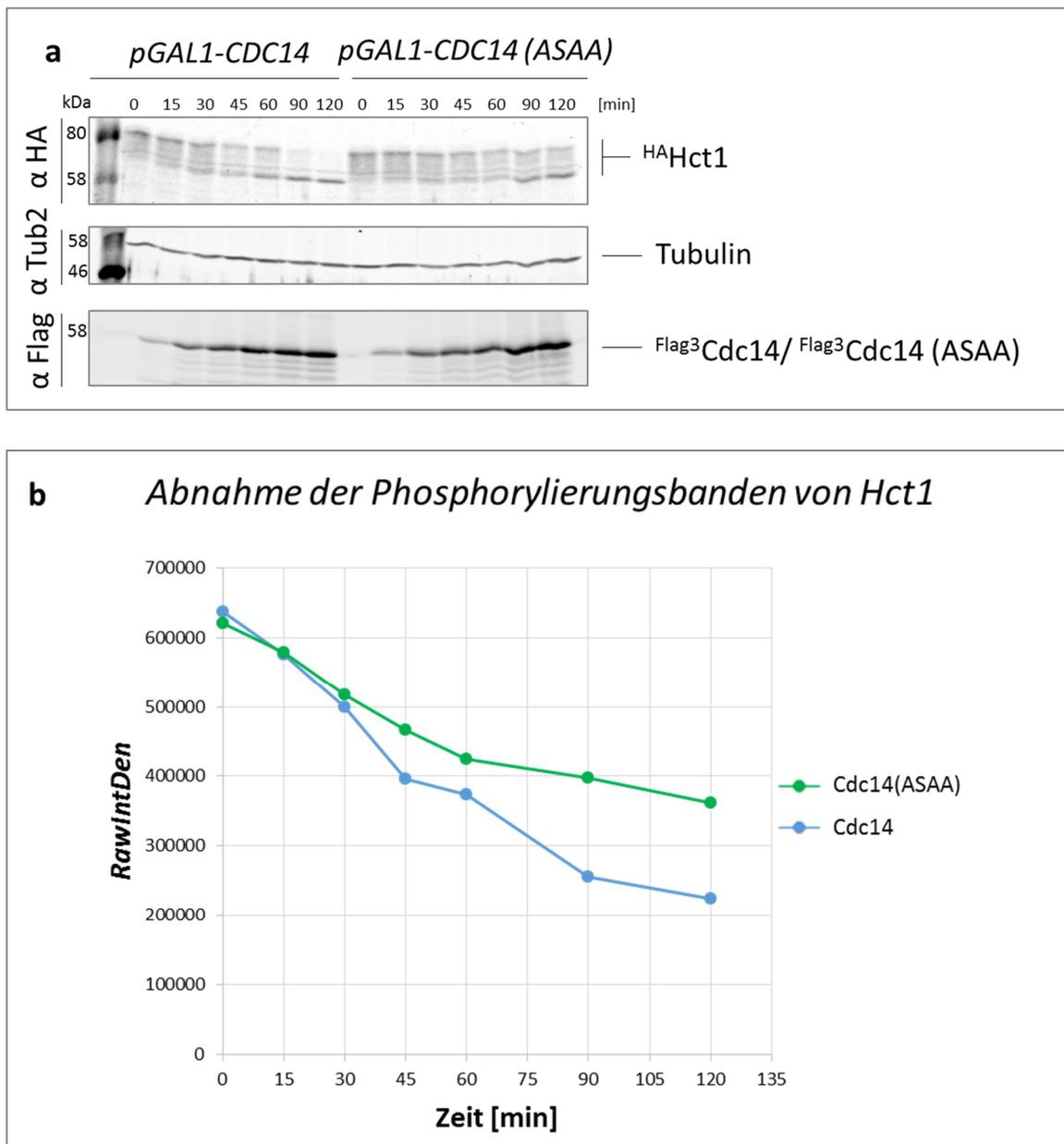


Abb. 53: Verminderung der Phosphatasefunktion von Cdc14(ASAA) *in vivo*. Western Blot-Analyse der Hct1-Phosphorylierung mit deren Quantifizierung in NOC-arretierten Hefezellen. Dafür wurden die beiden Plasmide mit Cdc14 (*pGAL1-flag3-CDC14-URA3*, pWS4799) und Cdc14(ASAA) (*pGAL1-flag3-CDC14(ASAA)-URA3*, pWS4801) in den Hct1-Hefestamm W471 (*HCT1::HA-HCT1-TRP1*) am *URA3*-Lokus ins Genom integriert. Nach Auswahl geeigneter Transformanten, mit einer möglichst ähnlichen Expression von *CDC14* und *CDC14(ASAA)* entstanden die beiden Stämme W14858 (*HCT1::HA-HCT1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC14-URA3*) und W14859 (*HCT1::HA-HCT1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC14(ASAA)-URA3*). **a**, Beide Hefestämme wurden in XYR2% (25°C) zur exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5-0,56$) angezogen und anschließend für zwei Stunden mit Nocodazol in der Metaphase arretiert. Danach wurden Zellen für den Zeitpunkt $t=0$ aus den Kulturen entnommen und die Expression von *CDC14* und *CDC14(ASAA)* durch die Zugabe von 2%iger Galaktose induziert. Nach 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten wurden jeweils weitere Proben entnommen und zu Proteinlysaten aufgearbeitet. Von den Lysaten wurden für jeden Zeitwert 20D₆₀₀-Zellen auf zwei 9%ige SDS-Gele aufgetragen. Der Hct1-Nachweis erfolgte mit dem α -HA-Antikörper (12CA5) und Tubulin als Ladekontrolle, der Nachweis von Cdc14 und Cdc14(ASAA) erfolgte mit dem α -Flag3-Antikörper (M2). Tubulin diente ebenfalls als Ladekontrolle. **b**, Quantifizierung der Phosphorylierungsbande von Hct1 in Zellen die *CDC14* bzw. *CDC14(ASAA)* exprimieren im zeitlichen Verlauf der Expression über zwei Stunden. Errechnete Proteingrößen: HA-Hct1: 64 kDa, Flag3-Cdc14: 65 kDa, Flag3-Cdc14(ASAA): 65 kDa, Tubulin: 51 kDa.

Untersucht wurde für jeden Zeitwert die Summe der Pixelwerte (*RawIntDen*) des Hct1-Gesamtsignals, sowie für die Dephosphorylierungsbande. Als Bezug zum Gesamtsignal von Hct1 wurde die quantifizierte dephosphorylierte, unterste Bande von Hct1 vom Gesamtsignal abgezogen. Dieser Wert entspricht der phosphorylierten Hct1-Spezies. Zur graphischen Darstellung wurden die absoluten Zahlen der phosphorylierten Hct1-Spezies mit der Zeit aufgetragen (Abb. 53 b). Die Quantifizierung bestätigte, dass der Phosphorylierungsgrad von Hct1 in Zellen mit Cdc14 und Cdc14(ASAA) anfangs etwa gleich war (t=0, Summe der Pixelwerte der Phosphorylierungsbanden von Hct1 mit Cdc14: 636423, mit Cdc14(ASAA): 620861). Die Werte nahmen über die Zeit in Zellen im NOC-Arrest, in denen *CDC14(ASAA)* exprimiert wurde, deutlich weniger ab als in der Kontrolle (t=120, Summe der Pixelwerte der Phosphorylierungsbanden von Hct1 mit Cdc14: 223744, mit Cdc14(ASAA): 362318). Werden die Summen der Pixelwerte von t=0 und t=120 der Phosphorylierungsbande von Hct1 miteinander verglichen, so nahm die phosphorylierte Hct1-Spezies in Zellen, in denen *CDC14* co-exprimiert wurde um 65% ab. In Zellen, in denen *CDC14(ASAA)* exprimiert wurde, verringerte sich die phosphorylierte Hct1-Spezies um 42%.

Die Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass in der CTD von Cdc14 Bereiche liegen, die neben der N-terminalen katalytischen Domäne die Phosphatasefunktion beeinflussen. Dies kann für Hct1 als direktes Zielprotein, gezeigt werden. Cdc14(ASAA) weist *in vivo* eine verringerte Fähigkeit auf Hct1 zu dephosphorylieren.

4.5.6 Hemmung des Kernimports von Hct1 durch Cdc14(Δ 426-430)

Hct1 wird von Cdc14 in der Anaphase dephosphoryliert was dessen Lokalisation im Zellzyklus beeinflusst. Phosphoryliertes Hct1 befindet sich im Zytoplasma, dephosphoryliertes Hct1 dagegen im Zellkern von *S. cerevisiae* (Jaquenoud *et al.*, 2002). Im N-terminalen Fragment von Hct1(1-257) befinden sich eine NLS mit benachbarten Cdk-Phosphorylierungsstellen. Die NTD von Hct1 wird durch Cdk phosphoryliert was dessen Kernimport verhindert (Höckner *et al.*, 2016). Cdc14 ist in der Lage diese Phosphorylierungsereignisse zu antagonisieren, was zur Translokation von Hct1 in den Zellkern führt. Für den Kernimport ist die Dephosphorylierung von Hct1 durch Cdc14 dementsprechend unabdingbar. Es war deshalb interessant zu untersuchen, ob Cdc14(Δ 426-430), analog zu Cdc14(ASAA), Hct1(1-257) weniger effektiv dephosphoryliert und sich dies folglich in einer veränderten Lokalisation von Hct1(1-257) widerspiegelt.

Um einen möglichen Einfluss auf den Kernimport von Hct1(1-257) aufgrund der internen Deletion in der CTD von Cdc14(Δ 426-430) präzise zu erfassen, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie Zeitrafferaufnahmen in Intervallen von fünf Minuten erstellt. Dabei diente Hct1(1-257)-GFP mit unverändertem Cdc14 als Kontrolle.

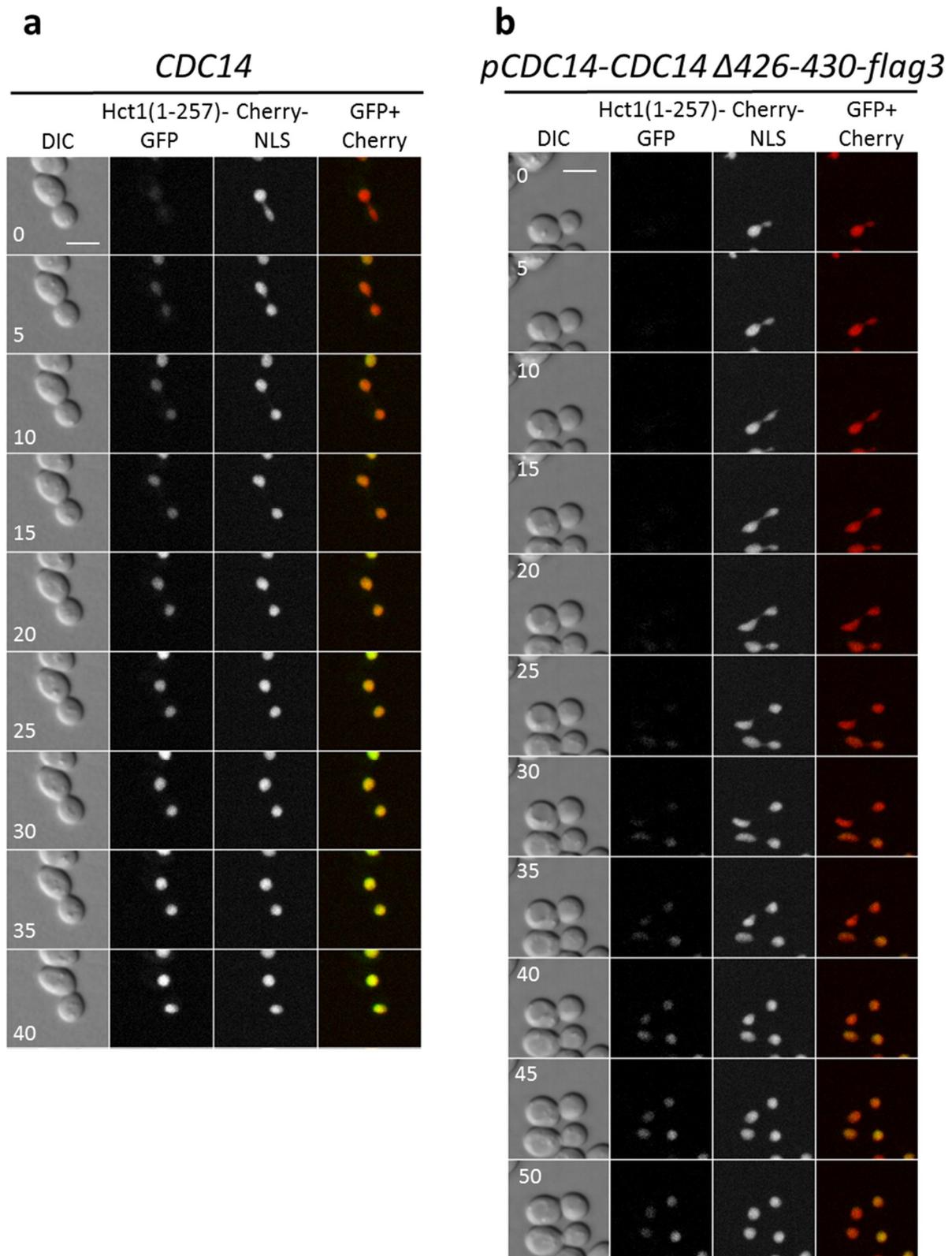


Abb. 54: Beeinträchtigung des Kernimports von Hct1(1-257) in *CDC14(Δ426-430)*-Zellen. Dargestellt sind mittels Fluoreszenzmikroskopie erstellte vergleichende Zeitrafferaufnahmen von lebenden, asynchronen Hefezellen. **a**, W14864 (*leu2::pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) als Kontrolle zu **b**, W14949 (*leu2:: pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-flag3-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*). Beide Filme wurden in einem Intervall von fünf Minuten aufgenommen. Erste Spalte: Durchlichtinterferenzkontrast (DIC) zur Visualisierung der Zellmorphologie, zweite Spalte: Hct1(1-257)-GFP Lokalisation, dritte Spalte: Cherry-NLS

zur Co-Lokalisation des Zellkerns, vierte Spalte: Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Länge des Maßstabalkens: 5 μm .

Hefezellen mit *HCT1(1-257)-GFP CDC14(Δ 426-430) Δ cdc14* (Tetradenanalyse s. Abb. 55 c, blaue Hervorhebung der verwendeten Spore) wurden zur Untersuchung der möglichen Effekte von Cdc14(Δ 426-430) herangezogen. In der Tat war der Kernimport von Hct1(1-257) in Zellen mit Cdc14(Δ 426-430) auffällig verändert. Obwohl in diesen Zellen mit der Veränderung von Cdc14 in der TR-Sequenz die Mitose langsamer verläuft, nahm die Dauer bis Hct1(1-257) im Zellkern akkumulierte, deutlich zu. Gleichzeitig schien Hct1(1-257) in diesen Zellen kürzer und nicht auf demselben Niveau in den Zellkern importiert zu werden als in der Kontrolle (Abb. 54). In Kontrollzellen mit großer Knospe und kurzer Nukleoplasmabrücke, akkumulierte Hct1(1-257) stetig bis zum Ende der Mitose (Abb. 54 a, t= 40) in den Zellkernen der Mutter- und Tochterzelle (Abb. 54 a, t= 0 bis 15). Im Vergleich dazu war in Zellen mit Cdc14(Δ 426-430) erst deutlich später und nur eine geringe Anreicherung in den Zellkernen festzustellen (Abb. 54 b, t= 0 bis t= 25), obwohl die Kernteilung vergleichbar fortgeschritten war.

Zur statistischen Erfassung wurde die Lokalisation von Hct1 in Zellen mit Hct1(1-257) als Kontrolle und Hct1(1-257) Cdc14(Δ 426-430) zum Vergleich mit Hilfe der Zeitrafferaufnahmen untersucht und die Gesamtdauer sowie die Dauer des detektierbaren Hct1(1-257)-GFP-Fluoreszenzsignals bis zum Kernimport analysiert (Abb. 55 a, b).

Die Dauer bis zum Kernimport von Hct1(1-257) in Zellen mit Cdc14(Δ 426-430) verdoppelte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 55 a, b, Kontrolle: 12,0 min \pm 6,75, n= 10 und Mutante: 24,25 min \pm 13,02, n=10). Die Gesamtdauer des Hct1(1-257)-GFP-Signals reduzierte sich jedoch gleichzeitig (Abb. 55 a, b, 28,5 min \pm 3,37, Kontrolle und 22,75 min \pm 12,72). Auffällig war, dass sowohl die Schwankungsbreite bis zum Kernimport von Hct1 als auch die Variabilität der Gesamtlokalisationsdauer von Hct1(1-257) um ein Vielfaches im Zellkern zunahm.

Diese Beobachtungen lassen auf einen starken Einfluss von Cdc14(Δ 426-430) auf den Kernimport von Hct1(1-257) schließen. In der TR-Sequenz verändertes Cdc14 scheint verglichen mit Wildtyp-Cdc14 eine schlechtere Phosphatase zu sein, da die Lokalisation von Hct1(1-257) abhängig von dessen Phosphorylierungsgrad ist. Damit könnte die Veränderung der Lokalisation durch den verminderten Kernimport erklärt werden. Die Lokalisation von Hct1(1-257) in der Anaphase ist somit aufgrund der verminderten Dephosphorylierung durch Cdc14, welches in der TR modifiziert ist, deutlich beeinflusst.

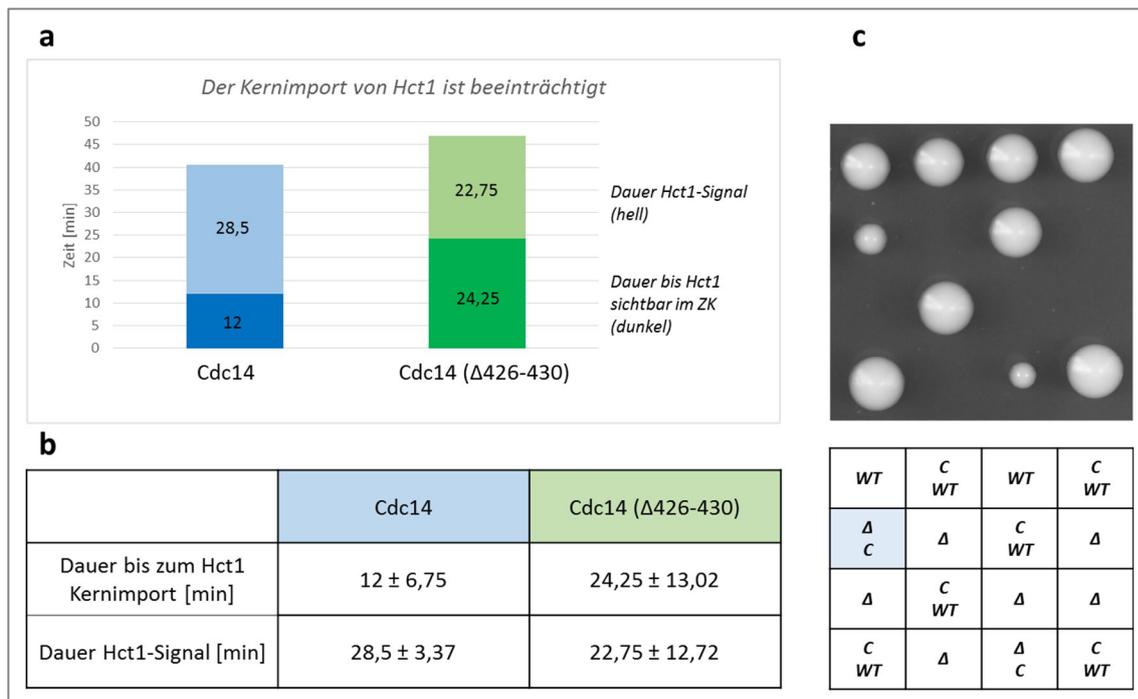


Abb. 55: Auswertung des Hct1(1-257)-Kernimports sowie dessen Lokisationsdauer mit Tetradenanalyse in Zellen mit Cdc14(Δ426-430). Zur umfangreicheren Erfassung wurde das Lokalisationssignal von Hct1(1-257)-GFP in Zellen mit Wildtyp-Cdc14 (n= 10, W14864, *leu2::pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*), sowie mit Cdc14(Δ426-430) $\Delta cdc14$ (n= 10, W14949, *leu2:: pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-flag3-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) graphisch (a) und statistisch (b) ausgewertet. Als Zeitpunkt t=0 ist die beginnende Anaphase, durch den Beginn der Kernteilung gewählt worden. c, ergänzende Tetradenanalyse zur Visualisierung des Phänotyps von Hct1(1-257)-GFP Cdc14(Δ426-430) $\Delta cdc14$ Cherry-NLS, die zur Mikroskopie verwendete Spore wurde blau hervorgehoben (W14949). C: Cdc14(Δ426-430), WT: Wildtyp-Allel, Δ: $\Delta cdc14$.

Neben der Statistik (Abb. 55 a, b) sollte der Kernimport von Hct1(1-257) quantifiziert werden (Kapitel 6.4.1.2). Dazu wurde das Hct1(1-257)-GFP Signal zusammen mit dem Kernsignal als Referenz mittels ImageJ quantifiziert. Der Zeitpunkt t=0 wurde mit Einsetzen der Kernteilung als Beginn der Anaphase gewählt. Der Kernimport von Hct1(1-257)-GFP (Abb. 56 a, n=10) als Kontrolle wurde mit dem Kernimport von Hct1(1-257)-GFP in Zellen mit Cdc14(Δ426-430) (Abb. 56 b, n=10) verglichen. Die Konzentration des roten Zellkern-Markers Cherry-NLS blieb weitestgehend konstant. Der Kernimport von Hct1(1-257) setzte in den Kontrollzellen (Abb. 56 a) mit beginnender Anaphase (t=0) ein. Das Signal erreichte nach 35 Minuten sein Maximum und nahm danach gleichmäßig ab. Zellen mit Cdc14(Δ426-430) zeigten einen deutlich schwächeren Kernimport von Hct1(1-257) (Abb. 56 b). In diesen Zellen war nach Beginn der Anaphase kaum Hct1(1-257)-Signal im Zellkern detektierbar. Das Signal nahm nach 20 Minuten leicht zu (vgl. Abb. 56, t= 35) und endete schließlich in einem Plateau (Abb. 56 b, t= 40 bis t= 50). Diese Daten lassen vermuten, dass Hct1(1-257) aufgrund unzureichender Dephosphorylierung durch Cdc14(Δ426-430) weniger effektiv in den Zellkern importiert wurde. Die Ergebnisse verdeutlichen somit, dass die intakte TR-Sequenz von Cdc14 notwendig für die Akkumulation von Hct1(1-257) im Zellkern ist.

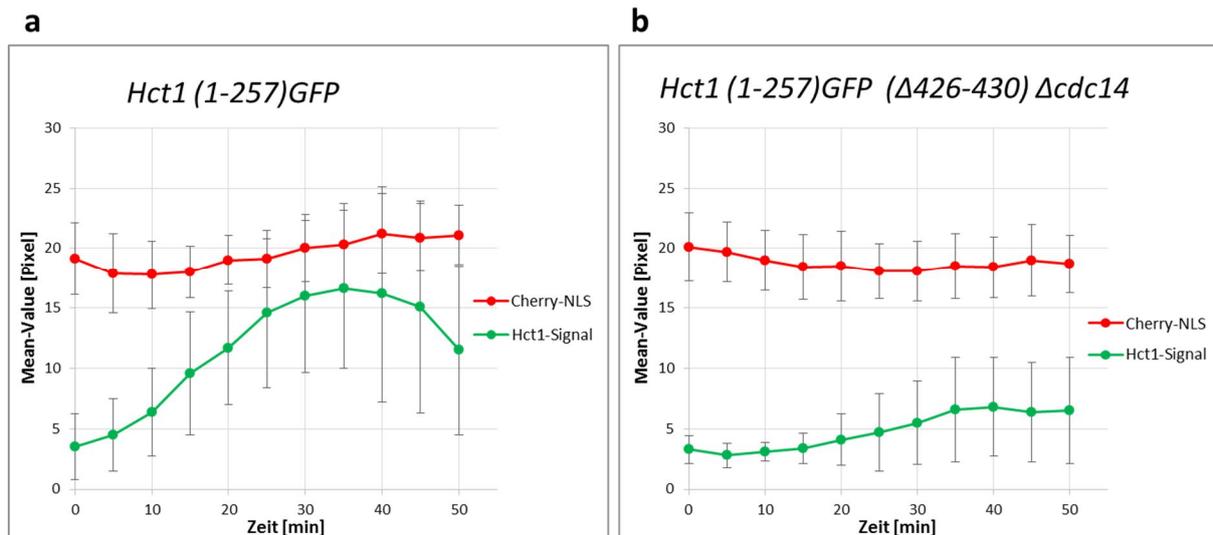


Abb. 56: Quantifizierung des Kernimports von Hct1(1-257)-GFP in Zellen mit Cdc14(Δ 426-430) Δ cdc14. Zur Analyse wurde die Konzentration (Mean-Value [Pixel]) des Hct1 (1-257)-GFP in Zellen mit Wildtyp-Cdc14 als Kontrolle (**a**, n= 10, W14864, *leu2::pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) und Zellen mit Cdc14(Δ 426-430) Δ cdc14 (**b**, n= 10, W14949, *leu2:: pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14-(Δ 426-430)-flag3-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) quantitativ mit ImageJ erfasst. Die Ermittlung des Kernsignals Cherry-NLS diente als Kontrolle über vergleichbare, konstante Ergebnisse von (a) und (b). Die Daten der Quantifizierung wurden über die Zeit mit dem Beginn der Anaphase (t= 0) mit der Standardabweichung für jeden Messpunkt aufgetragen. Verwendet wurden die absoluten Zahlen der Quantifizierungen.

Obwohl die analysierten Hefestämme aus einer Kreuzung mit anschließender Tetradenanalyse hervorgingen und daher Nachkommen denselben genetischen Hintergrund aufweisen, war es von Interesse die Proteinmengen von Hct1(1-257)-GFP direkt miteinander zu vergleichen (Abb. 57). Dafür wurden Proteinlysate der beiden verwendeten Stämme ohne die Phosphatase-Inhibitoren NaF und β -Glycerolphosphat erzeugt (vgl. Tab. 13, Puffer 3). Die Lysate wurden anschließend mehrmals auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 57). Ohne Phosphatase-Inhibitoren sollte Hct1(1-257) reduzierte Phosphorylierungsbanden aufweisen und eine vergleichende Beurteilung der Proteinmengen erleichtern. In der Tat liefen die Proteinbanden von Hct1(1-257) in der Kontrolle sowie mit Cdc14(Δ 426-430) auf gleicher Höhe und zeigten eine vergleichbare Intensität (Abb. 57). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der beobachtete verzögerte Kernimport von Hct1(1-257) sowie die kürzere Verweildauer im Kern auf Cdc14(Δ 426-430), jedoch nicht auf eine verminderte Proteinmenge von Hct1(1-257) zurückzuführen waren.

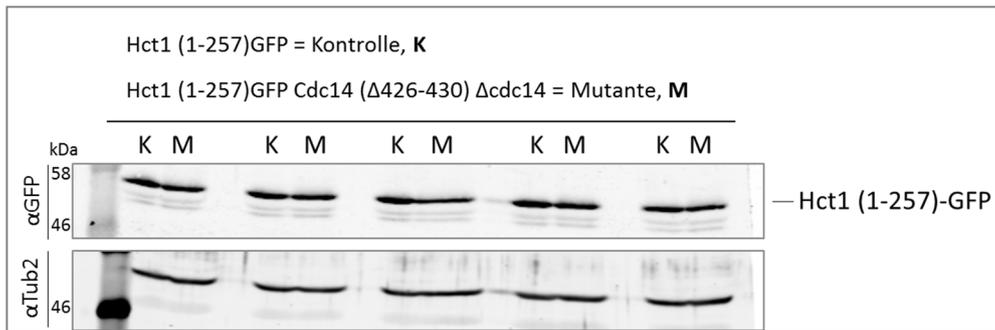


Abb. 57: Proteinexpression von HCT1(1-257)-GFP mit CDC14(Δ426-430) Δcdc14. Die Proteinmengen von Hct1 (1-257)-GFP der Hefestämme W14864 (*leu2::pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1* = K, Kontrolle) und W14949 (*leu2:: pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-flag3-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1* = M, Mutante) wurden zusammen analysiert. Proteinlysate beider Stämme ohne Phosphatase-Inhibitoren (Ohne Glycerolphosphat und ohne NaF im Aufschlusspuffer 3). Zur Gewinnung der Proteinlysate wurden exponentiell wachsende Hefekulturen der oben genannten Stämme verwendet. Die Proteinlysate wurden zur Überprüfung der Vergleichbarkeit mehrmals abwechselnd auf ein 9%-iges SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis von Hct1(1-257)-GFP erfolgte mit dem α-GFP-Antikörper. Als Ladekontrolle wurde Tub2, nachgewiesen mit α-Tub-Antikörper, mitdetektiert. Errechnete Proteingrößen: Hct1(1-257)GFP: 55,5 kDa, Tubulin: 51 kDa.

4.6 Unterstützung der Phosphataseaktivität *in vitro* durch die CTD

Die Untersuchungen der Konstrukte in Zellen in denen Cdc14 in der TR2-Sequenz verändert war, deuteten auf eine geringere Phosphatasefunktion *in vivo* hin.

Um die Relevanz dieser Sequenz auch mit biochemischen Methoden zu untersuchen, wurde zur unterstützenden Analyse ein *in vitro*-Phosphatasetest durchgeführt (Taylor *et al.*, 1997). Dazu wurde Cdc14(ASAA) mit einer MBP-Fusion vergleichend mit MBP-Cdc14 als Kontrolle analysiert.

Beide Proteine wurden zu diesem Zweck heterolog in *E. coli* exprimiert und nach ihrer Reinigung auf eine Proteinkonzentration von 2 µg/µl eingestellt. Um diese Proteinkonzentration zu überprüfen, wurden die Proteine zusammen mit einer BSA-Stammlösung (2 µg/µl) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Um Pipettierfehler auszugleichen wurden die Proteine jeweils drei Mal auf das SDS-Gel aufgebracht und nach der Coomassiefärbung mittels ImageJ quantifiziert. Von den drei Proteinen BSA, MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA) wurde nach Quantifizierung der jeweiligen *RawIntDen* (Summe der Pixelwerte) ein Mittelwert gebildet und anschließend die Abweichung zu BSA ermittelt (Abb. 58 b, c). Für den Phosphatasetest (Kapitel 6.7) wurden MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA) mit zunehmender Menge eingesetzt und als Substrat die niedermolekulare Substanz para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zugegeben. In der Reaktion wird pNPP zu para-Nitrophenol (pNP) dephosphoryliert. pNPP ist ein chromogenes Substrat, dessen Dephosphorylierung in einem Farbumschlag von farblos nach gelb resultiert und bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt werden kann. Je stärker die Gelbfärbung, desto aktiver ist die Phosphatase.

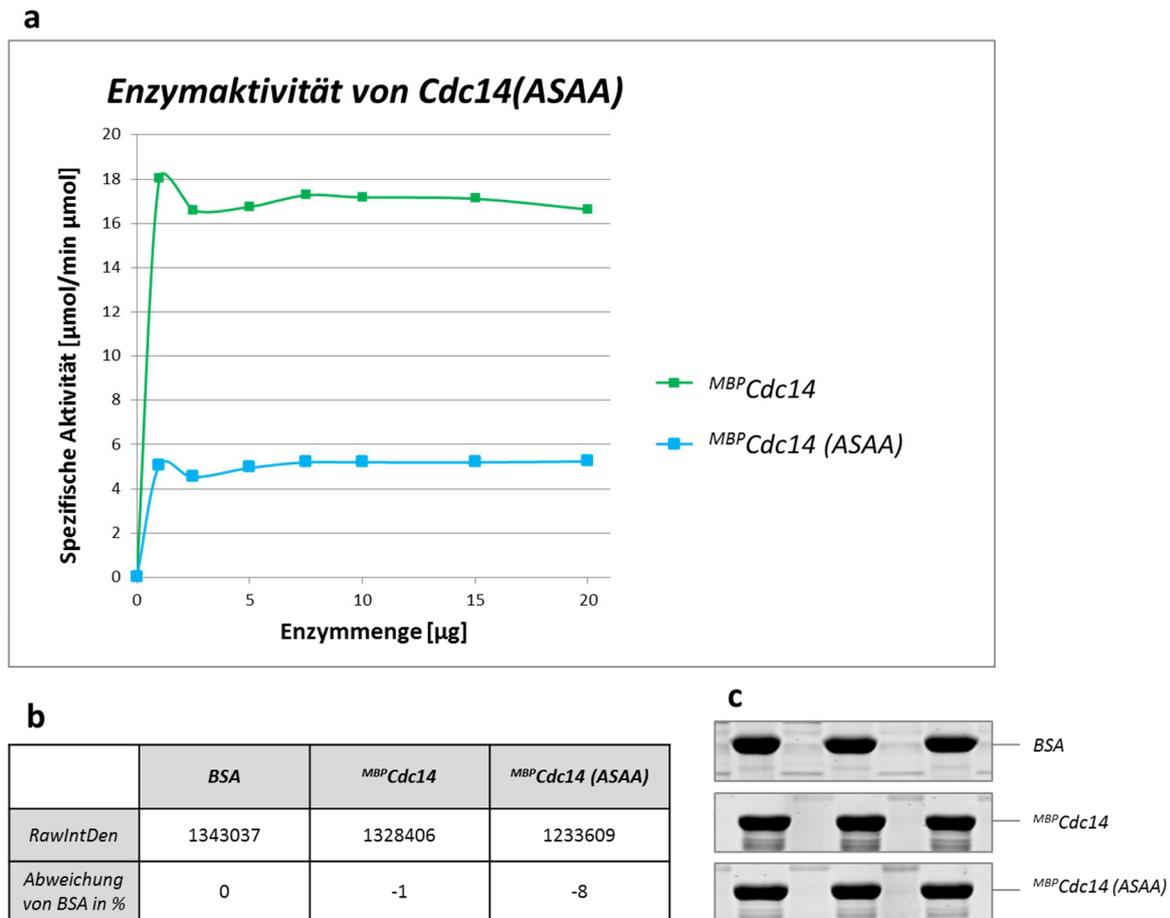


Abb. 58: Phosphataseaktivität von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA). Es wurden die Enzymaktivität abhängig von der Enzymmenge von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA) analysiert. Die Plasmide pWS1634 (*MBP-CDC14*) und pWS5089 (*MBP-CDC14(ASAA)*) wurden heterolog im *E.coli*-Expressionsstamm *BL21C+* exprimiert, aufgereinigt und danach für die Experimente eingesetzt. **a**, Phosphatsetest von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA). Beide Proteine wurden in steigenden Enzymmengen [µg] von 0 µg, 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg, 15 µg und 20 µg eingesetzt, über die Umsetzung des Substrats pNPP zu pNP die Enzymaktivität [µmol/ min*µmol] bestimmt und graphisch aufgetragen. **b**, MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA) wurden möglichst genau an die BSA-Konzentration von 2 µg/ µl angeglichen. Dazu wurden die Proteine jeweils drei Mal auf ein 9%iges SDS-Gel geladen, anschließend mit Coomassie gefärbt und dann mit ImageJ quantifiziert. Die Summe der Pixelwerte (RawIntDen) der zusammengehörigen Proteinbanden wurde gemittelt. Die Summe der Pixelwerte gibt durch den Vergleich mit BSA die Genauigkeit der Angleichung wider. Dazu wurde die Abweichung von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA) zu BSA in Prozent [%] angegeben. **c**, Die für die Quantifizierung verwendeten Proteinbanden von BSA, MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA). Errechnete Proteingrößen: BSA: 66,5 kDa, MBP-Cdc14: 104,5 kDa, MBP-Cdc14(ASAA): 104,5 kDa.

Obwohl die Proteine eng aneinander angeglichen waren (Abb. 58 b), war die Phosphataseaktivität von MBP-Cdc14 bei 20 µg Enzymmenge höher (spezifische Aktivität: 16,63 µmol/ min*µmol) als bei MBP-Cdc14(ASAA) (Faktor 3,4, spezifische Aktivität: 4,90 µmol/ min*µmol, Abb. 58 a). Eine vergleichbare Reduktion der Phosphataseaktivität für Cdc14(ASAA) wurde mit N-terminalen His6-Fusionen von Cdc14 und Cdc14(ASAA) bestätigt (bei 20 µg Enzymmenge, His6-Cdc14: spezifische Aktivität 6,43 µmol/ min*µmol, His6-Cdc14(ASAA): spezifische Aktivität 2,80 µmol/ min*µmol). Dies entspricht einer verminderten Phosphataseaktivität von His6-Cdc14 (ASAA) im Vergleich mit unverändertem Cdc14 (Faktor 2,3, Katharina Hannig, persönliche Mitteilung).

Dies zeigte, dass MBP-Cdc14(ASAA) eine verminderte Phosphataseaktivität aufwies als MBP-Cdc14.

4.6.1 Einfluss der CTD von Cdc14 auf die Net1-vermittelte Inhibition

Die Ergebnisse aus dem Phosphatase-Test mit MBP-Cdc14(ASAA) zeigten, dass MBP-Cdc14(ASAA) *in vitro* eine geringere Phosphatase-Aktivität aufwies als Cdc14 ohne Mutation in der TR2-Sequenz. (Kapitel 4.6). Es stellte sich nun die Frage, ob auch die Inhibition von MBP-Cdc14(ASAA) durch Net1 verändert sein könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass zur Inhibition von Cdc14 N-terminale Net1-Fragmente hinreichend sind (Kapitel 4.2.2).

Um zu untersuchen inwieweit MBP-Cdc14(ASAA) durch Net1 inhibiert wird, wurde ein Phosphatase-Test mit steigenden Mengen an Net1 als Inhibitor durchgeführt.

Dazu wurden MBP-Fusionsproteine von Net1(1-455), Net1(1-233) und Net1(205-455) (aufgereinigt durch Franziska Pielmeier) auf eine Konzentration von 0,25 µg/µl eingestellt. Diese eingestellten Proteine wurden zur Überprüfung zusammen mit BSA (0,25 µg/µl) aus einer BSA-Stammlösung mehrmals auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 59 b), nach der Coomassiefärbung mit ImageJ quantifiziert und nach Ermittlung der *RawIntDen* ein Mittelwert gebildet (Abb. 59 a). Die Abweichung der MBP-Net1-Fragmente nach dem finalen Angleich vergleichend zur BSA-Konzentration wurde in Prozent berechnet und dabei eine Abweichung kleiner als zehn Prozent akzeptiert (Abb. 59 a).

Da sich die Net1-Fragmente in ihrer Proteingröße unterschieden, wurden sie erst nach der Umrechnung in pmol als Inhibitoren eingesetzt. Für den Phosphatase-Test wurden die bereits angeglichenen Proteine MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA) verwendet (Kapitel 4.6). Um die Inhibition zu untersuchen, wurden jeweils 20 µg (entspricht 191 pmol) von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA) zusammen mit den Net1-Fragmenten in steigenden Mengen eingesetzt (Abb. 60 a, b). 191 pmol (markiert durch einen roten Pfeil, Abb. 60 a, b) entspricht dabei einer 1:1-Stöchiometrie von Net1 bezogen auf die Cdc14-Derivate.

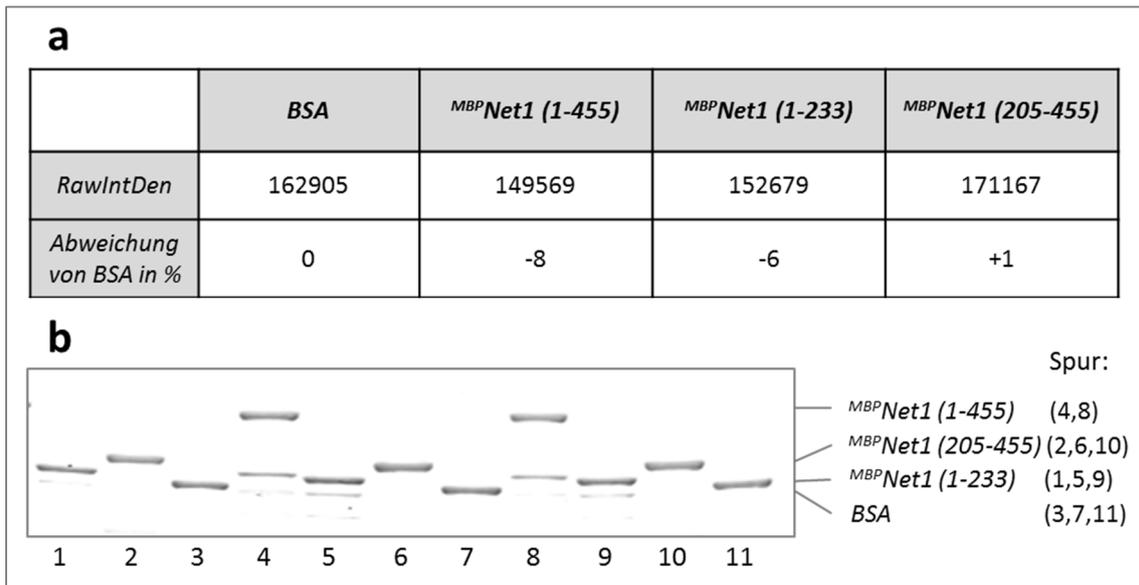


Abb. 59: Proteinangleichung N-terminaler Net1-Fragmente zur Analyse der Inhibition auf Cdc14. Zur Analyse der Inhibition von Cdc14 wurden die N-terminalen Net1-Fragmente MBP-Net1(1-455), MBP-Net1(1-233) und MBP-Net1(205-455) möglichst genau an BSA mit einer Konzentration von 0,25 µg/ µl angeglichen. Alle N-terminalen Net1-Proteine wurden zusammen mit BSA mehrmals auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Visualisierung der Proteine mittels Coomassiefärbung wurde die Summe der Pixelwerte (*RawIntDen*) mit ImageJ quantifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden gemittelt. **a**, Quantifizierung der gemittelten Summe der Pixelwerte zur Ermittlung eines erfolgreichen Proteinangleichs an BSA mit den N-terminalen Fragmenten von Net1 MBP-Net1(1-455), MBP-Net1(1-233) und MBP-Net1(205-455). Die Abweichung der N-terminalen Net1-Proteine zu BSA wurde in Prozent [%] angegeben. **b**, Die zur Quantifizierung verwendeten Proteinbanden der N-terminalen Net1-Fragmente zusammen mit BSA. Verwendete Plasmide zur heterologen Expression im *E. coli*-Expressionsstamm *BL21C+*: MBP-Net1(1-455): pWS5036, MBP-Net1(1-233): pWS5035 und MBP-Net1(205-455): pWS5039. Errechnete Proteingrößen: BSA: 66,5 kDa, MBP-Net1(1-455): 93 kDa, MBP-Net1(1-233): 69 kDa, MBP-Net1(205-455): 69 kDa.

Cdc14 und Cdc14(ASAA) zeigten eine vergleichbare Inhibition durch die N-terminalen Net1-Fragmente *in vitro*. Beide Cdc14-Proteine wurden durch Net1(1-233) nicht inhibiert. Die wirksamste Inhibition erfolgte durch Net1(1-455). Net1(205-455) zeigte eine mittlere Hemmeffektivität (Abb. 60 a, b).

Die Phosphataseaktivität von MBP-Cdc14(ASAA) war deutlich niedriger als die von MBP-Cdc14 (Kapitel 4.6), jedoch wurden beide analog durch Net1 inhibiert. Der essentielle Bereich in der CTD von Cdc14 scheint somit keinen Einfluss auf die Inhibition durch Net1 zu haben.

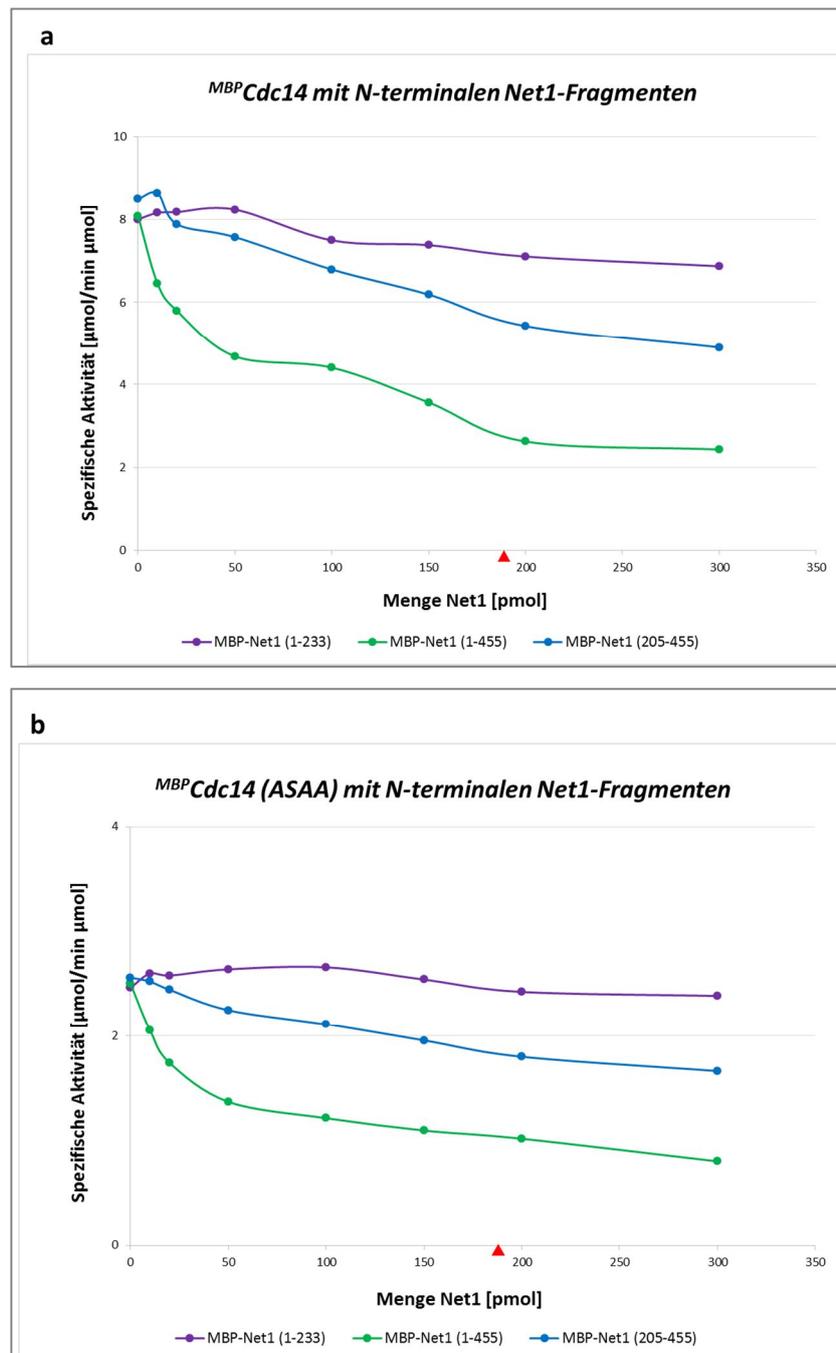


Abb. 60: Inhibition von Cdc14 und Cdc14(ASAA) durch N-terminale Net1-Fragmente. Als Test ob die Inhibition von Cdc14 (ASAA) im Vergleich zu Cdc14 durch Net1 verändert ist, wurden Phosphatase-Inhibitionsexperimente durchgeführt. **a**, Für den Inhibitionstest wurde MBP-Cdc14 mit einer Enzymmenge von 20 μg eingesetzt und dazu steigende Mengen (0 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 50 pmol, 100 pmol, 150 pmol, 200 pmol, 300 pmol) an MBP-Net1(1-455), MBP-Net1(1-233) und MBP-Net1(205-455). Graphisch aufgetragen wurden die steigenden Mengen der Net1-Fragmente [pmol] gegen die ermittelte Phosphataseaktivität [$\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \mu\text{mol}$]. Das rote Dreieck deutet eine 1:1 Stöchiometrie der Proteine Cdc14 zu Net1 bei 191 pmol an. **b**, Zum Test auf eine möglicherweise veränderte Inhibition von Cdc14(ASAA) durch Net1 wurde MBP-Cdc14(ASAA) mit einer Enzymmenge von 20 μg eingesetzt. Zur Inhibition wurden steigende Mengen an MBP-Net1(1-455), MBP-Net1(1-233) und MBP-Net1(205-455) von 0 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 50 pmol, 100 pmol, 150 pmol, 200 pmol und 300 pmol eingesetzt. Aufgetragen wurden die zunehmenden Mengen der N-terminalen Net1-Fragmente [pmol] gegen die ermittelte Phosphataseaktivität [$\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \mu\text{mol}$]. Das rote Dreieck zeigt die Inhibition in der 1:1 Stöchiometrie von Cdc14 zu Net1 (191 pmol).

4.6.2 Geringere *in vitro*-Aktivität der katalytischen Domäne ohne CTD

Die Ergebnisse der Lokalisationsstudien mit C-terminal verkürzten Cdc14-Derivaten (Kapitel 4.4.1) und Cdc14(1-374)-HA3 (Kapitel 4.4.2) zeigten, dass die katalytische Domäne alleine für die biologische Funktion von Cdc14 nicht ausreicht. Dies war unerwartet, da davon ausgegangen wurde, dass der essentielle Charakter von Cdc14 allein auf dessen Phosphataseaktivität beruht. Daher war es von Interesse, die Phosphataseaktivität von *CDC14(1-374)* *in vitro* zu überprüfen.

Für den Phosphatasetest wurden N-terminale MBP-Fusionen von *CDC14* und *CDC14(1-374)* heterolog in *E.coli* exprimiert. Nach Aufreinigung der Proteine wurden sie auf die Proteinmenge von 4 µg eingestellt. Dies wurde anhand der BSA-Stammlösung mit der Konzentration von 4 µg/µl auf einem Proteingel mit anschließender Quantifizierung mittels ImageJ überprüft (Abb. 61 b, c). Nach dem Angleich wurden die Proteine in steigenden Mengen in den Test eingesetzt.

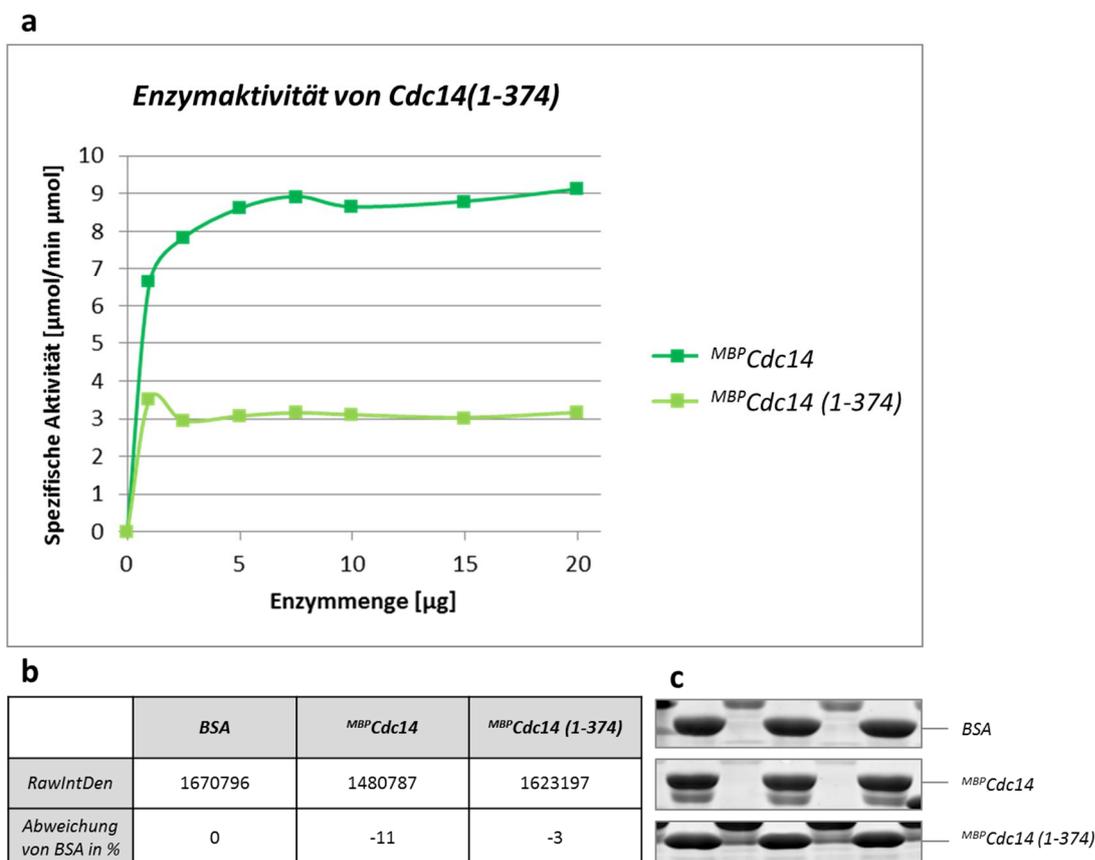


Abb. 61: Die katalytische Domäne zeigt eine geringere Phosphataseaktivität *in vitro*. Die Phosphataseaktivität von MBP-Cdc14 wurde mit der katalytischen Domäne MBP-Cdc14(1-374) verglichen. Dazu wurden die Proteine MBP-Cdc14 (pWS1634) und MBP-Cdc14(1-374) (pWS1635) heterolog im *E. coli*-Expressionsstamm *BL21C+* exprimiert, aufgereinigt und zur Analyse weiter aufgearbeitet. **a**, MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(1-374) wurden in steigenden Enzymmengen von 1 µg, 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg, 15 µg und 20 µg eingesetzt und die Enzymaktivität [µmol/ min*µmol] durch die Umsetzung des Substrats pNPP zu pNP ermittelt. **b**, Die mit ImageJ ermittelte Summe der Pixelwerte (*RawIntDen*) von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14 (1-374) zusammen mit BSA zum Angleich für den Phosphatasetest. Die Abweichung von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(1-374) zur Proteinmenge von BSA (4 µg) wurde in Prozent [%] angegeben. **c**, Die mit Coomassie gefärbten Proteinbanden von BSA, MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(1-374) zur Quantifizierung. Die Summe der Pixelwerte wurde jeweils gemittelt (s. b). Errechnete Proteingrößen: BSA: 66,5 kDa, MBP-Cdc14: 104,5 kDa, MBP-Cdc14(1-374): 85,5 kDa.

MBP-Cdc14 zeigte eine stärkere Phosphataseaktivität (spezifische Aktivität 9,12 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\mu\text{mol}$) im Vergleich zu MBP-Cdc14(1-374) (Faktor: 2,9, spezifische Aktivität: 3,17 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\mu\text{mol}$, Vergleich bei 20 μg Enzymmenge). Dies konnte mit N-terminalen His6-Proteinfusionen von His6-Cdc14 (Spezifische Aktivität: 4,10 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\mu\text{mol}$) und His6-Cdc14(1-374) (Spezifische Aktivität: 1,30 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\mu\text{mol}$) um einen vergleichbaren Faktor bei 20 μg Protein bestätigt werden (Faktor 3,2, Katharina Hanning, persönliche Mitteilung).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Zusatz zur katalytischen Domäne auch die CTD von Cdc14 einen wichtigen Beitrag zur Phosphataseaktivität *in vitro* leistet.

Interessant ist der Vergleich mit den Ergebnissen der *in vitro*-Phosphataseaktivität von MBP-Cdc14(ASAA) (Kapitel 4.6). Die vier Punktmutationen in der CTD von Cdc14 führten somit zu einer Reduktion der Phosphataseaktivität vergleichbar mit der Aktivität vollständiger Deletion der CTD von Cdc14 (Cdc14(1-374)).

5 Diskussion

Cdc14 in *S. cerevisiae* ist der am meisten untersuchte Vertreter aller bekannter Cdc14-Phosphatasen (Mocciaro und Schiebel, 2010). Als Antagonist der Cdk-Aktivität nimmt sie eine essentielle Rolle in der Regulation der Mitose und Zytokinese ein. Die Phosphatase-Aktivität wird durch die Bindung an den Inhibitor Net1 bis zur Anaphase unterdrückt (Shou *et al.*, 1999, Traverso *et al.*, 2001). Net1, ein multifunktionelles Protein, verankert als Kernkomponente des RENT-Komplexes neben Cdc14 auch weitere Proteine im Nukleolus und ist notwendig für dessen Aufrechterhaltung (Visintin *et al.*, 1999, Straight *et al.*, 1999). Aufgrund der Größe von Net1 und seinen multiplen Phosphorylierungen war es bisher schwierig den exakten Mechanismus zur Freisetzung von Cdc14 zu bestimmen. Dazu wurden in dieser Arbeit N-terminale Fragmente von Net1 auf ihre Fähigkeit Cdc14 zu binden und zu inhibieren analysiert, wodurch eine Unterscheidung dieser Domänen in ihren Eigenschaften erkennbar wurde. Nach der nukleolären Freisetzung von Cdc14, was dadurch zu ihrer Aktivierung führt, erfüllt Cdc14 multiple Funktionen im Zellkern und Zytoplasma der Hefezelle. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die katalytische Domäne als auch der variable Teil der Phosphatase einen wichtigen Beitrag zur Lokalisation leisten. Zudem konnte zum einen herausgefunden werden, dass die CTD von Cdc14 einen essentiellen Beitrag für die biologische Funktion leistet und zum anderen die Phosphatase-Aktivität *in vitro* unterstützt.

5.1 Regulation von Cdc14 über Lokalisationssignale

In dieser Arbeit konnten interessante Einblicke über die Regulation der Lokalisation von Cdc14 gewonnen werden. So wurde festgestellt, dass N-terminale Derivate von Cdc14 in Anwesenheit des Wildtyp-Allels in diploiden Hefezellen das im Zellzyklus typische Lokalisationsmuster zeigen. In haploiden Zellen konnte für Cdc14 festgestellt werden, dass die C-terminale NLS hinreichend jedoch nicht notwendig für die korrekte Lokalisation ist. Nur in Abwesenheit der N-terminalen katalytischen Domäne ist die NLS essentiell für den Kerntransport.

5.1.1 Wildtyp-Lokalisation durch Selbstinteraktion?

Fragmente von Cdc14, C-terminal verkürzt bis zur katalytischen Domäne (Cdc14(1-374)), zeigten ein für Cdc14 typisches Lokalisationsmuster in Abwesenheit der NLS in diploiden Hefezellen (Abb. 20 a, Abb. 21 a-f). Während der Interphase und der Metaphase waren diese Derivate im Nukleolus nachweisbar, in der Anaphase war die Freisetzung durch eine punktförmige Lokalisation in der Tochterzelle zu visualisieren. Auffallend war jedoch ein etwas diffuseres Lokalisationsmuster des Fragmentes Cdc14(1-340) welches ausschließlich die in allen Cdc14-Phosphatasen besonders konservierte katalytische Domäne enthält (Abb. 21 g).

Vermutlich spielt die bekannte Selbstinteraktion von Cdc14 eine Rolle für diese unbeeinträchtigte Lokalisation. Die Arbeitsgruppe um Charbonneau (Taylor *et al.*, 1997) zeigte bereits durch zwei unterschiedliche Methoden, dass Cdc14(1-374) aktive Oligomere bildet. Eine Fähigkeit zur Selbstinteraktion N-terminaler Cdc14-Derivate konnte durch Bindungsstudien dieser Arbeit festgestellt werden (Abb. 70). Daher ist wahrscheinlich, dass das Wildtyp-Protein die C-terminal verkürzten Cdc14-Derivate bindet und dadurch die Lokalisation dieser Konstrukte im Zellzyklus unterstützt. Die Proteinbindung von Cdc14(1-340) mit sich selbst wurde bisher nicht untersucht. Es wäre daher möglich, dass die Selbstinteraktion mit diesem Fragment beeinträchtigt ist. Dies wäre eine Erklärung für das geringfügig abweichende Lokalisationsmuster.

5.1.2 Rolle der Lokalisationssequenzen von Cdc14 in *S. cerevisiae*

Eine Voraussetzung für ein Protein um in den Zellkern zu gelangen, ist das Vorhandensein einer darin integrierten Kernlokalisationssequenz. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Cdc14-Mutanten, in denen die NLS in der CTD (Δ AS 506-551) deletiert wurde, in haploiden Hefezellen die typische Lokalisation des Wildtyp-Proteins aufwiesen (Abb. 20 b). Diesen untersuchten Cdc14-Fragmenten sind die katalytische Domäne in der NTD sowie die NES (AS 353-367, Bembek *et al.*, 2005) gemein.

Alle endogen exprimierten C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 lokalisierten im Nukleolus und wurden analog zu Wildtyp-Cdc14 zellzyklus-abhängig freigesetzt (Abb. 20 b, Abb. 22 a, b, Abb. 23 b vgl. Abb. 23 a). Zudem waren diese Derivate auch als punktförmige Strukturen in der Anaphase nachzuweisen, was auf die übliche Assoziation mit dem SPK der Tochterzelle hinweist.

Die nukleoläre Lokalisation kann nach wie vor über die NTD durch die Bindung an den Inhibitor Net1 vermittelt werden. Die Lokalisation im Nukleolus auch des kürzesten Fragments Cdc14(1-434) war nicht verändert (Abb. 23 b). Net1 könnte ebenfalls einen Beitrag für den Kernimport der Cdc14-Derivate leisten. Obwohl bislang nicht eindeutig geklärt ist, auf welche Art der Import von Net1 in den Zellkern und anschließend die Lokalisation im Nukleolus gewährleistet wird (Dissertation Katharina Hannig, 2015), wäre ein Co-Import von Cdc14 durch Net1 denkbar. Eine nukleoläre Lokalisation durch Protein-vermittelte Wechselwirkungen ist nicht unüblich. So wird angenommen, dass die Lokalisation von Net1 im Nukleolus durch die Proteinbindung an das rDNA-bindende Protein Fob1 oder über die Bindung an RNA Pol I vermittelt werden könnte (Huang und Moazed, 2003, Dissertation Katharina Hannig, 2015).

Um die Rolle der C-terminalen NLS zu charakterisieren, wurde von Mohl *et al.* (2009) ein Cdc14-Konstrukt ohne Vorhandensein der NLS analysiert. Dafür wurde *GFP-CDC14(1-506)* unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1,10*-Promotors exprimiert und lokalisiert. Eine Kopie des Wildtyp-Proteins war durch die Integration dieses Konstruktes noch vorhanden. Sie stellten fest, dass

Cdc14(1-506) in Abwesenheit der NLS zwar im Nukleolus angereichert, dieses Konstrukt jedoch zusätzlich im Zellkern und Zytoplasma zu visualisieren war. Die Ursachen für die unterschiedlichen Lokalisationsmuster von Cdc14(1-506) dieser Arbeit im Vergleich zu Mohl *et al.* (2009) könnten zum einen durch die transiente und bekannte heterogene Expression des *GAL1,10*-Promotors erklärt werden. Zum anderen könnte die Position der GFP-Fusion für die Lokalisation relevant sein. Die wohlbekannte Selbstinteraktion von Cdc14 kann zwischen Cdc14(1-506) und der Wildtyp-Kopie im Versuchsaufbau von Mohl *et al.* (2009) ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dies deutet darauf hin, dass die endogene Expression von Cdc14 in Abwesenheit der NLS dieser Arbeit am ehesten der tatsächlichen Physiologie und Lokalisation des Proteins entspricht.

Als Erklärung für den regulierten Kerntransport dieser Cdc14-Derivate wäre ein Beitrag der Karyopherine über eine Proteinbindung denkbar. Sie gehören zur Importin- β -Familie und binden zum Transport der Proteine an Lokalisationssequenzen (Asakawa und Toh-e, 2002). Von insgesamt 14 bekannten Transportproteinen in *S. cerevisiae* sind 10 dafür bekannt den Import von Proteinen zu unterstützen. Ein Vertreter davon ist Kap121 (auch bekannt als Pse1, Chook und Süel, 2010). Crm1, ein weiteres Transportprotein unterstützt dagegen ausschließlich den Export von Proteinen (Asakawa und Toh-e, 2002, Bemenek *et al.*, 2005). Bis auf die MEN-abhängige NLS in der CTD von Cdc14, ist bisher keine weitere NLS belegt. Es wurde nachgewiesen, dass Kap121 *in vitro* Cdc14 an der CTD (AS 540-551) binden kann und so den Kernimport unterstützt (Kobayashi *et al.*, 2015). Deshalb kann die Regulation der NTD-Fragmente von Cdc14 über das Transportprotein Karyopherin Kap121 ausgeschlossen werden.

Welchen Beitrag die NES während der Mitose leistet, ist derzeit fraglich. Zur Initiierung der Degradation der mitotischen Zyklone muss eine Dephosphorylierung des APC/C-Aktivatorproteins Hct1 durch Cdc14 vorangegangen sein. Dann kann Hct1 an den APC/C binden und dadurch die Degradation von Clb2 initiieren. Interessanterweise war eine mutierte NES von Cdc14 nicht hinreichend, um die Clb2-Degradation zu verhindern (Bembenek *et al.*, 2005). Daraus wurde gefolgert, dass die NES ausschließlich eine Rolle im direkten Austritt aus der Mitose, sowie in der Zytokinese eine Rolle spielt (Bembenek *et al.*, 2005). Mitunter wird überlappend mit der NES (Bembenek *et al.*, 2005) mit einem informatischen Programm in dieser Region eine schwache NLS (Wertigkeit 4,4 auf einer Skala von 10) vorhergesagt (Kosugi *et al.*, 2009). Möglicherweise kann die NES zusätzlich eine NLS-Funktion erfüllen, was die gewisse Redundanz der NLS in der CTD erklären könnte. Proteine aus der Familie der Karyopherine können sowohl NES- als auch NLS-Sequenzen erkennen und so neben dem exklusiven Kernimport und Export auch am bidirektionalen Transport beteiligt sein (Chook und Süel, 2010). Aufgrund der Vielfältigkeit, bezogen auf die Länge und die Sequenz, ist es schwierig eine NLS vorherzusagen. Obwohl NLS hauptsächlich lysinreich sind, ist kein klarer Konsensus für alle NLS-Sequenzen vorhanden (Chook und Süel, 2010). Es ist somit nicht

ausgeschlossen, dass diese Lokalisationssequenz auch zum Kernimport beitragen könnte. Es wäre denkbar, dass ein Karyopherin an die NES binden und dadurch den Import von Cdc14 in den Zellkern unterstützen kann. Um die unbeeinträchtigte Lokalisation von Cdc14 in Abwesenheit der NLS erklären zu können, müssten innerhalb der Phosphatase noch weitere Lokalisationssequenzen liegen, die hinreichend zum Kernimport sind.

Ein Vergleich bekannter funktionaler Lokalisationsdomänen von Cdc14-Phosphatasen in anderen Organismen ergab wenig Aufschluss. Im humanen Cdc14-Ortholog hCDC14B befindet sich konsistent mit der Bäckerhefe eine Crm1-vermittelte NES im variablen Teil, eine Nukleolus-spezifische Lokalisationssequenz in der NTD, aber keine weitere bekannte NLS (Bembenek *et al.*, 2005, Mocciaro und Schiebel, 2010). Da Cdc14 durch die Lokalisation streng reguliert wird, ist es höchst wahrscheinlich, dass multiple Sequenzen zur Lokalisation beitragen. Cdc14 ist ausschließlich in *S. cerevisiae* essentiell. Daher ist die multiple Regulation durch zusätzliche Lokalisationssequenzen in anderen Organismen möglicherweise nicht notwendig. Für den Kernexport und Kernimport war das in dieser Arbeit analysierte C-terminale Fragment Cdc14(342-551) jedoch hinreichend (Abb. 26). Dieses Konstrukt enthielt sowohl die NES, als auch die NLS. So war alleinig die CTD von Cdc14 ausreichend für den zellzyklus-abhängigen Kerntransport. Da in diesem Versuchsaufbau noch das Wildtyp-Allel von Cdc14 vorhanden war, ist jedoch auch eine Selbstinteraktion nicht auszuschließen, sollten auch Regionen nach Position AS 342 dazu beitragen. In einer Proteinbindungsstudie war allerdings keine Selbstinteraktion von Cdc14(342-551) nachweisbar (Abb. 70). Die Interaktion zwischen diesem C-terminalen Derivat und Wildtyp-Cdc14 ist ohnehin unwahrscheinlich, da angenommen werden kann, dass eine Interaktion mit dem Wildtyp-Protein, wie bereits für diploide Hefezellen beschrieben (Kapitel 5.1.1), zur Wiederherstellung der nukleolären Lokalisation führen würde. Ein Vergleich des C-terminalen Derivates mit Wildtyp-Cdc14 gestaltete sich schwierig. Neben dem Fehlen einer typischen nukleolären Struktur war auch in der Anaphase keine Assoziation mit dem SPK nachweisbar. Eine Erklärung für die veränderte Lokalisation wäre, dass ausschließlich die katalytische Domäne notwendig für die nukleoläre Lokalisation ist. Dies ist wahrscheinlich, da angenommen wird, dass Cdc14 über die NTD durch Net1 im Nukleolus verankert wird (Traverso *et al.*, 2001). Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die N-terminale GFP-Fusion dieses Proteins die Lokalisation im Nukleolus beeinträchtigt. In Abwesenheit der katalytischen Domäne von Cdc14 scheint die NLS (Position AS 506-551) dennoch essentiell für den Kerntransport zu sein. Dies zeigte die Analyse des C-terminalen Fragmentes in Abwesenheit der NLS (Cdc14(342-506)) (Abb. 27). Dieses Derivat war vollkommen delokalisiert und nicht länger hinreichend für den Import und Export in den Zellkern. Wird angenommen, dass die NES zugleich eine NLS-Funktion erfüllen könnte, würde diese somit allenfalls eine unterstützende Funktion aufweisen.

Dies bedeutet, dass die CTD zwar hinreichend für den nukleo-zytoplasmatischen Kerntransport ist, die Lokalisation im Nukleolus ist jedoch abhängig vom Vorhandensein der katalytischen Domäne. Obwohl eine weitere NLS innerhalb der CTD unwahrscheinlich ist, müssen, um die Kernlokalisation erklären zu können, zusätzliche Lokalisationsdomänen oder andere Mechanismen zur Regulation vorliegen.

5.2 Die Net1-vermittelte Regulation von Cdc14

Net1 ist in *S. cerevisiae* ein wichtiges Protein, um die Phosphatase-Aktivität von Cdc14 über den Großteil der Zeit im Zellzyklus zu inhibieren. Die Freisetzung von Cdc14 von Net1 erfolgt sukzessiv: In der frühen Anaphase wird Cdc14 über FEAR und in der späten Anaphase über MEN reguliert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cdc14 ohne die Bindung an Net1 zu früh aus dem Nukleolus freigesetzt wird. Darüber hinaus konnten zwischen Cdc14-Bindung und Cdc14-Inhibition durch Net1 unterschieden werden.

5.2.1 Einfluss von Net1 auf die Lokalisation von Cdc14

Aufgrund der bekannten Wachstumsdefekte von $\Delta net1$ -Zellen wurde ein Net1-Konstrukt mit einer Deletion der NTD bis AS 233 zur Analyse der Lokalisation von Cdc14 herangezogen. Net1(234-1189) war vollständig in der Hefezelle verteilt und es war keine nukleoläre Anreicherung feststellbar (Abb. 9 b). Cdc14 war hier, trotz der leichten Anreicherung im Nukleolus, für diese Zellzyklusphase untypisch, bereits im Zellkern visualisierbar (Abb. 10 b). Höchstwahrscheinlich resultiert diese Fehllokalisation von Cdc14 im Zellkern aus der fehlenden Verankerung durch Net1. Es wäre auch denkbar, dass Net1 durch eine starke Proteinwechselwirkung die Phosphatase aus dem Nukleolus zieht. Es ist nicht feststellbar, ob die verfrühte Freisetzung von Cdc14 auch mit einer vorzeitigen Aktivierung der Phosphatase einhergeht oder ob Cdc14 auch im Zellkern durch die Bindung an delokalisiertem Net1 inhibiert wird. Den Daten von Shou *et al.* (1999) nach ist letzteres vermutlich zutreffender. In $\Delta net1$ -Zellen sowie mit der temperatursensitiven (ts) Mutante *net1-1* wurde von Shou *et al.* (1999) zwar eine Zunahme der Cdc14-Aktivität nachgewiesen, jedoch konnte die Phosphatase-Aktivität durch eingesetzte Net1-gekoppelte *Beads* wieder inhibiert werden. Überträgt man diese Sachlage auf diese Arbeit, könnte Cdc14 durch den Anteil an freigesetztem Net1 im Zellkern inhibiert werden. Gleichzeitig war durch die konstitutive Überexpression von *NET1(234-1189)* eine größere Menge an Inhibitor vorhanden.

Fraglich ist, weshalb noch eine geringfügige Anreicherung von Cdc14 im Nukleolus festzustellen ist, nicht aber für Net1(234-1189). Die konstitutive Überexpression von *NET1(234-1189)* in diesem Versuchsaufbau, führte zu einem äußerst intensiven Fluoreszenzsignal (Abb. 9 b). Daher wäre es möglich, dass Net1(234-1189) teilweise noch im Nukleolus verankert ist, aber durch die Menge an

Fluoreszenzsignal kein Unterschied zwischen der Lokalisation im Nukleolus, Zellkern und dem Zytoplasma festzustellen war. Cdc14 wurde in diesen Zellen auf endogenem Niveau exprimiert. Aufgrund der geringeren Intensität des Fluoreszenzsignals konnte die Lokalisation von Cdc14 innerhalb des Zellkerns leichter unterschieden werden. In der Literatur wurde ein vergleichbarer Phänotyp von Cdc14 beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Deshaies (Shou *et al.*, 1999) stellte fest, dass Cdc14 zwar in $\Delta net1$ -Zellen vollkommen delokalisiert war, in ts-Mutanten jedoch, noch eine Anreicherung von Cdc14 im Nukleolus feststellbar war.

Neben der verfrühten Freisetzung in den Zellkern in Zellen mit Net1(234-1189), wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine korrelierende verfrühte Assoziation von Cdc14 mit dem SPK festgestellt (Abb. 11). Cdc14 lokalisierte bereits in Zellen ohne Knospe am SPK. Zu diesem Zeitpunkt war noch keine Separation der SPKs feststellbar, dies spricht dafür, dass die Mitosephase noch nicht eingesetzt hat. Sollte Cdc14 in diesem Zellzyklusstadium dennoch aktiv sein, ist unklar welche Funktion es erfüllen könnte. Im Vergleich zur Anaphase ist die Cdk1-Aktivität bis zum Einsetzen der Mitose noch gering (Uhlmann *et al.*, 2011). Die Cdk1-Aktivität könnte die Phosphatase-Aktivität in dieser Zellzyklusphase überwiegen und damit einen Phänotyp maskieren. Möglich wäre aber auch, dass Cdc14 mit Proteinen, die am SPK assoziiert sind, bereits interagiert. Bisher sind zwei Proteine des MEN bekannt, die in Zellen mit ungetrennten Zellkernen mit dem SPK assoziiert sind (Bardin und Amon, 2001). Die beiden MEN-Komponenten Tem1 und Bub2-Bfa1 (vgl. Abb. 7). Eine Interaktion von Cdc14 mit Tem1 und Bfa1 ist bekannt. Weitere MEN-Komponenten, Cdc15 und Dbf2-Mob1, lokalisieren an beiden SPKs, nachdem die Zellkerne schon getrennt wurden (Bardin und Amon, 2001). Da Cdc14 in Zellen mit Net1(234-1189) an einem SPK zu sehen war, unterstützen die Ergebnisse eher die Annahme, dass Cdc14 mit Tem1 und Bub2-Bfa1 assoziiert. In Zellen vor dem Anaphasebeginn ist MEN noch nicht aktiv (Yoshida *et al.*, 2002). Sobald Cdc14 in der frühen Anaphase (FEAR) vom Nukleolus freigesetzt wird, wird Bfa1 am SPK gebunden, jedoch erst in der späten Anaphase dephosphoryliert, was anschließend zur weiteren Aktivierung von MEN beiträgt (Pereira *et al.*, 2002).

Zudem ist bekannt, dass Cdc14 nach der nukleolären Lokalisation in der frühen Anaphase mit der elongierenden Spindel und dem Kinetochorprotein Nuf2 interagiert, jedoch nicht physisch mit dem SPK assoziiert ist (Pereira und Schiebel, 2003). Die Unterscheidung ist jedoch nur schwer zu treffen, da sich Nuf2 und der SPK vor der Mitose überlagern. Ob Cdc14 mit Nuf2 nach verfrühter Freisetzung interagiert, ist bislang nicht bekannt (Pereira und Schiebel, 2003).

Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass Cdc14 in Zellen ohne korrekt lokalisiertes Net1 verfrüht im Zellkern und am SPK lokalisiert. Ob Cdc14 jedoch abseits der Freisetzung durch FEAR und MEN funktionell aktiv ist, ist unbekannt. Es konnte keine verfrühte Aktivierung von MEN, die durch eine Verkürzung der Anaphase veranschaulicht werden könnte, beobachtet werden.

5.2.2 Trennung der Cdc14-Bindung und Inhibition durch Net1

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Domänen von Net1 hinreichend zur Bindung an Cdc14 bzw. zur der Inhibition der Phosphatase-Aktivität sind. Obwohl ein Beitrag des *pFAM10407*-Motivs in Net1 zur Bindung von Cdc14 nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, scheint es *in vivo* keinen Einfluss auf die Inhibition von Cdc14 zu haben.

5.2.2.1 Beitrag mehrerer Domänen von Net1 zur Bindung von Cdc14

Traverso *et al.* (2001) belegten bereits, dass ein N-terminales Fragment von Net1(1-600) hinreichend zur Inhibition von Cdc14 war. Net1 wurde als spezifischer, kompetitiver Inhibitor erkannt, der die katalytische Domäne von Cdc14 binden konnte. Vergleichend dazu wurde ein weiteres Derivat Net1(1-341) untersucht, welches Cdc14 ebenfalls inhibieren konnte, jedoch etwas geringfügigere Affinität als Net1(1-600) aufwies. Traverso *et al.* (2001) stellten fest, dass weitere Fragmente kleiner als Net1(1-341) keine schlüssigen Ergebnisse lieferten bzw. konnten nicht für *in vitro*-Analysen aufgereinigt werden. Die CTD von Cdc14 war dagegen nicht nötig um durch Net1 gebunden und inhibiert zu werden. Traverso *et al.* (2001) postulierten die Hypothese, dass die Inhibition der Phosphatase-Aktivität physisch durch die Bindung an Net1 erreicht wird. Dadurch würde die Wechselwirkung von Cdc14 mit dessen Substraten verhindert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der NTD von Net1 mehrere Bereiche zur Proteinbindung mit Cdc14 beitragen (Kapitel 4.2.1). Konsistent zu Traverso *et al.* (2001) wurde festgestellt, dass sich die Fähigkeit zur Cdc14-Bindung erhöhte, sofern die N-terminalen Net1-Fragmente in der Länge zunahm (Abb. 13, Abb. 14, Abb. 16, vgl. Tab. 2). Der Vergleich zwischen Net1(202-455), Net1(270-455) und Net1(342-455) zeigte, dass vor AS 342 Bereiche liegen, die zur Interaktion hinreichend sind (Abb. 14). Die Fähigkeit Cdc14 zu binden reduzierte sich mit zunehmender Deletion der NTD von Net1: Von diesen Konstrukten war die Bindung von Cdc14 mit Net1(202-455) am robustesten, nahm mit Net1(270-455) stark ab und war mit Net1(342-455) nicht mehr nachweisbar (Abb. 14, Tab. 2). Letzteres deckt sich auch mit den Ergebnissen von Traverso *et al.* (2001), die zwischen Net1(342-1189) und Cdc14 keine Wechselwirkung im Y2H feststellen konnten. Das in dieser Arbeit getestete kürzeste N-terminale Net1-Fragment (Net1(1-201)) zeigte eine schwache Proteininteraktion mit der Phosphatase (Abb. 14, Abb. 16). In dieser Region von Net1 befindet sich das bekannte *pFAM10407*-Motiv (AS 70-143), welches eine starke Sequenzähnlichkeit zu Tof2 (AS 81-153) und geringere Ähnlichkeit zu Dnt1 (AS 18-79) aus der Spaltheife aufweist (Jin *et al.*, 2007). Allen gemeinsam ist, Cdc14 zu binden. Aufgrund dessen wurde dieses Motiv in der *Saccharomyces Genome Database* als *Cdc14 phosphatase binding protein N-terminus* bezeichnet (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Der Begriff scheint jedoch irreführend zu sein, da diese *pFAM*-Sequenz vermutlich nicht zur Cdc14-Bindung beiträgt. Es war nur eine geringe Bindung zwischen Net1(1-201)

und Cdc14 nachweisbar, obwohl das *pFAM*-Motiv darin enthalten ist. Unterstützend dazu erhöhte sich die Fähigkeit mit zunehmender Länge des Net1-Derivates auch in Abwesenheit der *pFAM*-Sequenz eine Interaktion mit Cdc14 einzugehen (Net1(202-455) bzw. Net1(205-455)) (Abb. 14, Abb. 60 a). Dies bestätigt zusätzlich vorangegangene Interaktionsstudien unserer Arbeitsgruppe (Dissertation Katharina Hannig, 2015). Andere Funktionen der *pFAM* sind eher wahrscheinlich. So konnte gezeigt werden, dass N-terminale Sequenzen von Net1 eine Rolle in der DNA-Bindung spielen (Dissertation Katharina Hannig, 2015). Die DNA-Bindefähigkeit ist konsistent zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da Net1 mit einer Deletion der NTD einschließlich AS 233 vollständig delokalisiert war und somit die Bindung an die rDNA im Nukleolus stark beeinträchtigt war (Abb. 9 b). Eine weitere Funktion dieses Bereiches besteht vermutlich zudem darin die Net1-Selbstinteraktion zu unterstützen. In unserer Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, dass die Sekundärstruktur von Net1(80-142) große Ähnlichkeit zu dem Scaffoldprotein Par-3 aufweist (Dissertation Katharina Hannig, 2015). In Eukaryoten unterstützt Par-3 die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität (Zhang *et al.*, 2013). Von Par3 ist bekannt, dass es zur Oligomerisierung fähig ist. Diese Selbstinteraktion findet über die N-Termini der Par-3-Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen statt (Zhang *et al.*, 2013). Wird dieser für die Interaktion notwendige Bereich von Par-3 mit Net1 verglichen, kann dort eine große Ähnlichkeit der AS festgestellt werden (Dissertation Katharina Hannig, 2015). In den Bindungsstudien dieser Arbeit war eine Wildtyp-Kopie von Net1 noch enthalten. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung von Cdc14 mit dem kürzesten getesteten Fragment indirekt, also durch Interaktion mit dem Net1-Wildtypprotein, einhergeht.

Wird angenommen, dass die *pFAM10407* keinen Beitrag zur Proteinbindung von Net1 mit Cdc14 leistet, müssen vor AS 342 dennoch Sequenzen liegen, die die Proteininteraktion unterstützen können. Werden Net1-verwandte Proteine der Hefen *Torulaspora*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Ashbya* und *Kluyveromyces* miteinander verglichen, stellt man in der N-terminalen Region einige konservierte Bereiche fest: AS 1-12, AS 74-141, AS 158-165, AS 209-222, AS 242-259, AS 276-389, AS 304-318 und AS 359-402 (Abb. 62). Es wird davon ausgegangen, dass die Interaktion von Net1 mit Cdc14 durch sukzessive Phosphorylierungen geschwächt wird. Bisher sind insgesamt 19 Phosphorylierungen von Net1 durch Cdk1 nachgewiesen (Azzam *et al.*, 2004, Holt *et al.*, 2009). Es ist jedoch nur eine einzige Phosphorylierungsstelle der Polokinase Cdc5 bekannt: T212 (Azzam *et al.*, 2004). Fünf Cdk1-Phosphorylierungsstellen befinden sich davon in der NTD vor AS 342 (S166, S231, S252, S259, T297, Abb. 62). Innerhalb Net1(1-201) befindet sich nur eine Cdk1-Phosphorylierungsstelle (S166). Ob diese Phosphorylierungsstelle einen Beitrag zur sukzessiven Freisetzung von Cdc14 leistet, kann derzeit nicht beantwortet werden. Es wäre dennoch denkbar, dass der kurze konservierte Bereich (AS 1-12) die Proteinbindung unterstützen könnte.

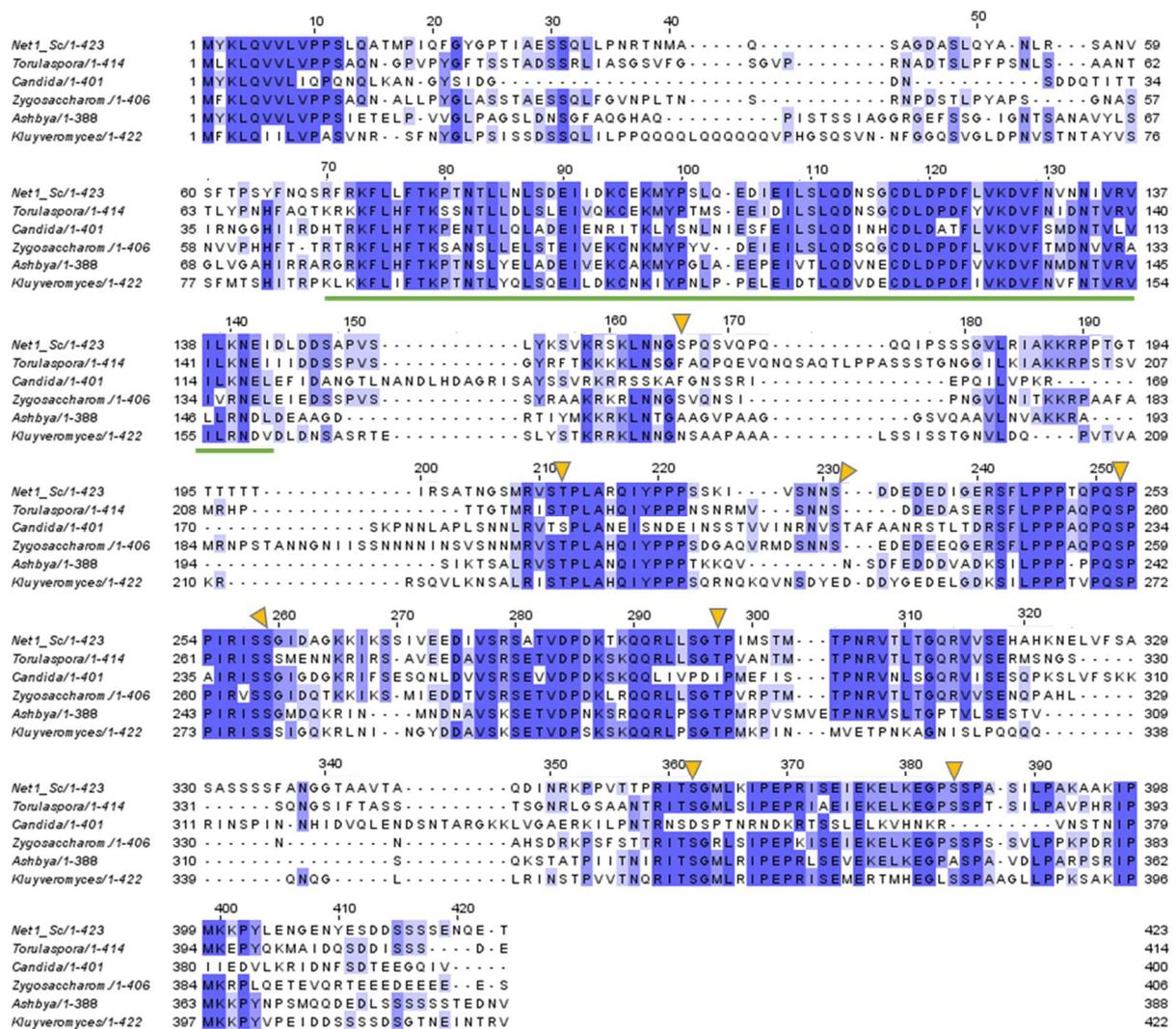


Abb. 62: Sequenzanalyse zwischen Net1-verwandten Proteinen. Der Sequenzvergleich wurde mit Jalview durchgeführt. Dazu wurden die N-terminalen Bereiche der Hefen *Torulaspora*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Ashbya* und *Kluyveromyces* mit Net1(AS 1-423) aus *S. cerevisiae* verglichen. Identische AS sind dunkelblau gekennzeichnet, ähnliche AS in Abstufungen hellblau hinterlegt. Die *pFAM10407*-Sequenz ist grün hervorgehoben, relevante Phosphorylierungsstellen sind mit orangen Pfeilen markiert.

Net1 codiert mit 1189 AS für ein vergleichsweise großes Protein. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass vor AS 342 bzw. vor AS 233 Bereiche liegen, die für die Faltung des Proteins notwendig sind.

Es werden vermutlich mehrere Bindedomänen in der NTD von Net1 zur Interaktion mit Cdc14 beitragen. Die Sequenz AS 1-270, worin der konservierte Bereich der AS 1-12 enthalten ist, könnte eine erste Region sein. Da sich in diesem Bereich jedoch keine Phosphorylierungsstelle befindet, würde diese Sequenz eine schwache grundlegende Bindung mit Cdc14 eingehen. Diese Interaktion würde mit zunehmenden Phosphorylierungen an den anderen Phosphorylierungssequenzen so sehr geschwächt, dass ab einem gewissen Punkt die Freisetzung von Cdc14 der Bindung überwiegt. Die

Binderegion AS 1-270 wäre durch das vermutlich nicht für die Proteinbindung notwendige *pFAM*-Motiv unterbrochen, ein Beitrag kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zusätzlich könnte die Bindung durch den Bereich AS 342-455 unterstützt werden, da eine gesteigerte Interaktionsfähigkeit von Net1(1-341) zu Net1(1-455) festgestellt werden konnte (Abb. 16). Vermutlich tragen zusammengenommen mindestens drei Bereiche in Net1 zur *in vivo*-Bindung von Cdc14 bei. Dabei wird die Bindung umso robuster, desto mehr dieser Bereiche die Interaktion unterstützen.

Tab. 2: Übersicht der untersuchten N-terminalen Fragmente von Net1 auf die Proteinwechselwirkung mit Cdc14. Zur Analyse wurden eine CoIP mit den Net1-Fragmenten unter der Kontrolle eines induzierbaren Galaktose-Promotors und unter der Kontrolle eines Methionin25-Promotors durchgeführt. Zur Ergänzung wurde die Wechselwirkung im Y2H untersucht. Sehr robuste Interaktion: +++, robuste Interaktion: ++, schwache Interaktion: +, keine Interaktion -. Eine Abstufung wurde durch Klammern gekennzeichnet.

	Interaktion		
	CoIP- <i>pGAL1</i>	CoIP- <i>pMET25</i>	Y2H
Net1 1-455	+++	+++	+++
Net1 1-341	+++	++	+++
Net1 1-269	++(+)		
Net1 1-201/ 1-233	+	+	+?
Net1 202-455/ 205-455	++		
Net1 270-455	+		
Net1 342-455	-		

5.2.2.2 Die Cdc14-Inhibitionsdomäne von Net1

Im Vergleich der hinreichenden Cdc14-Bindedomänen der Net1-Fragmente zeigten sich unterschiedliche Eigenschaften dieser Derivate Cdc14 zu inhibieren.

In den Wachstumsanalysen wiesen Net1(1-455) und Net1(202-455) die stärkste Inhibitionsfähigkeit von Cdc14 auf (Abb. 17), obwohl die *pFAM10407*-Sequenz in letzterem N-terminal verkürzten Konstrukt nicht enthalten ist. Interessanterweise, war die Inhibition von Cdc14 durch Net1(1-341) und Net1(270-455) durchaus vergleichbar und ebenfalls effizient. Dies war überraschend, da für Net1(270-455) nur eine geringe Proteininteraktion mit Cdc14 nachgewiesen werden konnte (Abb. 14). Im Gegensatz war Net1(1-269) zu einer äußerst robusten Präzipitation von Cdc14 hinreichend, zeigte jedoch eine sehr geringe Inhibitionswirkung (vgl. Abb. 14 mit Abb. 17). Keine Inhibition war mit Net1(1-201) und Net1(342-455) erkennbar (Abb. 17). Die Fähigkeit zur Inhibition von Cdc14 durch

die Net1-Derivate scheint somit gänzlich unabhängig vom Vorhandensein der *pFAM10407* zu sein. Im Wachstumstest ebenso wie im Phosphatase-Inhibitionstest wurde mit Net1(1-455) die stärkste Inhibition von Cdc14 festgestellt (Abb. 17, Abb. 60 a). Konsistent mit dem Ergebnis des Wachstumstests, konnte keine Inhibition mit Net1(1-233) festgestellt werden. Net1(1-201) und Net1(1-233) weisen somit ähnliche Eigenschaften auf. Konstrukte denen die Sequenzen AS 270-342 fehlten, waren nicht hinreichend um Cdc14 zu inhibieren (vgl. Abb. 17). Diese Region war somit zur Inhibition von Cdc14 essentiell. Sie scheint jedoch einen minimal notwendigen Bereich darzustellen. Eine robustere Inhibition konnte *in vivo* immer dann beobachtet werden, wenn Net1 zusätzlich die Sequenzen vor AS 270 enthielt. Im Kontrast dazu, scheint der N-terminale Bereich von Net1 *in vitro* relevant zu sein. Net1(205-455) inhibierte Cdc14 *in vitro* weniger effektiv als Net1(1-455) (Abb. 60 a, zusammengefasst in Tab. 3). Wie diese Diskrepanzen zu erklären sind, bleibt ungelöst. *In vivo* unterstützen jedoch auch die jeweilige Zellzyklusphase sowie andere Proteine die Wechselwirkung von Net1 mit Cdc14. Auch die Möglichkeit einer nicht der Physiologie entsprechenden Proteinfaltung in *in vitro*-Analysen kann nicht außer Acht gelassen werden. Für eine inhibitorische Wirkung ist auch die Stöchiometrie zwischen Phosphatase und Inhibitor essentiell. In den Phosphatasetests wurden zu einer vorher experimentell bestimmten Menge an Cdc14 die Net1-Fragmente in steigenden Mengen zugegeben. Das Verhältnis der Proteine zueinander ist *in vivo* derzeit nicht eindeutig geklärt. Die Anzahl der Net1-Moleküle pro Zelle ist mit Angaben von 1590 bis 1939 Molekülen pro Zelle vergleichsweise konsistent (Ghaemmaghami *et al.*, 2003, Kulak *et al.*, 2014). Für Cdc14 variiert die Anzahl von 938 bis 8550 Molekülen pro Zelle um fast einen Faktor 10 (Ghaemmaghami *et al.*, 2003, Kulak *et al.*, 2014). Wird davon ausgegangen, dass Cdc14 voller Länge aktive Dimere oder Trimere bildet (Taylor *et al.*, 1997), könnte ein Verhältnis mit bis zu 6-fachem Überschuss von Net1 bzw. bis zu einem 3-fachen Überschuss an Cdc14, je nach Molekülangebe, physiologisch sein. Im Phosphatasetest zeigte die 1:1-Stöchiometrie eine starke Reduktion der Aktivität von Cdc14, die auch mit höheren Mengen an eingesetztem Inhibitor nur noch geringfügig zunahm (Abb. 60 a). Eine effiziente Hemmung war jedoch bereits mit deutlich geringeren Mengen an Net1(1-455) feststellbar. So war schon mit einem Verhältnis von 10 Molekülen Cdc14 zu 1 Molekül Net1 (191 pmol Cdc14 zu 20 pmol Net1(1-455)) eine robuste Inhibitionswirkung feststellbar. Ob Cdc14 in diesem *in vitro*-Test Oligomere bildet, wurde nicht untersucht. In welchem Verhältnis Cdc14 und Net1 *in vivo* stehen, bleibt, um die genaue Regulation verstehen zu können, noch zu klären.

Ein Vergleich der Net1-Derivate die zur Inhibition von Cdc14 *in vivo* relevant sind, zeigt deutlich, dass die *pFAM10407*-Sequenz weder hinreichend noch notwendig ist um die Phosphatase-Aktivität zu inhibieren. Eine Kooperation zwischen Cdc14-Bindung und Inhibition durch Net1 im Bereich von AS 202-270 ist äußerst wahrscheinlich.

Tab. 3: Übersicht der untersuchten N-terminalen Fragmente von Net1 auf die inhibitorische Wirkung von Cdc14. Zur Analyse wurde ein Wachstumstest nach Überexpression der Net1-Fragmente (pGAL1) untersucht. Zudem wurde im Phosphatase-Test die Inhibitionswirkung der Net1-Derivate auf Cdc14 analysiert (pNPP). Sehr robuste Interaktion: +++, robuste Interaktion: ++, schwache Interaktion: +, keine Interaktion -. Eine Abstufung wurde durch Klammern gekennzeichnet.

	Inhibitor	
	Wachstumstest	Phosphatase-test
Net1 1-455	+++	+++
Net1 1-341	++(+)	
Net1 1-269	+	
Net1 1-201/ 1-233	-	-
Net1 202-455/ 205-455	+++	+(+)
Net1 270-455	++(+)	
Net1 342-455	-	

5.2.2.3 Modell zur Bindung und Inhibition von Cdc14

In Übereinstimmung mit Traverso *et al.* (2001) konnte gezeigt werden, dass N-terminale Net1-Fragmente hinreichend zur Bindung und Inhibition von Cdc14 sind. Interessant ist jedoch, dass diese Arbeit zeigt, dass zum einen zwischen Cdc14-bindenden und Cdc14-inhibierenden Eigenschaften in Net1 unterschieden werden kann. Zum anderen weisen mehrere Regionen in Net1 Cdc14-bindende Eigenschaften auf, jedoch nur eine Region ist *in vivo* hinreichend um Cdc14 zu inhibieren.

Für die Bindung relevante erste Sequenz würde sich in äußerster N-terminaler Region befinden. Zudem tragen höchstwahrscheinlich Sequenzen zwischen AS 202-270 sowie ein Bereich nach AS 342 zur Interaktion bei. Für die Inhibition von Cdc14 scheint es eine essentielle Domäne von AS 202 bis 342 zu geben, wobei der Bereich von AS 270 bis 342 eine minimal notwendige Sequenz darstellt. Zudem wäre denkbar, dass die Binderegion im Bereich von AS 202 bis 270 mit der Inhibitionsdomäne kooperiert (Abb. 63).

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Bindung und Inhibition von Cdc14 in Hefezellen durch die Selbstinteraktion der Net1-Fragmente unterstützt wird, wäre eine Co-Affinitätspräzipitation dieser Derivate in *E. coli* ein interessanter Ansatz um die Interaktion mit Cdc14 eindeutig klären zu können.

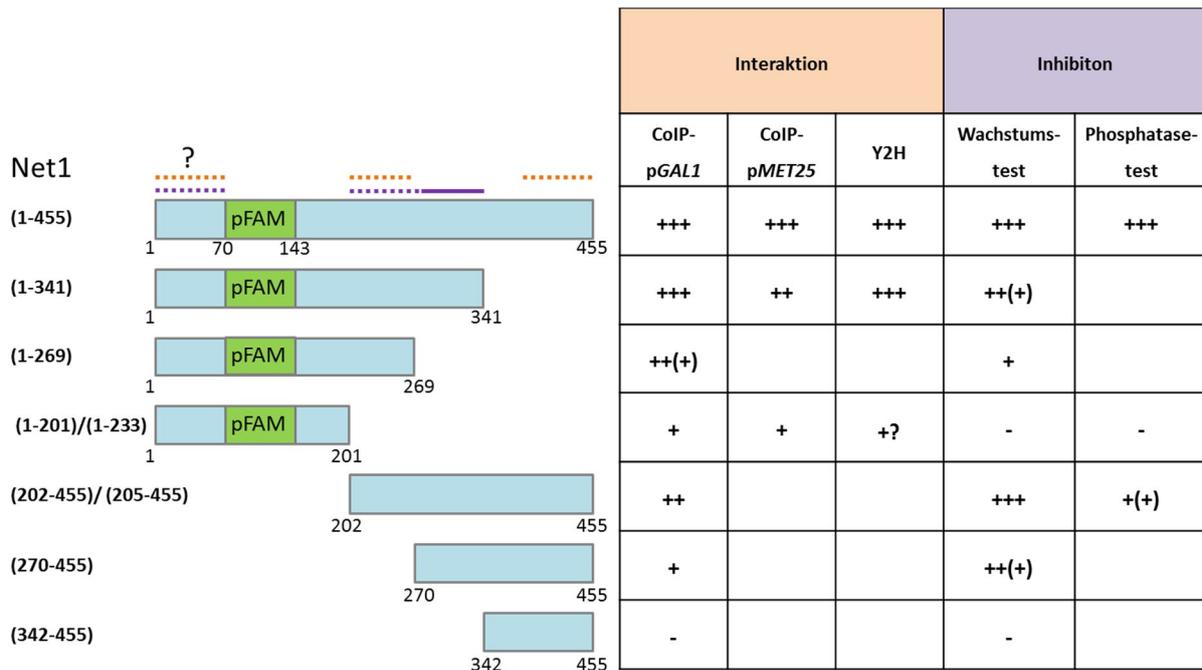


Abb. 63: Zusammenfassung zur Bindung und Inhibition von Cdc14. In grün hervorgehoben das *pFAM*-Motiv. Die analysierten Bindedomänen sind über dem längsten untersuchten Net1-Derivat durch eine unterbrochene Linie in orange dargestellt. Die Inhibitionsdomäne ist lila gekennzeichnet. Dabei wird zwischen der Minimaldomäne (durchgezogene Linie) und den vermutlich kooperierenden Domänen (unterbrochene Linie) differenziert.

5.3 Das essentielle Funktionselement in der CTD von Cdc14

Nach Analyse von Cdc14 konnte festgestellt werden, dass sich abseits der katalytischen Domäne zusätzlich in der CTD Sequenzen befinden, die für die biologische Funktion der Phosphatase essentiell sind und zudem die *in vitro*-Aktivität unterstützen.

5.3.1 Abhängigkeit der katalytischen Domäne von der CTD

Die Notwendigkeit der CTD konnte in dieser Arbeit dadurch veranschaulicht werden, dass die N-terminale katalytische Domäne von Cdc14 nicht hinreichend für die Aufrechterhaltung der biologischen Funktion war (Abb. 31, Abb. 32). Dieser Befund war überraschend, da sowohl die Bindung an Net1 (Traverso *et al.*, 2001), als auch die Selbstinteraktion über die NTD stattfinden (Taylor *et al.*, 1997). Es konnte jedoch eine *in vitro*-Aktivität von Cdc14(1-374) nachgewiesen werden (Abb. 61). Zudem zeigte eine ältere Arbeit, dass Cdc14(1-374) hinreichend zur Induktion der Clb2-Degradation war und damit die biologische Funktion der Phosphatase erfüllen konnte (Dissertation Albert Neutzner, 2002).

In dieser Arbeit wurde nach Analyse der Phosphatase-Aktivität der katalytischen Domäne *in vitro* reproduzierbar eine ca. 3-fache Reduktion im Vergleich zu Wildtyp-Cdc14 festgestellt (Abb. 61). Die Phosphatase-Aktivität dieses Konstruktes wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In Taylor *et al.*

(1997) wurde eine zehnfache Verminderung der Aktivität mit pNPP als Substrat gemessen. Traverso *et al.* (2001) stellten, ebenfalls mit pNPP als Substrat, eine 1,5-fache Hyperaktivität für Cdc14(1-374) fest.

Im weiteren Kontrast stehen die Ergebnisse von Rahal und Amon (2008). Sie zeigten, dass Cdc14(1-374) in Abwesenheit des Wildtyp-Proteins lebensfähig war, stellten somit nur eine deutlich verminderte Funktion durch eine verzögerte Anaphase, sowie mitotische Defekte mit FEAR- und MEN-Mutanten fest. Ähnliche Erkenntnisse gewannen Rahal und Amon (2008) nach einer Expression der NTD durch ein *ARS-CEN*-Plasmid. In dieser Arbeit konnte die biologische Funktion erst nach einer Co-Expression der CTD wiederhergestellt werden (Abb. 34 b). Auch unterschiedliche Proteinfusionen mit Cdc14(1-374) ergaben keine Abweichungen (Abb. 31, Abb. 32).

Im Extremfall könnte die Deletion nach Position AS 375 zu einem kompletten Funktionsverlust der Phosphatase führen. Zumindest eine Beeinträchtigung der Proteinfaltung oder eine nötige, aber hier fehlende Wechselwirkung durch die entstehende Sekundärstruktur mit sich selbst, sind nicht auszuschließen.

Die Daten dieser Arbeit offenbaren, dass die katalytische Domäne ohne vorhandene CTD nicht hinreichend für die *in vivo*-Funktion in haploiden Hefezellen ist.

5.3.2 Charakterisierung der CTD

Die Studien der vorliegenden Arbeit weisen deutlich auf eine essentielle Sequenz innerhalb der CTD hin (AS 426-435) (Kapitel 4.4.4.1 und 4.4.3.2). In dieser Region befinden sich eine Cdk1-Phosphorylierungsstelle sowie eine kurze, im Vergleich zu anderen Hefen, konservierte Sequenz (Abb. 22). Während den Lokalisationsstudien zur Analyse der CTD in haploiden Zellen wurde festgestellt, dass N-terminale Cdc14-Derivate verkürzt bis AS 431 ihre biologische Funktion verloren (Abb. 28). Dieser Effekt konnte nicht durch eine fehlende Proteinmenge erklärt werden (Abb. 19). Zur Charakterisierung dieses Bereiches wurden Komplementationsstudien mit Cdc14-Derivaten analysiert in denen die Cdk1-Phosphorylierungsstelle jeweils mutagenisiert bzw. deletiert war (Kapitel 4.4.4.1 und 4.4.3.2). Analog dazu wurde auch der konservierte Bereich in der CTD von Cdc14 untersucht (Kapitel 4.4.4.1 und 4.4.3.2). Diese Region wurde bereits von Taylor *et al.* (1997) beschrieben. Aufgrund einer 33%igen Konservierung der beiden darin enthaltenen homologen Sequenzen wurde diese als TR-Sequenz bezeichnet. In dieser Arbeit wurde zwischen TR1 (AS 400-421) und TR2 (AS 423-443) differenziert, da sich diese essentielle Region ausschließlich in TR2 befindet. Nach der Mutagenese des Cdk1-Minimalmotivs (TS 428/429 AA) wurde festgestellt, dass die Deletion von *CDC14* komplementiert werden konnte. Dieses Konstrukt war analog zur Kontrolle auch auf niedrigem Expressionsniveau bereits hinreichend zur Komplementation von $\Delta cdc14$ (vgl. Abb. 39 a mit b). Konsistent dazu wurde von Li *et al.* (2014) beschrieben, dass die

Mutagenese der Cdk1-Erkennungssequenz zu zwei Alaninen zu keinem Phänotyp führte. Erst nach der Einführung einer phosphomimetischen Mutation zu zwei Glutamaten (S429EE) und einer zusätzlichen Deletion von *SIC1* wurde ein Arrest in der S-Phase festgestellt. In ihren durchflusszytometrischen Analysen, wurde nach Überexpression von *CDC14 S429EE* eine Reduktion des nicht-replizierten Chromosomensatz (1C) gezeigt. Zudem wurde eine verzögerte Freisetzung aus dem Nukleolus beobachtet. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Position S429 *in vitro*, jedoch nicht *in vivo* als Substrat von Cdk1-Clb5 während der S-Phase phosphoryliert wurde. In dieser Arbeit wurde mittels Durchflusszytometrie konträr dazu eine geringe Verschiebung des 1C-Signals (unreplizierter Chromosomensatz) zum 2C-Signal (replizierter Chromosomensatz) für alle in der CTD veränderten Cdc14-Derivate festgestellt (Abb. 42). Dieser Effekt war jedoch mit Cdc14(ASAA) und Cdc14(Δ 430-434) deutlich prominenter, obwohl Cdc14(TS 428/429 AA) und Cdc14(Δ 426-430) nicht phosphorylierbar waren.

Da im Gegensatz zum mutagenisierten Cdk1-Motiv, alle weiteren Derivate erst nach einer Überexpression hinreichend waren um Δ *cdc14* zu komplementieren, war die Relevanz dieser Phosphorylierungsstelle zunächst fraglich. Besonders deutliche Phänotypen wurden immer dann festgestellt, wenn die konservierte QPRK-Region verändert wurde (Abb. 39 d, Abb. 42). Diese Region überlappt mit dem in haploiden Zellen kürzesten biologisch aktivem Derivat Cdc14(1-434) mit QPR.

Die Lokalisation von Cdc14(ASAA) und Cdc14(Δ 426-430) im Zellzyklus zeigte, dass dennoch beide Derivate gleichermaßen zu früh aus dem Nukleolus freigesetzt wurden (Abb. 43, Abb. 44). So war eine Co-Lokalisation mit dem SPK während der Interphase feststellbar. Ein ähnlicher Phänotyp wurde bereits in Zellen beobachtet, in denen die Bindung von Cdc14 mit Net1 beeinträchtigt war (Abb. 11 b). In dieser Zellzyklusphase ist der Antagonist zu Cdc14, Cdk1 mit dem Zyklin Clb5, aktiv. Clb5 als S-Phase-Zyklin befindet sich bis zum Metaphase-Anaphase-Übergang ausschließlich im Zellkern. Die FEAR-abhängige Freisetzung von Cdc14 antagonisiert die Phosphorylierungsereignisse von Cdk1-Clb5. Erst nachdem Clb5 zu Beginn der Anaphase zusätzlich degradiert wird, überwiegen die Dephosphorylierungen der Substrate die Phosphorylierungen und die Chromosomentrennung wird eingeleitet (Shirayama *et al.*, 1999, Jin *et al.*, 2008). Während der Interphase könnte also die Aktivität von Cdk1-Clb5 noch die Aktivität des freigesetzten Cdc14 im Zellkern überwiegen und damit einen Phänotyp maskieren. Es wäre folglich denkbar, dass die Phosphatase-Aktivität von Cdc14(ASAA) und Cdc14(Δ 426-430) im Zellkern unterdrückt wird. Da für beide Regionen ähnliche Phänotypen beobachtet werden, könnten beide Bereiche wichtig für die Proteinfunktion sein.

Ein Anhaltspunkt, um die Bedeutung des konservierten Motivs zu klären, waren Analysen mit bioinformatischen Programmen. Dieser Bereich ist als Sequenzmotiv bisher in keinem Programm erfasst. Zudem ist er ausschließlich in Hefen, nicht aber beispielsweise im Δ *cdc14*-komplementierenden hCDC14B zu finden. Ferner ist Cdc14 auch in *S. pombe* nicht essentiell (Bardin

und Amon, 2001). QPR(K) könnte an dieser Position nur für *S. cerevisiae* relevant sein. Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Veränderung von QPR(K) zu einem Funktionsverlust des Proteins führen könnte. Möglicherweise ist diese Region für eine Konformationsänderung der Phosphatase essentiell. Eine Vorhersage der Sekundärstruktur von Cdc14 zeigte keine α -Helix und keine Faltblattstruktur an dieser Region, jedoch einen möglichen Turn an Position P430 (Abb. 64). Aufschlussreich wäre hier eine vollständige Kristallstruktur einschließlich der CTD.



Abb. 64: Darstellung einer vorhergesagten Sekundärstruktur der CTD von Cdc14. Mit Hilfe des *open source*-Programmes des *Secondary structure prediction servers* (Chou und Fasman, 1974) wurde die C-terminale Sequenz von Cdc14 im Bereich der AS 421-490 analysiert. H: Helix, T: Turn.

Die QPR(K)-Sequenz könnte ebenso eine Bindestelle für regulatorische Proteine darstellen. Die Lokalisation von Cdc14 ist im Zellzyklus streng reguliert und die CTD enthält mehrere Kernlokalisationsdomänen. In *S. cerevisiae* sind zwei Vertreter aus der Familie der 14-3-3-Proteine zu finden: Bmh1 und Bmh2. Neben ihrer Beteiligung an der Inaktivierung bzw. Aktivierung von Proteinen, spielen sie auch in der subzellulären Lokalisation von Proteinen eine Rolle. Bmh1 und Bmh2 weisen eine Prävalenz für phosphorylierte Proteine nach DNA-Schäden auf. So wird in *S. pombe* die Mitose induzierende Phosphatase Cdc25 nach einer Beschädigung der DNA im Zellkern gebunden und über 14-3-3-Proteine in das Zytoplasma transferiert, um den Eintritt in die Mitose zu verhindern (Heusden und Steensma, 2006). Sie fungieren hier als mobile NES. Es wäre denkbar, dass eine Interaktion von Cdc14 nach der Phosphorylierung an S429 mit einem 14-3-3-Protein stattfindet. Bmh1 in *S. cerevisiae* ist durch die Interaktion mit der MEN-Komponente Bub2-Bfa1 am SAC beteiligt (Caydasi *et al.*, 2014). Da Cdc14(ASAA) scheinbar zu früh am SPK lokalisiert und Bub2-Bfa1 ebenfalls schon in der Interphase am SPK lokalisiert ist, könnte dort eine Interaktion möglich sein (Bardin und Amon, 2001). In der Tat, wurde in zwei *high-throughput* Studien eine Wechselwirkung mit Cdc14 (Breitkreuz *et al.*, 2010) und mit *CDC14* in $\Delta net1$ -Zellen gezeigt (Bloom *et al.*, 2011). In Proteinbindungsstudien für diese Arbeit konnte keine Proteinwechselwirkung von Cdc14 bzw. des C-terminalen Fragmentes mit Bmh1 nachgewiesen werden (Abb. 71, Abb. 72). Da die Interaktion zwischen Cdc14 und Bmh1 als mobile NES wahrscheinlich temporär stattfinden würde, ist die

Interaktion der beiden Proteine möglicherweise nicht robust genug, um sie mit den verwendeten Methoden nachzuweisen.

Eine weitere Funktion dieser Region in der CTD könnte darin bestehen zur Substratspezifität von Cdc14 beizutragen. Andere PPs wie die Proteinphosphatase 1 (PP1) bestehen aus mehreren Untereinheiten die zusammen ein aktives heterodimeres Holoenzym formen. PP1 erfüllt in höheren Eukaryoten u.a. ebenfalls Funktionen im Zellzyklus, ist katalytisch hoch aktiv, es sind jedoch ergänzend regulatorische Untereinheiten nötig die zur Substratspezifität beitragen. Die CTD von PP1, analog zu Cdc14, ist variabel aufgebaut. Eine Kristallstruktur von PP1 lässt mitunter vermuten, dass diese Untereinheiten am flexiblen C-Terminus binden (Terrak *et al.*, 2004). In der Literatur wird jedoch davon ausgegangen, dass Domäne A der katalytischen Domäne von Cdc14, die Substratspezifität unterstützt (Kapitel 3.3.1). Ein möglicher zusätzlicher unterstützender Einfluss der variablen CTD wird dabei nicht berücksichtigt (Gray *et al.*, 2003, Gray und Barford, 2003). Gegen diese Hypothese spricht die Reduktion der Phosphatase-Aktivität bezogen auf die niedermolekulare Substanz pNPP als Substrat im Phosphatasetest. *In vitro* sollte, falls *in vivo* eine wichtige Proteinbindung mit einem anderen Protein vorliegt, die Phosphatase-Aktivität nicht zwingend erniedrigt sein. Da *in vitro* ausschließlich die Aktivität durch Umsetzung der niedermolekularen Substanz pNPP ohne Berücksichtigung weiterer Proteinwechselwirkungen gemessen wird.

Daraus ergibt sich, dass sich in der CTD von Cdc14 vermutlich weder eine Bindestelle für andere Proteine befindet, noch die CTD einen Beitrag zur Substraterkennung leistet.

5.3.3 Regulation von Cdc14 durch die CTD

Die Aktivität von Cdc14 nimmt Einfluss auf viele Proteine im Zellzyklus. Mehr als 100 physische Interaktionen wurden bisher nachgewiesen (*Saccharomyces Genome Database*).

Neben der katalytischen NTD ist auch die CTD essentiell für die *in vivo*-Funktion der Phosphatase.

Obwohl die Freisetzung von Cdc14 mit den Veränderungen der CTD scheinbar zu früh stattfindet, ist eine möglicherweise damit verbundene verstärkte Aktivität nicht nachweisbar. Cdc14(ASAA) zeigte *in vitro* eine Reduktion der Phosphatase-Aktivität analog zur Aktivität nach der Deletion der CTD (Cdc14(1-374)) *in vitro* (Abb. 58, Abb. 61). Li *et al.* (2014) stellten fest, dass die Einführung einer phosphomimetischen Mutation an Position S429 zu S429EE zu einer Inhibition der Cdc14-Phosphatase-Aktivität führte. Die verminderte Aktivität von Cdc14 würde zudem Sic1 als Cdk1-Inhibitor essentiell als Antagonist der Cdk1-Aktivität machen. Sollte die Phosphorylierung an Position S429 inhibitorisch wirken, wäre zu erwarten, dass die Deletion der CTD zu einer Hyperaktivität von Cdc14 führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stünden also im Widerspruch zur Publikation von Li *et al.* (2014). *In vitro* konnte, wie bereits beschrieben, eine Reduktion der Aktivität für Cdc14(1-374)

festgestellt werden. Demzufolge wäre der Umkehrschluss zutreffender. Die Phosphorylierung würde eher aktivierend wirken.

Zur Charakterisierung von Cdc14(Δ 426-430) *in vivo* wurden die Spindelelongationsrate und die Auswirkungen auf die Cdc14-Substrate Ase1 und Hct1 untersucht (Kapitel 4.5.3.2 und 4.5.6). Die Spindelelongationsdauer sowie die Dauer der Kernteilung nahmen verstärkt zu, wodurch auf eine längere Anaphase im Zellzyklus geschlossen werden konnte (Kapitel 4.5.3.1). Die Etablierung der Zentralspindel war beeinträchtigt, da die Lokalisation von Ase1 eine Ausdehnung bzw. eine Verschiebung zum Zellkern der Mutterzelle zeigte (Abb. 49 b). Da Ase1 durch Cdc14 dephosphoryliert werden muss, um die *spindle midzone* zu assemblieren, lieferte es den Hinweis, dass die Phosphatase-Aktivität *in vivo* vermindert sein könnte. Dies erhärtete sich durch die Analyse des N-terminalen Fragmentes von Hct1. Erst durch Cdc14 dephosphoryliertes Hct1 kann an den APC/C im Zellkern binden und damit die Degradation des mitotischen B-Zyklins Clb2 initiieren. In dieser Arbeit war eine Reduktion der Dephosphorylierung von Hct1 durch Cdc14(ASAA) feststellbar (Abb. 53). Zugleich war auch der Kernimport von Hct1 in Zellen mit Cdc14(Δ 426-430) verringert und verzögert (Kapitel 4.5.6). Dies bestätigt eher die Relevanz beider Sequenzen. Wird angenommen, dass die Cdk1-Phosphorylierung aktivierend auf Cdc14 wirkt, ist diese Phosphorylierung durch die Deletion in Cdc14(Δ 426-430) ausgeschlossen und die verminderte Aktivität erklärbar. Die Punktmutationen in Cdc14(ASAA) müssten sich jedoch ebenfalls nachteilig auf die Phosphorylierung durch Cdk1 auswirken. Außerdem wurde kein Effekt durch die eingeführten Punktmutationen der Cdk1-Erkennungssequenz zu Alanin festgestellt. Die Ursache dafür ist fraglich, könnte aber durch zusätzliche Regulationsmechanismen erklärt werden. Durch die nun vermutete fehlende Aktivierung von Cdc14(Δ 426-430) durch Cdk1 könnte schon die Anheftung der Schwesterchromatiden an die mitotische Spindel negativ beeinflusst werden. In Wildtyp-Hefezellen wird durch den Aurora-Kinasekomplex Ipl1-Sli15 die korrekte Biorientierung der Spindelanheftung an den Zentromeren der Schwesterchromatiden sichergestellt. Ipl1-Sli15 ist bis zur Anheftung mit Kinetochorkomponenten assoziiert und induziert damit die Umorientierung der MT-Spindeln so lange, bis die richtige biorientale Spindelanheftung stattgefunden hat. Dann verändert Ipl1-Sli15 seine Lokalisation und assoziiert mit den Anaphasespindeln (Tanaka *et al.*, 2005). Diese Lokalisationsveränderung wird durch die Dephosphorylierung von Cdc14 an Sli15 initiiert. Dies führt zur Inhibition der Spindelumororientierung. Durch die verminderte Aktivität von Cdc14(Δ 426-430) könnte Sli15 damit weniger effektiv dephosphoryliert werden, was zu einer verlängerten Spindelreorientierung durch Ipl1-Sli15 führt (Pereira und Schiebel, 2003). Dadurch könnte es dauerhaft zur Aktivierung des SAC bzw. des *spindle orientation checkpoints* kommen, was die zeitliche Verzögerung erklären könnte. Die visualisierte Beeinträchtigung der Assemblierung und Stabilisierung der *spindle midzone* würde ebenfalls für eine vermindert aktive Phosphatase sprechen. Ein ähnlicher Effekt auf Ase1 wurde

bereits mit der *cdc14-2* ts-Mutante beschrieben (Khmelniskii *et al.*, 2007). So käme es zudem während der Ausbildung der Zentralspindel erneut zu einer *Checkpoint*-Situation. Ein weiterer Hinweis wurde durch die Lokalisation von Ase1, in Zellen in denen *HCT1* deletiert wurde, gegeben. Ase1 war zwar analog zu den Beobachtungen mit Cdc14(Δ 426-430) länger detektierbar, jedoch erfolgte die Ausbildung der Zentralspindel korrekt (Kapitel 4.5.3.3). Dennoch könnte auch die nicht ausreichende Dephosphorylierung von Hct1 zu einem späteren Zeitpunkt in der Anaphase zu einer zusätzlichen Verzögerung führen. Der APC/C, aktiviert durch Hct1, würde die Clb2-Degradation erst später einleiten, was damit in einem späteren Austritt aus der Mitose resultieren würde. Diese würde dem Gegensatz zur ektopischen Clb2-Degradation in Zellen die Cdc14 überexprimieren entsprechen (Visintin *et al.*, 1998). Eine ineffektivere Dephosphorylierung von Hct1 durch Cdc14(ASAA) konnte *in vivo* nachgewiesen werden (Abb. 53). Es zeigt, dass mindestens zwei wichtige Ereignisse während der Mitose durch die Veränderung von Cdc14 in der CTD gestört sind: die Stabilisierung der Anaphasespindel in der früheren Anaphase und ein Hct1-vermittelter Effekt in der späteren Anaphase.

Auch ein integraler Bestandteil der CTD zur Regulation der Phosphatase-Aktivität wäre denkbar. Die Wiederherstellung der biologischen Funktion nach Co-Expression der NTD mit der CTD könnte auf eine direkte Wechselwirkung beider Domänen hindeuten (Kapitel 4.4.2). Cdc14 könnte dann analog zu PP2A reguliert werden. PP2A, ein negativer Regulator für den Austritt aus der Mitose, ist als Holoenzym aus drei unterschiedlichen Einheiten aufgebaut. PP2A setzt sich aus einem Gerüstprotein (A-Untereinheit), einer regulatorischen Untereinheit (B-Untereinheit) und aus einer katalytischen Domäne (C-Untereinheit) zusammen (Wurzenberger und Gerlich, 2011). Die katalytische Domäne ohne weitere Untereinheiten ist vermindert aktiv. Analysen in Hefe konnten zeigen, dass die Aktivität der katalytischen Untereinheit eher von der strukturellen A-Untereinheit abhängt, als von der regulatorischen B-Untereinheit die zur Substratspezifität und zur subzellulären Lokalisation beiträgt (Hombauer *et al.*, 2007). Durch die Bindung der katalytischen Domäne und der regulatorischen Untereinheit an das Gerüstprotein kommt es zu einer Konformationsänderung und damit zu einer aktiveren Form des Holoenzym (Hombauer *et al.*, 2007). Es könnte sein, dass die variable Domäne von Cdc14, analog zu Domäne A von PP2A, die katalytische Domäne bindet und es durch eine Konformationsänderung zu einer gesteigerten Phosphatase-Aktivität kommt.

Folglich bleibt der exakte Regulationmechanismus zur Steigerung der Phosphatase-Aktivität von Cdc14 durch die CTD noch zu klären. Ob die Cdk1-Phosphorylierungsstelle allein hinreichend für die Aktivierung von Cdc14 ist, ist derzeit fraglich. Die Analyse der Doppelmutante, in der die Cdk1-Phosphorylierungsstelle und zugleich das QPR(K)-Motiv mutiert sind, könnte weitere Einblicke zur Regulation liefern. Möglicherweise ist die direkte Interaktion der NTD mit der CTD von Cdc14

essentiell für eine katalytisch hochaktive Form der Phosphatase. Diese Fragestellung könnte durch Proteinbindungsstudien zwischen N-terminalen und C-terminalen Cdc14-Fragmenten gelöst werden.

6 Methoden

6.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Amplifikation von *E. coli*-Vektoren und Plasmiden wurde für diese Arbeit folgender *Escherichia coli* Bakterienstamm DH5 α verwendet:

Genotyp_{DH5 α} : F- Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)-U169 deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (*r_k*⁻, *m_k*⁺) phoA recA1 relA1 supE44 thi-1

Zur Proteinexpression wurde der Expressionsstamm BL21 Codon+ (BL21C+) mit folgendem Genotyp verwendet:

Genotyp_{BL21C+}: F- ompT hsdSB (*r_B*-*m_B*⁻) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)

6.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der *E. coli*-Bakterien erfolgte bei 37°C rollernd oder schüttelnd. Hierfür wurde das LB-Medium verwendet, dem nach Bedarf, unterschiedliche Antibiotika zur Selektion auf die jeweiligen Resistenzen zugesetzt wurde. Zur Kultivierung auf Agarplatten wurden ebenso die entsprechenden Antibiotika im LB-Agar verwendet.

6.1.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Um elektrokompente *E. coli*-Bakterien mit Plasmid-DNA zu transformieren, wurden diese nach dem Auftauen mit 100 μ l sterilem Wasser 1:1 verdünnt. 100 μ l von dieser Zellsuspension wurden mit 1-2 μ l DNA versetzt und anschließend in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit einer Feldstärke von 12,5 kV/cm, einer Kapazität von 25 mF, einer Kondensatorspannung von 2,5 kV und einem Widerstand von 200 Ω . Die Zellsuspension wurde nach erfolgtem Stromimpuls in 500 μ l bis 1 ml SOC-Medium pipettiert und anschließend 100 μ l davon auf entsprechende LB-Platten ausplattiert. DH5 α -Zellen wurden auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert, der Expressionsstamm BL21C+ wurde immer auf LB-Platten mit Chloramphenicol und je nach transformierter Plasmid-DNA auf LB-Platten mit zusätzlichem Ampicillin verwendet. Nach der Ausplattierung auf eine entsprechende Selektionsplatte, wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2 Arbeiten mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Während dieser gesamten Arbeit wurde mit Hefezellen des Stammhintergrundes W303 gearbeitet.

Genotyp: ho ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-2 ssd1 can1-100

6.2.1 Die Kultivierung von Hefen in Flüssigmedium

Hefezellen wurden stets in XY-Vollmedium kultiviert, in dem je nach Experiment 2 % Glukose oder 2 % Raffinose zugesetzt wurde. Zur Induktion in Raffinose-Medium wurde zusätzlich 2 % Galaktose hinzugefügt. Vorkulturen wurden morgens in 5 ml Flüssigmedium angeimpft und abends auf eine bestimmte Optische Dichte zwischen $OD_{600} = 0,001$ bis $0,0025$ überimpft. Die Inkubationstemperatur betrug je nach Experiment entweder 25°C oder 30°C .

6.2.2 Konservierung von Hefestämmen

Zur Konservierung von Hefestämmen wurden von einer Übernachtskultur 2 ml in einem Schraubgefäß pelletiert und nach Abnehmen des Überstandes in 1 ml 15%igem Glycerin resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend bei -70°C eingefroren.

6.2.3 Wachstumstest mittels Verdünnungsreihe

Zur Analyse des Wachstumsverhaltens verschiedener Hefestämme bezüglich der Expressionsstärke bestimmter Konstrukte oder Temperaturvergleiche wurden Wachstumstests mittels einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Dazu wurden nicht stationäre Hefekulturen jeweils auf eine OD_{600} von 1 in $200\ \mu\text{l}$ resuspendiert und in einer Mikrotiterplatte jeweils 1:10 in weiteren $200\ \mu\text{l}$ verdünnt. Anschließend wurden die Suspensionen mit Hilfe eines Stempels (*Frogger*) auf die entsprechenden Vollmediumsplatten aufgebracht. Je nach Fragestellung und Experiment wurden dazu Platten mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen verwendet. Die Platten wurden immer bei 25°C , 30°C und 37°C inkubiert und während der Inkubation über 2-3 Tage täglich dokumentiert.

6.2.4 Kreuzung haploider Hefestämme

Eine Möglichkeit zur Generierung von Hefestämmen eines bestimmten Genotyps ist die Kreuzung zweier haploider Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps (MAT a mit MAT alpha). Zur Kreuzung wurde jeweils wenig Zellmaterial mit einem Zahnstocher der beiden zu kreuzenden Hefestämme übereinander auf eine Vollmediumsplatte übertragen und diese für einen Tag bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag konnte Zellmaterial auf die entsprechende Selektivplatte übertragen werden um die erfolgreiche Paarung anhand der Auxotrophiemarker zu prüfen.

6.2.5 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse

Um phänotypische Auswirkungen beispielsweise einer Mutation besser analysieren zu können, ist es oft hilfreich Experimente in einem haploiden Organismus durchzuführen. Dazu kann aus diploiden Hefezellen nach der Sporulation ein haploider Organismus gemacht werden. Zur Sporulation müssen

Hefezellen in Medium mit Mangelbedingungen gesetzt werden. Die Reduktion der Kohlen- und Stickstoffversorgung führt nach der meiotischen Teilung zur Bildung von Überdauerungsknospen, einer sogenannten Tetrade, in der sich vier haploide Sporen befinden. Diese Tetrade ist von einer Hülle umschlossen die als Ascus bezeichnet wird. Zur Sporulation werden die diploiden Zellen erst in 2 ml nährstoffreiches Präsporulationmedium gesetzt und über Nacht bei 25°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur nach dem Waschen (2 Minuten, 2000 Upm) mit einem nährstoffarmen Sporulationsmedium, wieder in 2 ml von diesem Medium aufgenommen. Nach einer Inkubation von ca. 3 Tagen bei 25°C können die Zellen zur Tetradenanalyse weiter verwendet werden. Für die Tetradenanalyse werden 50 µl der Zellen mit 50 µl Novozymlösung für 20 Minuten auf Raumtemperatur verdaut um den Ascus zu entfernen. Danach werden von der nun entstanden oberen, klaren Phase 15 µl abgenommen und auf eine Vollmediumsplatte getropft. Mit einem Mikromanipulator können nun die vier zusammengehörenden Sporen untereinander vereinzelt werden. Diese Platte wird anschließend für drei Tage bei 30°C inkubiert. Die entstanden Kolonien können dann durch einen Markertest auf den jeweiligen Selektivplatten charakterisiert werden.

6.2.6 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

Hefen können mit der Lithiumacetat-Methode (Gietz und Woods, 2002) effektiv mit Fremd-DNA transformiert werden. Dies geschieht durch die sogenannte homologe Rekombination. Dadurch ist es möglich veränderte Gene gezielt in das Hefegenom von *Saccharomyces cerevisiae* zu integrieren und auszutauschen. So sind N- oder C-terminale Epitopmarkierungen (nach Longetine *et al.*, 1998) oder Gendeletionen möglich. Die einzubringende DNA kann ein PCR-Amplifikat oder ein linearisiertes Plasmid sein. Die Linearisierung des jeweiligen Plasmids muss mit entsprechenden Restriktionsenzymen erfolgen.

Lithium-Ionen machen die Zellwand etwas permeabler und erleichtern so die Aufnahme der Fremd-DNA. Polyethylenglycol (PEG) bringt die Reaktionspartner in engeren Raum um die Effizienz zu erhöhen und einzelsträngige DNA (aufgekochte Heringssperma-DNA) sättigt unspezifische Bindungen an der Zellwand ab um die Aufnahme der doppelsträngigen DNA effizienter zu machen.

Zur Hefetransformation muss am vorherigen Abend eine Übernachtskultur in XYD-Vollmedium angezogen werden. Die Kultur wird zur Transformation 1:20 in Vollmedium überimpft (25°C) und nach 3h wird die Dichte der Kultur durch eine OD₆₀₀-Messung überprüft (optische Dichte bei 600nm). Zur Vorbereitung müssen zwei Reaktionslösungen vorbereitet werden (für einen Ansatz):

TE/ LiAc:

200 µl 10 x TE-Puffer
200µl 1M LiAc
1,6 ml steriles Wasser

PEG/LiAc:

50 µl 10 x TE-Puffer
50 µl 1M LiAc
400 µl 50% PEG 3350 (w/v)

Befindet sich die Kultur nun in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} ist zwischen 0,5 und 1,0) werden 1,5 OD_{600} Zellen geerntet, erst mit 1,5 ml sterilem Wasser gewaschen (2000 Upm, 2 Minuten) und dann mit 1,5 ml TE/ LiAc gewaschen. Anschließend wird das Zellpellet in 50 μ l TE/ LiAc aufgenommen.

Zur Transformation wird in ein 2 ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt:

5 μ l aufgekochte Heringssperma-DNA
50 μ l Hefesuspension in TE/ LiAc
1-15 μ l DNA
300 μ l PEG/ LiAc

Dieser Reaktionsansatz wurde für ca. 8 Sekunden zum Durchmischen gevortext. Anschließend wurde der Ansatz für 20 Minuten auf Raumtemperatur im Roller kultiviert. Danach wurde er zum Hitzeschock für 15 Minuten bei 42°C im Heizblock inkubiert. Die Zellen wurden danach für 2 Minuten mit 2000 Upm abzentrifugiert, in 150 μ l sterilem Wasser resuspendiert und auf eine entsprechende Selektivplatte ausplattiert. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die erhaltenen, transformierten Hefekolonien zum Reinigungsaustrich auf der entsprechenden Selektivplatte ausgestrichen.

6.2.7 Expression eines Gens mittels *pGAL1*-Induktion

Durch Induktion des *GAL1*-Promotors ist es möglich, das Anschalten der Expression von Genen gezielt zu steuern. Dadurch wird eine Überexpression dieses Gens erreicht. Zur Induktion des *GAL1*-Promotors werden zuerst Hefezellen am Morgen zuvor in 2%igem Raffinose-Medium angezogen und abends auf eine OD_{600} von 0,002 in XYRaf 2% überimpft. Befand sich die Kultur am nächsten Morgen in einer exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} hier zwischen 0,3 und 0,6) wurden die Zellen mit 2% Galaktose-Lösung für 2 Stunden induziert und für die entsprechenden Experimente weiter aufgearbeitet.

6.3 Fixierung und Färbung von Hefezellen zur durchflusszytometrischen Analyse

6.3.1 Ethanol-Fixierung von Hefezellen

Hefezellen müssen zur durchflusszytometrischen Analyse zuerst in Ethanol fixiert und anschließend aufgearbeitet werden. Hierzu wurden 0,25 OD_{600} Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur (OD_{600} 0,4- 0,8) geerntet, anschließend mit 300 μ l Wasser resuspendiert und mit 700 μ l 100% Ethanol *p.a.* versetzt. Die fixierten Zellen können bei 4°C gelagert werden.

6.3.2 Färbung von Hefezellen zur durchflusszytometrischen Analyse

Durch die Ethanolfixierung kommt es zu einer Agglumeration der Zellen und diese müssen zur weiteren Aufarbeitung vereinzelt werden. Dafür werden die Zellen mit 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen (1 Minute, 13000 Upm) und in 250 µl Natriumcitrat-Puffer aufgenommen. Anschließend werden die Zellen mit Ultraschall (8 Pulse bei 40% Leistung) behandelt um diese zu vereinzeln. Um die RNA zu entfernen werden zu den Zellen im Natriumcitrat-Puffer 10 µl RNaseA (10 mg/ml) gegeben und diese für 1h im Luftschtüttler bei 50°C inkubiert. Danach werden weitere 10 µl Proteinase K (10 mg/ml in 10 mM Tris/ HCl pH 7,5; 1mM CaAcetat) zugegeben und wieder 1h im Luftschtüttler bei 50°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (2 Minuten, 13000 Upm) und in 250 µl Na-Citratpuffer mit 1 µM Sytox Green aufgenommen. Die Zellen wurden bei 4°C im Dunkeln mindestens drei Tage vor der durchflusszytometrischen Analyse gelagert.

6.3.3 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse ermöglicht es, den DNA-Gehalt einer Zellkultur zum Zeitpunkt der Fixierung zu ermitteln. Dadurch ist es möglich, Abweichungen von Kontrollen im Zellzyklus zu analysieren.

Vor der Detektion müssen die Zellen nochmals mit Ultraschall (8 Pulse bei 40% Leistung) vereinzelt werden. Zur Messung wurden 15 µl der Zellsuspension in Na-Citratpuffer in 1 ml 50 mM Tris/ HCl-Puffer (pH 7,5) gegeben.

Die Messung der Zellen wurde am CyFlow Space Durchflusszytometer (Partec) durchgeführt.

In diesen Experimenten wurde zur Einstellung der FL1 (Sytox)-Parameter verändert. Die Einstellungen zur Analyse waren wie folgt: Skala „lin“, Gain zwischen 570 und 590, Lower Limit zwischen 40 und 85, Upper Limit immer 999.9. Die Geschwindigkeit (Bereich 0,2- 0,6) wurde so eingestellt, dass immer 100- 400 Ereignisse pro Sekunde erfasst wurden. Insgesamt wurden mindestens 20000 Zellen gemessen. Die resultierenden Daten wurden im Programm FlowMax[®] dargestellt. Zur Visualisierung wurden die Daten mit der Software WinMDI (Version 2.8) ausgewertet. Zur Analyse wie viele Zellen den einfachen Chromosomensatz (1C) bzw. replizierten Chromosomensatz (2C) enthielten, wurde die Software von *FCS-Express Flow Cytometrie* von *De Novo Software* verwendet.

6.4 Mikroskopie von lebenden Hefezellen

Zur Visualisierung von lebenden GFP- bzw. Cherry-Epitop-markierten Hefezellen, wurde eine 1%ige Wasseragar-Lösung hergestellt und in der Mikrowelle aufgeköcht. In einem 15 ml-Falkontube wurden 1,5 ml einer 20%igen Glukose-Lösung, weitere 1,5 ml der Drop-out ++-Lösung, sowie 1,5 ml der 10x YNB-Lösung vorgelegt. Anschließend wurde der flüssige Wasseragar bis zu einem Endvolumen von 15 ml zugegeben, kurz invertiert und in eine Petrischale geschüttet. Die

Vorbereitung dieser Agarplatte erfolgte immer einen Tag vor der Mikroskopie und wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für die Mikroskopie wurden aus der vorbereiteten exponentiell wachsenden Hefekultur 500 µl abgenommen, für 2 Minuten (2000 Upm) abzentrifugiert und der Überstand abgekippt. Die Zellen wurden in dem verbleibenden Medium resuspendiert und davon wurden 4 µl auf einen Objektträger überführt. Darauf wurde vorsichtig mit Hilfe eines Deckgläschens die Agarose gelegt.

Tab. 4: Zur Mikroskopie verwendete Fluoreszenzintensitäten und Expositionszeiten.

Abbildung	488 nm (GFP) [%]	561 nm (Cherry) [%]	Expositionszeit [ms]
8	30, 20	20, 30	200
9	30	20	200
10	30	20	200
11	20	60	200
20	25, 15	20, 10	100
21	5-30	---	100-200
22	20, 5	15, 20	100, 200
23	20, 12	10	100
26	2	10	100
27	2	10	100
43	20	---	100
44	10	30	100
47	15	20	100
49	30	15	100
51	30	15	100
54	7	15	100

Die Mikroskopie erfolgte mittels Spinning Disk-System am inversen Mikroskop Zeiss Axio Cellobserver SD. Zur Aufnahme wurde ein 63x PlanApochromat-Objektiv benutzt und die Detektion erfolgte über eine Axiocam (MRm Rev3; 1388x1040 Pixel).

Für die Anregung der jeweiligen Fluoreszenz betrug die Wellenlänge des Lasers 561 nm mit einer Leistung von 40 mW für das Cherry-Signal und 488 nm mit einer Leistung von 100 mW für das GFP-Signal. Als Belichtungszeit wurden 200 ms bzw. 100 ms gewählt. Für die Aufnahmen wurden Z-Stapel (10 Ebenen mit einem Abstand von 0,5 μm) verwendet.

Bei Filmen wurde auf eine möglichst niedrige Intensität der Laser sowie der Expositionszeit geachtet um Photobleaching zu vermeiden. Im Folgenden aufgelistet die Intensitäten der Laser und der Expositionszeit für die jeweiligen Abbildungen.

6.4.1 Bearbeitung der Mikroskopiedaten

Die Bearbeitung der Mikroskopiedaten, sowie deren Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ. Dazu wurden die Rohdaten in diesem Programm geöffnet und zur Darstellung die zehn Z-Stapel mit der Einstellung *Maximum Intensity* projiziert. Mittels *brightness/contrast*-Funktion wurde die Helligkeit und der Kontrast manuell eingestellt. Zur Darstellung des DIC-Kanals wurde aus den zehn Stapeln die schärfste Ebene gewählt. Die Ausschnitte der Bilder sind je ca. 15 x 15 μm (entspricht 150 x 150 Pixel) groß und wurden zur Darstellung in Textverarbeitungsprogrammen in das RGB-Format umgewandelt. Gespeichert wurden die Daten als TIF-Dateien. Analog zur Bearbeitung der Bilder wurden auch die Filme bearbeitet. Zuerst mussten aus den Rohdaten für die Filme jedoch ein *Hyperstack* gemacht werden. Anschließend wurden die Kanäle getrennt (*split channels*) und die Stapel für alle Zeitwerte mit der Funktion *Maximum Intensity* projiziert. Die Helligkeit und der Kontrast wurden auch hier manuell eingestellt. Für die Filme wurden die einzelnen Kanäle noch miteinander fusioniert und anschließend mittels *Montage-Tool* die Montagen erstellt. Die Speicherung erfolgte als TIF-Datei.

6.4.1.1 Quantifizierung der Hct1-Phosphorylierungsbande

Zur Quantifizierung der Phosphorylierungsbande von Hct1 wurde ein enger Rahmen um die dephosphorylierte Spezies von Hct1 gesetzt und dieser so gewählt, dass die zu messende Fläche für jeden einzelnen Zeitwert von Cdc14 und Cdc14(ASAA) beibehalten werden konnte. Weiter wurde mit dem identischen Threshold ein neuer Rahmen gesetzt um das Gesamtsignal der Hct1-Proteinbande zu messen (phosphorylierte und dephosphorylierte Hct1-Spezies).

Quantifiziert wurde mittels *ImageJ* für jeden Zeitwert die Summe der Pixelwerte (*RawIntDen*) des Hct1-Gesamtsignals, sowie für die Dephosphorylierungsbande. Für den Bezug zum Gesamtsignal

wurde die quantifizierte dephosphorylierte Bande (untere Bande) von Hct1 vom Gesamtsignal abgezogen. Dieser Wert entspricht der phosphorylierten Hct1-Spezies und wurde mit der Zeit in ein Diagramm eingetragen.

6.4.1.2 Quantifizierung von Hct1(1-257)-GFP

Zur Quantifizierung des Kernimports von Hct1(1-257)-GFP wurden die durch die Mikroskopie erhobenen Rohdaten in *ImageJ* geöffnet und die drei Kanäle DIC (Differenzialinterferenzkontrast, Durchlichtkanal), Ch1 (Cherry-NLS) und Ch2 (Hct1(1-257)-GFP) gesplittet. Die Quantifizierung des Kernimports von Hct1(1-257)-GFP mittels *ImageJ* bezieht sich ausschließlich auf die Mutterzelle. Zur Messung wurden die beiden Kanäle Ch1 und Ch2 synchronisiert. Mit Hilfe des DIC-Kanals wurde die schärfste Ebene der Bildstapel (z (gesamt)= 10) für jeden einzelnen Zeitpunkt gewählt. Dafür wurde anfangs der *Mean-Value* (= Konzentration) in einem definierten Bereich außerhalb der Zellen gemessen und überprüft ob sich der *Mean-Value* änderte (Durchschnittlich 31 Pixel, $n=6$, Messung des Hintergrundes: durchschnittlich 31 Pixel, $n= 76$ für die Kanäle Ch1 und Ch2). Danach wurden die durch den DIC-Kanal ausgewählten Zellen aus Ch1 und Ch2 stark vergrößert (300-400 %) um sicherzustellen, dass der für die Messung verwendete Bereich innerhalb des Zellkerns liegt. Die Größe des Zellkerns wurde durch das Fluoreszenz-Signal des Zellkerns (Ch1) festgelegt. Anschließend wurde ein runder Rahmen innerhalb des Zellkerns gelegt um die Konzentration der Pixelwerte messen zu können. Durch die Synchronisation der Kanäle, war auch der Flächeninhalt des gezogenen Rahmens innerhalb des Zellkerns für Ch1 und Ch2 identisch. Diese Konzentration (*Mean-Value*) der Fluoreszenzkanäle wurde durch die Funktion „*measure*“ von *ImageJ* gemessen und durch den ROI-Manager von *ImageJ* dokumentiert. Auf diese Weise wurde die jeweilige Konzentration der Pixelwerte für jede Zelle, zu jedem Zeitpunkt und in der schärfsten Ebene für Ch1 und Ch2 manuell gemessen. Nach den Messungen wurde der durchschnittliche Hintergrund von 31 Pixel von den Messwerten abgezogen.

6.5 Genetische und molekularbiologische Methoden

6.5.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

6.5.1.1 Herstellung von Kochlysaten

Nach Berghammer und Auer (1993) ist dies eine effiziente Methode um *high copy* Plasmide aus *E. coli* zu isolieren. Die gewonnene DNA kann mittels Restriktionsverdau analysiert werden oder nach weiterer Aufreinigung zur Sequenzanalyse weiterverarbeitet werden.

Dazu wurden 3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur abzentrifugiert (4 Minuten, 13200 Upm) und der Überstand entfernt. Danach werden die Zellen in 40 μ l *Easy Prep* Puffer resuspendiert, für 1 Minute

gekocht (100°C), für 1 Minute auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 13200 Upm zentrifugiert und der Überstand in der die isolierte Plasmid-DNA war, in ein frisches Gefäß überführt. Zur weiteren Analyse können hiervon 2 µl für einen Restriktionsverdau eingesetzt werden.

6.5.1.2 Plasmidpräparation über kommerzielle Reinigungssäulen

Zur Reinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (*Miniprep*) wurde der *Nucleospin Plasmid-Kit* von Mackerey-Nagel verwendet. Das eingesetzte Zellsuspensionvolumen betrug 3 ml Kultur in LB_{Amp} und eluiert wurde in 30-50 µl Elutionspuffer oder sterilem Wasser. Die Durchführung entsprach den Herstellerangaben. Für Plasmidpräparationen im mittleren Maßstab (*Midiprep*) wurde eine Ausgangskultur von 80 ml in LB_{Amp}-Medium verwendet und das *GenElute™HP Plasmid Midiprep-Kit* von Sigma verwendet. Die Durchführung entsprach den Herstellerangaben, eluiert wurde hier in 500 µl sterilem Wasser.

6.5.1.3 Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse (*low-copy* Plasmide)

Die Plasmidpräparation für *low-copy* Plasmide (pJOE2955-Derivate, MBP, pEG-Derivate) kann in großem Maßstab und kostengünstig mit der alkalischen Lyse durchgeführt werden. Hierfür werden 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur abzentrifugiert (2 Minuten, 5000 Upm), der Überstand vollständig abgenommen und die Zellen in 250 µl *Resuspension Solution* (Sigma Midiprep-Kit) resuspendiert. Nach Überführung in ein 2ml-Reaktionsgefäß, erfolgt die Lyse mittels 250 µl *Lysis Solution* (Sigma *Midiprep-Kit*). Nach Invertierung wird das Gemisch für maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Neutralisation wurde danach 250 µl *Neutralization Solution* (Sigma *Midiprep-Kit*) zugegeben und wieder durch invertieren gemischt. Anschließend für 15 Minuten auf Eis gestellt, 10 Minuten abzentrifugiert (14000 Upm), der Überstand abgenommen und mit 600 µl Isopropanol versetzt. Dieses Gemisch wurde für 15 Minuten zu -20°C gestellt. Danach wurde wieder für 10 Minuten abzentrifugiert (14000 Upm) und erneut der Überstand abgenommen. Dieser Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol *p.a.* versetzt und erneut zentrifugiert (1 Minute, 14000 Upm) und der Überstand wieder verworfen. Danach wurde dem Pellet 500 µl mit 100% Ethanol *p.a.* zugegeben, wieder zentrifugiert (1 Minute, 14000 Upm) und der Überstand erneut verworfen. Nach kurzem Trocknen des Pellets wurde es in 50 µl 1x TE-Puffer resuspendiert. Zur Analyse für den Restriktionsverdau wurden 5 µl verwendet.

6.5.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Messung von dsDNA wurde das BioPhotometer der Firma Eppendorf verwendet. Hierfür wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Referenz wurde eine Probe mit 100

µl sterilem Wasser verwendet, die zu messende Probe 3: 97 in Wasser verdünnt und zusammen mit der Referenz die Küvetten pipettiert.

6.5.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wird verwendet um DNA-Fragmente exponentiell *in vitro* zu generieren (nach Mullis et. al., 1986). Mittels kleiner, einzelsträngiger Oligonukleotide (*Primer*), spezifisch und homolog zum gewünschten DNA-Fragment, wird dadurch der zu amplifizierende Bereich definiert. Die thermostabile DNA-Polymerase, isoliert aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*), kann an die 3'-Hydroxylenden der Primer, komplementär zum Matrizenstrang, Desoxyribonukleotide hinzufügen. Da dieses Enzym jedoch keine 3'-5'-Exonukleasefunktion (*Proof-reading*) hat, wird es nicht für Amplifikationen zu Klonierungszwecken verwendet. Hierfür wird eine Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis* (*KOD*) verwendet, da bei der KOD-Polymerase durch die 3'-5'-Exonuklease die Fehlerrate geringer ist.

6.5.3.1 PCR für Epitopmarkierungen und Deletionen

Für die Epitopmarkierungen und Deletionen von Cdc14 in dieser Arbeit wurde das pFA6a-System (Longtine *et al.*, 1998) verwendet. Für die Epitopmarkierungen von Net1 das pFAlink-System (Janke *et al.*, 2004). Die Primer bestehen jeweils aus zwei unterschiedlichen Teilen. Zum einen im 5'-Bereich aus 45-50 Basen die spezifisch zum Zielgen im Hefegenom sind und zum anderen der 3'-Bereich zum aus 20 Basen komplementär zur Sequenz des pFA6a-Plasmids, der Matrize. Zur Amplifikation wurde die *KOD*-Polymerase verdünnt verwendet. Für die Amplifikation galt folgender Ansatz mit folgenden Temperaturen:

PCR-Ansatz:

10x KOD-Puffer	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
<i>forward</i> -Primer (10 mM)	3 µl
<i>reverse</i> -Primer (10 mM)	3 µl
DNA-Matrize	1 µl
KOD-Polymerase	1 µl
Wasser	26 µl

Temperaturprofil:

Denaturierung	94°C	4 Min	
Denaturierung	94°C	40 Sek	} 25 Zyklen
<i>Annealing</i>	Temp _{An}	20 Sek	
Elongation	72°C	Temp _{El}	
Amplifikation	72°C	10 Min	

Temp_{An}: Die verwendete *Annealing*-Temperatur wurde 0-2 °C unter der Schmelztemperatur der Primer gewählt.

Temp_{El}: Die verwendete Elongationszeit richtete sich nach der Größe des Amplifikats. Bei der KOD-Polymerase wurden für 1000 Basen 30 Sekunden zur Berechnung verwendet.

Als Matrize wurde eine 1:5 Vorverdünnung des jeweiligen pF6a-Plasmids eingesetzt und als Annealingtemperatur 54°C verwendet (nach Longtine *et al.*, 1998). Um genügend Ausbeute zur Transformation zu erhalten wurden meistens zwei PCR-Ansätze vereinigt und mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Eluiert wurde in 30 µl Elutionspuffer. Zur Integration am Genort durch homologe Rekombination wurden 10-15 µl zur Hefetransformation eingesetzt.

6.5.3.2 PCR mit genomischer oder Plasmid-DNA

Zu Klonierzwecken wurde eine PCR mit genomischer-DNA oder Plasmid-DNA eingesetzt. Um die Amplifikate klonieren zu können, wurden bereits in den Primern Restriktionsenzyme eingeführt. Als Polymerase wurde immer die KOD verwendet, wobei sie unverdünnt zur Amplifikation von Plasmid-DNA und verdünnt zur Amplifikation von genomischer DNA eingesetzt wurde. Das Plasmid als Matrize wurde dabei immer 1:5 verdünnt und von der genomischen DNA wurde jeweils 1 µl pro PCR-Ansatz eingesetzt. Ansatz und Temperaturprofil sind unter Kapitel 6.5.3.1 zu finden.

6.5.3.3 Mutagenese-PCR

Um gezielt Mutationen oder kurze, interne Deletionen in das Hefegenom einzuführen wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. So war es möglich Regionen in der CTD von Cdc14 besser zu charakterisieren. Hierzu wurden die Primer so gewählt, dass die Mutationen, bzw. interne Deletionen jeweils mittig im Primer liegen und die Annealing-Temperatur der beiden Primer-Flanken (homolog zur Zielsequenz im Hefegenom) jeweils zwischen 50 und 54°C betrug. Für die PCR wurden 50-100 ng des Plasmids als Matrize eingesetzt. Die Zyklenanzahl wurde jedoch auf 18 Zyklen reduziert.

Der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil ist im Abschnitt 6.5.3.1 zu finden.

Nach der Amplifikation wurde der Ansatz mit *DpnI* für 3-7 Stunden (37°C) verdaut um zwischen dem Matrizenstrang und der neu-synthetisierten DNA zu diskriminieren. Das Plasmid kommt aufgrund der Klonierung aus *E. coli* und ist daher an bestimmten Bereichen methyliert. Die neu-synthetisierte DNA ist durch die Amplifikation nicht methyliert. *DpnI* schneidet an bestimmten methylierten Sequenzen und baut somit den Matrizenstrang ab. Anschließend folgte ein Dialyseschritt zur Entsalzung für 20 Minuten. Am Ende wurden 2 µl des dialysierten Ansatzes in *E. coli DH5α*-Zellen transformiert und auf eine LB_{Amp}-Platte ausplattiert.

Die eingeführten Veränderungen wurden stets durch Sequenzierungen überprüft (Kapitel 6.5.8).

6.5.3.4 MAT-PCR

Haploide Hefezellen können in zwei unterschiedlichen Paarungstypen vorliegen, MAT a und MAT α. Um diesen zu bestimmen, wird eine MAT-PCR (nach Huxley *et al.*, 1990) durchgeführt. Dabei werden durch die Denaturierung während der PCR Hefezellen aufgeschlossen und die genomische Hefe-DNA dient dabei als Matrize zur Amplifikation.

Auf Chromosom III befinden sich dabei zwei unterschiedliche Loci, (HML oder HMR) mit stillgelegten Allelen, die für verschiedene Transkriptionsfaktoren codieren. Der Paarungstyp wird dabei durch den jeweils exprimierten MAT-Lokus festgelegt. Die nach einer Tetradenanalyse entstandenen haploiden Sporen wurden vor der experimentellen Analyse auf ihren Paarungstyp hin untersucht.

Zur Amplifikation des Allels am MAT-Lokus wurde ein Oligonukleotidgemisch (WS826, WS827 und WS828) und die *Taq*-Polymerase verwendet. Bei Zellen des Paarungstyps MAT a entstand ein Produkt von 544 Basenpaaren und bei MAT α ein Produkt von 404 Basenpaaren. Die Zellen wurden für den PCR-Ansatz von der Platte entnommen und in 5 µl Wasser resuspendiert. Danach wurde folgendes Reaktionsgemisch zupipettiert (20 µl) und die PCR gestartet.

Ansatz:

Resuspendierte Hefezellen	5 µl
10x Koloniepuffer mit 15 mM MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
Primer Mix (je 10 µM WS826, WS827, WS828)	3,0 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5U/ µl)	0,5 µl
Steriles Wasser	11,5 µl

Dabei wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	1 min	} 35 Zyklen
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	72°C	40 sek	
Amplifikation	72°C	3 min	

Zur Analyse auf einem 1,5%igen Agarosegel wurde der Ansatz mit 2,5 µl Ladepuffer versetzt und davon 10 µl auf das Gel geladen.

6.5.4 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese kann negativ-geladene DNA in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wird in das Agarosegel Ethiumbromid eingebracht, welches mit der DNA interkalieren kann. Ethidiumbromid bindet die DNA proportional zu ihrer Größe. Durch Anregung im UV-Licht werden die Nukleinsäuren dadurch indirekt sichtbar.

Die Herstellung von Agarosegelen erfolgt mit 1% oder 1,5% Agarose und 40 ml TAE-Puffer. Die Agarosesuspension wurde anschließend bis zu ihrer vollständigen Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht. Zur Vorbereitung wurde nun je nach Anwendung ein kleiner Kamm für analytische Gele (Taschenvolumen ca. 10 µl) oder ein großer Kamm für präparative Gele (Taschenvolumen ca. 30 µl) in ein entsprechendes Gestell aus Plexiglas eingesetzt. Die aufgeköchte Agaroselösung wurde mit 0,2 µg Ethidiumbromid versetzt und in die vorbereitete Form gegossen. Nach dem Aushärten des Gels nach ca. 20 Minuten wurde es in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelapparatur gesetzt. Die Proben wurden mit Laufpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde der *GeneRuler DNA-Ladder-Mix* (Fermentas) verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte mit einer Spannung von 80 V- 90 V für 45 bis 60 Minuten. Am Ende wurde das Gel am UV-Schirm visualisiert und dokumentiert.

6.5.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

6.5.5.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde das *Gel-Extractionkit* (Qiagen) verwendet. Nach der Gelelektrophorese, um nach einem Restriktionsverdau die entstanden Fragmente voneinander für die

Klonierung zu trennen, wurden die gewünschten DNA-Fragmente wieder aus dem Gel isoliert. Hierfür wurden größere Volumina der Proben und größere Geltaschen (ca. 30 µl) verwendet. Die Visualisierung erfolgte auf dem UV-Schirm mit schwachem UV-Licht. Mit einem Skalpell wurden die entsprechenden Banden zügig aus dem Gel geschnitten und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet.

6.5.5.2 Aufreinigen von DNA-Fragmenten nach PCR

Nach einer PCR bleiben im Reaktionsansatz noch kleine Oligonukleotide und die Polymerase zurück. Um diese zu entfernen, wurden die DNA-Fragmente mit dem PCR-Aufreinigungskit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet.

6.5.6 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme die spezifische, meistens palindromische Sequenzen erkennen und an denen sie Phosphodiesterbindungen hydrolysieren. Die DNA wird durch die Enzyme inner- oder außerhalb dieser Sequenzmotive geschnitten. Dadurch entstehen meist 3'/ 5'-Überhänge.

Der Restriktionsverdau richtete sich in Temperatur, Puffer und Inkubationszeit nach den Herstellerangaben (NEB). Folgender Ansatz wurde verwendet:

DNA 1µg (Präparativer Verdau)/ 2-5 µl (Analytischer Verdau)	
10 x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzyme	je 5-10 U
Steriles Wasser	ad 20 µl

6.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Kompatibile DNA-Fragmente können zur Klonierung mit einer T4-Ligase zusammengefügt werden.

Zur Ligation wurde folgender Ansatz verwendet:

Vektor-DNA	1 µl
Insert-DNA	5-facher Vektorüberschuss
T4-DNA-Ligase	1 U
10 x Ligase-Puffer	2 µl
Steriles Wasser	ad 20 µl

Die Ligation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

6.5.8 Sequenzierung

Die nach der Amplifikation erhaltenen DNA-Fragmente wurden zur Überprüfung in den *E. coli* Klonierungsvektor pBluescript KS II+ kloniert und in diesem sequenziert (Alting-Mees und Short, 1989).

Die so entstandenen Plasmide wurden in folgenden Ansatz pipettiert:

1,2 µg	DNA
3,0 µl	Sequenzierprimer (WS84 <i>forward</i> -Primer oder WS85 <i>reverse</i> -Primer)
Ad 15 µl	steriles Wasser

Dieser Ansatz wurde zur Firma Sequlab/ Microsynth in Auftrag gegeben. Am nächsten Tag waren die Ergebnisse in der Regel abrufbar. Fragmente kürzer als 800 bp wurden mit dem *forward*-Primer sequenziert. Längere Fragmente wurden in zwei Ansätzen, mit einerseits dem *forward*- und andererseits dem *reverse*-Primer sequenziert um eine vollständige Sequenzierung zu gewährleisten.

6.6 Proteinanalytische Methoden

6.6.1 Zellaufschluss und Reinigung von Proteinen aus *Escherichia Coli*

6.6.1.1 Testexpression und Expression zur Proteinaufreinigung

Zur Auswahl geeigneter Transformanten für die Proteinreinigung aus *E. coli* (BL21C+) wurde vorher eine Testexpression durchgeführt. Dafür wurden abends jeweils zwei Kolonien von der Platte in je 5 ml LB_{Amp, Chl}-Medium angeimpft und Übernacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden je 2 OD₆₀₀-Zellen der Übernachtskultur geerntet (2 Minuten, 132000 Upm), der Überstand verworfen und in 75 µl MBP-Waschpuffer resuspendiert. Anschließend wurde diese Zellsuspension mit 75 µl 2xLSB für 10 Minuten bei 100°C aufgekocht. Die so behandelten Proben galten als Referenz für die uninduzierte Kultur. Die restliche Kultur wurde zu einer OD₆₀₀ von 0,1 in 5 ml überimpft und für 2 Stunden bei 22°C inkubiert. Danach wurde die jeweilige Kultur mit 0,2% Rhamnose (Endkonzentration) für 22 Stunden bei 22°C inkubiert um den Rhamnose-Promotor zur Proteinexpression zu induzieren. Am nächsten Tag wurden 2 OD₆₀₀-Zellen geerntet (2 Minuten, 13200 Upm), der Überstand verworfen, das Pellet in 75 µl MBP-Waschpuffer resuspendiert und anschließend wieder mit 75 µl 2xLSB aufgekocht (10 Minuten, 100°C). Diese Proben waren nun die induzierten Ansätze.

Alle Proben zusammen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, anschließend mit Coomassie zur Visualisierung gefärbt, dokumentiert und beurteilt.

Ausgewählte Klone aus der Testexpression wurden in einer Vorkultur in 50 ml LB_{Amp, Chl} Übernacht bei 37°C angeimpft. Für die Hauptkultur wurde die Vorkultur in 1L LB_{Amp, Chl} zu 0,1 OD₆₀₀ überimpft und

für 2h bei 22°C inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur mit 0,2% Rhamnose Übernacht (22h) bei 22°C geschüttelt. Danach wurde die Kultur in 4x 250 ml großen Sorvall-Zentrifugenbechern in der Sorvallzentrifuge geerntet (10 Minuten, 4°C, 5000 Upm). Die geernteten Kulturen wurden in 20 ml kaltem, sterilem Wasser resuspendiert und jeweils zwei Becher in einem 50 ml-Falkonröhrchen vereinigt. Die Falkonröhrchen wurden auf der großen Tischzentrifuge geerntet (15 Minuten, RT, 4000 Upm). Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Zellen entweder gleich aufgeschlossen oder bei -70°C eingefroren.

6.6.1.2 Zellaufschluss mittels French Press

Die geernteten Zellen wurden entweder frisch aufgeschlossen oder vorher auf Eis aufgetaut. Danach in 20 ml MBP-Waschpuffer resuspendiert und in der großen French Press drei Mal aufgeschlossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen und das Lysat auf Eis gelagert wurden, bzw. der Stahlzylinder für die French Press kalt war.

Das Lysat wurde anschließend in ein SS34 Sorvall-Röhrchen überführt und das in der French Press-Zelle verbliebene Lysat mit der Pipette mitüberführt. Danach wurden die Lysate in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert (15 Minuten, 4°C, 15000 Upm). Der Überstand nach der Zentrifugation wurde über einen Zelluloseacetat-Filter in ein frisches 50 ml Falkonröhrchen filtriert. Vom filtrierten Lysat wurden 50 µl abgenommen, mit 50 µl 2x LSB für 5 Minuten aufgeköcht (100°C).

6.6.1.3 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Die MBP-Fusionsproteine wurden nach dem Zellaufschluss mit Säulenmaterial gereinigt. Dazu wurden 2 ml pro Ansatz des NEB *Amylose Resins* gewaschen. Dafür wurde das Säulenmaterial in ein 50 ml Falkonröhrchen überführt, mit 20 ml kaltem, sterilem Wasser durch 3-malige Invertierung gewaschen (4 Minuten, 3000 Upm) und der Überstand entfernt. Anschließend wurden 20 ml des MBP-Waschpuffers zugegeben, wieder durch invertieren gemischt und abzentrifugiert (4 Minuten, 3000 Upm). Das vollständige, gefilterte Lysat wurde zugegeben, der Deckel des Falkonröhrchens mit Parafilm abgedichtet und Übernacht, bei 4°C auf der Wippe inkubiert.

6.6.1.4 Bradford-Test für Proteinreinigungen

Zur Kontrolle der Proteinreinigung wurde ein Bradford-Schnelltest durchgeführt. Dadurch war es möglich die Anzahl der notwendigen Waschschrte, sowie die erfolgreiche Proteinexpression abzuschätzen. Für den Test wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte eine Reihe (pro Reinigung) mit je 100 µl Bradford-Reagenz pro *Well* vorgelegt. Das Lysat-Säulenmaterialgemisch wurde abzentrifugiert (4 Minuten, 3000 Upm) und davon 50 µl, als Durchlauf, mit 50 µl 2xLSB gemischt und aufgeköcht (5 Minuten, 100°C). Der verbleibende Überstand wurde danach vom Lysat-Säulengemisch entfernt.

Danach wurden 20 ml des MBP-Waschpuffers zugegeben, leicht durchmischt und abzentrifugiert (3 Minuten, 3000 Upm), 5 µl vom Überstand wurden im Bradford-Schnelltest getestet, 50 µl vom Überstand mit 50 µl 2x LSB aufgeköcht (5 Minuten, 100°C) und der restliche Überstand wieder entfernt. Dies wurde wiederholt, bis der Schnelltest kaum mehr färbte. In der Regel waren 4 Waschrunde nötig und es wurde dem MBP-Waschpuffer frisch DTT (1mM) zugesetzt. Zur Elution wurde in das Falcon 1 ml Elutionspuffer zugegeben, durch pipettieren gemischt und anschließend auf 2 ml-Reagiergefäße gleichmäßig aufgeteilt (2x ca. 0,5 ml). Abzentrifugiert wurde in der Tischzentrifuge (1 Minute, 13200 Upm) und die beiden Überstände in einem 1,5 ml-Schraubgefäß vereinigt (erste Elution). Von diesem zusammengeführten Überstand wurden 5 µl im Bradford-Schnelltest getestet, 50 µl davon mit 50 µl 2xLSB aufgeköcht (5 Minuten, 100°C) und auf Eis aufbewahrt. Dies wurde so oft wiederholt bis der Schnelltest kaum mehr färbte. Auf diese Weise wurde 6 bis 8 Mal eluiert. Alle gesammelten Elutionsfraktionen wurden bei 4°C gelagert.

Von den Proben wurden am Ende jeweils 10 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (Proben induziert, Lysat, Durchlauf, die erste und letzte Waschfraktion und alle Elutionsfraktionen).

6.6.2 Proteinlysate aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus Hefe wurden entsprechende Kolonien morgens von der Platte in 5 ml XYD bzw. in 5 ml XYRaf (2% Raffinose) angeimpft und bei 30°C bis abends kultiviert. Am Abend wurde die Vorkultur in 20 ml XYD oder XYRaf auf eine OD_{600} von 0,001 (XYD) oder 0,0025 (XYRaf) überimpft und Übernacht bei 25°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden ca. 10 OD_{600} -Zellen dieser exponentiell wachsenden Kultur (OD_{600} 0,5 – 0,9) in einem Falkongefäß geerntet (2 Minuten, 4000 Upm). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml kaltem, sterilem Wasser zum Waschen resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension wieder abzentrifugiert (2 Minuten, 4000 Upm) und wieder in 1 ml kaltem, sterilem Wasser aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in vorher vorbereitete 1,5 ml Schraubreagiergefäße mit ca. 0,3g Glasperlen überführt und für 15 Sekunden (13200 Upm) in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 150 µl Puffer3 mit Glycerolphosphat (60mM) auf die Zellen mit den Glasperlen gegeben und sie anschließend für 10 Minuten in der Retschmühle (maximale Frequenz) aufgeschlossen. Die nun aufgeschlossenen Zellen wurden für 3 Minuten in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert (3 Minuten, 4°C, 13200 Upm), danach 100 µl des Überstandes mit 100 µl 2xLSB für 5 Minuten (100°C) aufgeköcht und anschließend auf Eis gestellt oder bei -20°C weggefroren.

6.6.2.1 Bradford-Test

Um den Proteingehalt aus den Proteinlysaten zu ermitteln, wurden aus dem verbleibenden Überstand nach dem Zellaufschluss über den Glasperlen, 5 µl entnommen und in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegten 45 µl sterilem Wasser überführt. Dies wurde kurz (ca. 5 Sekunden) mittels Vortexer durchmischt und davon 5 µl in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegten 495 µl sterilem Wasser pipettiert. Diesem Ansatz wurden 500 µl Bradford-Reagenz zugegeben und eine Referenzkontrolle mit 500 µl sterilem Wasser und 500 µl Bradford-Reagenz vorbereitet. Die Ansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach die OD bei 595 nm gemessen. Die Errechnung des Proteingehalts erfolgte durch den Kehrwert. Auf ein SDS-Gel wurden 2 oder 4 OD₆₀₀-Zellen aufgetragen. Rechnung: 2 OD₆₀₀-Zellen geteilt durch den erhaltenen Wert bei der OD₅₉₅-Messung ist einzusetzendes Volumen in µl.

6.6.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS, *Sodiumdodecylsulfate*, *Natriumdodecylsulfat*) wurde dazu verwendet um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (Laemmli 1970). Dabei wurde eine Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid (37,5: 1) verwendet, welches durch Ammoniumpersulfat (Radikalstarter) und Tetramethyldiamin (Katalysator) in einer Radikalreaktion zu einer Vernetzung der Komponenten führt. Durch dieses Netz werden Proteine nach Anlegen einer Spannung ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dafür wurden die Proteine während der Vorbereitung der Proben durch aufkochen mit LSB-Probenpuffer denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene, negativ geladene SDS lagert sich dabei an die Proben an und das ebenfalls enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken der Proteine.

Zur Analyse der Proteine mit dieser Methode wurden zuerst Gele, bestehend aus Trenngel und Sammelgel zwischen zwei Glasplatten, abgedichtet mit einem Gummi gegossen. Das frisch gegossene Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet. Dabei wurde nach dem Auspolymerisieren des Trenngels und Entfernen des Isopropanols, das Sammelgel gegossen und ein dafür vorgesehener Kamm gesetzt. Zur Probenbeladung wurden die Gele in eine entsprechende Apparatur gesetzt und als Puffer 1x Turbo-LRB verwendet.

In dieser Arbeit wurden entweder 9- oder 12%ige SDS-Gele verwendet. Pro Gel wurde eine Spannung zwischen 17 und 25mA angelegt und für 70 bis 90 Minuten laufen gelassen. Als Größenstandard wurden 5 µl des *ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range* (NEB), bzw. der *Color Plus Standard* (NEB) verwendet. Falls in der Bildunterschrift nicht anders angegeben wurden von den Proteinlysaten 2 OD₆₀₀-Zellen auf das SDS-Gel aufgetragen.

6.6.2.3 Western Blot mit Proteinnachweis

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteingele geblottet. Dazu wurde ein in Transferpuffer getränktes Whatman-Paper auf die Anode einer Blottingapparatur gelegt, darauf die in Wasser äquilibrierte Nitrocellulosemembran. Auf diese Membran wurde das Trenngel blasenfrei gelegt und darauf ein weiteres in Transferpuffer getränktes Whatman-Paper. Darauf wurde die Kathode der Blottingapparatur gesetzt. Ein Gel wurde dazu bei 40 mA für 70 bis 90 Minuten, je nach Proteingröße, geblottet. Um kleine Proteine aus dem Gel nicht aus der Membran zu blotten, wurde darauf geachtet, die untere Zeitgrenze zu nehmen.

Nach dem Blotten wurde die Membran in eine Plexiglasbox überführt und ca. 5 ml einer PonceauS-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation von ca. 15 Minuten wurde die Membran mit Reinwasser gewaschen um überschüssiges PonceauS von der Membran zu entfernen. Die nun sichtbaren unspezifisch gefärbten Proteinbanden dienen zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung des geblotteten Proteingels. Die Membran wurde anschließend eingescannt und danach für eine Stunde mit 5 ml 5%igem Magermilchpulver in TBS-T geblockt um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Nach dem Blocken wurde der spezifische primäre Antikörper in 5 ml Magermilchpulverlösung in TBS-T zugegeben und übernacht bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 Mal mit 5 ml TBS-T gewaschen und der entsprechende sekundäre Antikörper in 5 ml Magermilchpulverlösung in TBS-T für 3 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Darauf war zu achten, dass die Lösung mit dem sekundären Antikörper abgedunkelt wurde um ein Ausbleichen des an ein Chromophor gekoppelten Antikörpers zu verhindern.

6.6.2.4 Co-Immunpräzipitation

Mittels Co-Immunpräzipitation (CoIP) ist es möglich direkte oder indirekte Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren. Dafür können Proteine aus dem Gesamtzellextrakt (WCE- *whole cell extract*) aufgereinigt werden. Es wird dabei ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen das Epitop des Epitop-fusionierten Proteins (z.B. Flag3) gerichtet ist. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit anti-Flag-Antikörpern gekoppelt an Agarosebeads (*Flag-Beads*) der Firma Sigma präzipitiert.

Zur Immunpräzipitation (IP) wurden mindestens 100 OD₆₀₀-Zellen einer exponentiell wachsenden Hefekultur (OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,9) in je zwei 50ml-Falkonröhrchen geerntet (2 Minuten, 2000 Upm) und anschließend mit je 1 ml kaltem, sterilem Wasser gewaschen. Um Degradationen der Proteine zu vermeiden, wurde immer auf Eis oder mit vorgekühlten Geräten gearbeitet. Die Zellpellets wurden in je 300 µl kaltem Puffer³ mit 60 mM Glycerolphosphat (Aufschlusspuffer) resuspendiert und in zwei Schraubdeckelgefäße mit je ca. 0,6g Glasperlen überführt. Der Aufschluss wurde in der Retschmühle bei maximaler Frequenz (10 Minuten, 4°C) durchgeführt. Danach wurden die Proben für

10 Minuten in der Kühlzentrifuge (4°C, 13200 Upm) abzentrifugiert, die Überstände der beiden Proben in einem frischen Reaktionsgefäß vereinigt und wieder abzentrifugiert (15 Minuten, 4°C, 13200 Upm). Davon wurden 5 µl vom Überstand zur Proteinkonzentrationsbestimmung für den Bradford-Test eingesetzt. 25 µl des Überstands wurden mit 25 µl 2xLSB aufgeköcht (10 Minuten, 100°C) und bei -20°C eingefroren (= WCE). Für die IP wurden 160-200 OD₅₉₅-Zellen in 500 µl Puffer3 mit Glycerolphosphat eingestellt. Anschließend wurden die anti-Flag-Beads vorbereitet. Pro Ansatz wurden 50 µl dieser Beads in ein Schraubdeckelgefäß überführt, 2 Mal mit Aufschlusspuffer gewaschen (12 Sekunden, 13200 Upm) und in 75% des Ausgangsvolumens im Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Überstand sollte dabei nicht vollständig abgenommen werden, um ein Aufsaugen der an Agarose gekoppelten Beads zu vermeiden. Die Beads wurden dann gleichmäßig (je 50 µl) auf die Proben verteilt. Die Proben wurden bei 4°C für 3-4 Stunden gerollert, anschließend abzentrifugiert (10 Sekunden, 13200 Upm), drei Mal mit 500 µl Aufschlusspuffer gewaschen und der Überstand mit der Hamilton-Spritze vollständig abgenommen. Anschließend wurden die Proben mit 40 µl 1xLSB versetzt und für 10 Minuten bei 100°C aufgeköcht. Zur Lagerung wurden sie bei -20°C eingefroren.

Zur Analyse wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend ein Western Blot durchgeführt. Dafür wurden gleiche Mengen des WCE (2 OD₆₀₀-Zellen), 2 µl des Präzipitats zur Überprüfung der Präzipitation und 8-10 µl des Präzipitats für die CoIP um die Protein-Wechselwirkung nachzuweisen auf ein SDS-Gel aufgetragen.

6.6.2.5 Coomassie-Färbung

Zum Färben von SDS-Gelen wurde eine 0,01%ige Coomassie-Lösung nach Luo *et al.* (2006) verwendet.

Die Coomassie-Färbung wurde benutzt um bei Proteinreinigungen deren Reinheit zu überprüfen, für die Testexpression geeignete Klone durch den Vergleich der Proteinexpression von uninduzierten und induzierten zu vergleichen und somit auszuwählen oder mit Hilfe einer BSA-Eichgerade den Proteingehalt ausgewählter Banden quantitativ zu analysieren.

Die Proteingele wurden nach dem Entnehmen der Laufapparatur und Entfernen des Sammelgels in einer Plastiksachtel 3 Mal mit ca. 5 ml Reinwasser für 5 Minuten gewaschen, in ca. 10 ml der Coomassie-Lösung für 15 Minuten geschwenkt und erneut 3 Mal 5 Minuten mit Wasser gewaschen.

Detektiert wurde das gefärbte Gel anschließend am LI-COR Odyssey mit der Einstellung Proteingel im 680 nm-Kanal und einer Intensität zwischen 4 und 5.

6.6.2.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinbanden mittels *ImageJ*

Der Bradford-Test ist geeignet um den Gesamtproteingehalt von Proben zu analysieren, da er aber nicht zwischen degradiertem und nicht-degradiertem Protein diskriminiert, ist er für die genaue Ermittlung der Konzentrationsbestimmung von Proteinbanden zu ungenau.

Hierzu wird im Vorfeld auf das SDS-Gel eine BSA-Eichgerade in dem Konzentrationsbereich in dem sich das zu analysierende Protein befindet aufgetragen. Diese Eichgerade wird aus einem 100x BSA-Stock von NEB verdünnt. Die Proben für die Eichgerade werden in einer Konzentration von 0,5 µg bis 5 µg in Wasser zusammen mit 2xLSB eingestellt und für 5 Minuten bei 100°C aufgeköcht. Beispiel: Erstellte BSA-Verdünnung sei auf 1 µg/µl eingestellt. In einem Reaktionsgefäß 8 µl Wasser vorlegen, 2 µl dieser BSA-Verdünnung zugeben, 10 µl 2x LSB hinzu pipettieren und zusammen aufkochen. Davon dann das SDS-Gel mit 10 µl beladen (Proteingehalt pro Tasche beträgt hier 1 µg). Das größere Volumen wurde gewählt um Pipettierfehler zu reduzieren. Die Stammlösungen für die Eichgerade wurden bei 4°C aufbewahrt und damit alle späteren Proteinangleichungen aus denselben Lösungen zu pipettieren um weitere Pipettierfehler zu vermeiden. Es wurden jeweils 3 x 1 µl des zu analysierenden Proteins zwischen der BSA-Eichgerade auftragen, um die Proteinbanden für die Quantifizierung besser voneinander zu trennen.

Nach Färben und Entfärben des Proteingels mit Coomassie (Kapitel 6.6.2.5), wird das Gel am LI-COR Odyssey eingescannt (Einstellungen: Proteingel, im 680nm-Kanal die Intensität 4 bzw. 5 wählen).

Diese Aufnahme in *ImageJ* öffnen und die *Measure Bar* öffnen. Den Reiter *Threshold* wählen und die Grenzen so wählen, dass möglichst alle zu messenden Banden rot erscheinen. Unter *Set Measurements Area* und *Integrated Density* anwählen und mit OK bestätigen. Einen Rahmen um die zu messende Bande ziehen und auf *Particles* klicken. Dabei *Pixel units* anhaken und *Size* auf *2-Infinity* ändern. Anschließend mit OK bestätigen. Dies wird so oft wiederholt, bis die Signale aller für die Bestimmung notwendiger Banden gemessen sind. Die Ergebnisse sind im Fenster *Results* zu finden. Die *Results* werden in Excel kopiert und daraus dann mit Hilfe der BSA-Eichgerade in µg die Konzentration des gewünschten Proteins aus der *RawIntDen* in µg berechnet.

6.7 Phosphatase-Assay

Die Aktivität von Phosphatasen kann mit Hilfe der niedermolekularen Substanz para-Nitrophenylphosphat (pNPP) in einem Phosphatase-Assay bestimmt werden. Durch die Dephosphorylierung des Substrats durch die Phosphatase zu para-Nitrophenol wird das Substrat von farblos nach gelb umgesetzt und dessen Absorption bei 405 nm mit einem Photometer bestimmt.

Um die spezifischen Aktivitäten von MBP-Cdc14, MBP-Cdc14(1-374) und MBP-Cdc14(ASAA) zu ermitteln, wurden Enzym in steigender Menge von jeweils 1 µg, 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg und 20 µg für den Versuch eingesetzt. Zur Reaktion wurden 20 mM pNPP zugegeben und für 15 Minuten bei

30°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 0,2 M Natronlauge abgestoppt und die Absorption bei 405 nm photometrisch bestimmt.

Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$A(\text{Enzym}) = \frac{OD_{405} * V}{\epsilon(\text{Substrat}) * d * t * n(\text{Enzym})} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \mu\text{mol}} \right]$$

OD ₄₀₅	gemessene Absorption bei 405 nm
V	Reaktionsvolumen, 1 ml
ε(Substrat)	molarer Extinktionskoeffizient von para-Nitrophenol bei 405 nm, $1,78 * 10^4 \frac{1}{\text{M} * \text{cm}}$
d	Schichtdicke der Küvette, 1 cm
t	Inkubationszeit, 15 Minuten
n(Enzym)	eingesetzte Stoffmenge des Enzyms MBP-Cdc14, variabel

Auf diese Art wurde auch die passende Enzymmenge für das Inhibitionsexperiment mit unterschiedlichen N-terminalen MBP-Net1-Fragmenten ermittelt. Dafür wurden jeweils 20 µg von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA) verwendet (entspricht 191,39 pmol) und MBP-Net1(1-233), MBP-Net1(1-455) und MBP-Net1(205-455) als Inhibitoren in steigender Konzentration von 0 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 50 pmol, 100 pmol, 150 pmol, 200 pmol und 300 pmol zugegeben.

6.8 Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H)

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast-two-Hybrid*, Y2H) ist eine Methode um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* zu analysieren. Die zu untersuchenden Proteine werden jeweils an eine Bindedomäne (BD, pEG202) und eine Aktivierungsdomäne (AD, pJG4-5) kloniert. Findet eine Interaktion statt, kommt es über den nun aktiven Transkriptionsfaktor im Reporterstamm W276 zu einer Aktivierung die entweder durch Wachstum auf einer Selektivplatte oder einer Blaufärbung des Reporterstamms nach Überschichtung mit Agar sichtbar gemacht werden kann.

Der verwendete Reporterstamm enthält zwei unterschiedliche Reportergene, ein funktionelles β-Galaktosidase-Gen und ein Markergen für die Leucin-Prototrophie. Beide unter einem *lexA*-Operon. Mittels X-Gal (5-Brom-4chlor-3-indoxyl-β D-galactopyranosid), ein chromogenes Substrat, kann bei einer Blaufärbung, nach der Spaltung der β-Galaktosidase, auf deren Aktivität geschlossen werden. Parallel dazu wird die Prototrophie für das *LEU2*-Gen auf einer entsprechenden Selektivplatte untersucht.

Die zu untersuchenden Konstrukte wurden jeweils in den pEG202 und den pJG4-5 kloniert. Danach wurde der Reporterstamm W276 damit co-transformiert (1 µl pJG4-5, 2 µl PEG202) und auf SD-HT-

Platten ausgestrichen. Von diesen Transformanten wurden jeweils 6 ausgewählt und jeweils in 150 µl sterilem Wasser in einer Reihe einer Mikrotiterplatte resuspendiert. Sechs Replika pro Kombination. Diese Zellsuspensionen wurden dann auf SD-HT, SRG-HT bzw. SSG-HT (für den X-Gal-Test), ebenso wie SRG-HTL bzw. SSG-HTL (Wachstumstest) gestempelt.

Anschließend wurden die Platten für etwa zwei Tage bei 30°C inkubiert. Für den X-Gal-Test wurden die Platten mit Agar mit X-Gal überschichtet (Rupp, 2002) und für mehrere Stunden bei 30°C inkubiert. Nach deren Dokumentation wurden die Platten bei 4°C aufbewahrt und am nächsten Tag ggf. nochmals dokumentiert. Ebenso wurden die Platten für den Wachstumstest dokumentiert.

Der Agar zur Überschichtung für den X-Gal-Test:

1% Agar	5 ml
1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0)	5 ml
DMFA	600 µl
10% SDS	100 µl
X-Gal (20 mg/ml in DMFA)	100 µl

7 Material

7.1 Hefestämme

Tab. 5: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme mit deren Beschreibung.

Sammlung: Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert

Bezeichnung	Paarungstyp	Genotyp	Ursprung
K699	MAT a	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3, ssd1delta?, can1-100, [psi+], ho</i>	Sammlung
K842	MAT a/alpha	<i>ade2-1/ade2-1, his3-11, 15/his3-11, 15, leu2-3, 112/leu2-3, 112, trp1-1/, trp1-1, ura3/ura3</i>	Sammlung
W276	MAT alpha	<i>his3, trp1, ura3-52::URA3-lexA-op-lacZ, leu2::pLEU2-lexA-op</i>	Sammlung
W471	MAT a	<i>HCT1::HA-HCT1-TRP1</i>	Sammlung
W8458	MAT alpha	<i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Sammlung
W11398	MAT a	<i>CDC14-MYC13-kanMX6</i>	Sammlung
W12125	MAT alpha	<i>his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 NatNT2-pTEF1-GFP-NET1</i>	Sammlung
W12126	MAT alpha	<i>his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 NatNT2-pTEF1-GFP-NET1(234-1189)</i>	Sammlung
W12989	MAT a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-374)-GFP-HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
W12990	MAT a/alpha	<i>CDC14/ CDC14-GFP-HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
W12996	MAT alpha	<i>TUB1-GFP-TRP1 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	Diese Arbeit
W13173	MAT a	<i>CDC14-GFP-HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
W13174	MAT alpha	<i>CDC14-GFP-HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
W13300	MAT a/alpha	<i>CDC14/CDC14-GFP His3MX6 ura3::NOP56-3mCherry-URA3</i>	Diese Arbeit
W13307	MAT a	<i>natNT2-pTEF1-NET1(234-1189) SPC42-3mCherry-URA3 CDC14-GFP-HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
W13309	MAT alpha	<i>natNT2-pTEF1-NET1 CDC14-GFP-HIS3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W13310	MAT a	<i>natNT2-pTEF1-NET1(234-1189) CDC14-GFP-HIS3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W13423	MAT a	<i>CDC14-GFP-His3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit

W13433	Mat a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-449)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W13434	MAT a	<i>CDC14(1-449)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W13436	Mat a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-506)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W13437	Mat a	<i>CDC14(1-506)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W13439	Mat a	<i>CDC14-GFP-His3MX6 ura3::Nop56-3mCherry-URA3</i>	Diese Arbeit
W13446	Mat a	<i>CDC14(1-449)-GFP-His3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W13543	MAT a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-423)-GFP-HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
W13544	MAT alpha	<i>pTEF2-GFP CDC14(342-551)-URA3 trp1-Delta1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W13575	MAT a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-506)-GFP-HIS3MX6 Nop56-3mCherry-URA3</i>	Diese Arbeit
W13576	MAT a	<i>CDC14(1-506)-GFP-HIS3MX6 Nop56-3mCherry-URA3</i>	Diese Arbeit
W13726	MAT alpha	<i>pTEF2-GFP CDC14(342-506)-tCYC1-URA3 trp1-Delta1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W14087	MAT a/alpha	<i>CDC14/ delta cdc14-kanMX6</i>	Diese Arbeit
W14088	MAT a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-437)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W14090	MAT a	<i>CDC14(1-437)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W14091	MAT a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-431)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W14092	MAT a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-434)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W14093	MAT a/alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-340)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W14095	MAT a	<i>CDC14(1-437)-GFP-His3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W14124	MAT a	<i>BMH1-FLAG3-KanMX6</i>	Sammlung
W14137	MAT a	<i>CDC14 (1-434)-GFP-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W14138	MAT alpha	<i>CDC14(1-434)-GFP-His3MX6 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W14218	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14219	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14224	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(T428A S429A)-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14225	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(T428A S429A)-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit

W14226	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP- URA3</i>	Diese Arbeit
W14228	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14 (QPRK 432-435 ASAA)-GFP- URA3</i>	Diese Arbeit
W14229	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14231	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ430-434)-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14376	MAT a	<i>cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP- URA3</i>	Diese Arbeit
W14377	MAT a	<i>cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14378	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ430-434)-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14383	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430) -GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14384	MAT a	<i>CDC14 cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14385	MAT a	<i>cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14486	MAT a	<i>leu2::pGAL1-NET1(1-455)-Flag3-tCYC1-LEU2 CDC14- MYC13-kanMX6</i>	Diese Arbeit
W14487	MAT a	<i>leu2::pGAL1-NET1(1-201)-Flag3-tCYC1-LEU2 CDC14- MYC13-kanMX6</i>	Diese Arbeit
W14488	MAT a	<i>leu2::pGAL1-NET1(202-455)-Flag3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6</i>	Diese Arbeit
W14489	MAT a	<i>leu2::pGAL1-NET1(1-269)-Flag3-tCYC1-LEU2 CDC14- MYC13-kanMX6</i>	Diese Arbeit
W14490	MAT a	<i>leu2::pGAL1-NET1(270-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6</i>	Diese Arbeit
W14491	MAT a	<i>leu2::pGAL1-NET1(1-341)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14- MYC13-kanMX6</i>	Diese Arbeit
W14492	MAT a	<i>leu2::pGAL1-NET1(342-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6</i>	Diese Arbeit

W14495	MAT a/alpha	<i>CDC14/ cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-FLAG3-tCYC1-URA3</i>	Diese Arbeit
W14505	MATa	<i>cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(QPRK 432-435 ASAA)-GFP- URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mcherry-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W14577	MATa	<i>cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(T428A S429A)-GFP-URA3</i>	Diese Arbeit
W14584	MAT a/ alpha	<i>CDC14/ CDC14(1-374)-HA3-His3MX6</i>	Diese Arbeit
W14586	MAT a	<i>cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ430- 434)-GFP-tCYC1-URA3</i>	Diese Arbeit
W14694	MAT a	<i>CDC14-MYC13-kanMX6 ura3::pMET25-Net1(1-455)-FLAG3-tCYC1-URA3</i>	Diese Arbeit
W14695	MAT a	<i>CDC14-MYC13-kanMX6 ura3::pMET25-NET1(1-341)-FLAG3-tCYC1-URA3</i>	Diese Arbeit
W14696	MAT a	<i>CDC14-MYC13-kanMX6 ura3::pMET25-NET1(1-201)-FLAG3-tCYC1-URA3</i>	Diese Arbeit
W14715	MAT alpha	<i>ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W14718	MAT alpha	<i>cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-FLAG3-tCYC1-URA3 trp1::TUB1-GFP-TRP1 his3::pTEF2-mCherry-SWI5- S/A-tCYC1-HIS3</i>	Diese Arbeit
W14858	MAT a	<i>HCT1::HA-HCT1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC14-URA3</i>	Diese Arbeit
W14859	MAT a	<i>HCT1::HA-HCT1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC14(QPRK 423-435 ASAA)- URA3</i>	Diese Arbeit
W14864	MAT alpha	<i>leu2:: pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W14882	MAT alpha	<i>cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-FLAG3-tCYC1-URA3 ase1::ASE1-GFP-SpHIS5 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5- S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
W14949	MAT a	<i>leu2:: pTEF2-HCT1(1-257)-YEGFP-tCYC1-LEU2 cdc14-delta::kanMX4 ura3::pCDC14-CDC14(Δ426-430)-FLAG3-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit

W14951	MAT alpha	<i>hct1delta::kanMX4</i> <i>ase1::ASE1-GFP-SpHIS5</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	Diese Arbeit
---------------	-----------	--	--------------

7.2 Vektoren und Plasmide

Tab. 6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide.

Bezeichnung	Vektor	Insert	Ursprung
pFA6a-GFP(S65T)His3MX6	<i>pFA6a</i>		Longtine <i>et al.</i> 1998
pFA6a-kanMX6	<i>pFA6a</i>		Longtine <i>et al.</i> 1998
pYM-N19 P30275	<i>pYM-N19</i>		Janke <i>et al.</i> , 2004
pWS1634	<i>pJoe2955</i>	<i>CDC14</i>	Sammlung
pWS1635	<i>pJoe2955</i>	<i>CDC14(1-374)</i>	Sammlung
pWS2752	<i>pEG202</i>	<i>CDC14(C283A)</i>	Sammlung
pWS2753	<i>pJG4-5</i>	<i>CDC14(C283A)</i>	Sammlung
pWS2954	<i>pWS2897</i>	<i>SWI5-S/A</i>	Sammlung
pWS4063	<i>pJG4-5</i>	<i>NET1(1-233)</i>	Sammlung
pWS4172	<i>pJG4-5</i>	<i>CDC14(1-374 C283A)</i>	Diese Arbeit
pWS4173	<i>pEG202</i>	<i>CDC14(1-374 C283A)</i>	Diese Arbeit
pWS4242	<i>pJG4-5</i>	<i>CDC14(1-449 C283A)</i>	Diese Arbeit
pWS4243	<i>pEG202</i>	<i>CDC14(1-449 C283A)</i>	Diese Arbeit
pWS4245	<i>pJG4-5</i>	<i>CDC14(342-551)</i>	Diese Arbeit
pWS4246	<i>pEG202</i>	<i>CDC14(342-551)</i>	Diese Arbeit
pWS4281	<i>pEG202</i>	<i>NET1(1-341)</i>	Sammlung
pWS4282	<i>pEG202</i>	<i>NET1(1-455)</i>	Sammlung
pWS4284	<i>pJG4-5</i>	<i>NET1(1-341)</i>	Sammlung
pWS4285	<i>pJG4-5</i>	<i>NET1(1-455)</i>	Sammlung
pWS4289	<i>pWS2793</i>	<i>CDC14(342-551)</i>	Diese Arbeit
pWS4605	<i>pJG4-5</i>	<i>BMH1</i>	Sammlung
pWS4777	<i>pWS4692</i>	<i>CDC14(Δ426-430)-FLAG3</i>	Diese Arbeit
pWS4778	<i>pWS4694</i>	<i>CDC14(Δ430-434)-FLAG3</i>	Diese Arbeit

pWS4779	<i>pWS3308</i>	<i>CDC14-FLAG3</i>	Diese Arbeit
pWS4799	<i>pWS2215</i>	<i>CDC14</i>	Diese Arbeit
pWS4801	<i>pWS2215</i>	<i>CDC14(QPRK 423-435 ASAA)</i>	Diese Arbeit
pWS5035	<i>pJOE2955</i>	<i>NET1(1-233)</i>	Sammlung
pWS5036	<i>pJOE2955</i>	<i>NET1(1-455)</i>	Sammlung
pWS5039	<i>pJOE2955</i>	<i>NET1(205-455)</i>	Sammlung
pWS5089	<i>pJOE2955</i>	<i>CDC14(QPRK 432-435 ASAA)</i>	Diese Arbeit

7.3 Oligonukleotide

7.3.1 Mutagenese-Primer

Tab. 7: Mutagenese-Oligonukleotide

Beschreibung	Sequenz	Name	Ursprung
F-Primer zur Mutagenese von TS 428/429 zu AA	5'- CTCAGCCGTCACAGGCTGCGCCTGGTCAGCC GAGAAA-3'	WS2678	Diese Arbeit
R-Primer zur Mutagenese von TS 428/429 zu AA	5'- TTTCTCGGCTGACCAGGCGCAGCCTGTGGGACG GCTGGAG-3'	WS2679	Diese Arbeit
F-Primer zur Mutagenese von QPRK 432-435 zu ASAA	5'- CACAGACTTCGCCTGGTGCTAGCGCTGCAGGCC AAAACGGTTCTAATA-3'	WS2772	Diese Arbeit
R-Primer zur Mutagenese von QPRK 432-435 zu ASAA	5'- TATTAGAACCGTTTTGGCCTGCAGCGCTAGCACC AGGCGAAGTCTGTG-3'	WS2773	Diese Arbeit
F-Primer zur Deletion/ Mutagenese von Cdc14 Δ 426-430 und einfügen von Ala (GCG), mit BstUI überprüfbar	5'- ATTCAAGAGCTCAGCCGTCGCGGGTCAGCCGAG AAAGGGC-3'	WS2800	Diese Arbeit
R-Primer zur Deletion von Cdc14 Δ 426-430 und einfügen von Ala (GCG), mit BstUI überprüfbar	5'- GCCCTTCTCGGCTGACCCGCGACGGCTGAGCT CTTGAAT-3'	WS2801	Diese Arbeit

F-Primer zur Deletion von Cdc14 Δ430-434), mit BstBI überprüfbar	5'- GCCGTCCCACAGACTTCGAAGGGCCAAAACGGT TCTAAT-3'	WS2802	Diese Arbeit
R-Primer zur Deletion von Cdc14 Δ430-434), mit BstBI überprüfbar	5'- ATTAGAACCGTTTTGGCCCTTCGAAGTCTGTGG GACGGC-3'	WS2803	Diese Arbeit

7.3.2 Oligos zur Epitopmarkierung und Deletion von *CDC14*

Tab. 8: Oligos zur Epitopmarkierung und Deletion von *CDC14*

Sammlung: Oligosammlung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Seufert

Beschreibung	Sequenz	Name	Ursprung
F-Primer zur Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> 1-506 mit dem <i>PFA6a</i> -System	5'-CCTCTGCTTCATCGTCCCGAATGGAAGATAACGAA CCCAGC CGGATCCC-CGGGTTAATTAA-3'	WS2619	Diese Arbeit
F-Primer zur Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> 1-449 mit dem <i>PFA6a</i> -System	5'-CCAAAACGGTTCTAATACTATAGAAGATATCAACA ATAAT CGGATCCC-CGGGTTAATTAA-3'	WS2618	Diese Arbeit
F-Primer zur Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> 1-437 mit dem <i>PFA6a</i> -System	5'-TCAGCCGTCCCACAGACTTCGCCTGGTCAGCCGAG AAAGGGCCAA CGGATCCC-CGGGTTAATTAA-3	WS2770	Diese Arbeit
F-Primer zur Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> 1-434 mit dem <i>PFA6a</i> -System	5'-TTCAAGAGCTCAGCCGTCCCACAGACTTCGCCTGG TCAGCCGAGACGGATCCC-CGGGTTAATTAA-3'	WS2780	Diese Arbeit
F-Primer zur Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> 1-431 mit dem <i>PFA6a</i> -System	5'-AGTAATTCATTCAAGAGCTCAGCCGTCCCACAGAC TTCGCCTGGT-CGGATCCCCGGGTTAATTAA-3	WS2771	Diese Arbeit
F-Primer zur Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> 1-423 mit dem <i>PFA6a</i> -System	5'-TCTACGGCGAATAATGGAAGTAATTCATTCAAGAG CTCA -CGGATCCCCGGGTTAATTAA-3	WS2631	Diese Arbeit

F-Primer zur Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> 1-340 mit dem <i>PFA6a</i> -System	5'-CAGCATTGGTTATATTTACACCAGAATGATTTTAG AGAATGGAAG-CGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'	WS2781	Diese Arbeit
F-Primer zur Deletion von <i>CDC14</i> mit dem <i>pFA6a</i> -System	5'-TACGAAACAATTGCACAGAGGCTGGGACTACAAA GTACGCTTATA-CGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'	WS2758	Diese Arbeit
R-Primer zur Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> mit dem <i>pFA6a</i> -System	5'-AGTTTTTTTATTATATGATATATATATATAAAAA TGAAAT AAA – GAATTCGAGCTCGTTTAAAC –3'	WS1766	Sammlung

7.4 Antikörper

Tab. 9: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Primäre Antikörper	Beschreibung	Organismus	Verdünnung
α -Flag	M2	Maus	1: 20 000
α -GFP	mAB Roche	Maus	1: 2 000
α -HA	12CA5	Maus	1: 50
α -Tub2	SA4978	Kaninchen	1: 6 000
α -Myc	A14	Kaninchen	1: 500
Sekundäre Antikörper			
α -Maus-800	LiCOR		1: 15 000
α -Maus-680	LiCOR		1: 15 000
α -Kaninchen-800	LiCOR		1: 15 000
α -Kaninchen-680	LiCOR		1: 15 000

7.5 Medien, Puffer und Lösungen

7.5.1 Bakterienmedien

Tab. 10: Bakterienmedien

Medium	Zusammensetzung	Menge
LB-Medium	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	NaOH	0,3 mM
	Für Platten: 1,7% Agar	
	Nach Bedarf Antibiotikazusätze:	
	Ampicillin	Endkonzentration 100 µg/ ml
SOC-Flüssigmedium	Chloramphenicol	Endkonzentration 50 µg/ ml (Flüssigmedium)
		Endkonzentration 34 µg/ ml (Platten)
SOC-Flüssigmedium	Bacto Trypton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glukose	20 mM

Stammlösungen	Ampicillin	100 mg/ml in Ethanol
	Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol

7.5.2 Hefemedien

Tab. 11: Hefemedien

Medium	Zusammensetzung	Menge
Selektivmedium flüssig (S)	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	100 ml/l
	10x Drop Out-5	100 ml/l
	Zucker	20 g/l
	Adenin (A)	50 mg/l
	Histidin (H)	50 mg/l
	Leucin (L)	100 mg/l
	Tryptophan (T)	100 mg/l
	Uracil (U)	50 mg/l
	Wasser mit 1,7% Agar autoklaviert	350 ml
Vollmedium flüssig (XY)	Bacto Pepton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	Tryptophan	0,2 g/l
	Adeninsulfat	0,1 g/l
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	Zucker (nach dem Autoklavieren)	20 g/l
	Für Platten: 1,7% Agar Nach Bedarf Antibiotikumzusatz G418 (W303)	500 µg/ ml
Mikroskopie-Agar	10x YNB	100 ml/l
	10x Drop Out ++	100 ml/l
	Glukose	20 g/l
Novozymmedium	Sorbitol	1 M
	Tris/ HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	DTT (frisch zugeben)	50 mM
	Novozym (frisch zugeben)	2 mg/ml
Präsporulationsmedium (sterilfiltriert)	Bacto Yeast Extract	8 g/l
	Bacto Pepton	3 g/l
	Adeninsulfat	50 mg/l
	Glukose	100 g/l

Sporulationsmedium (sterilfiltriert)	Bacto Yeast Extract	1 g/l
	Kaliumacetat	10 g/l
	10x Drop Out++	10 ml/l
	Glukose	0,5 g/l

Dabei verwendete Stammlösungen von Hefemedien:

Tab. 12: Stammlösungen für Hefemedien

Medium	Zusammensetzung	Menge
Adenin(-sulfat) Histidin Tryptophan Leucin Uracil		5 g/l
		5 g/l
		10 g/l
		10 g/l
		2,5 g/l
10x Drop Out -5	Alanin	0,5 g/l
	Arginin	0,5 g/l
	Asparagin	0,5 g/l
	Aspartat	1,0 g/l
	Cystein	0,5 g/l
	Glutamin	0,5 g/l
	Glutamat	1,0 g/l
	Glycin	0,5 g/l
	(myo-)Inositol	0,5 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Lysin	0,5 g/l
	Methionin	0,5 g/l
	p-Aminobenzoesäure	0,05 g/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Prolin	0,5 g/l
	Serin	1,0 g/l
Threonin	1,0 g/l	
Tyrosin	0,5 g/l	
Valin	1,0 g/l	
10x Drop Out ++	Zu Drop Out -5 zusätzlich:	
	Adenin	0,5 g/l
	Histidin	0,5 g/l
	Tryptophan	1,0 g/l
	Leucin	1,0 g/l
	Uracil	0,5 g/l
G418(-Sulfat)		500 mg/ml

Glukose 20%	Glukose-Monohydrat	20 g/l
Galaktose 20%		20 g/l
Raffinose 20%		20 g/l
Saccharose 10%		10 g/l
10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
	Ammoniumsulfat	50 g/l

7.5.3 Puffer und Lösungen

Tab. 13: Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Menge
10x DNA-Ladepuffer (LP)	Tris/HCl, pH 7,8	10 mM
	EDTA	1 mM
	Bromphenolblau	2,5 mg/ml
	Xylen cyanol FF	2,5 mg/ml
	Glycerin	50%
10x Koloniepuffer (MAT-PCR)	Tris/ HCl pH 8,5	125 mM
	KCl	560 mM
	MgCl ₂	15 mM
2x Laemmli sample buffer (LSB)	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	40 mg/ml
	Glycerin	200 mg/ml
	Bromphenolblau	400 µg/ml
	β-Mercaptoethanol	10 %
Sammelgel	Wasser	1,5 ml
	0,5 M Tris/Cl pH 6,8	625 µl
	Acrylamid-Mix	335 µl
	10 % SDS	25 µl
	10 % APS	25 µl
	TEMED	2,5 µl
10x Reaktionspuffer (Phosphatase-Assay)	Tris/ HCl pH 7,0	0,5 M
	NaCl	2,5 M
	EDTA	1 mM
	DTT (frisch zugeben)	10 mM
10x TBS	Tris-Base	200 mM
	NaCl	1,37 M
		(pH 7,6 mit Salzsäure eingestellt)

10x TE	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA	100 mM 10 mM
50x TAE	Tris/Acetat, pH 8,0 EDTA	(pH 8,0 mit Essigsäure eingestellt)
10x Turbo-LRB	Glycin Tris-Base SDS	9,46 M 250 mM 1%
Coomassie-Färbelösung	Coomassie G250 Methanol Eisessig	0,01 % 50 % 10 %
EasyPrep-Puffer (EP)	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA Saccharose Lysozym RNase A BSA	10 mM 1 mM 15 % (w/v) 2 mg/ml 0,2 mg/ml 0,1 mg/ml
MBP-Waschpuffer	Tris/ HCl pH 7,4 NaCl EDTA DTT	20 mM 200 mM 1 mM 1 mM
MBP-Elutionspuffer	Tris/ HCl pH 7,4 NaCl EDTA DTT Maltose	20 mM 200 mM 1 mM 1 mM 10 mM
PEG/LiAc	TE/LiAc pH 7,5 EDTA Lithiumacetat pH 7,5 Polyethylenglykol 3350	10 mM 1 mM 100 mM 40%
PonceauS	PonceauS Eisessig Wasser bidest	1 g 50 ml ad 1L
Puffer 3 mit β -Glycerolphosphat	NaCl Tris/HCl, pH 7,5 NaF EDTA Igal CA-630 β -Glycerolphosphat	150 mM 50 mM 50 mM 5 mM 0,1 % 60 mM
Proteinase K	Proteinase K Tris/HCl pH 7,5 Calciumacetat	10 mg/ml 10 mM 1 mM

RNaseA	RNase A	10 mg/ml
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	15 mM
TBS-T	TBS (10 x)	100 ml
	Tween 20 (10 % (w/v))	10 ml
	Wasser	ad 1L
TE/ LiAc	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	Lithiumacetat, pH 7,5	100 mM
Transferpuffer	Glycin	2,9 g
	Tris-Base	5,8 g
	SDS (10 %)	3,7 ml
	Methanol	100 ml
	Wasser	ad 1 L
Trenngel 9%	Wasser	2,6 ml
	1,5 M Tris/Cl pH 8,8	1,5 ml
	Acrylamid-Mix	1,8 ml
	10 % SDS	60 µl
	10 % APS	36,5 µl
	TEMED	3,65 µl
Trenngel 12%	Wasser	1,98 ml
	1,5 M Tris/Cl pH 8,8	1,5 ml
	Acrylamid-Mix	3,4 ml
	10 % SDS	60 µl
	10 % APS	36,5 µl
	TEMED	3,65 µl

7.6 Programme und Software

Tab. 14: Programme und Software

Programm/ Software	Beschreibung
Axio Vision LE Rel. 4.8.1	Carl Zeiss Vision
BioEdit	Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad
BLAST	Blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Clone Manager 6.00	Sci Ed Central
Clustal Omega	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
Endnote V7	Thomson ISI ResearchSoft
ExPASy translate tool	Web.expasy.org/translate
FCS-Express Flow Cytometrie V. 4.07.0020	De Novo Software
GOR4: Secondary protein structure prediction	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secprd_gor4.pl
HHpred	Toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred
ImageJ 1.47k (Java 1.7.0_25, 32-bit)	W.S. Rasband, U.S. National Institutes of Health
Jalview	https://jalview.org Waterhouse <i>et al.</i> , 2009
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation
NLS-mapper	Nls-mapper.iab.keio.ac.jp/ Kosugi <i>et al.</i> , (2009) PNAS 106, 10171-10176
Odyssey V. 3.0.21	LI-COR Biosciences GmbH
<i>Saccharomyces genome database</i> (SGD)	www.yeastgenome.org

8 Literaturverzeichnis

- Alting-Mees, M. A. und J. M. Short (1989). "pBluescript II: gene mapping vectors." Nucleic Acids Res **17**(22): 9494.
- Amon, A. (2008). "A decade of Cdc14--a personal perspective." FEBS J **275**(23): 5774-5784.
- Arnold, L., S. Höckner und W. Seufert (2015). "Insights into the cellular mechanism of the yeast ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 from the analysis of in vivo degrons." Mol Biol Cell **26**(5): 843-858.
- Asakawa, K. und A. Toh-e (2002). "A defect of Kap104 alleviates the requirement of mitotic exit network gene functions in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **162**(4): 1545-1556.
- Azzam, R., S. L. Chen, W. Shou, A. S. Mah, G. Alexandru, K. Nasmyth, R. S. Annan, S. A. Carr und R. J. Deshaies (2004). "Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus." Science **305**(5683): 516-519.
- Bardin, A. J. und A. Amon (2001). "Men and sin: what's the difference?" Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 815-826.
- Bembek, J., J. Kang, C. Kurischko, B. Li, J. R. Raab, K. D. Belanger, F. C. Luca und H. Yu (2005). "Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cytokinesis in budding yeast." Cell Cycle **4**(7): 961-971.
- Berghammer, H. und B. Auer (1993). ""Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*." Biotechniques **14**(4): 524, 528.
- Bernardi, R., P. P. Scaglioni, S. Bergmann, H. F. Horn, K.H. Vousden und P. P. Pandolfi (2004). „PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus“. Nat Cell Biol **6**(7):665-72.
- Bloom, J., I. M. Cristea, A. L. Procko, V. Lubkov, B. T. Chait, M. Snyder und F. R. Cross (2011). "Global analysis of Cdc14 phosphatase reveals diverse roles in mitotic processes." J Biol Chem **286**(7): 5434-5445.
- Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues und A. I. Lamond (2007). "The multifunctional nucleolus." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 574-585.
- Breitkreutz, A., H. Choi, J. R. Sharom, L. Boucher, V. Neduva, B. Larsen, Z. Y. Lin, B. J. Breitkreutz, C. Stark, G. Liu, J. Ahn, D. Dewar-Darch, T. Regul, X. Tang, R. Almeida, Z. S. Qin, T. Pawson, A. C. Gingras, A. I. Nesvizhskii und M. Tyers (2010). "A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast." Science **328**(5981): 1043-1046.
- Bremmer, S. C., H. Hall, J. S. Martinez, C. L. Eissler, T. H. Hinrichsen, S. Rossie, L. L. Parker, M. C. Hall und H. Charbonneau (2012). "Cdc14 phosphatases preferentially dephosphorylate a subset of cyclin-dependent kinase (Cdk) sites containing phosphoserine." J Biol Chem **287**(3): 1662-1669.
- Buck, S.W., N. Maqani, M. Matecic, R. D. Hontz, R. D. Fine, M. Li, und J. S. Smith (2016). "RNA Polymerase I and Fob1 contributions to transcriptional silencing at the yeast rDNA locus“. Nucleic Acid Res. **44**(13):6173-84.
- Cabib, E., R. Roberts und B. Bowers (1982). "Synthesis of the yeast cell wall and its regulation." Annu Rev Biochem **51**: 763-793.

- Caydasi, A. K., Y. Micoogullari, B. Kurtulmus, S. Palani und G. Pereira (2014). "The 14-3-3 protein Bmh1 functions in the spindle position checkpoint by breaking Bfa1 asymmetry at yeast centrosomes." Mol Biol Cell **25**(14): 2143-2151.
- Caydasi, A. K., A. Khmelinskii, R. Duenas-Sanchez, B. Kurtulmus, M. Knop und G. Pereira (2017). "Temporal and compartment-specific signals coordinate mitotic exit with spindle position." Nat Commun. **8**:14129.
- Chen, K. C., A. Csikasz-Nagy, B. Gyorffy, J. Val, B. Novak und J. J. Tyson (2000). "Kinetic Analysis of a Molecular Model of the Budding Yeast Cell Cycle." Mol Biol Cell **11**(1): 369-391.
- Chen, C. T., M. P. Peli-Gulli, V. Simanis und D. McCollum (2006). "S. pombe FEAR protein orthologs are not required for release of Clp1/Flp1 phosphatase from the nucleolus during mitosis." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4462-4466.
- Chook, Y. M. und K. E. Suel (2011). "Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition." Biochim Biophys Acta **1813**(9): 1593-1606.
- Chou, P. Y. und G. D. Fasman (1974). "Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins." Biochemistry **13**(2): 211-222.
- Chou, P. Y. und G. D. Fasman (1974). "Prediction of protein conformation." Biochemistry **13**(2): 222-245.
- Clemente-Blanco, A., M. Mayan-Santos, D. A. Schneider, F. Machin, A. Jarmuz, H. Tschochner und L. Aragon (2009). "Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase." Nature **458**(7235): 219-222.
- Cockell, M. M. und S. M. Gasser (1999). "The nucleolus: nucleolar space for RENT." Curr Biol **9**(15): R575-576.
- Cohen-Fix, O. und D. Koshland (1997). "The metaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis." Curr Opin Cell Biol **9**(6): 800-806.
- D'Amours, D. und A. Amon (2004). "At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network." Genes Dev **18**(21): 2581-2595.
- Eissler, C. L., G. Mazón, B. L. Powers, S. N. Savinov, S. S. Lorraine und M. C. Hall (2014). "The Cdk/Cdc14 module controls activation of the Yen1 Holliday junction resolvase to promote genome stability". Mol Cell. **54** (1):80-93.
- Enserink, J. M. und R. D. Kolodner (2010). "An overview of Cdk1-controlled targets and processes." Cell Div **5**: 11.
- Garcia, S. N. und L. Pillus (1999). "Net results of nucleolar dynamics." Cell **97**(7): 825-828.
- Geil, C., M. Schwab und W. Seufert (2008). "A nucleolus-localized activator of Cdc14 phosphatase supports rDNA segregation in yeast mitosis." Curr Biol **18**(13): 1001-1005.
- Geymonat, M., A. Spanos, G. de Bettignies und S. G. Sedgwick (2009): "Lte1 contributes to Bfa1 localization rather than stimulating nucleotide exchange by Tem1." J Cell Biol **187**(4):497-511.
- Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O'Shea und J. S. Weissman (2003). "Global analysis of protein expression in yeast." Nature **425**(6959): 737-741.

- Gietz, R. D. und R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Godfrey, M., T. Kuilman und F. Uhlmann (2015): "Nur1 Dephosphorylation Confers Positive Feedback to Mitotic Exit Phosphatase Activation in Budding Yeast." *PLoS Genet* **11**(1):e1004907.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin und S. G. Oliver (1996). "Life with 6000 genes." *Science* **274**(5287): 546, 563-547.
- Granot, D. und M. Snyder (1991). "Segregation of the nucleolus during mitosis in budding and fission yeast." *Cell Motil Cytoskeleton* **20**(1): 47-54.
- Gray, C. H. und D. Barford (2003). "Getting in the ring: proline-directed substrate specificity in the cell cycle proteins Cdc14 and CDK2-cyclinA3." *Cell Cycle* **2**(6): 500-502.
- Gray, C. H., V. M. Good, N. K. Tonks und D. Barford (2003). "The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase." *EMBO J* **22**(14): 3524-3535.
- Hannig, K. (2015). „Net1 - ein modular aufgebautes und multifunktionales Protein im Nukleolus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“. Dissertation, Universität Regensburg.
- Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti und M. Culotti (1973). "Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants." *Genetics* **74**(2): 267-286.
- Herskowitz, I. (1995). "MAP kinase pathways in yeast: for mating and more." *Cell* **80**(2): 187-197.
- Höckner, S., L. Neumann-Arnold und W. Seufert (2016). "Dual control by Cdk1 phosphorylation of the budding yeast APC/C ubiquitin ligase activator Cdh1." *Mol Biol Cell* **27**(14): 2198-2212.
- Holt, L. J., B. B. Tuch, J. Villen, A. D. Johnson, S. P. Gygi und D. O. Morgan (2009). "Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution." *Science* **325**(5948): 1682-1686.
- Hombauer, H., D. Weismann, I. Mudrak, C. Stanzel, T. Fellner, D. H. Lackner und E. Ogris (2007). "Generation of active protein phosphatase 2A is coupled to holoenzyme assembly." *PLoS Biol* **5**(6):e155.
- Huang, J. and D. Moazed (2003). "Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing." *Genes Dev* **17**(17): 2162-76.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." *Cell* **80**(2): 225-236.
- Huxley, C., E. D. Green und I. Dunham (1990). "Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR." *Trends Genet* **6**(8): 236.
- Janke, C., M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel und M. Knop (2004). "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." *Yeast* **21**(11): 947-962.
- Jaquenoud, M., F. van Drogen und M. Peter (2002). "Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1)." *EMBO J* **21**(23): 6515-6526.

- Jin, F., H. Liu, F. Liang, R. Rizkallah, M. M. Hurt und Y. Wang (2008). "Temporal control of the dephosphorylation of Cdk substrates by mitotic exit pathways in budding yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16177-16182.
- Jin, Q. W., S. Ray, S. H. Choi und D. McCollum (2007). "The nucleolar Net1/Cfi1-related protein Dnt1 antagonizes the septation initiation network in fission yeast." Mol Biol Cell **18**(8): 2924-2934.
- Kay, B. K., M. P. Williamson und M. Sudol (2000). "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains." FASEB J **14**(2): 231-241.
- Khmelniskii, A., C. Lawrence, J. Roostalu und E. Schiebel (2007). "Cdc14-regulated midzone assembly controls anaphase B." J Cell Biol **177**(6): 981-993.
- Kobayashi, J., H. Hirano und Y. Matsuura (2015). "Crystal structure of the karyopherin Kap121p bound to the extreme C-terminus of the protein phosphatase Cdc14p." Biochem Biophys Res Commun **463**(3): 309-314.
- Kobayashi, T. (2011). "How does genome instability affect lifespan?: roles of rDNA and telomeres." Genes Cells **16**(6): 617-624.
- Kosugi, S., M. Hasebe, M. Tomita und H. Yanagawa (2009). "Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(25): 10171-10176.
- Kuilman, T., A. Maiolica, M. Godfrey, N. Scheidel, R. Aebersold und F. Uhlmann (2015). "Identification of Cdk targets that control cytokinesis." EMBO J. **34**(1):81-96.
- Kulak, N. A., G. Pichler, I. Paron, N. Nagaraj und M. Mann (2014). "Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells." Nat Methods **11**(3): 319-324.
- Lam, Y. W. und L. Trinkle-Mulcahy (2015): „New insights into nucleolar structure and function.“ E Prime Rep. **7**:48.
- Li, Y., F. R. Cross und B. T. Chait (2014). "Method for identifying phosphorylated substrates of specific cyclin/cyclin-dependent kinase complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(31): 11323-11328.
- Leger-Silvestre, I., S. Trumtel, J. Noaillic-Depeyre und N. Gas (1999). "Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Chromosoma **108**(2): 103-113.
- Lew, D. J. und D. J. Burke (2003): „The Spindle Assembly and Spindle Position Checkpoints“. Annu Rev. **37**:251-82.
- Lew, D. J., T. Weinert und J. R. Pringle (1997). „Cell Cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*“. Yeast **3**, 607-695.
- Liang, F., F. Jin, H. Liu und Y. Wang (2009). "The molecular function of the yeast polo-like kinase Cdc5 in Cdc14 release during early anaphase." Mol Biol Cell **20**(16): 3671-3679.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen und J. R. Pringle (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **14**(10): 953-961.

- Luo, S., N. B. Wehr und R. L. Levine (2006). "Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green." Anal Biochem **350**(2): 233-238.
- Mailand, N., C. Lukas, B. K. Kaiser, P. K. Jackson, J. Bartek und J. Lukas (2002). „Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation.“ Nature Cell Biol **4**: 318-322.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, P. F. Cherukuri, C. DeWeese-Scott, L. Y. Geer, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. Zhang and S. H. Bryant (2005). "CDD: a Conserved Domain Database for protein classification." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D192-196.
- Machin, F., O. Quevedo, C. Ramos-Perez and J. Garcia-Luis (2016): "Cdc14 phosphatase: warning, no delay allowed for chromosome segregation!" Curr Genet **62**(1): 7-13.
- Mekhail, K. und D. Moazed (2010). "The nuclear envelope in genome organization, expression and stability." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(5): 317-328.
- Miller, D. P., H. Hall, R. Chaparian, M. Mara, A. Mueller, M. C. Hall und K. B. Shannon (2015): "Dephosphorylation of Iqg1 by Cdc14 regulates cytokinesis in budding yeast.“ Mol Biol Cell **26**(16):2913-26
- Mirchenko, L. und F. Uhlmann (2010): "Sli15(INCENP) Dephosphorylation Prevents Mitotic Checkpoint Reengagement Due to Loss of Tension at Anaphase Onset.“. Curr Biol **20**(15):1396-401.
- Mocciaro, A. und E. Schiebel (2010). "Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions?" J Cell Sci **123**(Pt 17): 2867-2876.
- Mohl, D. A., M. J. Huddleston, T. S. Collingwood, R. S. Annan und R. J. Deshaies (2009). "Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis." J Cell Biol **184**(4): 527-539.
- Moll, T., G. Tebb, U. Surana, H. Robitsch und K. Nasmyth (1991). "The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5." Cell **66**(4): 743-758.
- Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." Nature **374**(6518): 131-134.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Musacchio, A. und K. G. Hardwick (2002): „The Spindle Checkpoint: Structural Insights into Dynamic Signalling.“ Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10):731-41.
- Mumberg, D., R. Muller und M. Funk (1994). "Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression." Nucleic Acids Res **22**(25): 5767-5768.
- Neutzner, A. (2002). „Termination der Mitose: Die Rolle der Phosphatase Cdc14 beim M/G1-Übergang in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 21-32.

- Patterson, K. I., T. Brummer, P. M. O'Brien and R. J. Daly (2009). "Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets." *Biochem J* **418**(3): 475-489.
- Pereira, G., C. Manson, J. Grindlay und E. Schiebel (2002). "Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p." *J Cell Biol* **157**(3): 367-379.
- Pereira, G. und E. Schiebel (2003). "Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14." *Science* **302**(5653): 2120-2124.
- Pickl, A. (2009). „Studien zur Funktion und Regulation der Cdc14 Phosphatase im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.“ Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Pielmeier, F. (2016). „Charakterisierung der Interaktion der Proteine Net1 und Cdc14 der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.“ Bachelorarbeit, Universität Regensburg.
- Queralt, E., C. Lehane, B. Novak und F. Uhlmann (2006). "Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast." *Cell* **125**(4): 719-732.
- Rahal, R. und A. Amon (2008). "The Polo-like kinase Cdc5 interacts with FEAR network components and Cdc14." *Cell Cycle* **7**(20): 3262-3272.
- Rocuzzo, M., C. Visintin, F. Tili and R. Visintin (2015). "FEAR-mediated activation of Cdc14 is the limiting step for spindle elongation and anaphase progression." *Nat Cell Biol* **17**(3): 251-261.
- Rock, J. M. and A. Amon (2009). "The FEAR network." *Curr Biol* **19**(23): R1063-1068.
- Rodriguez-Rodriguez, J. A., Y. Moyano, S. Játiva und E. Queralt (2016): „Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1.“ *Cell Rep* **15**(9):2050-62.
- Ross, K. E. und O. Cohen-Fix (2004). "A role for the FEAR pathway in nuclear positioning during anaphase." *Dev Cell* **6**(5): 729-735.
- Rosso, L., A. C. Marques, M. Weier, N. Lambert, M. A. Lambot, P. Vanderhaeghen and H. Kaessmann (2008). "Birth and rapid subcellular adaptation of a hominoid-specific CDC14 protein." *PLoS Biol* **6**(6): e140.
- Ryu, H.Y. und S. Ahn (2014): „Yeast Histone H3 lysine 4 demethylase Jhd2 regulates mitotic ribosomal DNA condensation.“ *BMC Biol* **12**:75.
- San-Segundo, P. A. und G. S. Roeder (1999). "Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control." *Cell* **97**(3): 313-324.
- Schwab, M., A. S. Lutum und W. Seufert (1997). "Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis." *Cell* **90**(4): 683-693.
- Sheff, M. A. und K. S. Thorn (2004). "Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **21**(8): 661-670.
- Shirayama, M., A. Toth, M. Galova und K. Nasmyth (1999). "APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5." *Nature* **402**(6758): 203-207.
- Shou, W., R. Azzam, S. L. Chen, M. J. Huddleston, C. Baskerville, H. Charbonneau, R. S. Annan, S. A. Carr und R. J. Deshaies (2002). "Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex." *BMC Mol Biol* **3**: 3.

- Shou, W., J. H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z. W. Chen, J. Jang, A. Shevchenko, H. Charbonneau und R. J. Deshaies (1999). "Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex." *Cell* **97**(2): 233-244.
- Sikorski, R. S. und P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **122**(1): 19-27.
- Stegmeier, F. und A. Amon (2004). "Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation." *Annu Rev Genet* **38**: 203-232.
- Stegmeier, F., J. Huang, R. Rahal, J. Zmolik, D. Moazed and A. Amon (2004). "The replication fork block protein Fob1 functions as a negative regulator of the FEAR network." *Curr Biol* **14**(6): 467-480.
- Stoker, A. W. (2005). "Protein tyrosine phosphatases and signalling." *J Endocrinol* **185**(1): 19-33.
- Straight, A. F., W. F. Marshall, J. W. Sedat und A. W. Murray (1997). "Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate." *Science* **277**(5325): 574-578.
- Straight, A. F., W. Shou, G. J. Dowd, C. W. Turck, R. J. Deshaies, A. D. Johnson und D. Moazed (1999). "Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity." *Cell* **97**(2): 245-256.
- Sullivan, M., T. Higuchi, V. L. Katis und F. Uhlmann (2004). "Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase." *Cell* **117**(4): 471-482.
- Suzuki, K., K. Sako, K. Akiyama, M. Isoda, C. Senoo, N. Nakajo und N. Sagata (2015). "Identification of non-Ser/Thr-Pro consensus motifs for Cdk1 and their roles in mitotic regulation of C2H2 zinc finger proteins and Ect2." *Sci Rep* **5**: 7929.
- Tanaka, T. U., M. J. Stark und K. Tanaka (2005). "Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(12): 929-942.
- Taylor, G. S., Y. Liu, C. Baskerville und H. Charbonneau (1997). "The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression." *J Biol Chem* **272**(38): 24054-24063.
- Terrak, M., F. Kerff, K. Langsetmo, T. Tao und R. Dominguez (2004). "Structural basis of protein phosphatase 1 regulation." *Nature* **429**(6993): 780-784.
- Traverso, E. E., C. Baskerville, Y. Liu, W. Shou, P. James, R. J. Deshaies und H. Charbonneau (2001). "Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast." *J Biol Chem* **276**(24): 21924-21931.
- Tschochner, H. und E. Hurt (2003). "Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm." *Trends Cell Biol* **13**(5): 255-263.
- Uhlmann, F., C. Bouchoux und S. Lopez-Aviles (2011). "A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**(1584): 3572-3583.
- van Heusden, G. P. und H. Y. Steensma (2006). "Yeast 14-3-3 proteins." *Yeast* **23**(3): 159-171.
- Visintin, R. und A. Amon (2000). "The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks." *Curr Opin Cell Biol* **12**(6): 752.

- Visintin, R., K. Craig, E. S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers und A. Amon (1998). "The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation." *Mol Cell* **2**(6): 709-718.
- Visintin, R., E. S. Hwang und A. Amon (1999). "Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus." *Nature* **398**(6730): 818-823.
- Visintin, R., S. Prinz und A. Amon (1997). "CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis." *Science* **278**(5337): 460-463.
- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, D. M. Martin, M. Clamp und G. J. Barton (2009). "Jalview Version 2-- a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." *Bioinformatics* **25**(9): 1189-1191.
- Weber, J. D., L. J. Taylor, M. F. Roussel, C. J. Sherr und D. Bar-Sagi (1999). "Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53." *Nat Cell Biol* **1**(1): 20-26.
- Weiss, E. L. (2012): „Mitotic Exit and Separation of Mother and Daughter Cells.“ *Genetics* **192**(4):1165-202.
- Winey, M. and E. T. O'Toole (2001). "The spindle cycle in budding yeast." *Nat Cell Biol* **3**(1): E23-27.
- Woodbury, E. L. und D. O. Morgan (2007): „Cdk and APC activities limit the spindle-stabilizing function of Fin1 to anaphase“. *Nat Cell Biol* **9**(1):106-12.
- Wurzenberger, C. und D. W. Gerlich (2011): „Phosphatases: Providing safe passage through mitotic exit.“ *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**(8):469-82.
- Yang, C. H., E. J. Lambie, J. Hardin, J. Craft und M. Snyder (1989). "Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body." *Chromosoma* **98**(2): 123-128.
- Yellman, C. M. und G. S. Roeder (2015). "Cdc14 Early Anaphase Release, FEAR, Is Limited to the Nucleus and Dispensable for Efficient Mitotic Exit." *PLoS One* **10**(6): e0128604.
- Yoshida, S., K. Asakawa und A. Toh-e (2002). "Mitotic exit network controls the localization of Cdc14 to the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Biol* **12**(11): 944-950.
- Zhang, Y., W. Wang, J. Chen, K. Zhang, F. Gao, B. Gao, S. Zhang, M. Dong, F. Besenbacher, W. Gong, M. Zhang, F. Sun und W. Feng (2013). "Structural insights into the intrinsic self-assembly of Par-3 N-terminal domain." *Structure* **21**(6):997-1006.

9 Anhang

9.1 Ergänzungen zu den Ergebnissen

9.1.1 Proteinwechselwirkung N-terminaler Fragmente von Net1 mit Cdc14

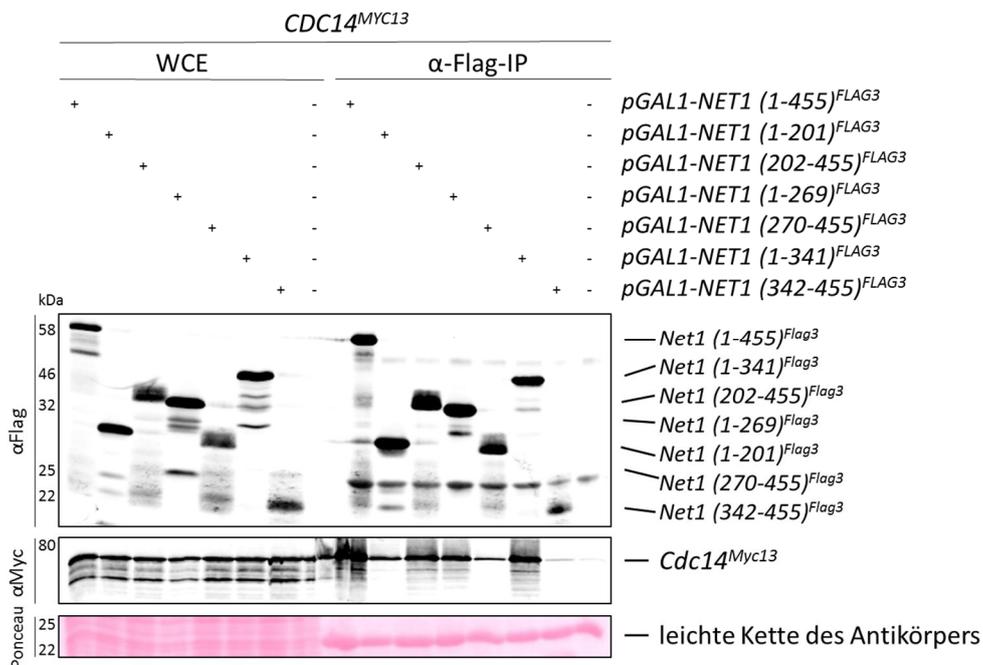


Abb. 65: Reproduktion der CoIP mit N-terminalen Net1-Fragmenten mit Cdc14. Die N-terminalen Net1-Derivate Net1(1-455), Net1(1-201), Net1(202-455), Net1(1-269), Net1(270-455), Net1(1-341), Net1(342-455) wurden auf ihre Proteinwechselwirkung mit Cdc14 in einer CoIP untersucht. Die in XYR2% exponentiell wachsenden Hefestämme wurden zur Expression der *NET1*-Konstrukte für zwei Stunden (25°C) mit 2%Galaktose induziert. Dazu wurden in Testexpressionen ausgewählte Stämme mit den Genotypen *leu2::pGAL1-NET1(1-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-Myc13-kanMX6* (W14486), *leu2::pGAL1-NET1(1-201)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14487), *leu2::pGAL1-NET1(202-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14488), *leu2::pGAL1-NET1(1-269)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14489), *leu2::pGAL1-NET1(270-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14490), *leu2::pGAL1-NET1(1-341)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14491), *leu2::pGAL1-NET1(342-455)-FLAG3-tCYC1-LEU2 CDC14-MYC13-kanMX6* (W14491) und als Negativkontrolle der Stamm W11398 mit *CDC14-MYC13-kanMX6* verwendet. Die Präzipitation erfolgte mittels α-Flag gekoppelteten Beads und deren Nachweis mit dem α-Flag-Antikörper M2. Cdc14-Myc13 wurde mit dem α-Myc-Antikörper A14 nachgewiesen. Zusätzlich zu den aufgereinigten Proben wurden die Gesamtlysate (WCE) mit der Negativkontrolle Cdc14-Myc13 auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Als Ladekontrolle ist die mittels Ponceau gefärbte, leichte Kette des α-Flag-Antikörpers gezeigt. Errechnete Proteingrößen: Net1(1-455)-Flag3: 54 kDa, Net1(1-201)-Flag3: 27 kDa, Net1(202-455)-Flag3: 32 kDa, Net1(1-269)-Flag3: 34 kDa, Net1(270-455)-Flag3: 25 kDa, Net1(1-341)-Flag3: 42 kDa, Net1(342-455)-Flag3: 17 kDa, Cdc14-Myc13: 78 kDa.

9.1.2 Western Blot-Analyse als Ergänzung zu Cdc14(1-374)-HA3

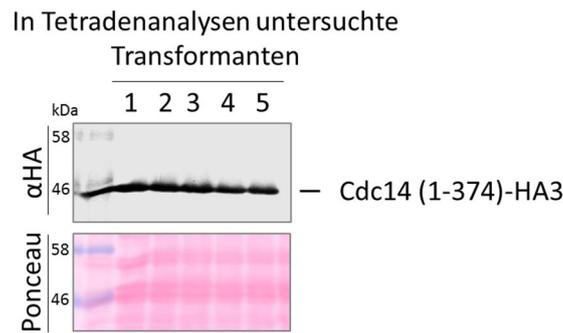


Abb. 66: Western Blot-Analyse unterschiedlicher Klone mit Cdc14(1-374)-HA3. Um mehrmals zu überprüfen, ob die NTD von Cdc14(1-374) mit intakter katalytischer Domäne und HA3-Fusion (nach Longtine *et al.*, 1998) ausreichend für die biologische Funktion von Cdc14 ist, wurden Tetradenanalysen mit allen fünf gezeigten Transformanten durchgeführt. Der für die Komplementationsstudien durch Co-Expression der NTD und CTD verwendete Transformant, ist Klon Nr. 1. Der Nachweis von Cdc14(1-374)-HA3 erfolgte mit dem α -HA-Antikörper 12CA5. Errechnete Proteingröße: Cdc14(1-374)-HA3: 49 kDa. Als Ladekontrolle die unspezifische Färbung des Gesamtproteins mittels Ponceau.

9.1.3 Komplementationsstudien mit Cdc14-Flag3-Derivaten

9.1.3.1 Expression von CDC14 mit internen Deletionen der CTD und Flag3-Fusion

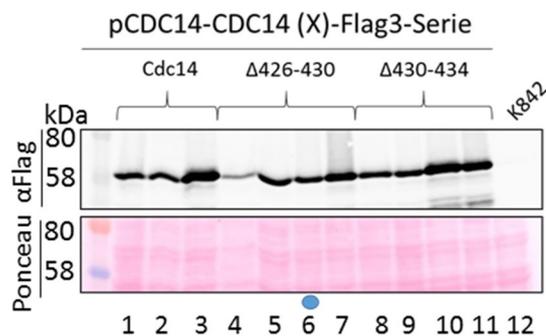


Abb. 67: Western Blot-Analyse unterschiedlicher Transformanten zum Test auf die Komplementation von Δ cdc14. Der Komplementationsausgangsstamm W14087 (*CDC14/ delta cdc14-kanMX6*) wurde mit den Plasmiden pWS4779 (*pCDC14-CDC14-FLAG3-URA3*), pWS4777 (*pCDC14-CDC14(Δ 426-430)-FLAG3-URA3*) und pWS4778 (*pCDC14-CDC14(Δ 430-434)-FLAG3-URA3*) transformiert. Als Negativkontrolle wurde der diploide Hefewildtyp-Stamm K842 mitgeführt. Der blaue Punkt markiert das Proteinlevel des Stammes von dem ein haploider Nachkomme für die weiteren Analysen dieses Bereiches verwendet wurde (Spur 6). Der Nachweis erfolgte mit dem α -Flag-Antikörper M2. Errechnete Proteingrößen: Cdc14-Flag3: 65 kDa, Cdc14(Δ 426-430)-Flag3: 64 kDa, Cdc14(Δ 430-434)-Flag3: 64 kDa.

9.1.3.2 Komplementationsanalysen mit Flag3-Proteinfusionen

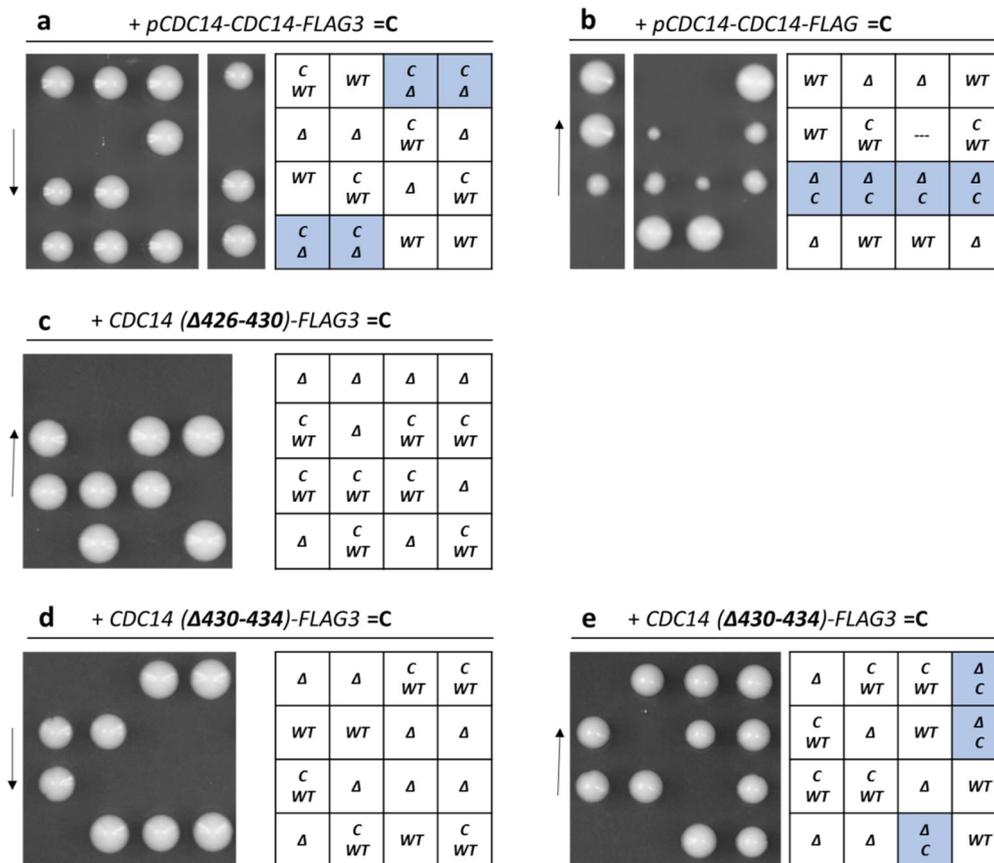


Abb. 68: Komplementationsanalysen der Cdc14-Flag3-Komplementationskonstrukte. Der Komplementationsausgangsstamm W14087 (*CDC14/ delta cdc14-kanMX6*) wurde mit den Plasmiden pWS4779 (*pCDC14-CDC14-FLAG3-URA3*), pWS4777 (*pCDC14-CDC14(Δ426-430)-FLAG3-URA3*) und pWS4778 (*pCDC14-CDC14(Δ430-434)-FLAG3-URA3*) transformiert. **a**, pWS4779: niedrige Expression (Abb. 67, Spur 2), **b**, pWS4779: hohe Expression (Abb. 67, Spur 3). **c**, pWS4777: hohe Expression (Abb. 67, Spur 7), **d**, pWS4778: niedrige Expression (Abb. 67, Spur 8) **e**, pWS4778: hohe Expression (Abb. 67, Spur 11).

9.1.4 Proteinexpression von GFP-CDC14(342-551)

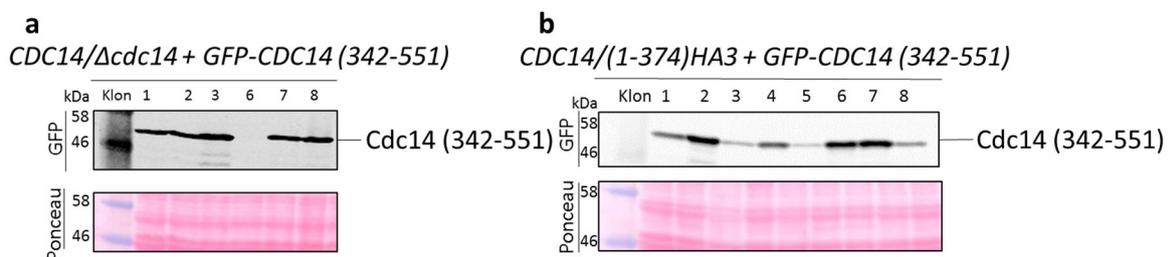


Abb. 69: Western Blot-Analyse zur Wahl geeigneter Transformanten. Ergänzende Proteinmengenlevel von pWS4289, pTEF2-GFP-CDC14(342-551)-URA3 mit dem der Komplementationsstamm W14087 (*CDC14/ delta-cdc14-kanMX6*) und W14584 (*CDC14/ CDC14(1-374)-HA3-HIS3MX6*) transformiert wurde. Ergänzung zu **Abb. 33: a**, Für *CDC14/Δcdc14* mit *GFP-CDC14(342-551)*: Klon (K) 1, niedrige Expression, K3 starke Expression. Ergänzung zu **Abb. 34: b**, Für *CDC14/(1-374)HA3* mit *GFP-CDC14(342-551)*: K5 niedrige Expression, K7 starke Expression. Nach erfolgter Aufarbeitung zu Proteinlysaten wurden jeweils acht unterschiedliche Transformanten auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen und deren Expression mit dem α-GFP-Antikörper nachgewiesen. Errechnete Proteingröße: GFP-Cdc14(342-551): 50 kDa.

9.1.5 Selbsteraktion von Cdc14 im N-Terminus

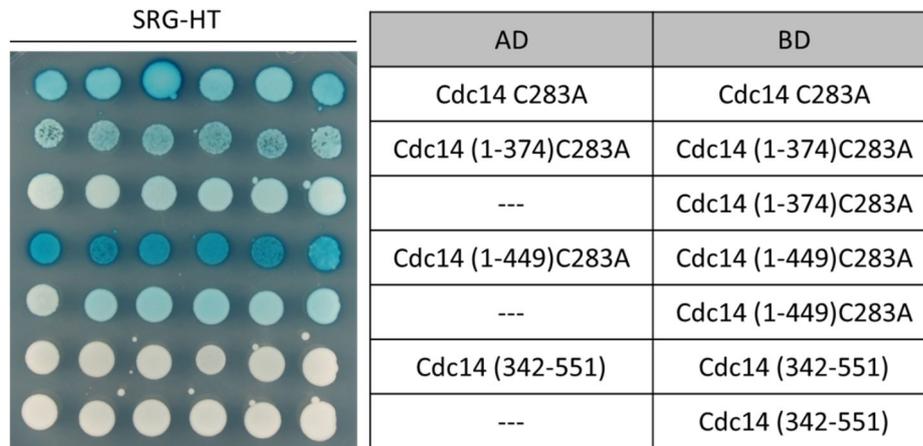


Abb. 70: Selbstinteraktion der NTD von Cdc14. Dargestellt ist die Proteinwechselwirkung von N-terminalen Fragmenten von Cdc14 mit sich selbst im durch einen β -Galaktosidase-Test im Y2H. Dazu wurde die Bindung zwischen dem katalytisch inaktiven Cdc14(C283A), Cdc14(1-374) C283A, Cdc14(1-449) C283A und Cdc14(342-551) jeweils mit sich selbst analysiert. Nach einer Co-Transformation des Reporterstammes W276 (*ura3::URA3-lexA-op-lacZ leu2::pLEU2-lexA-op*) mit jeweils einem Protein fusioniert mit der Aktivierungsdomäne (AD, pJG4-5-Derivate) und einem Protein fusioniert an die Bindedomäne (BD, pEG202-Derivate), bzw. mit pJG4-5-Leervektor als Kontrolle, wurden pro Transformation sechs Kolonien auf eine Selektivplatte mit SRG-HT aufgebracht. Für die Co-Transformation wurden folgende Plasmide verwendet: pWS2753 (pJG4-5-CDC14 (C283A)), pWS2752 (pEG202-CDC14(C283A)) als Positivkontrolle, pWS4172 (pJG4-5-CDC14(1-374 C283A)), pWS4173 (pEG202-CDC14(1-374 C283A)), pWS4242 (pJG4-5-CDC14(1-449 C283A)), pWS4243 (pEG202-CDC14(1-449 C283A)), pWS4245 (pJG4-5-CDC14(342-551)), pWS424 (pEG202-CDC14(342-551)), pJG4-5 Leervektor. Für den Galaktosidasetest wurden die gewachsenen Kolonien mit X-Gal enthaltendem Agar überschichtet und bei 30°C inkubiert.

9.1.6 Proteinwechselwirkungen zwischen Bmh1 und Cdc14

9.1.6.1 Co-Immünpräzipitation von Bmh1 mit Cdc14 und Cdc14(342-551)

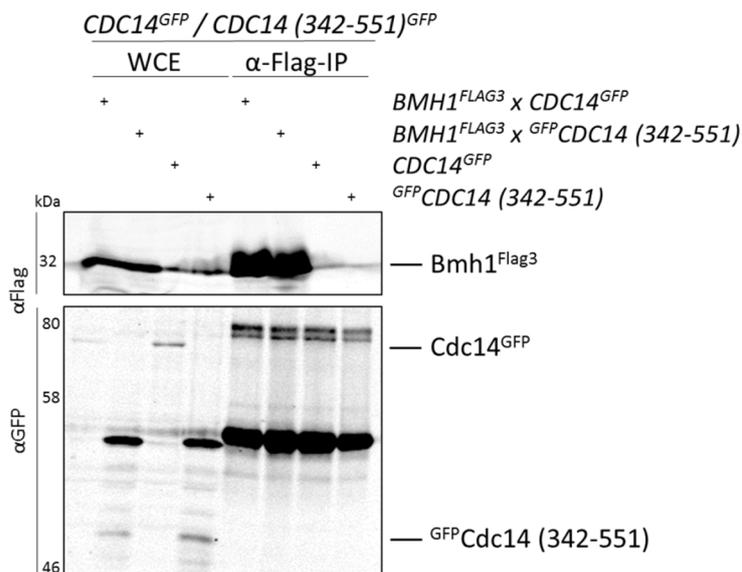


Abb. 71: Proteininteraktion von Bmh1 mit der CTD von Cdc14. Die Proteinwechselwirkung von Bmh1 mit Cdc14 und Cdc14(342-551) wurde *in vivo* in einer CoIP analysiert. Dazu wurde W14124 (*BMH1-FLAG3-KanMX6*) jeweils mit W13174 (*CDC14-GFP-HIS3MX6*) und W13544 (*pTEF2-GFP Cdc14(342-551)-URA3 trp1-Delta1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) mit einander verkreuzt und als diploide Stämme in das Experiment eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten W13174 und W13544 als haploide Ausgangsstämme. Zusätzlich zu den aufgereinigten Proben wurden die Gesamtlysate (WCE) auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Präzipitation erfolgte mittels α -Flag gekoppelten Beads und deren Nachweis mit dem α -Flag-Antikörper M2. Die Cdc14-Derivate wurden mit dem α -GFP-Antikörper nachgewiesen. Errechnete Proteingrößen: Bmh1-Flag3: 34 kDa, Cdc14-GFP: 89 kDa, GFP-Cdc14(342-551): 50 kDa.

9.1.6.2 Proteinbindung von Bmh1 mit Cdc14 im Y2H

SSG-HT	AD	BD
	---	Cdc14 C283A
	Bmh1	Cdc14 C283A
	---	Cdc14 (1-374)C283A
	Bmh1	Cdc14 (1-374)C283A
	---	Cdc14 (342-551)
	Bmh1	Cdc14 (342-551)
	Cdc14 C283A	Cdc14 C283A

Abb. 72: Interaktionsstudie mit Bmh1 und Cdc14. Dargestellt ist die Proteinbindung von Bmh1 mit Cdc14, Cdc14(1-374) und Cdc14(342-551) anhand des β -Galaktosidase-Tests im Y2H. Dafür wurde der Reporterstamm W276 (*ura3::URA3-lexA-op-lacZ leu2::pLEU2-lexA-op*) mit jeweils einem Protein fusioniert mit der Aktivierungsdomäne (AD, *pJG4-5*-Derivate) und einem Protein fusioniert an die Bindedomäne (BD, *pEG202*-Derivate), bzw. mit *pJG4-5*-Leervektor als Kontrolle transformiert. Für das Experiment wurden katalytisch inaktive Derivate von Cdc14 verwendet. Pro Transformation wurden sechs Kolonien auf eine Selektivplatte mit SSG-HT aufgebracht. Für die Transformation wurden die folgenden Plasmide verwendet: *pWS2752* (*pEG202-CDC14(C283A)*), *pWS4605* (*pJG4-5-BMH1*), *pWS4173* (*pEG202-CDC14(1-374 C283A)*), *pWS424* (*pEG202-CDC14(342-551)*). Mit dem *pJG4-5* als Negativkontrolle, *pWS2753* (*pJG4-5-CDC14(C283A)*) mit *pWS2752* als Positivkontrolle. Für den Galaktosidasetest wurden die gewachsenen Kolonien mit X-Gal enthaltendem Agar überschichtet und bei 30°C inkubiert.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zellzyklus der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .	7
Abb. 2: Klassifikation der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Superfamilie mit anschließender Unterteilung.	11
Abb. 3: Bändermodell der katalytischen Domäne des humanen CDC14B.	12
Abb. 4: Sequenzalignment von Cdc14 aus <i>S. cerevisiae</i> (Sc) mit hCDC14B.	13
Abb. 5: Schematischer Aufbau von Cdc14 in <i>S. cerevisiae</i> .	13
Abb. 6: Schematischer Aufbau der rDNA-Region auf Chromosom XII in <i>S. cerevisiae</i> .	14
Abb. 7: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten der Netzwerke FEAR und MEN.	18
Abb. 8: Lokalisation von Cdc14 in diploiden und haploiden Hefezellen.	26
Abb. 9: Lokalisation von Net1 und Net1(234-1189) mit N-terminalen GFP-Fusionen.	27
Abb. 10: Die Lokalisation von Cdc14 ist abhängig von Net1.	29
Abb. 11: Lokalisation von Cdc14 am SPK in <i>NET1(234-1189)</i> -Zellen.	30
Abb. 12: Schematische Darstellung der erstellten Net1-Fragmente zur Analyse auf die Interaktion mit Cdc14.	31
Abb. 13: Proteinbindung zwischen Cdc14 und N-terminalen Net1-Derivaten im Y2H.	33
Abb. 14: Proteininteraktion N-terminaler Net1-Fragmente mit Cdc14.	34
Abb. 15: Wachstumstest N-terminaler Net1-Fragmente unter der Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors.	36
Abb. 16: Interaktion N-terminaler <i>pMET25-NET1</i> -Fragmente mit Cdc14.	37
Abb. 17: Inhibition von Cdc14 durch N-terminale Net1-Fragmente.	38
Abb. 18: Schematische Darstellung der C-terminalen Verkürzungen von Cdc14.	40
Abb. 19: Western Blot-Analyse von C-terminal verkürztem Cdc14.	41
Abb. 20: Einfluss der C-terminalen NLS-Sequenz auf die Lokalisation in diploiden und haploiden Hefezellen.	42
Abb. 21: Lokalisation der C-terminal verkürzten Cdc14-Derivate in diploiden Hefezellen.	44
Abb. 22: Lokalisation von Cdc14(1-449) und Cdc14(1-437) in unterschiedlichen Zellzyklusstadien.	45
Abb. 23: Lokalisation von Cdc14(1-434)-GFP im Zellzyklus.	46
Abb. 24: Tetradenanalyse der C-terminalen Verkürzungen von Cdc14 mit GFP-Fusionen.	48
Abb. 25: Wachstumstest der haploid lebensfähigen C-terminalen Verkürzungen von Cdc14.	49
Abb. 26: Bedeutung der CTD von Cdc14 für den Kerntransport.	50
Abb. 27: Delokalisation von GFP-Cdc14(342-506).	51
Abb. 28: Tetradenanalysen von <i>CDC14/ CDC14(1-434)</i> und <i>CDC14/ CDC14(1-431)</i> .	52
Abb. 29: Sequenzanalyse von Cdc14-Orthologen in Hefen.	52
Abb. 30: Schematischer Aufbau von Cdc14(1-551) und Cdc14(1-374).	53

Abb. 31: Die Deletion der CTD ist letal.....	54
Abb. 32: Tetradenanalyse von <i>CDC14/CDC14(1-374)-HA3</i>	55
Abb. 33: Keine Komplementation nach Co-Expression der CTD von Cdc14 mit <i>Δcdc14</i>	55
Abb. 34: Wiederherstellung der biologischen Funktion von Cdc14 nach Co-Expression von NTD und CTD.....	56
Abb. 35: Die Deletion von <i>CDC14</i> ist letal.....	57
Abb. 36: Proteinexpression der Stämme für die Komplementationsanalysen zur Charakterisierung des essentiellen Bereiches in der CTD von Cdc14.....	58
Abb. 37: Komplementation von <i>Δcdc14</i> mit Cdc14-GFP.....	59
Abb. 38: Durchflusszytometrische Analyse der zur Komplementationsanalyse verwendeten Stämme mit Punktmutationen in der CTD.....	60
Abb. 39: Komplementationsstudien mit Cdc14(TS 428/429 AA) und Cdc14(ASAA).....	61
Abb. 40: Komplementationsstudien mit Deletionen in der TR-Sequenz von Cdc14.....	63
Abb. 41: Wachstumstest der haploiden Hefestämme mit veränderter TR-Sequenz von Cdc14.....	66
Abb. 42: Durchflusszytometrische Analyse der <i>Δcdc14</i> komplementierenden <i>CDC14</i> -Konstrukte.....	67
Abb. 43: Lokalisation von Cdc14(Δ426-430) im Zellzyklus.....	69
Abb. 44: Co-Lokalisation von Cdc14(ASAA) mit dem SPK der Tochterzelle.....	70
Abb. 45: Verstärkte Lokalisation von Cdc14(ASAA) am SPK.....	71
Abb. 46: Komplementation von <i>Δcdc14</i> nach Expression von <i>CDC14(Δ426-430)-FLAG3</i>	72
Abb. 47: Beeinträchtigung der Spindelelongation in Zellen mit Cdc14(Δ426-430).....	73
Abb. 48: Graphische und statistische Auswertung der Spindelelongation in Zellen mit Cdc14(Δ426-430) <i>Δcdc14</i>	75
Abb. 49: Beeinträchtigung der <i>spindle midzone</i> in Zellen mit Cdc14(Δ426-430).....	77
Abb. 50: Graphische und statistische Auswertung der Ase1-Lokalisation in Zellen mit Cdc14(Δ426-430) <i>Δcdc14</i>	78
Abb. 51: Lokalisation von Ase1-GFP in <i>Δhct1</i> -Zellen.....	82
Abb. 52: Dephosphorylierung von Ase1 durch Cdc14(Δ426-430).....	83
Abb. 53: Verminderung der Phosphatasefunktion von Cdc14(ASAA) <i>in vivo</i>	85
Abb. 54: Beeinträchtigung des Kernimports von Hct1(1-257) in <i>CDC14(Δ426-430)</i> -Zellen.....	87
Abb. 55: Auswertung des Hct1(1-257)-Kernimports sowie dessen Lokalisationsdauer mit Tetradenanalyse in Zellen mit Cdc14(Δ426-430).....	89
Abb. 56: Quantifizierung des Kernimports von Hct1(1-257)-GFP in Zellen mit Cdc14(Δ426-430) <i>Δcdc14</i>	90
Abb. 57: Proteinexpression von <i>HCT1(1-257)-GFP</i> mit <i>CDC14(Δ426-430) Δcdc14</i>	91
Abb. 58: Phosphataseaktivität von MBP-Cdc14 und MBP-Cdc14(ASAA).....	92

Abb. 59: Proteinangleichung N-terminaler Net1-Fragmente zur Analyse der Inhibition auf Cdc14. ...	94
Abb. 60: Inhibition von Cdc14 und Cdc14(ASAA) durch N-terminale Net1-Fragmente.	95
Abb. 61: Die katalytische Domäne zeigt eine geringere Phosphataseaktivität <i>in vitro</i>	96
Abb. 62: Sequenzanalyse zwischen Net1-verwandten Proteinen.	106
Abb. 63: Zusammenfassung zur Bindung und Inhibition von Cdc14.	110
Abb. 64: Darstellung einer vorhergesagten Sekundärstruktur der CTD von Cdc14.	113
Abb. 65: Reproduktion der CoIP mit N-terminalen Net1-Fragmenten mit Cdc14.	164
Abb. 66: Western Blot-Analyse unterschiedlicher Klone mit Cdc14(1-374)-HA3.....	165
Abb. 67: Western Blot-Analyse unterschiedlicher Transformanten zum Test auf die Komplementation von $\Delta cdc14$	165
Abb. 68: Komplementationsanalysen der Cdc14-Flag3-Komplementationskonstrukte.....	166
Abb. 69: Western Blot-Analyse zur Wahl geeigneter Transformanten.	166
Abb. 70: Selbstinteraktion der NTD von Cdc14.	167
Abb. 71: Proteininteraktion von Bmh1 mit der CTD von Cdc14.	168
Abb. 72: Interaktionsstudie mit Bmh1 und Cdc14.....	168

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Quali- und quantitative Auswertung der Cdc14-Komplementationsanalysen mit C-terminalen GFP-Markierungen.....	64
Tab. 2: Übersicht der untersuchten N-terminalen Fragmente von Net1 auf die Proteinwechselwirkung mit Cdc14.	107
Tab. 3: Übersicht der untersuchten N-terminalen Fragmente von Net1 auf die inhibitorische Wirkung von Cdc14.	109
Tab. 4: Zur Mikroskopie verwendete Fluoreszenzintensitäten und Expositionszeiten.	123
Tab. 5: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme mit deren Beschreibung.	141
Tab. 6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide.	145
Tab. 7: Mutagenese-Oligonukleotide	146
Tab. 8: Oligos zur Epitopmarkierung und Deletion von <i>CDC14</i>	147
Tab. 9: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper	148
Tab. 10: Bakterienmedien	149
Tab. 11: Hefemedien.....	150
Tab. 12: Stammlösungen für Hefemedien	151
Tab. 13: Puffer und Lösungen.....	152
Tab. 14: Programme und Software.....	155

9.4 Abkürzungsverzeichnis

1C	einfacher DNA-Gehalt, vor der Replikation der DNA
2C	doppelter DNA-Gehalt, nach der Replikation der DNA
α	anti, alpha bei Paarungstyp
Δ	Deletion eines Gens
λ	Wellenlänge
Ω	Ohm, Einheit des Widerstands
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius, Einheit der Temperatur
μ	Mikro (10^{-6})
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μF	Mikrofarad, Einheit der elektrischen Kapazität

A

aa	Aminosäure, <i>amino acid</i>
A	Ampere oder Absorption
Abb.	Abbildung
AD	Aktivatorodomäne
Amp	Amicillin
APC/C	<i>Anaphase promoting complex/Cyclosome</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure

B

BD	Bindedomäne
bp	<i>base pair</i> , Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise

C

c	Zenti (10^{-2})
Chr.	Chromosom
Cdk	zyklinabhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Ende der Polypeptidkette
CTD	C-terminale Domäne
CoIP	Co-Immunpräzipitation

D

D	Glukose
Da	Dalton
DIC	Differentialinterferenzkontrast (<i>differential interference contrast</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DUSP	<i>Dualspezifische Proteinphosphatase</i>

E

E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtOH	Ethanol

F

FEAR	<i>Cdc fourteen early anaphase release</i>
<i>F-Primer</i>	<i>Forward-Primer</i>

G

g	Gramm
G/Gal	Galaktose
G418	Kanamycin
GAP	<u>G</u> TPase <u>A</u> ktivator <u>p</u> rotein
GDP	<u>G</u> uanosin- <u>D</u> iphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (<i>g</i> uanine nucleotide <i>e</i> xchange <i>f</i> actor)
GFP	<i>g</i> reen <i>f</i> luorescent <i>p</i> rotein
GTP	Guanosin-Triposphat

H

h	Stunde (<i>hour</i>)
HA	Hämagglutinin-Epitop

I

IB	Inhibitionsdomäne
IP	Immunpräzipitation

K

k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt

L

l	Liter
LB	Bakterienmedium (<i>Luria Broth</i>)

M

m	mono
M	molar, Mol/ Liter
mA	Milliampere
MAT	Paarungstyp
MBP	<u>M</u> annose <u>b</u> inding <u>p</u> rotein

MEN	<i>mitotic exit network</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-Phase	Mitose-Phase
ms	Millisekunde
MT	Mikrotubuli
MW	Molekulargewicht
MYC	c-myc-Epitop

N

n	Anzahl
NaF	Natriumfluorid
NES	Kernexportsequenz (<i>nuclear export sequence</i>)
NLS	Kernlokalisationssequenz (<i>nuclear localization sequence</i>)
nm	Nanometer (10 ⁹)
NOC	Nocodazol
N-Terminus	Amino-Ende der Polypeptidkette
NTD	N-terminale Domäne

O

OD _{xxx}	Optische Dichte der Wellenlänge bei XXXnm
-------------------	---

P

p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamidgele <u>e</u> lektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
pCDC14	endogener CDC14-Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglykol
pGAL1	Galaktose-induzierbarer Promotor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pMET25	Methionin-reprimierbarer Promotor
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
pNP	para-Nitrophenol
ROI	region of interest
pTEF2	konsitiutiver Triose Phosphat Isomerase Promotor

R

r	ribosomal
R/ Raf	Raffinose
RENT	<i>regulator of nucleolar silencing and telophase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
R-Primer	<i>Reverse-Primer</i>
RT	Raumtemperatur

S

S	Sucrose
SAC	<i>spindle assembly checkpoint</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	synthetisch definiert
SDS	Natriumdodexylsulfat
sek	Sekunde
SIN	<i>septation initiation network</i>

T

t	Zeit, <i>time</i>
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA Puffer
TBS(T)	Tris-gepufferte Saline (mit Tween)
TEMED	Tris/ EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TR	<i>Tandem Repeat</i>
ts	Temperatursensitiv
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan

U

U	Unit (Enzymmenge)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolettes Licht

V

V	Volt
vgl.	vergleiche

W

WB	Western Blot
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

X

X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- β -D-galactosid
XY	Hefe-Vollmedium

Y

Y2H	Hefe-zwei-Hybridsystem, yeast-two-hybrid
-----	--

Z

z	Ebene
z.B.	zum Beispiel

AS und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt. Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur. Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder gebräuchlich ist.

10 Lebenslauf

Name	Weber
Vorname	Nina-Maria
Adresse	Graf-Zeppelin-Str. 16 93053 Regensburg
Geburtsdatum	12.09.1985
Geburtsort	Deggendorf
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet
 Ausbildung	
seit Jul 2013	Promotion, Lehrstuhl für Genetik, bei Prof. Dr. Seufert
Jan 2013- Jun 2013	Wissenschaftliche Hilfskraft, Lehrstuhl für Genetik, bei Prof. Dr. Seufert
2010 – 2012	konsekutiver Master in Biologie (Universität Regensburg), Lehrstuhl für Genetik, bei Prof. Dr. Seufert Masterarbeit mit dem Titel: „Die Struktur des Nukleolus in der Mitose in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “ Abschluss M. Sc. Biologie
2008 – 2010	Bachelorstudiengang Biologie (Universität Regensburg) Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie, bei Prof. Dr. Schneuwly Bachelorarbeit mit dem Titel: „A <i>Drosophila</i> model of Kufor- Rakeb syndrome“ Abschluss B. Sc. Biologie
2006 – 2008	Bachelorstudiengang Chemie (Universität Regensburg)
 Schulbildung	
1997-2006	Schülerin und Abitur St. Gotthard-Gymnasium in Niederalteich

Kenntnisse

Sprachen

- Englisch: sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
- Französisch: Grundkenntnisse

Engagement

- Mitglied der Graduiertenschule RIGeL „Excursions & Trips“ seit Sep 2014
- Mitglied im VBIO seit 2012
- Betreuung eines Studentenpraktikums des JCF 2009

11 Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Seufert für die Bereitstellung des interessanten Themas und die zahlreichen hilfreichen Diskussionen. Zudem hast du mich immer motiviert, wenn es nicht so wie erhofft gelaufen ist und mir stets neue Wege aufgezeigt.

Ich möchte mich auch bei meinen Mentoren Prof. Dr. Achim Griesenbeck und Prof. Dr. Olaf Stemmann für die konstruktive Kritik zu den Jahresberichten bedanken.

Besten Dank auch an Prof. Dr. Frank Sprenger der mich wie ein Mentor unterstützt hat und mir immer mit Rat und Tat bei Fragen und Auswertungen geholfen hat.

Besonderen Dank nochmals an Prof. Dr. Achim Griesenbeck für die Begutachtung meiner Arbeit. Vielen Dank an die Mitglieder der Prüfungskommission besonders an Prof. Dr. Frank Sprenger, Prof. Dr. Stephan Schneuwly und Prof. Dr. Reinhard Sterner.

Danke an alle Mitglieder des Lehrstuhls! Ihr habt die schönen Tage noch schöner gemacht und die frustrierenden Tage weniger dramatisch erscheinen lassen!!! Während einer Doktorarbeit lernt man auch viel über sich selbst... :)

Für die interessanten wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Gespräche und für eure Unterstützung bedanke ich mich besonders bei meinen Büromitstreitern Katharina Hannig, Philipp Girke und Andrea Brücher!!! Vielen Dank an dich Lea für deinen Input und das Korrekturlesen dieser schriftlichen Arbeit. An meine ehemalige Bachelorandin Franzi P. für ihre tolle Arbeit und die unglaublichen Muffins. Franzi W. dir danke ich im Besonderen für deine geduldige Hilfestellung bezüglich der Wordformatierungen und unsere kurzen Auszeiten! Herzlichen Dank auch besonders an Antje die mich in der letzten Zeit im Labor noch durch aufbauende Worte und vieles mehr unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich auch bei Dr. Wolfgang Mages, Adelheid, Christiane und Sven für die schöne Zeit bedanken. Danke an Matthias, Thomas, Jan und Daniel für die lustige Atmosphäre!

Ich danke von ganzem Herzen meiner Familie und meinen Freunden. Danke Dani für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Besonders an meinen lieben Mann, der mich so sehr gestützt, mir den Rücken freigehalten und mir Essen gemacht hat. Außerdem hast du stoisch meine Stimmungsschwankungen in dieser Lebensphase ertragen. Großen Dank an meine Eltern die immer für mich da sind, immer hinter mir stehen und mich in Allem unterstützen.

DANKE