

**Der Zellzyklusregulator Rca1 –
Inhibitor und Substrat
des Anaphase-Promoting-Komplexes
in *Drosophila melanogaster***



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

vorgelegt von

Christoph Morgenthaler

aus Regensburg

im November 2013

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von Mai 2009 bis November 2013 am Lehrstuhl für Genetik an der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 26. November 2013

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Frank Sprenger

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
Abstract	9
1 Einleitung	10
1.1 Der eukaryotische Zellzyklus.....	10
1.2 Zellteilungszyklen der <i>Drosophila</i>-Embryogenese.....	11
1.3 Cyclin-abhängige Kinasen regulieren den Zellzyklus.....	14
1.4 Die Ubiquitin-abhängige Proteolyse.....	15
1.5 Der APC/C-Komplex	17
1.5.1 Aufbau.....	17
1.5.2 APC/C-Erkennungssequenzen.....	19
1.5.3 Die Rolle des APC/C bei der Zellteilung in <i>Drosophila</i>	20
1.5.3.1 Eintritt in die Mitose	20
1.5.3.2 Austritt aus der Mitose.....	21
1.6 Der Zellzyklusregulator Rca1	23
1.6.1 Entdeckung und Funktionsanalyse von Rca1.....	23
1.6.2 Die F-Box-Funktion von Rca1 am G1/S-Phase-Übergang.....	24
1.6.3 Das Rca1-Ortholog Emi1	25
1.6.3.1 Die Rca1/Emi1-Familie.....	25
1.6.3.2 Die Regulation von Emi1	27
1.6.3.3 Der Abbau von Rca1 unterscheidet sich von Emi1	28
1.6.4 Identifizierung der Abbausequenz in Rca1	29
1.7 Zielsetzung der Arbeit	29
2 Ergebnisse.....	31
2.1 Der Abbau von Rca1 erfolgt in der G1-Phase.....	31
2.1.1 Der Abbau von Rca1 in Embryonen.....	31
2.1.2 Der Abbau von Rca1 in Schneiderzellen.....	33
2.2 Rca1 – ein Substrat des Anaphase-Promoting-Komplex.....	36

2.2.1 Die quantitative Analyse des Rca1-Abbaus durch Abbaukurven.....	36
2.2.1.1 Erstellung einer Abbaukurve am Beispiel HA-NLS-GFP-Rca1	36
2.2.1.2 Abbaukurven verschiedener Epitopmarkierungen.....	38
2.2.2 Abbau von Rca1 zeitgleich mit anderen Substraten des APC/C.....	40
2.2.3 Der Abbau von N- und C-terminalem Rca1 in G1.....	43
2.2.4 Überexpression von Fzr aktiviert den APC/C in G2.....	46
2.2.4.1 Abbau von Rca1-GFP in G2 nach Fzr-Überexpression.....	47
2.2.4.2 Der verfrühte Rca1-Abbau verglichen mit APC/C-Substraten.....	50
2.2.4.3 Der Abbau von N- und C-terminalem Rca1 in G2	51
2.2.5 Der Abbau von Rca1 ist abhängig von der eigenen Aktivität.....	52
2.2.6 Steigende Fzr-Konzentrationen verbessern die Rca1-Degradation	54
2.2.7 Knock-down von Fzr führt zu Verlust der G1-Phase	56
2.2.8 Dacapo-Überexpression führt zu stabilem Rca1 in G1	59
2.2.9 Rca1 interagiert mit der APC/C-Untereinheit Cdc23	62
2.2.9.1 Nachweis im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	62
2.2.9.2 Co-Immunpräzipitation von Rca1 mit Cdc23	64
2.3 Der Abbau von Rca1 in Schneiderzellen	66
2.3.1 Faktoren, die den Abbau von Rca1 beeinflussen.....	66
2.3.1.1 Ermittlung der Stabilitätswerte verschiedener Rca1-Derivate	66
2.3.1.2 Die Aktivität der Rca1-Derivate	71
2.3.1.3 Epitopmarkierungen	74
2.3.1.4 Linker zwischen GFP und Rca1 führt zu Instabilität.....	78
2.3.1.5 Lokalisierung Zytoplasma - Zellkern.....	82
2.3.2 Rca1 – Eingrenzung der Abbausequenz.....	84
2.3.2.1 Die Deletion der funktionalen Domänen	84
2.3.2.2 N-terminale Rca1-Deletionen.....	87
2.3.2.3 N-terminale Rca1-Deletionen ohne postulierte Abbausequenz.....	89
2.3.2.4 C-terminale Rca1-Deletionen	91
2.3.2.5 Das kleinste abbaubare Fragment (KAF)	92
2.3.2.6 N- und C-terminales Rca1	98
2.3.2.7 N-terminales Rca1 mit N-terminalen Verkürzungen.....	98
2.3.2.8 N-terminale Rca1-Fragmente.....	101
2.3.3 Für die Aktivität relevante Regionen in Rca1	102

2.3.3.1 Vergleich der APC/C-Inhibition ausgewählter Rca1-Derivate	102
2.3.3.2 Die C351S-Mutation führt zu einer Destabilisierung.....	104
2.4 Die Etablierung eines <i>Drosophila</i>-spezifischen <i>in vitro</i>-Ubiquitylierungsassays	106
2.4.1 Herstellung der benötigten Komponenten.....	106
2.4.1.1 Ubiquitin (6xHis-Ubiquitin).....	107
2.4.1.2 Substrat Geminin* (Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis)	108
2.4.1.3 E1: Ubiquitin-aktivierendes Enzym Uba1 (6xHis-Uba1)	109
2.4.1.4 E2-Enzyme UbcH5b, Vihar und Effete.....	111
2.4.1.5 Ubiquitin-E2-Aktivitätsassay	115
2.4.1.6 E3-Ligasen-Aktivität im Retikulozytenlysat.....	119
2.4.2 Test der einzelnen Komponenten auf Aktivität im Retikulozytenlysat.	121
2.4.2.1 Substrat Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis (<i>E. coli</i>).....	121
2.4.2.2 E2-Enzyme	123
2.4.3 Ubiquitylierungsassays.....	124
2.4.3.1 Inaktivierung des Retikulozytenlysats durch NEM.....	124
2.4.3.2 Ubiquitylierungsassay im <i>Drosophila</i> -Extrakt.....	130
2.4.3.3 Die Aufreinigung von Rca1 im Baculo-System	132
3 Diskussion.....	134
3.1 Rca1 – vom Inhibitor zum Substrat des APC ^{Fzr}	134
3.2 Der Abbau von Rca1 in Schneiderzellen.....	140
3.2.1 Die Etablierung des Messsystems	140
3.2.1.1 Auf den Abbau Einfluss-nehmende Faktoren	140
3.2.1.2 Etablierung der Methoden	143
3.2.2 Die Eingrenzung der Abbausequenz/en in Rca1.....	144
3.2.3 Das Rca1 Funktions- und Degradationsmodell.....	150
3.3 Die Etablierung eines <i>Drosophila</i> -spezifischen <i>in vitro</i> -Ubiquitylierungsassays	154
4 Methoden.....	161
4.1 Arbeiten mit Bakterien	161
4.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	161

4.1.2 Herstellung elektrokompetenter DH5 α -Zellen.....	161
4.2 Arbeiten mit Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	162
4.2.1 Kultivierung von Hefestämmen in Flüssigmedium.....	162
4.2.2 Aufbewahrung von Hefestämmen	162
4.2.3 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode	162
4.2.4 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	163
4.2.4.1 X-Gal-Reaktions-Nachweis	165
4.2.4.2 Wachstumstest	166
4.3 Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	166
4.3.1 Fliegenhaltung und Zucht.....	166
4.3.2 Dechorionisieren von <i>Drosophila</i> -Embryonen.....	166
4.3.3 Das UAS/Gal4-System	167
4.4 Genetische und molekularbiologische Methoden	167
4.4.1 Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	167
4.4.1.1 Plasmidschnellisolierung	167
4.4.1.2 Plasmidpräparation mit dem peqGOLD Plasmid <i>Miniprep Kit</i>	168
4.4.2 Messung von Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung	168
4.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	168
4.4.3.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	169
4.4.3.2 Ortsspezifische Mutagenese eines Gens mittels PCR.....	170
4.4.4 Restriktionsverdau von DNA	171
4.4.5 Dephosphorylierung.....	171
4.4.6 Gelelektrophorese von DNA.....	171
4.4.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	172
4.4.7.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	172
4.4.7.2 Aufreinigen von DNA-Fragmenten.....	173
4.4.8 Ligation.....	173
4.4.9 Transformation mittels Elektroporation	173
4.4.10 Sequenzierung.....	174
4.4.11 RNA-Interferenz (RNAi)	174
4.5 Proteinanalytische Methoden	175
4.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen.....	175
4.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	175

4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	175
4.5.4 Färbung mit Coomassie.....	176
4.5.5 Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen	176
4.5.6 Färbung mit Ponceau S.....	177
4.6 Ubiquitylierungsassay	177
4.6.1 <i>in vitro</i> -Translation	178
4.6.1.1 Linearisieren von Plasmiden.....	178
4.6.1.2 <i>in vitro</i> -Transkription.....	179
4.6.1.3 <i>in vitro</i> -Translation.....	179
4.6.2 Immunpräzipitation	180
4.6.3 Inaktivierung von Retikulozytenlysat durch NEM.....	181
4.6.4 Ubiquitin-E2 Aktivitätsassay	181
4.7 Proteinbiochemische Methoden	182
4.7.1 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	182
4.7.1.1 Testexpression im analytischen Maßstab	183
4.7.1.2 Expression von Proteinen im präparativen Maßstab.....	184
4.7.1.3 Proteinreinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie.	185
4.7.1.4 Dialyse von Proteinlösungen.....	186
4.7.1.5 Weitere Aufreinigung mittels Gelfiltration	186
4.7.1.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen	186
4.7.1.7 Lagerung von gereinigtem Protein	186
4.7.2 Das Baculovirus-Expressionssystem	187
4.8 Arbeiten in der Zellkultur	189
4.8.1 <i>Drosophila</i> -Schneiderzellen	189
4.8.1.1 Auftauen	189
4.8.1.2 Kultivierung.....	189
4.8.1.3 Splitten	189
4.8.1.4 Zellzahlbestimmung in Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.....	190
4.8.1.5 Aussäen und Transfektion.....	190
4.8.1.6 Einfrieren.....	191
4.8.2 SF21-Insektenzellen	192
4.8.2.1 Kultivierung.....	192
4.8.2.2 Splitten	192

4.8.2.3 Transfektion von SF21-Zellen und Gewinnung von V0	192
4.8.2.4 Infektion von SF21-Zellen mit Viruslösung V0	193
4.8.2.5 Titration der Viruslösung V1	194
4.8.2.6 Infektion mit optimalem V1/Zell-Verhältnis.....	194
4.8.2.7 Aufschluss von SF21-Insektenzellen.....	194
4.9 Live-cell-imaging.....	195
4.9.1 Mikroskopsystem.....	195
4.9.2 Vorbereitung der Zellkulturzellen.....	195
4.9.3 Bedingungen am Mikroskop	195
4.10 Durchflusszytometrie	196
4.10.1 Vorbereitung der Zellen	196
4.10.2 Messung am Durchflusszytometer	197
4.10.3 Auswertung der Daten	198
5 Material.....	200
5.1 Nukleinsäuren	200
5.2 Enzyme und Proteine	200
5.3 Antikörper und Seren.....	201
5.3.1 Primäre Antikörper und Antiseren	201
5.3.2 Sekundäre Antikörper.....	201
5.4 Chemikalien.....	202
5.5 Verbrauchsmaterialien.....	204
5.6 Geräte und Software	205
5.6.1 Geräte	205
5.6.2 Software	207
5.7 Medien und Agarplatten.....	207
5.7.1 Bakterienmedien.....	207
5.7.2 Hefemedien.....	207
5.7.3 Drosophilafutter und Apfelagarplatten.....	209
5.8 Puffer und Lösungen.....	209
5.9 Oligonukleotide.....	211
5.10 Plasmide und Vektoren.....	215
5.10.1 Verwendete Stammplasmide	215

5.10.2 Plasmide von Klonierungszwischenstufen	216
5.10.3 Plasmide für Rca1-Derivate mit GFP-Epitopmarkierung	216
5.10.4 Plasmide für Rca1-Konstrukte mit Cherry-Epitopmarkierung.....	220
5.10.5 Plasmide für Hefe-Zwei-Hybrid-System	220
5.10.6 Plasmide für Ubiquitylierungsassay	221
5.10.7 Plasmide für Vergleich von APC/C-Substraten.....	221
5.11 Hefestämme.....	222
6 Literaturverzeichnis.....	223
7 Abkürzungsverzeichnis.....	233
8 Lebenslauf.....	235
9 Danksagung.....	236

Zusammenfassung

Ein wichtiger Kontrollmechanismus des Zellzyklus ist die irreversible Proteolyse von Zellzyklus-Regulatoren. Dabei markieren E3-Ligasen Zielproteine durch Ubiquitinmoleküle. Für den Abbau in der Mitose und der G1-Phase reguliert der APC/C-Komplex (Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome) als E3-Ligase den zeitlichen Verlauf des Zellzyklus. Die Aktivität des APC/C wiederum wird in den übrigen Zellzyklusstadien durch Phosphorylierung und durch Proteine der Rca1/Emi1-Proteinfamilie inaktiv gehalten.

Für eine vollständige APC/C^{Fzr}-Aktivität in der G1-Phase muss Rca1 seine inhibitorische Funktion auf den APC/C^{Fzr} verlieren. Es konnte gezeigt werden, dass Rca1 über einen anderen Mechanismus abgebaut wird als das Ortholog Emi1. Während Emi1 bereits in der Mitose SCF^{βTRCP}-vermittelt abgebaut wird, ist bei Rca1 ein Abbau erst in der frühen G1-Phase zu erkennen.

Für die Identifizierung der Abbausequenz wurden in dieser Arbeit live-cell-imaging und Durchflusszytometrie verwendet. Dazu wurden Schneiderzellen transient mit Fluoreszenzmarkierten Rca1-Deletions-Derivate transfiziert und die Stabilität in G1 näher untersucht. Auf diese Weise wurden eine Abbausequenz im N-terminalen Bereich sowie eine im zentralen C-terminalen Bereich von Rca1 identifiziert. Letztere beinhaltet neben einer für Rca1 neu entdeckten Linkerregion eine KEN-Box-Domäne, die als bekannte Erkennungssequenz für APC/C^{Fzr}-Substrate gilt und somit eine direkte Verbindung zum APC/C^{Fzr}-Komplex herstellt.

In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Rca1-Abbau mit der Aktivierung des APC/C^{Fzr} zusammen fällt. In der G1-Phase beginnt der Abbau von Rca1 zeitgleich mit anderen APC/C-Substraten. Eine verfrühte Aktivierung des APC/C^{Fzr} durch die Überexpression von Fzr führt ebenfalls zu einem zeitgleich beginnenden Abbau in der Interphase. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stabilität von Rca1 direkt von seiner Fähigkeit abhängt, den APC/C^{Fzr} zu inaktivieren. Während ein aktives Rca1 seinen eigenen Abbau verzögern kann, wird der Abbau eines inaktiven Rca1 durch die Überexpression von Fzr beschleunigt.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Rca1 während der S- und G2-Phase ein Inhibitor des APC/C^{Fzr} ist, jedoch im Verlauf der G1-Phase zu einem Substrat des APC/C^{Fzr} wird.

Um einen endgültigen Nachweis zu erhalten, dass Rca1 sowohl Inhibitor als auch Substrat des APC/C^{Fzr} ist, wurde ein *Drosophila*-spezifischer, biochemischer *in vitro*-Ubiquitylierungsassay etabliert. In diesem Assay konnte eine Ubiquitylierung von APC/C-Substraten beobachtet werden und soll nun für die Analyse von Rca1 als Inhibitor des APC/C als auch als Substrat des APC/C eingesetzt werden.

Abstract

For progression through the cell cycle, alternate degradation and accumulation of regulatory proteins are essential. Proteolysis of cell cycle regulators is initiated by E3 ligases that mediate polyubiquitination of substrate molecules. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is such an ubiquitin-ligase that is active during mitosis and G1-phase but needs to be inactive during S- and G2-phase. Inactivation of the APC/C involves proteins of the Emi1/Rca1 family. Inhibition of the APC/C by Rca1 has to be reversed to allow full APC/C activity. In the case of the vertebrate Emi1, this is achieved by its proteolysis during mitosis, initiated by SCF^{BTrcP} dependent ubiquitination. Rca1 is stable throughout mitosis and gets rapidly degraded when cells enter the G1-phase, suggesting a different degradation mechanism.

In this work, live-cell-imaging and flow cytometry of transfected *Drosophila* tissue culture cells were used to identify the sequences as well as the mechanism responsible for the degradation of GFP- and Cherry-tagged Rca1-proteins. Two distinct degradation sequences could be identified in the N- and C-terminal part of Rca1, respectively. In the latter case, the KEN-box together with a newly identified linker-region is necessary for Rca1 degradation. The KEN-box is a well characterized recognition site of APC/C^{Fzr}-substrates and implies the involvement of APC/C in the degradation mechanism of Rca1. Several experiments could show that the degradation of Rca1 resembles the degradation of other substrates of the APC/C^{Fzr}-complex. This was seen in direct comparison to Geminin and CyclinB in G1 but also after APC/C^{Fzr} activation during interphase following overexpression of Fzr. Furthermore, it could be shown that the stability of Rca1 depends on its ability to inhibit the APC/C^{Fzr}. An active Rca1 can reduce its own degradation while the degradation of an inactive Rca1 can be speed up by a higher concentration of Fzr.

These findings suggest that Rca1 can be switched from an inhibitor of the APC/C^{Fzr}-complex during S- and G2-phase to a substrate of APC/C^{Fzr} in G1. This switch could be induced by a modification for example a phosphorylation as it is seen by the human ortholog Emi1.

In order to test biochemically, whether and how Rca1 can act as both inhibitor and substrate for APC/C^{Fzr}, an assay was established to analyse APC/C-dependent ubiquitination in vitro. This assay can now be used in further experiments to examine the way how Rca1 acts as an inhibitor and as a substrate for the APC/C.

1 Einleitung

Die Zelle ist die kleinste funktionelle Einheit eines Organismus. Dennoch besitzt diese einen so komplexen Aufbau und eine derart hohe Organisation, dass sie bis heute nicht vollständig verstanden ist. Im Gegensatz zu einzelligen Prokaryoten sind ein- oder mehrzellige Eukaryoten zusätzlich noch in verschiedene intrazelluläre Kompartimente aufgeteilt. Nur durch das Zusammenwirken der einzelnen Kompartimente sind eukaryotische Zellen in der Lage, komplexe Abläufe wie zum Beispiel das Zellwachstum oder die Zellteilung zu steuern.

Dabei stellt die Zellteilung den Fortbestand jeglichen Lebens dar, bei der sich aus einem Einzeller ein neuer einzelliger Organismus entwickelt oder bei einem Mehrzeller nach der Befruchtung der Eizelle, aus einer einzigen Zelle durch viele Zellteilungen ein Organismus entsteht, in dem jede Zelle eine bestimmte Funktion erfüllt.

1.1 Der eukaryotische Zellzyklus

Die Periode von einer Zellteilung bis zur nächsten wird als Zellzyklus bezeichnet und ist eine präzise Abfolge an Vorgängen, die zur Entstehung von zwei Tochterzellen führt, von denen jede eine exakte Kopie der elterlichen Chromosomen enthält. Der Zellzyklus wird in vier Phasen unterteilt. Der als Mitose bezeichneten Phase (M-Phase) mit der Teilung des Zellkerns und der Trennung in zwei Tochterzellen (Zytokinese) ist die Interphase angeschlossen. Diese befindet sich zwischen zwei M-Phasen und wird in G1-, S- und G2-Phase untergliedert.

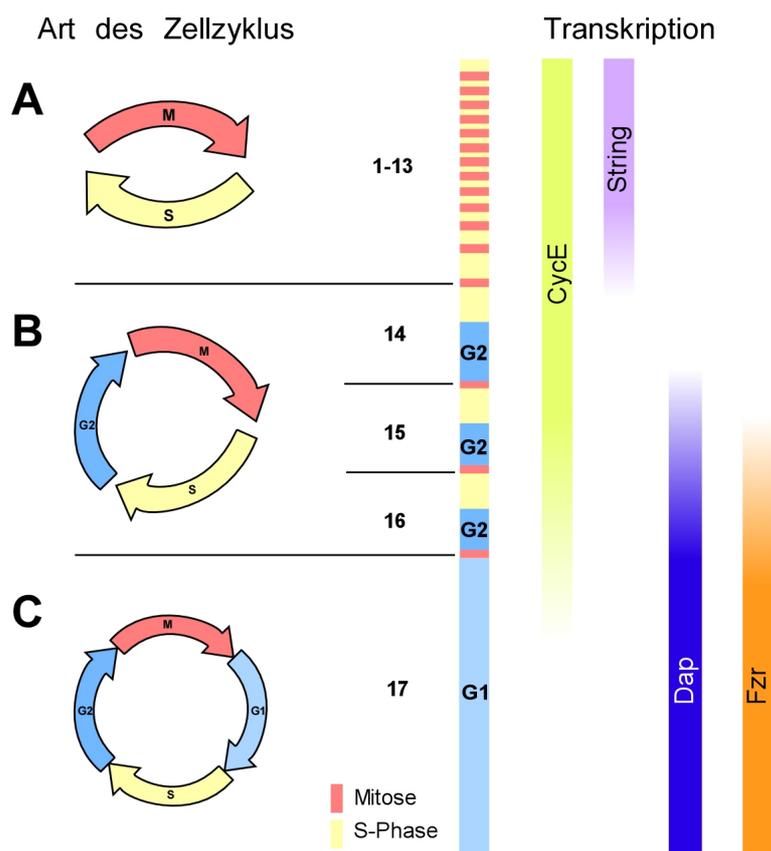
Als G1 („*gap*“) wird die Phase nach Abschluss der Mitose bezeichnet und dient der Zelle in erster Linie zum Wachstum. Zusätzlich werden in ihr RNA und Proteine produziert, die für die angeschlossene S-Phase („*synthesis*“) benötigt werden (Morgan, 2007). In dieser Phase findet die Verdopplung der Chromosomen statt, so dass die beiden Schwesterchromatiden in der Mitose auf Mutter- und Tochterzelle verteilt werden können. Zwischen der Synthese der DNA und der Zellteilung wird die replizierte DNA in der G2-Phase auf Fehler überprüft und die Zelle bereitet sich auf die erneute Mitose vor. Während der Mitose durchläuft die Zelle große morphologische Veränderungen. In den meisten eukaryotischen Zellen, mit Ausnahme von Hefen, löst sich in der Prophase die Kernmembran auf und die Chromosomen beginnen zu kondensieren. Dabei werden die beiden Schwesterchromatiden über Cohesine zusammengehalten. Im Zytoplasma bildet

sich ausgehend von den beiden Zentrosomen, der Spindelapparat aus. In der Prometaphase elongieren die Mikrotubuli der Kernspindel und nehmen Kontakt zu den Kinetochoren der Schwesterchromatiden auf. Sobald sich die Chromosomen in der Metaphase entlang der sogenannten Metaphase-Platte angelagert haben und alle Kinetochore durch Mikrotubuli besetzt sind, werden zu Beginn der Anaphase die Cohesine gespalten und es erfolgt die Trennung der Kinetochore und die Aufteilung der Schwesterchromatiden auf Tochter- und Mutterzelle (Cohen-Fix und Koshland, 1997). In der Telophase dekondensieren die Chromosomen und die Zellkerne bilden sich neu aus. Aber erst mit Ausbildung einer neuen Zellmembran und der vollständigen Trennung beider Zellen in der Zytokinese wird der Zellzyklus abgeschlossen. Die einzelnen Vorgänge unterliegen dabei präzisen Kontrollmechanismen, die sicherstellen, dass sowohl die DNA-Replikation der Chromosomen, als auch die Verteilung der Schwesterchromatide fehlerlos und in der richtigen Reihenfolge ablaufen. Der zeitlich korrekte Ablauf und die Geschwindigkeit von Zellteilungen in einem Organismus sind entscheidend für den normalen Verlauf der Entwicklung, ein Fehlverhalten führt zum Absterben der Zelle oder zu unkontrollierten Zellteilungen, wie es bei Krebszellen der Fall ist.

1.2 Zellteilungszyklen der *Drosophila*-Embryogenese

In der Entwicklung eines *Drosophila*-Embryos werden verschiedene Zellteilungszyklen durchlaufen (Orr-Weaver, 1994; Vidwans und Su, 2001). In den ersten 13 Zellzyklen finden nur Kernteilungen statt, die Zytokinese unterbleibt (Abb. 1.1 A). Dabei wird das Genom im Zytoplasma des Embryos in der S-Phase verdoppelt und in einer anschließenden Mitose auf verschiedene Zellkerne aufgeteilt. Ein besonderes Merkmal ist das Fehlen der G1- und G2-Phasen, weshalb jeder Zellzyklus nur 9-12 Minuten dauert. Aufgrund der synchron ablaufenden Zellzyklen, wird es auch als synzytialer Zyklus bezeichnet und führt zu einem exponentiellen Anstieg von Zellkernen innerhalb der synzytialen Eizelle und zu einer extrem schnellen Vervielfachung des Genoms.

Für diese synzytialen Zyklen zu Beginn der Entwicklung sind zwei Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks) Cdk1 und Cdk2, verschiedene Cycline, sowie die String (*stg*) Phosphatase verantwortlich, die während der Oogenese als RNA oder als Proteine von der Mutter im Ei deponiert werden. String sorgt nach der S-Phase für die Aktivierung von Cdk1, wodurch die Zelle direkt in die Mitose eintreten kann (Edgar, *et al.*, 1994; O'Farrell, *et al.*, 1989). Nach der Mitose wiederum ermöglicht der maternal vererbte, aktive CyclinE-Cdk2-Komplex den direkten Eintritt in die S-Phase.



Verändert nach Grosskortenhaus, 2002

Abbildung 1.1: Die verschiedenen Zellteilungszyklen in der *Drosophila*-Embryonalentwicklung

A) In den ersten 13 Zellzyklen finden nur Kernteilungen statt bei denen sich S- und M-Phase abwechseln. Die Zytokinese unterbleibt.

B) Das Fehlen von String führt bei gleichzeitig einsetzender Zellularisierung in den Zellzyklen 14-16 erstmals zu einer G₂-Phase.

C) Die Abschaltung der CyclinE-Transkription und die vollständige Inhibierung von CyclinE-Cdk2 durch die Expression des CyclinE-Cdk2-Inhibitors Dap ermöglicht den Zellen nach Zellzyklus 16 den Eintritt in die G₁-Phase.

Nach Mitose 13 sind die Vorräte an maternal gespeichertem *stg* aufgebraucht und die Expression von String unterliegt ab diesem Zeitpunkt einer zeitlich und örtlich exakt differenzierten Transkriptionskontrolle (Edgar und Datar, 1996). Das Fehlen von String führt bei gleichzeitig einsetzender Zellularisierung erstmals zu einer G₂-Phase und somit zu einer entwicklungsabhängigen Regulation des Eintritts in die Mitose (Abb. 1.1 B). Der Eintritt in die S-Phase erfolgt jedoch weiterhin ohne erkennbare G₁-Phase, da maternales CyclinE-Cdk2 weiterhin in ausreichendem Maße vorhanden ist (Knoblich, *et al.*, 1994).

Die meisten Zellen des Embryos teilen sich nach der Zellularisierung noch dreimal und treten nach Mitose 16 zum ersten Mal in eine quieszente G₁-Phase ein (Abb. 1.1 C). Der Eintritt in die erste G₁-Phase ist dabei von der Inaktivierung der CyclinE-Cdk2- und CyclinA-Cdk1-Komplexe abhängig, da beide Komplexe die S-Phase induzieren können.

Dazu wird die zygotische Transkription von CyclinE abgeschaltet. Zusätzlich läuft die maternale Kontribution an CyclinE-mRNA aus (Knoblich, *et al.*, 1994). Für eine vollständige Inaktivierung von CyclinE sorgt die erstmalige Transkription des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors (CKI) dacapo (dap). Dacapo ist ein zu den CIP/KIP-Inhibitoren aus Vertebraten orthologes Protein, das an bereits vorhandene CyclinE-Cdk2-Komplexe bindet und diese dadurch inhibiert. Die Abschaltung der CyclinE-Transkription ermöglicht der Zelle die Transkription von Fzr, einem Aktivator des Anaphase-Promoting-Komplexes (APC/C, Kapitel 1.5), der für den Abbau von CyclinA zu Beginn der Mitose sorgt. Erst dadurch ist nach dem CyclinE-Cdk2-Komplex auch der CyclinA-Cdk1-Komplex inaktiviert und die Zelle kann in die erste G1-Phase eintreten (Sigrist, *et al.*, 1995).

Am besten untersucht ist dieser molekulare Mechanismus in der embryonalen Epidermis, da sich die epidermalen Zellen relativ synchron teilen und nach Mitose 16 in der G1-Phase verbleiben (Foe, 1989). Im Gegensatz dazu durchlaufen u.a. Zellen des Nervensystems in der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* weitere Zellteilungszyklen. Um weitere Teilungen durchzuführen, werden in diesen Zellen wieder CyclinE und String exprimiert, wobei vor allem die CyclinE Expression essentiell ist (Knoblich, *et al.*, 1994).

Eine weitere Art des Zellzyklus findet man vor allem im Larvenstadium, aber auch in der späten Embryogenese tritt dieser Zyklus auf. Bestimmte Zellgruppen beginnen in einem definierten Muster zu endoreplizieren, angefangen mit der Speicheldrüse, über den anterioren und posterioren Darm, bis zum zentralen Mitteldarm (Smith und Orr-Weaver, 1991). In diesen sogenannten Endoreplikationszyklen wird die DNA mehrfach repliziert, ohne dass die Zellen eine Mitose durchlaufen oder eine Zellteilung erfolgt (Edgar und Orr-Weaver, 2001). Für das Ausbleiben der M-Phasen während der Endoreplikation wird ein weiterer Regulationsmechanismus benötigt, der ebenfalls bei der Abschaltung der mitotischen Regulatoren String, CyclinA und CyclinB eingreift (Sauer, *et al.*, 1995) und die Expression von CyclinE für die S-Phasen der Endoreplikationszyklen notwendig macht (Knoblich, *et al.*, 1994).

Eine besondere Bedeutung in der Entwicklung von *Drosophila* kommt den Imaginalscheiben zu, die während der Entwicklung der Larve ausgebildet werden und aus denen später die adulte Fliege hervorgeht. Die Imaginalscheiben einer frisch geschlüpften Larve bestehen aus 10 bis 50 Zellen. Diese werden bis zur Verpuppung auf etwa 100000 Zellen vermehrt und differenzieren danach zu Geweben wie Flügel oder Augen. Wäh-

rend der Vermehrung der imaginalen Zellen in den Larvalstadien nimmt neben der Zellzahl auch die Zellmasse zu. Dieser Zuwachs an Masse wird in den imaginalen Zellzyklen durch eine G1-Phase vor der S-Phase und einer G2-Phase vor der Mitose erreicht. Mit dem Verlauf G1-, S-, G2-, M-Phase entspricht dieser imaginale Zellzyklus dem „klassischen“ Zellzyklus. In diesem wird der Eintritt in S- und M-Phase durch die Expression von CyclinE und String reguliert (Johnston und Edgar, 1998; Neufeld, *et al.*, 1998; Richardson, *et al.*, 1995)

1.3 Cyclin-abhängige Kinasen regulieren den Zellzyklus

Je nach Entwicklungsstadium kommen in *Drosophila* verschiedene Zellzyklen zum Einsatz. Die Koordination des Ablaufes und die Geschwindigkeit der Zellteilung werden dabei von molekularen Kontrollsystemen an bestimmten Kontrollpunkten im Zellzyklus gesteuert. Erst wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind, kann die Zelle den Kontrollpunkt überschreiten und in die nächste Zellzyklusphase eintreten.

Die als molekularer Taktgeber verantwortlichen Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) wurden in genetischen Analysen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und in *Schizosaccharomyces pombe* (Hartwell, *et al.*, 1974; Nurse, *et al.*, 1976) identifiziert. Dabei handelt es sich um konservierte Serin/Threonin-Kinasen, deren Aktivitäten im Verlauf des Zellzyklus oszillieren und dadurch den Eintritt in die Mitose und den Eintritt in die S-Phase regulieren. Entscheidend für die Aktivität ist die Bildung eines Komplexes der katalytischen Untereinheit Cdk mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin (Murray, 2004). Die Cdk-Cyclin-Komplexe phosphorylieren Zielproteine und aktivieren oder inhibieren auf diese Weise regulatorische Kaskaden. Ebenso wie ihre Substrate werden auch die Cdk-Cyclin-Komplexe über Phosphorylierung aktiviert oder inaktiviert. Während in Hefen nur eine Cdk für den Zellzyklus verantwortlich ist, sind in höheren Organismen mehrere Cdks notwendig. In der Bäckerhefe assoziiert Cdk1 (Cdc28) mit neun verschiedenen Cyclinen um den Zellzyklus zu regulieren. In der G1-Phase interagiert Cdk1 mit Cln1-3 (Nasmyth, 1993), in der S-Phase mit den S-Phase Cyclinen Clb 5-6 (Murray, 2004) und für den Eintritt in die Mitose wird Cdk1 durch die Interaktion mit den M-Phase Cyclinen Clb 1-4 (Andrews und Measday, 1998) aktiviert. In höheren Organismen werden Cdk4 und Cdk6 in der G1-Phase mit D-Typ Cyclinen aktiviert und Cdk2 sorgt mit A- und E-Typ Cyclinen für die Initiation der DNA-Replikation (Edgar und Lehner, 1996). Für den Eintritt in die Mitose ist hauptsächlich Cdk1 mit B-Typ Cyclinen verantwortlich (Sigrist, *et al.*, 1995). Zusätzlich zu der primären Funktion im Zellzyklus

konnten den Cyclin-abhängigen Kinasen in den letzten Jahren noch weitere Aufgaben in der Zelle zugeordnet werden. Neben den bereits erwähnten Cdks wurden noch weitere identifiziert, deren Funktion nicht immer bei der Regulation des Zellzyklus zu finden ist (Lim und Kaldis, 2013).

Während die Cyclin-abhängigen Kinasen im Zellzyklus konstant vorhanden sind, fluktuieren die Level ihrer aktivierenden Cycline (Murray, 2004; Murray, *et al.*, 1989). Zusätzlich wird die Aktivität der Cdks über sogenannte Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (CKI) kontrolliert, deren Expressionslevel ebenfalls stark variiert (Lane, *et al.*, 1996). Die Regulation der Cycline und der CKIs geschieht zum Teil auf Ebene der Transkription, hauptsächlich werden sie jedoch im Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Lim und Kaldis, 2013; Morgan, 2007), wodurch dem Fortschreiten des Zellzyklus eine unidirektionale Richtung vorgegeben wird.

1.4 Die Ubiquitin-abhängige Proteolyse

Cycline und viele andere Zellzyklusregulatoren werden durch Anheften von mehreren Ubiquitinen erkannt und durch das Proteasom abgebaut (Voges, *et al.*, 1999). Ubiquitin ist ein hoch konserviertes Protein, bestehend aus 76 Aminosäuren, das in allen Eukaryoten vorhanden ist. Der C-terminale Glycinrest G76 von Ubiquitin wird an ein Lysinrest des abzubauenen Substrats geknüpft. Dies geschieht über eine Kaskade von drei verschiedenen Enzymen: Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) und Ubiquitin-übertragende Ligase (E3). In einem ersten Schritt wird eine Thioesterbindung zwischen einem Cystein des E1-Enzyms und der C-terminalen Carboxygruppe des Ubiquitins geschaffen. Für diese energieaufwendige „Aktivierung“ des Ubiquitins wird ein ATP in ein AMP hydrolysiert. Das aktivierte Ubiquitin wird in einem zweiten Schritt durch Transesterifizierung vom E1-Enzym auf das katalytische Cystein des E2-Enzyms übertragen (Ciechanover und Schwartz, 1994) und von dort in dem wohl am stärksten regulierten, finalen Schritt von der E3-Ligase an das Zielprotein geknüpft. Dabei katalysiert die E3-Ligase die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und einem Lysin des Substrats.

Neben der Substratspezifität der E3-Ligase bilden die E2-Enzyme aus der hochkonservierten Proteinfamilie „*ubiquitin-conjugating enzyme*“ (UBC) eine erste Möglichkeit der Regulation (Matuschewski, *et al.*, 1996). Im Gegensatz zum E1-Enzym, bei dem mit Ausnahme von Pflanzen für den aktivierenden Schritt in der Regel nur ein einziges E1-Enzym verantwortlich ist (Haas und Rose, 1982), gibt es viele E2-Enzyme, die teilweise

sehr spezifische Funktionen haben und nur mit einer E3-Ligase interagieren können, während andere eher unspezifisch mit mehreren E3-Ligasen wechselwirken (Brzovic und Klevit, 2006). In einer anderen Klassifizierung werden die E2-Enzyme auf die Art der Ubiquitinylierung eingeteilt. Es gibt E2-Enzyme, die für die Monoubiquitinylierung der Substrate zuständig sind, während andere E2-Enzyme die Polyubiquitinylierung übernehmen. So sind in humanen Zellen UbcH5 und UbcH10 für die Monoubiquitinylierung von Zellzyklus-spezifischen Substraten notwendig und Ube2S sorgt für die Kettenverlängerung und somit für den Abbau im Proteasom (Garnett, *et al.*, 2009). Neben der Polyubiquitinylierung von Proteinen für den proteasomalen Abbau, werden durch einfache- oder mehrfache Monoubiquitinylierungen an verschiedenen Lysinresten des Proteins andere Wege beschritten, die zum Beispiel Endozytose oder DNA-Reparatur zur Folge haben (Mukhopadhyay und Riezman, 2007). Interessanterweise sind manche E2-Enzyme in der Lage, bestimmten Substraten auch ohne E3-Ligase ein Ubiquitin zu übertragen (Hoeller, *et al.*, 2007).

In der Regel wird für die Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat aber eine E3-Ligase benötigt, die das Substrat direkt oder über ein Adapterprotein bindet. In einer Zelle gibt es eine Vielzahl an E3-Ligasen, die insgesamt in vier Klassen eingeordnet werden können: die U-Box E3-Ligasen, die PHD-Finger-E3-Ligasen, die HECT-E3-Ligasen und die RING-Finger-E3-Ligasen (Nakayama und Nakayama, 2006). Zu letzteren zählen der sogenannte SCF-Komplexe („*Skp-Cullin-F-box-containing complex*“) (Feldman, *et al.*, 1997; Skowyra, *et al.*, 1997) und der APC/C-Komplex („*anaphase-promoting-complex/cyclosome*“) (Irniger, *et al.*, 1995; King, *et al.*, 1995; Sudakin, *et al.*, 1995; Tugendreich, *et al.*, 1995). Bei beiden handelt es sich um Multiproteinkomplexe, die für die Ubiquitinylierung von Zellzyklusregulatoren wichtig sind.

Obwohl es sich bei beiden Komplexen um RING-Finger-E3-Ligasen handelt und sie eine Ähnlichkeit in ihrem Grundgerüst aufweisen, unterscheiden sie sich fundamental in der Regulation des Zellzyklus. SCF-Komplexe sind konstitutiv über den gesamten Zellzyklus aktiv und die Regulation erfolgt auf Ebene der Substrate. In der Regel müssen Proteine erst phosphoryliert werden, bevor sie vom SCF-Komplex als Substrate erkannt werden können. Im Gegensatz dazu, ist der APC/C-Komplex nur zu bestimmten Zellzyklusphasen aktiv und wird direkt über Phosphorylierung gesteuert. Erst am Ende der G2-Phase wird der APC/C phosphoryliert und ein Aktivatorprotein kann binden, um den Komplex zu aktivieren (Vodermaier, 2004). Nichtsdestotrotz findet auch beim APC/C eine Regulation auf Ebene der Substrate statt, nur werden hier die Substrate über Phosphorylie-

rung geschützt. Beispiele, in denen Substrate des APC/C erst in der richtigen Zellzyklusphase dephosphoryliert und dadurch vom APC/C erkannt werden, sind unter anderem Pds1 in Hefe (Wang, *et al.*, 2001) und die AuroraA Kinase (Littlepage und Ruderman, 2002).

1.5 Der APC/C-Komplex

Der APC/C ist eine große Cullin-RING-E3-Ligase von der bis heute 13 Untereinheiten in *S. cerevisiae* und 12 Untereinheiten in humanen Zellen identifiziert werden konnten (Peters, 2006). Die in diesem Kapitel vorgestellten Untereinheiten des APC/C-Komplexes stammen aus *H. sapiens*. Essentielle Untereinheiten besitzen in anderen Organismen oft andere Bezeichnungen oder konnten bis dato noch nicht identifiziert werden.

1.5.1 Aufbau

Der APC/C-Komplex reguliert das Durchschreiten der verschiedenen mitotischen Phasen sowie den Eintritt in die S-Phase (Barford, 2011; Peters, 2006; Pines, 2011). Dennoch erscheint der komplizierte Aufbau des APC/C etwas überraschend, da viele andere RING-Finger-E3-Ligasen aus einer einzigen oder aus wenigen Untereinheiten bestehen und zeigen, dass die Ubiquitylierungsreaktion an sich keinen Multienzymkomplex benötigt (Passmore, 2004).

Aus seinen 12 Untereinheiten werden vier verschiedene Funktionsdomänen gebildet (Abb. 1.2). Die katalytische Domäne, die für die Ubiquitylierungsreaktion notwendig ist, besteht aus der Untereinheit Apc11 mit der RING-Domäne und der Untereinheit Apc2. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass Apc11 mit dem E2-Enzym Ubch5 ausreichen, um eine Polyubiquitylierung eines Substrates herbeizuführen (Gmachl, *et al.*, 2000; Levenson, *et al.*, 2000; Tang, *et al.*, 2001). Wurde Ubch10 als E2-Enzym verwendet, war zusätzlich noch Apc2 nötig (Tang, *et al.*, 2001). Die katalytische Domäne aus Apc11 und Apc2 ist somit *in vitro* hinreichend für die Ubiquitylierungsreaktion, weshalb anzunehmen ist, dass die restlichen Untereinheiten für die Regulation des APC/C-Komplexes und für die Substrat-Spezifität benötigt werden.

Hingegen wird der APC/C *in vivo* erst aktiv, wenn an die regulatorische Aktivator-domäne ein Co-Aktivatorprotein bindet. Für diese Bindung benötigt der Aktivator das IR-Motiv und die C-Box. Das IR-Motiv besteht aus den beiden Aminosäuren Ile-Arg (IR) am

C-Terminus des Aktivators und interagiert mit der Untereinheit Apc3, die zu den „*tetrice-peptide-repeat*“-Proteinen gehört (TPR-Proteine). Die C-Box ist ein Motiv aus acht Aminosäuren und stellt eine Verbindung mit der Gerüstdomäne her (Matyskiela, *et al.*, 2009). Die beiden am besten verstandenen mitotischen APC/C-Aktivatoren sind Cdc20 (Fzy in *Drosophila*) und Cdh1 (Fzr in *Drosophila*). Cdc20 aktiviert den APC/C in der frühen Mitose und bewirkt den Übergang von der Metaphase in die Anaphase, indem Securin und die mitotischen Cycline ubiquitinyliert werden. Cdh1 assoziiert mit dem APC/C in der späten Mitose und während der G1-Phase.

Die TPR-Domäne ist für Protein-Protein Wechselwirkungen bekannt und reguliert die Interaktion mit den Aktivatoren (Kraft, *et al.*, 2005; Matyskiela und Morgan, 2009; Vodermaier, *et al.*, 2003). Die Domäne setzt sich aus den drei essentiellen Untereinheiten Cdc27, Cdc16, Cdc23 zusammen, die teilweise mehr als einmal in einem Komplex vorkommen (Dube, *et al.*, 2005; Huang und Raff, 2002).

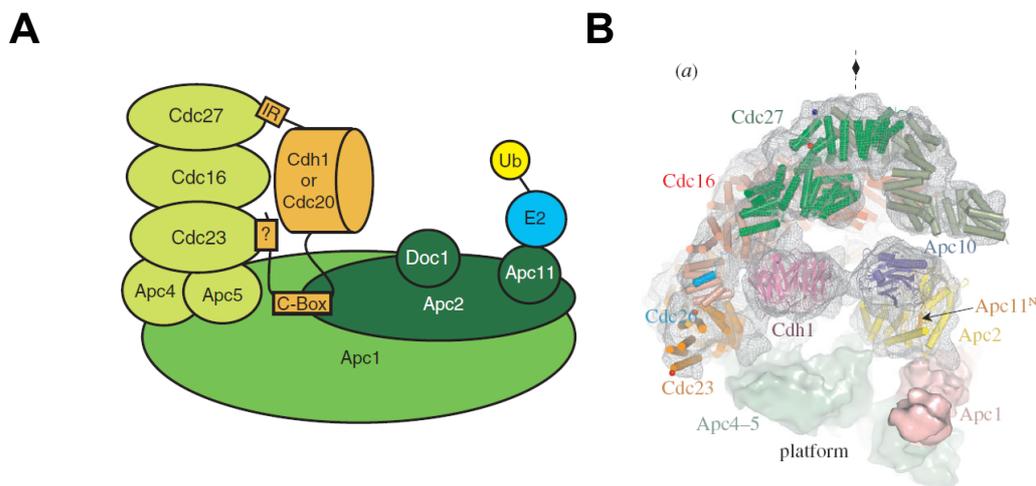


Abbildung aus Matyskiela et al., 2009

Abbildung aus Barford, 2011

Abbildung 1.2: Schematische Struktur des APC/C-Komplex

A) Der APC/C besteht aus mindestens 12 Untereinheiten und kann in mehrere Subkomplexe untergliedert werden. Er besteht aus der **katalytischen Domäne** (dunkelgrün) mit der Cullin-Untereinheit Apc2, der Untereinheit Apc10 (Doc1) und der Ring-Domäne Apc11, die für die Rekrutierung der E2-Enzyme notwendig ist. Ein anderer Subkomplex, die **TPR-Domäne** (hellgrün), enthält die *tetrice peptide repeats* (TPR-Proteine) Cdc23, Cdc16 und Cdc27, die mit Protein-Protein-Wechselwirkungen wahrscheinlich regulatorische Aufgaben übernehmen. Apc4 und Apc5 stellen die Verknüpfung mit dem restlichen APC/C über die **Plattform** Apc1 (grün) her. Über die TPR-Domäne können die beiden **Aktivatoren** Cdh1 und Cdc20 (orange) an mindestens zwei Stellen binden, dem Ile-Arg (IR) Motiv und der C-Box. Mithilfe der WD40-Domäne bildet der Aktivator zusammen mit Doc1 eine Substrat-Bindestelle aus, so dass das E2-Enzym in der Lage ist, das Ubiquitinmolekül an das Substrat zu übertragen.

B) Das „Pseudo-Atom-Modell“ zeigt die Anordnung der einzelnen Untereinheiten zueinander.

Ergänzend binden Spezies-abhängig einige weitere Untereinheiten, die entweder zur Komplexstabilität beitragen (Passmore, *et al.*, 2003; Schwickart, *et al.*, 2004; Zachariae, *et al.*, 1998b), die regulatorische Variabilität durch zusätzliche Interaktionsstellen in der TPR-Domäne erhöhen (Vodermaier, *et al.*, 2003) oder möglicherweise auch Substraten die Bindung ermöglichen (Hayes, *et al.*, 2006).

Die TPR-Domäne und die katalytische Domäne werden über die Gerüstdomäne miteinander verbunden. Die Domäne besteht aus den drei Untereinheiten Apc1, Apc4 und Apc5, ihre Funktionen sind allerdings noch unklar. Vermutlich gewährleistet die Gerüstdomäne den notwendigen Abstand für eine katalytische Aktivität als E3-Ligase.

1.5.2 APC/C-Erkennungssequenzen

Die meisten APC/C-Substrate, die in der frühen Mitose von APC/C^{Fzy/Cdc20} oder in der späten Mitose und in der G1-Phase von APC/C^{Fzr/Cdh1} erkannt und ubiquitinyliert werden, besitzen meistens eine „*destruction box*“ bzw. D-Box (Erkennungssequenz R-X-X-L-X-X-X-N/D/E, (Glotzer, *et al.*, 1991; King, *et al.*, 1996)) oder eine KEN-Box (Erkennungssequenz K-E-N-X-X-X-E/D/N, (Pfleger und Kirschner, 2000)). Die unterstrichenen Aminosäuren reichen dabei in den meisten Fällen bereits als Erkennungssequenz aus. Die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Aktivatoren Fzy/Cdc20 und Fzr/Cdh1 wird durch die Erkennungssequenzen ermöglicht, da Fzy/Cdc20 nur D-Box-Substrate erkennt und die KEN-Box vermutlich spezifisch für Fzr/Cdh1-Substrate ist. In einigen Fällen benötigen APC/C-Substrate sowohl eine D-Box als auch eine KEN-Box (Burton und Solomon, 2001; Hendrickson, *et al.*, 2001; Jacobs, *et al.*, 2001; Zur und Brandeis, 2001). Neben diesen beiden prominentesten Degrons konnten für einige Substrate weitere Degradationssignale identifiziert werden, so u.a. die A-Box (Littlepage und Ruderman, 2002), das GxEN-Motiv (Castro, *et al.*, 2003), die O-Box (Araki, *et al.*, 2005) und die CRY-Box, die erst nach einer Plk1-Phosphorylierung für eine APC/C^{Fzr}-Erkennung sorgt (Hyun, *et al.*, 2013; Reis, *et al.*, 2006).

Interessanterweise konnte in einigen Studien eine direkte Interaktion verschiedener Substrate mit den Aktivatoren *in vitro* nachgewiesen werden (Vodermaier, 2001). Verantwortlich für diese Interaktion ist die WD40-Domäne, die dadurch als wichtiger D-Box-Rezeptor identifiziert wurde (Kraft, *et al.*, 2005). Substrate können auch ohne Aktivatoren an den APC/C binden. Dies geschieht allerdings mit einer stark reduzierten Selektivität und Affinität (Eytan, *et al.*, 2006). In Hefen konnte die APC/C-Untereinheit Doc1 als ein weiterer Substrat-Rezeptor identifiziert werden, über den die Bindung der

Substrate in Abwesenheit der Aktivatoren ermöglicht wird (Carroll, *et al.*, 2005; Passmore, *et al.*, 2003). Durch die Deletion von Doc1 kann der APC/C keine Substrate mehr binden, obwohl die Bindefähigkeit der Aktivatoren an den APC/C-Komplex nicht eingeschränkt war (Passmore, *et al.*, 2003).

1.5.3 Die Rolle des APC/C bei der Zellteilung in *Drosophila*

Weil ein Proteinabbau zu einem falschen Zeitpunkt folgenschwere Konsequenzen für eine Zelle oder einen ganzen Organismus nach sich ziehen würde, wird die APC/C-Aktivität durch mehrere Regulationsmechanismen auf bestimmte Phasen im Zellzyklus begrenzt (Peters, 2006). Erst zu Beginn der Mitose wird der APC/C aktiv und kehrt erst am Ende der G1-Phase in seinen inaktiven Zustand zurück. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass Substrate des APC/C in Phasen seiner Inaktivität akkumulieren können und abgebaut werden, wenn sie ihre Funktion erfüllt haben.

1.5.3.1 Eintritt in die Mitose

Mit der Inaktivierung des APC/C-Komplexes beginnt die Zelle, die M-Phase Cycline A, B und B3 in der S- und G2-Phase zu synthetisieren. Diese binden an Cdk1 und ermöglichen dadurch die Aktivierung der Kinase, sofern sie durch einen zweiten Regulationsmechanismus den richtigen Phosphorylierungszustand erhalten haben. Cdk1 kann an verschiedenen Positionen phosphoryliert werden. Während die Phosphorylierung von Threonin 161 zur Aktivierung führt, inhibiert die Phosphorylierung am Threonin 14 oder Tyrosin 15 den Komplex. Welcher Phosphorylierungszustand vorliegt, hängt von der Balance der Kinasen Wee und Myt (Campbell, *et al.*, 1995; Mueller, *et al.*, 1995) und der Phosphatase Cdc25 ab (Russell und Nurse, 1986).

Im aktiven Zustand phosphoryliert Cdk1 zusammen mit der „*polo like kinase1*“ (Plk1) den APC/C-Komplex und trägt damit maßgeblich zu seiner Aktivierung bei. Nur im phosphorylierten Zustand kann der APC/C-Aktivator Fzy an den APC/C binden, was dazu führt, dass die Aktivität des APC/C^{Fzy} auf die Mitosephase begrenzt ist (Kramer, *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wird Fzr durch Phosphorylierung inaktiv gehalten (Peters, 2006). In der Prometaphase erfüllt der APC/C^{Fzy} hauptsächlich die Aufgabe CyclinA zu ubiquitinylieren. CyclinA wird abgebaut und die Cdk-Aktivität nimmt ab. Da CyclinA-Cdk1 den zweiten APC/C-Aktivator Fzr in einem phosphorylierten und damit inaktiven

Zustand hält (den_Elzen und Pines, 2001), ermöglicht die Inaktivierung von Cdk1 den Phosphatasen die inhibitorische Phosphorylierung von Fzr wieder aufzuheben.

Zu Beginn der Mitose wird der APC/C-Komplex allerdings noch über den „*spindle assembly checkpoint*“ (Spindelkontrollpunkt, kurz SAC) größtenteils inaktiv gehalten (Amon, 1999). Zwar können bestimmte Substrate wie CyclinA und Nek2A vom APC/C ubiquitinyliert werden, vollständig aktiv wird der APC/C^{Fzy} allerdings erst, wenn alle Kinetochore mit dem Spindelapparat assoziiert sind. Erst dann wird die Aktivität der Cdk1 vollständig heruntergefahren, da bis dahin die B-Typ-Cycline Cdk1 noch aktiv halten.

1.5.3.2 Austritt aus der Mitose

Die vollständige Aktivierung des APC/C^{Fzy} ermöglicht der Zelle den Abbau der B-Typ-Cycline und von Securin (*pimples* in *Drosophila*). Infolge des Securin-Abbaus wird die Separase aktiv und spaltet die Cohesin-Komplexe, die seit der S-Phase die Schwesterchromatiden zusammenhalten (Peters, *et al.*, 2008). Die Trennung der Schwesterchromatiden stellt eines der wichtigsten Ereignisse während der Mitose dar und bedeutet den Eintritt in die Anaphase (Manchado, *et al.*, 2010; Shah und Cleveland, 2000).

Zusätzlich wird durch den Abbau der B-Typ-Cycline eine niedrige Cdk-Aktivität erreicht, wodurch Fzr im nun unphosphorylierten Zustand an den APC/C binden kann. Fzy dissoziiert vom APC/C (Kramer, *et al.*, 2000) und wird zumindest in Säugerzellen durch eine Plk1-Phosphorylierung an der CRY-Box selbst zu einem Substrat des nun aktiven APC/C^{Fzr}-Komplexes (Hyun, *et al.*, 2013). In Hefen konnte ein zusätzlicher intramolekularer Mechanismus identifiziert werden, in dem sich Cdc20^{Fzy} autoubiquitinyliert und somit für einen schnelleren Wechsel hin zum APC/C^{Fzr} sorgt (Foe, *et al.*, 2011).

Der APC/C^{Fzr} bleibt von der späten Mitose bis zum Ende der G1-Phase aktiv und sorgt für eine niedrige Cdk1-Aktivität, da mitotische Cycline und andere Cdk-Regulatoren degradiert werden (Harper, *et al.*, 2002; Manchado, *et al.*, 2010).

Um aus der Mitose in die G1-Phase überzutreten, werden einige Substrate vom APC/C^{Fzr}-Komplex ubiquitinyliert, deren Abbau für den Austritt aus der Mitose notwendig ist. Zu diesen Substraten zählt neben der Plk1 unter anderem auch AuroraA. In der G1-Phase wird zum Beispiel der Inhibitor der DNA-Replikation Geminin als APC/C^{Fzr}-Substrat erkannt und abgebaut. Geminin wird zellzyklusabhängig vom G1/S-Übergang bis zum Ende der Mitose exprimiert und verhindert die Aufnahme von Mcm2-7 Proteinen in präreplikative Komplexe (McGarry und Kirschner, 1998). Dabei bindet Geminin

an das Protein Cdt1, das notwendig ist, um die Mcm2-7 Proteine an den „*origin of replication*“ (ori) zu rekrutieren. In der S-Phase bindet Geminin Cdt1 und wird ab dem Metaphase-Anaphase-Übergang abgebaut, um eine erneute Replikation im nachfolgenden Zellzyklus zuzulassen (Luo und Kessel, 2004).

Lange Zeit wurde angenommen, dass im Gegensatz zu Cdc20^{Fzy}, Cdh1^{Fzr} in Hefen nicht abgebaut wird und während des gesamten Zellzyklus vorhanden ist (Kramer, *et al.*, 1998). Neuere Studien zeigen aber, dass das phosphorylierte Cdh1^{Fzr} in der S-Phase über den SCF-Komplex abgebaut wird (Benmaamar und Pagano, 2005; Yamaguchi, *et al.*, 2000). Am G1/S-Phase Übergang muss der APC/C^{Cdh1/Fzr} jedoch wieder inaktiviert werden, damit APC/C-Substrate, die für die DNA-Replikation und den Eintritt in die Mitose benötigt werden, wieder akkumulieren können. Dies wird zum Teil über Phosphorylierung erreicht. Am Ende der G1-Phase sorgt die Expression von CyclinE für ein aktives CyclinE-Cdk2 und ein steigender CyclinA-Spiegel für aktives CyclinA-Cdk1 und CyclinA-Cdk2. Die Phosphorylierung von Cdh1^{Fzr} führt zur Dissoziation vom APC/C-Komplex (Jaspersen, *et al.*, 1999; Rape und Kirschner, 2004; Zachariae, *et al.*, 1998a). Widersprüchlich ist, dass CyclinA-Cdk1 nur in der G2-Phase und CyclinE-Cdk2 nur in der S-Phase aktiv ist (Reber, *et al.*, 2006). Für den humanen APC/C^{Cdh1}-Komplex konnte eine weitere Ebene der Regulation identifiziert werden. E2-Enzyme arbeiten eng mit dem APC/C-Komplex zusammen um Substrate zu ubiquitinylieren. Sobald in der G1-Phase der Großteil an Substraten abgebaut worden ist, wendet sich der APC/C-Komplex gegen seine eigenen E2-Enzyme UbcH10 und Ube2S. Der Abbau beider APC/C-spezifischen E2-Enzyme führt zwangsweise zur Inaktivierung der meisten APC/C^{Cdh1}-Komplexe am Ende der G1-Phase (Rape und Kirschner, 2004).

Neben diesem Mechanismus und der inhibierenden Phosphorylierung durch CyclinA-Cdk1 und CyclinE-Cdk2 gibt es einen zusätzlichen Inhibitor, der den APC/C^{Cdh1/Fzr} am Ende der G1-Phase inaktiviert und damit die S-Phase einleitet. In Vertebraten bindet der *early mitotic inhibitor 1* (Emi1) in der späten G1-Phase bis zum G2-M-Phase-Übergang als Pseudosubstratinhibitor an den APC/C^{Cdh1} (Hsu, *et al.*, 2002), während in *Drosophila* das orthologe Protein *regulator of cyclin A* (Rca1) für die Inhibierung von APC/C^{Fzr} verantwortlich ist (Dong, *et al.*, 1997; Grosskortenhaus und Sprenger, 2002).

1.6 Der Zellzyklusregulator Rca1

1.6.1 Entdeckung und Funktionsanalyse von Rca1

Zum ersten Mal in Erscheinung trat *rca1* in einem Screen für dominante Suppressoren des *roughex*-Augenphänotyps (Dong, *et al.*, 1997). *Roughex* ist ein CKI des CyclinA-Cdk1-Komplexes. Ein Defekt in diesem Gen führt in der Augenentwicklung zu einem rauen Augenphänotyp, weil der CyclinA-Cdk1-Komplex nicht mehr inhibiert werden kann und es dadurch zu ektopischen S-Phasen kommt (Dong, *et al.*, 1997; Thomas, *et al.*, 1997).

In diesem Screen wurde der raue Augenphänotyp durch eine Reduktion von Rca1 oder von CyclinE unterdrückt, während eine Überexpression von Rca1 und CyclinE ebenfalls zu diesem Phänotyp führte. Wird bei der Überexpression von Rca1 gleichzeitig CyclinA reduziert, kann der hervorgerufene Phänotyp wieder aufgehoben werden, während es andersherum nicht möglich war. Die Beobachtungen waren ein erster Hinweis darauf, dass Rca1 einen Einfluss auf die Aktivität des CyclinA-Cdk1-Komplexes hat (Dong, *et al.*, 1997).

Den Namen „*regulator of cyclin A*“ erhielt Rca1 aufgrund seines Phänotyps, der bei homozygoten *rca1*-Mutanten dem Phänotyp von CyclinA-Mutanten ähnelte. Embryonen von homozygoten *rca1*-Mutanten arretieren in der G2-Phase von Zellzyklus 16, was zu einer Reduktion an epidermalen Zellen führt (Dong, *et al.*, 1997; Lehner und O'Farrell, 1989). Verantwortlich für diesen verfrühten Zellzyklusarrest ist eine verfrühte Aktivierung des APC/C^{Fzr} (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). Um zu zeigen, dass der G2-Phase-Arrest auf einen verfrühten Abbau der mitotischen Cycline zurückzuführen ist, wurde ein CyclinA-Nachweis durchgeführt. In Wildtyp-Embryonen, in denen sich viele epidermale Zellen in der G2-Phase befinden und der APC/C^{Fzr} inaktiviert vorliegt, ist CyclinA mit einem spezifischen Antikörper nachweisbar, während in *rca1*²-Embryonen mit aktivem APC/C^{Fzr} kein CyclinA nachgewiesen werden kann (Radermacher, 2007).

Wird *fzr* in epidermalen Zellen deletiert, durchschreiten die Zellen einen weiteren Zellzyklus und arretieren erst in Zellzyklus 18 (Sigrist und Lehner, 1997). Dafür verantwortlich ist eine Stabilisierung von CyclinA in der G1-Phase, was einen verfrühten G1/S-Übergang auslöst, indem es die Funktion von CyclinE-Cdk2 übernimmt (Sprenger, *et al.*, 1997). Hingegen führt eine Überexpression von Fzr wiederum zu einem Arrest in der G2-Phase, wie es bereits bei den *rca1*-Mutanten gesehen werden konnte (Sigrist und Lehner, 1997).

Sowohl eine gemeinsame Überexpression von Rca1 und Fzr, als auch eine gemeinsame Deletion beider Gene können den Mutanten-Phänotyp wieder aufheben. In beiden Fällen zeigen die Embryonen verglichen mit Wildtyp-Embryonen eine normale Cyclin-Akkumulierung in der G2-Phase und eine ähnliche Anzahl an Epidermiszellen. Neben diesen Deletions- und Überexpressionsstudien in Embryonen, konnte auch biochemisch eine Interaktion zwischen Rca1 und Fzr nachgewiesen werden (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002).

Anhand dieser Daten wurde Rca1 als ein wichtiger Regulator für den Eintritt in die Mitose identifiziert. Rca1 inhibiert APC/C^{Fzr} in der G2-Phase, mitotische Cycline können akkumulieren, wodurch die beiden CyclinA-Cdk1- und CyclinE-Cdk2-Komplexe aktiviert werden und Fzr zusätzlich noch phosphorylieren (Dienemann und Sprenger, 2004; Zielke, 2006). Damit bewirken beide Mechanismen, Cdk-Phosphorylierung und Inhibition durch Rca1 eine vollständige Inaktivierung des APC/C-Komplexes in S- und G2-Phase, was letztendlich zum Eintritt in die Mitose führt.

1.6.2 Die F-Box-Funktion von Rca1 am G1/S-Phase-Übergang

Die Funktion von Rca1 scheint jedoch nicht auf die Inhibition des APC/C^{Fzr} in der G2-Phase und am G2-M-Übergang begrenzt zu sein. Im zentralen Bereich besitzt Rca1 eine funktionelle F-Box-Domäne, die womöglich als Adapterprotein in einem SCF-Komplex für die Erkennung und somit für die Ubiquitylierung und den proteasomalen Abbau von spezifischen Substraten notwendig ist. Bisher ist über die F-Box-Funktion von Rca1 wenig bekannt. Erste Hinweise deuten eine Beteiligung von Rca1 am G1/S-Übergang an, die F-Box-abhängig vermittelt werden könnte.

Die Überexpression von Rca1 in Augenimaginalscheiben führte in der Augenentwicklung zu ektoptischen S-Phasen und zu einem „raue Augen“-Phänotyp, allerdings nur, wenn ein Rca1 mit intakter F-Box verwendet wurde. Zusätzlich führte die Überexpression von Rca1 mit deletierter F-Box in *rca1*-Mutanten zu einem verspäteten S-Phase-Übergang (Zielke, 2006). Interessanterweise scheint die F-Box nicht nur eine Funktion am G1/S-Übergang zu besitzen, sondern könnte auch am G2/M-Phase-Übergang beteiligt sein, da eine nicht funktionale F-Box in der embryonalen Entwicklung zu einem G2-Phase-Arrest in Zellzyklus 16 führte (Kies, 2011). In Co-Immunpräzipitationen konnte eine F-Box-abhängige Interaktion von Rca1 mit SkpA nachgewiesen werden (Zielke,

2006), wodurch frühere Ergebnisse eines genomweiten *Yeast-two-hybrid*-Screens bestätigt werden konnten (Giot, 2003).

Fasst man all diese Ergebnisse zusammen, ist ein Modell denkbar, in dem Rca1 F-Box-abhängig als Teil eines SCF-Komplexes für den Abbau eines APC/C^{Fzr}-Inhibitors sorgen könnte. Rca1 wäre dadurch sowohl für den Eintritt in die S-Phase, als auch für den Eintritt in die Mitose mitverantwortlich. Ein potentielles SCF^{Rca1}-Zielprotein ist der CyclinE-Cdk2-Inhibitor Dacapo, da durch die Überexpression von Rca1 der Abbau von Dacapo zu beobachten war (Bauer, 2011). Dass Rca1 in der G1-Phase einen G1-S-Übergang induzieren kann, muss in weiteren Experimenten aber erst noch näher untersucht werden. Die bisher gesehenen Effekte von Rca1 am G1/S-Phase-Übergang basieren alle auf Überexpressionsstudien von Rca1 und müssen daher erst noch bestätigt werden.

1.6.3 Das Rca1-Ortholog Emi1

In *Drosophila* und in Vertebraten ist für die Etablierung und Aufrechterhaltung der G1-Phase ein Abbau der mitotischen Cycline zwingend notwendig (Jacobs, *et al.*, 2002; Lukas, *et al.*, 1999; Pimentel und Venkatesh, 2005). Diese Aufgabe übernimmt APC/C^{Fzr}. Um jedoch eine APC/C-Aktivität während der Mitose zu ermöglichen, müssen die Inhibitoren Rca1 in *Drosophila* und Emi in Vertebraten inaktiviert bzw. abgebaut werden. In Embryonen ist Rca1 nicht mehr zu detektieren, wenn sich alle epidermalen Zellen in der G1-Phase befinden. In früheren Zellzyklen ohne G1-Phase ist hingegen kein Abbau von Rca1 zu beobachten (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002).

Die molekularen Mechanismen, wie Rca1 die Inhibition des APC/C^{Fzr} in der S- und G2-Phase bewerkstelligt und wie Rca1 die Fähigkeit der Inhibition in der Mitose verliert, sind ebenso wenig verstanden, wie die Frage nach seinem Abbau in der G1-Phase. Über die Funktionsweise des orthologen Proteins Emi1 der Vertebraten, ist inzwischen mehr bekannt, weswegen ein Vergleich der beiden Proteine sinnvoll ist.

1.6.3.1 Die Rca1/Emi1-Familie

Obwohl Rca1 in einem direkten Sequenzvergleich nur eine 18%ige Identität und 27%ige Ähnlichkeit zu Emi1 nachgewiesen werden konnte (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002), sind sie in ihrer Größe und der Anordnung bzw. Ausbildung ihrer funktionellen Domänen sehr ähnlich. Auffällig ist die identische Lokalisierung der F-Box-Domäne im zentralen Bereich der Aminosäuresequenz und der bipartite Zink-

Binde-Region (ZBR) im C-terminalen Abschnitt beider Proteine. F-Box-Proteine binden als Adapterproteine an den SCF-Komplex und dienen dort der Erkennung von phosphorylierten Substraten (Jackson, *et al.*, 2000; Zachariae und Nasmyth, 1999). Die ZBR ist häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Charakteristisch für diese Domäne sind vier konservierte Cysteine in einem bestimmten Abstand zueinander. Zwischen F-Box und ZBR befinden sich in Rca1 noch drei weitere konservierte Strukturelemente, die auch in Emi1 vorhanden, aber an etwas anderer Stelle lokalisiert sind (Abb. 1.3). Sowohl die KEN-Box, als auch die D-Box (1.5.2) sind häufig in Substraten des APC/C-Komplexes zu finden (Pfleger und Kirschner, 2000). Allerdings handelt es sich bei der D-Box in Rca1 um keine hoch konservierte Domäne, wie ein Sequenzvergleich mit verschiedenen *Drosophila*-Spezies zeigen konnte. Im Gegensatz zu Rca1 interagiert Emi1 über die D-Box sowohl mit Cdc20 als auch mit Cdh1 (Miller, *et al.*, 2006; Reimann, *et al.*, 2001) und hält den APC/C^{Cdc20/Fzy}-Komplex in der frühen Mitose noch inaktiv (Moshe, *et al.*, 2011). Das dritte konservierte Strukturelement zwischen F-Box und ZBR von Rca1, das ebenfalls in Emi1 zu finden ist, ist die Erkennungssequenz DSGxxS für die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3). Sie spielt zum Beispiel beim Abbau der inhibitorischen Untereinheit I κ B des Transkriptionsfaktors NF κ B eine wichtige Rolle (Hattori, *et al.*, 1999). Zusätzlich enthält der N-Terminus von Rca1 eine bipartite Kernlokalisierungssequenz (NLS) für die Aufnahme in den Zellkern, während Emi1 zwei monopartite NLS-Sequenzen, jeweils eine im N-Terminus und eine im C-Terminus, besitzt.

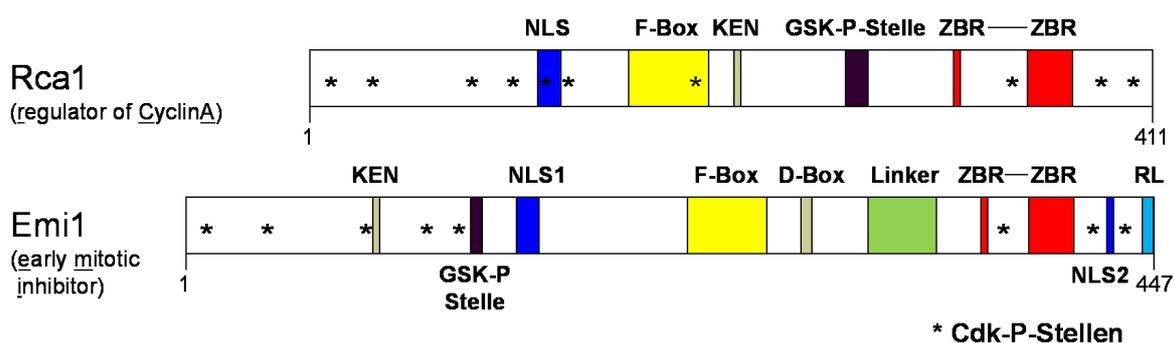


Abbildung 1.3: Struktureller Vergleich von Emi1 und Rca1

Schematische Darstellung der orthologen Proteine: *Drosophila*-Rca1 und *Vertebraten*-Emi1. Beide Proteine besitzen ähnliche funktionelle Domänen: **NLS** (Kernlokalisationssequenz), **F-Box** (SCF-Interaktionsmotiv), **D-Box** (wichtige Erkennungssequenz für APC/C-Substrate), **KEN-Box** (wichtige Erkennungssequenz für APC/C^{Fzy}-Substrate), **GSK-P-Stelle** (bei Emi1 Erkennungssequenz für den SCF ^{β TRCP}-vermittelten Abbau), **ZBR** (Zinkbinderegion, APC/C-Inhibition) und ***Cdk-P-Stellen** (mögliche Phosphorylierungsstellen der Cdk1)

In Emi1 sind des Weiteren vorhanden: **Linker** und **RL-Tail** (APC/C-Inhibition)

Weitere Regulationsmöglichkeiten ergeben sich mit den CDK-Phosphorylierungsstellen (S/T-P) in beiden Proteinen. Rca1 enthält insgesamt zehn potentielle CDK-Phosphorylierungsstellen, in Emi1 konnten acht identifiziert werden. Jeweils drei befinden sich in der Nähe der ZBR und zumindest für Emi1 konnte eine Phosphorylierung an dieser Stelle die Inhibierung beider APC/C-Komplexe wieder aufheben (Moshe, *et al.*, 2011). Als weitere notwendige Bereiche für die Inhibition des APC/C^{Fzy} konnten in Emi1 die Linker-Region und der RL-Tail ausfindig gemacht werden (Wang und Kirschner, 2013).

1.6.3.2 Die Regulation von Emi1

Sowohl Rca1 als auch Emi1 sind während der S- und G2-Phase beides Inhibitoren des APC/C^{Cdh1/Fzr}-Komplex und beiden konnte eine Funktion am G1/S-Phase-Übergang nachgewiesen werden (Hsu, *et al.*, 2002). RNAi-Experimente haben gezeigt, dass der Knock-down von Emi1 den Eintritt in die S-Phase verhindert, während die Überexpression von Emi1 eine Verkürzung der G1-Phase zur Folge hat. Emi1 wird am G1/S-Phase-Übergang über den Transkriptionsfaktor E2F transkribiert, wodurch CyclinA akkumulieren kann und der Zelle damit der Eintritt in die S-Phase ermöglicht wird (Hsu, *et al.*, 2002). In der G2-Phase bindet Emi1 mithilfe der D-Box als Pseudosubstrat an den D-Box-Rezeptor des APC/C und blockiert so die Bindung anderer Substrate (Miller, *et al.*, 2006). In einem *in vitro*-Ubiquitylierungsassay wurde Emi1 mit inaktiver ZBR selbst als Substrat des APC/C abgebaut, weshalb die ZBR den APC/C inaktiv hält und seinen eigenen Abbau verhindert (Miller, *et al.*, 2006). Ein weiterer wichtiger Bereich konnte in den letzten C-terminalen Aminosäuren (C-Tail oder kurz RL für die verantwortlichen Aminosäuren Arginin (R) und Leucin (L)) ausgemacht werden. Der RL wird für die Rekrutierung und die Positionierung von Emi1 an das katalytische Zentrum von APC/C benötigt und sorgt damit für eine stärkere Bindung an den D-Box Rezeptor (Wang und Kirschner, 2013). Die Hauptfunktion des C-Tails ist die kompetitive Bindung an die APC/C-Untereinheit APC2, wodurch die Bindung des E2-Enzyms Ube2S und somit die Polyubiquitylierung der Substrate verhindert wird (Wang und Kirschner, 2013). Eine Monoubiquitylierung durch UbcH10 wird hingegen nicht beeinträchtigt. In Strukturanalysen konnte zudem eine Linkerregion zwischen F-Box und ZBR ausfindig gemacht werden, die ebenfalls für eine richtige Positionierung notwendig ist (Frye, *et al.*, 2013). Die verschiedenen Domänen in Emi1 wirken zusammen, um die beiden APC/C-

Komplexe, in der G2-Phase den APC/C^{Cdh1/Fzr} und zu Beginn der Mitose den APC/C^{Cdc20/Fzy}, zu inhibieren.

Die Inhibitionsfähigkeit verliert Emi1 erst durch eine Phosphorylierung an den C-terminalen CDK-Phosphorylierungsstellen durch Plk1 und CyclinB-Cdk1 (Moshe, *et al.*, 2011). Interessanterweise geschieht dies unabhängig vom Abbau, da eine aktive aber stabile Form von Emi1 die Inhibierung nicht aufrechterhalten konnte. Die Phosphorylierung tritt spezifisch nur in der Mitose auf und wird in S- und G2-Phase wahrscheinlich durch ein noch unbekanntes Protein geschützt oder durch eine Phosphatase revertiert (Moshe, *et al.*, 2011).

1.6.3.3 Der Abbau von Rca1 unterscheidet sich von Emi1

Während der S- und G2-Phase wird der Abbau von Emi1 über den stabilisierenden Faktor Evi5 verhindert. Das Evi5-Protein akkumuliert zu Beginn der G1-Phase und bindet in der S-Phase direkt neben der GSK3-Phosphorylierungsstelle von Emi1. Dadurch blockiert Evi5 sowohl die Phosphorylierung des Degrons DSGxxS durch die Polo-like Kinase 1, als auch die Bindestelle für die SCF^{βTRCP} und verhindert die Ubiquitinierung durch den SCF-Komplex (Eldridge, *et al.*, 2006). Der Abbau von Emi1 wird mit der Phosphorylierung der konservierten CDK-Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Bereich durch CyclinB-Cdk1 eingeleitet. Evi5 dissoziiert ab und gibt dadurch die Phosphorylierungsstelle für die Polo-like Kinase 1 frei. Die anschließende Phosphorylierung des DSGxxS-Motivs erkennt der SCF-Komplex mithilfe des Adaptermoleküls βTRCP und markiert Emi1 für den proteasomalen Abbau (Guardavaccaro, *et al.*, 2003; Hansen, *et al.*, 2004; Margottin-Goguet, *et al.*, 2003).

Der Abbau von Rca1 scheint einem anderen Weg zu folgen. Da weder CDK-Phosphorylierungsstellen noch die GSK3-Phosphorylierungsstelle einen Einfluss auf die Stabilität besitzt (Radermacher, 2007), scheidet der SCF vermittelte Abbau von Rca1 über β-TRCP aus. In einem *in vitro*-Ubiquitinierungssassay konnte Emi1 durch eine Punktmutation in der ZBR von einem Inhibitor zu einem Substrat des APC/C-Komplexes verwandelt werden (Miller, *et al.*, 2006). Ein solcher Weg ist auch für Rca1 denkbar. Da Rca1 in *Drosophila*-Embryonen erst in der frühen G1-Phase abgebaut wird, könnte Rca1 über eine Modifikation zuerst die inhibitorische Wirkung auf den APC/C^{Fzr} verlieren und in der frühen G1-Phase durch die KEN-Box selbst zu einem Substrat des APC/C^{Fzr} werden.

1.6.4 Identifizierung der Abbausequenz in Rca1

Rca1 wird zu Beginn der G1-Phase abgebaut und ist in epidermalen Zellen, die zum ersten Mal in die G1-Phase des Zellzyklus 17 eintreten, nicht mehr detektierbar (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). Für die Identifizierung der Abbausequenz wurden verschiedene Rca1-Deletionen und Rca1-Punktmutationen auf ihre Stabilität in der G1-Phase in den epidermalen Zellen von Embryonen untersucht. Neben der Mutation der zehn CDK-Phosphorylierungsstellen führte auch eine Punktmutation in der GSK3-Phosphorylierungsstelle zu keiner Stabilisierung von Rca1 in der G1-Phase. Somit wird Rca1 aller Wahrscheinlichkeit nach über einen anderen Mechanismus abgebaut als Emi1 (Zielke, 2006). Um die Abbausequenz einzuschränken, wurden N-terminale Deletionen vorgenommen. Während die ersten 203 Aminosäuren keinen Einfluss auf den Abbau besitzen, führt eine Deletion der ersten 255 Aminosäuren zu einer Stabilisierung in der G1-Phase (Zielke, 2006). In dem Bereich zwischen Aminosäure 203-255 liegt neben der GSK3-Phosphorylierungsstelle, die nur für Emi1 wichtig ist (Hansen, *et al.*, 2004; Moshe, *et al.*, 2004), auch die KEN-Box, die als generelle Erkennungssequenz für den APC/C^{Fzr} gilt (Pfleger und Kirschner, 2000). Aber auch die Mutation der KEN-Box in Rca1, sowie in dem um 203 Aminosäuren verkürzten Rca1 (Rca1_Del-1-203), führte zu keiner ersichtlichen Stabilisierung. Weitere N-terminale Verkürzungen ergaben eine Stabilisierung bei Rca1_Del-1-234. In diesem Bereich sind mehrere Aminosäuren, die posttranslational modifiziert werden können und so einen Abbau von Rca1 einleiten können (Radermacher, 2007).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Aktivierung des APC/C-Komplexes durch die Bindung von Fzy leitet die Mitose ein. Für die Etablierung der G1-Phase wird in der späten Mitose Fzy durch Fzr ersetzt. In vorherigen Arbeiten konnte Rca1 als ein Inhibitor des APC/C^{Fzr} identifiziert werden. Mit Aktivierung des APC/C verliert Rca1 allerdings seine inhibitorische Wirkung was im späteren Verlauf den Eintritt in die G1-Phase erst ermöglicht. Ein Sequenzvergleich mit dem APC/C-Inhibitor Emi1 aus Vertebraten zeigt mehrere Domänen, die beide Inhibitoren gemeinsam besitzen. Aber während Emi1 über zwei dieser Domänen durch den SCF^{βTRCP}-vermittelten Abbau degradiert wird, konnten Struktur- und Funktionsanalysen einen Abbau von Rca1 über SCF^{βTRCP} nicht bestätigen. Bis jetzt konnten weder der Mechanismus, noch die Abbau-vermittelnden Elemente identifiziert werden.

In früheren Arbeiten wurde die Stabilität der Rca1-Derivate mittels Antikörperfärbung in *Drosophila*-Embryonen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Zellkultursystem etabliert werden, mit dem die Kinetik des Rca1-Abbaus mithilfe des „*live-cell-imaging*“ unter dem Mikroskop direkt verfolgt und in sogenannten Abbaukurven festgehalten werden konnte. Anhand dieser Quantifizierung sollte der Abbau von Rca1 mit anderen Proteinen, die ebenfalls in der G1-Phase abgebaut werden, verglichen werden. Ziel war es, über den direkten Vergleich der Abbaukinetiken Hinweise über den Abbaumechanismus von Rca1 zu erhalten. Neben *live-cell-imaging* sollte mit der Durchflusszytometrie eine zweite Methode etabliert werden, um die erhaltenen Stabilitätswerte der untersuchten Rca1-Derivate zu bestätigen und die verantwortlichen Abbausequenzen weiter einzugrenzen. Da die für den Abbau von Emi1 verantwortlichen Domänen für den Abbau von Rca1 nicht relevant sind, sollte anhand von N- und C-terminalen Deletionen ein kleinstes abbaubares Rca1-Fragment identifiziert werden. In diesem kurzen Rca1-Fragment sollten weitere Studien zur Identifizierung der Region führen, die für den Abbau verantwortlich sind.

Nachdem in einem *in vitro*-Ubiquitylierungsassay Emi1 durch eine Punktmutation in der ZBR von einem Inhibitor zu einem Substrat des APC/C-Komplexes verwandelt werden konnte (Miller, et al., 2006), ist auch für Rca1 eine Umwandlung zu einem Substrat des APC/C^{Fzr} denkbar. Dieser mögliche Abbaumechanismus sollte in diversen Funktionsanalysen untersucht werden, um weitere Hinweise zu sammeln, dass es sich bei Rca1 um ein Substrat des APC/C-Komplexes handelt.

Eine wichtige Methode, um Rca1 letztendlich als Substrat des APC/C-Komplexes zu identifizieren, ist ein *Drosophila*-spezifischer *in vitro*-Ubiquitylierungsassay, der in dieser Arbeit entwickelt werden sollte. Neben der Identifizierung von Rca1 als Substrat des APC/C-Komplexes könnte der Assay auch dazu verwendet werden, die inhibitorische Domäne von Rca1 ausfindig zu machen. Ebenso hilfreich wäre der Assay für die Aufklärung der Abbausequenz.

2 Ergebnisse

2.1 Der Abbau von Rca1 erfolgt in der G1-Phase

Während der Embryogenese von *Drosophila* beginnt der Abbau von Rca1 beim Übergang der Mitose 16 zur G1-Phase von Zellzyklus 17. In dieser Phase der embryonalen Entwicklung befinden sich alle epidermalen Zellen in der ersten G1-Phase und HA-Rca1, das mithilfe der ubiquitären *armadillo*-Gal4 (*arm*-Gal4) Treiberlinie in Embryonen exprimiert ist, ist nicht mehr zu detektieren (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). In früheren embryonalen Zellzyklen ist in Abwesenheit einer G1-Phase kein Abbau von HA-Rca1 zu beobachten. Bis jetzt war unklar, zu welchem Zeitpunkt der Abbau von Rca1 eingeleitet wird, da HA-Rca1 in Embryonen nicht live verfolgt werden kann, sondern durch eine Antikörperfärbung gegen das HA-Epitop nur eine Momentaufnahme möglich war (Radermacher, 2007).

2.1.1 Der Abbau von Rca1 in Embryonen

Um den Zeitpunkt des Rca1-Abbaus näher zu untersuchen wurde ein Fliegenstamm hergestellt, der Rca1-GFP mithilfe der ubiquitären *armadillo*-Gal4 (*arm*-Gal4) Treiberlinie in Embryonen exprimiert. Die schematische Darstellung des Fluoreszenzproteins Rca1-GFP ist in Abb. 2.1 A gezeigt. Zugleich exprimierte diese Treiberlinie ein RFP-epitopmarkiertes Histon, welches zellzyklusunabhängig in konstanter Menge im Zellkern vorhanden ist und als Kontrollprotein Verwendung fand. Für die Lebendzellbeobachtung – zukünftig auch als „live-cell-imaging“ bezeichnet – wurden 6-12 h alte Embryonen vorbereitet und Z-Stapel aufgenommen. Von diesen Bildern wurde eine Maximalprojektion durchgeführt und als Film gespeichert (Film 1 und 2 in beiliegender CD).

Da während der Gastrulation der embryonalen Entwicklung der Embryo in Bewegung ist und die Zellen aus der Ebene wandern, ist es schwierig eine Einzelzelle zu verfolgen, zumal das Signal von Rca1-GFP mit der Zeit verschwindet. Mithilfe des im Zellkern lokalisierten und unabhängig vom Zellzyklus konstitutiv exprimierten, stabilen Histon-RFP wird eine zeitliche Verfolgung einer einzelnen Zelle jedoch möglich und Mitosestadien können gut erkannt werden (Abb. 2.1).

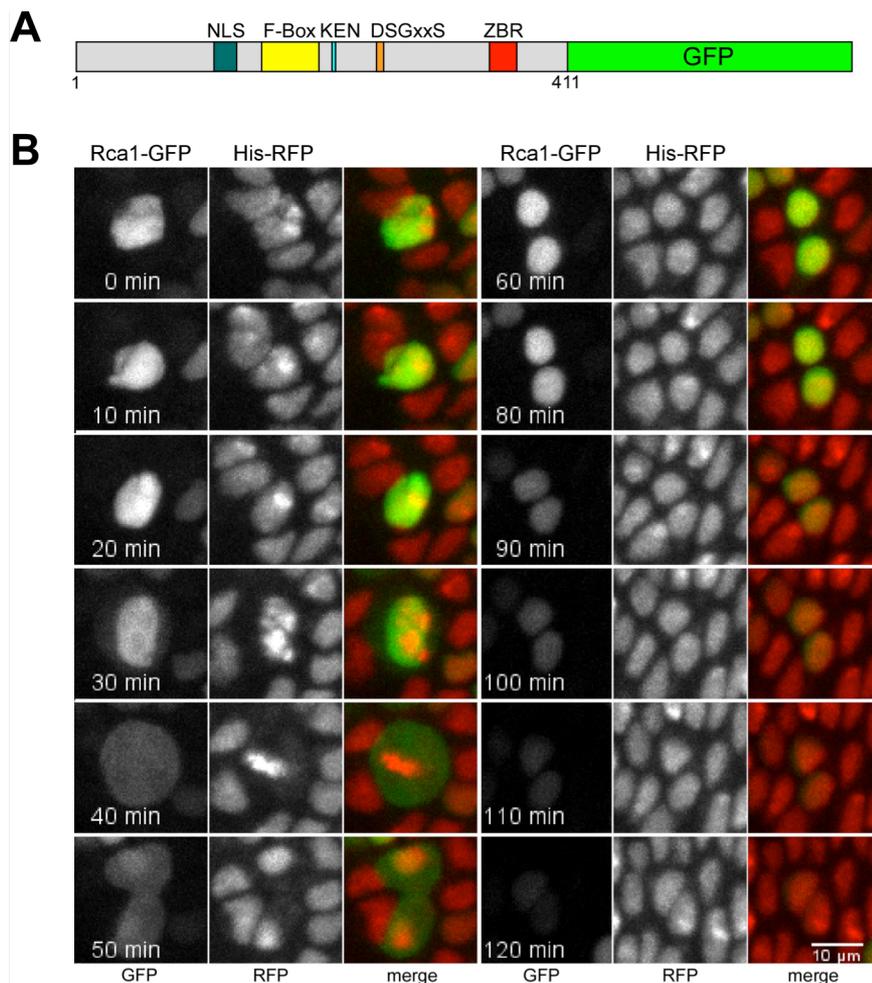


Abbildung 2.1: Rca1-GFP wird in der G1-Phase des Zellzyklus 17 in Embryonen abgebaut

A: Schematische Darstellung des exprimierten Fluoreszenz-markierten GFP-Fusionsproteins
B: Für die Analyse des Abbaus von Rca1-GFP wurden von einem Embryo, der sowohl das dargestellte Protein als auch ein mit RFP-epitopmarkiertes Histon (His-RFP) exprimiert, in einem Abstand von 10 Minuten lebend Aufnahmen gemacht. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz, sowie die farblich markierte Überlagerung der beiden Kanäle GFP (grün) und RFP (rot). Zu Beginn der Aufnahme befindet sich die Zelle in der Interphase (0 min). Gut erkennbar ist die Auflösung der Kernhülle (40 min), die Zytokinese (50 min) und die Neubildung der Kernhülle in den beiden neu entstandenen Zellen (50-60 min). Rca1-GFP wird in den Zellkern aufgenommen und dort im Verlauf der G1-Phase abgebaut (60-120 min), während das Fluoreszenzsignal von Histon-RFP konstant bleibt (10-120 min).

In jedem Zeitabschnitt ist neben dem GFP- und dem RFP-Kanal in Grauton auch die Überlagerung beider Kanäle farblich abgebildet. Dabei wurde Rca1-GFP in grün und Histon-RFP in rot dargestellt (Abb. 2.1 B). Zu Beginn der Aufnahme befindet sich die Zelle in der Interphase und Rca1-GFP ist aufgrund der enthaltenden NLS-Sequenz im Zellkern lokalisiert (t=0 min). Nach Auflösung der Kernmembran in der Mitose ist Rca1 gleichmäßig in der Zelle verteilt und wird nach Vollendung der Zytokinese wieder in

den Zellkern aufgenommen ($t=60$ min). Der Abbau von Rca1 beginnt im Verlauf der G1-Phase ($t=60-120$ min). Das Fluoreszenzsignal von Histon-RFP bleibt hingegen über den gesamten Verlauf der Aufnahmen konstant.

Diese Daten zeigen, dass Rca1-GFP genauso wie HA-Rca1 während der ersten G1-Phase in der Embryonalentwicklung abgebaut wird.

2.1.2 Der Abbau von Rca1 in Schneiderzellen

Ein Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Identifizierung bzw. der Eingrenzung der Aminosäuresequenzen in Rca1, die für dessen Abbau notwendig sind. Dafür wurden verschiedene Rca1-Mutanten und Rca1-Deletionen erstellt und auf ihre Stabilität in der G1-Phase untersucht. Anstatt die Rca1-Derivate aufwendig in *Drosophila*-Embryonen zu untersuchen, steht in der Zellkultur eine schnelle und einfache Methode zur Verfügung, den Abbau zu verfolgen.

Zu Beginn wurde der Frage nachgegangen, ob der Abbau von Rca1 in Schneiderzellen mit dem Abbau in *Drosophila*-Embryonen vergleichbar ist. Weil der Abbau von Rca1-GFP in Embryonen bereits gezeigt werden konnte (Abb. 2.1), wurde mit der Untersuchung von Rca1-GFP in Schneiderzellen begonnen. Generell wurden Zellkulturzellen über transiente Transfektionen mit verschiedenen Fluoreszenz-epitopmarkierten Rca1-Derivaten transfiziert und der Abbau am Mikroskop live verfolgt. Die Aufnahmen erstreckten sich über bis zu 48 Stunden, in denen kein signifikanter Bleicheffekt festzustellen war (Film 3 in beiliegender CD). Neben einem GFP-markierten Rca1-Derivat wurde häufig Rca1-3xCherry als eine Referenz für den Abbau eines Rca1 voller Länge verwendet (Abb. 2.2 A).

Von den transient transfizierten Zellen wurden Z-Stapel aufgenommen und die Summenprojektionen erstellt. In Abbildung 2.2 B ist eine Zelle exemplarisch dargestellt.

Zu Beginn der Aufnahme befindet sich die Zelle in der Interphase ($t=0$ min) und durchläuft in den dargestellten Zeitabschnitten eine Zellteilung. In der Mitose kommt es zur Auflösung der Kernhülle und die beiden starken Signale verteilen sich über die gesamte Zelle ($t=20$ min). Mit der Zytokinese ($t=60$ min) wird die Zellteilung vollendet und die neuen Kernhüllen bilden sich aus ($t=80$ min). Sowohl Rca1-GFP als auch Rca1-3xCherry werden anschließend in den Zellkern transportiert. Ab diesem Zeitpunkt wird sowohl Rca1-GFP als auch Rca1-3xCherry im weiteren Verlauf abgebaut. Dies geschieht zu einem Zeitpunkt, in dem sich die Zelle in der G1-Phase befindet.

Der Abbau von Rca1-GFP in Schneiderzellen ähnelt dabei dem Abbau von Rca1-GFP in Embryonen. In beiden Fällen reakkumuliert Rca1-GFP zuerst in den sich neu formierenden Zellkernen, bevor die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals in Embryonen und in Schneiderzellen im Laufe der G1-Phase abnimmt (Film 4 in beiliegender CD). Der Zeitpunkt des Abbaus stimmt überein, weshalb Studien über Rca1 in Schneiderzellen durchgeführt werden können.

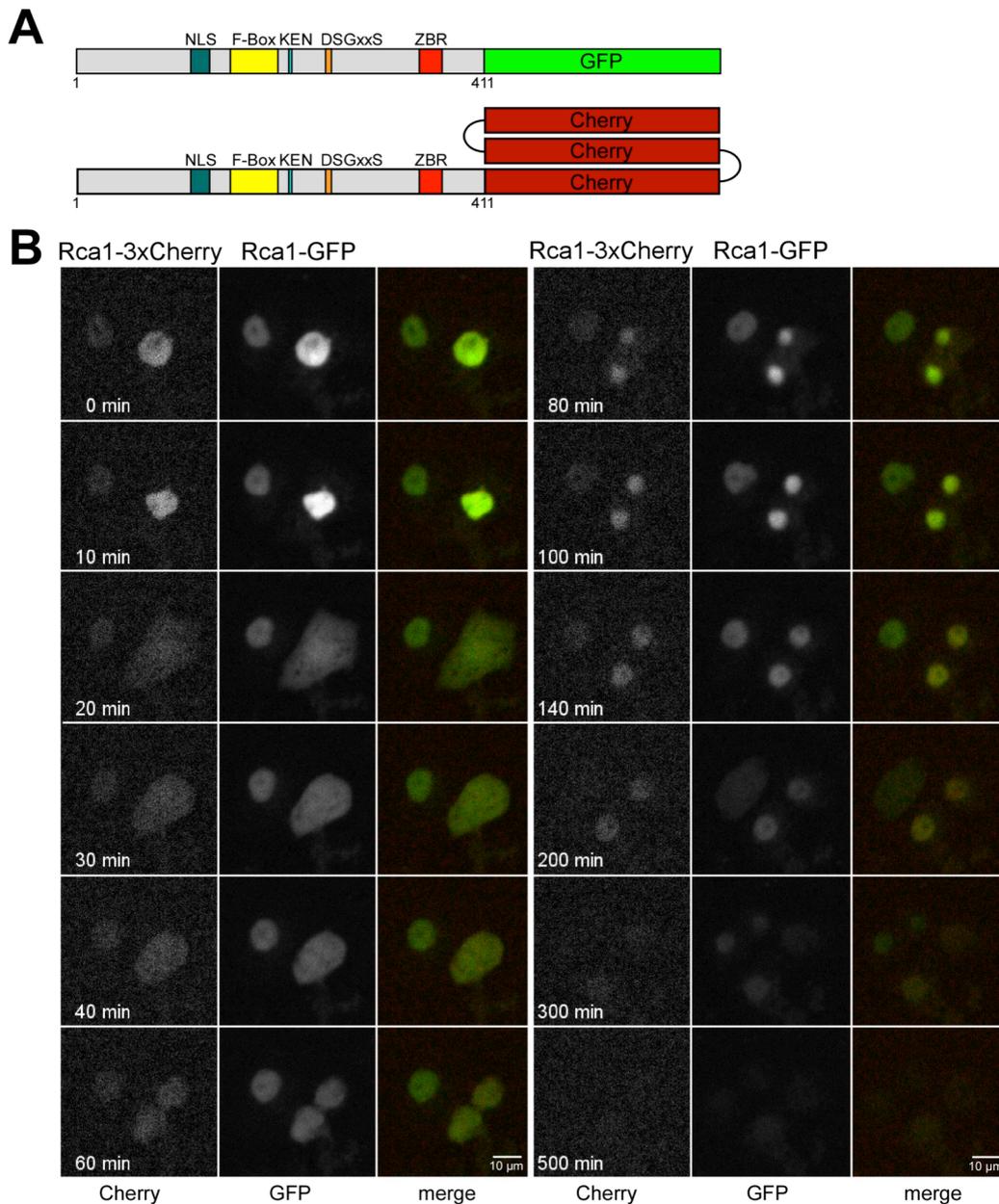


Abbildung 2.2: Rca1 wird in Schneiderzellen in der G1-Phase abgebaut

A: Schematische Darstellung der exprimierten Fluoreszenz-markierten Rca1-Proteine Rca1-GFP und Rca1-3xCherry

B: Nach Auflösung der Kernmembran kommt es zur Verteilung beider Rca1-Fusionsproteine in der gesamten Zelle. Nach der Mitose akkumulieren beide Proteine wieder im Kern (80-100 min). Danach wird das Fluoreszenzsignal kontinuierlich schwächer. Da benachbarte Zellen (außerhalb des gezeigten, aber beleuchteten Ausschnittes) weiterhin stark fluoreszieren, ist die Abnahme des Fluoreszenzsignals auf den Abbau der Proteine zurückzuführen. Für die Analyse des Abbaus von Rca1-GFP in Schneiderzellen wurde sowohl Rca1-GFP, als auch ein C-terminales 3xCherry-epitopmarkiertes Rca1-Kontrollprotein, Rca1-3xCherry, exprimiert und in einem Abstand von 10 Minuten lebend Aufnahmen gemacht.

2.2 Rca1 – ein Substrat des Anaphase-Promoting-Komplex

Rca1 ist ein Inhibitor des APC/C^{Fzr} Komplex (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002) und führt während der G2-Phase zu dessen Inaktivierung. In der G1-Phase wird jedoch die Aktivität von APC/C^{Fzr} benötigt. Dies steht auch in zeitlicher Nähe zum Abbau von Rca1, was bedeuten könnte, dass in der G1-Phase Rca1 selbst zum Substrat des APC/C^{Fzr} wird. Um diese These zu verfolgen, soll zunächst der Rca1-Abbau mit dem Abbau anderer APC/C^{Fzr}-Substrate in der G1-Phase verglichen werden.

2.2.1 Die quantitative Analyse des Rca1-Abbaus durch Abbaukurven

Um den Abbau von Rca1 und APC/C^{Fzr}-Substraten quantitativ vergleichen zu können, wurden Schneiderzellen mit Plasmiden transient transfiziert, von denen die entsprechenden Proteine Fluoreszenz-markiert exprimiert wurden. Durch live-cell-imaging wurden Zellen über mehrere Zellteilungszyklen verfolgt und die Fluoreszenzsignale anschließend quantitativ ausgewertet. Von diesen Werten konnten schließlich sogenannte „Abbaukurven“ erstellt werden.

2.2.1.1 Erstellung einer Abbaukurve am Beispiel HA-NLS-GFP-Rca1

In Abbaukurven wird der Verlauf der Fluoreszenzintensität von GFP- oder Cherry-markierten Proteinen in einer Zelle über einen Zeitraum dargestellt. Um verschiedene Zellen miteinander vergleichen zu können, wurde der Beginn der Anaphase, wenn sich die Zellform von kugelig nach ellipsoid verändert, als Zeitpunkt $t=0$ bestimmt. Dieser Zeitpunkt wurde weiterhin als 100%-Wert der Signalintensität definiert. In Abbildung 2.3 sind für fünf Zellen, die HA-NLS-GFP-Rca1 exprimieren, die individuellen Abbaukurven dargestellt.

Oft ist zu beobachten, dass kurz vor Beginn der Anaphase die Signalstärke abnimmt und kurz darauf wieder ansteigt. Dieses Verhalten ist auf die Auflösung und Neubildung der Kernmembran zurückzuführen. Das im Kern konzentrierte Fluoreszenzprotein verteilt sich bei der Auflösung der Kernmembran auf die komplette Zelle. Durch diese Verteilung des Fluoreszenzsignals auf ein Vielfaches des ursprünglichen Volumens fallen eventuell einige Signale unter den Schwellenwert, der für die Quantifizierung benutzt wurde, so dass die Gesamtfluoreszenzintensität scheinbar abnimmt. Dieser Effekt ist

jedoch in den meisten Fällen sehr transient, vor allem wenn kernlokalisierte Proteine verfolgt werden.

Die Expressionsstärke bei der transienten Expression zeigt hohe Variabilität, da verschiedene Mengen an Plasmid von einer Zelle aufgenommen werden. Wird das Fluoreszenzsignal außerhalb einer Zelle (Hintergrundsignal) bestimmt, kann die Expressionsstärke zweier Zellen miteinander verglichen werden. Das Verhältnis GFP- zu Hintergrundsignal in Abbildung 2.3 zeigt, dass selbst bei Signalen, die fünffach über dem Hintergrundsignal liegen, keine signifikante Veränderung in der Abbaukurve erkennbar ist. Aus den fünf Einzelkurven wurden zu jedem Zeitwert die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet und so eine sogenannte „Abbaukurve“ generiert. In Abbildung 2.4 ist die Abbaukurve für HA-NLS-GFP-Rca1 abgebildet. Die rote Linie markiert den Zeitwert, an dem die Signalintensität um die Hälfte gefallen ist ($t=75$ min). Die grüne Linie entspricht dem Endwert, der in diesem Fall nach 150 Minuten erreicht worden ist. Nach diesem Zeitpunkt konnte kein weiterer signifikanter Abbau mehr festgestellt werden.

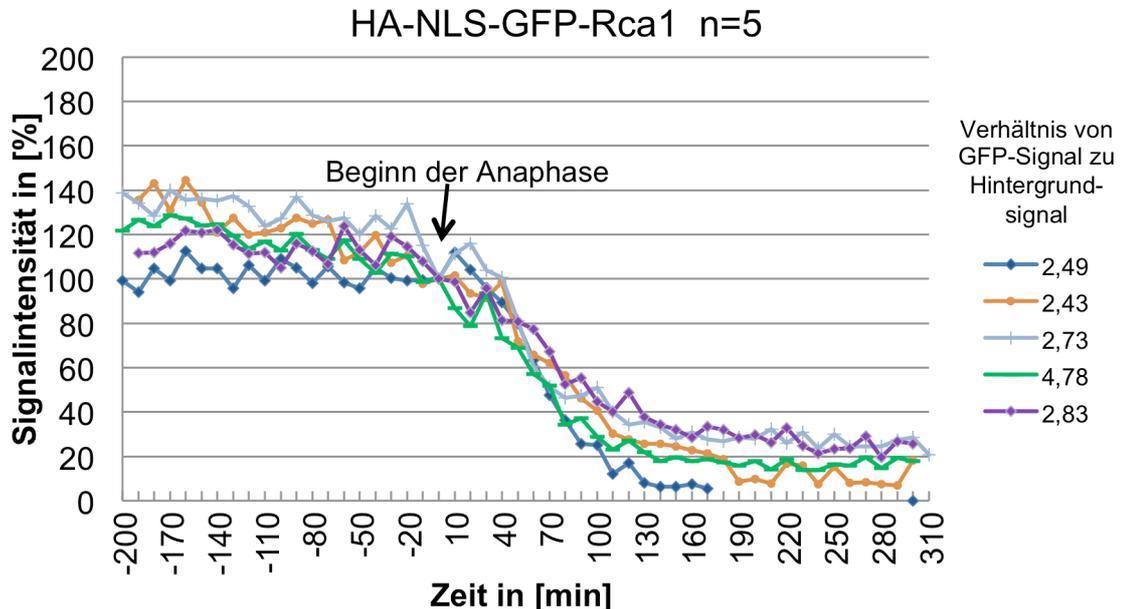


Abbildung 2.3: Abbaukurven von fünf Einzelzellen, die HA-NLS-GFP-Rca1 exprimieren

Der Zeitpunkt $t=0$ min wurde dem ersten Anzeichen der Teilungsfurche zugeordnet und diesem die Signalintensität von 100% zugewiesen (Pfeil). Die Zahlen der Legende verdeutlichen die Signalstärke jeder Zelle im Verhältnis zwischen GFP- und Hintergrundsignal, um die Varianz der Signalintensität darzustellen.

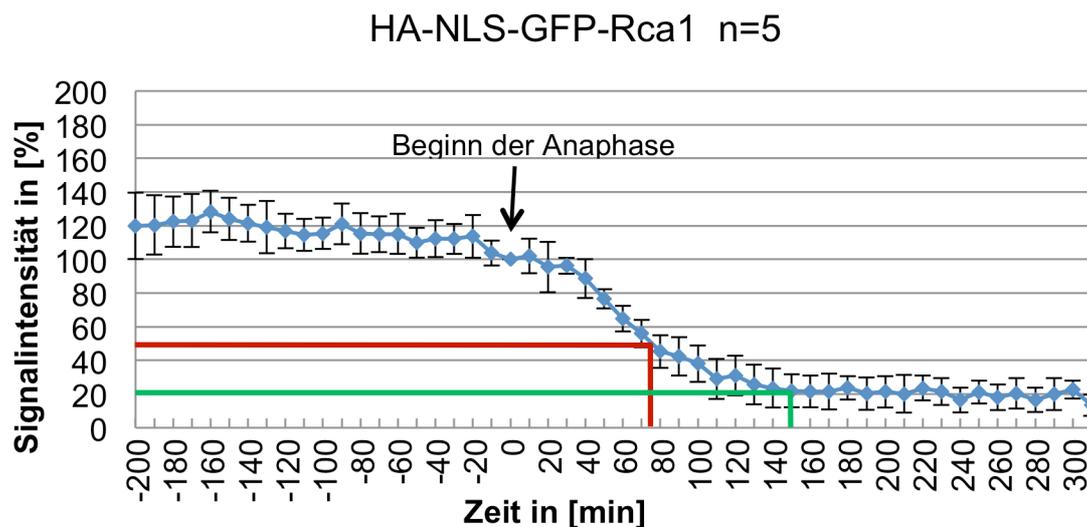


Abbildung 2.4: Abbaukurve von HA-NLS-GFP-Rca1, generiert aus fünf Einzelkurven

Aus der Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der fünf einzelnen Zellen (Abb 2.3) wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet und so die Abbaukurve für HA-NLS-GFP-Rca1 generiert. Die Zeitpunkte, bei denen die Signalintensität auf 50% bzw. auf den minimalen Endwert (in dem Fall 20%) gefallen sind, sind in rot bzw. grün markiert.

2.2.1.2 Abbaukurven verschiedener Epitopmarkierungen

Die Fusion eines recht großen Epitops an das C- bzw. N-terminale Ende eines Proteins hat häufig Auswirkungen auf die Funktionalität oder die Stabilität, da wichtige regulatorische Regionen oder Bindedomänen des Proteins blockiert sein können. Auch die korrekte Faltung bei der Entstehung des Proteins kann durch das Epitop negativ beeinflusst sein, was häufig zu einer Destabilisierung führt. So zeigte sich in früheren Studien, dass eine C-terminale Fusion des APC/C-Substrates CyclinB_Del-286-530 mit einem einfachen Cherry-Epitop gut abgebaut werden konnte, ein C-terminales Dreifachepitop den Abbau deutlich verlangsamt und eine N-terminale Fusion mit 3xCherry sogar zu einer kompletten Stabilisierung führte (Kawall, 2010).

In dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene Fluoreszenz-Epitopmarkierungen an Rca1 getestet und anhand von Abbaukurven deren Einfluss auf die Stabilität von Rca1 untersucht. Dazu wurden Schneiderzellen mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert, induziert und aus den live-cell-imaging-Aufnahmen 10 Zellen für die Erstellung der Abbaukurven verwendet.

Der Abbau der verschiedenen epitopmarkierten Rca1-Proteine setzt zeitgleich etwa 40 Minuten nach Beginn der Anaphase ein. Aber im Vergleich zu den C-terminal markierten Rca1-GFP/3xCherry geschieht der Abbau des N-terminal markierten HA-NLS-

GFP-Rca1 deutlich schneller. Nach 80 Minuten hat es die Hälfte der Signalintensität verloren und nach 150 Minuten bereits den minimalen Endwert erreicht, ab dem kein weiterer signifikanter Abbau mehr erfolgt. Zu diesem Zeitpunkt erreichte der Abbau von Rca1-GFP und von Rca1-3xCherry hingegen nur 50%. Genauso wie HA-NLS-GFP-Rca1 erreicht auch das C-terminal markierte Rca1 den gleichen minimalen Endwert von 20%, allerdings erst nach 300 Minuten (Abb. 2.5).

C-terminale Fluorochrome führen zu einem inaktiven Rca1 (Grosskortenhans und Sprenger, 2002) und verlangsamen den Abbau von Rca1. Werden die Abbaukurven von Rca1-GFP und Rca1-3xCherry miteinander verglichen, fällt auf, dass der Abbau mit nahezu identischer Kinetik verläuft und diese Proteine deutlich langsamer abgebaut werden als HA-NLS-GFP-Rca1.

Ein N-terminales GFP-Epitop beeinflusst dagegen die Aktivität von Rca1 nicht (2.3.1.3.1). Deshalb wurde in den späteren Experimenten das N-terminale HA-NLS-GFP verwendet. Um den Abbau von Rca1 mit anderen Substraten des APC/C^{Fzr} zu vergleichen, wurde dagegen das im Abbau etwas verlangsamte Rca1-3xCherry eingesetzt, da die anderen Substrate mit GFP markiert waren.

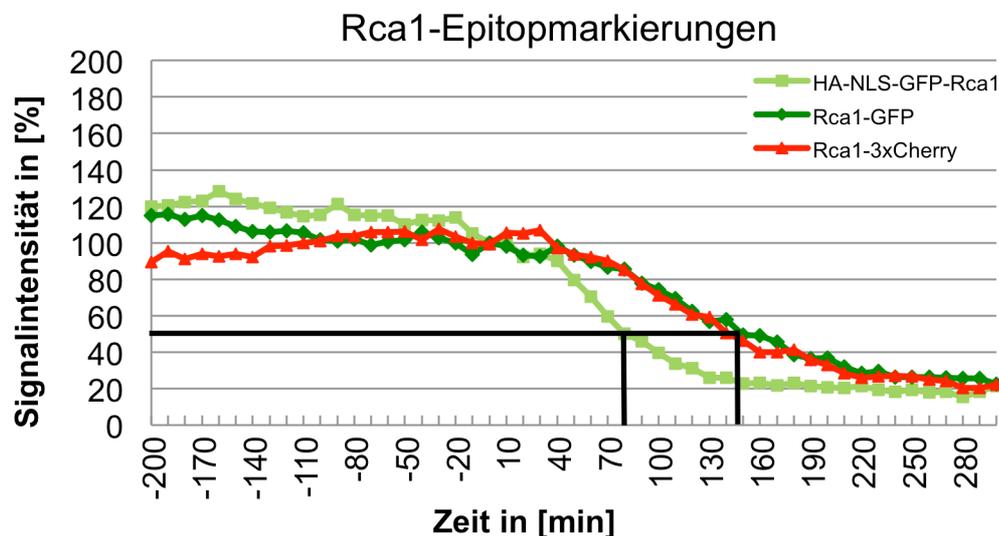


Abbildung 2.5: Abbaukurven von Rca1 mit verschiedenen Epitopmarkierungen

Aus den live-cell-imaging-Aufnahmen von HA-NLS-GFP-Rca1, Rca1-GFP und Rca1-3xCherry wurden jeweils die Fluoreszenzintensitäten von 10 Zellen quantifiziert und die Abbaukurven generiert. Die Zeitpunkte, bei denen die Signalintensität auf 50% gefallen ist, wurden markiert. HA-NLS-GFP-Rca1 erreicht diesen Wert nach 80 min, die C-terminal epitopmarkierten Rca1-GFP und Rca1-3xCherry erst nach 150 min. Zu diesem Zeitpunkt hat HA-NLS-GFP-Rca1 bereits den minimalen Endwert (in dem Fall 20%) erreicht. Rca1-3xCherry und Rca1-GFP gelingt dies erst nach ca. 300 min.

2.2.2 Abbau von Rca1 zeitgleich mit anderen Substraten des APC/C

Die bisherigen Daten zeigen, dass der Abbau von Rca1 am Ende der Mitose bzw. in der frühen G1-Phase beginnt (Abb. 2.1 und 2.2, Kapitel 2.1.1 und 2.1.2) und über einen bisher unbekanntem Abbauweg vermittelt wird, da eine SCF^{B-TRCP}-vermittelte Degradation wie sie für das humane Ortholog Emi1 bekannt ist, sehr unwahrscheinlich ist (1.6.3.3). Der Zeitpunkt des Abbaus überschneidet sich dabei mit der Aktivierung von APC/C^{Fzr}. Um der Vermutung nachzugehen, dass es sich bei Rca1 um ein Substrat des APC/C^{Fzr} handeln könnte, wurden bekannte APC/C-Substrate zusammen mit Rca1-3xCherry in Schneiderzellen co-exprimiert und Abbaukurven generiert. Die schematischen Skizzen der verwendeten Substrate CyclinB_Del-286-530-2xGFP, HA-NLS-GFP-Geminin_Del-102-192, sowie dem möglichen APC/C-Substrat HA-NLS-GFP-Fzy, sind in Abb. 2.6 A dargestellt. Bei CyclinB handelt es sich nicht um ein reines APC/C^{Fzr}-Substrat, sondern es wird bereits mit dem Aktivator Fzy vom APC/C erkannt und für den Abbau markiert. Da in Hefen Cdc20/Fzy über einen intramolekularen Mechanismus sich selbst ubiquitinyliert (Foe, *et al.*, 2011), gilt Geminin als das einzige, ausschließliche APC/C^{Fzr}-Substrat. Geminin wird zudem in Embryonen nicht während der Mitose abgebaut, sondern wie Rca1 erst in der G1-Phase (Sprenger, persönliche Mitteilung).

In Abbildung 2.6 B ist zunächst die zeitliche Abfolge des DIC-, Cherry- und GFP-Kanals einer mit CyclinB_Del-286-530-2xGFP und Rca1-3xCherry transfizierten Zelle dargestellt. Zu Beginn der Aufnahme befindet sich die Zelle in der Interphase und durchschreitet in den folgenden Zeitabschnitten eine Mitose. Mit der Zytokinese wird die Zellteilung vollendet und CyclinB_Del-286-530-2xGFP wird sehr schnell in die sich neu ausbildenden Zellkerne aufgenommen und dort abgebaut (t=50 min). Die Aufnahme von Rca1-3xCherry in den Kern verläuft etwas verlangsamt. Nach t=100 min, wenn der Abbau von Rca1-3xCherry erst beginnt, ist das Signal von CyclinB_Del-286-530-2xGFP bereits fast vollständig verschwunden (Abb. 2.6 B).

Weiterhin wurde der Abbau von HA-NLS-GFP-Fzy und HA-NLS-Geminin_Del-102-192-GFP analysiert (Abb. 2.6 und Abbaukurven in Abb. 2.9).

Werden die Abbaukurven der unter A dargestellten Substrate des APC/C^{Fzr} mit der Abbaukurve von HA-NLS-GFP-Rca1 übereinandergelegt, wird deutlich, dass der Abbau von Rca1 in zeitlicher Nähe zu den Substraten des APC/C^{Fzr} beginnt. Dabei ähnelt die Abbaukinetik der von HA-NLS-GFP-Fzy, während HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP

schneller und HA-NLS-Geminin_Del-102-192-GFP langsamer abgebaut werden. Auch ist der Abbau von HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP letztendlich effektiver, da hier das Signal vollständig verschwindet, während die Signalintensitäten von HA-NLS-GFP-Rca1 und HA-NLS-GFP-Fzy sich bei einem minimalen Endwert zwischen 10-20% einpendeln. Das in diesen Experimenten gleichzeitig exprimierte Rca1-3xCherry wurde, wie vorher beobachtet, im Vergleich zu HA-NLS-GFP-Rca1 verlangsamt abgebaut (Abb. 2.6 C). Ein direkter visueller Vergleich der verschiedenen Substrat-Abbaukinetiken ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Das Ergebnis der Abbaukurven wird dabei widerspiegelt, obwohl die Darstellung von jeweils nur einer Zelle geringe Abweichungen mit sich zieht.

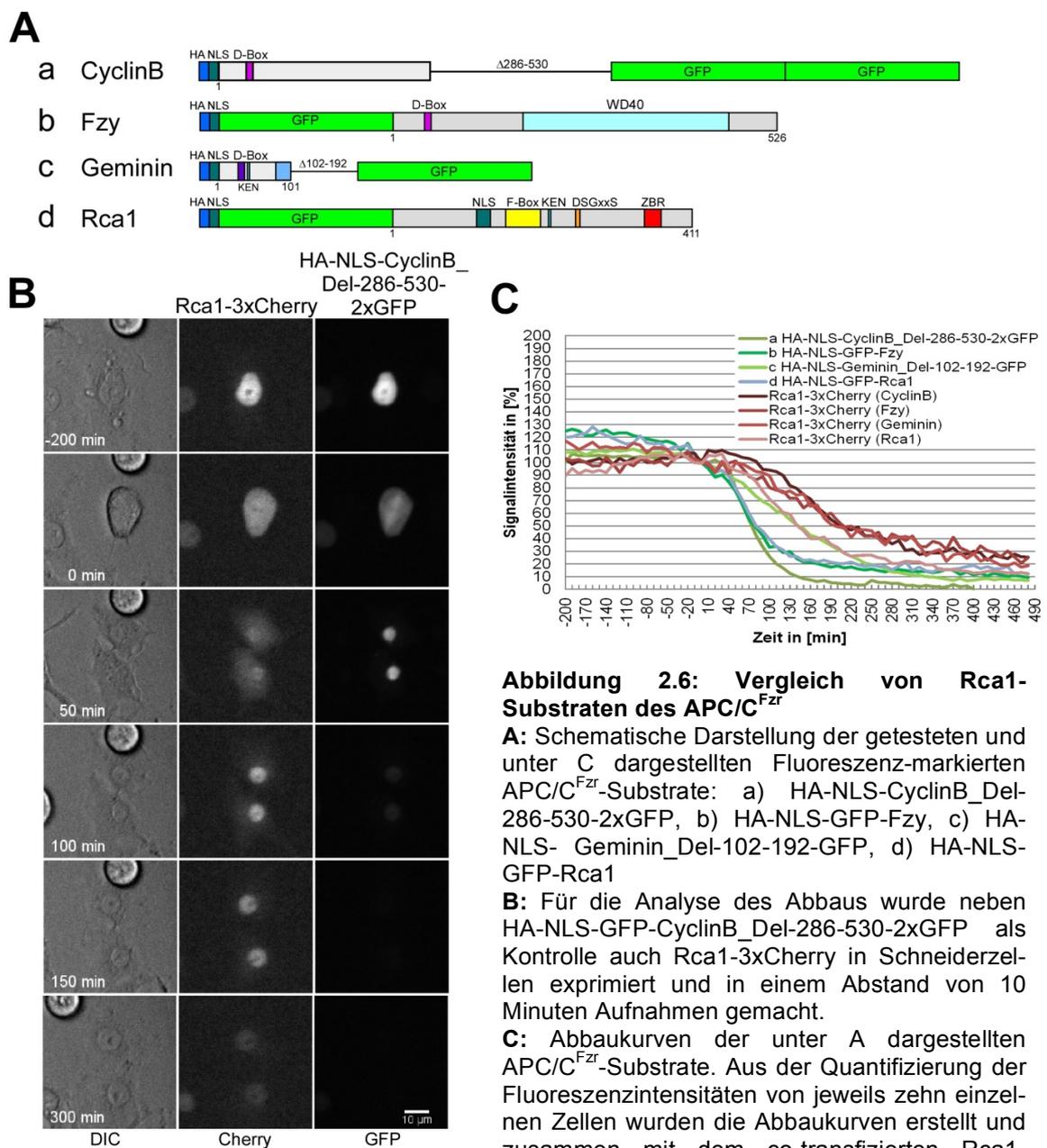


Abbildung 2.6: Vergleich von Rca1-Substraten des APC/C^{FZr}

A: Schematische Darstellung der getesteten und unter C dargestellten Fluoreszenz-markierten APC/C^{FZr}-Substrate: a) HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP, b) HA-NLS-GFP-Fzy, c) HA-NLS-Geminin_Del-102-192-GFP, d) HA-NLS-GFP-Rca1

B: Für die Analyse des Abbaus wurde neben HA-NLS-GFP-CyclinB_Del-286-530-2xGFP als Kontrolle auch Rca1-3xCherry in Schneiderzellen exprimiert und in einem Abstand von 10 Minuten Aufnahmen gemacht.

C: Abbaukurven der unter A dargestellten APC/C^{FZr}-Substrate. Aus der Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten von jeweils zehn einzelnen Zellen wurden die Abbaukurven erstellt und zusammen mit dem co-transfizierten Rca1-3xCherry in einem Graphen dargestellt.

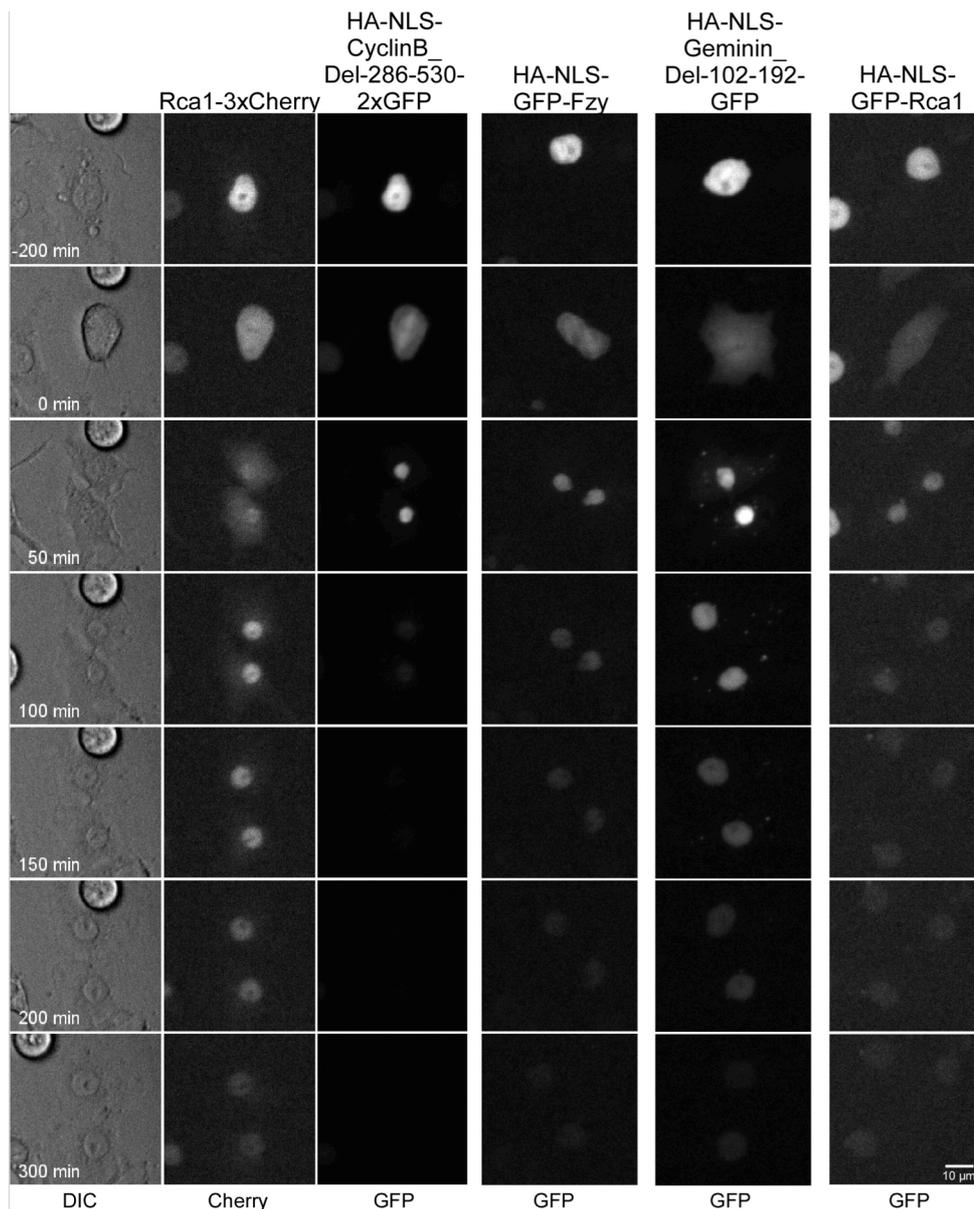


Abbildung 2.7: Direkter Vergleich des Abbaus verschiedener APC/C^{Fzr}-Substrate

Dem Abbau der Rca1-3xCherry-Kontrolle und dem HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP aus Abb. 2.6 B ist der Abbau von HA-NLS-GFP-Fzy, HA-NLS-GFP-Geminin_Del-102-192 und von HA-NLS-GFP-Rca1 gegenübergestellt. Die einzelnen Zeitabschnitte stimmen miteinander überein. Dargestellt ist der Signalabbau von jeweils einer einzelnen Zelle.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der Abbau von HA-NLS-GFP-Rca1 dem Abbau von HA-NLS-GFP-Fzy am ähnlichsten ist. Der schnellere Abbau von HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP könnte an der gleichzeitigen Erkennung durch die beiden APC/C-Aktivatoren Fzy und Fzr liegen. HA-NLS-Geminin_Del-102-192-GFP wird dagegen ähnlich wie das inaktive Rca1-3xCherry abgebaut.

Der Abbau von Rca1 verläuft in der G1-Phase mit ähnlicher Kinetik wie der Abbau der anderen APC/C-Substrate.

2.2.3 Der Abbau von N- und C-terminalem Rca1 in G1

Für eine erste Eingrenzung der Region in Rca1, die für den Abbau verantwortlich ist, wurden zuerst die N- und C-terminalen Hälften untersucht. Dazu wurde der C-terminale Teil von Rca1 hinter das Fluorochrom HA-NLS-GFP kloniert. Zusätzlich wurde in der Zinkbinderegion mit der Mutation des Cysteins 351 zu Serin eine Punktmutation, C351S, eingeführt, die bewirkt, dass das überexprimierte Rca1 seine inhibierende Wirkung auf

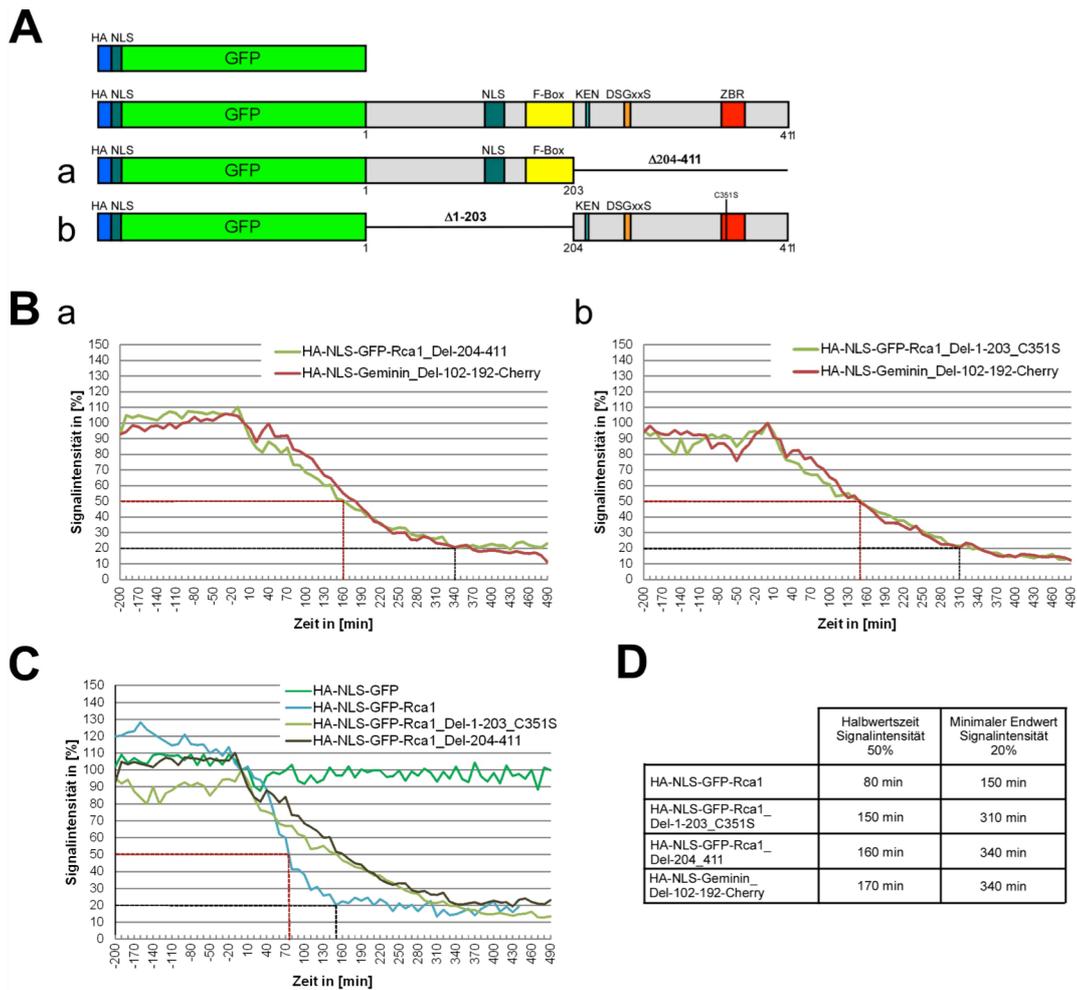


Abbildung 2.8: Abbau von N- u. C-term. Rca1 entspricht dem von Geminin_Del-102-192
A: Schematische Darstellung der unter C) verglichenen GFP-Kontrolle HA-NLS-GFP, HA-NLS-GFP-Rca1 sowie der N- und C-terminalen Rca1-Deletionen: a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 und b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S
B: Für die Analyse des Abbaus der Rca1-Deletionen wurden N-terminales Rca1 (a) und C-terminales Rca1 (b) in Abbaukurven mit dem co-exprimierten HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry verglichen. Die Halbwertszeiten (50%) und die minimalen Endwerte (20%) sind eingezeichnet und unter D zusammengefasst.
C: Abbaukurven der unter A dargestellten HA-NLS-GFP Kontrolle, HA-NLS-GFP-Rca1 und N- bzw. C-terminalem Rca1 sowie Halbwertszeit und minimaler Endwert von HA-NLS-GFP-Rca1.
D: Übersichtstabelle der Halbwertszeiten und der minimalen Endwerte der unter A schematisch dargestellten Rca1-Derivate sowie von HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry.

den APC/C verliert und eine Einflussnahme auf den Zellzyklus verhindert wird.

Der C-terminale Teil von Rca1, HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S (Abb. 2.8 Ab), und das N-terminale Fragment von Rca1, HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 (Abb. 2.8 Aa), wurden jeweils mit HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry in Schneiderzellen co-transfiziert und von den live-cell-imaging-Aufnahmen Abbaukurven erstellt (Abb. 2.8 B). Dabei zeigte sich, dass sowohl N- als auch C-terminales Fragment von Rca1 hinreichend sind, um in der G1-Phase abgebaut zu werden. Dieser Abbau ähnelt sehr stark dem Abbau des APC/C^{Fzr}-Substrats HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry (Kawall, 2010). In Abbildung 2.8 B wird dies an den Abbaukurven für HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S und für HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 verdeutlicht.

Im direkten Vergleich der Abbaukurven der C- und N-terminalen Rca1-Deletionen mit der Abbaukurve des gesamten HA-NLS-GFP-Rca1 in Abbildung 2.8 C zeigt sich ein Unterschied in der Abbaukinetik. Scheinbar besitzt sowohl das C- als auch das N-terminale Fragment von Rca1 eine eigenständige Abbausequenz, die zusammenwirken und zu einer deutlich schnelleren Degradation von Rca1 führen. Die Kontrolle HA-NLS-GFP weist in der G1-Phase keinen Signalverlust auf, was nochmals zeigt, dass Bleicheffekte keine wesentliche Rolle spielen (Abb. 2.8 C). In einer Übersichtstabelle der Halbwertszeiten sind die minimalen Endwerte der Rca1-Derivate sowie von HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry dargestellt (Abb. 2.8 D). HA-NLS-GFP-Rca1 wird doppelt so schnell abgebaut wie die beiden C- und N-terminalen Rca1-Deletionen, deren Abbau dem von HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry gleicht. Der minimale Endwert, definiert als der Wert an dem kein weiterer signifikanter Abbau feststellbar ist, liegt einheitlich bei ca. 20%. Jedoch wird dieser Wert von HA-NLS-GFP-Rca1 bereits nach 150 Minuten erreicht, etwa doppelt so schnell wie bei den N- und C-terminalen Rca1-Deletionen und von HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry.

Ein direkter visueller Vergleich des Abbaus von N- und C-terminalem Rca1 mit HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Das Ergebnis der Abbaukurven wird dabei widergespiegelt, obwohl die Darstellung von jeweils nur einer Zelle nicht exakt den Werten aus den Abbaukurven entspricht.

Aus den Abbaukurven wird ersichtlich, dass der Abbau des APC/C^{Fzr}-Substrates Geminin (Abb. 2.8 B) sowie anderer Substrate (Abb. 2.6 C, Kapitel 2.2.2) nahezu zeitgleich mit dem Abbau von Rca1 einsetzt. Der Beginn des Abbaus beschränkt sich auf ein relativ kurzes Zeitfenster. Sobald sich nach der Zellteilung die beiden Nuklei neu ausbilden, beginnt der Abbau der Substrate bzw. von Rca1 sofort nach Aufnahme in den Zellkern

(Abb. 2.6 B bzw. Abb. 2.7, Kapitel 2.2.2). Ob dieser Abbau über Fzr geregelt wird, soll in weiteren Experimenten geklärt werden, bei denen durch eine Überexpression von Fzr der Abbau der APC/C^{Fzr}-Substrate in einer anderen Phase des Zellzyklus eingeleitet werden kann.

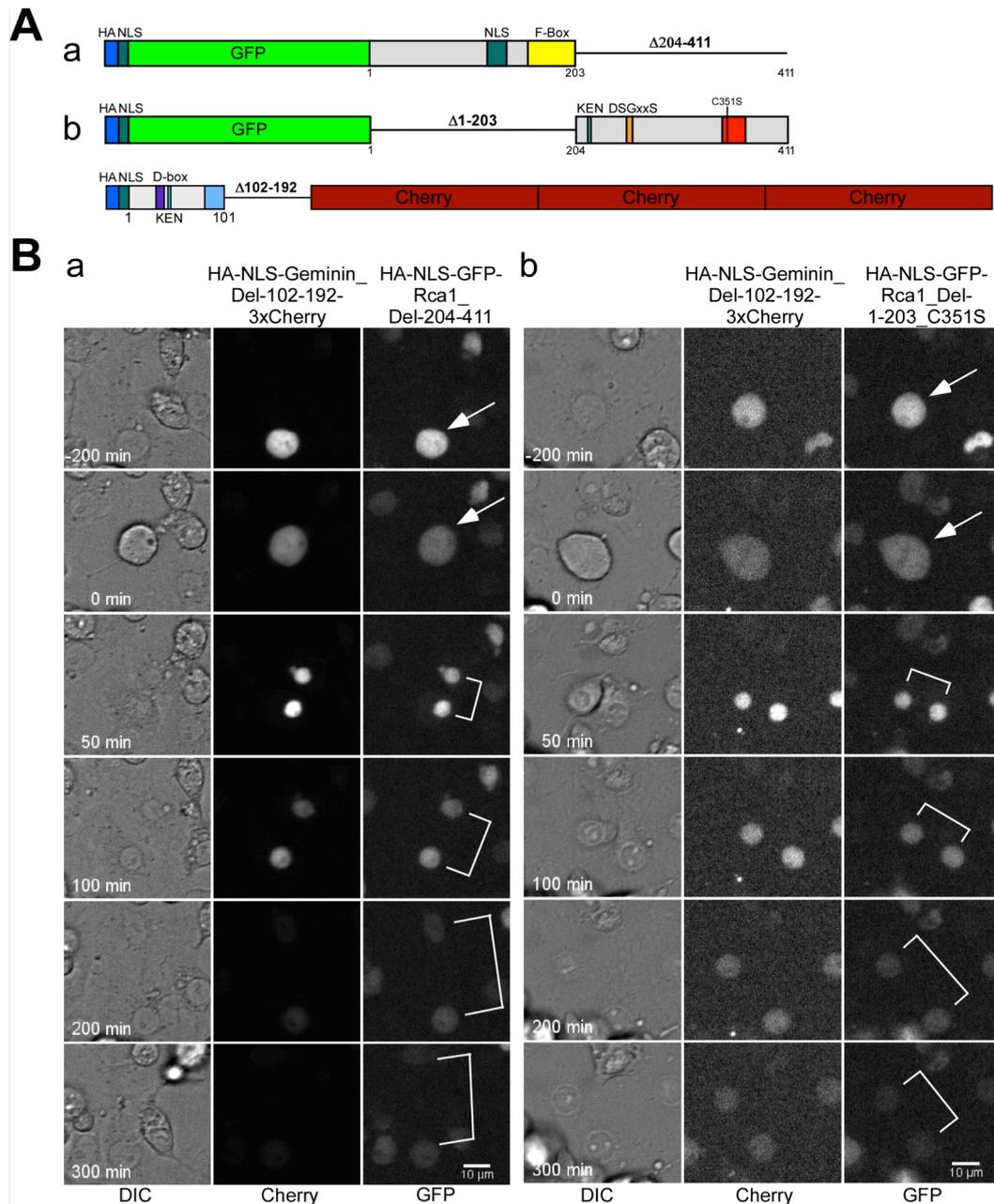


Abbildung 2.9: Abbau von N- u. C-term. Rca1 entspricht dem von Geminin_Del-102-192

A: Schematische Darstellungen: a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 und b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S sowie dem co-transfizierten HA-NLS-Geminin_Del-102-192-Cherry
B: Zeitliche Abfolge einer Zellteilung mit Abbau des N-terminalen Rca1 (a) und des C-terminalen Rca1 (b) mit dem co-exprimierten HA-NLS-Geminin_Del-102-192-Cherry. Zur leichteren Verfolgung wurden die Zellen mit einem Pfeil bzw. mit Klammern markiert. Die einzelnen Zeitabschnitte stimmen miteinander überein. Dargestellt ist der Signalabbau von jeweils einer einzelnen Zelle, weshalb es visuell zu leichten Abweichungen im Vergleich zu den Daten der Abbaukurven aus Abb. 2.8 C kommen kann.

2.2.4 Überexpression von Fzr aktiviert den APC/C in G2

Eine Überexpression von Fzr führt zu einem vorzeitigen Abbau der APC/C-Substrate Cyclin A und Cyclin B in der G2-Phase des Zellzyklus 16 (Grosskortenhaus, 2001). Diese verfrühte Aktivierung des APC/C durch Fzr verhindert eine Akkumulierung der Cycline in der G2-Phase, wodurch die Zellen nicht mehr in die Mitose 16 eintreten können. Im weiteren Verlauf können diese Zellen weitere S-Phasen durchlaufen und zeigen einen höheren DNA-Gehalt (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002; Reber, *et al.*, 2006)

Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung des APC/C in G2 durch Überexpression von Fzr auch in Schneiderzellen möglich ist, wurden Zellen mit 4xFLAG-Fzr transfiziert und das Zellzyklusprofil im Durchflusszytometer analysiert.

Dazu wurden die transfizierten Zellen geerntet und die DNA der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Die Emission des DNA-interkalierenden Farbstoffs wurde im FL2 Kanal (bezeichnet als Hoechst) aufgenommen und dadurch das DNA-Profil bestimmt (Abb. 2.10). In lebenden S2R⁺-Zellen können zwei Peaks erkannt werden, die mit 1C (einfacher Chromosomensatz) und 2C (doppelter Chromosomensatz) benannt wurden. Unter 1C fallen alle Zellen in der G1-Phase, 2C-Zellen befinden sich in der G2- und M-Phase. S-Phase Zellen können unter diesen Umständen nicht aufgetrennt werden und befinden sich zwischen den beiden Peaks. M-Phase Zellen werden anhand des DNA-Gehaltes den G2-Zellen zugeordnet, aufgrund ihrer geringen Häufigkeit fallen sie jedoch nicht weiter ins Gewicht. Überreplizierende Zellen mit einem höheren Anteil an DNA als G2-Phase Zellen erfahren auf der x-Achse eine Verschiebung nach rechts. Eine zusätzliche Selektion ist durch Setzen von „Gates“ möglich, so wurde im vorliegenden Beispiel ausschließlich auf das DNA-Profil GFP-positiver Zellen selektiert (Abb. 2.10) und im Diagramm gegen die Anzahl an Zellen (counts) aufgetragen.

Das Zellzyklusprofil von untransfizierten Zellen weist einen größeren Anteil an G1-Phase-Zellen auf (Abb. 2.10). Eine Expression von NLS-3xGFP in S2R⁺-Zellen verändert das DNA-Profil der GFP-positiven Zellen kaum. Wird neben NLS-3xGFP als Transfektionskontrolle zusätzlich 4xFLAG transient in Schneiderzellen überexprimiert, kommt es zu einer Zellzyklusverschiebung der GFP-positiven Zellen in Richtung G2-Phase. Dabei dienen die GFP-positiven Zellen zum einen als Transfektionskontrolle und zum anderen als indirekter Nachweis für die Überexpression von 4xFLAG-Fzr, da davon ausgegangen werden kann, dass GFP-positive Zellen auch das co-transfizierte Plasmid für 4xFLAG-Fzr aufnehmen. Neben der Zellzyklusverschiebung bewirkt die 4xFLAG-Fzr-Überexpression

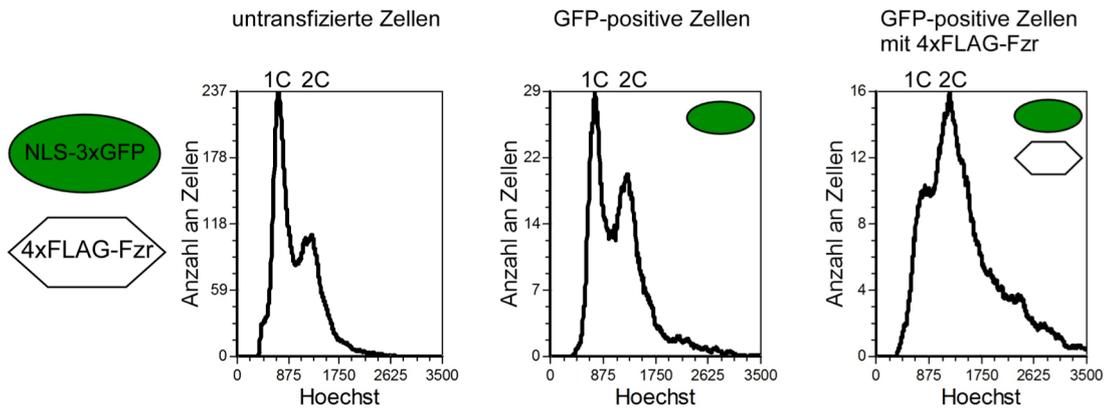


Abbildung 2.10: Fzr-Überexpression in Schneiderzellen führt zum G2-Arrest

Schneiderzellen wurden entweder untransfiziert im Durchflusszytometer gemessen oder transient mit NLS-3xGFP bzw. zusätzlich noch mit 4xFLAG-Fzr transfiziert.

Die untransfizierten Zellen zeigen ein typisches Zellzyklusprofil mit einem größeren Zellanteil in der G1-Phase. Auch NLS-3xGFP transfizierte Zellen zeigen dieses Profil. Wird 4xFLAG-Fzr überexprimiert, akkumulieren die GFP-positiven Zellen in der G2-Phase und ein größerer Anteil überreplizierender Zellen ist festzustellen.

einen erhöhten Anteil an überreplizierenden Zellen mit einem mehrfachen Chromosomensatz.

Eine Überexpression des funktionalen 4xFLAG-Fzr führt in Schneiderzellen zu einer Verschiebung in Richtung höheren DNA-Gehalt. Diese Verschiebung wird vermutlich durch eine verfrühte Aktivierung des APC/C-Komplexes hervorgerufen, wodurch Cycline nicht mehr akkumulieren können und die Zellen dadurch in der G2-Phase arretieren.

2.2.4.1 Abbau von Rca1-GFP in G2 nach Fzr-Überexpression

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob der durch Überexpression von 4xFLAG-Fzr aktivierte APC/C^{Fzr} in der G2-Phase einen verfrühten Abbau von Rca1 initiieren kann. Für eine direkte Vergleichbarkeit wurden Schneiderzellen zur Kontrolle transient mit Rca1-GFP und als Zellzyklus unabhängige Kontrolle mit NLS-3xCherry transfiziert (Abb. 2.11 A) und unter dem Mikroskop live verfolgt (Abb. 2.11 B links).

Wie bereits bei HA-NLS-GFP-Rca1 und Rca1-3xCherry zu sehen war (2.2.2), geht die Zelle in eine neue Zellteilung, Rca1 reakkumuliert in den sich neu ausbildenden Zellkernen der Mutter- und Tochterzelle und wird in der G1-Phase abgebaut. Das co-transfizierte NLS-3xCherry hingegen ist keiner Degradation unterworfen und bleibt in jeder Zellzyklusphase in der Zelle konstant. Wird in diesem Ansatz zusätzlich noch 4xFLAG-Fzr co-exprimiert (Abb. 2.11 B rechts), wird der APC/C^{Fzr} vorzeitig in der G2-Phase aktiviert und die Zelle kann nicht mehr in die Mitose eintreten. Dabei zeigt sich,

dass ab einem unbestimmten Zeitpunkt die Zelle mit dem Abbau von Rca1-GFP beginnt, ohne zuvor eine Zellteilung zu durchschreiten. Die co-transfizierte Kontrolle NLS-3xCherry ist von diesem Abbau nicht betroffen. Wird in einer Zelle neben Rca1-GFP das APC/C^{Fzr}-Substrat HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry co-exprimiert (Abb. 2.12 A) und mit 4xFLAG-Fzr der APC/C^{Fzr} in G2 aktiviert, so kommt es zu einem einheitlichen Abbau beider Proteine in der G2-Phase (Abb. 2.12 B rechts). Ohne die Überexpression von 4xFLAG-Fzr gehen die Zellen wieder normal in die Zellteilung und beide Signale werden einheitlich in der G1-Phase abgebaut (Abb. 2.12 B links).

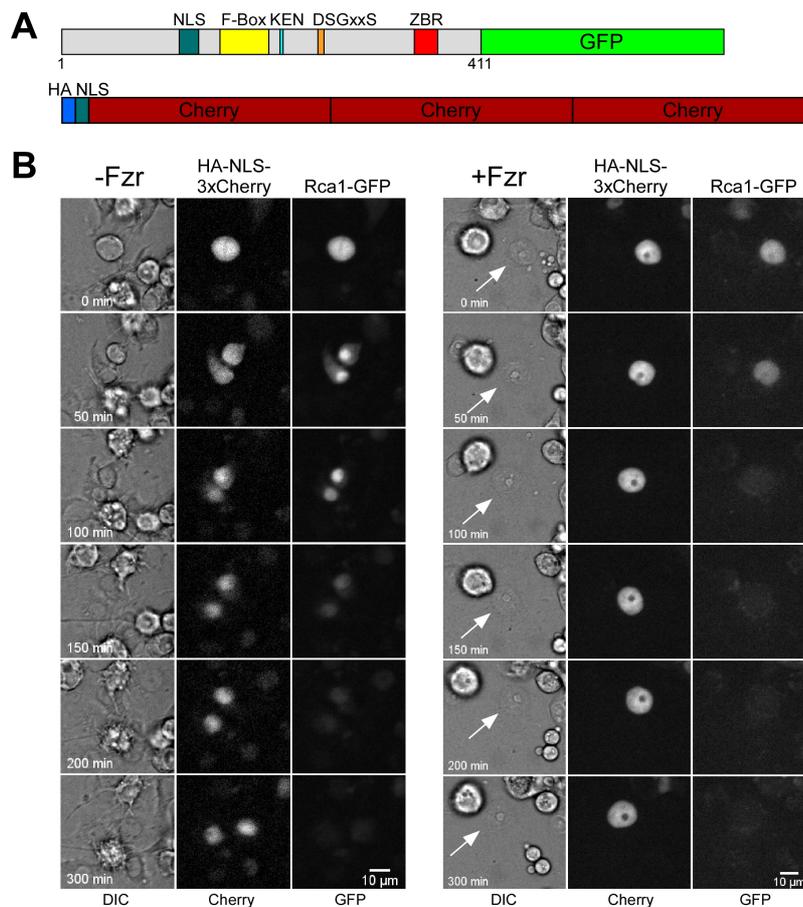


Abbildung 2.11: Abbau von Rca1-GFP in G1 und nach APC/C-Aktivierung durch Fzr in G2

A: Schematische Darstellung der in Schneiderzellen co-exprimierten Plasmide von Rca1-GFP und HA-NLS-3xCherry

B: Vergleich des Abbaus von Rca1-GFP in der G1-Phase (links, ohne Fzr) mit dem Abbau in der G2-Phase nach Fzr-Überexpression (rechts, mit Fzr).

Links dargestellt ist der Abbau von Rca1-GFP in der G1-Phase. Dabei teilt sich die Zelle und nimmt Rca1-GFP zuerst wieder aktiv in den Zellkern auf, bevor der Abbau beginnt. Das Signal der co-exprimierten NLS-3xCherry-Kontrolle bleibt dabei konstant.

Die Zelle auf der rechten Seite co-exprimiert zusätzlich 4xFLAG-Fzr. Dies führt dazu, dass die Zelle nicht in die Mitose eintreten kann. Obwohl keine Zellteilung erkennbar ist (Pfeile markieren die Zelle), wird Rca1-GFP in Folge der Aktivierung des APC/C durch Fzr in der G2-Phase abgebaut. Das Signal des Kontrollproteins NLS-3xCherry bleibt dabei konstant.

Die zeitgleiche Terminierung des Abbaus von Rca1-GFP und von HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry sowohl in der G1-Phase, als auch in der G2-Phase nach Aktivierung des APC/C^{Fzr}-Komplexes durch die Überexpression von 4xFLAG-Fzr sind weitere Hinweise, dass es sich bei Rca1 um ein Substrat des APC/C^{Fzr} handeln könnte. Um diesen gewonnenen Eindruck mit mehreren Beispielen hinterlegen zu können, sollte im Folgenden der Rca1-Abbau mit anderen Substraten des APC/C-Komplexes verglichen werden.

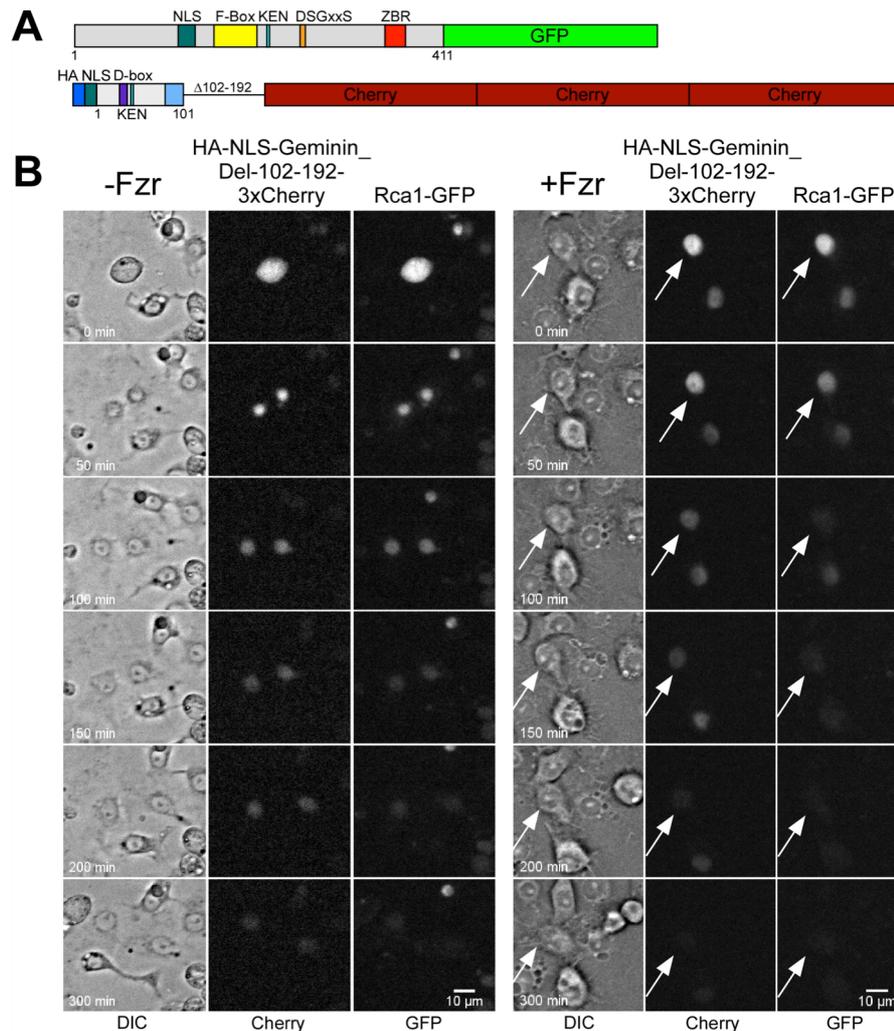


Abbildung 2.12: Rca1- und Geminin-Abbau nach APC/C-Aktivierung in G2 nahezu identisch

A: Schematische Darstellung der in Schneiderzellen co-exprimierten Plasmide von Rca1-GFP und HA-NLS-Geminin_Del-102-192-Cherry.

B: Vergleich des Abbaus von Rca1-GFP und von HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry in der G1-Phase (links, ohne Fzr) mit dem Abbau nach Fzr-Überexpression in der G2-Phase (rechts, mit Fzr).

Links dargestellt ist die zeitliche Abfolge einer Zellteilung mit dem Abbau von Rca1-GFP und HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry in der G1-Phase. Dabei teilt sich die Zelle bevor der Abbau beginnt.

Die Zelle auf der rechten Seite co-exprimiert zusätzlich 4xFLAG-Fzr. Obwohl keine Zellteilung erkennbar ist (Pfeile markieren die Zelle), werden Rca1-GFP und HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry in Folge der Aktivierung des APC/C durch Fzr in der G2-Phase abgebaut.

2.2.4.2 Der verfrühte Rca1-Abbau verglichen mit APC/C-Substraten

Bisher wurde ein GFP-markiertes Rca1 für den Vergleich mit Geminin verwendet. In diesem Experiment kam Rca1 wieder mit einem C-terminalen 3xCherry zum Einsatz. Der direkte Vergleich des Abbaus der APC/C-Substrate mit Rca1-3xCherry in der G1-Phase wurde bereits in Kapitel 2.2.1.3 behandelt (Abb. 2.6 B). Eine Überexpression von 4xFLAG-Fzr führte auch in der G2-Phase zu einem einheitlichen Abbau von Rca1-3xCherry und HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP sowie HA-NLS-GFP-Fzy (Abb. 2.13 B).

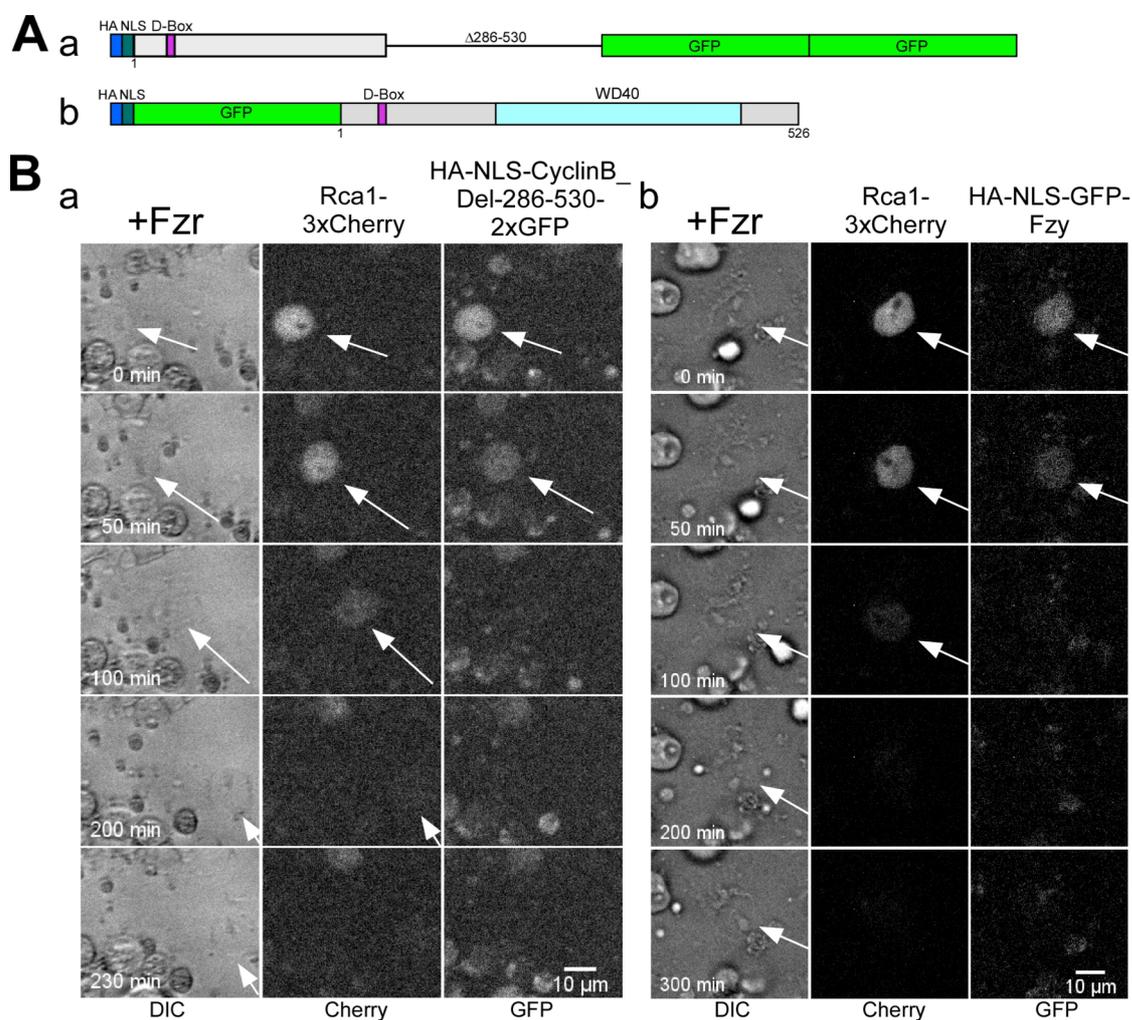


Abbildung 2.13: Rca1-Abbau in G2 identisch mit Substraten des APC/C^{Fzr}

A: Schematische Darstellung der in Schneiderzellen mit Rca1-3xCherry co-exprimierten Plasmide: a) HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP und b) HA-NLS-GFP-Fzy

B: Vergleich des Abbaus von Rca1-3xCherry mit a) HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP und mit b) HA-NLS-GFP-Fzy nach 4xFLAG-Fzr-Überexpression in der G2-Phase.

Obwohl keine Zellteilung erkennbar ist (Pfeile markieren die Zellen), wird Rca1-3xCherry genauso wie HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP und HA-NLS-GFP-Fzy vermutlich in Folge der Aktivierung des APC/C durch Fzr in der G2-Phase abgebaut.

2.2.4.3 Der Abbau von N- und C-terminalem Rca1 in G2

Sowohl der N- als auch der C-terminale Teil von Rca1 sind hinreichend für einen Abbau in der G1-Phase (2.2.1.4, Abb. 2.8 und 2.9). Es konnte gezeigt werden, dass der Abbau in G1 sehr stark dem Abbau des APC/C^{Fzr}-Substrats HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry ähnelt.

Im Folgenden sollte nun auch der Abbau in der G2-Phase nach Fzr-Überexpression genauer untersucht werden. Dazu wurden die in Abbildung 2.14 A abgebildeten Proteine zusammen mit HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry und 4xFLAG-Fzr co-exprimiert und der Abbau der Proteine miteinander verglichen (Abb. 2.14 B).

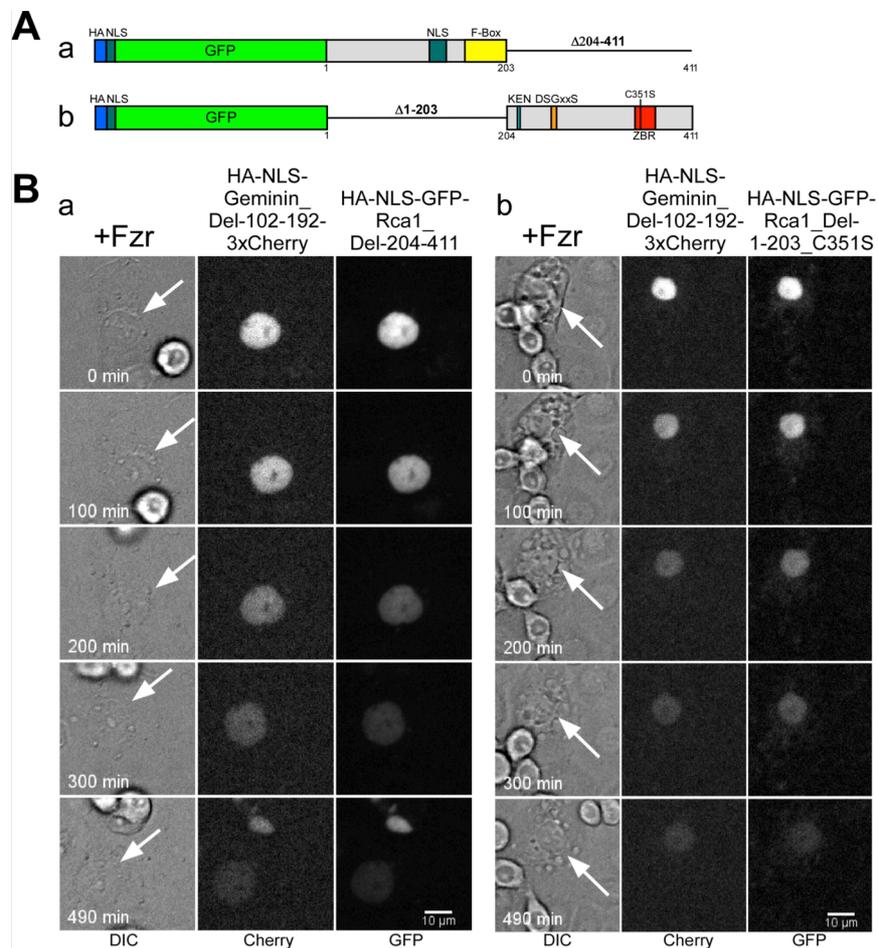


Abbildung 2.14: Der Abbau von N- und C-terminalem Rca1 in G2

A: Schematische Darstellung der in Schneiderzellen mit HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry co-exprimierten Plasmide: a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 und b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S.

B: Vergleich des Abbaus von a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 und b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S mit HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry nach 4xFLAG-Fzr-Überexpression in der G2-Phase.

Obwohl keine Zellteilung erkennbar ist (Pfeile markieren die Zellen), werden die beiden C- und N-terminalen Rca1-Fragmente zusammen mit dem Substrat des APC/C^{Fzr} HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry in Folge der Aktivierung des APC/C durch 4xFLAG-Fzr in der G2-Phase abgebaut.

Dabei stellte sich heraus, dass auch bei einer verfrühten Aktivierung des APC/C^{Fzr} in der G2-Phase der Abbau des N- und C-terminalen Rca1 vergleichbar mit dem Abbau von HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry ist.

Die Ergebnisse lassen die Interpretation zu, dass eine vorzeitige Aktivierung des APC/C in der Interphase durch die Überexpression von 4xFLAG-Fzr zu einem vorzeitigen Abbau der APC/C-Substrate und auch zu einem vorzeitigen Abbau von inaktivem Rca1 führt. In einem nächsten Schritt sollte nun getestet werden, inwieweit die Überexpression eines aktiven Rca1 als Inhibitor des APC/C^{Fzr}-Komplexes den Effekt der Überexpression von 4xFLAG-Fzr zu unterdrücken vermag.

2.2.5 Der Abbau von Rca1 ist abhängig von der eigenen Aktivität

In Embryonen konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von HA-Rca1 den Effekt der Überexpression von Fzr aufheben kann (Grosskortenhaus, 2001). Dabei wurde in Embryonen HA-Rca1 zusammen mit Fzr unter der Kontrolle des *prd-Gal4* Promotors überexprimiert. Im Gegensatz zu Embryonen, in denen nur Fzr überexprimiert wurde, konnten diese Embryonen die Mitose 16 durchschreiten, da es zu keiner verfrühten Aktivierung des APC/C^{Fzr} und somit zu keinem vorzeitigen Abbau mitotischer Cycline kam (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002).

Im Folgenden sollte auch in Schneiderzellen geprüft werden, ob eine verfrühten Aktivierung des APC/C^{Fzr}, hervorgerufen durch eine Überexpression von 4xFLAG-Fzr, durch eine Überexpression von aktivem 4xFLAG-Rca1 vollständig inhibiert werden kann.

Um zu zeigen, dass die inhibitorische Wirkung von Rca1 einen direkten Einfluss auf die eigene Stabilität besitzt, wurden in diesem Experiment Schneiderzellen entweder mit einem aktiven 4xFLAG-Rca1 oder mit einem inaktiven 4xFLAG-Rca1_C351S transfiziert. Die Mutation des Cysteins 351 in der Zinkbinderegion in ein Serin führte dabei zu einem nahezu vollständigen Verlust der APC/C-Inhibierungsfähigkeit (2.3.3.1). Co-exprimiert wurden diese Zellen entweder mit dem aktiven 4xFLAG-Fzr oder aber, um im Transfektionsansatz eine gleiche Menge an Plasmid-DNA gewährleisten zu können, mit einem Bluescript-Leervektor. Zusätzlich wurde neben einem Ansatz mit untransfizierten Zellen (Abb. 2.15 A Spur 1) noch eine Transfektion mit Bluescript-Leervektor-DNA (Abb. 2.15 A Spur 2) bzw. mit 4xFLAG-Fzr (Abb. 2.15 A Spur 3) als weitere Kontrollen mitgeführt. Die Zellzahl der einzelnen Proben wurde mit einem Teil der Zellen im

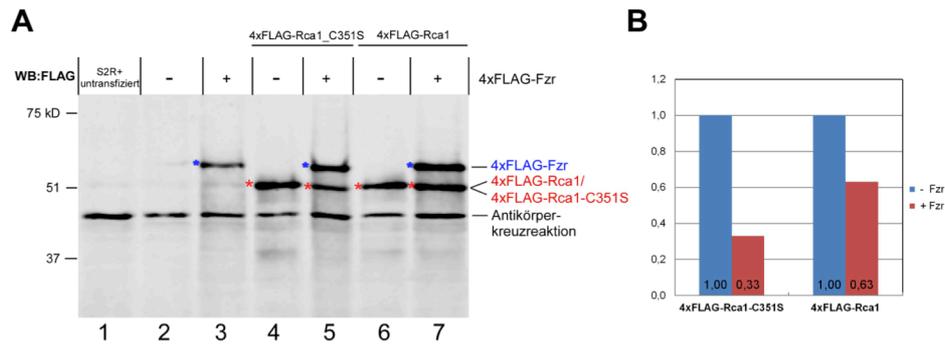


Abbildung 2.15 Der Abbau von Rca1 ist abhängig von der eigenen Aktivität

A: Schneiderzellen wurden entweder mit einem inaktiven 4xFLAG-Rca1_C351S (Spur 4, 5) oder einem aktiven 4xFLAG-Rca1 (Spur 6, 7) transient transfiziert und mit Hinblick auf die Stabilität nach 4xFLAG-Fzr-Überexpression auf einem Westernblot verglichen. Neben untransfizierten Zellen (1) dienten als Kontrolle mit einem Bluescript-Leervektor transfizierte S2R+ Zellen (2) und Zellen transfiziert mit 4xFLAG-Fzr (3). Die eingesetzte Gesamt-Plasmidmenge wurde bei allen Ansätzen mit einem Bluescript-Leervektor auf 375 ng aufgefüllt.

B: Normiertes Diagramm, um die Abhängigkeit des Abbaus von der eigenen Aktivität darzustellen. Die Antikörperkreuzreaktionsbande aus A diente der Anpassung der Beladungsunterschiede. 4xFLAG-Rca1_C351S und 4xFLAG-Rca1 ohne 4xFLAG-Fzr-Überexpression wurden zusätzlich auf den Wert 1 normiert.

Durchflusszytometer bestimmt und 55.000 Zellen für eine Westernblotanalyse auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

Nach Co-Transfektion mit 4xFLAG-Fzr ist die Abnahme von inaktivem 4xFLAG-Rca1_C351S deutlich stärker (vgl. Abb. 2.15 A Spur 4 zu 5) als bei einem aktiven 4xFLAG-Rca1 (vgl. Abb. 2.15 A 6 zu 7). Für eine genauere Auswertung des Einflusses von 4xFLAG-Fzr auf aktives bzw. inaktives Rca1 wurde die Antikörperkreuzreaktionsbande aus A für die Normierung von 4xFLAG-Rca1_C351S mit und ohne 4xFLAG-Fzr (Abb. 2.15 A Spur 4, 5) sowie für die Normierung von 4xFLAG-Rca1 mit und ohne 4xFLAG-Fzr (Abb. 2.15 A Spur 6, 7) verwendet. Die Normierung wurde anhand der Signalintensitäten in ImageJ vorgenommen. Zusätzlich wurden die Werte von aktivem und inaktivem Rca1 ohne Fzr-Überexpression auf den Wert 1 normiert, so dass ein direkter Vergleich möglich wurde (Abb. 2.15 B).

Aus dem Diagramm geht hervor, dass ein aktives 4xFLAG-Rca1 der Überexpression von 4xFLAG-Fzr entgegenwirken und seinen eigenen Abbau verhindern kann. Bei der Westernblotanalyse zeigte sich, dass ein Rca1 Konstrukt mit geringer APC/C-Inhibitionsfähigkeit bei aktivem APC/C^{Fzr} in der G2-Phase abgebaut wird. Im Falle von 4xFLAG-Rca1_C351S ist bei gleichzeitiger Überexpression mit 4xFLAG-Fzr eine um den Faktor 2 geringere Proteinmenge als bei dem APC/C-inhibitionsfähigen 4xFLAG-Rca1 nachweisbar (Abb. 2.15 B).

2.2.6 Steigende Fzr-Konzentrationen verbessern die Rca1-Degradation

In vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die N- als auch die C-terminale Region von Rca1 für einen Abbau in der G2-Phase hinreichend sind (2.2.4.3). Aber nicht nur die Abbausequenz scheint hierbei eine Rolle zu spielen, auch die inhibitorische Funktion von Rca1 auf den APC/C^{Fzr} scheint darin involviert zu sein (2.2.5). Inwieweit der Abbau von Rca1 von der Fzr-Konzentration abhängt, sollte in einer Transfektion von Schneiderzellen mit steigender Menge an Fzr-Plasmid geklärt werden. In einer anschließenden Analyse wurde die Proteinmenge an Rca1 im Westernblot und im Durchflusszytometer bestimmt.

Dazu wurden transient transfizierte Zellen auf eine SDS-PAGE aufgetragen, die neben der Transfektionskontrolle HA-NES-3xCherry entweder mit HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S, HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 oder einem HA-NLS-GFP als Kontrolle transfiziert waren (Abb. 2.16 B). In diesen Ansätzen wurde zusätzlich noch das aktive 4xFLAG-Fzr in steigender Konzentration co-exprimiert. Um die Transfektion immer mit der vergleichbaren Gesamtmenge an Plasmid-DNA durchzuführen, wurde die Differenz, die durch die unterschiedliche Menge an eingesetzter Plasmid-DNA für 4xFLAG-Fzr entstand, mit einem Bluescript-Leervektor ausgeglichen. Im Durchflusszytometer wurde ein Teil der Zellen gezählt und der prozentuale Anteil an GFP- und Cherry-positiven Zellen in jeder Probe bestimmt. Jeweils 55.000 Zellen wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und im anschließenden Westernblot sowohl Fzr als auch die Rca1-Derivate mit einer 1:1 HA/FLAG-Antikörpermischung nachgewiesen (Abb. 2.16 A). Dabei ist deutlich erkennbar, dass die Proteinmengen des C-terminalen HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S (a), als auch des N-terminalen HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 (b) bei steigender 4xFLAG-Fzr-Konzentration abnehmen. Anders verhält es sich bei der Kontrolle HA-NLS-GFP (c). Eine steigende Fzr-Konzentration hat keinen Einfluss auf das Expressionsniveau von HA-NLS-GFP. Die aufgetragene Menge an Zellen war mit Ausnahme der jeweils höchsten Konzentration an 4xFLAG-Fzr gleichmäßig, wie anhand der Transfektionskontrolle HA-NES-3xCherry auf den drei Blots zu erkennen ist. Die Abweichungen der Zellmengen bei jeweils der höchsten Fzr-Konzentration wird anhand von Überexpressionsexperimenten mit 4xFLAG-Fzr in Schneiderzellen erklärbar. Dort führte eine zu hohe Fzr-Konzentration zu einem vermehrten Absterben der Zellen bzw. zu einem schlechten Zellwachstum (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt legen die Blots den Schluss nahe, dass die Überexpression von 4xFLAG-Fzr für den Abbau von Rca1 direkt verantwortlich ist. Bekräftigt wird dies durch die Auswertung der Durchflusszytometriedaten. Das Diagramm in Abbildung 2.16 C zeigt die Auftragung der zuvor bestimmten Verhältnisse von GFP- zu Cherry-positiven Zellen gegen die steigende Fzr-Konzentration. Während bei der Kontrolle HA-NLS-GFP das Verhältnis von GFP- zu Cherry-positiven Zellen konstant blieb, konnten bei steigender Fzr-Konzentration immer weniger GFP-positive Zellen bei HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S (a) und bei HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 (b) detektiert werden. Dabei zeigte sich sowohl im Blot als auch im Diagramm, dass 4xFLAG-Fzr den Abbau des C-terminalen Rca1 (a) effizienter initiieren kann als den Abbau des N-terminalen Rca1 (b). Nachdem in Fzr-Überexpressionsexperimenten ein verfrühter Abbau von APC/C^{Fzr}-Substraten und auch von Rca1 in der G2-Phase gesehen werden konnte, sollte in einem weiteren Experiment getestet werden, ob durch eine Reduzierung der Fzr-Menge in Schneiderzellen eine Stabilisierung von Rca1 in der G1-Phase erreicht werden kann.

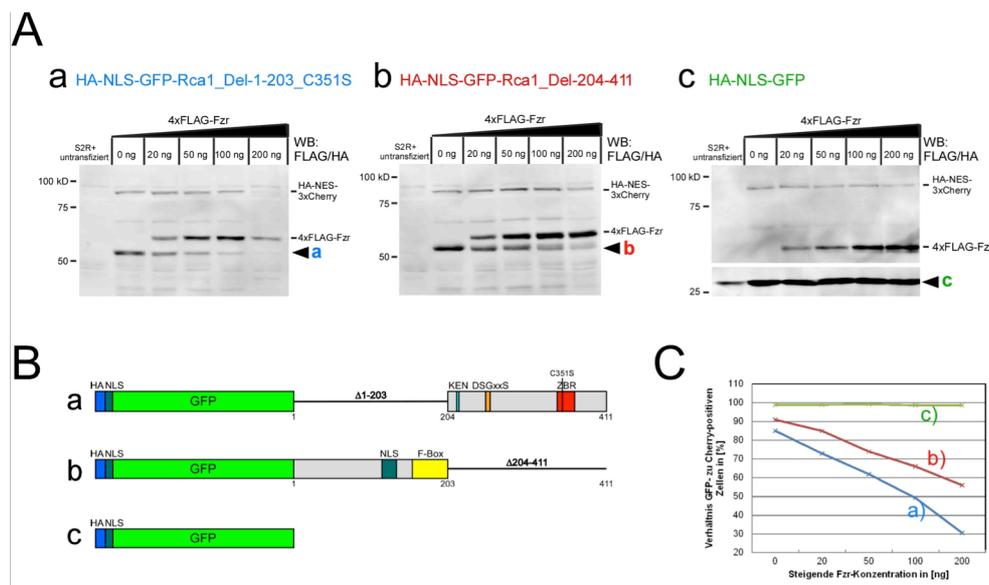


Abbildung 2.16: Der Abbau von Rca1 nimmt mit steigender Fzr-Menge zu

A: In Schneiderzellen wurden neben der Transfektions- und Beladungskontrolle HA-NES-3xCherry entweder das C-terminale Fragment von Rca1 (a), das N-terminale Fragment von Rca1 (b) oder eine stabile Kontrolle (c) exprimiert. Zusätzlich wurden die S2R⁺ Zellen mit einer steigenden Konzentration an Plasmid-DNA kodierend für 4xFLAG-Fzr transfiziert. Nach der Zählung eines Teiles der Zellen im Durchflusszytometer wurden 55.000 Zellen auf eine SDS-PAGE aufgetragen und im Westernblot mit einer 1:1 FLAG/HA-Antikörpermischung analysiert.

B: Schematische Darstellung der analysierten Rca1-Derivate: a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 und c) HA-NLS-GFP

C: Anhand der Durchflusszytometerdaten wurde das Verhältnis aus GFP- zu Cherry-positiven Zellen ermittelt und gegen die eingesetzte 4xFLAG-Fzr-Plasmidkonzentration in ein Diagramm eingezeichnet. HA-NES-3xCherry unterliegt keinem Abbau, wodurch es zusätzlich die Aufgabe einer Transfektionskontrolle übernimmt. Das fallende Verhältnis zwischen GFP- zu Cherry-positiven Zellen zeigt indirekt den mit steigender 4xFLAG-Fzr-Konzentration schneller werdenden Abbau des N- und C-terminalen Rca1 an.

2.2.7 Knock-down von Fzr führt zu Verlust der G1-Phase

Es ist bekannt, dass für eine Etablierung der G1-Phase Fzr zwingend notwendig ist (Sigrist und Lehner, 1997). Deshalb sollte in einem RNAi-Experiment versucht werden, die Aktivität des APC/ C^{Fzr} -Komplexes so weit herab zu setzen, dass die Zellen zwar noch in die G1-Phase gelangen können, dort aber nicht mehr in der Lage sind, die spezifischen Substrate effektiv abzubauen.

Für die Etablierung eines solchen Systems wurde zuerst in einem allgemeinen Kontroll-experiment die Effizienz der doppelsträngigen RNAi an einem Knock-down von NES-3xCherry überprüft. Dafür wurden in Schneiderzellen NES-3xCherry und HA-NLS-GFP überexprimiert und durch Zugabe von zuvor hergestellter, doppelsträngiger Cherry-RNAi der Effekt im Durchflusszytometer analysiert. Als Referenz dienten transfizierte Zellen ohne zugegebener Cherry-RNAi (Abb. 2.17). Dabei zeigte sich eine deutliche Reduzierung bei den Cherry-positiven Zellen, während die GFP-positiven Zellen unverändert blieben.

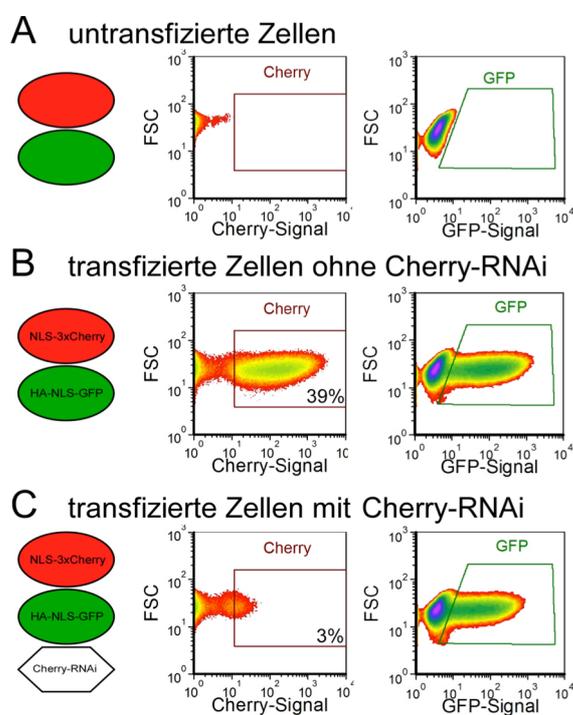


Abbildung 2.17: Kontrollexperiment für den Knock-down von NLS-3xCherry

A: Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Schneiderzellen im Durchflusszytometer gemessen und die Gates (Rechtecke) für Cherry- bzw. GFP-positiven Zellen so gesetzt, dass weniger als 0,25% der Zellen im Inneren lagen.

B: Transfektion der S2R+ Zellen mit HA-NLS-3xCherry und HA-NLS-GFP als Positivkontrolle. Die Cherry- bzw. GFP-positiven Zellen befinden sich innerhalb der Gates.

C: Zusätzliche Zugabe von doppelsträngiger Cherry-RNAi auf die transfizierten Zellen

In einem weiteren Etablierungsschritt wurde doppelsträngige Fzr-RNAi hergestellt und auf Schneiderzellen gegeben, die neben einer HA-NLS-GFP Kontrolle auch das APC/C^{Fzr}-Substrat CyclinB_Del-286-530-Cherry exprimierten (Abb. 2.18). Für diese erste Experimentreihe ist die hergestellte Fzr-RNAi auf einem Agarosegel überprüft worden, die genaue Konzentration wurde aber nicht bestimmt, weshalb auch keine Konzentrationsangabe möglich ist. Es wurde vielmehr eine Titrationsreihe durchgeführt und von Ansatz zu Ansatz die Menge an Fzr-RNAi jeweils halbiert.

Abbildung 2.18 A zeigt die Zellzyklusprofile ohne Fzr-RNAi-Zugabe. Während das Profil der GFP-positiven Zellen dem Profil der untransfizierten Zellen ähnelt und demnach HA-NLS-GFP zellzyklusunabhängig exprimiert wird, weisen die Cherry-positiven Zellen einen reduzierten Gehalt an G1-Zellen auf, der durch den APC/C^{Fzr} bedingten Abbau von CyclinB_Del-286-530-Cherry in der G1-Phase hervorgerufen wird. Wird auf die Zellen

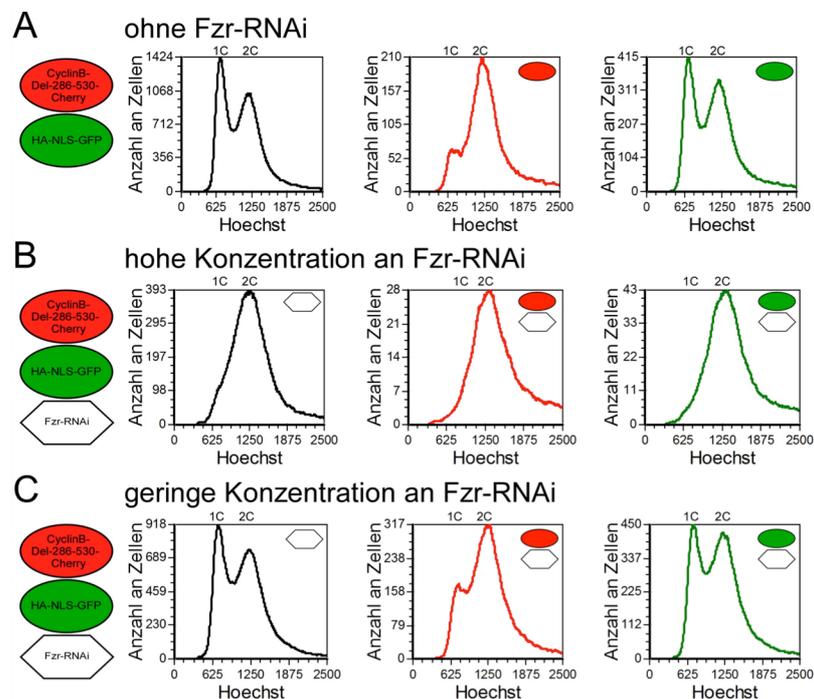


Abbildung 2.18: Knock-down von Fzr führt zu Verlust der G1-Phase in Schneiderzellen

In Schneiderzellen wurde neben dem Kontrollprotein HA-NLS-GFP das verkürzte APC/C^{Fzr}-Substrat CyclinB_Del-286-530-Cherry exprimiert und die Fluoreszenzsignale im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Zellzyklusprofile der untransfizierten Zellen (links), sowie der Cherry-positiven Zellen (Mitte) und der GFP-positiven Zellen (rechts).

A: Zellzyklusprofile ohne Fzr-RNAi: Die untransfizierten Zellen zeigen ein normales Zellzyklusprofil. CyclinB_Del-286-530-Cherry wird als Substrat des APC/C^{Fzr} in der G1-Phase abgebaut, während HA-NLS-GFP gleichmäßig exprimiert vorliegt und dem Zellzyklusprofil der untransfizierten Zellen ähnelt.

B: Zellzyklusprofile mit hoher Konzentration an Fzr-RNAi: Durch den vermutlich vollständigen Knock-down von Fzr können die Zellen keine G1-Phase mehr etablieren und der 1C-Peak ist vollständig verschwunden.

C: Zellzyklusprofile mit geringer Konzentration an Fzr-RNAi: Die untransfizierten Zellen zeigen wieder annähernd ein normales Zellzyklusprofil. Ebenso die Kontrolle der GFP-positiven Zellen. CyclinB_Del-286-530-Cherry wird trotz der Reduzierung von Fzr als Substrat des APC/C^{Fzr} erkannt und in der G1-Phase wieder abgebaut.

zusätzlich eine hohe Konzentration an doppelsträngiger Fzr-RNAi gegeben, kommt es zu einem vollständigen Knock-down von Fzr-RNA in der Zelle, mit dem Resultat, dass die Zellen nicht mehr in der Lage sind, eine G1-Phase zu etablieren. Dabei scheinen alle Zellen die doppelsträngige RNA aufgenommen zu haben (Abb 2.18 B).

Wurde in dem Experiment eine geringere Menge an Fzr-RNAi hinzugegeben, waren die Zellen wieder in der Lage eine ausreichende Anzahl an APC/C^{Fzr}-Komplexen zu aktivieren und die Zellen konnten in die G1-Phase eintreten. Sowohl die untransfizierte Zellen als auch die GFP-positiven Zellen zeigten wieder annähernd ein normales Zellzyklusprofil mit einem größeren Anteil an G1- als G2-Zellen. Der erzielte Knock-down von Fzr reichte aber nicht aus, um die notwendige Etablierung der G1-Phase von der Aktivität des APC/C^{Fzr}-Komplexes mit dem Abbau der Substrate zu entkoppeln (Abb. 2.18 B). In einem abschließenden Experiment wurde die HA-NLS-GFP-Kontrolle durch das inaktive HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S ersetzt und der Versuch wie zuvor beschrieben durchgeführt (Abb. 2.19).

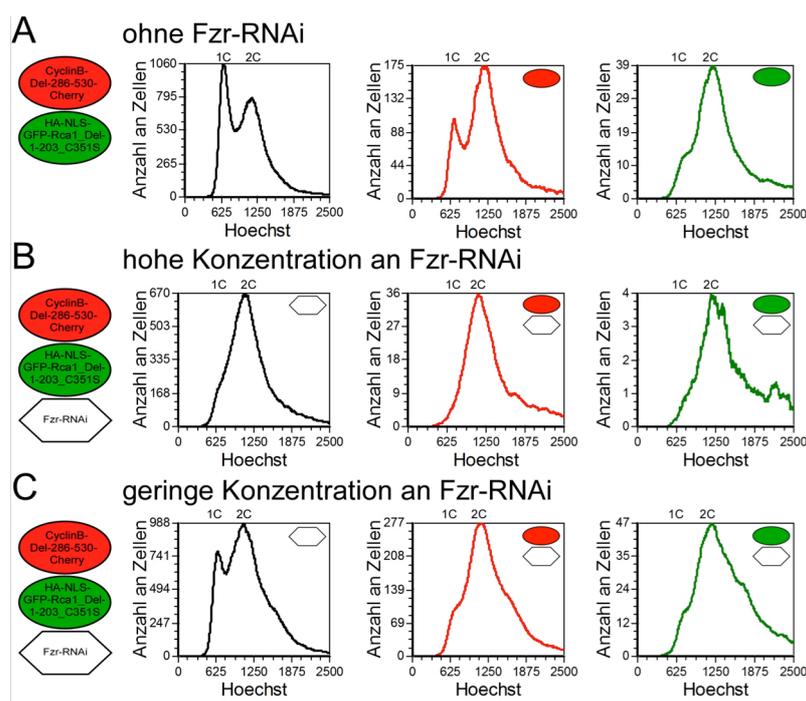


Abbildung 2.19: Knock-down von Fzr führt zu Verlust der G1-Phase in Schneiderzellen

In Schneiderzellen wurde neben dem Substrat CyclinB_Del-286-530-Cherry auch das C-terminale, inaktive HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S exprimiert und im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Zellzyklusprofile der untransfizierten Zellen (links), sowie der Cherry-positiven Zellen (Mitte) und der GFP-positiven Zellen (rechts).

A: Zellzyklusprofile ohne Fzr-RNAi: Die untransfizierten Zellen zeigen ein normales Zellzyklusprofil. Sowohl CyclinB_Del-286-530-Cherry als Substrat des APC/C^{Fzr}, als auch HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S werden in der G1-Phase abgebaut.

B: Zellzyklusprofile mit hoher Konzentration an Fzr-RNAi: Durch den vermutlich vollständigen Knock-down von Fzr können die Zellen keine G1-Phase mehr etablieren und der 1C-Peak ist vollständig verschwunden.

C: Zellzyklusprofile mit geringer Konzentration an Fzr-RNAi: Wenigen der untransfizierten Zellen gelingt es, die G1-Phase zu etablieren. Dennoch wird keine Stabilisierung von CyclinB_Del-286-530-Cherry und von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S in der G1-Phase

Dabei zeigte sich bei der Kontrollmessung ohne Fzr-RNAi, dass sowohl CyclinB_Del-286-530-Cherry als Substrat des APC/C^{Fzr}, als auch HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S in der G1-Phase abgebaut wurden (Abb. 2.19 A). Auch hier ergab sich durch die Zugabe einer hohen Dosis an Fzr-RNAi eine Zellzyklusverschiebung in Richtung G2-Zellen, da keine G1-Phase mehr etabliert werden konnte (Abb. 2.19 B). Wurde die Menge an Fzr-RNAi so weit reduziert, dass bei den untransfizierten Zellen wieder ein kleiner G1-Phase-Peak zu erkennen war, war dennoch keine Entkopplung von G1-Etablierung und reduzierter APC/C-Aktivität möglich. Sowohl CyclinB_Del-286-530-Cherry als auch HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S zeigten keine Stabilisierung in der G1-Phase (Abb. 2.19 C). Nachdem auch CyclinB_Del-286-530-Cherry als bekanntes Substrat des APC/C nicht stabilisiert werden konnte, ist es mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich, die APC/C^{Fzr}-Aktivität in der G1-Phase so weit zu inaktivieren, dass die Substrate stabilisiert werden, aber zugleich die Progression in G1 erhalten bleibt. Scheinbar ist bereits eine geringe Anzahl aktivierter APC/C-Komplexe ausreichend, um einen effektiven Abbau der Substrate herbeizuführen.

Dennoch kann aus den einheitlichen DNA-Profilen zwischen dem APC/C-Substrat CyclinB_Del-286-530-Cherry und HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S der Schluss gezogen werden, dass sich Rca1 wie ein APC/C-Substrat verhält.

2.2.8 Dacapo-Überexpression führt zu stabilem Rca1 in G1

Dacapo ist ein Cyclin-Kinase-Inhibitor (CKI), der über eine Bindedomäne an CyclinE und Cdk2 bindet und dadurch CyclinE/Cdk2 in der G1-Phase inaktiv hält (de Nooij, *et al.*, 1996; Lane, *et al.*, 1996). Da die CyclinE/Cdk2-Aktivität wichtig für den G1/S-Übergang ist (Knoblich, *et al.*, 1994), wird durch die Inhibierung der Eintritt in die S-Phase verzögert.

Durch Überexpression von Dacapo kann in *Drosophila*-Embryonen eine vollständige Inhibierung von CyclinE/Cdk2 und ein vollständiger G1-Arrest erzielt werden (de Nooij, *et al.*, 2000). Auch in Schneiderzellen konnte bei Überexpression von GFP-Dacapo ein Arrest des Zellzyklus in G1 beobachtet werden (Bauer, 2011).

Bei einer gleichzeitigen Überexpression mit dem APC/C^{Fzr}-Substrat CyclinB_Del-286-530-Cherry wurde dieses nicht wie gewohnt abgebaut, sondern lag in der G1-Phase stabil vor. Aus einem noch ungeklärten Grund wird der APC/C-Komplex durch die Überexpression von Dacapo in der G1-Phase inaktiviert (Bauer, 2011). Wenn durch dieses

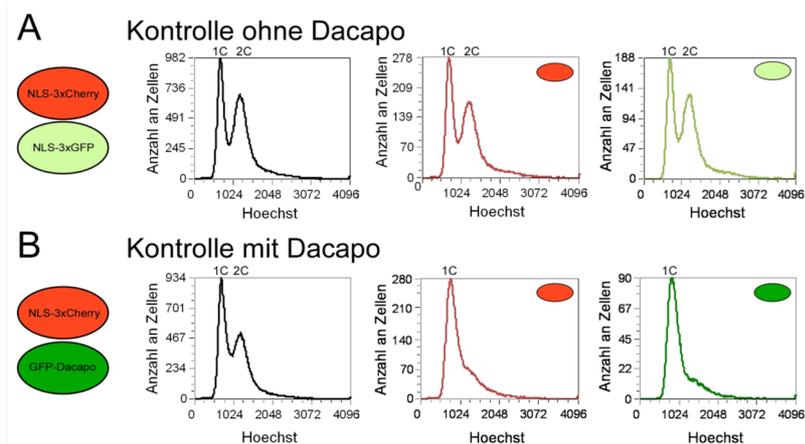


Abbildung 2.20: Überexpression von GFP-Dacapo führt zu einem G1-Phase-Arrest

Überexpression des Kontrollproteins NLS-3xCherry mit NLS-3xGFP (A) oder GFP-Dacapo (B) in Schneiderzellen. Dargestellt sind die Zellzyklusprofile der untransfizierten Zellen (links), sowie der Cherry-positiven Zellen (Mitte) und der GFP-positiven Zellen (rechts).

A: Die NLS-3xCherry und NLS-3xGFP transfizierten Zellen zeigen ein normales Zellzyklusprofil ähnlich den untransfizierten Zellen mit einem größeren Anteil an G1-Zellen.

B: Überexpression von GFP-Dacapo: G1-Phase-Arrest, der sowohl im Zellzyklusprofil der GFP-positiven Zellen, aber auch der Cherry-positiven Zellen zu sehen ist.

Phänomen CyclinB_Del-286-530-Cherry in der G1-Phase stabilisiert wird, müsste auch Rca1 stabilisiert werden, sofern es ein Substrat des APC/C^{Fzr} ist.

Um dies zu testen, wurden Schneiderzellen mit NLS-3xCherry und NLS-3xGFP transfiziert und das Zellzyklusprofil mit Zellen verglichen, in denen NLS-3xGFP mit GFP-Dacapo ersetzt worden ist. Die Überexpression von Dacapo führte zu einem G1-Phase Arrest der Zellen, der auch im Zellzyklusprofil der Cherry-positiven Zellen zu sehen war

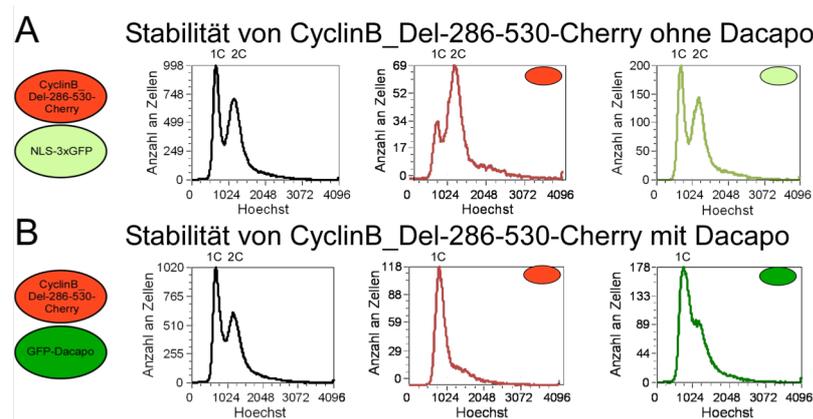


Abbildung 2.21: Überexpression von GFP-Dacapo stabilisiert CyclinB_Del-286-530 in G1

A: Das Zellzyklusprofil von CyclinB_Del-286-530-Cherry zeigt durch seinen Abbau als Substrat des APC/C^{Fzr} einen verringerten G1-Peak im Vergleich zur NLS-3xGFP Kontrolle, die dem DNA-Profil der untransfizierten Zellen gleicht.

B: Überexpression von GFP-Dacapo: Zellen arretieren in der G1-Phase und CyclinB_Del-286-530-Cherry kann in der G1-Phase akkumulieren.

(Abb. 2.20). Wird anstelle von NLS-3xCherry das APC/C^{Fzr}-Substrat CyclinB_Del-286-530-Cherry mit NLS-3xGFP co-transfiziert, kann im Zellzyklusprofil der Cherry-positiven Zellen der spezifische Abbau von CyclinB_Del-286-530-Cherry durch den APC/C^{Fzr} anhand der Abnahme des 1C-Peaks verfolgt werden. Bei einer gleichzeitigen Co-Expression mit GFP-Dacapo arretieren die Zellen wieder in der G1-Phase und CyclinB_Del-286-530-Cherry kann in der G1-Phase akkumulieren. Die Überexpression von Dacapo scheint sich inhibitorisch auf den APC/C^{Fzr} auszuwirken (Abb. 2.21).

In einem letzten Schritt wurde das bekannte APC/C-Substrat CyclinB_Del-286-530-Cherry durch Cherry-Rca1_Del-1-203_C351S ersetzt (Abb. 2.22). Dabei zeigte sich auch hier nach Überexpression von GFP-Dacapo eine Stabilisierung in der G1-Phase, während es ohne Dacapo in der G1-Phase noch abgebaut werden konnte.

Durch die Überexpression von Dacapo sind die Zellen nicht mehr in der Lage, die G1-Phase zu verlassen. Zusätzlich inaktiviert die Überexpression von Dacapo über einen unbekanntem Mechanismus den APC/C^{Fzr}-Komplex in G1, was zu einer Stabilisierung des APC/C-Substrates CyclinB_Del-286-530-Cherry in G1 führt. Dieselbe Stabilisierung konnte auch für Cherry-Rca1_Del-1-203-C351S in G1 gezeigt werden. Diese und vorhergehenden Experimente lassen den Schluss zu, dass Rca1 ein Substrat des APC/C^{Fzr} sein könnte.

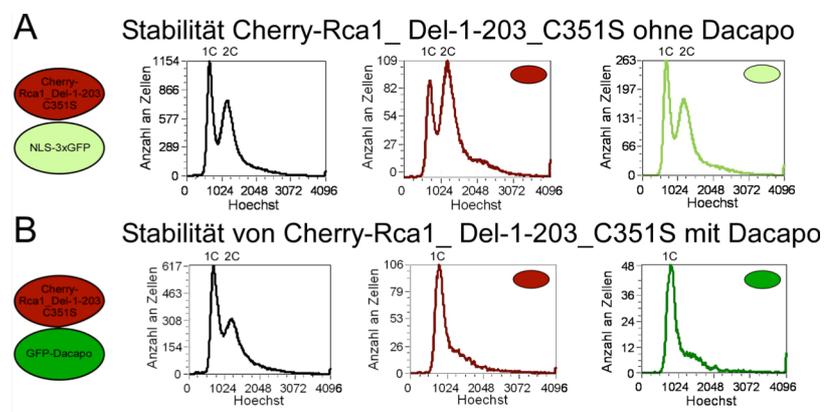


Abbildung 2.22: Überexpression von GFP-Dacapo stabilisiert Rca1_Del-1-203_C351S in G1

A: Das Zellzyklusprofil von Cherry-Rca1_Del-1-203_C351S zeigt durch seinen Abbau in der G1-Phase einen verringerten G1-Peak im Vergleich zur NLS-3xGFP-Kontrolle, welche dem DNA-Profil der untransfizierten Zellen gleicht.

B: Überexpression von GFP-Dacapo: Zellen arretieren in der G1-Phase und Cherry-Rca1_Del-1-203_C351S kann in der G1-Phase akkumulieren.

2.2.9 Rca1 interagiert mit der APC/C-Untereinheit Cdc23

In vorherigen Studien konnte eine Interaktion zwischen Rca1 und Fzr festgestellt werden (Grosskortenhans, 2001). Neben der Interaktion mit den beiden APC/C-Komponenten konnte auch eine physikalische Interaktion von Rca1 – sowohl in einer Co-Immunpräzipitation (Zielke, 2006), als auch in einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment (Giot, *et al.*, 2003) – mit einer Komponente des SCF-Komplexes nachgewiesen werden. Dabei zeigte Rca1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine starke Interaktion mit der SCF-Untereinheit SkpA.

In einem genomweiten Screen mit einer *Drosophila*-Genbank wurde von der Firma „Y2H service Hybigenics“ aus Paris nach Interaktionspartnern von Rca1 gesucht. Neben dem bereits bekannten SkpA konnte auch Cdc23 als ein moderater Interaktionspartner identifiziert werden. In einer anschließenden Immunpräzipitation mit FLAG-Cdc23 und HA-Rca1 konnte Cdc23 als ein Interaktionspartner von Rca1 bestätigt werden (Querings, 2006).

Um die Interaktion noch einmal genauer zu verifizieren, wurde in dieser Arbeit ein eigenes Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment und eine neue Co-Immunpräzipitation aus Schneiderzellen durchgeführt.

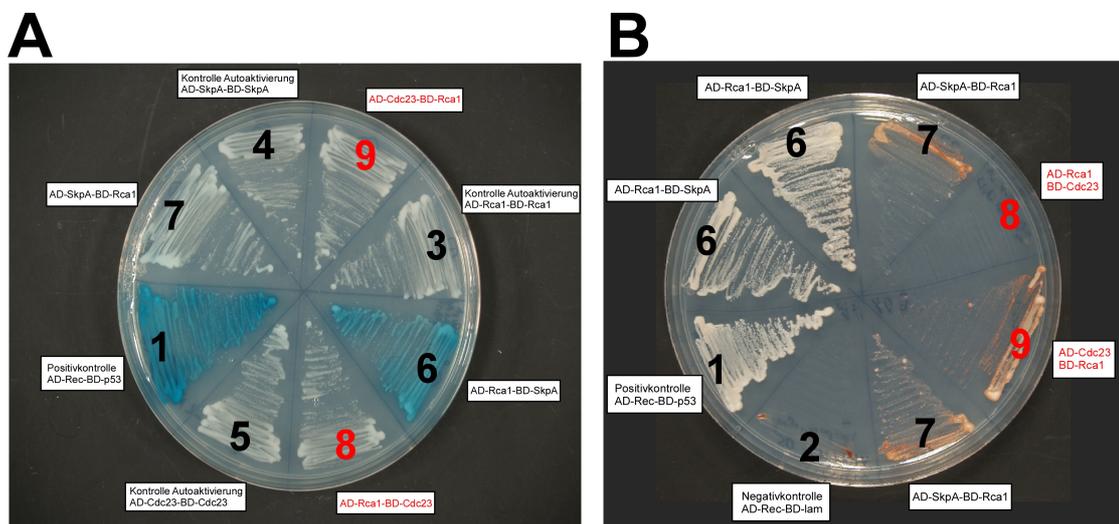
2.2.9.1 Nachweis im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast-Two-Hybrid*, kurz: Y2H) kann die direkte Interaktion zweier Proteine getestet werden. Die Gensequenzen der zu untersuchenden Proteine werden entweder an die DNA-Bindedomäne (BD) des Transkriptionsfaktors oder an die Transkriptionsaktivatorodomäne (AD) gekoppelt. Nur wenn beide Proteine miteinander in Kontakt treten, kann der Transkriptionsfaktor das unter seiner Kontrolle stehende Gen aktivieren, was entweder zur Blaufärbung der Kolonien (X-Gal-Farbassay) oder zum Wachstum der Zellen (Wachstumsassay) führt.

Dazu wurden die Allele von Rca1 und von Cdc23 so in beide Expressionsvektoren pGBKT7 und pADT7 umkloniert, dass N-terminale Fusionen mit der Aktivierungs- bzw. der Bindedomäne entstanden. Zur Überprüfung der Expressionslevel wurde zwischen Aktivatorodomäne und dem Gen ein einfach bzw. vierfach HA-Epitop zwischengeschaltet. Außerdem kam nach der Bindedomäne ein einfaches MYC-Epitop zum Einsatz. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde mit beiden Plasmiden transformiert und einzelne, auf Selektionsplatten gewachsene Kolonien entsprechend der Bezifferung von Abbildung

2.23 auf den Selektionsplatten für den X-Gal-Farbassay (Abb. 2.23 A) bzw. auf Selektionsplatten für den Wachstumstest (Abb. 2.23 B) ausgestrichen.

Als Positivkontrollen wurden zum einen die im Matchmakersystem mitgelieferten Kontrollen AD-HA-Rec und BD-MYC-p53 verwendet, zum anderen wurde die bereits bekannte Interaktion von AD-4x-HA-Rca1 mit MYC-SkpA als direkte Kontrolle für eine Interaktion von Rca1 genutzt (Abb. 2.23 A, B, C Nummer 1 und 6). Beide Positivkontrollen zeigten dabei eine starke Interaktion in Form einer intensiven Blaufärbung. Interessanterweise erbrachte die umgekehrte Orientierung AD-HA-SkpA – MYC-Rca1 ein anderes Ergebnis, denn es konnte nur beim sensitiveren Wachstumsassay ein geringes Wachstum und somit eine geringe Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 2.23 A, B, C Nummer 7).



C

	Aktivierungsdomäne	Binde-domäne	Interaktion (Farbtest)	Interaktion (Wachstumstest)	
1	Positivkontrolle	HA-Rec	MYC-p53	+++	+++
2	Negativkontrolle	HA-Rec	MYC-lam	-	-
3	Kontrolle Autoaktivierung	4xHA-Rca1	MYC-Rca1	-	n.d.
4	Kontrolle Autoaktivierung	HA-SkpA	MYC-SkpA	-	n.d.
5	Kontrolle Autoaktivierung	4xHA-Cdc23	MYC-Cdc23	-	n.d.
6		4xHA-Rca1	MYC-SkpA	+++	+++
7		HA-SkpA	MYC-Rca1	-	+
8		4xHA-Rca1	MYC-Cdc23	-	-
9		4xHA-Cdc23	MYC-Rca1	-	+

Abbildung 2.23: Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment

Transkriptionsfaktoren enthalten normalerweise zwei Domänen, eine DNA-Bindedomäne und eine Transkriptionsaktivator-domäne. Die zu untersuchenden Interaktionspartner wurden jeweils an eine der Domänen fusioniert. Der Transkriptionsfaktor wird aktiviert, wenn beide Proteine interagieren.

A: X-Gal-Farbassay: Eine Interaktion zwischen den zu testenden Proteinen wird über eine Blaufärbung sichtbar.

B: Wachstumstest: Nur bei einer Interaktion kann die Auxotrophie gegen Tryptophan und Leucin aufgehoben werden, so dass die Hefen wachsen können.

C: Übersichtstabelle der getesteten Interaktionspartner und der Richtung, in der getestet wurde. Die Skala von – bis +++ spiegelt die Stärke der Interaktion wieder (von keiner Interaktion: - bis zu starker Interaktion +++). In rot dargestellt ist der Interaktionstest von Rca1 mit Cdc23. n.d.: nicht durchgeführt

Der Farbassay war nicht zu unterscheiden von der mitgelieferten Negativkontrolle HA-Rec – MYC-Lam und ist somit negativ zu bewerten (Abb. 2.23 B, C Nummer 2). Wird die Interaktion zwischen Rca1 und Cdc23 betrachtet, kann auch hier nur im Wachstumsassay zwischen 4xHA-Cdc23 – MYC-Rca1 eine schwache Interaktion festgestellt werden, in der anderen Orientierung 4xHA-Rca1 – MYC-Cdc23 fiel der Interaktionsnachweis negativ aus (Abb. 2.23 A, B, C Nummer 8 und 9).

Zudem wurde eine mögliche Dimerisierung untersucht. Diese fiel jedoch im Farbassay sowohl bei Rca1 als auch mit Cdc23 und SkpA negativ aus (Abb. 2.23 A, C Nummer 3, 4, 5). Ein Ergebnis mit dem sensitiveren Wachstumsassay liegt nicht vor, weshalb eine endgültige Aussage über eine Dimerisierung nicht getroffen werden kann.

Von jedem Interaktionspartner wurde zusätzlich eine mögliche Autoaktivierung im Farbassay überprüft. Eine Autoaktivierung liegt dann vor, wenn ein Interaktionspartner alleine in der Lage ist, den Transkriptionsfaktor zu aktivieren. Dazu wurden die verschiedenen Interaktionspartner, die entweder an die Bindedomäne oder die Aktivator-domäne fusioniert waren, mit dem entsprechenden Leervektor der anderen Domäne getestet. Im Farbassay konnte keine Autoaktivierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), aber um eine endgültige Autoaktivierung ausschließen zu können, ist auch hier der sensitivere Wachstumsassay notwendig.

Von den einzelnen Hefestämmen wurden Proteinlysate gemacht und die Proteinmengen auf einem Westernblot analysiert (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich heraus, dass die Proteinmengen von Stamm zu Stamm durchaus Unterschiede aufwiesen, es konnten aber überall die Proteine nachgewiesen werden. Einen Einfluss auf die Stärke der Interaktion hatten die unterschiedlichen Expressionsstärken nicht.

Anhand dieser Interaktionsanalyse konnten frühere Ergebnisse bestätigt werden, in denen Rca1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit SkpA interagiert (Giot, *et al.*, 2003). Die Interaktion funktioniert allerdings nur in eine Richtung. Insgesamt konnte das Ergebnis aus dem Hefescreen wiederholt werden, der Beitrag der Autoaktivierung ist jedoch ungewiss, weshalb auch in einer Co-Immunpräzipitation dieses Ergebnis noch einmal verifiziert werden sollte.

2.2.9.2 Co-Immunpräzipitation von Rca1 mit Cdc23

Basierend auf den Daten vom Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment ist Cdc23 zwar ein moderater, aber direkter Interaktionspartner von Rca1. Um das Ergebnis zu bestätigen, wurde eine Wiederholung der Co-Immunpräzipitation in Schneiderzellen durchgeführt.

Dazu wurde Cdc23 mit einem N-terminalen 4xFLAG-Epitop und Rca1 mit einem N-terminalen 1xHA-Epitop versehen, um die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern detektieren zu können. 4xFLAG-Cdc23 und HA-Rca1 wurden in S2R+ Zellen co-exprimiert und beide Proteine mithilfe des FLAG- bzw. des HA-Antikörpers aus den Zelllysaten immunpräzipitiert. Im Anschluss wurden die Zelllysate (Input) zusammen mit den Präzipitaten auf eine SDS-PAGE aufgetragen und die Westernblots mit einem FLAG- oder HA-Antikörper analysiert.

Abbildung 2.24 A zeigt das Ergebnis der Co-Immunpräzipitation mit dem FLAG-Antikörper. HA-Rca1 konnte aus den Zelllysaten präzipitiert werden. Die Präzipitation mittels HA-Antikörper ist nicht dargestellt.

Der FLAG-Antikörper detektiert zwei spezifische Banden, die im Input ohne 4xFLAG-Cdc23 nicht zu sehen sind, wobei die stärkere Bande der erwarteten Bandengröße von 4xFLAG-Cdc23 bei ca. 78 kDa entspricht. Bei der kleineren Bande könnte es sich ebenfalls um Cdc23 mit möglicherweise nur einem FLAG-Epitop handeln (Abb. 2.24 Spur 1 und 2 FLAG-Blot). Wird 4xFLAG-Cdc23 mit dem FLAG-Antikörper präzipitiert, lassen sich ebenfalls wieder die beiden Banden nachweisen (Spur 4). Auf dem HA-Blot ist bei der erwarteten Bandengröße von ca. 47 kDa eine schwache Bande erkennbar. Dabei müsste es sich um das co-präzipitierte HA-Rca1 handeln, da es in der Kontrollspur ohne überexprimiertem 4xFLAG-Cdc23 nicht zu detektieren war (Abb. 2.24 A, Spur 3 und 4). Aufgrund der Daten aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment, die eine direkte Interaktion zwischen Cdc23 und Rca1 zeigen konnten, wurden 4xFLAG-Cdc23 und HA-Rca1 in direktem Kontakt zueinander gezeichnet (Abb. 2.24 B). Es ist jedoch nach wie vor nicht auszuschließen, dass Cdc23 und Rca1 nur indirekt miteinander interagieren.

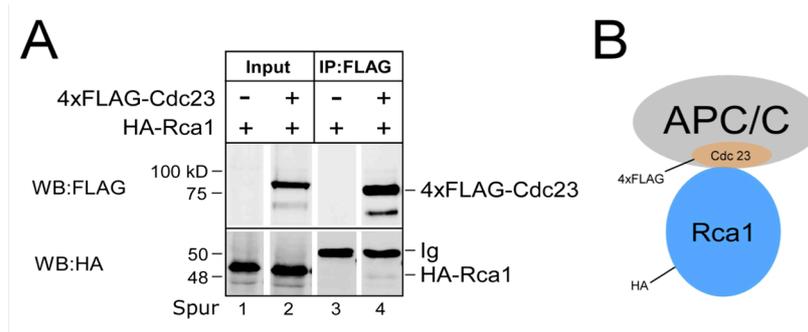


Abbildung 2.24: Biochemische Interaktion von Rca1 und Cdc23

A: S2R+-Zellen wurden mit Plasmiden für 4xFLAG-Cdc23 und HA-Rca1 transient transfiziert und deren Proteinexpression induziert. Die Zelllysate von 4xFLAG-Cdc23 und HA-Rca1 (Input) sowie die Immunpräzipitate (IP) wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und die Proteine im Westernblot mit FLAG-Antikörper (oberer Blot) und HA-Antikörper (unterer Blot) nachgewiesen.

B: Graphische Darstellung einer möglichen Interaktion von HA-Rca1 mit 4xFLAG-Cdc23

Dieses und vorhergehende Experimente lassen den Schluss zu, dass mit Rca1 ein weiteres Substrat des APC/C^{F₂r} gefunden worden sein könnte. Um einen näheren Einblick auf den APC/C-vermittelten Abbau in der G1-Phase zu bekommen, ist es von Bedeutung, die notwendige Abbausequenz in Rca1 zu ermitteln.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Rca1 mit APC/C-Komponenten interagiert. Diese Interaktion spiegelt die Fähigkeit von Rca1 wider, je nach Zellzyklusphase entweder als Inhibitor oder als Substrat an den APC/C zu binden. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, müssten die Aminosäure-Sequenzen in Rca1 identifiziert werden, die für die Bindung von Rca1 an den APC/C als Inhibitor und als Substrat verantwortlich sind. Im besten Fall müssten beide Funktionen einzeln untersucht werden.

2.3 Der Abbau von Rca1 in Schneiderzellen

Für eine genauere Quantifizierung des Abbaus der verschiedenen Rca1-Deletionen in der G1-Phase wurde, neben den bereits dargestellten Abbaukurven, eine Methode etabliert, um die Quantifizierung am Durchflusszytometer durchzuführen. Während die Abbaukurven den Mittelwert des Abbaus aus zehn Einzelzellen über die Zeit darstellen, bringt die Durchflusszytometrie den Vorteil mit sich, durch einen großen Durchsatz an Zellen eine größere Anzahl an Zellen zu analysieren.

2.3.1 Faktoren, die den Abbau von Rca1 beeinflussen

Um mittels Durchflusszytometrie an verlässliche Daten über den Abbau von Rca1 zu gelangen, mussten zu Beginn eine Vielzahl an beeinflussenden Faktoren ausgeschlossen werden. Generell wurden die Messungen an wachsenden Zellen durchgeführt, da sich bei stationären Zellen das Zellzyklusprofil in Richtung G2-Phase verschiebt und dies einen Einfluss auf die Auswertung hat.

Im Folgenden wird auf die Berechnung der Stabilitätswerte der verschiedenen Rca1-Derivate eingegangen und die Einfluss nehmenden Faktoren näher erläutert.

2.3.1.1 Ermittlung der Stabilitätswerte verschiedener Rca1-Derivate

Für die Berechnung der Stabilitätswerte wurde in Schneiderzellen neben dem Rca1-Derivat immer ein Kontrollprotein co-exprimiert. Handelte es sich um ein Cherry-epitopmarkiertes Rca1, wurde als Kontrollprotein HA-NLS-3xGFP verwendet, bei einem

GFP-epitopmarkiertem Rca1 kam HA-NES-3xCherry zum Einsatz. Den Kontrollproteinen kommt bei der Berechnung der relativen G1-Stabilität eine entscheidende Rolle zu, was im Folgenden an ein paar Beispielen erläutert wird.

2.3.1.1.1 Kontrolle HA-NLS-GFP und HA-NES-3xCherry

Als Beispiel für ein G1-Phase stabiles Protein wurde HA-NLS-GFP verwendet und HA-NES-3xCherry als Kontrollprotein co-exprimiert (Abb. 2.25 A).

Die Zellzyklusprofile wurden im Durchflusszytometer bestimmt und sind in Abbildung 2.25 B in einer Grafik zusammengestellt. Für eine direkte Vergleichbarkeit der einzelnen Profile wurden die Zellen auf das Maximum im G2-Peak der untransfizierten Zellen normiert. Wie zu erkennen ist, sind die Profile der GFP- (grün) und der Cherry-positiven Zellen (rot) identisch und ähneln stark dem Profil der untransfizierten Zellen (grau). Einzig der Anteil an G1-Zellen ist reduziert. Die Ursache könnte an der Methode der Expression durch Plasmid-Transfektion liegen. Die Zellen nehmen die Plasmide bei der Transfektion ins Zytoplasma auf, die Herstellung der Proteine beginnt aber erst nach Aufnahme in den Zellkern nach der ersten Zellteilung. Deshalb könnte es sich hier um den Anteil an Zellen handeln, die sich seit der Transfektion nicht geteilt haben. Dieser Unterschied spielt in der Berechnung keine Rolle, da die Verhältnisse der GFP- und Cherry-positiven Zellen verwendet wurden und die untransfizierten Zellen in die Berechnung nicht mit einfließen. Um den Fehler möglichst gering zu halten und alle S-Phase-Zellen auszuschließen, wurden nur die erste Hälfte des 1C-Peaks und die zweite Hälfte des 2C-Peaks in der Formel verwendet. In einer Seitenaufsicht auf die drei überlagerten Zellzyklusprofile wird dies ersichtlich (Abb. 2.25 C).

Die Formel zur Bestimmung der relativen G1-Stabilität ist in Abbildung 2.25 D dargestellt. Für die Berechnung wird das Verhältnis der Cherry- zu den GFP-positiven Zellen in G2 durch das Verhältnis der Cherry- und GFP-positiven Zellen in G1 geteilt.

Werden die aus der Durchflusszytometrie erhaltenen Werte für HA-NLS-GFP und HA-NES-3xCherry in diese Formel eingesetzt, ergibt sich ein Wert von 1,00. Dieser Referenzwert entspricht dem Wert eines stabilen Proteins in der G1-Phase, das keinem Abbau unterworfen ist. Die Berechnungen wurden mithilfe eines Makros in Microsoft Excel durchgeführt.

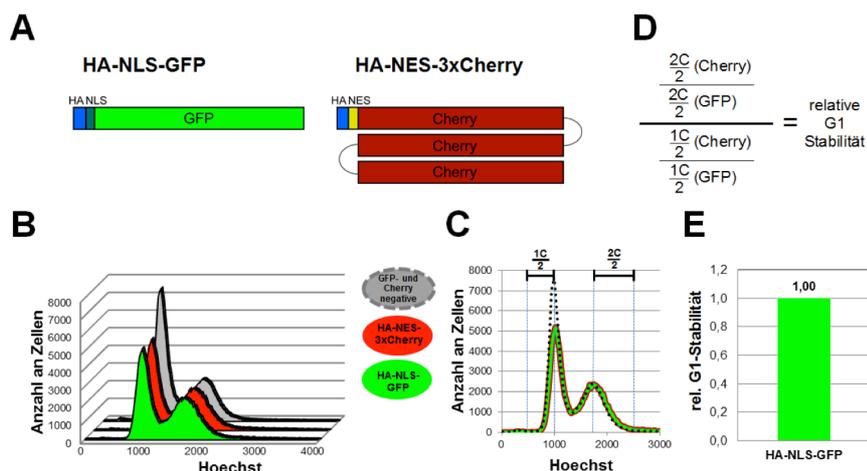


Abbildung 2.25: Ermittlung der Stabilitätswerte der Kontrolle HA-NLS-GFP

A: Schematische Darstellung der in Schneiderzellen co-exprimierten Kontrollplasmide HA-NLS-GFP und HA-NES-3xCherry

B: Die Zellzyklusprofile der untransfizierten Zellen (grau), der Cherry-positiven (rot) sowie der GFP-positiven (grün) Zellen sind in einer Grafik dargestellt. Dabei wurden GFP- und Cherry-positive Zellen auf den maximalen G2-Wert der untransfizierten Zellen normiert.

C: Seitenansicht auf die drei übereinandergelagerten Zellzyklusprofile. In die Berechnung für die Ermittlung der Stabilitätswerte (D) ging jeweils nur die erste Hälfte des 1C-Peaks sowie die zweite Hälfte des 2C-Peaks ein, um die vorhandenen S-Phase-Zellen in der Berechnung auszuschließen.

D: Formel für die Berechnung der Stabilitätswerte in G1. Dabei wird das Verhältnis der Cherry- zu den GFP-positiven Zellen in G2 durch das Verhältnis der Cherry- und GFP-positiven Zellen in G1 geteilt. Das Ergebnis entspricht der relativen G1-Stabilität des untersuchten GFP-Fusionsproteins.

E: Für HA-NLS-GFP als Kontrollprotein ergibt sich ein Wert von 1,00. Dieser Referenzwert sagt aus, dass HA-NLS-GFP in der G1-Phase stabil vorliegt und keinem Abbau unterworfen ist. Das Verhältnis von Kontrollprotein HA-NES-3xCherry zu HA-NLS-GFP liegt in der G1-Phase bei dem Wert 1.

2.3.1.1.2 Rca1-GFP

Für die Berechnung der relativen G1-Stabilität von Rca1-GFP wurde als Kontrollprotein HA-NES-3xCherry verwendet (Abb. 2.26 A). Aus den übereinandergelagerten Zellzyklusprofilen wird ersichtlich, dass sich die Zellzyklusprofile von Rca1-GFP und HA-NES-3xCherry in der Ausprägung eines G1-Peaks unterscheiden. Rca1-GFP wird aufgrund seiner Instabilität in der G1-Phase abgebaut (Abb. 2.26 B und C). Wird die relative G1-Stabilität ermittelt, ergibt sich ein Wert von 0,35 (Abb. 2,26 D). Je effizienter und schneller der Abbau in der G1-Phase ist, desto geringer ist der Anteil an GFP-positiven Zellen im Zellzyklusprofil und umso kleiner fällt der Wert für die relative G1-Stabilität aus. Von Rca1-GFP ist durch die erstellten Abbaukurven bereits bekannt, dass die C-terminale GFP-Epitopmarkierung einen negativen Einfluss auf den Abbau in der G1-Phase ausübt und Rca1 dadurch stabilisiert wird. Im Vergleich zu HA-NLS-GFP-Rca1 wird Rca1-GFP deutlich langsamer degradiert (2.2.1.2, Abb. 2.5).

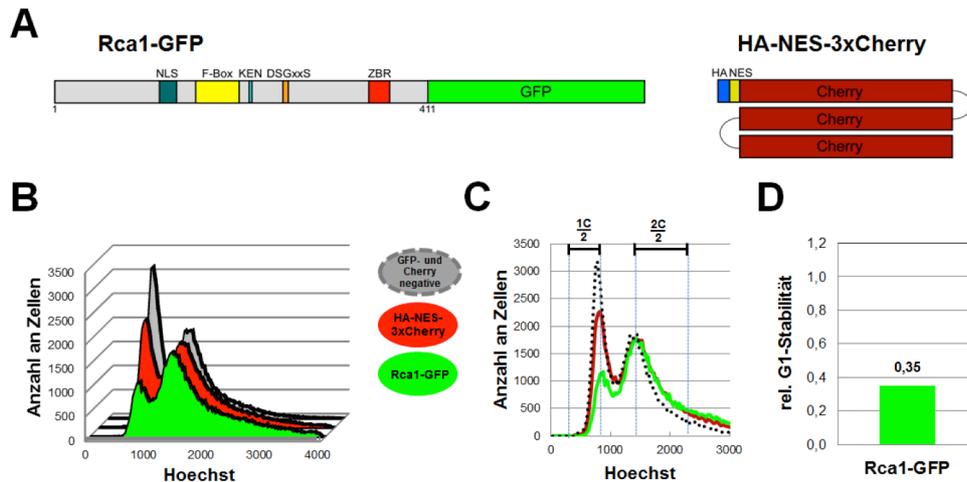


Abbildung 2.26: Ermittlung der relativen G1-Stabilität von Rca1-GFP

A: Schematische Darstellung des in Schneiderzellen co-exprimierten Rca1-GFP und des Kontrollplasmids HA-NES-3xCherry

B: Die Zellzyklusprofile der untransfizierten Zellen (grau), von HA-NES-3xCherry (rot) sowie von Rca1-GFP (grün) sind in einer Grafik dargestellt. Dabei wurden GFP- und Cherry-positive Zellen auf den maximalen G2-Wert der untransfizierten Zellen normiert.

C: Seitenaufsicht auf die drei übereinandergelagerten Zellzyklusprofile. In die Berechnung für die Ermittlung der Stabilitätswerte ging jeweils nur die erste Hälfte des 1C-Peaks sowie die zweite Hälfte des 2C-Peaks ein, um die vorhandenen S-Phase-Zellen in der Berechnung auszuschließen.

D: Die Ermittlung der relativen G1-Stabilität ergab für Rca1-GFP einen Wert von 0,35. Dieser Wert sagt aus, dass Rca1-GFP verglichen mit dem stabilen Kontrollprotein HA-NES-3xCherry in der G1-Phase in einem Verhältnis von 0,35/1,00 vorliegt. Je geringer dieser Wert ist, desto schneller wird das untersuchte Protein in der G1-Phase abgebaut und umso weniger liegt es in der G1-Phase vor. Ein Wert von 1 ist dabei der maximale Wert und entspricht einem in der G1-Phase stabilen Protein.

2.3.1.1.3 HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP

Wie effektiv ein Abbau in der G1-Phase sein kann, wird am Beispiel von HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP deutlich. Als ein bekanntes Substrat des APC/C hat HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP in Abbaukurven die schnellste Abbaukinetik gezeigt (2.2.2, Abb. 2.6 B). Aus diesem Grund wurde HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP als Referenzwert für den minimalen Endwert einer relativen G1-Stabilitätsmessung herangezogen (Abb. 2.27 A).

Das Zellzyklusprofil der GFP-positiven Zellen zeigt einen stark reduzierten Anteil an 1C-Zellen (Abb. 2.27 B und C). Dementsprechend fiel der Wert der relativen G1-Stabilität mit 0,14 deutlich geringer aus als bei Rca1-GFP (Abb. 2.27 D). Dies entspricht auch den Beobachtungen aus den Abbaukurven bzw. den live-cell-imaging-Aufnahmen, in denen HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP deutlich schneller abgebaut wurde als Rca1-GFP.

Mit dieser Messmethode wurde ein Weg gefunden, die Ergebnisse der Durchflusszytometrie miteinander zu vergleichen. Dadurch wird es nun möglich, die verschiedenen Rca1-Derivate auf ihre G1-Stabilität hin zu untersuchen. Ein großer Vorteil der Durchflusszytometrie liegt im hohen Zelldurchsatz begründet; dadurch kann eine viel größere Anzahl an Zellen analysiert werden und die Ergebnisse werden so statistisch signifikanter. Leider gibt es jedoch auch Probleme bei der Auswertung, wenn durch die Aktivität von Rca1 gleichzeitig das Zellzyklusprofil verändert wird oder durch generelle (Zellzyklus-unabhängige) Instabilität die Anzahl an messbaren Zellen sinkt (siehe weiter unten).

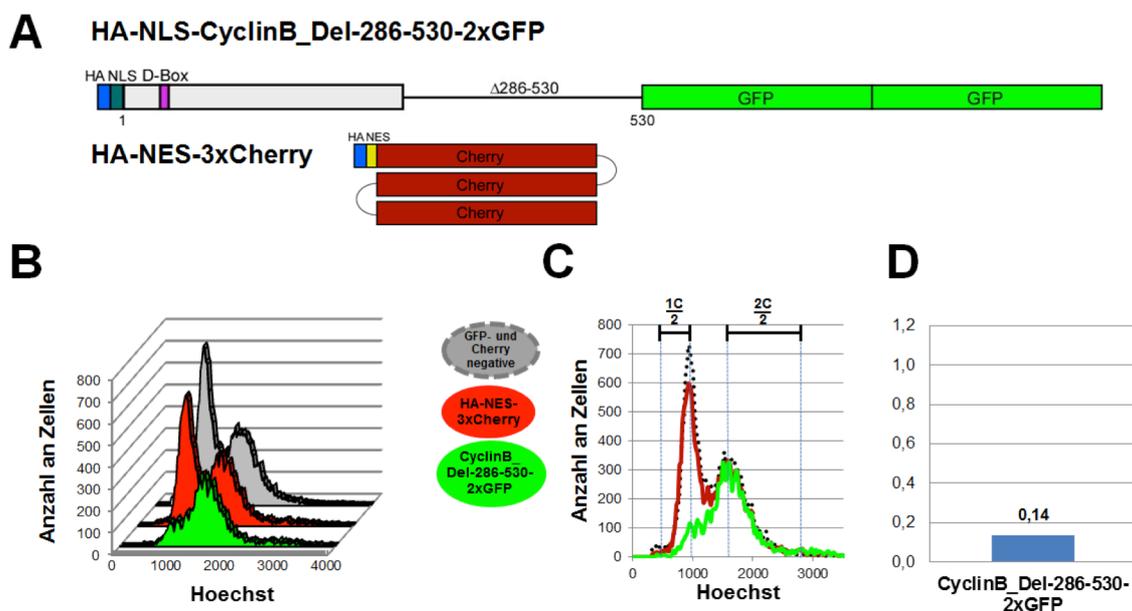


Abbildung 2.27: Relative G1-Stabilität von HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP

A: Schematische Darstellung des in Schneiderzellen co-exprimierten HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP und des Kontrollplasmids HA-NES-3xCherry

B: Die Zellzyklusprofile der untransfizierten Zellen (grau), von HA-NES-3xCherry (rot) sowie von HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP (grün) sind in einer Grafik dargestellt. Dabei wurden GFP- und Cherry-positive Zellen auf den maximalen G2-Wert der untransfizierten Zellen normiert.

C: Seitenansicht auf die drei übereinandergelagerten Zellzyklusprofile. In die Berechnung für die Ermittlung der Stabilitätswerte ging jeweils nur die erste Hälfte des 1C-Peaks sowie die zweite Hälfte des 2C-Peaks ein, um die vorhandenen S-Phase-Zellen in der Berechnung auszuschließen.

D: Die Ermittlung der relativen G1-Stabilität ergab für HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP einen Wert von 0,14. Dieser Wert sagt aus, dass HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP verglichen mit dem stabilen Kontrollprotein HA-NES-3xCherry in der G1-Phase in einem Verhältnis von 0,14/1,00 vorliegt. Je geringer dieser Wert ist, desto schneller wird das untersuchte Protein in der G1-Phase abgebaut und umso weniger liegt es in der G1-Phase vor. Ein Wert von 1 ist dabei der maximale Wert und entspricht einem in der G1-Phase stabilen Protein.

2.3.1.2 Die Aktivität der Rca1-Derivate

In früheren Studien konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass eine Überexpression von Rca1 einen G1-S-Übergang induzieren kann, wodurch während der Augenentwicklung ein „rauer Augenphänotyp“ entsteht (Dong et al., 1997). Wie sich herausstellte, ist dieser Effekt F-Box abhängig und führt zu einer verkürzten G1-Phase (Zielke, 2006). Diese Zellzyklusverschiebung in Richtung G2-Phase wurde in weiteren Experimenten in Schneiderzellen näher untersucht. Dabei wurden verschiedene epitopmarkierte Rca1-Derivate auf ihre Aktivität hin überprüft, die S-Phase zu induzieren. Um die Verweildauer der Zellen in der G1-Phase bestimmen zu können, wurde das Rca1-Derivat in den Zellen zusammen mit einem Zellzyklusmarker co-exprimiert, der mit Beginn der S-Phase abgebaut wird. In diesen Experimenten konnte bestätigt werden, dass die Überexpression eines aktiven Rca1 zu einer Verkürzung der G1-Phase führt (unveröffentlichte Daten Martina Frank).

Diese Verkürzung der G1-Phase verursacht eine Zellzyklusverschiebung in Richtung G2-Phase. Dadurch verändert sich die Berechnungsgrundlage für aktive Rca1-Derivate, was zu deutlich höheren relativen Stabilitätswerten führt. Wie groß dieser Einfluss sein kann, wird am Beispiel von HA-NLS-GFP-Rca1 deutlich. Der Wert für die relative Stabilität liegt bei 0,66. HA-NLS-GFP-Rca1 wird in Abbaukurven jedoch deutlich effektiver abgebaut als Rca1-GFP (2.2.1.2, Abb. 2.5), dessen relativer Stabilitätswert auf 0,35 berechnet wurde (2.3.1.1.2, Abb. 2.26 D).

Es wurde keine Möglichkeit gefunden, diesen Faktor in die Formel für die relative G1-Stabilität mit einzubeziehen, deshalb wurde in einer zweiten Formel kontrolliert, ob das zu untersuchende Rca1-Derivat noch in der Lage ist, die S-Phase zu induzieren und den Zellzyklus zu verschieben. Wurde eine Aktivität festgestellt, konnte der relative Stabilitätswert nicht verwendet werden und die Stabilität wurde über eine Abbaukurve bestimmt. Im Folgenden soll anhand eines Beispiels die zweite Formel zur Bestimmung der relativen Rca1-Funktionalität näher erläutert werden.

In Schneiderzellen wurde das Kontrollprotein HA-NES-3xCherry entweder mit dem stabilen Kontrollprotein HA-NLS-GFP, mit dem inaktiven Rca1-GFP oder einem aktiven HA-NLS-GFP-Rca1 co-exprimiert (Abb. 2.28 A). Handelt es sich bei dem Rca1-Derivat um ein aktives Rca1, ist die Zellzyklusverschiebung auch im Zellzyklusprofil des Kontrollproteins zu sehen, weil die Zellen bei der Transfektion ein Plasmidgemisch aufnehmen (Abb. 2.28 C). Im Gegensatz zu Rca1 ist das Kontrollplasmid keinem Abbau unterworfen und liegt in jeder Zellphase stabil vor, weshalb sich aus dem Verhältnis zu den

untransfizierten Zellen ein Messwert für die Rca1-Funktionalität berechnen lässt. Für die Bestimmung der relativen Rca1-Funktionalität musste zuerst das relative G2/G1-Verhältnis berechnet werden. In diese Berechnung flossen die erste Hälfte des 1C-Peaks und die zweite Hälfte des 2C-Peaks aus dem Zellzyklusprofil der untransfizierten Zellen sowie des Kontrollproteins HA-NES-3xCherry bzw. HA-NLS-3xGFP mit ein (Abb. 2.28 D). In der Grafik sind deshalb nur die beiden für die Auswertung notwendigen Zellzyklusprofile der untransfizierten Zellen (grau) und von HA-NES-3xCherry (rot) dargestellt. Dabei wurden die Cherry-positiven Zellen auf den maximalen 2C-Wert der untransfizierten Zellen normiert (Abb. 2.28 B-D). Die co-exprimierten und zu untersuchenden GFP-Fluoreszenzproteine sind mit angegeben.

Nach Anwendung der Formel ergibt sich für das stabile Kontrollprotein HA-NLS-GFP als minimalen Endwert ein relatives G2/G1-Verhältnis von 1,55. Es sind also mehr Cherry-positive Zellen in der G2-Phase zu detektieren (Abb. 2.28 F). Erwartet würde man einen Wert von 1,00. Eine Erklärung ist in der Transfektion zu finden. Jede transfizierte Zelle muss zuerst einen vollständigen Zellzyklus durchlaufen, um die beiden Plasmide in den neuen Kern aufzunehmen und mit der Transkription der Proteine zu beginnen. Nachdem noch nicht jede Zelle einen vollständigen Zellzyklus durchlaufen hat, befinden sich mehr Cherry-positive Zellen in der G2-Phase. Als aktivstes Rca1-Derivat wurde für HA-NLS-GFP-Rca1 ein Wert von 4,31 gemessen (Abb. 2.28 F). Im Verhältnis zu den untransfizierten Zellen befinden sich also 4,31-mal so viele Zellen in der G2-Phase. Das Rca1-GFP besitzt zwar mit 2,14 einen etwas höheren Wert als das Kontrollprotein, kann aber aufgrund der Grafik noch als inaktives Rca1 bezeichnet werden (Abb. 2.28 B-D).

Für eine allgemeine Vergleichbarkeit wurden in dieser Beispielrechnung alle Rca1-Derivate für die relative Rca1-Funktionalität mit 4,31 auf das aktivste Rca1 normiert. So wurde HA-NLS-GFP-Rca1 der Wert 1 zugeordnet, das inaktive HA-NLS-GFP erhielt den Wert 0,40 und das inaktive Rca1-GFP den Wert 0,50 (Abb. 2.28 G).

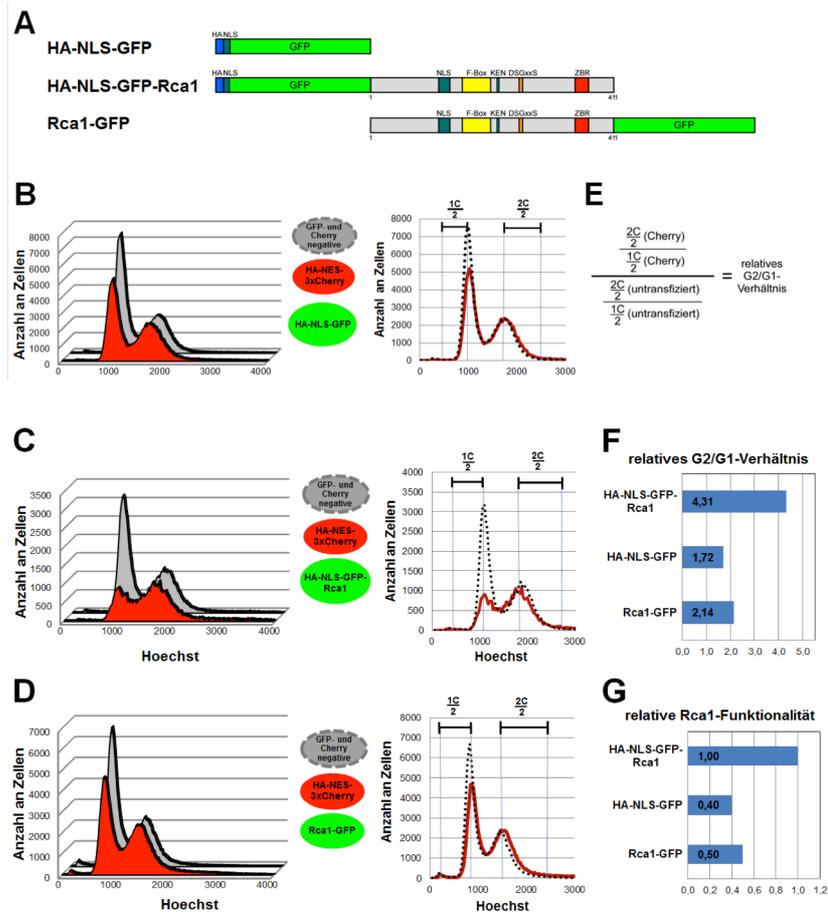


Abbildung 2.28: Relative Rca1-Funktionalität beeinflusst den Abbau von Rca1 in G1

A: Schematische Skizze der verwendeten Proteine für die Darstellung der relativen Rca1-Funktionalität

B-D: Ein funktionelles Rca1 führt zu einer Verschiebung des Zellzyklusprofils in Richtung G2 (C). Nachdem die Zellen bei der Transfektion ein Plasmidgemisch aus beiden aufnehmen, ist die Verschiebung auch im Zellzyklusprofil des Kontrollproteins zu sehen, mit dem Unterschied, dass das Kontrollplasmid in G1 stabil vorliegt und sich aus dem Verhältnis zu den untransfizierten Zellen ein Messwert für die Rca1-Funktionalität berechnen lässt. Für die Bestimmung der relativen Rca1-Funktionalität musste zuerst das relative G2/G1-Verhältnis berechnet werden. In diese Berechnung flossen die erste Hälfte des 1C-Peaks und die zweite Hälfte des 2C-Peaks aus dem Zellzyklusprofil der untransfizierten Zellen sowie des Kontrollproteins mit ein. In diesem Fall von den Cherry-positiven Zellen. In der Grafik sind deshalb nur die beiden für die Auswertung notwendigen Zellzyklusprofile der untransfizierten Zellen (grau) und von HA-NES-3xCherry (rot) dargestellt. Dabei wurden die Cherry-positiven Zellen auf den maximalen 2C-Wert der untransfizierten Zellen normiert. Die ebenfalls co-exprimierten und zu untersuchenden GFP-Fluoreszenzproteine sind mit angegeben.

B: HA-NLS-GFP besitzt keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Das Zellzyklusprofil von HA-NES-3xCherry zeigt ein ähnliches Profil zu den untransfizierten Zellen.

C: HA-NLS-GFP-Rca1 ist aktiv und verschiebt auch das Zellzyklusprofil der Cherry-positiven Zellen in Richtung G2-Phase. Dadurch verändert sich das G2/G1-Verhältnis.

D: Rca1-GFP besitzt keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Das Zellzyklusprofil von HA-NES-3xCherry zeigt ein ähnliches Profil zu den untransfizierten Zellen.

E: Formel zur Berechnung des relativen G2/G1-Verhältnisses

F: Ergebnisse der drei Berechnungen in Diagrammform: je größer der Einfluss des Rca1-Derivats auf den Zellzyklus ist, desto größer wird der Wert.

G: Die relative Rca1-Funktionalität ergibt sich aus der Normierung durch das aktivste Rca1, HA-NLS-GFP-Rca1. Je geringer der Wert ist, desto weniger aktiv ist das zu untersuchende Rca1-Derivat. Ein Wert von 0,40 entspricht einem vollständig inaktiven Protein.

Für eine statistisch aussagekräftige Auswertung wurden alle Messungen in dieser Arbeit mindestens dreimal durchgeführt, für die Normierung wurde der Mittelwert aus $n=7$ unabhängigen Messungen verwendet und weicht mit 4,20 etwas von dem Wert aus der Beispielrechnung ab. Somit ergibt sich für die Berechnung folgende Formel:

Relative Rca1-Funktionalität = (relatives G2/G1-Verhältnis) / 4,2 = Rca1-Derivat/4,2.

2.3.1.3 Epitopmarkierungen

Epitopmarkierungen können einen negativen Einfluss auf die Aktivität oder den Abbau des zu untersuchenden Proteins nehmen. Oft sind Epitope große Fluorochrome, die an das N- oder C-terminale Ende des entsprechenden Zielproteins fusioniert werden und unter Anregung eines Lasers einer bestimmten Wellenlänge sichtbar gemacht werden können. Dabei kann die Fusion eines Epitops das Zielprotein in seiner Funktion oder seiner Regulation beeinflussen. So konnte zum Beispiel in Abbaukurven gezeigt werden, dass eine N-terminale Fusion von einem oder mehreren Cherry- oder GFP-Fluorochrom/en an das in Kapitel 2.2.2 bereits verwendete Geminin_Del-102-192 zu einer vollständigen Stabilisierung führte (Kawall, 2010).

Aufgrund der Unvorhersagbarkeit des Einflusses von GFP- und Cherry-Fusionen auf die Funktion und Regulation von Rca1, wurden verschiedene Fusionen an Rca1 im Durchflusszytometer bestimmt und mit der Formel für die relative G1-Stabilität und für die relative Rca1-Funktionalität die Auswirkungen auf Stabilität und Funktion auch unter Zuhilfenahme von Abbaukurven analysiert.

2.3.1.3.1 GFP-Epitopmarkierungen

Zur Analyse der GFP-Epitopmarkierungen wurde Rca1 C- bzw. N-terminal mit einem GFP-Fluorochrom fusioniert und in Schneiderzellen mit der Transfektionskontrolle HA-NES-3xCherry co-exprimiert (Abb. 2.29 A). Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. Aus den ermittelten Daten wurde über die Formel aus Kapitel 2.3.1.1 die relative G1-Stabilität (Abb. 2.29 B) und aus Kapitel 2.3.1.2 die relative Rca1-Funktionalität (Abb. 2.29 C) errechnet. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen. Das Kontrollprotein HA-NLS-GFP wies mit einem Wert von 0,99 eine vollständige Stabilität auf und hatte auch keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Je kleiner der Wert unter 1 wird, desto instabiler ist das entsprechende Protein in der G1-Phase verglichen mit dem Kontrollprotein. Am instabilsten war das Rca1 mit der C-terminalen

GFP-Fusion, Rca1-GFP, mit 0,35. Dieses erwies sich auch als nahezu inaktiv und erreichte mit 0,51 annäherungsweise den minimalen Wert des inaktiven Kontrollproteins HA-NLS-GFP von 0,40. Ein Wert von 1 entspricht dabei einem Rca1 mit voller Aktivität. Anders verhielt es sich mit der N-terminalen GFP-Fusion von Rca1. Das Ergebnis für die relative G1-Stabilität deutet mit 0,66 ein stabilisiertes Protein an, allerdings wurde das Ergebnis durch die Überprüfung der Rca1-Funktionalität relativiert (2.3.1.2).

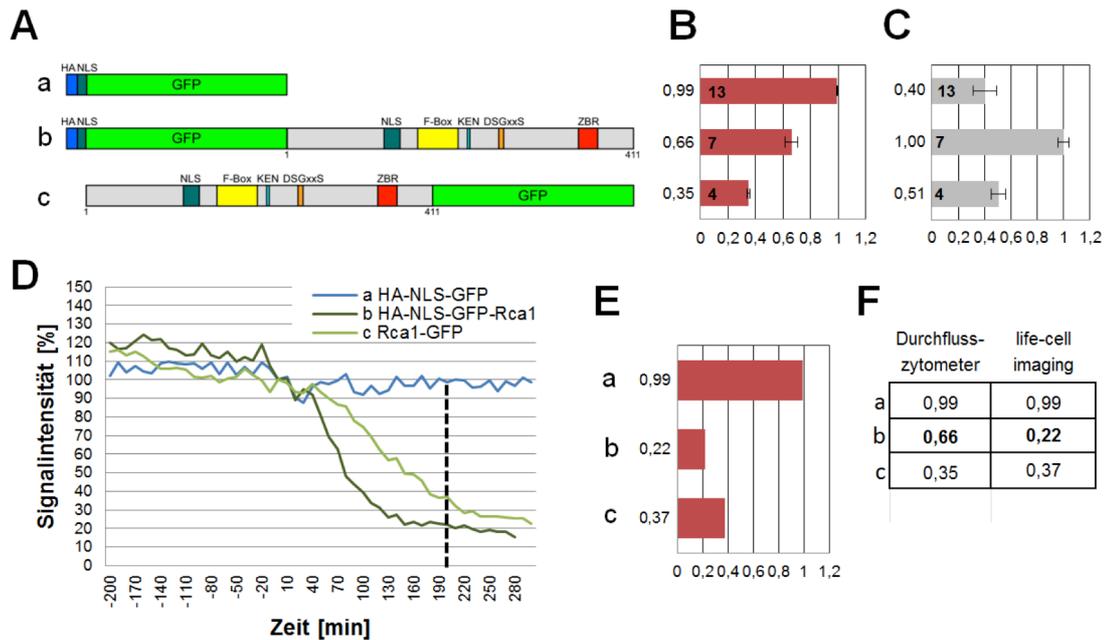


Abbildung 2.29: GFP-Epitope und ihr Einfluss auf Abbau und Funktionalität von Rca1

A: Schematische Darstellung der exprimierten GFP-Fusionsproteine: a) HA-NLS-GFP b) HA-NLS-GFP-Rca1 c) Rca1-GFP. Für die Analysen B und C wurden die dargestellten Proteine zusammen mit dem Kontrollprotein HA-NES-3xCherry exprimiert, für die Analysen von D und E wurde das Kontrollprotein Rca1-3xCherry verwendet.

B: Durchflusszytometrie-Analyse-1: relative G1-Stabilität
Verhältnis der GFP-positiven Zellen mit einfachem DNA-Gehalt („1C“) zu Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt („2C“), relativ zum 1C/2C-Verhältnis der Zellen, die positiv für das co-exprimierte Fluorochrom sind. Werte < 1 bedeuten, dass das entsprechende Protein in der G1-Phase instabiler als das Kontrollprotein ist. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

C: Durchflusszytometrie-Analyse-2: relative Rca1-Funktionalität gemessen am Grad der Zellzyklusverschiebung. Verhältnis der Cherry-positiven 1C- und 2C-Zellen relativ zum Verhältnis von 1C- zu 2C-Zellen, die keine Expression von GFP und Cherry zeigen. Die Werte wurden mit dem Faktor 4,2 dividiert, da die Expression von Rca1 die Anzahl der 1C-Zellen um das ca. 4,2-fache reduzieren kann. Rca1-Derivate, die zu Zellzyklusveränderungen mit signifikant höheren Werten als das Kontrollprotein HA-NLS-GFP führen, lassen Rückschlüsse auf die Aktivität des exprimierten Rca1-Proteins zu.

D: Abbaukurven der verschiedenen Proteine (Mittelwerte von 10 Zellen). Der Zeitpunkt t=200 min nach Beginn der Anaphase wurde als Referenzpunkt gewählt. Zu dieser Zeit ist der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen und die meisten Zellen sollten sich noch in der G1-Phase befinden.

E: Relative Fluoreszenzwerte der Abbaukurven von D zum Zeitpunkt t=200 min

F: Direkter Vergleich der ermittelten Werte für die Stabilität der Rca1-Derivate in G1 zwischen Durchflusszytometer (B) und den Abbaukurven (D+E)

HA-NLS-GFP-Rca1 besitzt mit 1,00 volle Aktivität, was dazu führt, dass die G1-Stabilitätswerte aufgrund der Zellzyklusverschiebung nicht verwertbar sind (2.3.1.2). Die Auswertung von live-cell-imaging-Aufnahmen in Form von Abbaukurven stellt ein anderes Bild dar. Für die Ermittlung der G1-Stabilität wurde der Zeitpunkt 200 Minuten nach Beginn der Anaphase als Referenzpunkt gewählt. Zu dieser Zeit ist der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen und die meisten Zellen sollten sich noch in der G1-Phase befinden. Eine gemeinsame Darstellung der Abbaukurven der drei GFP-Fusionen zeigt, dass HA-NLS-GFP-Rca1 deutlich instabiler in G1 ist als Rca1-GFP (Abb. 2.29 D und E). Bei einem direkten Vergleich der beiden Messmethoden Durchflusszytometrie und live-cell-imaging zeigt sich, dass die Ergebnisse durchaus miteinander verglichen werden können, solange es sich um ein inaktives Rca1 handelt (Abb. 2.29 F). Für eine Bestimmung der G1-Stabilität von aktivem Rca1 eignet sich hingegen nur die Ermittlung über Abbaukurven.

Anhand der Daten können nun Aussagen über den Einfluss der C- und N-terminalen GFP-Epitopmarkierungen getroffen werden. Eine C-terminale GFP-Fusion zeigt einen negativen Einfluss sowohl auf die Aktivität als auch auf die Stabilität von Rca1. Es ist denkbar, dass das relativ große GFP-Fluorochrom die Zink-Binde-Region im C-terminalen Bereich von Rca1 blockiert und Rca1 dadurch vollständig inaktiviert wird. Auch die Abbausequenz scheint davon betroffen zu sein, da es im Vergleich zu einem N-terminal fusionierten Rca1 deutlich langsamer abgebaut wird. Es ist durchaus denkbar, dass eine N-terminale GFP-Fusion keinen negativen Einfluss auf die Aktivität und die Stabilität von Rca1 besitzt, letztendlich kann darüber nur spekuliert werden, da entsprechende Vergleichswerte fehlen.

2.3.1.3.2 Cherry-Epitopmarkierungen

Für die Analyse der Cherry-Epitopmarkierungen wurde Rca1 C- bzw. N-terminal mit einem einfachen oder dreifachen Cherry-Fluorochrom fusioniert und in Schneiderzellen mit der Transfektionskontrolle HA-NLS-GFP co-exprimiert (Abb. 2.30 A). Ein HA-NLS-3xCherry diente als Kontrolle. Aus den ermittelten Daten der Durchflusszytometrie wurde die relative G1-Stabilität und die relative Rca1-Funktionalität berechnet (Abb. 2.30 B und C) und anhand von live-cell-imaging-Aufnahmen aus jeweils 10 Einzelzellen die zugehörigen Abbaukurven erstellt (Abb. 2.30 D und E).

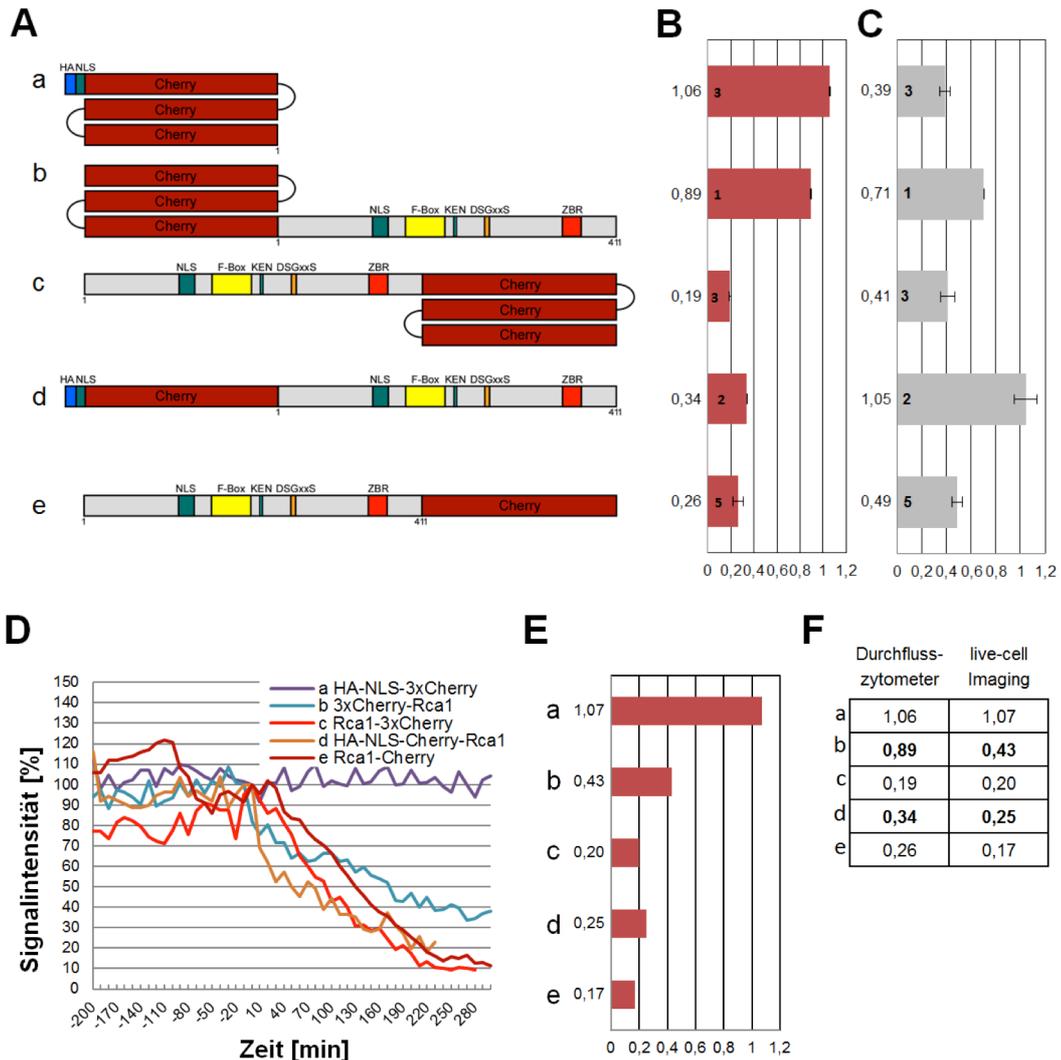


Abbildung 2.30: Cherry-Epitope und ihr Einfluss auf Abbau und Funktionalität von Rca1

A: Schematische Darstellung der exprimierten Cherry-Fusionsproteine:

a) HA-NLS-3xCherry b) 3xCherry-Rca1 c) Rca1-3xCherry d) HA-NLS-Cherry-Rca1 e) Rca1-Cherry Für die Analysen B und C wurden die dargestellten Proteine zusammen mit dem Kontrollprotein HA-NLS-GFP exprimiert, für die Analysen von D und E wurde das Kontrollprotein Rca1-GFP verwendet.

B: Durchflusszytometrie-Analyse-1: relative G1-Stabilität

Verhältnis der Cherry-positiven Zellen 1C/2C. Werte <1 bedeuten, dass das entsprechende Protein in der G1-Phase instabiler als das Kontrollprotein ist. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

C: Durchflusszytometrie-Analyse-2: relative Rca1-Funktionalität gemessen am Grad der Zellzyklusverschiebung. Verhältnis der GFP-positiven 1C- und 2C-Zellen relativ zum Verhältnis von 1C- zu 2C-Zellen, die keine Expression von GFP und Cherry zeigen. Die Werte wurden mit dem Faktor 4,2 dividiert, da die Expression von Rca1 die Anzahl der 1C-Zellen um das ca. 4,2-fache reduzieren kann. Rca1-Derivate die zu Zellzyklusveränderungen mit signifikant höheren Werten als das Kontrollprotein HA-NLS-3xCherry führen, lassen Rückschlüsse auf die Aktivität des exprimierten Rca1-Proteins zu.

D: Abbaukurven der verschiedenen Proteine (Mittelwerte von 10 Zellen). Der Zeitpunkt t=200 min nach Beginn der Anaphase wurde als Referenzpunkt gewählt. Zu dieser Zeit ist der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen und die meisten Zellen sollten sich noch in der G1-Phase befinden.

E: Relative Fluoreszenzwerte der Abbaukurven von D zum Zeitpunkt t=200 min

F: Direkter Vergleich der ermittelten Werte für die Stabilität der Rca1-Derivate in G1 zwischen Durchflusszytometer (B) und den Abbaukurven (D+E)

Für die C-terminalen einfach und dreifach Cherry-Epitopmarkierungen zeigt sich ein einheitliches Bild. Mit Werten von 0,19 und 0,26 liegen sie bei der relativen G1-Stabilität innerhalb der Standardabweichung (Abb. 2.30 B) und haben nach 200 Minuten in den Abbaukurven Werte von 0,20 und 0,17 erreicht (Abb. 2.30 D und E). Die Epitope scheinen keinen Einfluss auf die Stabilität auszuüben, jedoch verursachen sie eine vollständige Inaktivität und blockieren wahrscheinlich die Zink-Binde-Region. Die relative Rca1-Funktionalität ist mit 0,41 und 0,49 vergleichbar mit dem inaktiven Kontrollprotein HA-NLS-3xCherry, das einen Wert von 0,39 aufweist (Abb. 2.30 C).

Im Gegensatz zu den C-terminalen Cherry-Epitopen besitzt Rca1 mit einer N-terminalen Fusion eines einfachen Cherry-Epitops volle Aktivität und liegt mit 1,05 innerhalb der Standardabweichung sogar leicht über dem angegebenen Maximum. Auch zeigt das Cherry-Epitop keinen negativen Einfluss auf die Stabilität und die Werte aus der relativen G1-Stabilität und der Abbaukurve sind mit 0,18 und 0,20 kongruent zueinander. Ein anderes Verhalten ergibt sich bei einer dreifachen Cherry-Epitopmarkierung im N-Terminus. Das dreifache Epitop scheint durch seine Größe einen negativen Einfluss auf die Aktivität zu besitzen und auch auf die Stabilität hat es einen negativen Effekt. In Abbaukurven zeigt sich eine deutlich langsamere Abbaukinetik, was sich auch im Wert von 0,43 nach 200 Minuten widerspiegelt.

Anhand der Daten sind Aussagen über den Einfluss der C- und N-terminalen Cherry-Epitopmarkierungen möglich. Eine C-terminale Cherry-Fusion zeigt einen negativen Einfluss auf die Aktivität. Wahrscheinlich blockiert das 1x oder 3xCherry-Epitop im C-terminalen Bereich von Rca1 die Zink-Binde-Region. Rca1 wird dadurch vollständig inaktiviert, während eine einfache N-terminale Cherry-Fusion keinen Einfluss auf die Aktivität gezeigt hat.

2.3.1.4 Linker zwischen GFP und Rca1 führt zu Instabilität

Oft wird zwischen Fluorochrom und dem fusionierten Zielprotein eine kurze Basensequenz – oft auch als Linker bezeichnet – dazwischen gesetzt, um dem Fluorochrom in seiner Struktur etwas mehr Beweglichkeit zu verschaffen. Damit soll erreicht werden, dass das Fluorochrom keine notwendige Domäne blockiert und das zu untersuchende Protein dadurch nicht in seiner Aktivität bzw. der Regulation eingeschränkt wird.

Auch in dieser Arbeit wurde zu Beginn mit einem Linker gearbeitet, weshalb in Folgendem näher darauf eingegangen wird.

2.3.1.4.1 Herkunft und Beschaffenheit des Linkers

Eine Nukleotidanalyse in der verwendeten Plasmiddatenbank Vector NTI hat ergeben, dass der Linker in früheren Arbeiten bereits Verwendung fand. Während der N-terminale Teil des Linkers bei der Sequenzanalyse mit dem Blast-Algorithmus keinen Treffer ergab und es sich hierbei um ein Relikt aus verschiedenen Klonierungen handelt, konnten die 30 C-terminalen Basenpaare als Fragment des 3'-UTR der Alkoholdehydrogenase von *Drosophila melanogaster* identifiziert werden, das auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms lokalisiert ist. Der Linker besteht aus 63 Basenpaaren, die translatierten Aminosäuren zeigen keine besondere Auffälligkeit bezüglich der Zusammensetzung auf basische-, saure oder aromatische Aminosäuren (Abb. 2.31).

```
TCC GGA CTC AGA TCT CGA CCT GCA GGC ATG CAA GCT ATT CGA TGC ACA CTC ACA TTC TTC TCC
  S  G  L  R  S  R  P  A  G  M  Q  A  I  R  C  T  L  T  F  F  S
```

Abbildung 2.31: Aminosäuresequenz des Linkers:

Basische Aminosäuren

Saure Aminosäuren

Aromatische Aminosäuren

2.3.1.4.2 Einfluss des Linkers auf HA-NLS-GFP

Die Ansprüche für ein GFP-Fluorochrom, um es an ein Protein fusionieren zu können, sind zum einen, dass es in jeder Phase des Zellzyklus in der Zelle stabil vorliegt und keinem Abbau unterworfen ist, und zum anderen, dass seine Überexpression in der Zelle keinen Einfluss auf den Zellzyklus nimmt. Auf diese zwei Bedingungen wurde das Linker-Fusionsprotein in Schneiderzellen getestet. Dazu wurden neben der Transfektionskontrolle HA-NES-3xCherry entweder HA-NLS-GFP mit dem Linker oder nur HA-NLS-GFP in S2R⁺-Zellen co-exprimiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer.

Wie sich herausstellte, führt die Linkerregion zu einer Zellzyklus-unspezifischen Instabilität von HA-NLS-GFP. Evident wird das bei einem Vergleich des Kontrollproteins HA-NLS-GFP mit Linker bzw. ohne Linker. Bei HA-NLS-GFP-Linker sind bei gleichzeitig guter Cherry-Transfektionsrate kaum GFP-positive Zellen im Gate (Rechteck) zu detektieren (Abb. 2.32 Aa). Auch in der Überlagerung der beiden Zellzyklusprofile der GFP- und der Cherry-positiven Zellen wird der große Unterschied sichtbar (Abb. 2.32 Ab). Dabei stellt sich die Instabilität von HA-NLS-GFP-Linker Zellzyklus-unabhängig dar.

Ganz anders verhält es sich bei HA-NLS-GFP. Im Durchflusszytometer konnten GFP-positive Zellen detektiert werden und bei der Überlagerung der Zellzyklusprofile von GFP- und Cherry-positiven Zellen zeigten beide ein sehr ähnliches Profil mit einer nahe-

zu identischen Anzahl an Zellen (Abb. 2.32 Ba und Bb). Bei HA-NLS-GFP handelt es sich um ein Protein, das den Zellzyklus nicht beeinflusst und in jeder Phase des Zellzyklus stabil vorliegt.

Aus den Daten der Durchflusszytometrie wurde anhand der Formel die relative G1-Stabilität beider Fluorochrome berechnet (Abb. 2.32 C) Während HA-NLS-GFP mit 0,99 als stabil gelten kann, erscheint HA-NLS-GFP-Linker mit dem Wert von 0,32 als ein

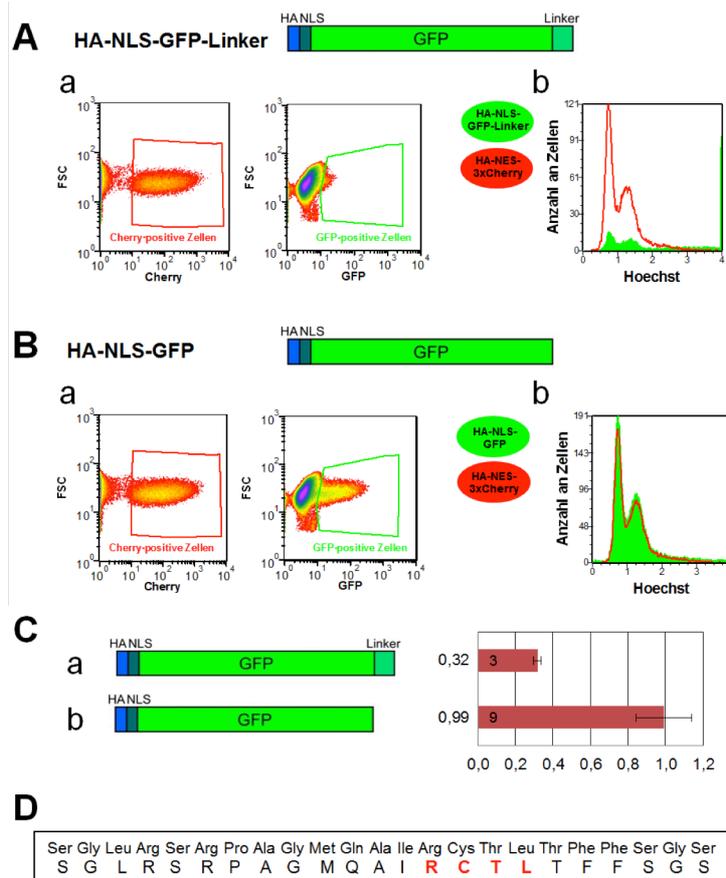


Abbildung 2.32: Linker nach GFP führt zu Instabilität

A und B: Vergleich der Stabilität von A) HA-NLS-GFP-Linker mit B) HA-NLS-GFP, gemessen im Durchflusszytometer. Links in den beiden Diagrammen befinden sich innerhalb der Gates (Rechtecke) die Cherry- bzw. GFP-positiven Zellen, rechts ist die Überlagerung der GFP- und Cherry-positiven Zellzyklusprofile abgebildet.

A: Mit dem Linkerprotein transfizierte Zellen zeigen Zellzyklus-unabhängig im Verhältnis zu den Cherry-positiven Zellen einen sehr geringen Anteil an GFP-positiven. Dies zeigt sich sowohl im Diagramm links deutlich, in dem innerhalb des Gates kaum GFP-positive Zellen zu finden sind, aber auch in der Überlagerung der Zellzyklusprofile wird das ungleiche Verhältnis von GFP- zu Cherry-positiven Zellen deutlich.

B: HA-NLS-GFP ohne die Linkerregion zeigt eine vergleichbare Expressionsrate wie NES-3xCherry. Die Überlagerung der beiden Profile ist nahezu identisch.

C: Ermittelte relative G1-Stabilität. Das Kontrollprotein HA-NLS-GFP erweist sich als stabil, HA-NLS-GFP-Linker zeigt aufgrund der geringen Signalstärke eine G1-Instabilität an.

D: Aminosäuresequenz der Linkerregion im Drei- und Einbuchstabencode. Der Linker enthält ein RxxL D-Box-Motiv (rot dargestellt).

instabiles Protein. Bei genauerer Betrachtung der Linker-Aminosäuresequenz kann mit der kurzen Sequenz RxxL der elementare Teil des bekannten D-Box-Motivs gefunden werden (Abb. 2.32 D). Diese sogenannte „*destruction-box*“ dient sehr häufig als APC/C-Erkennungssequenz für Substrate, die abgebaut werden sollen. Dies könnte auch in diesem Fall zu einem spezifischen Abbau in der Mitose und der G1-Phase führen, wenn der APC/C-Komplex aktiv vorliegt. Die G1-Instabilität kann jedoch nicht alleine für die geringe Zahl an GFP-positiven Zellen verantwortlich sein. Der Linker verursacht zusätzlich eine generelle Instabilität über den ganzen Zellzyklus hinweg.

2.3.1.4.3 Einfluss des Linkers auf die Rca1-Stabilität

Die Linkerregion ist ein Relikt aus verschiedenen Umklonierungen und fand bereits in früheren Arbeiten Verwendung. Die ersten Rca1-Derivate, die mit einem GFP-Fluorochrom versehen im live-cell-imaging untersucht wurden, enthielten diese Linkersequenz. Zunächst fiel die Zellzyklus-unabhängige Instabilität, die durch den Linker verursacht wurde, nicht auf, da der Effekt bei Rca1-Derivaten mit voller Länge geringer ausfiel. Der Einfluss der Instabilität scheint aber mit steigender Verkürzung der Rca1-Derivate zuzunehmen (Daten nicht gezeigt).

Eine plausible Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden, aber das vergleichende Beispiel von Rca1_Del-1-203_Del-258-411, das entweder mit oder ohne Linkerregion mit HA-NLS-GFP fusioniert wurde, offenbart den großen Anteil des Linkers an der Instabilität (Abb. 2.33). Die Berechnungen der relativen G1-Stabilität aus den Daten der Durchflusszytometrie ergaben für das Rca1-Derivat mit der Linkerregion einen Wert von 0,26, was gleichzusetzen ist mit dem Abbau von Rca1-3xCherry. Fehlt die Linkerregion, führt dies bei einem Wert von 0,74 zu einer Stabilisierung von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-258-411 (Abb. 2.33 A). Ein direkter Vergleich des Rca1-Derivates mit bzw. ohne Linkerregion in live-cell-imaging-Aufnahmen verdeutlicht diesen Effekt des Linkers. Das Signal von HA-NLS-GFP-Linker-Rca1_Del-1-203_Del-258-411 nimmt ähnlich ab wie die Transfektionskontrolle Rca1-3xCherry (Abb. 2.33 B; links), während HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-258-411 stabilisiert vorliegt (Abb. 2.33 B; rechts).

Auf welche Weise der Linker die Instabilität von Rca1 hervorruft ist unklar. Es besteht die Möglichkeit, dass das D-Box-Motiv im Linker dazu beiträgt, allerdings könnte dadurch nur die Instabilität in Phasen mit aktivem APC/C-Komplex erklärt werden. Die Instabilität in der S-Phase und der G2-Phase, in denen der APC/C inaktiv vorliegt, muss durch etwas anderes verursacht werden.

2.3.1.5 Lokalisierung Zytoplasma - Zellkern

Rca1 ist ein nukleares Protein und besitzt eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) im N-terminalen Bereich (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). Mithilfe dieser Sequenz wird Rca1 nach der Zellteilung wieder in den sich neu formierenden Zellkern transportiert. Nach der Aufnahme beginnt im Zellkern der Abbau von Rca1 zu Beginn der G1-Phase (2.1.2, Abb. 2.2).

Um herauszufinden, welche Bedeutung die Kernlokalisierung für den Abbau von Rca1 hat, wurden zwei Rca1-Deletions-Derivate mit fehlender NLS-Sequenz auf die relative G1-Stabilität hin untersucht und mit den Pendants mit N-terminaler HA-NLS-Sequenz verglichen. Bei der ersten Rca1-Deletion wurde zusätzlich untersucht, ob die Linker-basierende Instabilität von Rca1 auf den Zellkern beschränkt ist oder ob sich der Effekt unabhängig von der Lokalisation auch im Zytoplasma wiederfinden lässt. Dazu wurde die relative G1-Stabilität von HA-NLS-GFP-Linker-Rca1_Del-1-203_Del-257-411 (2.3.1.4, Abb. 2.33 A) mit der relativen G1-Stabilität ohne fusionierter HA-NLS-Sequenz miteinander verglichen (Abb. 2.34 A). Als zweites Rca1-Deletions-Derivat wurden die relativen G1-Stabilitäten von (HA-NLS-)GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411 untersucht. Mit einem Wert von 0,86 im Vergleich zu 0,56 wird es im Zytoplasma stabilisiert. In beiden Fällen ist eine Stabilisierung des Rca1-Derivates im Zytoplasma erkennbar, doch während GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411 mit dem Wert von 0,86 im Zytoplasma nahezu vollständig stabil vorliegt, scheint die Linker-Region auch im Zytoplasma eine Destabilisierung von GFP-Linker-Rca1_Del-1-203_Del-257-411 zu verursachen (Abb. 2.34 B).

Bei den beiden untersuchten Rca1-Derivaten konnte eine deutliche Stabilisierung festgestellt werden, wenn keine NLS-Sequenz vorhanden ist. Für einen effektiven Abbau von Rca1 ist demnach dessen Kernlokalisierung notwendig. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Linkerregion eine generelle destabilisierende Wirkung besitzt.

Zusammen mit den Ergebnissen aus den GFP- und Cherry-Epitopmarkierungen wurde der Entschluss gefasst, für die Eingrenzung der Abbausequenz von Rca1 die zu untersuchenden Rca1-Derivate einheitlich mit einem N-terminalen HA-NLS-GFP zu versehen. Außerdem wurde auf die Verwendung eines Linkers verzichtet. Falls das Rca1-Derivat mit einem Cherry-Epitop untersucht werden sollte, wurde eine N-terminale 1x Cherry-Fusion verwendet.

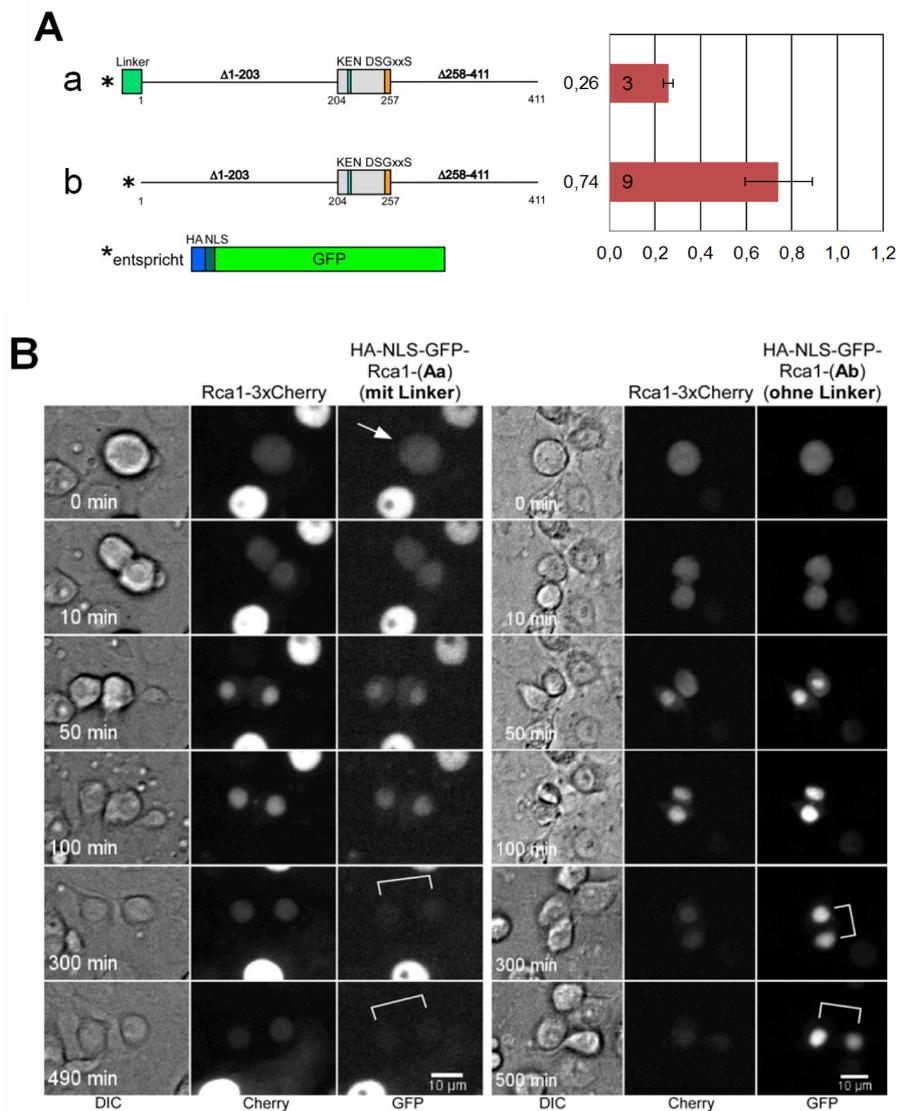


Abbildung 2.33: Linker nach HA-NLS-GFP führt zu Instabilität

A: Schematische Darstellung des untersuchten Proteins Rca1_Del-1-203_Del-258-411 a) mit N-terminalem HA-NLS-GFP-Linker und b) mit N-terminalem HA-NLS-GFP

Das Diagramm rechts zeigt die relative G1-Stabilität.

B: Für die Analyse der Einflussnahme des Linkers auf die G1-Stabilität von Rca1 wurde Rca1_Del-1-203_Del-258-411 einmal mit dem Linker (links) und einmal ohne Linker (rechts) zusammen mit Rca1-3xCherry in Schneiderzellen co-exprimiert. Mittels live-cell-imaging wurden in einem Abstand von 10 Minuten Aufnahmen gemacht und der Abbau in G1 über die Zeit verfolgt.

Dargestellt ist die zeitliche Abfolge des Abbaus in den beiden Kanälen GFP und Cherry, sowie die Aufnahme der Zelle im Durchlichtkanal (DIC). In beiden Aufnahmen wird die Kontrolle Rca1-3xCherry im Verlauf der G1-Phase abgebaut. Das Signal für die Rca1-Deletion mit dem N-terminalen Linker nimmt in G1 ebenfalls ab, ohne Linker bleibt das Signal des Rca1-Derivats nahezu unverändert.

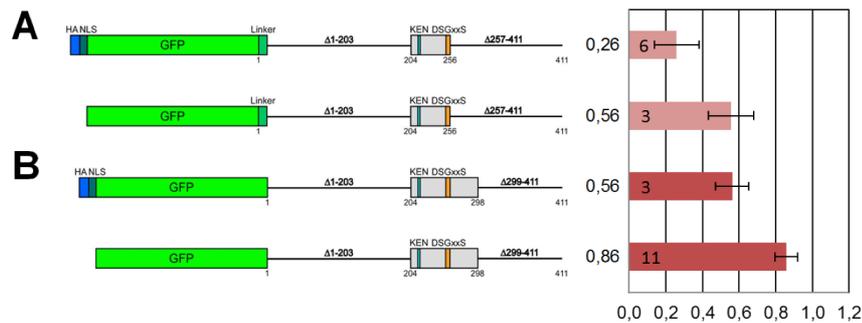


Abbildung 2.34: Einfluss der Kernlokalisierung auf die relative G1-Stabilität

Schematische Darstellung der beiden untersuchten Rca1-Derivate (A und B), jeweils mit bzw. ohne N-terminaler Kernlokalisierungssequenz, zusammen mit den zugehörigen relativen G1-Stabilitäten.

A: Rca1-Derivat mit Linker-Sequenz: schematische Darstellung des aus Abb. 2.33 Aa bekannten HA-NLS-GFP-Linker-Rca1_Del-1-203_Del-257-411 und ohne der HA-NLS-Sequenz GFP-Linker-Rca1_Del-1-203_Del-257-411

B: Rca1-Derivat ohne Linker-Sequenz: schematische Darstellung von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411 und GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411

2.3.2 Rca1 – Eingrenzung der Abbausequenz

In früheren Arbeiten wurden mithilfe der ubiquitären *armadillo-Gal4* (*arm-Gal4*) Treiberlinie verschiedene N-terminale Deletionen von Rca1 auf ihre G1-Stabilität in Embryonen untersucht (Radermacher, 2007; Zielke, 2006). Dabei waren die Rca1-Derivate mit einem N-terminalen HA-Epitop versehen und der Abbau wurde beim Übergang von der Mitose 16 zur G1-Phase des Zellzyklus 17 über eine Antikörperfärbung überprüft. Die Embryonen mussten dazu fixiert werden, weshalb eine Verfolgung des Abbaus nicht möglich war. Um dies im lebenden Organismus zu ermöglichen, wurden die Rca1-Derivate hinter ein N-terminales HA-NLS-GFP kloniert und in Schneiderzellen entweder zusammen mit einer Transfektionskontrolle HA-NES-3xCherry für die Bestimmung der relativen G1-Stabilität im Durchflusszytometer oder einer Abbaukontrolle Rca1-3xCherry für die Erstellung von Abbaukurven im live-cell-imaging transfiziert.

2.3.2.1 Die Deletion der funktionalen Domänen

Das Rca1-Protein besitzt mehrere Domänen, die für einen Abbau verantwortlich sein können. Im N-terminalen Bereich ist eine F-Box lokalisiert, die vermutlich als Erkennungssequenz für den SCF-Komplex dient. Es wird vermutet, dass Rca1 im G1-S-Übergang als Aktivatorprotein an den SCF-Komplex bindet und dort phosphorylierte Substrate zum Abbau markiert. Im mittleren Bereich der Rca1-Sequenz ist eine konservierte KEN-Box zu finden, die den Abbau von Rca1 vermitteln könnte. Sie ist häufig bei

Substraten des APC/C^{Fzr}/Cdh1-Komplexes zu finden und dient als Erkennungssequenz (Pfleger und Kirschner, 2000) Im C-terminalen Bereich von Rca1 befindet sich eine Zink-Binde-Region, die vermutlich für die inhibitorische Wirkung auf den APC/C^{Fzr}-Komplex verantwortlich ist. Rca1 besitzt genauso wie das Vertebraten-Ortholog Emi1 eine GSK3-Phosphorylierungsstelle. Bei Emi1 wird der Abbau über eine Phosphorylierung dieser GSK3-Stelle eingeleitet (Guardavaccaro, *et al.*, 2003; Hansen, *et al.*, 2004; Margottin-Goguet, *et al.*, 2003; Moshe, *et al.*, 2004). Auch Cdk1-Phosphorylierungsstellen werden dafür benötigt, die sowohl in Emi1 wie auch in Rca1 hoch konserviert vorliegen. In *Drosophila*-Embryonen zeigte die Mutation der GSK3-Phosphorylierungsstelle oder der Cdk1-Phosphorylierungsstellen allerdings keine Stabilisierung von Rca1 (Zielke, 2006).

In dieser Arbeit wurden die funktionellen Domänen in Schneiderzellen untersucht, um zum einen die vorhandenen Daten aus Embryonen zu bestätigen, aber vor allem auch, um geringfügige Stabilisierungseffekte der Mutationen und Deletionen der Rca1-Derivate über die Abbaukinetik in Abbaukurven bzw. über die Veränderung der Stabilisierung im Durchflusszytometer festzustellen.

Dazu wurden die entsprechenden Plasmide in Schneiderzellen exprimiert und die relativen G1-Stabilitäten sowie auch die Rca1-Funktionalitäten bestimmt (Abb. 2.35 A und B). Handelte es sich bei einem untersuchten Rca1-Derivat um ein aktives Protein, welches einen schnelleren G1/S-Übergang vermittelt, konnten die Werte der relativen G1-Stabilität nicht verwendet werden. In diesem Fall wurden Abbaukurven erstellt und der Zeitwert t=200 Minuten als Referenzwert genommen, da zu diesem Zeitpunkt der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen sein sollte und sich die Zellen noch in der G1-Phase befinden (Abb. 2.35 C und D).

Bei den Durchflusszytometrie-Messungen zeigte sich, dass die folgenden Rca1-Derivate ein niedriges G1/G2-Verhältnis aufweisen und damit in der G1-Phase instabil sind: Rca1 mit Mutationen der Cdk1-P-Stellen (b), Deletion der F-Box (c), Mutationen in der KEN-Box (d) und Mutation in der ZBR (f). Die Expression dieser Derivate konnte das Zellzyklusprofil nicht signifikant verschieben, d.h. diese Derivate haben eine verminderte Aktivität, den G1-S-Übergang zu induzieren. Hingegen zeigten HA-NLS-GFP-Rca1 (a) und Mutationen in der GSK3 (e) eine starke Verschiebung des Zellzyklusprofils, so dass die Stabilitätsdaten aus der Zytometermessung nicht verwendbar sind. In den Abbaukurven (Abb. 2.35. C) zeigten alle getesteten Rca1-Derivate einen ähnlichen Verlauf, der darauf hinweist, dass alle hier getesteten Rca1-Derivate in der G1-Phase instabil sind.

Das bedeutet, dass keine der konservierten Domänen alleine für den Abbau von Rca1 verantwortlich ist, weshalb im Folgenden über N-terminale Deletionen nach der Abbausequenz gesucht wurde.

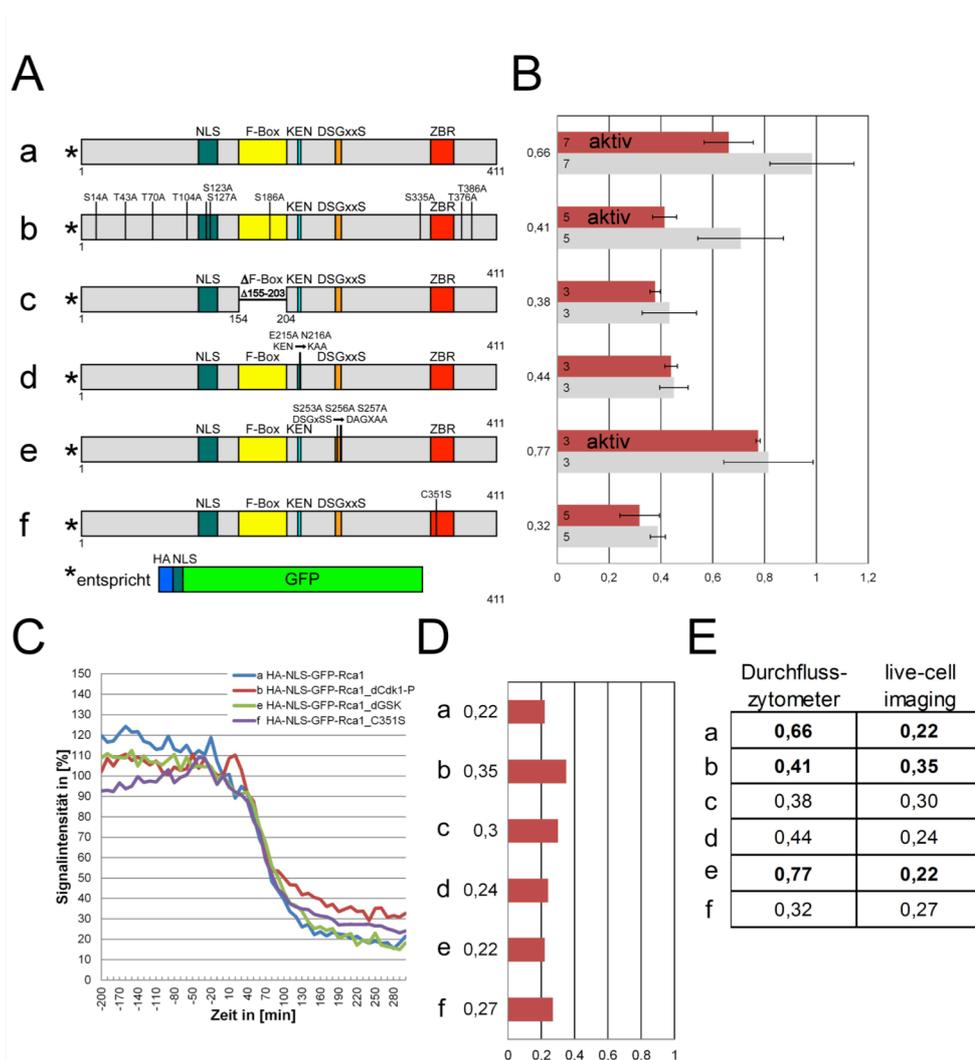


Abbildung 2.35: Einfluss der funktionalen Domänen auf die relative G1-Stabilität

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate

a) HA-NLS-GFP-Rca1, b) HA-NLS-GFP-Rca1_dCdk1-P, c) HA-NLS-GFP-Rca1_dF-Box, d) HA-NLS-GFP-Rca1_KEN-KAA, e) HA-NLS-GFP-Rca1_dGSK, f) HA-NLS-GFP-Rca1_C351S

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität (roter Balken). Verhältnis der Cherry-positiven Zellen 1C/2C. Werte <1 bedeuten, dass das entsprechende Protein in der G1-Phase instabiler als das Kontrollprotein HA-NES-3xCherry ist. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen. Relative Rca1-Funktionalität (grauer Balken): Verhältnis der GFP-positiven 1C- und 2C-Zellen relativ zum Verhältnis von 1C- zu 2C-Zellen, die keine Expression von GFP und Cherry zeigen. Ein Wert >0,4 bedeutet, dass das entsprechende Protein eine Aktivität besitzt und in der Lage ist, die G1-Phase zu verkürzen. Die Stabilität solcher Rca1-Derivate wurde über Abbaukurven bestimmt.

C: Abbaukurven der verschiedenen Proteine (Mittelwerte von zehn Zellen). Der Zeitpunkt $t=200$ min nach Beginn der Anaphase wurde als Referenzpunkt gewählt. Zu dieser Zeit ist der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen und die meisten Zellen sollten sich noch in der G1-Phase befinden.

D: Relative Fluoreszenzwerte der Abbaukurven von C zum Zeitpunkt $t=200$ min

E: Direkter Vergleich der ermittelten Werte für die Stabilität der Rca1-Derivate in G1 zwischen Durchflusszytometer (B) und den Abbaukurven (C+D)

2.3.2.2 N-terminale Rca1-Deletionen

In Embryonen wurden bereits verschiedene N-terminale Deletionskonstrukte auf ihre G1-Stabilität untersucht (Zielke, 2006). Dabei zeigte sich, dass ein Rca1-Derivat, dem die ersten 203 Aminosäuren fehlen, noch abgebaut wird, während ein Rca1, mit einer Deletion der ersten 255 Aminosäuren in der G1-Phase stabilisiert vorliegt.

Für die Untersuchung der C-terminalen Region wurden Rca1-Derivate verschiedener Länge erstellt und hinter HA-NLS-GFP kloniert (Abb. 2.36 A). Bei den ermittelten Durchflusszytometrie-Messungen wurde die relative G1-Stabilität bestimmt und die Rca1-Funktionalität überprüft. Dabei konnten die Ergebnisse aus Embryonen reproduziert werden. Die relative Rca1-Funktionalität wies HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203 (b) und HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-220 (c) mit Werten von 0,78 und 0,61 als aktive Rca1-Derivate aus (Abb. 2.36 Aktivitätswerte im grauen Balken), weshalb die Stabilitäten über Abbaukurven bestimmt wurden. Hier zeigten beide einen deutlich langsameren Abbau in der G1-Phase als HA-NLS-GFP-Rca1 (Abb. 2.36 C a-c). Weitere Verkürzungen führten zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der Rca1-Derivate und gleichzeitig zu einer steigenden Stabilisierung in G1. Bereits HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-234 (d) kann als ein stabiles Rca1-Derivat bezeichnet werden, da es sowohl aus den Daten der Durchflusszytometrie als auch in Abbaukurven als stabiles Protein hervorgeht (Abb. 2.36 C-E).

In dieser Messreihe wurde ebenfalls die Stabilität eines HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-255 (e) bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion der ersten 255 Aminosäuren nicht nur in Embryonen, sondern auch in Schneiderzellen zu einem stabilen Rca1 führt (Abb. 2.36 B, D, E).

Während HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-220 (c) mit einem Wert von 0,51 noch relativ gut abgebaut wurde, war die Rca1-Deletion HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-234 (d) mit einem Wert von 0,95 bereits stabil. Zu demselben Ergebnis führten Untersuchungen von HA-Rca1-Derivaten in *Drosophila*-Embryonen (Radermacher, 2007). Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass in der Aminosäuresequenz zwischen aa220-234 die Abbausequenz zu finden ist. Dieser Bereich scheint auch in Schneiderzellen eine wichtige Rolle für den Abbau zu haben.

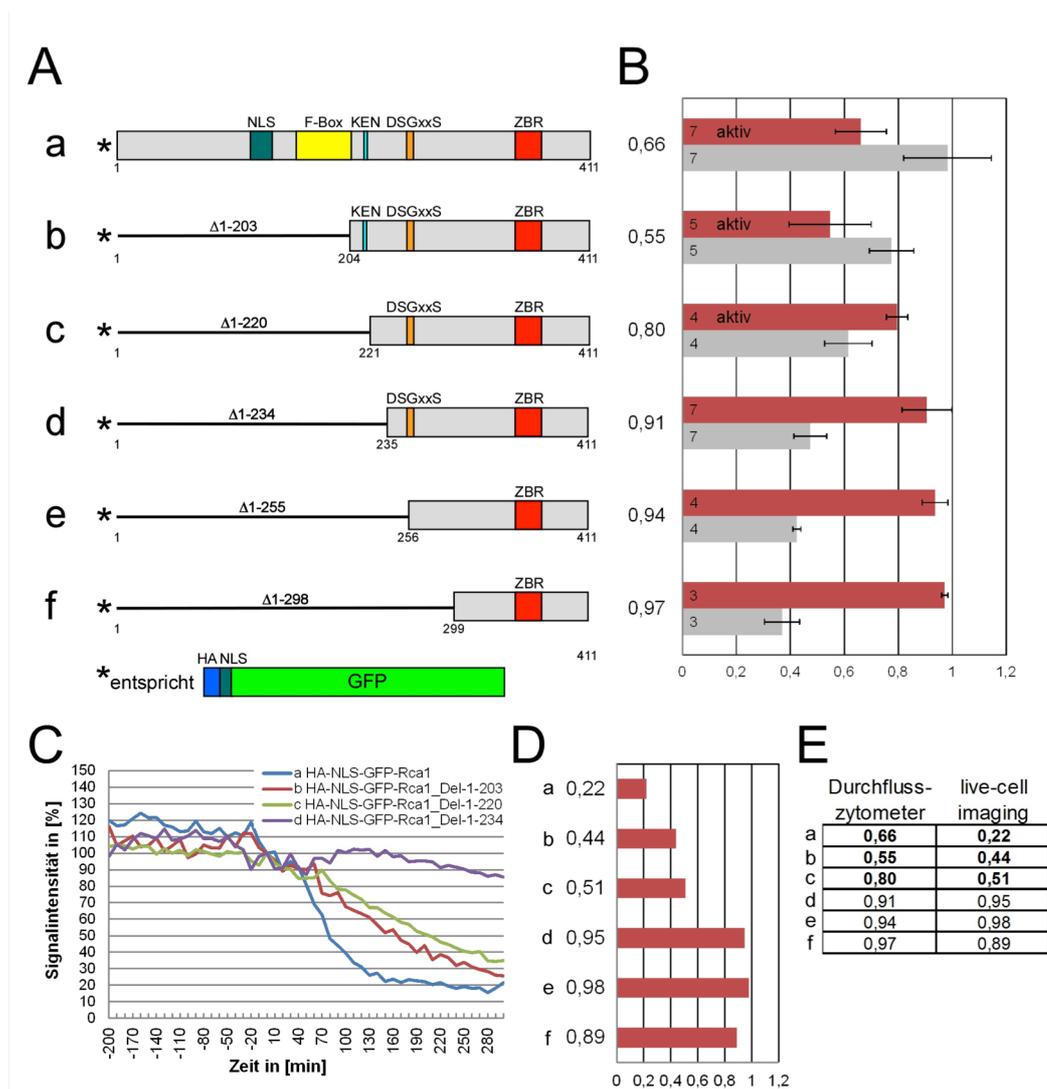


Abbildung 2.36: Einfluss der N-terminalen Rca1-Deletionen auf die relative G1-Stabilität

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate:

a) HA-NLS-GFP-Rca1, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-220, d) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-234, e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-255, f) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-298

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität (roter Balken). Verhältnis der Cherry-positiven Zellen 1C/2C. Werte <1 bedeuten, dass das entsprechende Protein in der G1-Phase instabiler als das Kontrollprotein HA-NES-3xCherry ist. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen. Relative Rca1-Funktionalität (grauer Balken): Verhältnis der GFP-positiven 1C- und 2C-Zellen relativ zum Verhältnis von 1C- zu 2C-Zellen, die keine Expression von GFP und Cherry zeigen. Ein Wert signifikant >0,4 bedeutet, dass das entsprechende Protein eine Aktivität besitzt und in der Lage ist, die G1-Phase zu verkürzen. Die Stabilität solcher Rca1-Derivate wurde über Abbaukurven bestimmt.

C: Abbaukurven der verschiedenen Proteine (Mittelwerte von 10 Zellen). Der Zeitpunkt t=200 min nach Beginn der Anaphase wurde als Referenzpunkt gewählt. Zu dieser Zeit ist der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen und die meisten Zellen sollten sich noch in der G1-Phase befinden.

D: Relative Fluoreszenzwerte der Abbaukurven von C zum Zeitpunkt t=200 min

E: Direkter Vergleich der ermittelten Werte für die Stabilität der Rca1-Derivate in G1 zwischen Durchflusszytometer (B) und den Abbaukurven (C+D)

2.3.2.3 N-terminale Rca1-Deletionen ohne postulierte Abbausequenz

Die Verlängerung der N-terminalen Rca1-Deletion von 220 auf 234 Aminosäuren führte in Abbaukurven zu einem sprunghaften Anstieg der Stabilität. Die relativen Fluoreszenzwerte der Abbaukurven wiesen zum Zeitpunkt $t=200$ min Werte von 0,51 zu 0,95 auf (Abb. 2.37 A, D; vgl. a, b). Aufgrund dieser Stabilisierung könnte es sich bei der kurzen Aminosäuresequenz von aa221-234 um eine mögliche Abbausequenz von Rca1 handeln. Die 14 Aminosäuren umfassende Region enthält auf den ersten Blick keine erkennbare Abbausequenz, es sind aber modifizierbare Aminosäuren zu finden, die den Abbau einleiten könnten. Neben zwei Lysinen ist auch ein Serin und ein Threonin zu finden (Abb. 2.37 F).

Die Deletion dieses kurzen Bereiches ist aktiv, weshalb die Stabilität von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-221-234 (c) in Abbaukurven bestimmt wurde. Der erhaltene Wert von 0,30 verdeutlicht, dass die kurze Aminosäuresequenz zumindest nicht als einzige Abbausequenz von Rca1 in Frage kommen kann (Abb. 2.37 A-D, c). Eine zusätzliche Deletion des N-Terminus führt zu einer Stabilisierung. HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-221-234 (d) ist sowohl im Durchflusszytometer, als auch in Abbaukurven mit Werten von 0,86 und 0,81 als nahezu stabil einzuordnen und deutet eine weitere Abbausequenz im N-Terminus an.

Um die für den Abbau verantwortlichen Aminosäuren in dieser kurzen Aminosäuresequenz weiter einzugrenzen, wurden Doppel-Punktmutanten erstellt und untersucht (Abb 2.37 f, g). Dabei ergab sich keine zusätzliche Stabilisierung. Sowohl HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_S224A_V233L (f) als auch HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_K228R_T232V (g) zeigten mit den Werten der Abbaukurven von 0,36 und 0,40 keinen signifikanten Unterschied zu dem Wert von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203 (e) mit 0,44.

Aus den Untersuchungen der Rca1-Derivate kann der Schluss gezogen werden, dass es vermutlich mindestens zwei Abbausequenzen in Rca1 gibt. Eine Abbausequenz ist in der N-terminalen Region lokalisiert, bei der anderen könnte es sich um den Bereich um aa221-234 handeln. Für den Abbau verantwortliche, einzelne Aminosäuren konnten nicht identifiziert werden.

Nachdem jedoch nicht auszuschließen ist, dass die Abbausequenz an anderer Stelle in der C-terminalen Region von Rca1 lokalisiert ist, wurde über C-terminale Deletionen an HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203 die Abbausequenz weiter eingegrenzt.

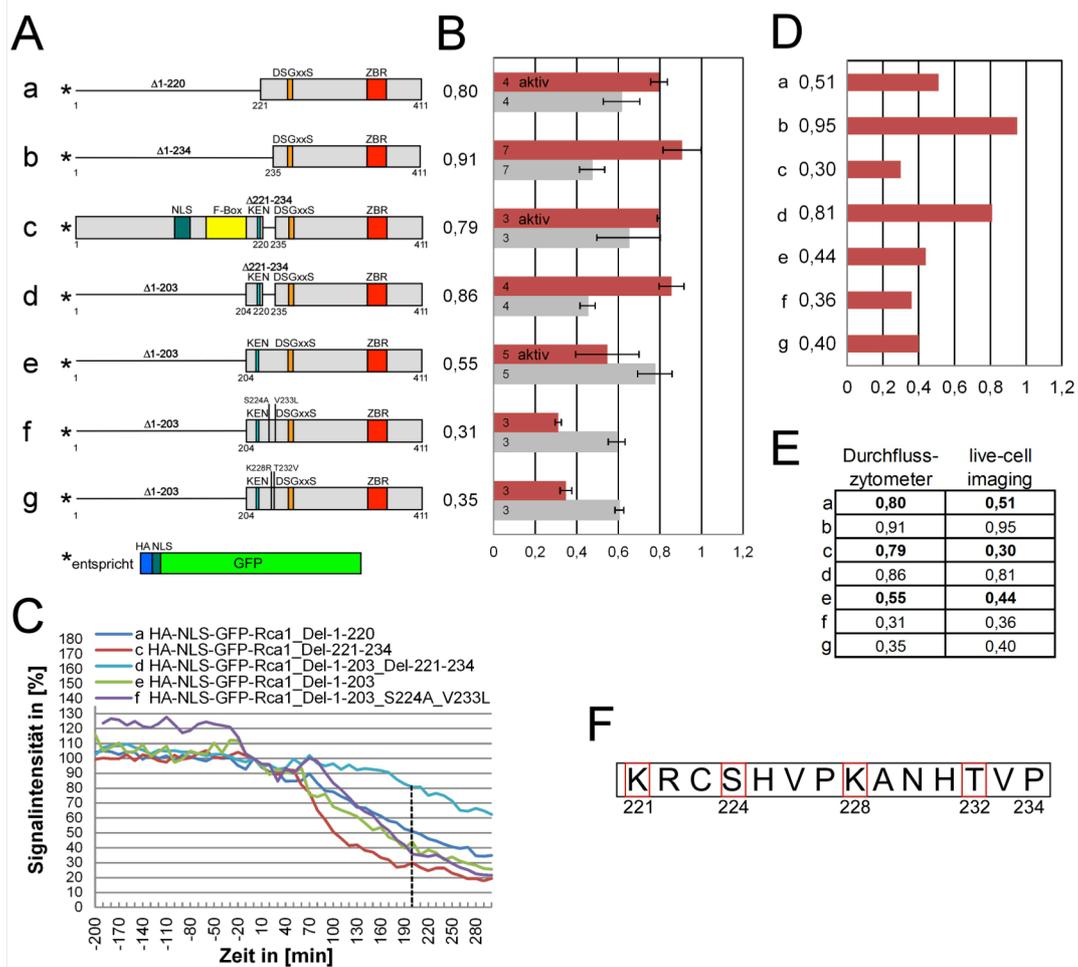


Abbildung 2.37: Einfluss der postulierten Abbausequenz aa220-234 auf die Stabilität

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate:

a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-220, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-234, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-221-234, d) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-221-234, e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203, f) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_S224A_V233L, g) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_K228R_T232V

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität (roter Balken). Verhältnis der Cherry-positiven Zellen 1C/2C. Werte <1 bedeuten, dass das entsprechende Protein in der G1-Phase instabiler als das Kontrollprotein HA-NES-3xCherry ist. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen. Relative Rca1-Funktionalität (grauer Balken). Verhältnis der GFP-positiven 1C- und 2C-Zellen relativ zum Verhältnis von 1C- zu 2C-Zellen, die keine Expression von GFP und Cherry zeigen. Ein Wert signifikant >0,4 bedeutet, dass das entsprechende Protein eine Aktivität besitzt und in der Lage ist, die G1-Phase zu verkürzen. Die Stabilität solcher Rca1-Derivate wurde über Abbaukurven bestimmt.

C: Abbaukurven der verschiedenen Proteine (Mittelwerte von 10 Zellen). Der Zeitpunkt t=200 min nach Beginn der Anaphase wurde als Referenzpunkt gewählt. Zu dieser Zeit ist der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen und die meisten Zellen sollten sich noch in der G1-Phase befinden.

D: Relative Fluoreszenzwerte der Abbaukurven von C zum Zeitpunkt t=200 min

E: Direkter Vergleich der ermittelten Werte für die Stabilität der Rca1-Derivate in G1 zwischen Durchflusszytometer (B) und den Abbaukurven (C+D).

F: Aminosäuresequenz der postulierten Abbausequenz aa221-234. Die roten Rechtecke markieren die Aminosäuren, die am Abbau von Rca1 beteiligt sein könnten. Man findet zwei Lysine (K) sowie ein Serin (S) und ein Threonin (T).

2.3.2.4 C-terminale Rca1-Deletionen

Es wurden mehrere C-terminale Deletionen an HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203 erstellt und im Durchflusszytometer die G1-Stabilität und die Rca1-Funktionalität bestimmt (Abb. 2.38 A). Von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203 (a) ist bereits bekannt, dass es noch Aktivität aufweist und in Abbaukurven einen Stabilitätswert von 0,44 besitzt. Werden vom C-terminalen Ende aus Verkürzungen vorgenommen, führt das bereits bei einer Verkürzung um sieben Aminosäuren zu einem vollständigen Aktivitätsverlust, die Stabilität ist davon aber nicht betroffen. Die C-terminalen Rca1-Deletionen HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-405-411 (b), HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-387-411 (c), HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-367-411 (d), HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-344-411 (e) und HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411 (f) zeigen mit Werten zwischen 0,40 und 0,56 in der G1-Phase aus Messungen der Durchflusszytometrie einen nahezu gleichbleibenden Abbau (Abb. 2.38 A, B).

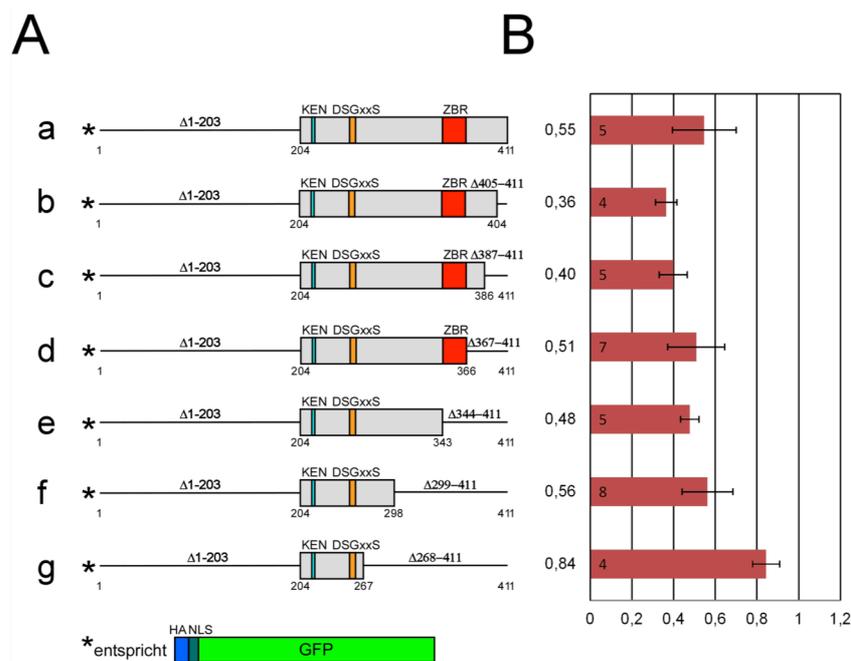


Abbildung 2.38: Eingrenzung der C-terminalen Abbausequenz

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate:

a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-405-411 c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-387-411, d) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-367-411, e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-344-411, f) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411, g) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-268-411

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität. Verhältnis der Cherry-positiven Zellen 1C/2C. Werte <1 bedeuten, dass das entsprechende Protein in der G1-Phase instabiler als das Kontrollprotein HA-NES-3xCherry ist. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

Die Berechnung der relativen Rca1-Funktionalität ergab für jede C-terminale Rca1-Deletion einen Wert für ein inaktives Rca1-Derivat. Die erhaltenen Werte der Durchflusszytometrie entsprechen den Werten aus den Abbaukurven (nicht gezeigt).

Erst bei einer weiteren Verkürzung auf 143 Aminosäuren bei HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-268-411 (g) kommt es zu einer signifikanten Stabilisierung.

Nachdem die Aktivität der Rca1-Derivate unabhängig von der Länge der C-terminalen Deletion verloren ging, scheint das C-terminale Ende entweder für die Ausbildung der Zink-Binde-Region notwendig zu sein, oder aber die C-terminale Region unabhängig von der ZBR-Domäne für die Aktivität von Rca1 benötigt zu werden. Für den Abbau spielt die Region aber augenscheinlich keine Rolle.

2.3.2.5 Das kleinste abbaubare Fragment (KAF)

Aus den C-terminalen Rca1-Deletionen wurde HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411 als das kleinste, noch abbaubare Rca1-Fragment ausgemacht (Abb. 2.39). Eine weitere Verkürzung des C-Terminus hat eine deutliche Stabilisierung zur Folge. Mit einem Wert von 0,84 liegt HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-268-411 in der G1-Phase nahezu stabil vor. Auch eine weitere Verkürzung von der N-terminalen Seite führt zu einem stabilen Rca1-Derivat (Abb. 2.39 c). HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-220_Del-299-411 ist mit einem Wert von 0,95 aus den Berechnungen der Durchflusszytometrie-Daten annähernd so stabil wie die Kontrolle HA-NLS-GFP.

Mit HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411 konnte das kleinste abbaubare Fragment (KAF) von Rca1 gefunden werden. Eine weitere Verkürzung sowohl vom N-Terminus als

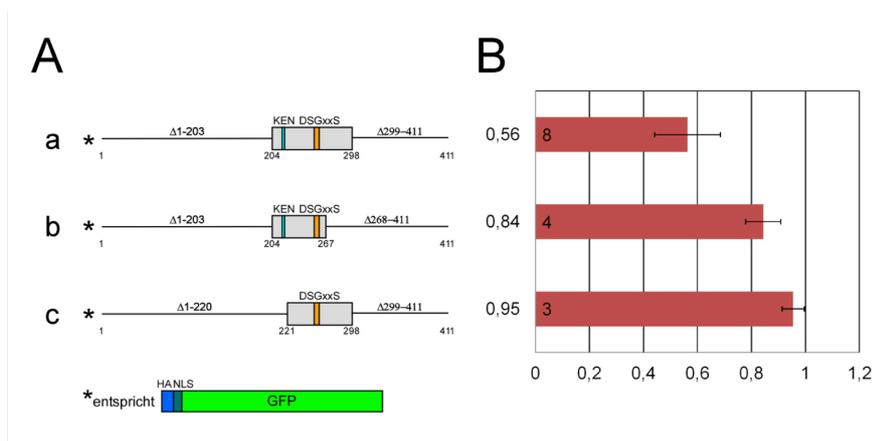


Abbildung 2.39: Die relative G1-Stabilität des kleinsten-abbaubaren-Fragments

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate:

a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-268-411, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-221_Del-299-411

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität. Verhältnis der Cherry-positiven Zellen 1C/2C. Werte <1 bedeuten, dass das entsprechende Protein in der G1-Phase instabiler als das Kontrollprotein HA-NES-3xCherry ist. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

Die Berechnung der relativen Rca1-Funktionalität ergab für jede Rca1-Deletion einen Wert für ein inaktives Rca1-Derivat. Die erhaltenen Werte der Durchflusszytometrie stimmen mit den Werten aus den Abbaukurven überein (nicht gezeigt).

auch vom C-Terminus führte zu einer deutlichen Stabilisierung in der G1-Phase. Zwar konnte eine Abbausequenz weiter eingegrenzt werden, aber es ist weiterhin unklar, wo die Abbausequenz in diesem verkürzten Rca1-Fragment lokalisiert ist. Es könnte sich hier um zwei Abbausequenzen handeln die synergistisch wirken, ebenso denkbar ist es, dass es sich hier um eine Abbausequenz handelt, die über Faltung erst in räumliche Nähe gebracht wird.

2.3.2.5.1 Die kleinsten Rca1-Fragmente

Um der Frage nachzugehen, welcher der beiden Bereiche eine größere Bedeutung für den Abbau trägt, wurden weitere Deletionen erstellt und auf G1-Stabilität hin überprüft. Dazu wurde ausgehend vom kleinsten abbaubaren Fragment HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411 (a) und von dem C-terminal verkürzten Rca1-Fragment HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-268-411 (d) jeweils zwei weitere N-terminale Deletionen um 220 und 234 Aminosäuren erstellt.

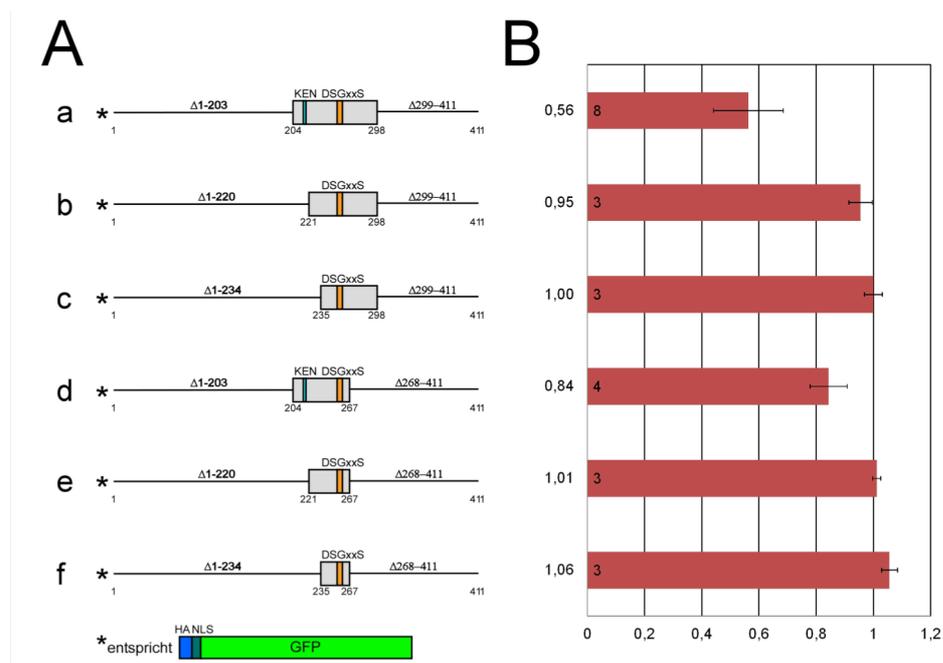


Abbildung 2.40: Relative G1-Stabilität der kleinsten Rca1-Fragmente

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate:

a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-220_Del-299-411, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-234_Del-299-411, d) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-267-411, e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-220_Del-267-411, f) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-234_Del-267-411

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität

Die Berechnung der relativen Rca1-Funktionalität ergab für jede C-terminale Rca1-Deletion einen Wert für ein inaktives Rca1-Derivat. Die erhaltenen Werte der Durchflusszytometrie stimmen mit den Werten aus den Abbaukurven überein (nicht gezeigt).

In beiden Fällen kommt es zu einer Stabilisierung, sobald zusätzlich der N-terminale Bereich deletiert wird (Abb. 2.40 b, c und e, f). In diesem Bereich ist die konservierte KEN-Box lokalisiert, die oftmals als Erkennungssequenz von APC/C-Substraten dient. Eine Deletion in der C-terminalen Region führt trotz intakter KEN-Box zu einer deutlichen Stabilisierung (Abb. 2.40 d), was einen Hinweis darauf gibt, dass die KEN-Box für den Abbau zwar notwendig ist, aber durch die Region im C-terminalen Teil unterstützt wird. Erst die Deletion der KEN-Box führt zu einer vollständigen Stabilisierung (Abb. 2.40 e, f).

2.3.2.5.2 Punktmutationen im kleinsten-abbaubaren-Fragment

Ein Sequenzvergleich des kleinsten, noch abbaubaren Rca1-Fragmentes Rca1_Del-1-203_Del-299-411 (Abb. 2.41 A) in verschiedenen *Drosophila*-Spezies lieferte im N-terminalen Bereich eine hohe Konservierung bis einschließlich zur KEN-Box. Interessanterweise befindet sich auch im C-Terminus zwischen den Aminosäuren 264-288 ein Bereich mit einer auffallend hohen Konservierung (Abb. 2.41 B-D). Im humanen Rca1-Ortholog Emi1 konnte eine sogenannte Linkerregion identifiziert werden, die als Unterstützung für die schwache D-Box-Domäne für eine korrekte Platzierung von Emi1 am APC/C-Komplex sorgt (Frye, *et al.*, 2013). Der konservierte Bereich der Linkerregion liegt bei Emi1 zwischen D-Box und ZBR-Domäne. Wird die Lage dieser Linkerregion mit der konservierten Region in Rca1 zwischen den Aminosäuren 264-288 verglichen, können Analogien gefunden werden. So befindet sich der konservierte Bereich in Rca1 zwischen KEN-Box und ZBR. Aufgrund der ähnlichen Funktion zu Emi1 könnte es sich bei Rca1 ebenfalls um eine Linkerregion handeln, die für eine stabile Anlagerung und vor allem richtige Positionierung von Rca1 an den APC/C^{Fzr} notwendig ist, damit die ZBR den APC/C-Komplex inhibieren kann. In dieser Region wurden eine Reihe von Punktmutationen eingefügt, die zu einem Austausch von geladenen und polaren Aminosäuren zu Alanin führen.

Über die Funktion dieses konservierten Bereiches in Rca1 ist noch nichts bekannt. Aufgrund der ähnlichen Funktion zu Emi1 könnte es sich bei Rca1 ebenfalls um eine Linkerregion handeln, die für eine stabile Anlagerung und vor allem richtige Positionierung von Rca1 an den APC/C^{Fzr} notwendig ist, damit die ZBR den APC/C-Komplex inhibieren kann. Ebenso gut könnte diese Region eine zusätzliche Abbausequenz für Rca1 darstellen, die mit anderen Abbausequenzen unterstützend auf den Abbau wirkt.

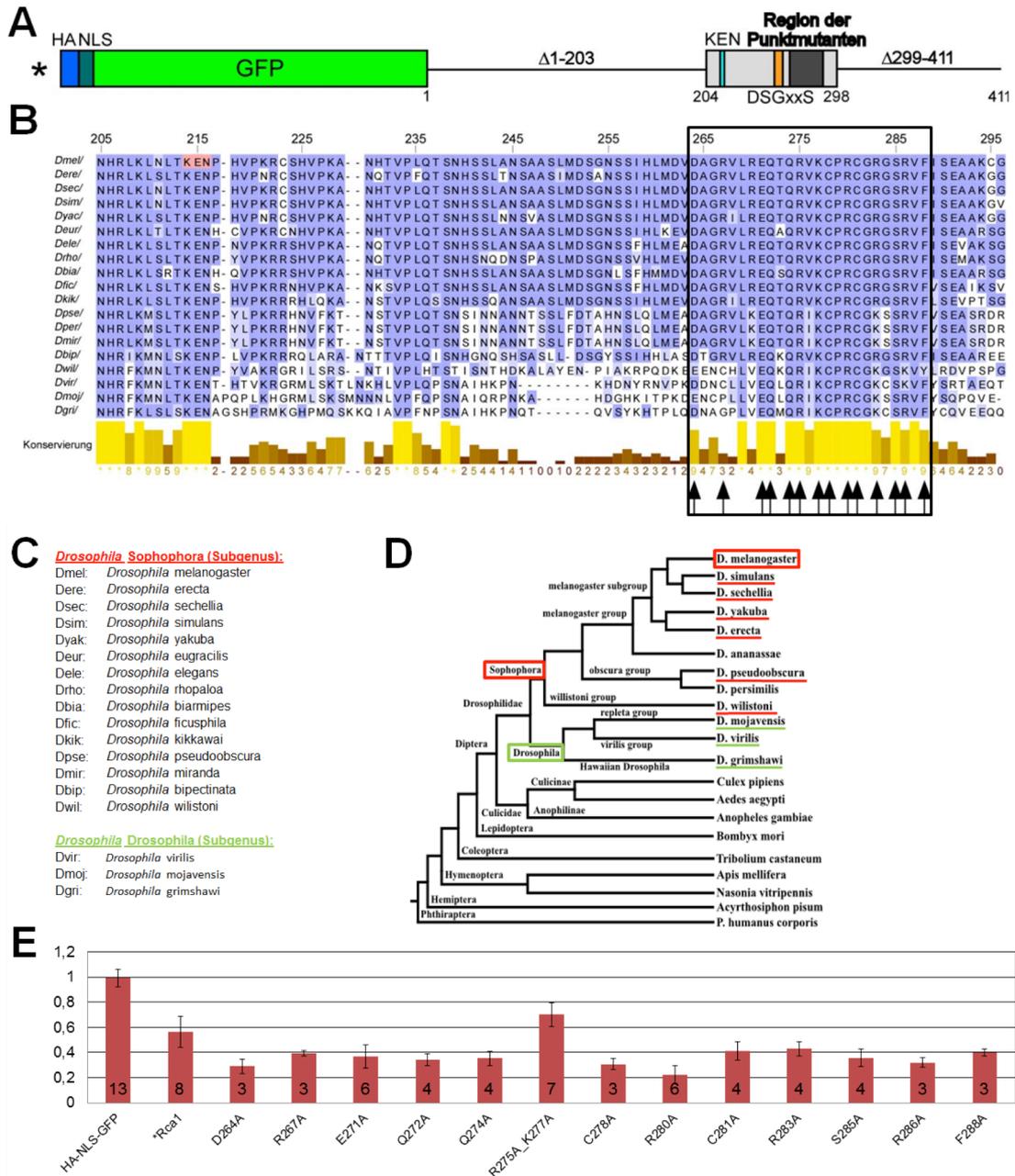


Abbildung 2.41: Einfluss der Punktmutationen auf die relative G1-Stabilität

A: Schematische Darstellung der untersuchten Region der Punktmutanten

B: Sequenzvergleich von Rca1_Del-1-203_Del-299-411 mit anderen *Drosophila*-Spezies
 Dargestellt ist der Sequenzvergleich des kleinsten, noch abbaubaren Rca1-Fragments Rca1_Del-1-203_Del-299-411 aus *Drosophila melanogaster* (oberste Reihe) mit verschiedenen *Drosophila*-Spezies. Die Region der Punktmutanten von Aminosäure 264 bis 288 ist schwarz eingerahmt. Die Pfeile unterhalb des Sequenzvergleiches markieren die untersuchten Punktmutanten.

C: Gattung- und Art der *Drosophila*-Spezies in der Sequenzanalyse

D: Stammbaum für den Verwandtschaftsgrad der verschiedenen *Drosophila*-Spezies

E: Bestimmung der relativen G1-Stabilität der Punktmutanten

Die Berechnung der relativen Rca1-Funktionalität ergab für alle Punktmutanten einen Wert für ein inaktives Rca1-Derivat. Die erhaltenen Werte der Durchflusszytometrie stimmen im Rahmen der Standardabweichung mit den Werten aus den Abbaukurven überein (nicht gezeigt).

*KAF: kleinstes abbaubares Fragment (HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411; siehe A)

Die relativen G1-Stabilitäten der Punktmutanten im Vergleich zum kleinsten, noch abbaubaren Fragment (KAF) sind in Abbildung 2.41 E dargestellt. Im Vergleich zur G1-Stabilität von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411 (G1-Stabilitätswert von 0,56), führen Punktmutationen in der Linkerregion in den meisten Fällen zu einer Destabilisierung. Eine Ausnahme stellt die Doppelmutante R275A_K277A dar, die zu einer Stabilisierung des kleinsten abbaubaren Fragmentes führt (G1-Stabilitätswert von 0,70).

Werden die beiden Punktmutationen einzeln betrachtet, kann für beide eine Stabilisierung nachgewiesen werden, die in beiden Fällen mit 0,68 bzw. 0,71 sehr ähnlich ausfällt (Abb. 2.42 c, d). Dies bedeutet, dass beide positiv geladenen Aminosäuren zusammen für einen effizienten Abbau notwendig sind.

Interessanterweise kann die Stabilisierung durch die KEN-Box-Mutation KEN-KAA mit der Punktmutation K277A nicht weiter stabilisiert werden (Abb. 2.42 d, e, f).

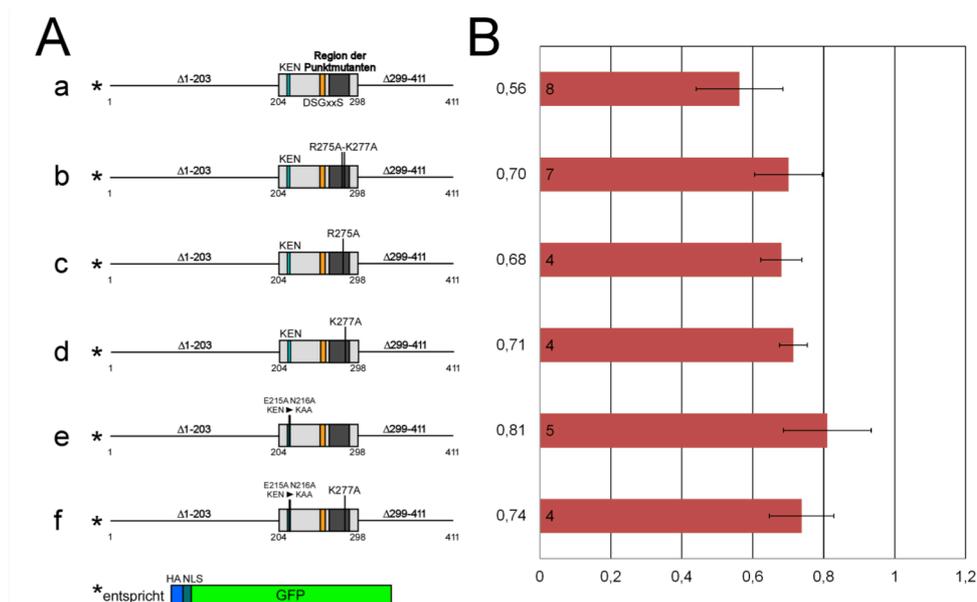


Abbildung 2.42: Einfluss der Punktmutation K277A auf die relative G1-Stabilität

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Punktmutanten:

a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R275A_K277A, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R275A, d) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411_K277A, e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411_KEN-KAA, f) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411_KEN-KAA_K277A,

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität

Die Berechnung der relativen Rca1-Funktionalität ergab für jede Rca1-Mutante einen Wert für ein inaktives Rca1-Derivat. Die erhaltenen Werte der Durchflusszytometrie stimmen mit den Werten aus den Abbaukurven überein (nicht gezeigt).

2.3.2.5.3 Destabilisierung durch Argininmutation

Die Punktmutation R280A führte den Berechnungen der G1-Stabilität zufolge zu einer stärkeren Destabilisierung (Abb. 2.43 b). Dieser Effekt könnte mit der starken Veränderung der positiv geladenen Guanidingruppe bei Arginin zu einer kurzen, hydrophoben Seitenkette bei Alanin zusammenhängen. Die Veränderung der Ladung und der Größe kann einen Einfluss auf die benachbarten Aminosäuren besitzen, weshalb in einem weiteren Austausch in die Arginin-ähnliche Aminosäure Lysin die G1-Stabilität erneut überprüft werden sollte.

Wie sich herausstellte, zeigte die Punktmutation R280K einen geringeren Destabilisierungseffekt als die Punktmutation R280A. Mit dem Wert von 0,28 weist die Punktmutante aber weiterhin eine deutliche Destabilisierung auf. In der Sequenzanalyse aus Abbildung 2.41 liegt das mutierte Arginin genau in dem Bereich der höchsten Konservierung, weshalb dem Arginin möglicherweise eine wichtige Funktion in der Linkerregion zuteil wird.

Mit den bisherigen Untersuchungen konnte die Abbausequenz auf ein kleines Rca1-Fragment der Aminosäuren 203-299 eingegrenzt werden. In dieser Region konnten zwei Domänen identifiziert werden, die mit dem Abbau in Verbindung stehen. Zum einen führt die Mutation der KEN-Box zu einer Stabilisierung des kurzen Fragments, zum anderen spielt dabei die Linkerregion eine Rolle, da die Punktmutanten R275A und K277A genauso wie die KEN-Box-Mutation in der Lage sind, das kurze Fragment zu stabilisieren. Punktmutationen an anderer Stelle der Linkerregion ermöglichten eine Destabilisierung, besonders deutlich war dieser Effekt bei der Punktmutante R280A zu sehen.

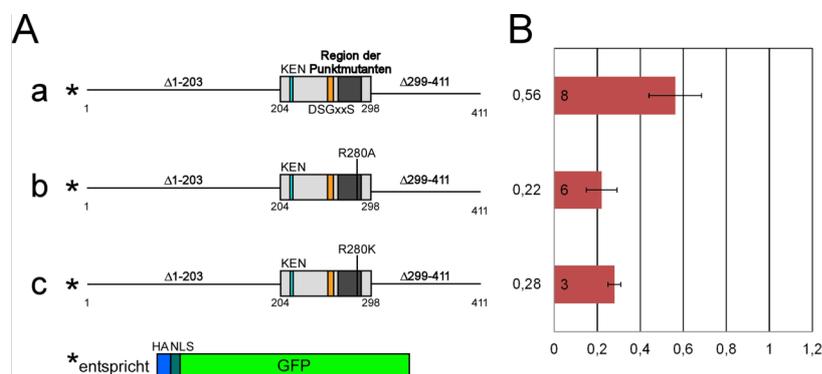


Abbildung 2.43: Einfluss der Arginin-Punktmutanten auf die relative G1-Stabilität

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Punktmutanten:

a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R280A, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R280K

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität

Die Berechnung der relativen Rca1-Funktionalität ergab für jede Rca1-Mutante einen Wert für ein inaktives Rca1-Derivat. Die erhaltenen Werte der Durchflusszytometrie stimmen mit den Werten aus den Abbaukurven überein (nicht gezeigt).

Bisher lag der Fokus auf dem C-terminalen Rca1. Die Rolle der N-terminalen Abbausequenz von Rca1 sollte im Folgenden näher charakterisiert werden.

2.3.2.6 N- und C-terminales Rca1

Die Abbausequenz im C-terminalen Rca1 wurde entdeckt, als von Rca1 zwei Deletionen erstellt wurden, die das Rca1 in zwei Hälften spaltete (Abb. 2.44 A). Von beiden wurde die relative G1-Stabilität bestimmt und die Rca1-Funktionalität überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass beide Teile von Rca1 eine eigene Abbausequenz enthalten, da sowohl der C-Terminus HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203 (b), als auch der N-Terminus HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 (c) in nahezu gleicher Weise abgebaut werden. Die relative Rca1-Funktionalität weist nur das C-terminale Fragment von Rca1 mit der intakten ZBR als aktiv aus, dennoch wurde von beiden Hälften die Abbaukurven erstellt, um sie direkt miteinander vergleichen zu können. Die N- und C-terminalen Rca1-Fragmente zeigen einen sehr ähnlichen Abbau und erreichen in den Abbaukurven nach 200 Minuten Werte von 0,40 und 0,44. Damit unterscheiden sie sich jedoch deutlich in der Abbaukinetik von HA-NLS-GFP-Rca1, das nach viel kürzerer Zeit (t=150 min) bereits den Wert von 0,22 erreicht (Abb. 2.44 C-E). Es ist wahrscheinlich, dass für einen effektiven Abbau beide Abbausequenzen zusammenwirken müssen.

Für die Suche nach der Abbausequenz im N-terminalen Teil von Rca1 wurden deshalb N-terminale Deletionen erstellt.

2.3.2.7 N-terminales Rca1 mit N-terminalen Verkürzungen

Die Suche nach der Abbausequenz im N-terminalen Rca1 erfolgte durch N-terminale Deletionen ausgehend von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411 (Abb. 2.45 a). Dabei wurden bis zur NLS-Sequenz die Deletionen in 25er Aminosäureschritten erstellt: HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-25_Del-204-411 (b), HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-50_Del-204-411 (c), HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-75_Del-204-411 (d) und HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-100_Del-204-411 (e). Weitere Deletionen wurden direkt vor der NLS-Sequenz HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-115_Del-204-411 (f) und direkt nach der NLS-Sequenz HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-133_Del-204-411 (g) durchgeführt. Das kürzeste N-terminale Fragment beinhaltete nur die F-Box-Domäne HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-154_Del-204-411 (h). Da der N-terminale Bereich von Rca1 keine ZBR mehr besitzt, handelt es sich bei den untersuchten N-terminalen Deletionen um inaktive Rca1-Derivate, die keine Rca1-Funktionalitäten mehr aufweisen. Die Bestimmung der G1-Stabilitäten ergab ein uneinheitliches Bild

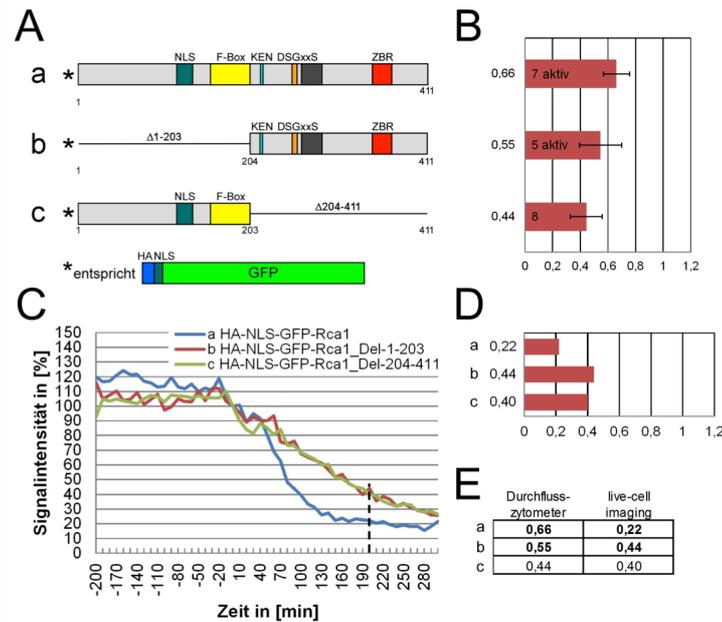


Abbildung 2.44: Relative G1-Stabilität von N- und C-terminalem Rca1

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Deletionen

a) HA-NLS-GFP-Rca1, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität

Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

C: Abbaukurven der verschiedenen Proteine (Mittelwerte von 10 Zellen). Der Zeitpunkt $t=200$ min nach Beginn der Anaphase wurde als Referenzpunkt gewählt. Zu dieser Zeit ist der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen und die meisten Zellen sollten sich noch in der G1-Phase befinden.

D: Relative Fluoreszenzwerte der Abbaukurven von C zum Zeitpunkt $t=200$ min

E: Direkter Vergleich der ermittelten Werte für die Stabilität der Rca1-Derivate in G1 zwischen Durchflusszytometer (B) und den Abbaukurven (C+D)

(Abb. 2.45 B). Während die Deletion von 25 und 50 Aminosäuren keine Auswirkung auf die Stabilität besitzt, liegt HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-75_Del-204-411 (d) mit dem Wert von 0,94 in der G1-Phase stabil vor. Weitere Verkürzungen führten jedoch wieder zu einer Destabilisierung (HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-100_Del-204-411 (e) und HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-115_Del-204-411 (f) während HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-133_Del-204-411 wiederum sehr stabil erscheint.

Auffällig war, dass im Durchflusszytometer bei den N-terminalen Derivaten signifikant weniger GFP-positive Zellen detektiert werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass eine generelle Zellzyklus-unabhängige Instabilität vorliegt. Damit können die Werte aus der Durchflusszytometrie nur mit Vorsicht interpretiert werden.

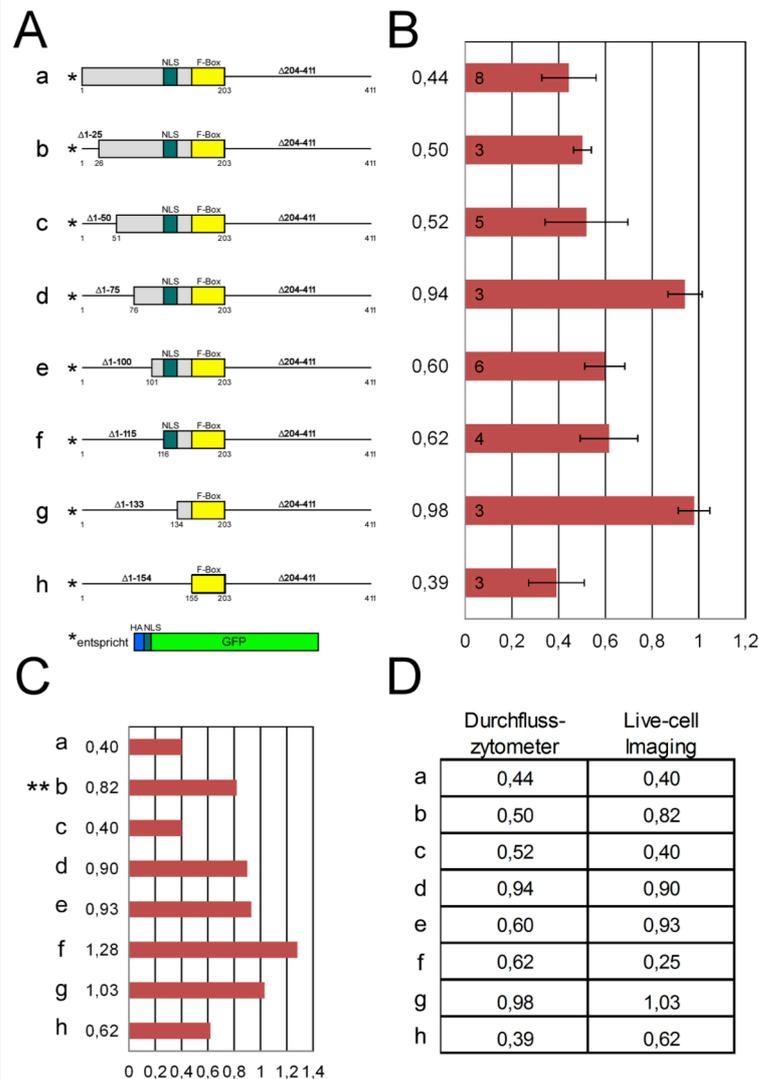


Abbildung 2.45: Die relative G1-Stabilität N-terminaler Rca1-Deletionen

A: Schematische Darstellung der untersuchten N-terminalen Rca1-Deletionen:

a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-25_Del-204-411, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-50_Del-204-411, d) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-75_Del-204-411 e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-100_Del-204-411, f) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-115_Del-204-411, g) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-133_Del-204-411, h) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-154_Del-204-411

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität

Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

C: Relative Fluoreszenzwerte der Abbaukurven zum Zeitpunkt t=200 min

** b) der Wert der Abbaukurve zeigt ein stabilisiertes Protein an, was allerdings ein etwas verzerrtes Bild darstellt. Der minimale Wert der 10 Einzelkurven von HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-25_Del-204-411 liegt zum Zeitpunkt t=400 min bei 0,25. Dies zeigt, dass es durchaus noch abgebaut werden kann.

D: Direkter Vergleich der ermittelten Werte für die Stabilität der Rca1-Derivate in G1 zwischen Durchflusszytometer (B) und den Abbaukurven (C)

Auch im live-cell-imaging kam es bei diesen Derivaten zu Unregelmäßigkeiten. So zeigte der t=200 Wert bei HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-25_Del-204-411 (b) eine Stabilisierung an, obwohl dieses Protein noch gut abgebaut wird, da der t=400 Wert bei 0,25 lag. Weiter-

hin wurde bei HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-115_Del-204-411 (f) ein Wert über 1,0 gemessen. Schließlich fallen in beiden Messungen (Durchflusszytometer und live-cell-imaging) die Werte vom Derivat, das nur noch die F-Box Domäne besitzt (h) heraus. In beiden Fällen wird das Derivat noch relativ gut abgebaut. Die Gründe für diese Variabilität konnten nicht klar bestimmt werden, generelle Instabilität spielt hier sicher eine wichtige Rolle.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich keine eindeutige Aussage über die Lokalisierung der Abbausequenz treffen. Eine deutliche Stabilisierung sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in Abbaukurven konnte bei der Deletion der ersten 75 Aminosäuren beobachtet werden, während die Deletion von 50 Aminosäuren noch gut abgebaut wurde (c und d). Um zu überprüfen, ob in dem Bereich zwischen den Aminosäuren 50 und 75 eine mögliche Abbausequenz liegt, wurden weitere N-terminale Rca1-Deletionen erstellt.

2.3.2.8 N-terminale Rca1-Fragmente

Da die Bestimmung über das Durchflusszytometer bei Rca1-Derivaten mit N-terminalen Deletionen nicht zuverlässig durchgeführt werden konnte, wurden hier nur die Daten aus dem live-cell-imaging verwendet.

Dabei zeigt sich, dass HA-NLS-GFP-Rca1_Del-76-411 noch eine recht gute G1-Instabilität aufweist (Abb. 2.46 b). Dies deutet darauf hin, dass in den ersten 75 Aminosäuren eine Region ist, die für die Instabilität verantwortlich ist.

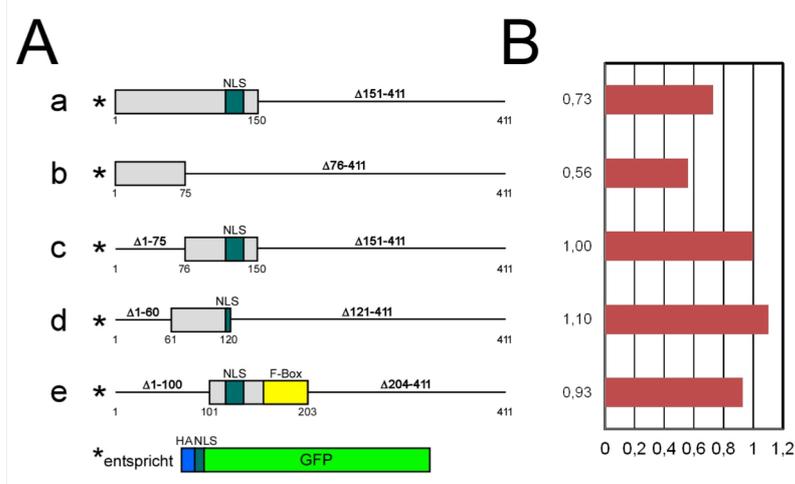


Abbildung 2.46: Die relative G1-Stabilität der N-terminalen Rca1-Fragmente

A: Schematische Darstellung der untersuchten N-terminalen Rca1-Deletionen:

a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-151-411, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-76-411, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-75_Del-151-411, d) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-60_Del-121-411 e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-100_Del-204-411

B: Relative Fluoreszenzwerte der Abbaukurven zum Zeitpunkt t=200 min

2.3.3 Für die Aktivität relevante Regionen in Rca1

Aus den bisherigen Ergebnissen der Rca1-Funktionalität konnten einige Bereiche identifiziert werden, die für die Aktivität von Rca1 notwendig sind.

2.3.3.1 Vergleich der APC/C-Inhibition ausgewählter Rca1-Derivate

Der Verlust der Aktivität beruht auf zwei verschiedenen Funktionen von Rca1, die es zu unterscheiden gilt. Neben der Inhibierung des APC/C^{Fzr}-Komplexes in der G2-Phase und am G2/M-Phase-Übergang (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002) konnte auch eine Interaktion mit Komponenten des SCF-Komplexes nachgewiesen werden (Zielke, *et al.*, 2006). Rca1 vermittelt vermutlich die Substraterkennung des SCF-Komplexes und könnte einen negativen Regulator des G1/S-Phase-Übergangs darstellen, indem es Substrate für den Abbau markiert. Eine Überexpression von Rca1 während der Augenentwicklung in *Drosophila* kann S-Phasen induzieren und die Fliegen entwickeln einen rauen Augen-Phänotyp. Dieser Effekt ist F-box abhängig (Zielke, *et al.*, 2006). Wird Rca1 in Schneiderzellen überexprimiert, verkürzt sich die G1-Phase, da Rca1 frühzeitig die S-Phase induzieren kann (persönliche Mitteilung von Martina Frank). Diese verkürzte G1-Phase spiegelt sich auch in den Daten der Durchflusszytometrie wider, wenn HA-NLS-GFP-Rca1 in Schneiderzellen überexprimiert wird. Das Verhältnis von G1- zu G2-Phase-Zellen der GFP-positiven Zellen verschiebt sich in Richtung G2, was in den Werten der Rca1-Funktionalität gut zu erkennen ist (Abb. 2.47 A). Wird die F-Box deletiert, verliert

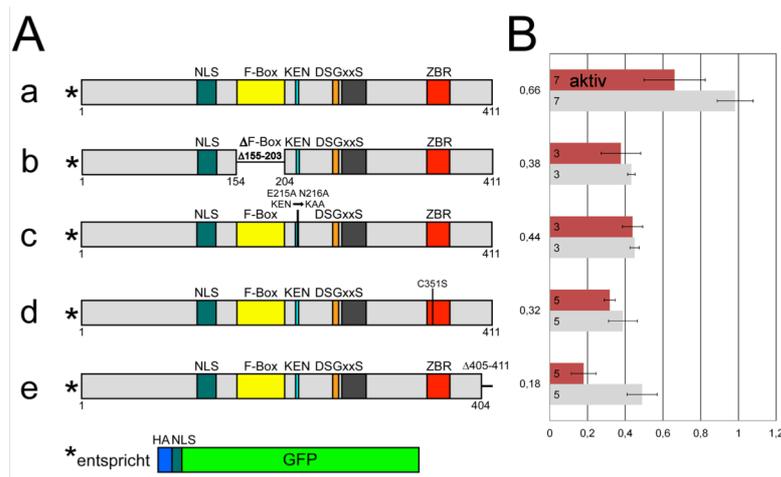


Abbildung 2.47: Rca1-Derivate, die keine Aktivität besitzen

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate:

a) HA-NLS-GFP-Rca1, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-155-203 (ΔF-Box), c) HA-NLS-GFP-Rca1_E215A_N216A (KEN-KAA), d) HA-NLS-GFP-Rca1_C351S (ZBR) e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-405-411 (RL-Tail)

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität und Rca1-Funktionalität

Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

Rca1 die Interaktion mit dem SCF-Komplex (Y2H Analyse Martina Frank) und kann bei Überexpression die S-Phase nicht mehr frühzeitig induzieren. Der Wert der Rca1-Funktionalität von 0,42 verdeutlicht die verlorengangene Funktionalität (Abb. 2.47 b). Die Mutationen der KEN-Box, der ZBR und die Deletion des RL-Tails verursachen ebenfalls einen vollständigen Funktionsverlust von Rca1 (Abb. 2.47 c-e). Für das humane Ortholog Emi1 konnte gezeigt werden, dass die APC/C-Inhibition über einen Mechanismus abläuft, in dem neben der D-Box als Erkennungssequenz des APC/C^{Cdc20} auch die ZBR für die Blockierung der Substrat-Bindestelle als Pseudosubstratinhibitor notwendig ist. Der RL-Tail von Emi1 blockiert die Bindestelle für UBE2S, eine E2-Ubiquitin-Ligase, die für die Polyubiquitylierung von APC/C-Substraten an den APC/C-Komplex binden muss (Frye, *et al.*, 2013). Werden diese Erkenntnisse auf Rca1 übertragen, ist bei diesen Rca1-Mutanten die APC/C-Inhibitionsfähigkeit betroffen, mit dem Unterschied, dass Rca1 durch die KEN-Box an APC/C^{Fzr} bindet und inhibiert.

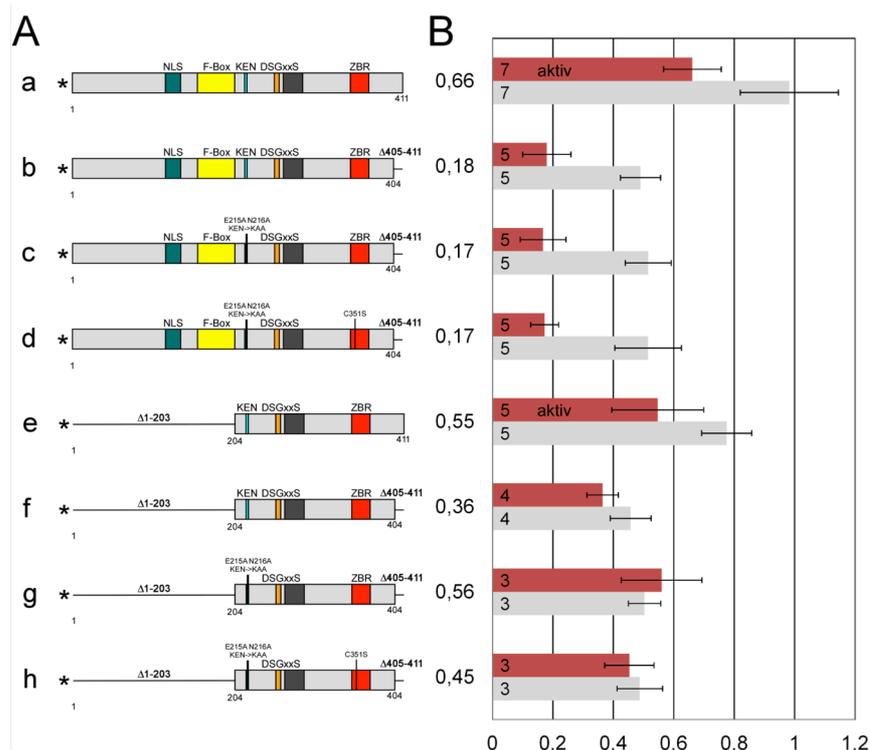


Abbildung 2.48: Rca1-Derivate, die keine Aktivität besitzen

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate:

a) HA-NLS-GFP-Rca1, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-405-411 (RL-Tail), c) HA-NLS-GFP-Rca1_E215A_N216A_Del-405-411 (KEN-KAA + RL-Tail), d) HA-NLS-GFP-Rca1_E215A_N216A_C351S_Del-405-411 (KEN-KAA + ZBR + RL-Tail)

e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203 ($\Delta 203$), f) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-405-411 ($\Delta 203$ + RL-Tail), g) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_E215A_N216A_Del-405-411 ($\Delta 203$ + KEN-KAA + RL-Tail), h) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_E215A_N216A_C351S_Del-405-411 ($\Delta 203$ + KEN-KAA + ZBR + RL-Tail)

B: Bestimmung der relativen G1-Stabilität und Rca1-Funktionalität

Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

Unabhängig von der Rca1-Funktionalität zeigt sich der Abbau von Rca1. Die Deletion der F-Box und des RL-Tails haben keine Stabilisierung von Rca1 zur Folge. Es scheint sogar, als ob die Deletion des RL-Tails zu einem schnelleren Abbau führt (Abb. 2.47 e). Die Mutationen in der KEN-Box-Domäne oder der ZBR bewirken in Schneiderzellen ebenfalls keine Stabilisierung von Rca1 in G1, die C351S-Mutation könnte eher einen destabilisierenden Einfluss auf die G1-Stabilität besitzen (Abb. 2.47 d).

In einer weiteren Stabilitäts- und Aktivitätsanalyse wurden die KEN-Box-Mutante, die ZBR-Mutante und die RL-Tail-Deletion miteinander kombiniert und im Durchflusszytometer untersucht (Abb. 2.48). Es zeigte sich, dass die verschiedenen Kombinationen keinen Einfluss auf Aktivität oder Stabilität besitzen, solange Rca1 im N-Terminus nicht deletiert ist (Abb. 2.28 a-d). Sobald die ersten 203 Aminosäuren fehlen, wirkt sich die Kombination von RL-Tail-Deletion und KEN-Box-Mutation stabilisierend aus (Abb. 2.48 f und g). Diese Stabilisierung kann durch die zusätzliche Kombination mit der C351S-Mutation zum Teil rückgängig gemacht werden (Abb. 2.48 h).

Die Untersuchung der Rca1-Derivate hat vier Bereiche identifizieren können, die für die Rca1-Funktionalität verantwortlich sind. Die F-Box dient in anderer Funktion als Erkennungssequenz für den SCF-Komplex, in dem Rca1 vermutlich am G1-S-Übergang notwendig ist. KEN-Box, ZBR und RL-Tail sind notwendig für die Inhibition des APC/C^{Fzr}-Komplexes, wobei die Veränderung von einer Region bereits für einen vollständigen Verlust der Rca1-Funktionalität ausreichend ist. Aber selbst die Kombination der drei Domänen hat keinen Einfluss auf die G1-Stabilität. Erst mit der Deletion des N-terminalen Bereiches von Rca1 stabilisiert die KEN-Box-Mutation Rca1 in der G1-Phase. Die zusätzliche Punktmutation in der ZBR kann den Effekt allerdings wieder aufheben.

2.3.3.2 Die C351S-Mutation führt zu einer Destabilisierung

Die Mutation des Cysteins 351 in der Zinkbinderegion führt zu einem vollständigen Verlust der APC/C-Inhibition und zeigte in Verbindung mit der Deletion des N-Terminus, der KEN-Box-Mutation und der Deletion des RL-Tails von Rca1 in Abbildung 2.48 einen destabilisierenden Effekt. Der Unterschied in der G1-Stabilität zwischen den beiden Rca1-Deletions-Derivaten ist mit der Differenz aus beiden Werten von 0,11 nicht sehr groß und liegt noch innerhalb der möglichen Standardabweichung (Abb. 2.48 g und h). Um diesen Effekt näher zu charakterisieren, wurden in Abbildung 2.49 verschiedene Rca1-Deletionen mit dem Pendant mit der C351S-Mutation miteinander verglichen. Dargestellt sind dabei die zugehörigen G1-Stabilitäten. Es ist zu

erkennen, dass die Einführung einer zusätzlichen C351S-Mutation in der Zinkbinderegion in allen Fällen zu einer Destabilisierung des Rca1-Derivates führt (Abb. 2.49).

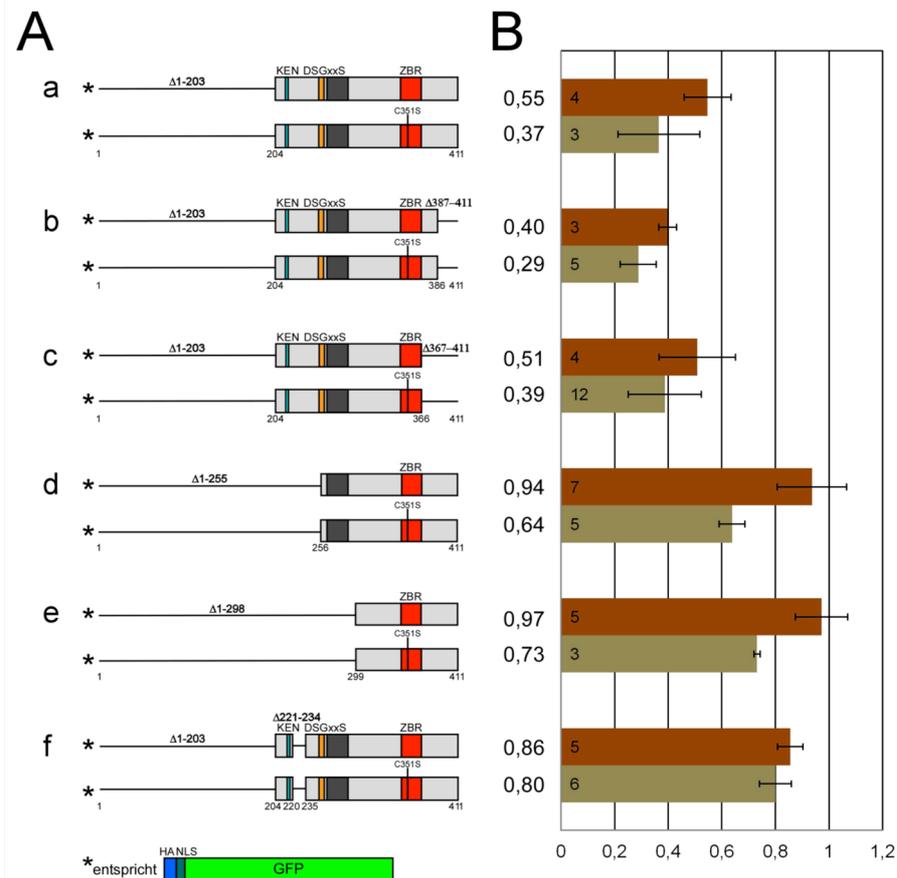


Abbildung 2.49: Einfluss der C351S-Mutation auf die relative G1-Stabilität

A: Schematische Darstellung der untersuchten Rca1-Derivate, mit bzw. ohne C351S
 a) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203, b) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-387-411, c) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-367-411, d) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-255, e) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-298, f) HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_Del-221-234

B: Vergleich der relativen G1-Stabilitätswerte

Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl unabhängiger Messungen an, dargestellt sind ebenfalls die Standardabweichungen der einzelnen Messungen.

2.4 Die Etablierung eines *Drosophila*-spezifischen *in vitro*-Ubiquitylierungsassays

Einen wichtigen Mechanismus der Zellregulation stellt der zeitgenau terminierte Abbau von Proteinen über das Proteasom dar. Dazu werden Proteine von verschiedenen Ubiquitinligasen mit Ubiquitinmolekülen für den Abbau markiert. Die Ubiquitylierung von Zellzyklus-spezifischen Substraten wird in der Zelle z.B. durch den APC/C-Komplex durchgeführt. Für einen zellfreien Ubiquitylierungsassay (APC/C-Assay oder *in vitro*-Assay) müssen alle notwendigen Komponenten in einem Ansatz vereinigt werden, mit denen eine Ubiquitylierung von Substraten auch außerhalb des zellulären Milieus erfolgen kann. Zu den notwendigen Komponenten gehören die Enzyme E1, E2 und E3 (APC/C), der Aktivator des APC/C Fzr, Ubiquitin, ATP und das zu untersuchende Substrat (Miller, *et al.*, 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, einen biochemischen Ubiquitylierungsassay mit *Drosophila*-spezifischen Komponenten zu etablieren, um zum einen die Inhibitionsfähigkeit von Rca1 auf den *Drosophila*-APC/C^{Fzr}-Komplex *in vitro* nachweisen zu können, und zum anderen, um Rca1 als mögliches Substrat des APC/C zu identifizieren. Wenn das Substrat ubiquityliert wird, sind nach dem Westernblot entsprechende Ubiquitylierungsbanden auf der Membran zu detektieren (Summers und Jackson, 2009). In ihrer Diplomarbeit konnte Sungatiah Höfer eine Ubiquitylierung an Geminin feststellen. Allerdings war dieses Geminin im Retikulozytenlysat *in vitro* hergestellt und die Komponenten des Ubiquitylierungsassays aus dem humanen System.

Deshalb wurden zuerst die einzelnen *Drosophila*-spezifischen Komponenten in *E. coli* überexprimiert und über HisTag-Säulen aufgereinigt bzw. der APC/C-Komplex aus Embryonen oder adulten Fliegen extrahiert. In weiteren Schritten wurden die Komponenten zur Etablierung eines Ubiquitylierungsassays eingesetzt.

2.4.1 Herstellung der benötigten Komponenten

Zur Herstellung der benötigten Komponenten wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem entsprechenden pET-Vektor transformiert (5.10.6) und in LB-Medium mit dem benötigten Antibiotikum die Genexpression durch IPTG induziert.

2.4.1.1 Ubiquitin (6xHis-Ubiquitin)

Die Überexpression von 6xHis-Ubiquitin erfolgte über Nacht bei 37 °C in einem Volumen von 2x 1 l. Am Morgen wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und für den Aufreinigungsschritt vorbereitet. Die eigentliche Aufreinigung wurde mithilfe einer 5 ml HisTrap-Säule durchgeführt, an die das Ubiquitin mit dem 6xHis-Epitop bindet. Mit steigender Imidazolkonzentration im Elutionspuffer wurde das Eluat in 2 ml Fraktionen gesammelt.

Abbildung 2.50 zeigt den Verlauf der Reinigung von Ubiquitin über eine HisTrap-Säule. Rekombinantes 6xHis-Ubiquitin fand sich in deutlich größerem Anteil in der löslichen Fraktion des Zellextrakts (Ü) (Abb. 2.50 B).

Mit dem in der löslichen Fraktion vorhandenen Protein wurde eine Metallchelataffinitätschromatographie durchgeführt (Abb. 2.50 A). Fraktionen, die das Protein in reiner Form enthielten (Abb. 2.50 B) wurden vereinigt und mittels Dialyse das Imidazol entfernt. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde das Protein in flüssigen Stickstoff eingetroppt und bei -80 °C gelagert.

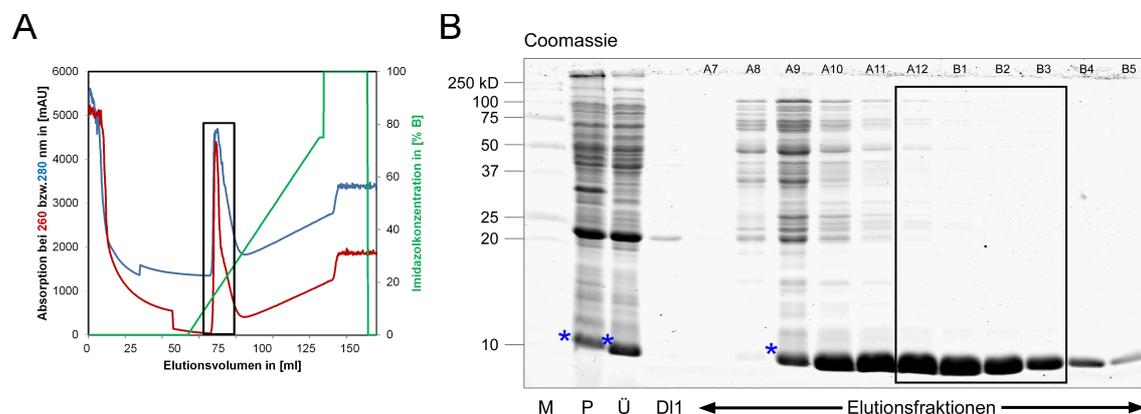


Abbildung 2.50: Reinigung von 6xHis-Ubiquitin aus *E. coli* BL21(DE3)

A: Elutionsprofil der HisTrap-Metallchelataffinitätschromatographie

Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Mit steigender Imidazolkonzentration (grün) wird das gebundene Protein von der Säule gewaschen und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Das schwarze Kästchen markiert das eluierende 6xHis-Ubiquitin.

B: Verlauf der Reinigung, verfolgt über SDS-PAGE (14%) mit anschließender Coomassiefärbung. Auftragung von links nach rechts: (M) Low Molecular weight marker; (P) Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextrakts; (Ü) Überstand, lösliche Fraktion des Zellextrakts; (DI1) Durchlauf, nicht mit der Säule interagierendes Protein; (A7-B5) Elutionsfraktionen

Die gezeigten Elutionsfraktionen A7-B5 sind in A mit einem schwarzen Rechteck markiert. Je Fraktion wurden 4 µl aufgetragen. Rekombinantes 6xHis-Ubiquitin besitzt eine Größe von 8,5 kDa (blauer Stern).

Spätere Elutionsfraktionen zeigen eine geringere Verunreinigung mit anderen Proteinen. Die Elutionsfraktionen, die vereinigt und eingefroren wurden, sind mit dem schwarzen Rechteck in B markiert.

Neben dem selbst hergestellten 6xHis-Ubiquitin wurde in den Ubiquitinylierungsassays auch gekauftes, nicht epitopmarkiertes Ubiquitin (Enzo) bzw. FLAG-Ubiquitin (Biomol) verwendet.

2.4.1.2 Substrat Geminin* (Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis)

In früheren Arbeiten wurde das verkürzte Geminin_Del-102-192-10xHA über *in vitro*-Translation in Retikulozytenlysat hergestellt und direkt in die Ubiquitinylierungsreaktion eingesetzt (Höfer, 2011). In diesem Retikulozytenlysat herrscht ein Milieu vor, das sich nicht nur für die Transkription und Translation eignet, sondern auch für die Ubiquitinylierungsreaktion optimale Bedingungen bereitstellt. Für den *Drosophila*-Ubiquitinylierungsassay sollte das Substrat Geminin* in *E. coli* hergestellt werden. Dazu wurde es mit einem C-terminalen 6xHis-Epitop versehen, in *E. coli* überexprimiert und über eine 5 ml HisTag-Säule aufgereinigt.

Testexpressionen bei Temperaturen von 18 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C zeigten, dass am meisten Protein nach dem Zellaufschluss bei 18 °C im Überstand zu finden ist. Die Überexpression von Geminin* erfolgte deshalb über Nacht bei 18 °C in einem Volumen von 2x 1 l. Mit dem in der löslichen Fraktion vorhandenen Protein wurde eine Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt. Abbildung 2.51 zeigt den Verlauf der Reinigung von Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis über eine 5 ml HisTrap-Säule.

Die Fraktionen B11-C1 wurden vereinigt und mittels Dialyse das Imidazol entfernt (Abb. 2.51 B). Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde das Protein in flüssigen Stickstoff eingetroppt und bei -80 °C gelagert.

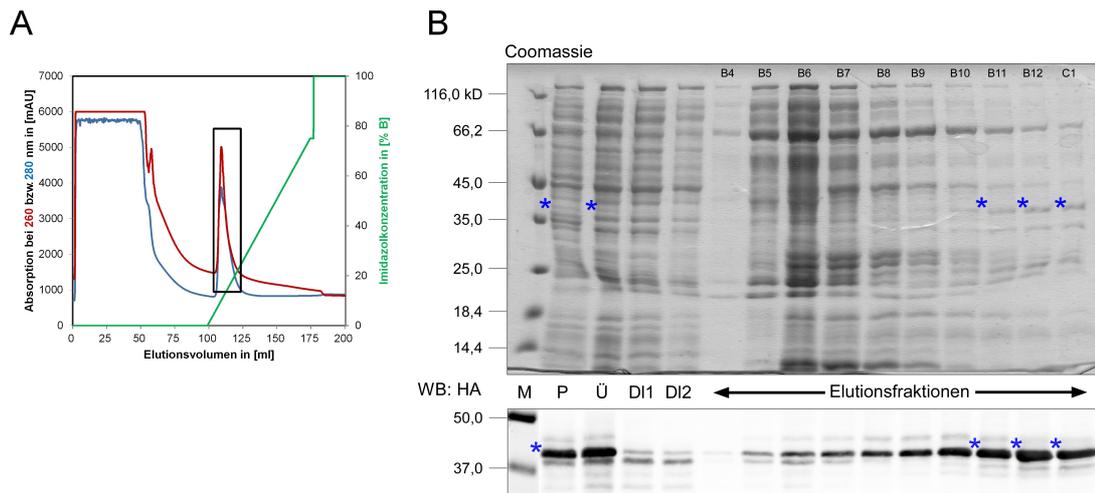


Abbildung 2.51: Reinigung von Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis aus *E. coli*

A: Elutionsprofil der HisTrap-Metallchelate-Affinitätschromatographie

Dargestellt ist die Absorbationsmessung bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Mit steigender Imidazolkonzentration (grün) wird das gebundene Protein von der Säule gewaschen und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Das schwarze Kästchen markiert das eluierende Substrat.

B: Verlauf der Reinigung, verfolgt über SDS-PAGE (10%) mit anschließender Coomassiefärbung. Auftragsverlauf von links nach rechts: (M) Low Molecular weight marker; (P) Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextrakts; (Ü) Überstand, lösliche Fraktion des Zellextrakts; (DI1+DI2) Durchlauf, nicht mit der Säule interagierendes Protein; (B4-C1) Elutionsfraktionen.

Die gezeigten Elutionsfraktionen B4-C1 sind in A mit einem schwarzen Rechteck markiert. Je Fraktion wurden 4 μ l aufgetragen. Rekombinantes Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis besitzt eine Größe von 24,8 kDa (blauer Stern), läuft aber auf der SDS-PAGE bei ca. 40 kDa.

Die aufgereinigte Menge an Substrat ist mit der Coomassiefärbung kaum detektierbar, weshalb in einem Westernblot mit Antikörper gegen das HA-Epitop der Nachweis durchgeführt wurde (unterer Blot).

2.4.1.3 E1: Ubiquitin-aktivierendes Enzym Uba1 (6xHis-Uba1)

Für einen *Drosophila*-spezifischen Assay wurde das E1-Enzym Dmel/Uba1 aus *Drosophila* aufgereinigt. Dabei handelt es sich um das einzig bekannte Ubiquitin-aktivierende Enzym in *Drosophila melanogaster* (Lee, et al., 2008). Die Überexpression von 6xHis-Uba1 erfolgte über Nacht bei 37 °C in einem Volumen von 2x 1l. Nach Aufschluss der Zellen lag das Protein größtenteils gelöst im Überstand vor und wurde in einer Metallchelate-Affinitätschromatographie über eine 5 ml HisTrap-Säule aufgereinigt (Abb. 2.52). Rekombinantes 6xHis-Uba1 befand sich in deutlich größerem Anteil in der löslichen Fraktion des Zellextrakts (Ü) (Abb. 2.52 B).

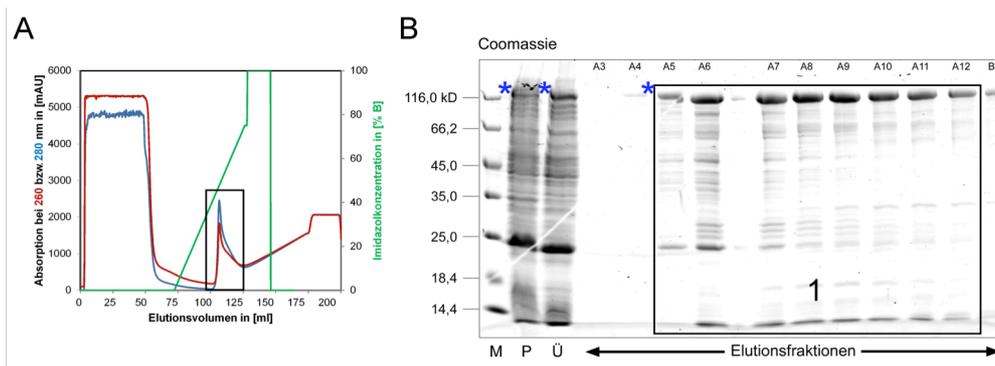


Abbildung 2.52: Reinigung von 6xHis-Uba1 aus *E. coli*

A: Elutionsprofil der HisTrap-Metallchelate-Affinitätschromatographie

Dargestellt ist die Absorptionsmessung bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Mit steigender Imidazol-Konzentration (grün) wird das gebundene Protein von der Säule gewaschen und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Das schwarze Kästchen markiert das eluierende Substrat.

B: Verlauf der Reinigung, verfolgt über SDS-PAGE (10%) mit anschließender Coomassiefärbung

Auftragung von links nach rechts: (M) Low Molecular weight marker; (P) Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextrakts; (Ü) Überstand, lösliche Fraktion des Zellextrakts; (A3-B1) Elutionsfraktionen.

Die gezeigten Elutionsfraktionen A3-B1 sind in A mit einem schwarzen Rechteck markiert. Je Fraktion wurden 4 µl aufgetragen. Rekombinantes 6xHis-Uba1 besitzt eine Größe von 133 kDa (blauer Stern).

Die Elutionsfraktionen zeigen eine relativ große Verunreinigung mit niedermolekularen Proteinen. Daher wurden die Fraktionen A5-A12 (Box 1, schwarz umrahmt) vereinigt und in einer zusätzlichen Gelfiltration kleinere Partikel entfernt.

Die Fraktionen A5-A12 enthielten die größte Menge an aufgereinigtem Protein und wurden vereinigt (1). Da es sich bei 6xHis-Uba1 um ein sehr großes Protein mit 133 kDa handelt und der Großteil der Verunreinigungen im niedermolekularen Bereich des Gels zu finden sind, wurde an die Affinitäts-Chromatographie noch zusätzlich eine Gelfiltrations-Aufreinigung angeschlossen, um 6xHis-Uba1 in gereinigter Form in den Ubiquitylierungsassay einsetzen zu können. Mittels der Gelfiltration werden niedermolekulare Substanzen durch das poröse Säulenmaterial aufgehalten, während größere Moleküle im Ausschlussvolumen des Materials in den ersten Fraktionen eluieren. Die aufgefangenen Fraktionen wurden gesammelt und auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 2.53). Während das Ausschlussvolumen noch kein Protein enthielt (Elutionsfraktion 20), konnten in späteren Fraktionen zwei unterschiedlich große 6xHis-Uba1-Konformationen aufgefangen werden. Vermutlich handelt es sich bei dem 6xHis-Uba1 von Box 2 (Elutionsfraktionen 26-28) um ein dimeres Protein, das schneller durch das Gel wandern konnte als das monomere 6xHis-Uba1 von Box 3, welches erst deutlich später von der Säule gewaschen wurde (Elutionsfraktionen 33-35). Die Fraktionen der beiden Konformationen wurden jeweils vereinigt und getrennt voneinander in flüssigem Stickstoff gelagert.

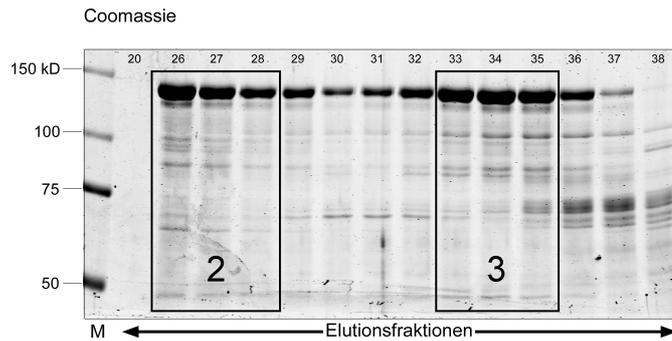


Abbildung 2.53: 2. Reinigungsschritt von 6xHis-Uba1 aus *E. coli*

Verlauf der Gelfiltration, verfolgt über SDS-PAGE (7%) mit anschließender Coomassiefärbung
 Auftragung von links nach rechts: (M) Low Molecular weight marker; (20) Elutionsfraktion vor der Elution von 6xHis-Uba1; (26-36) Elutionsfraktionen von 6xHis-Uba1

Je Fraktion wurden 4 µl aufgetragen. Rekombinantes 6xHis-Uba1 besitzt eine Größe von 133 kDa.

6xHis-Uba1 wurde vermutlich in zwei unterschiedlichen Konformationen eluiert. Das Dimer von 6xHis-Uba1 (Box 2, schwarz umrahmt) in den Elutionsfraktionen 26-28 und das Monomer 6xHis-Uba1 (Box 3, schwarz umrahmt) in den Elutionsfraktionen 33-35. Die eingerahmten Fraktionen wurden jeweils vereinigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.1.4 E2-Enzyme Ubch5b, Vihar und Effete

Für die Übertragung der aktivierten Ubiquitinmoleküle auf die APC/C-Substrate sind die sogenannten E2-Enzyme verantwortlich. In *Saccharomyces cerevisiae* sind zwei E2-Enzyme bekannt, die für eine Polyubiquitin-Kettenbildung sorgen. Ubc4 katalysiert die schnelle Monoubiquitinylierung von multiplen Lysinen der APC/C-Substrate und Ubc1 knüpft weitere Ubiquitinmoleküle über eine Lys48-Verlinkung an das Monoubiquitin. Im humanen System ist Ubch5 bzw. Ubch10 für die Monoubiquitinylierung zuständig und das E2-Enzym Ube2S reguliert die Kettenverlängerung (Barford, 2011). Auch in *Drosophila* sind verschiedene E2-Enzyme für die Mono- bzw. Polyubiquitinylierung zuständig. Dabei regulieren Ube2S und Ubch10/Vihar gemeinsam den Abbau von APC/C-Substraten (Williamson, *et al.*, 2009). Neben diesen beiden konnte noch ein weiteres E2-Enzym Effete in *Drosophila* identifiziert werden, das in Keimbahnzellen für den Abbau von Cyclin A notwendig ist (Chen, *et al.*, 2009).

2.4.1.4.1 Humanes Ubch5b (Ubch5b-6xHis)

Die Überexpression von Ubch5b-6xHis erfolgte über Nacht bei 37 °C in einem Volumen von 2x 1 l. Mit dem in der löslichen Fraktion vorhandenen Protein wurde eine Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt. Abbildung 2.54 zeigt den Verlauf der Reinigung über eine 5 ml HisTrap-Säule. Rekombinantes Ubch5b-6xHis fand sich in deutlich größerem Anteil in der löslichen Fraktion des Zellextrakts (Ü).

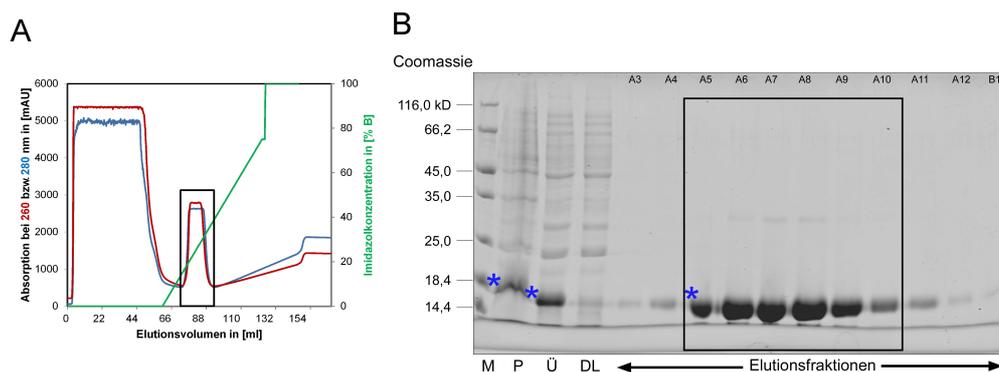


Abbildung 2.54: Reinigung von Ubch5b-6xHis aus *E. coli* BL21(DE3)

A: Elutionsprofil der HisTrap-Metallchelate-Affinitätschromatographie. Dargestellt ist die Absorptionsmessung bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Mit steigender Imidazol-Konzentration (grün) wird das gebundene Protein von der Säule gewaschen und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Das schwarze Kästchen markiert das eluierende Ubch5b-6xHis.

B: Verlauf der Reinigung, verfolgt über SDS-PAGE (14%) mit anschließender Coomassiefärbung. Auftragung von links nach rechts: (M) Low Molecular weight marker; (P) Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextrakts; (Ü) Überstand, lösliche Fraktion des Zellextrakts; (DI) Durchlauf, nicht mit der Säule interagierendes Protein; (A3-B1) Elutionsfraktionen.

Je Fraktion wurden 4 µl aufgetragen. Rekombinantes Ubch5b-6xHis besitzt eine Größe von 16 kDa (blauer Stern). Die Elutionsfraktionen, die vereinigt und eingefroren wurden, sind mit dem schwarzen Rechteck in B markiert.

Mit dem in der löslichen Fraktion vorhandenen Protein wurde eine Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt (Abb. 2.54 A). Fraktionen, die das Protein in reiner Form enthielten (Abb. 2.54 B) wurden vereinigt und mittels Dialyse das Imidazol entfernt. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde das Protein in flüssigen Stickstoff eingetroppt und bei -80 °C gelagert.

Neben dem selbst hergestellten Ubch5b-6xHis wurde in den Ubiquitylierungsassays auch gekauftes Ubch5b (Enzo) ohne Epitop verwendet. Für einen *Drosophila*-spezifischen Assay wurden zusätzlich die E2-Enzyme aus *Drosophila* aufgereinigt.

2.4.1.4.2 *Drosophila* Vihar (Vihar-6xHis)

Die Überexpression von Vihar-6xHis erfolgte über Nacht bei 37 °C in einem Volumen von 2x 1 l. Rekombinantes Vihar-6xHis fand sich in deutlich größerem Anteil in der löslichen Fraktion des Zellextrakts (Ü) und wurde über eine 5 ml HisTrap-Säule in einer Metallchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Abbildung 2.55 zeigt den Verlauf der Reinigung.

Die Fraktionen B5-B8 enthielten die größte Menge an aufgereinigtem Protein und wurden für einen weiteren Reinigungsschritt über die Gelfiltrationssäule vereinigt. Vihar-6xHis ist mit 20,9 kDa ein kleines Protein und zeigte im höher molekularen Bereich des

Gels eine im Vergleich zu UbcH5b-6xHis vergleichsweise starke Verunreinigung mit unspezifischen Proteinen. Um Vihar-6xHis in gereinigter Form in den Ubiquitylierungsassay einsetzen zu können, wurde an die Affinitäts-Chromatographie noch zusätzlich eine Gelfiltrations-Aufreinigung angeschlossen (Abb. 2.56).

Während das Ausschlussvolumen noch kein Protein enthielt (Elutionsfraktionen 22-23), konnten in späteren Fraktionen zwei unterschiedlich große Vihar-6xHis Konformationen gesammelt werden. Vermutlich handelt es sich bei den Elutionsfraktionen 24-30 um ein multimeres Protein, das schneller durch das Gel wandern kann als das monomere Vihar-6xHis, welches erst deutlich später von der Säule gewaschen wird (Elutionsfraktionen 48-55).

Da die Multimerisierung von Vihar-6xHis vermutlich ein Effekt der Überexpression ist und Vihar-6xHis in Zellen keine Dimere bildet, wurden nur die Monomere vereinigt (Elutionsfraktionen 50-52) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

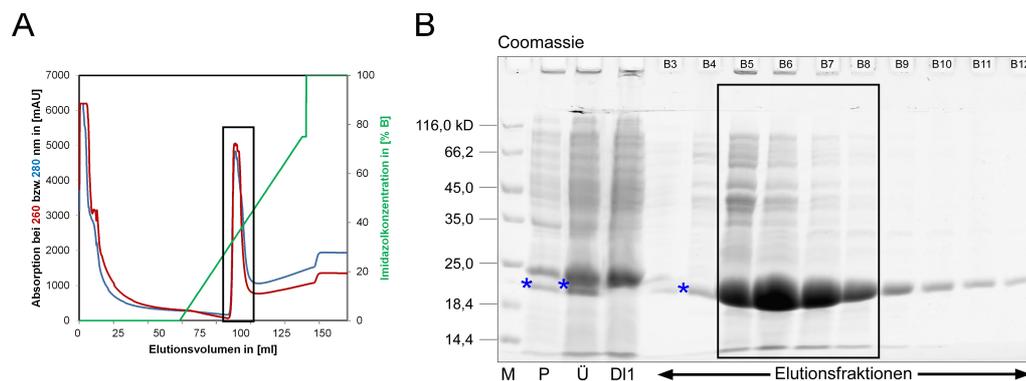


Abbildung 2.55: Reinigung von Vihar-6xHis aus *E. coli* BL21(DE3)

A: Elutionsprofil der HisTrap-Metallchelate-Affinitätschromatographie

Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Mit steigender Imidazol-Konzentration (grün) wird das gebundene Protein von der Säule gewaschen und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Das schwarze Kästchen markiert das eluierende Vihar-6xHis.

B: Verlauf der Reinigung, verfolgt über SDS-PAGE (14%) mit anschließender Coomassiefärbung. Auftragung von links nach rechts: (M) Low Molecular weight marker; (P) Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextrakts; (Ü) Überstand, lösliche Fraktion des Zellextrakts; (DI1) Durchlauf, nicht mit der Säule interagierendes Protein; (B3-B12) Elutionsfraktionen.

Je Fraktion wurden 4 µl aufgetragen. Rekombinantes Vihar-6xHis besitzt eine Größe von 20,9 kDa (blauer Stern). Die Elutionsfraktionen (B5-B8, markiert mit schwarzem Rechteck) wurden vereinigt und in einer angeschlossenen Gelfiltration weiter aufgereinigt.

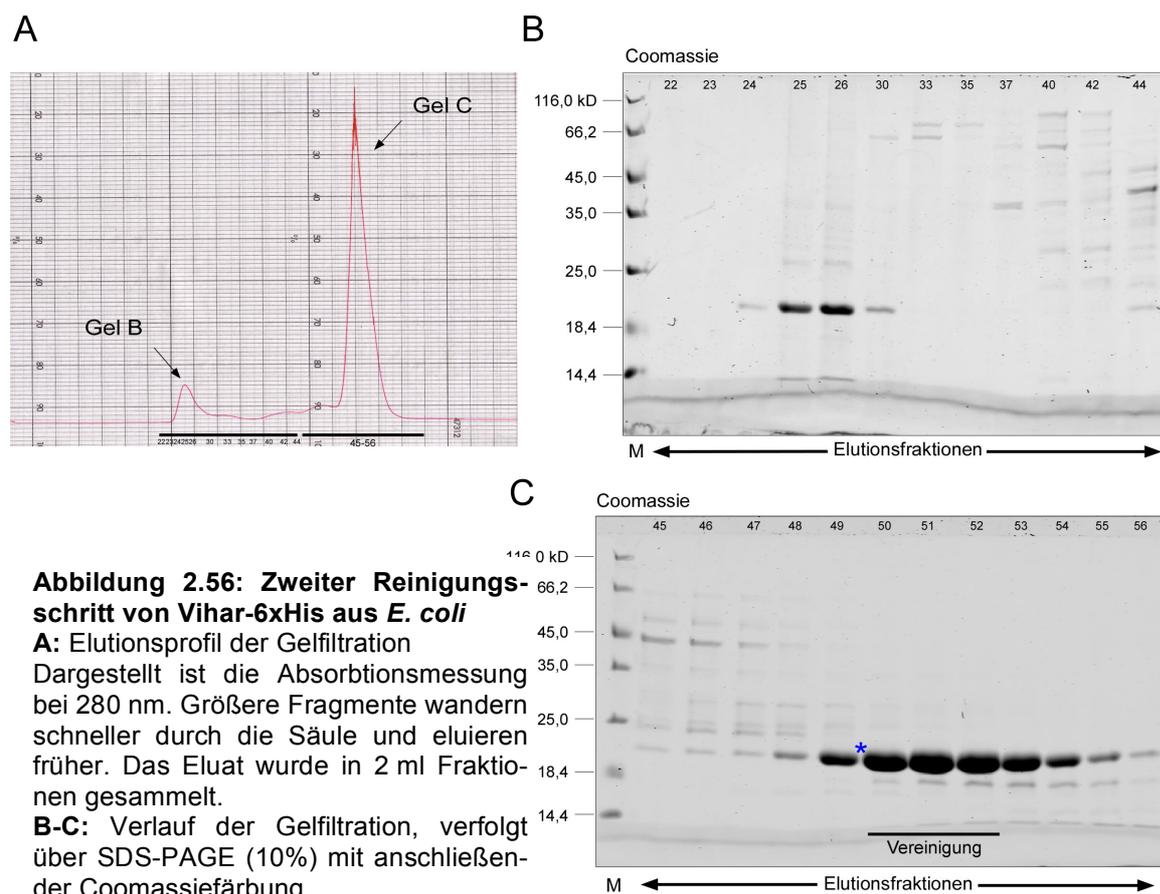


Abbildung 2.56: Zweiter Reinigungsschritt von Vihar-6xHis aus *E. coli*

A: Elutionsprofil der Gelfiltration

Dargestellt ist die Absorbationsmessung bei 280 nm. Größere Fragmente wandern schneller durch die Säule und eluieren früher. Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt.

B-C: Verlauf der Gelfiltration, verfolgt über SDS-PAGE (10%) mit anschließender Coomassiefärbung

Auftragung von links nach rechts: (M) Low Molecular weight marker; (22-23) Elutions-fraktion vor der Elution von Vihar-6xHis; (24-30) Elutionsfraktionen von multimerem Vihar-6xHis; (48-55) Elutionsfraktionen von monomerem Vihar-6xHis. Je Fraktion wurden 4 µl aufgetragen. Rekombinantes Vihar-6xHis besitzt eine Größe von 20,9 kDa. Die Fraktionen 50-52 wurden vereinigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.1.4.3 *Drosophila* Effete (Effete-6xHis)

Eine Testexpression von Effete-6xHis bei verschiedenen Temperaturen ergab keinen Unterschied in der Löslichkeit, weshalb die Überexpression über Nacht bei 37 °C in einem Volumen von 2x 1 l erfolgte. Rekombinantes Effete-6xHis fand sich zu gleichen Teilen im Zellpellet (P) und in der löslichen Fraktion des Zellextrakts (Ü). Mit dem Überstand wurde eine Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt. Abbildung 2.57 A zeigt den Verlauf der Reinigung über eine 5 ml HisTrap-Säule.

Die Elutionsfraktionen A8-A12, die das Protein in reiner Form enthielten (Abb. 2.57 B), wurden vereinigt, dialysiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Um einen ersten Anhaltspunkt zu bekommen, ob es sich bei den aufgereinigten Proteinen um aktive Enzyme handelt, wurde ein Ubiquitin-E2-Aktivitätsassay durchgeführt.

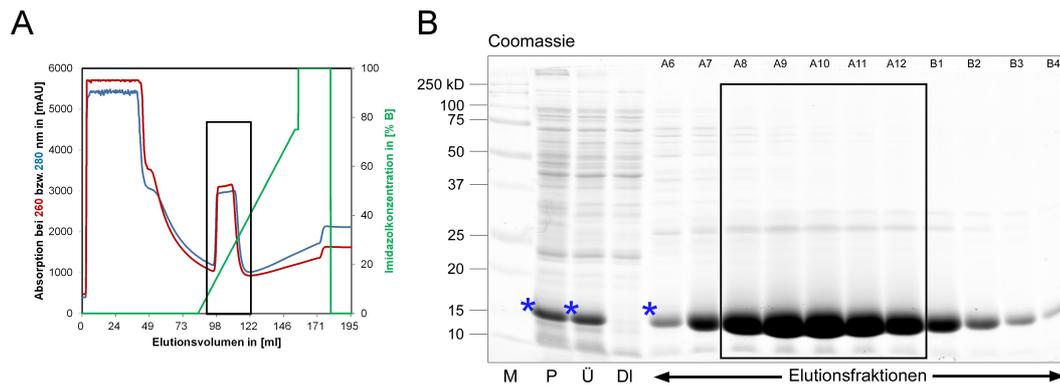


Abbildung 2.57: Reinigung von Effete-6xHis aus *E. coli* BL21(DE3)

A: Elutionsprofil der HisTrap-Metallchelate-Affinitätschromatographie

Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Mit steigender Imidazol-Konzentration (grün) wird das gebundene Protein von der Säule gewaschen und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Das schwarze Kästchen markiert das eluierende Effete-6xHis.

B: Verlauf der Reinigung, verfolgt über SDS-PAGE (14%) mit anschließender Coomassiefärbung. Auftragung von links nach rechts: (M) Low Molecular weight marker; (P) Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextrakts; (Ü) Überstand, lösliche Fraktion des Zellextrakts; (DI) Durchlauf, nicht mit der Säule interagierendes Protein; (A6-B4) Elutionsfraktionen.

Je Fraktion wurden 4 µl aufgetragen. Rekombinantes Effete-6xHis besitzt eine Größe von 17,7 kDa (blauer Stern). Die Elutionsfraktionen im schwarzen Rechteck wurden vereinigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.1.5 Ubiquitin-E2-Aktivitätsassay

In diesem Assay wird überprüft, ob das E1-Enzym FLAG-Ubiquitin aktivieren kann und in der Lage ist, es auf das E2-Enzym zu übertragen. Durch Zugabe von DTT werden die geknüpften Thioesterbindungen zwischen FLAG-Ubiquitin und E1 bzw. E2 wieder aufgebrochen, so dass ein Signalverlust auf dem Westernblot einen spezifischen Binde-nachweis zwischen FLAG-Ubiquitin und E1- bzw. E2-Enzym darstellt (4.6.3).

In einem ersten Experiment wurden die aufgereinigten *Drosophila*-spezifischen Proteine 6xHis-Uba1 aus der Affinitätschromatographie-Aufreinigung (Abb. 2.52, Vereinigung 1) und Effete-6xHis eingesetzt und überprüft, ob die beiden Enzyme eine Thioesterbindung mit FLAG-Ubiquitin knüpfen können (Abb. 2.58). Eine gebildete Thioesterbindung konnte in einer Westernblot-Analyse mit FLAG-Antikörper festgestellt werden, da erst durch die Verknüpfung mit FLAG-Ubiquitin eine Bande auf Höhe des E1- bzw. E2-Enzyms sichtbar wird. In einer Positivkontrolle wurde neben FLAG-Ubiquitin (Bio-mol) auch das humane 6xHis-E1-Enzym (Enzo) und E2-Enzym UbcH5b (Enzo) eingesetzt. Auf dem FLAG-Blot kann sowohl auf Höhe von UbcH5b, als auch auf Höhe des E1-Enzyms eine Bande gesehen werden (1). Die Behandlung mit DTT führte zur Reduktion dieser Verbindung (7), weshalb von einer spezifischen Thioesterbindung ausgegangen werden kann. Wird anstelle des humanen E1-Enzyms das aufgereinigte 6xHis-Uba1

verwendet, kann keine Bande detektiert werden (3) und kein Unterschied zur Negativkontrolle mit Wasser ist erkennbar (2). Wird das E2-Enzym Ubch5 durch das aufgereinigte Effete-6xHis ersetzt, ist mit dem humanen E1-Enzym eine Aktivität feststellbar, jedoch nicht mit 6xHis-Uba1 (4-6). Die Reduktion der Thioesterbindung ist bei Effete-6xHis effektiver als bei Ubch5b (8), allerdings kann keine Angabe zur eingesetzten Menge an Effete-6xHis gemacht werden. Ubch5b besitzt kein His-Epitop, weshalb im His-Blot keine spezifische Bande auf Höhe des E2-Enzyms sichtbar ist. Dies steht im Gegensatz zu 6xHis-Uba1, bei dem entweder eine zu geringe Menge unterhalb der Detektionsgrenze oder gar kein Protein eingesetzt wurde.

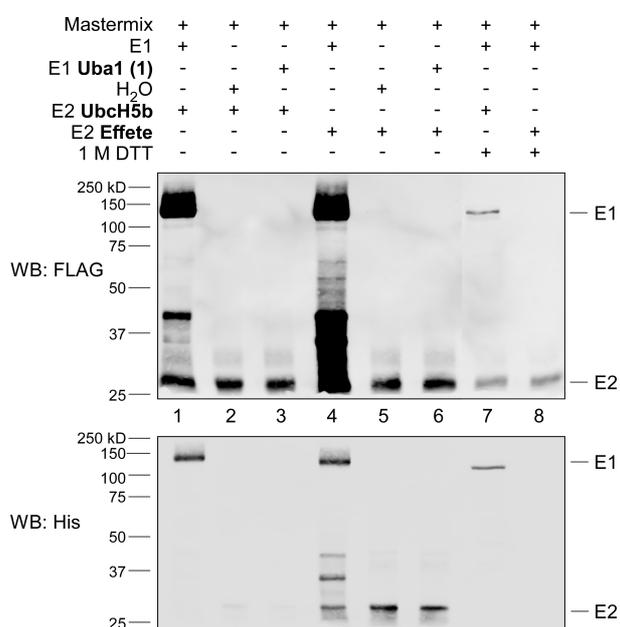


Abbildung 2.58: Ubiquitin-E2-Aktivitätstest zur Überprüfung von Effete und Uba1

Die Bindung von FLAG-Ubiquitin an das E1-Enzym bzw. die Übertragung des FLAG-Ubiquitin an das E2-Enzym wurde im Westernblot mit einem FLAG-Antikörper sichtbar gemacht (oberes Gel). Der Westernblot mit His-Antikörper (unteres Gel) diente dem Nachweis der E1- bzw. E2-Enzyme, die einen 6xHisTag besitzen.

(Spur 1-3): Nachweis von gekauftem Ubch5b nur über FLAG-Blot durch die Bindung von FLAG-Ubiquitin möglich. (1) Das humane E1-Enzym bindet FLAG-Ubiquitin und überträgt es auf Ubch5b; (3) 6xHis-Uba1 ist nicht nachweisbar und kann auch kein FLAG-Ubiquitin auf Ubch5b übertragen.

(Spur 4-6): Nachweis von Effete-6xHis im His-Blot und im FLAG-Blot durch die Bindung von FLAG-Ubiquitin. (4) Das humane E1-Enzym überträgt FLAG-Ubiquitin auf Effete-6xHis. Kein Nachweis von 6xHis-Uba1 im Westernblot (6).

(Spur 7 und 8): Die Inkubation der Proben mit 1M DTT führt zur Reduktion der Thioesterbindungen zwischen E1-Enzym bzw. E2-Enzym und FLAG-Ubiquitin.

(Spur 2 und 5): Negativkontrollen von Ubch5b (2) und Effete-6xHis (5) ohne E1-Enzym

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz: 6,5 µg FLAG-Ubiquitin (2 µl), Thioesterpuffer (2 µl), H₂O (13,5 µl); hinzugegeben wurde humanes E1 oder 6xHis-Uba1 (1,5 µl) und Ubch5b oder Effete-6xHis (1 µl).

Es wurden jeweils 15 µl auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Zusammenfassend erwies sich Effete-6xHis als ein aktives E2-Enzym, 6xHis-Uba1 hingegen war weder nachweisbar, noch konnte es FLAG-Ubiquitin auf Effete-6xHis übertragen. Die Affinitätschromatographie-Aufreinigung von 6xHis-Uba1 (Box 1, Abb. 2.52) zeigte einen recht hohen Verunreinigungsgrad mit unspezifischen Proteinen, weshalb in einer angeschlossenen Gelfiltration eine weitere Aufreinigung durchgeführt wurde. In dieser Aufreinigung eluierten vermutlich zwei verschiedene 6xHis-Uba1 Konformere, zuerst das Dimer (Box 2; Abb. 2.53) und in späteren Fraktionen das Monomer von 6xHis-Uba1 (Box 3; Abb. 2.53). Diese Konformere wurden in den Ubiquitin-Aktivitätstest eingesetzt und überprüft, ob eine zusätzliche Aufreinigung zu einem aktiven E1-Enzym führt (Abb. 2.59).

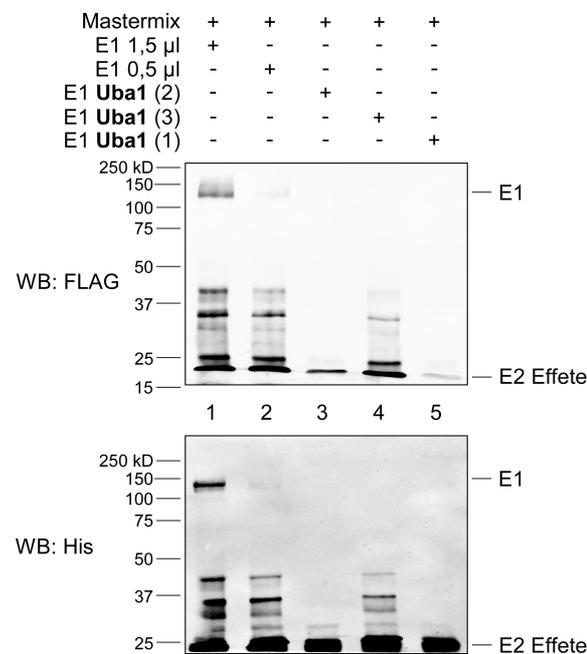


Abbildung 2.59: Die verschiedenen Uba1 Aufreinigungen im Ubiquitin-E2-Aktivitätstest

Die Bindung von FLAG-Ubiquitin an das E1-Enzym 6xHis-Uba1 bzw. die Übertragung des FLAG-Ubiquitin an das E2-Enzym Effete-6xHis wurde im Westernblot mit einem FLAG-Antikörper sichtbar gemacht (oberes Gel). Der Westernblot mit His-Antikörper (unteres Gel) dient dem Nachweis des humanen E1 bzw. dem *Drosophila* E1-Enzym 6xHis-Uba1 und dem E2-Enzym Effete-6xHis.

(Spur 1-2): Positivkontrollen der Reaktion mit dem humanen E1-Enzym und Effete-6xHis mit zwei verschiedenen Mengen an E1-Enzym

(Spur 3-5): Verwendung der verschiedenen 6xHis-Uba1-Aufreinigungen: (3) frühe Elutionsfraktionen von 6xHis-Uba1 nach der Gelfiltration (Box 2, Abb. 2.53); (4) spätere Elutionsfraktionen von 6xHis-Uba1 nach der Gelfiltration (Box 3, Abb. 2.53); (5) 6xHis-Uba1 nach Affinitätschromatographie (Box 1, Abb. 2.52)

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz: 6,5 µg FLAG-Ubiquitin (2 µl), Thioesterpuffer (2 µl), Effete-6xHis (1 µl), H₂O (13,5 µl); hinzugegeben wurde humanes E1 (1,5 µl oder 0,5 µl + 1 µl H₂O) bzw. 6xHis-Uba1 (1,5 µl). Es wurden jeweils 15 µl auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Dabei stellte sich heraus, dass das spät eluierende 6xHis-Uba1 aus der Gelfiltration Aktivität besitzt und Effete-6xHis mit FLAG-Ubiquitin beladen kann (4), während 6xHis-Uba1 aus der Affinitätschromatographie (5), sowie die frühe Elution in der Gelfiltration (3), zu keiner Beladung von Effete-6xHis in der Lage war. Aus der Kontrollreaktion mit zwei verschiedenen Konzentrationen an humanem E1-Enzym (1-2) lässt sich mutmaßen, dass eine geringe, im Westernblot nicht detektierbare Menge an 6xHis-Uba1 ausreichen könnte, um Effete-6xHis mit FLAG-Ubiquitin zu beladen. Um 6xHis-Uba1 im Westernblot sichtbar zu machen, wurde die aktive Fraktion von 6xHis-Uba1 10x aufkonzentriert und in einem weiteren Aktivitätstest eingesetzt (Abb. 2.60).

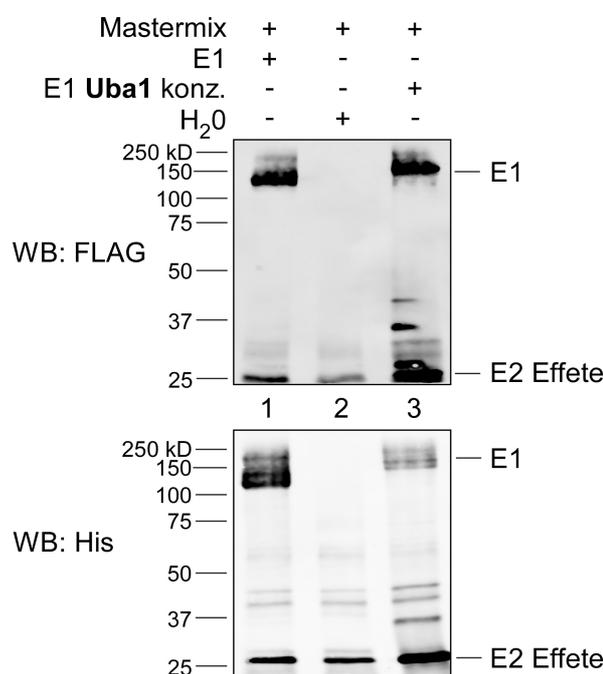


Abbildung 2.60: Aufkonzentriertes Uba1 im Ubiquitin-E2-Aktivitätstest

Vergleich der Bindung von FLAG-Ubiquitin an das humane E1-Enzym und an das *Drosophila*-spezifische 6xHis-Uba1. Die Übertragung des FLAG-Ubiquitin an das E2-Enzym Effete-6xHis wurde im Westernblot mit einem FLAG-Antikörper sichtbar gemacht (oberes Gel). Der Westernblot mit His-Antikörper (unteres Gel) dient dem Nachweis des humanen E1- bzw. des *Drosophila* E1-Enzyms 6xHis-Uba1 und des E2-Enzyms Effete-6xHis.

(Spur 1): Positivkontrolle der Reaktion mit dem humanen E1-Enzym und Effete-6xHis

(Spur 2): Negativkontrolle mit H₂O anstelle eines E1-Enzyms

(Spur 3): Verwendung des 10x aufkonzentrierten 6xHis-Uba1 aus der Gelfiltration (Box 3, Abb. 2.53)

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz: 6,5 µg FLAG-Ubiquitin (2 µl), Thioesterpuffer (2 µl), Effete-6xHis (1 µl), H₂O (13,5 µl); hinzugegeben wurde 0,5 µg humanes E1 (1,5 µl) bzw. 10x aufkonzentriertes 6xHis-Uba1 (1,5 µl). Es wurden jeweils 15 µl auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Durch die Aufkonzentrierung konnte 6xHis-Uba1 sowohl im FLAG-Blot als auch im His-Blot detektiert werden. Das FLAG-Ubiquitin kann an 6xHis-Uba1 binden und an Effete-6xHis weitergegeben werden (3), so wie es auch beim humanen E1 der Fall ist (1). Anhand der Negativkontrolle mit Wasser können die beiden Signale eindeutig den beiden E1-Enzymen zugeordnet werden (2). Dabei scheint die Beladung von Effete-6xHis auch ohne E1-Enzym zu funktionieren, wird aber durch das E1-Enzym beschleunigt.

Somit konnte in diesen Aktivitätstests nachgewiesen werden, dass neben den gekauften humanen Komponenten E1-Enzym, E2-UbcH5b und FLAG-Ubiquitin auch die aufgereinigten Komponenten des Ubiquitylierungsweges Effete-6xHis sowie 6xHis-Uba1 aktiv sind.

In einem weiteren Schritt galt es nun ein *Drosophila*-spezifisches Ubiquitylierungssystem zu etablieren, in dem die humanen Komponenten Stück für Stück durch die *Drosophila*-spezifischen Komponenten ersetzt wurden.

2.4.1.6 E3-Ligasen-Aktivität im Retikulozytenlysate

In einer vorhergehenden Arbeit wurde Retikulozytenlysate verwendet, um ein APC/C-Substrat zu translatieren. Durch Zugabe von Komponenten des Ubiquitylierungsweges konnte anschließend im Milieu des Retikulozytenlysates eine Ubiquitylierung des APC/C-Substrates erreicht werden (Höfer, 2011). Allerdings war die gesehene Ubiquitylierung nicht auf den APC/C-Komplex zurückzuführen. Vermutlich handelte es sich um eine Ubiquitylierungsreaktion durch verschiedene E3-Ligasen, da Retikulozytenlysate ubiquitylierende Enzyme enthalten (Hershko, 1988).

Für die Etablierung eines *Drosophila*-spezifischen Ubiquitylierungsassays wurden die gekauften Komponenten stufenweise durch die hergestellten und aktiven Komponenten aus *Drosophila* ausgetauscht. Für einen ersten *in vitro*-Ubiquitylierungsassay wurde im Retikulozytenlysate das um die Cdt1-Bindestelle verkürzte und somit Zellzyklus inaktive APC/C-Substrat Geminin_Del-102-192-10xHA *in vitro* translatiert. Das E1-Enzym war bereits im Retik-Lysate enthalten, die restlichen Komponenten (humanes E2-UbcH5, humanes Ubiquitin und ATP) wurden beigefügt und der Gesamtansatz für 60 Minuten bei 30 °C inkubiert. In dieser Zeit fand die Ubiquitylierung statt, bis die Reaktion durch Zugabe von 4xLSB-Puffer gestoppt wurde. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben aufgeköcht, zur Analyse auf ein SDS-Gel aufgetragen, aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis erfolgte mithilfe der Westernblotanalyse über HA-Antikörper.

Auf dem Westernblot in Abbildung 2.61 sind insgesamt drei Spuren zu erkennen. Als Translationskontrolle wurde Retik-Lysat mit dem *in vitro* translatierten (IVT) Geminin_Del-102-192-10xHA aufgetragen. Dabei ist keine Ubiquitinylierung zu erkennen (1). In den beiden verbleibenden Ansätzen wurde der Mastermix mit allen notwendigen Ubiquitinylierungskomponenten zugesetzt und die Reaktion bei der Nullkontrolle sofort mit 4xLSB gestoppt (2). Bei dem dritten Ansatz wurde die Reaktion erst nach einer 60-minütigen Inkubationszeit beendet (3). In diesen 60 Minuten wird das Substrat ubiquitinyliert, wodurch es zu einer deutlichen Zunahme an Polyubiquitinylierungsbanden kommt. Gleichzeitig nimmt die Menge an eingesetztem Geminin_Del-102-192-10xHA ab (3).

Dieses Experiment zeigt, dass im Milieu des Retikulozytenlysats eine Ubiquitinylierung des *in vitro* translatierten *Drosophila*-spezifischen Geminin_Del-102-192-10xHA möglich ist. Allerdings wurden in diesem Versuch noch auf humane Komponenten der Ubiquitinylierung zurückgegriffen.

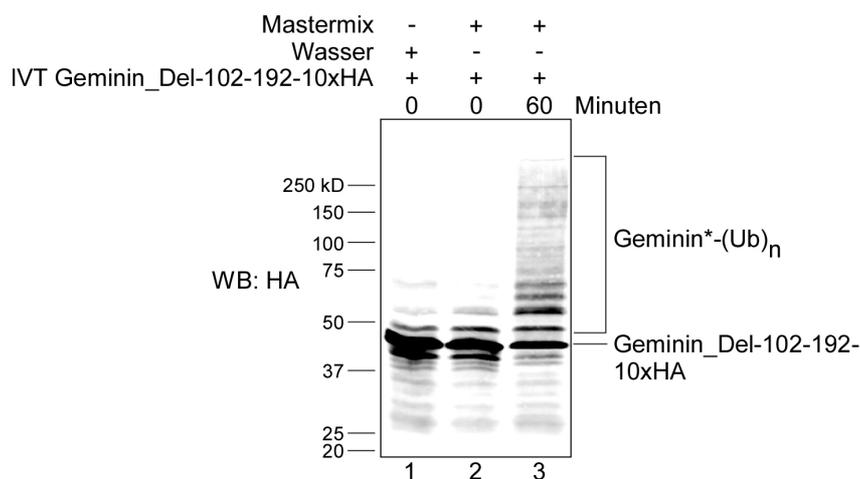


Abbildung 2.61: Aktivität im Retikulozytenlysats – Ubiquitinylierung von IVT Geminin

Geminin_Del-102-192-10xHA wurde im Retikulozytenlysats translatiert und in 8 μ l Portionen auf drei PCR-Cups verteilt. (1) wurde mit 1,75 μ l H₂O versetzt, (2) mit 1,75 μ l Mastermix versetzt und bei beiden 8 μ l 4xLSB zugegeben. (3) wurde mit 1,75 μ l Mastermix versetzt und für 60 Minuten auf 30 °C inkubiert. Erst danach wurde 8 μ l 4xLSB zugegeben. Die drei Proben wurden aufgekocht und 8 μ l auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Die Ubiquitinylierung des Substrates Geminin_Del-102-192-10xHA wurde im Westernblot mit einem HA-Antikörper sichtbar gemacht. In der Negativkontrolle ohne Ubiquitinylierungskomponenten (1) und in der Nullkontrolle mit allen Komponenten zum Zeitpunkt t=0 min (2), sind keine Polyubiquitinylierungsbanden zu erkennen. Erst nach 60 Minuten hat die Substratmenge abgenommen und Polyubiquitinylierungsbanden sind entstanden (3).

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz: 55,5 mM UbcH5b (1,35 μ l), 100 mM ATP (0,3 μ l), Ubiquitin (0,1 μ l). Nicht enthalten war ein E1-Enzym. Es wurden jeweils 8 μ l auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.4.2 Test der einzelnen Komponenten auf Aktivität im Retikulozytenlysat

Für eine Untersuchung der einzelnen Komponenten des *Drosophila*-spezifischen Ubiquitylierungsassays ist das Retikulozytenlysat gut geeignet. Es enthält bereits viele notwendige Komponenten und stellt ein ideales Milieu bereit. Aber mit den unspezifischen E3-Ligasen im Retikulozytenlysat lässt sich keine Aussage treffen, ob das zu untersuchende Substrat wirklich vom APC/C ubiquityliert worden ist.

2.4.2.1 Substrat Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis (*E. coli*)

Um langfristig nicht mehr von der Translation im Retikulozytenlysat abhängig zu sein, soll das *E. coli* aufgereinigte Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis als Substrat Verwendung finden. Ein direkter Vergleich mit dem *in vitro* translatierten Geminin_Del-102-192-10xHA sollte Aufschluss darüber geben, ob rekombinantes, in *E. coli* hergestelltes Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis (Geminin*) als Substrat ubiquityliert werden kann.

In Abbildung 2.62 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Ubiquitylierung des IVT Geminin_Del-102-192-10xHA ist auf dem Westernblot nicht zu erkennen (1-4), während das aufgereinigte *E. coli* Geminin* im Vergleich zur Nullkontrolle nach t=0 Minuten (5) eine starke Ubiquitylierung aufweist (6). Die Verwendung von FLAG-Ubiquitin ermöglicht es zusätzlich, in einem Westernblot mit FLAG-Antikörper die unspezifische Ubiquitylierung von Proteinen durch E3-Ligasen sichtbar zu machen. Damit stellt es eine gute Kontrolle dar, um eine Aktivität im Retikulozytenlysat nachzuweisen. Wurde anstelle eines unmarkierten Ubiquitins ein FLAG-Ubiquitin in die Reaktion eingesetzt, ist eine etwas stärkere Polyubiquitylierung im hochmolekularen Bereich des Westernblots zu erkennen (7). Die Polyubiquitylierung nimmt bei einer Mischung aus Ubiquitin und FLAG-Ubiquitin sogar noch weiter zu (8). Im Hinblick auf die Ubiquitylierung von *in vitro* translatiertem Geminin_Del-102-192-10xHA ist das eingesetzte Retikulozytenlysat ähnlich aktiv wie bei Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis (3, 4 und 7, 8). Eine Ubiquitylierung des Substrates konnte aber auch bei höherer Laserintensität im HA-Blot nicht nachgewiesen werden (Blot nicht gezeigt).

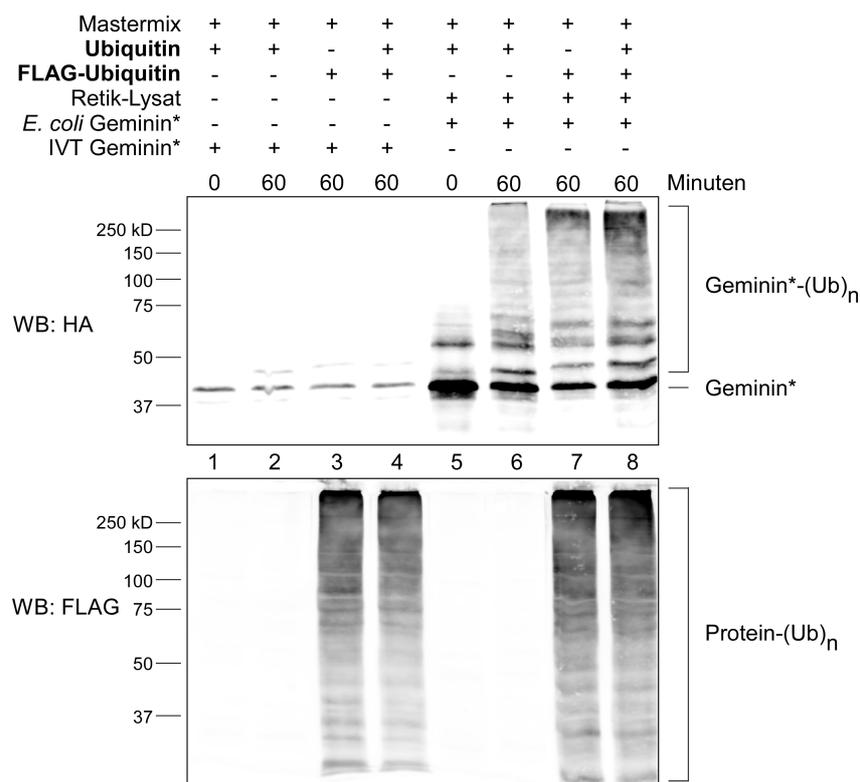


Abbildung 2.62: Vergleich des aufgereinigten Geminin aus *E. coli* mit IVT Geminin

Die spezifische Ubiquitinylierung des Substrates Geminin_Del-102-192-10xHA wurde im Westernblot mit einem HA-Antikörper sichtbar gemacht (oberer Blot). Die unspezifische Ubiquitinylierung von Proteinen durch E3-Ligasen im Retikulozytenlysat kann durch die Zugabe von FLAG-Ubiquitin im Westernblot mit einem FLAG-Antikörper detektiert werden (unterer Blot).

(Spur 1-4) Ubiquitinylierung von IVT Geminin_Del-102-192-10xHA:

(1) Nullkontrolle; (2-4) Ubiquitinylierungsreaktionen nach 60 Minuten mit verschiedenen Ubiquitin-zusammensetzungen

(Spur 5-8) Ubiquitinylierung des aus *E. coli* aufgereinigten Geminin*:

(5) Nullkontrolle; (6-8) Ubiquitinylierungsreaktionen nach 60 Minuten mit verschiedenen Ubiquitin-zusammensetzungen

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz:

55,5 mM UbcH5b (1 μ l), 100 mM ATP (0,3 μ l), Uba1 (0,5 μ l),

Ubiquitin (0,2 μ l + 1,8 μ l H₂O); FLAG-Ubiquitin (2 μ l); FLAG-Ubiquitin/Ubiquitin (1 μ l + 0,1 μ l + 0,9 μ l H₂O)

(1-4): Vom IVT Geminin_Del-102-192-10xHA wurde 8 μ l eingesetzt,

(5-8): Vom *E. coli* Geminin* wurde 1 μ l + 7 μ l Retik-Lysat eingesetzt.

Reaktionen wurden mit 10 μ l 4xLSB gestoppt, aufgeköcht und jeweils 6 μ l auf zwei 10% SDS-Gele aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Geminin*: Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis

Insgesamt hat das Experiment gezeigt, dass auch in *E. coli* hergestelltes Geminin* für einen *in vitro*-Ubiquitinylierungsassay geeignet ist. Für die Reaktion kann neben Ubiquitin auch FLAG-Ubiquitin verwendet werden, wodurch die unspezifische Aktivität von E3-Ligasen im Retikulozytenlysat überprüft werden kann.

2.4.2.2 E2-Enzyme

Im Ubiquitin-Aktivitätstest konnte bereits die Fähigkeit von Uba1 gezeigt werden, ein FLAG-Ubiquitin zu aktivieren und es auf ein E2-Enzym zu übertragen (Abb. 2.60). Als E2-Enzyme kamen bei diesem Test neben dem humanen UbcH5b (Enzo) auch das *Drosophila* Effete-6xHis zur Anwendung. Beide waren in der Lage, FLAG-Ubiquitin zu binden.

Ob und mit welcher Effizienz die E2-Enzyme UbcH5b-6xHis, Effete-6xHis und Vihar-6xHis das Ubiquitin mithilfe der E3-Ligase an das Substrat Geminin* übertragen können, sollte in diesem Assay beantwortet werden. Die E2-Enzyme sowie 6xHis-Uba1 wurden in die entsprechenden PCR-Cups vorgelegt und die Reaktion mit Zugabe des Mastermixes gestartet. Am schnellsten arbeitete das gekaufte UbcH5b (Abb. 2.63). Nach 60 Minuten konnten nur noch 16% der Ausgangsmenge des Substrats *Geminin nachgewiesen werden und hochmolekulare Banden zeigten eine Polyubiquitylierung an (4). Nach 180 Minuten waren nur noch 5% des Substrats detektierbar und der Rest polyubiquityliert bzw. bereits über das Proteasom abgebaut (5). Im Vergleich dazu setzte das aus *E. coli* aufgereinigte UbcH5b-6xHis Geminin* langsamer um (2 und 3).

Wird zusätzlich noch 6xHis-Uba1 hinzugefügt, läuft die Reaktion mit UbcH5b-6xHis nicht schneller ab (vgl. 2 zu 6). Das Retikulozytenlysate enthält vermutlich bereits ausreichende Mengen an E1-Enzym. Die Daten deuten sogar an, dass die Reaktion durch den Überschuss an E1-Enzym etwas gehemmt sein könnte. Werden anstatt UbcH5b-6xHis die beiden *Drosophila* E2-Enzyme Effete-6xHis und Vihar-6xHis eingesetzt, zeigt sich bei Effete-6xHis eine ähnliche Ubiquitylierungsreaktion wie zuvor bei UbcH5b-6xHis (6 und 7). Vihar-6xHis hingegen besitzt nur eine geringe Aktivität (8), weshalb an dieser Stelle beschlossen wurde, mit Effete-6xHis weiter zu arbeiten. Nichtsdestotrotz sollte noch ein Ubiquitin-Aktivitätstest mit Vihar-6xHis durchgeführt werden, um dessen Fähigkeit zu überprüfen, ein FLAG-Ubiquitin von 6xHis-Uba1 zu empfangen.

In den Ubiquitin-Aktivitätstests und in den Ubiquitylierungsassays konnte gezeigt werden, dass die in *E. coli* aufgereinigten *Drosophila*-spezifischen Komponenten 6xHis-Uba1, Effete-6xHis und Geminin* funktional sind und anstelle der humanen Komponenten E1 und UbcH5b in einem Ubiquitylierungsassay eingesetzt werden können. Keine Aktivität konnte hingegen bei Vihar-6xHis nachgewiesen werden und auch das aufgereinigte Ubiquitin zeigte in diesen Assays keine Aktivität (Daten nicht gezeigt).

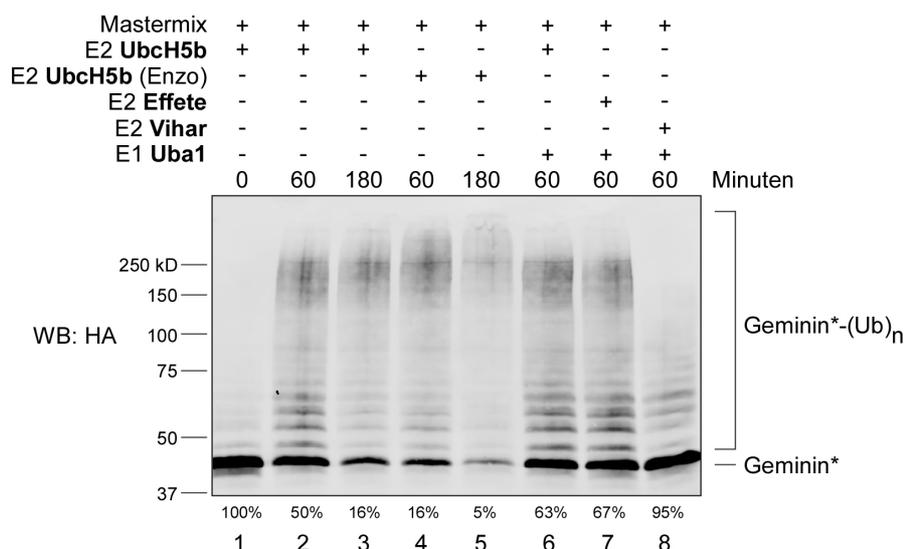


Abbildung 2.63: Vergleich der *Drosophila* E2-Enzyme Effete und Vihar mit humanem UbcH5b

Die spezifische Ubiquitylierung des Substrates Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis wurde im Westernblot mit einem HA-Antikörper sichtbar gemacht. Die Prozentangaben unterhalb des Blots geben die verbliebene Menge an Substrat nach erfolgter Reaktion an. Die Ausgangsmenge entsprach dabei den 100% der Nullkontrolle zum Zeitpunkt t=0 (1).

(2-3) Ubiquitylierungsreaktionen nach 60 Minuten (2) bzw. 180 Minuten mit aufgereinigtem UbcH5b-6xHis aus *E. coli*

(4-5) Ubiquitylierungsreaktionen nach 60 Minuten (4) bzw. 180 Minuten mit gekauftem UbcH5b (Enzo)

(6-8): Ubiquitylierungsreaktionen mit unterschiedlichen E2-Enzymen unter Zugabe von zusätzlichem 6xHis-Uba1: (6) Ubiquitylierung mit UbcH5b-6xHis; (7) Ubiquitylierung mit Effete-6xHis; (8) Ubiquitylierung mit Vihar-6xHis zum Zeitpunkt t=60 min

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz:

Geminin* (2 µl), Ubiquitin (0,15 µl), 100 mM ATP (0,3 µl), Retik-Lysat (8 µl).

(1-8): E2-Enzyme gemäß Angabe (1 µl); (6-8): 6xHis-Uba1 (0,5 µl)

Reaktionen wurden mit 10 µl 4xLSB gestoppt, aufgeköcht und jeweils 10 µl auf ein 8%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Geminin*: Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis

2.4.3 Ubiquitylierungsassays

2.4.3.1 Inaktivierung des Retikulozytenlysats durch NEM

Retikulozytenlysate werden häufig für die Translation von Proteinen verwendet. In dieser Arbeit wurde bereits Geminin_Del-102-192-10xHA *in vitro* hergestellt, letztendlich aber durch aus *E. coli* aufgereinigtes Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis ersetzt. Eine bakterielle Aufreinigung ist aber nicht in allen Fällen möglich. Der APC/C-Aktivator Fzr benötigt zum Beispiel für eine richtige Faltung CCT-Chaperone (Bandura, *et al.*, 2013). Dieser Reifungsprozess ist nur im eukaryotischen Zellsystem möglich, weshalb Fzr nicht in *E. coli* hergestellt werden kann. Um den störenden Einfluss der unspezifischen E3-Ubiquitin-Ligasen im Retikulozytenlysate zu beseitigen, wurde deshalb in einem ersten

Experiment das Retik-Lysat durch Zugabe von 10 mM N-Ethylmaleinimid (NEM) behandelt (Enquist-Newman, *et al.*, 2008). NEM geht eine chemische Reaktion mit Cysteinen ein, wodurch aktive S-H-Bindungen reduziert und somit inaktiviert werden. Durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) soll der Überschuss an NEM beseitigt werden, so dass der APC/C-Komplex durch Zugabe von 6xHis-Uba1 und einem entsprechenden E2-Enzym wieder aktiviert werden kann, andere Ubiquitin-Ligasen jedoch weiterhin inaktiviert bleiben.

Ob NEM in der Lage ist, die E3-Ligasen im Retikulozytenlysate vollständig zu inaktivieren, zeigt Abbildung 2.64. Ein Teil des Retik-Lysates wurde mit NEM und DTT vorbehandelt und mit aktivem sowie inaktiviertem Retikulozytenlysate ein Ubiquitylierungsassay mit allen notwendigen Komponenten im Mastermix angesetzt. Um die Aktivität der E3-Ligasen detektieren zu können, wurde ein 1:1 Gemisch von Ubiquitin/FLAG-Ubiquitin verwendet. Bei beiden Ansätzen zeigte die Nullkontrolle im FLAG-Blot keine Polyubiquitylierungsbanden (1 und 3). Die Behandlung mit NEM und DTT führte zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung der E3-Ligasen, da vor allem auf dem FLAG-Blot nur noch eine schwache Polyubiquitylierung zu sehen ist (4).

Das unbehandelte Retikulozytenlysate hingegen zeigt als Positivkontrolle in der Reaktion deutliche Polyubiquitylierungsbanden im hochmolekularen Bereich an, die sowohl im FLAG-Blot für unspezifische Proteine als auch für das APC/C-Substrat Geminin* gut zu erkennen sind (2).

Durch eine zusätzliche Zugabe von 6xHis-Uba1 und dem im Mastermix vorhandenen humanen Ubch5b sollte der APC/C-Komplex wieder reaktiviert werden und speziell das Geminin* ubiquityliert werden. Zwar wurden keine anderen E3-Ligasen reaktiviert, eine Polyubiquitylierung von Geminin* im HA-Blot ist allerdings auch nicht zu erkennen (5).

Anhand dieses Experiments lässt sich die Aussage treffen, dass NEM die E1-, E2-, und E3-Enzyme im Retikulozytenlysate nahezu vollständig inhibieren kann. Eine Reaktivierung durch Zugabe von DTT, humanem Ubch5b und 6xHis-Uba1 konnte nicht beobachtet werden. Es ist wahrscheinlich, dass nach NEM-Inaktivierung sämtlicher E3-Ligasen für eine Reaktivierung der Ubiquitylierungsreaktion neben dem E1- und dem E2-Enzym auch ein aktiver APC/C^{Fzr}-Komplex wieder hinzugegeben werden muss.

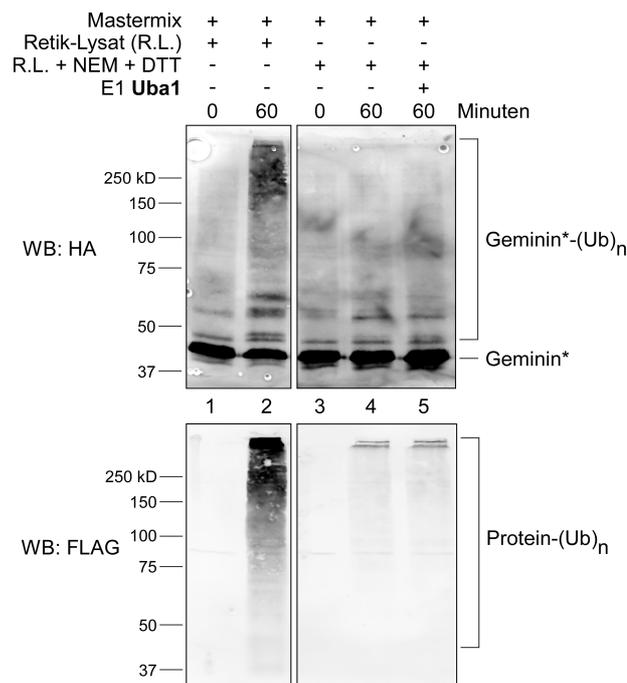


Abbildung 2.64: Inaktivierung der E3-Ligasen im Retikulozytenlysat durch NEM

Die spezifische Ubiquitinylierung des Substrates Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis wurde im Westernblot mit einem HA-Antikörper sichtbar gemacht (oberer Blot). Die unspezifische Ubiquitinylierung von Proteinen durch E3-Ligasen im Retikulozytenlysat kann durch die Zugabe von FLAG-Ubiquitin im Westernblot mit einem FLAG-Antikörper detektiert werden (unterer Blot).

(1-2): Ubiquitinylierungsassays mit aktivem Retik-Lysat zum Zeitpunkt t=0 min (Nullkontrolle) und t=60 min (Positivkontrolle)

(3-4): Ubiquitinylierungsassays mit inaktiviertem Retik-Lysat zum Zeitpunkt t=0 min (Nullkontrolle) und t=60 min. Das Retik-Lysat wurde mit 10 mM N-Ethylmaleinimid (NEM) vorbehandelt, wodurch unter anderem die Cysteine der Ubiquitin-übertragenden Enzyme reduziert und damit inaktiviert wurden. DTT inaktiviert den Überschuss an NEM.

(5) Ubiquitinylierungsreaktion des inaktiven Retik-Lysates mit zusätzlichem 6xHis-Uba1 nach t=60 min

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz:

Geminin* (1 µl), Ubiquitin (0,1 µl), FLAG-Ubiquitin (0,2 µl), 100 mM ATP (0,3 µl), MG132 (0,5 µl), UbcH5b (1 µl), aktives oder inaktiviertes Retik-Lysat (8 µl); Ansatz 5: 6xHis-Uba1 (0,5 µl)

Die Reaktionen wurden mit 10 µl 4xLSB gestoppt, aufgeköcht und jeweils 10 µl auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Geminin*: Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis

2.4.3.1.1 Fehlende *Drosophila*-Komponenten APC/C und Fzr

Bisher wurden die Ubiquitinylierungsreaktionen im Retikulozytenlysat wahrscheinlich von verschiedenen E3-Ligasen ausgeführt. Humane- bzw. *Drosophila*-spezifische Komponenten wurden hinzugegeben, um die Stimulierung einer unbekanntes E3-Ligase durch das E2-Enzym herbeizuführen.

In einem weiteren Etablierungsschritt zum *Drosophila*-spezifischen Ubiquitinylierungsassay sollte nun der APC/C-Komplex als einzige E3-Ligase aufgereinigt werden. In *Saccharomyces cerevisiae* konnte der gesamte APC/C-Komplex unter anderem über MYC-

Cdc16 und Cdc16-Tap gewonnen werden (Carroll, *et al.*, 2005; Passmore, *et al.*, 2005) und auch aus humanen HeLa-Zellen war eine Aufreinigung möglich (Sugimoto, *et al.*, 2008).

Aus *Drosophila* sollte der APC/C-Komplex durch Immunpräzipitation aus adulten Fliegen, oder aus *Drosophila*-Embryonen gewonnen werden. Dazu standen transgene Fliegen zur Verfügung, die entweder GFP-Cdc16 oder GFP-Cdc27 exprimieren und freundlicherweise von Dr. Huang (University Newcastle) zur Verfügung gestellt wurden. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine in den endogenen APC/C inkorporieren und über das Fusionsprotein mehrere Untereinheiten des APC/C präzipitiert werden können (Raff, *et al.*, 2002). Für die Isolation des APC/C-Komplexes wurden adulte Fliegen homogenisiert, die GFP-Cdc16 exprimieren. Mit diesem Homogenisat wurde eine GFP-Immunpräzipitation durchgeführt. Das Präzipitat konnte in einem Westernblot mit dem gleichen GFP-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 2.65 A). Während GFP-Cdc16 bei der vorhergesagten Größe von 106 kDa sichtbar ist, konnte GFP-Cdc27 nach identischen Immunpräzipitationsbedingungen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um den APC/C-Komplex aus *Drosophila* in einem Ubiquitylierungsassay aktivieren zu können, wird einer der beiden Aktivatoren Fzy oder Fzr benötigt. Beide Aktivatoren benötigen für ihre posttranslationale Faltung Chaperone (Camasses, *et al.*, 2003), weshalb eine bakterielle Aufreinigung nicht möglich ist. Die schnellste Möglichkeit den epitopmarkierten Aktivator 4xFLAG-Fzr herzustellen, ist die *in vitro*-Translation im Retikulozytenlysat. Abbildung 2.65 B zeigt die Effizienz der Translation.

Mit der Immunpräzipitation von GFP-Cdc16 und der *in vitro*-Translation von 4xFLAG-Fzr konnten zwei weitere wichtige Komponenten für den Ubiquitylierungsassay bereitgestellt werden. Es ist jedoch noch unklar, ob über GFP-Cdc16 ein aktiver APC/C-Komplex co-präzipitiert werden kann und ob das Retik-Lysat vom *in vitro* translatierten 4xFLAG-Fzr aufgrund der enthaltenen E3-Ligasen nicht störend wirkt.

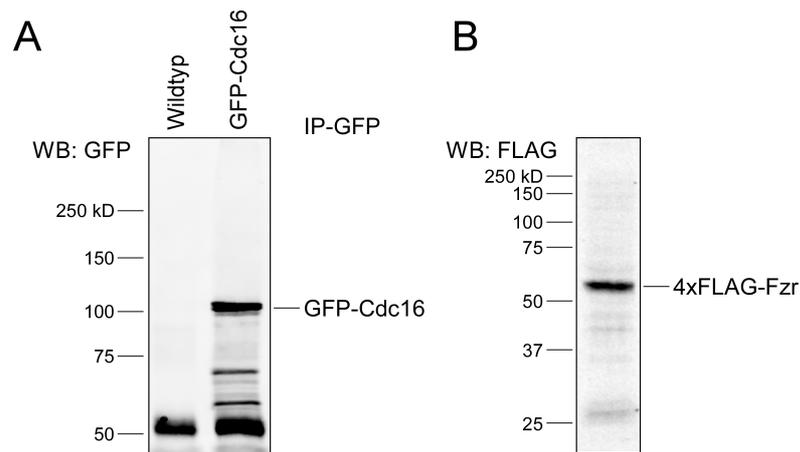


Abbildung 2.65: Gewinnung der fehlenden *Drosophila*-Komponenten APC/C und 4xFLAG-Fzr

A: Co-Immunpräzipitation des APC/C-Komplexes über die Untereinheit GFP-Cdc16:

Die APC/C-Untereinheit GFP-Cdc16 wurde mithilfe des GFP-Epitops aus dem adulten Fliegenstamm 430 präzipitiert und im Westernblot mit einem GFP-Antikörper sichtbar gemacht. GFP-Cdc16 hat eine Größe von 107 kDa. Die Präzipitation aus Wildtyp-Fliegen diente als Negativkontrolle. Jeweils 15 μ l der Präzipitate wurden aufgekocht und auf ein 14%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

B: *In vitro*-Translation des APC/C-Aktivators 4xFLAG-Fzr:

Der APC/C-Aktivator 4xFLAG-Fzr wurde *in vitro* im Retikulozytenlysat translatiert und konnte im Westernblot mit einem FLAG-Antikörper nachgewiesen werden. 4xFLAG-Fzr hat eine Größe von 57,8 kDa.

10 μ l des Translationsansatzes wurde auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.4.3.1.2 Ubiquitinierungsassay mit immunpräzipitiertem APC/C

In Hefen konnte der gesamte APC/C-Komplex über die epitopmarkierte Untereinheit Cdc16 co-präzipitiert werden, weshalb auch in *Drosophila* die Möglichkeit besteht, einen aktiven APC/C-Komplex über GFP-Cdc16 präzipitieren zu können und eine Ubiquitinierung mit reinen *Drosophila*-Komponenten erzeugen zu können. Dazu wurde vor jedem Experiment GFP-Cdc16 frisch aus den transgenen Fliegen immunpräzipitiert und die Beads mit dem gebundenen GFP-Cdc16 in einem 1xThioesterpuffer aufgenommen und in die entsprechenden PCR-Cups vorgelegt.

Da der Aktivator eine entscheidende Rolle bei der Aktivität des APC/C-Komplexes spielt und nicht bekannt ist, ob Fzr bei der Immunpräzipitation mit dem APC/C aufgereinigt wird, wurde ein *in vitro* translatiertes 4xFLAG-Fzr verwendet.

Um Ubiquitinierungsbanden als solche zu erkennen, wurde in einem als Nullkontrolle bezeichneten Ansatz Geminin* ohne eine andere Komponente des Ubiquitinierungssystems ausschließlich mit Wasser für 60 Minuten bei 30 °C inkubiert (Abb 2.66 Spur 5). In einer Negativkontrolle wurde NEM-inaktiviertes Retikulozytenlysat mit IVT 4xFLAG-Fzr mit allen notwendigen Komponenten vereinigt, allerdings noch ohne das

präzipitierte GFP-Cdc16 (1). Im Vergleich zur Nullkontrolle konnte die Aktivität der E3-Ligasen im Retik-Lysat nicht vollständig durch NEM inaktiviert werden, die Polyubiquitylierungsbanden im hochmolekularen Bereich waren jedoch deutlich reduzierter als im gleichen Ansatz mit aktivem Retik-Lysat (2).

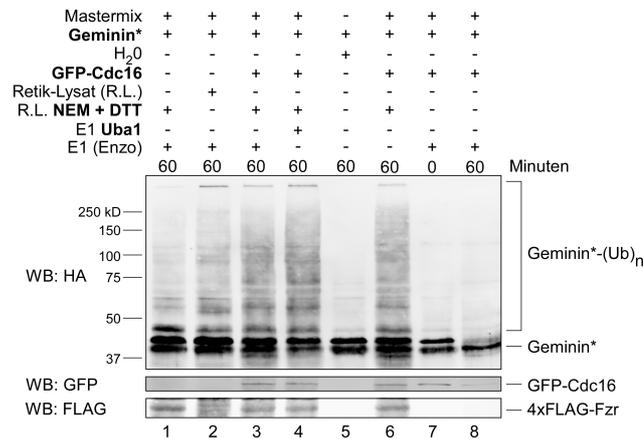


Abbildung 2.66: Ubiquitylierungsassay mit immunpräzipitiertem GFP-Cdc16 und 4xFLAG-Fzr

Die spezifische Ubiquitylierung des Substrates Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis wurde im Westernblot mit einem HA-Antikörper sichtbar gemacht (oberer Blot). Der Nachweis des frisch hergestellten Präzipitats GFP-Cdc16 aus transgenen Fliegen erfolgte im Westernblot über GFP-Antikörper (mittlerer Blot) und 4xFLAG-Fzr wurde im Westernblot mit einem FLAG-Antikörper detektiert (unterer Blot). Bei den unteren beiden Blots handelt es sich um relevante Ausschnitte. Das Retik-Lysat mit dem IVT 4xFLAG-Fzr wurde mit 10 mM N-Ethylmaleinimid (NEM) vorbehandelt, und mit DTT der Überschuss an NEM entfernt.

(1): Negativkontrolle mit inaktiviertem Retikulozytenlysate nach t=60 min

(2): Positivkontrolle mit aktivem Retikulozytenlysate nach t=60 min

(3, 4, 6): Ubiquitylierungsassays mit inaktiviertem Retik-Lysat und unter Verwendung von GFP-Cdc16 zum Zeitpunkt t=60 min. Eingesetzt wurden humanes E1-Enzym (3) und Uba1-6xHis (4), bzw. kein E1-Enzym (6).

(5) Nullkontrolle: reines Substrat Geminin* nach t=60 min

(7-8): *Drosophila* Ubiquitylierungsassay, mit dem APC/C als einzige E3-Ligase, ohne Retik-Lysat aber auch ohne Aktivator Fzr. Nullkontrolle nach t=60 min (7) und nach t=60 min

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz:

Geminin* (2 µl), Effete-6xHis (1 µl), Ubiquitin (0,1 µl), FLAG-Ubiquitin (0,2 µl), 100 mM ATP (0,3 µl)

Separat zugegeben: aktives oder NEM-inaktiviertes Retik-Lysat mit IVT 4xFLAG-Fzr (8 µl); humanes E1-Enzym bzw. 6xHis-Uba1 (1 µl), GFP-Cdc16 Präzipitat (8 µl); Ansatz 5, 7 und 8: Thioesterpuffer (8 µl)

Die Reaktionen wurden mit 10 µl 4xLSB gestoppt, aufgeköcht und jeweils 10 µl auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Geminin*: Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis

In einem weiteren Schritt wurde zum inaktivierten Retikulozytenlysat das präzipitierte GFP-Cdc16 gegeben, wodurch die Polyubiquitylierung von Geminin* zunahm (3). Dieses Ergebnis lässt die Möglichkeit offen, dass durch GFP-Cdc16 der vollständige APC/C-Komplex präzipitiert werden konnte. Allerdings zeigte sich kein Unterschied, ob das humane E1-Enzym verwendet wurde (3), das *Drosophila* 6xHis-Uba1 eingesetzt wurde (4) oder kein E1-Enzym hinzugegeben wurde (6).

Nachdem die E3-Ligasen im Retikulozytenlysat keine klare Aussage bezüglich der Polyubiquitylierung von Geminin* durch den APC/C-Komplex zulassen, wurde eine Reaktion ohne Retik-Lysat angesetzt. Dazu wurde das GFP-Cdc16-Präzipitat mit allen Komponenten des Ubiquitylierungs-Systems versetzt und mit 1xThioesterpuffer auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. In diesem Ansatz fehlte der Aktivator Fzr, was eine Erklärung dafür sein könnte, warum nach 60 Minuten Inkubation kein Unterschied zur Nullkontrolle in der Polyubiquitylierung von Geminin* zu erkennen ist (7 und 8).

In diesem Experiment konnte mit dem Präzipitat von GFP-Cdc16 eine Polyubiquitylierung von Geminin* nachgewiesen werden. Allerdings waren in diesem Ansatz auch die E3-Ligasen des Retikulozytenlysates enthalten, weshalb in Frage gestellt werden muss, ob für die Reaktion der Aktivator 4xFLAG-Fzr im Retik-Lysat oder das Retik-Lysat selber verantwortlich ist.

2.4.3.2 Ubiquitylierungsassay im *Drosophila*-Extrakt

Anstatt der aufwändigen Immunpräzipitation des APC/C-Komplexes aus adulten Fliegen würde die Verwendung von Embryonen die Isolierung des APC/C-Komplexes deutlich vereinfachen. Die APC/C-Aktivität in Embryonen ist jedoch abhängig vom Entwicklungsstadium, da der APC/C^{Fzr} erst im Zellzyklus 16 zum ersten Mal aktiv wird, wenn die Zelle sich auf die erste G1-Phase vorbereitet. In Embryonen früherer Entwicklungsstadien wird kein Fzr exprimiert, so dass der APC/C aus solchen Lysaten vermutlich keine APC/C^{Fzr}-Substrate abbauen kann und für den Ubiquitylierungsassay ungeeignet wäre. Der Arbeitsgruppe um Dr. Medenbach an der Universität Regensburg gelang es, aus 0-8h alten *Drosophila*-Embryonen einen Extrakt (*D.m.*-Extrakt) herzustellen, der für die zeitgleiche Transkription und Translation geeignet ist, und stellte ihn freundlicherweise zur Verfügung. Für die Aufrechterhaltung des benötigten Energielevels sorgt das zugefügte Energieregulationssystem von Creatinphosphat und Creatinkinase (Medenbach, *et al.*, 2011).

In einem ersten Experiment wurde das Substrat Geminin*, Effete-6xHis und alle anderen notwendigen Komponenten des Ubiquitylierungsassays zum *Drosophila*-Extrakt gegeben und der Ansatz für 60 Minuten bei 30 °C inkubiert (Abb. 2.67). In diesem Ansatz ist im FLAG-Blot im Vergleich zur Nullkontrolle (1) eine generelle Ubiquitylierung zu erkennen (2). Diese fällt aber auf dem HA-Blot für Geminin* deutlich geringer aus. Wird das E2-Enzym Effete-6xHis durch das humane UbcH5b ausgetauscht, nimmt sowohl die allgemeine Ubiquitylierung unspezifischer Proteine zu, als auch die Ubiquitylierung von Geminin* (3).

Die beiden Reaktionen zeigen, dass mit dem *Drosophila*-Extrakt Ubiquitylierungsreaktionen möglich sind. Dem Alter der Embryonen könnte hier eine entscheidende Bedeutung zukommen, da in zu jungen Embryonen kein Fzr vorhanden ist.

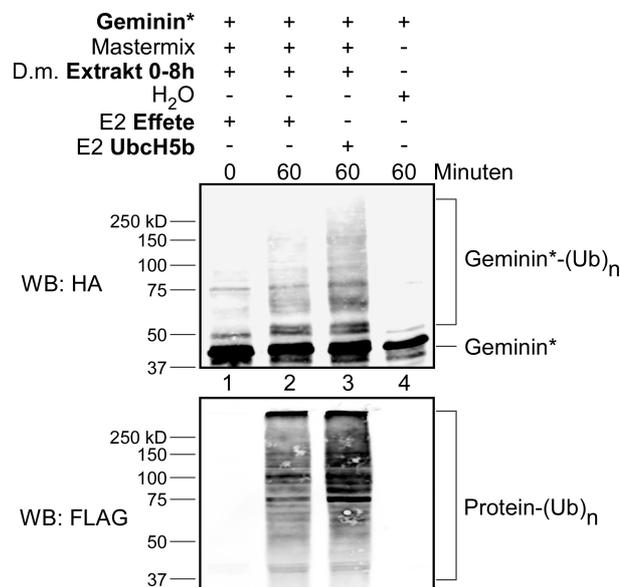


Abbildung 2.67: Ubiquitylierungsassay mit *Drosophila*-Extrakt aus 0-8h alten Embryonen

Die spezifische Ubiquitylierung des Substrates Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis wurde im Westernblot mit einem HA-Antikörper sichtbar gemacht (oberer Blot). Der Nachweis einer allgemeinen Aktivität im Extrakt durch die Polyubiquitylierung unspezifischer Proteine erfolgte im Westernblot mit einem FLAG-Antikörper (unterer Blot).

(1-2): Nullkontrolle nach t=0 min (1) und Ubiquitylierungsassay nach t=60 min (2) mit *Drosophila*-Extrakt aus 0-8h alten Embryonen und Effete-6xHis als E2-Enzym

(3): Ubiquitylierungsassay mit *Drosophila*-Extrakt aus 0-8h alten Embryonen und dem E2-UbcH5b

(4): Nullkontrolle: reines Substrat Geminin* nach t=60 min

Zusammensetzung des Mastermixes pro Ansatz:

D.m. Extrakt 0-8h (4 µl), 1 M HEPES (0,24 µl), 4 M KOAc (0,225 µl), 100 mM MgOAc (0,06 µl), 200 mM CreatinP (1 µl), 10 µg/µl Creatinekinase (0,08 µl), Geminin* (1 µl), 6xHis-Uba1 (0,5 µl), Ubiquitin (0,15 µl), FLAG-Ubiquitin (0,15 µl), MG132 (0,5 µl), H₂O (1,2 µl)

Separat zugegeben: humanes UbcH5b (1 µl) bzw. Effete-6xHis (1 µl)

Die Reaktionen wurden mit 10 µl 4xLSB gestoppt, aufgeköcht und jeweils 6 µl auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Geminin*: Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis

2.4.3.3 Die Aufreinigung von Rca1 im Baculo-System

Eine weitere Möglichkeit den APC/C-Komplex aus Embryonen zu aktivieren stellt die Zugabe von aktivem, aufgereinigtem Fzr zum *Drosophila*-Extrakt dar.

Bisher wurde der APC/C-Aktivator Fzr in Retikulozytenlysat über *in vitro*-Translation hergestellt, da Fzr im Reifeprozess eine posttranslationelle Faltung durch Chaperone erfahren muss (Camasses, *et al.*, 2003) und eine Aufreinigung über *E. coli* deshalb nicht möglich ist. Das Retikulozytenlysat stellte sich allerdings als problematisch heraus, da zum einen die enthaltenen E3-Ligasen nicht vollständig durch NEM inhibiert werden konnten und zum anderen der APC/C-Komplex aus Kaninchen stammt und dem *Drosophila*-Ubiquitylierungsassay hinderlich ist. Auch Rca1 bedarf einer posttranslationalen Faltung und eine Überexpression in *E. coli* ist nicht möglich.

Aus diesem Grund wurden die Gene von *fzr* und *rca1* hinter eine N-terminale 6xHis-FLAG-Epitopmarkierung in die Baculovirus-DNA integriert, um das Protein nach erfolgter Überexpression bei Bedarf über eine HisTag-Säule oder eine FLAG-Säule aufzureinigen zu können. Während das 6xHis-Epitop über einen enzymatischen Verdau abgespalten werden kann, soll das FLAG-Epitope nach dem Ubiquitylierungsassay der Detektion im Westernblot dienen. Für einen ersten Test wurden SF21-Insektenzellen mit dem Bacmid des integrierten 6xHis-FLAG-Rca1 infiziert. 24-48 h nach der Infektion stellen die SF21-Zellen die Zellteilung ein, was auch als „*day of proliferation arrest*“ (dpa) bezeichnet wird. Ab diesem Zeitpunkt beginnen die Zellen anstatt eigener Proteine, Komponenten des Baculovirus herzustellen, unter anderem auch das FLAG-Rca1. Die eukaryotische Kompartimentierung der SF21-Zellen wird dabei für die posttranslationale Faltung des FLAG-Rca1 genutzt.

Ab dem dpa beginnt in den SF21-Zellen die Produktion von FLAG-Rca1. Alle 24 Stunden wurden Proben entnommen und das Level der FLAG-Rca1 Überexpression im Überstand und im Zellpellet im Westernblot überprüft (Abb. 2.68 A). Die maximale Menge an FLAG-Rca1 wurde im Überstand nach 48 Stunden erreicht, wobei ein Großteil des Proteins im Zellpellet zu finden war. Der Zellüberstand 48 Stunden nach dpa wurde über eine FLAG-Säule aufgereinigt, um unspezifische Proteine zu entfernen (Abb. 2.68 B). Es stellte sich heraus, dass FLAG-Rca1 kaum an die Säule bindet und somit größtenteils im Durchlauf zu finden war. Nur ein kleiner Anteil konnte im Eluat nachgewiesen werden.

Die weitaus größere Menge an FLAG-Rca1 befand sich in den Zellkernen, die auch über Sonifikation nicht aufgeschlossen werden konnten. Aus Zeitgründen konnte an dieser

Stelle die Aufreinigung von FLAG-Rca1 nicht mehr fortgeführt werden und auch FLAG-Fzr wurde noch nicht für eine Überexpression in SF21-Zellen verwendet.

Bei der Aufreinigung von FLAG-Rca1 im Baculo-System konnte zwar eine gute Überexpression erzielt werden, die Ausbeute des aufgereinigten Proteins war jedoch gering, da das Protein zum einen größtenteils im Zellpellet – und somit vermutlich in den Zellkernen angereichert vorliegt, zum anderen konnte FLAG-Rca1 aus dem Überstand nicht über das FLAG-Epitop an die Säule binden.



Abbildung 2.68: Überexpression und Aufreinigung von FLAG-Rca1 aus SF21-infizierten Zellen

Der Nachweis von FLAG-Rca1 erfolgte im Westernblot mit FLAG-Antikörpern.

A: Die Überexpression von FLAG-Rca1 beginnt erst nach dem „*day of proliferation arrest*“.

Ab dem dpa wurde über einen Zeitraum von drei Tagen alle 24 h die gleiche Menge an Zellen geerntet, aufgeschlossen und das Level der FLAG-Rca1 Überexpression im Überstand und im Zellpellet im Westernblot überprüft.

B: Die Aufreinigung von FLAG-Rca1 aus dem Überstand 48 h nach dpa

Auftragung von links nach rechts: (P) Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextrakts; (Ü) Überstand, lösliche Fraktion des Zellextrakts; (DI) Durchlauf; (W) Fraktion des Waschschrittes; (E) Eluat, aufgereinigtes FLAG-Rca1

Aus den geernteten Zellen 48 h nach dpa befand sich der größte Anteil an FLAG-Rca1 im Zellpellet. Der Überstand wurde über eine FLAG-Säule weiter aufgereinigt, eluierte aber größtenteils im Durchlauf.

Jeweils 6 µl vom Pellet und Überstand sowie den einzelnen Fraktionen wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

3 Diskussion

3.1 Rca1 – vom Inhibitor zum Substrat des APC^{Fzr}

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Rca1 zum ersten Mal in der Embryogenese von *Drosophila* in der G2-Phase von Zellzyklus 16 benötigt wird. In dieser Phase bindet Rca1 als Inhibitor an den APC/C^{Fzr} und ermöglicht im Zusammenwirken mit CyclinA-Cdk1 und CyclinE-Cdk2 die vollständige Inaktivierung des APC/C^{Fzr}-Komplexes (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). Mitotische Cycline können akkumulieren und die Zelle tritt in die Mitose ein, in der der APC/C-Komplex aktiviert wird und die Prozesse der Zellteilung steuert. Über einen noch unbekanntem Mechanismus verliert Rca1 im Laufe der Mitose die Fähigkeit, den APC/C-Komplex inaktiv zu halten und fällt in der frühen G1-Phase selbst dem proteasomalen Abbau zum Opfer. Erste Vermutungen, dass Rca1 wie sein Ortholog Emi1 aus Vertebraten über einen SCF-Komplex abgebaut wird, bestätigten sich nicht (Margottin-Goguet, *et al.*, 2003; Radermacher, 2007; Zielke, 2006). Auf der Suche nach dem Abbaumechanismus fällt die zentral gelegene KEN-Box auf, die in vielen Substraten als Erkennungssequenz des APC/C^{Fzr}-Komplexes zu finden ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch ein *in vitro*-Ubiquitylierungsassay, in dem Emi1 durch eine Punktmutation in der inhibierenden ZBR von einem Inhibitor zu einem Substrat des APC/C-Komplexes verwandelt werden konnte (Miller, *et al.*, 2006). Ein solcher Weg ist auch für Rca1 denkbar. So müsste Rca1 über eine Modifikation zuerst die inhibitorische Wirkung auf den APC/C^{Fzr} verlieren und würde im Verlauf der Mitose durch die KEN-Box selbst zu einem Substrat des APC/C^{Fzr} werden.

Um diese Theorie zu belegen wurde in einem ersten Schritt der Abbau von Rca1-GFP in Embryonen live verfolgt (2.1.1, Abb. 2.1). Der Zeitpunkt des Rca1-Abbaus beginnt in der frühen G1-Phase, wenn Rca1-GFP nach Vollendung der Zytokinese wieder in den Zellkern aufgenommen worden ist. Es ist jedoch unklar, ob die Kinetik, mit der Rca1 abgebaut wird, dem Abbau des „realen“ Rca1 in der Zelle entspricht. Durch die Überexpression von Rca1-GFP ist in der Zelle deutlich mehr Rca1 vorhanden, was zum einen die Abbaukinetik negativ beeinflussen könnte, zum anderen ist aus Überexpressionsstudien bekannt, dass ein aktives Rca1 einen Einfluss auf den G1/S-Phase Übergang besitzt und auch der Abbau davon betroffen sein könnte. Zwar konnte in *Drosophila*-Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass eine C-terminale GFP-Epitopmarkierung

eine Inaktivierung von Rca1 zur Folge hatte (2.3.1.3.1, Abb. 2.29), ein genereller Einfluss auf den Abbau kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Ein weiteres Problem stellt der Bleichungseffekt in Langzeitaufnahmen dar, der in den Zeitrafferaufnahmen als Abbau interpretiert werden könnte. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der Bleicheffekt kaum eine Rolle spielt, da bei direkt benachbarten Zellen, deren Zellteilung erst zu einem späteren Zeitpunkt eingeleitet wurde, kein Bleichen festzustellen war (siehe dazu auch Movie 1 Bleicheffekt).

Ein Großteil dieser Arbeit wurde in *Drosophila*-Zellkulturzellen (Schneiderzellen) durchgeführt. In einem ersten Versuch stand die Frage der Vergleichbarkeit des Rca1-Abbaus in Embryonen und in Schneiderzellen im Vordergrund. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Abbau von Rca1-GFP und Rca1-3xCherry in transient transfizierten Schneiderzellen in einem ähnlichen Muster erfolgt wie in *Drosophila*-Embryonen (2.1.2, Abb. 2.2). Etwas unterschiedlich ist der Zeitrahmen, in dem der Abbau von Rca1-GFP in Schneiderzellen stattfindet. Nach 140 Minuten ist in Schneiderzellen noch ein Signal für Rca1-GFP zu erkennen, während in Embryonen nach 120 Minuten kein Signal mehr detektiert werden konnte. Da in den transient transfizierten Schneiderzellen noch mehr Protein vorliegt als in den transgenen Fliegen, kann noch etwas später Protein detektiert werden.

Eine Möglichkeit, eine direkte Verbindung zwischen dem Rca1-Abbau und der Aktivität des APC/C^{Fzr}-Komplexes zu knüpfen, besteht in einem direkten Vergleich der verschiedenen Abbaukurven von Rca1 und verschiedener APC/C-Substrate (2.2.1.3, Abb. 2.6). In diesem Experiment kam für Rca1 ein N-terminales GFP-Epitop zum Einsatz, da das C-terminale GFP-Epitop den Abbau negativ beeinflusst (2.3.1.3.1, Abb. 2.29). Der Vergleich der Abbaukurven ergibt für HA-NLS-GFP-Rca1 eine Abbaukinetik, die mehr der Abbaukurve von HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP und HA-NLS-GFP-Fzy entspricht und deutlich schneller verläuft, als beim reinen APC/C^{Fzr}-Substrat HA-NLS-Geminin_Del-102-192-GFP. Nachdem es sich bei CyclinB in erster Linie um ein APC/C^{Fzy}-Substrat handelt und der Co-Aktivatoren Fzy nicht nur vom APC/C^{Fzr}, sondern womöglich auch über einen intramolekularen Mechanismus, wie er bei Hefen gezeigt werden konnte, zu seinem eigenen Abbau beiträgt (Foe, *et al.*, 2011), kommt der Verdacht auf, dass es sich bei Rca1 ebenfalls um ein Substrat des APC/C^{Fzy} handeln könnte zumal die Abbaukurve des einzigen APC/C^{Fzr}-Substrates Geminin deutlich langsamer verläuft. Jedoch kann kein Rca1-Abbau zu Beginn der Mitose festgestellt werden, wenn CyclinB bereits abgebaut wird. Auch findet kein Abbau von Rca1 in mitotischen Zellen vor der Mitose 16 statt, während

Fzy und CyclinB in dieser Phase auch in Abwesenheit von Fzr bereits abgebaut werden. Dies spricht eher gegen einen Abbau von Rca1 über APC/C^{Fzy} und für einen reinen APC/C^{Fzr}-Abbau.

Die Überexpression des aktiven HA-NLS-GFP-Rca1 könnte allerdings einen Einfluss auf den G1-Verlauf genommen haben. Die Einführung der Punktmutation C351S in der ZBR, die zu einer Inaktivierung von Rca1 führt, zeigte jedoch einen vergleichbaren Abbau (2.2.3.1, Abb. 2.35).

Erst die Spaltung von Rca1 in ein N- und ein C-terminales Rca1 verlangsamte den Abbau. Überraschenderweise wurden beide Hälften Zellzyklus-spezifisch in der G1-Phase abgebaut und der Vergleich mit HA-NLS-Geminin_Del-102-192-GFP ergab sowohl für das N-terminale Fragment von Rca1, HA-NLS-GFP-Rca1_Del-204-411, als auch für das C-terminale Fragment von Rca1, HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S, einen erstaunlich ähnlichen Abbau (2.2.4, Abb. 2.8). Nachdem Rca1 normalerweise im Zellkern lokalisiert und dort auch sein Abbau gezeigt worden ist, wurden beide Rca1-Deletionen vorsorglich mit einer NLS-Sequenz vor dem N-terminalen GFP-Epitop versehen, um sicherzustellen, dass sich an der Lokalisation nichts ändert. Zusätzlich war noch ein N-terminales HA-Epitop angebracht, das vollständigkeithalber an dieser Stelle erwähnt wird, aber für dieses Experiment keine Rolle spielte. Beide Rca1-Deletionen waren inaktiv und konnten auf den Zellzyklus keinen Einfluss mehr nehmen. Dass noch beide Rca1-Deletionen in der G1-Phase abgebaut werden, ist ein deutlicher Hinweis auf zwei Abbausequenzen und wird bei der Eingrenzung der Abbausequenz in Kapitel 3.2 thematisiert. Womöglich ergeben beide Abbausequenzen zusammen eine stärkere Affinität zum APC/C^{Fzr}, die bewirkt, dass Rca1 als Substrat gegenüber Geminin bevorzugt abgebaut wird.

Aus einer früheren Arbeit ist bekannt, dass die Überexpression von Fzr in Embryonen zu einem vorzeitigen Abbau der APC/C-Substrate CyclinA und CyclinB in der G2-Phase des Zellzyklus 16 erfolgt (Grosskortenhaus, 2001). Wurde der APC/C^{Fzr} in Schneiderzellen durch Fzr-Überexpression aktiviert, konnte der Abbau von Rca1-GFP im Verlauf der S/G2-Phase verfolgt werden, während HA-NLS-3xCherry keinem Abbau unterworfen war (2.2.4.1, Abb. 2.11). Auch bei den APC/C-Substraten HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry (Abb. 2.12), sowie HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP, HA-NLS-GFP-Fzy und Rca1-3xCherry (Abb. 2.13) konnte der Abbau über eine verfrühte Aktivierung des APC/C^{Fzr} vor der Mitose eingeleitet werden. Das gleiche Ergebnis lieferte die Untersuchung des Abbaus von N- und C-terminalem Rca1 (2.2.4.3, Abb. 2.14). Zwar ist es in dem

Versuchsaufbau weder möglich den genauen Zeitpunkt der APC/C-Aktivierung zu bestimmen noch den Beginn des Substratabbaus zeitlich genau zu taxieren, aber in allen Fällen konnte die Akkumulierung und ein parallel beginnender Abbau der Substrate beobachtet werden, ohne dass es zuvor zu einer mitotischen Zellteilung gekommen ist. Interessanterweise erfolgt der Substratabbau mit der gleichen Abbaukinetik wie sie im direkten Vergleich ohne Fzr-Überexpression für den Abbau in der G1-Phase gezeigt werden konnte. Auch dieses Mal verschwindet das Signal von CyclinB am schnellsten, gefolgt von Fzy und Rca1. Erst etwas später war das Signal von Geminin und von N- und C-terminalem Rca1 verschwunden. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass Rca1 ein Substrat des APC/C^{Fzr} ist.

Nachdem bisher nachgewiesen werden konnte, dass die Überexpression von Fzr den Abbau von Rca1 initiieren kann, sollte nun ein anderer Weg eingeschlagen werden und gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung von Rca1 einen direkten Einfluss auf die eigene Stabilität besitzt. Dies wäre nur der Fall, wenn APC/C^{Fzr} für den Abbau seines eigenen Inhibitors Rca1 verantwortlich ist. Dazu wurde in Zellen ein aktives 4xFLAG-Rca1 oder ein inaktives 4xFLAG-Rca1_C351S überexprimiert und ein Vergleich mit Zellen angestellt, in denen noch zusätzlich 4xFLAG-Fzr überexprimiert wurde. Es zeigte sich, dass ein aktives 4xFLAG-Rca1 der Überexpression von 4xFLAG-Fzr entgegenwirken kann und in der Lage ist, seinen eigenen Abbau zu verhindern oder zumindest zu verlangsamen, während das inaktive Rca1 eine um den Faktor 2 geringere Proteinmenge im Westernblot aufweist (2.2.5, Abb. 2.15).

Die inhibitorische Funktion von Rca1 hat demnach einen direkten Einfluss auf die eigene Stabilität. Inwieweit der Rca1-Abbau von der Fzr-Konzentration abhängt, wurde in einem Experiment mit dem N- und C-terminalen Rca1 untersucht. Bei beiden handelte es sich um inaktive Rca1-Derivate, damit das Experiment nicht durch die inhibitorische Funktion auf den APC/C-Komplex negativ beeinflusst wird (2.2.6, Abb. 2.16). In diesem Experiment stellte sich heraus, dass das N- und das C-terminale Fragment von Rca1 mit steigender 4xFLAG-Fzr-Konzentration einem stärkeren Abbau unterworfen sind, während HA-NLS-GFP 4xFLAG-Fzr-unabhängig auf dem Westernblot ein konstantes Signal zeigte.

In den bisherigen Ergebnissen wurde der Rca1-Abbau betrachtet und mit anderen APC/C-Substraten verglichen. Dabei konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Fzr und Rca1 hergestellt werden. Während zu Beginn der Rca1-Abbau in der G1-Phase näher betrachtet wurde, behandelten die späteren Experimente den Rca1-Abbau nach

Fzr-Überexpression und der vorzeitigen APC/C^{Fzr}-Aktivierung in der G2-Phase. In weiteren Experimenten wurde der Versuch unternommen den APC/C-Komplex in der G1-Phase soweit zu inaktivieren, dass Rca1 als Substrat dieses Komplexes stabilisiert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aktivierung des APC/C-Komplexes über den Co-Aktivator Fzr notwendig ist, damit die Zelle in die G1-Phase eintreten kann (Sigrist und Lehner, 1997). Da Rca1 normalerweise in der G1-Phase abgebaut wird, reicht es nicht aus, einen vollständigen Fzr-Knock-down durchzuführen, da die Zellen sonst keine G1-Phase etablieren würden. In einem RNAi-Experiment sollte Fzr soweit herunterreguliert werden, dass die Aktivität des APC/C^{Fzr}-Komplexes zwar ausreicht um eine G1-Phase zu etablieren, aber dennoch eine so reduzierte Aktivität besitzt, dass neben dem bekannten APC/C-Substrat CyclinB_Del-286-530-Cherry auch HA-NLS-GFP-Rca1_Del-1-203_C351S in der G1-Phase stabilisiert wird. Es wurde eine Verdünnungsreihe von Fzr-RNAi getestet, aber es konnte keine Fzr-RNAi-Konzentration gefunden werden, mit der das gewünschte Ziel erreicht werden konnte (2.2.7, Abb. 2.19). Sobald die Konzentration von Fzr-RNAi die Etablierung einer G1-Phase zugelassen hat, war zugleich der APC/C^{Fzr} aktiv und ließ weder eine Akkumulierung von CyclinB_Del-286-530-Cherry noch von HA-NLS-Rca1_Del-1-203_C351S zu. Vermutlich ist die Etablierung der G1-Phase von der APC/C^{Fzr}-Aktivität nicht entkoppelbar. Sobald genügend Fzr in der Zelle vorhanden ist um in die G1-Phase einzutreten, reichen die aktiven APC/C^{Fzr}-Komplexe aus, um den Abbau der Substrate in der G1-Phase zu gewährleisten. Aber auch mit diesem Experiment kann zumindest aus den einheitlichen DNA-Profilen zwischen CyclinB_Del-286-530-Cherry und HA-NLS-Rca1_Del-1-203_C351S der Schluss gezogen werden, dass der Abbau von Rca1 dem Abbau eines APC/C-Substrates sehr ähnlich sieht.

Eine weitere Möglichkeit den APC/C^{Fzr}-Komplex in der G1-Phase zu inaktivieren, wurde zum ersten Mal durch gleichzeitige Überexpression von GFP-Dacapo mit CyclinB_Del-286-530-Cherry gezeigt (Bauer, 2011). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Überexpression von Dacapo eine vollständige Inhibierung von CyclinE-Cdk2 zur Folge hat (de Nooij, *et al.*, 1996; Lane, *et al.*, 1996). CyclinE-Cdk2 wird aber für den G1/S-Phase Übergang benötigt, weshalb die Überexpression von Dacapo in einem G1-Phase-Arrest resultiert. In diesen G1-Zellen konnte CyclinB_Del-286-530-Cherry nicht mehr abgebaut werden und lag stabil vor (Bauer, 2011). Die Ursachen für diese völlig unerwartete Inaktivierung des APC/C unter diesen Bedingungen konnten bisher nicht ermittelt werden. Wird unter diesen Bedingungen das inaktive Cherry-Rca1_Del-1-203-C351S exprimiert, so verhält sich Rca1 wie das APC/C-Substrat CyclinB und liegt in der G1-

Phase stabil vor. Eine kritische Betrachtung dieses Experiments lässt zwei Punkte offen: Zum einen fehlt in diesem Experiment eine Positivkontrolle eines in der G1-Phase instabilen Proteins, dessen Abbau trotz Dacapo-Überexpression APC/C-unabhängig in der G1-Phase verfolgt werden kann. Zum anderen ist noch gänzlich ungeklärt, warum der APC/C-Komplex durch Dacapo-Überexpression inaktiviert wird und welche anderen Mechanismen ebenfalls betroffen sind. Solange diese Fragen nicht geklärt sind, können die Ergebnisse nur als weiterer Hinweis angesehen werden, dass sich Rca1 wie ein Substrat des APC/C in der G1-Phase stabilisieren lässt.

Während Rca1 in der S/G2-Phase als Inhibitor an den APC/C^{Fzr} bindet, wäre für den Abbau ebenfalls eine Interaktion notwendig. Es ist durchaus vorstellbar, dass Rca1 am APC/C gebunden bleibt und durch den Verlust seiner inhibitorischen Funktion zum direkten Substrat umfunktioniert wird. Eine andere Variante würde Rca1 zuerst vom APC/C^{Fzr}-Komplex diffundieren lassen, bevor es zu einer Neubindung und zu einer Ubiquitylierung führt. In beiden Fällen ist eine Interaktion mit dem APC/C^{Fzr}-Komplex notwendig, die für Rca1 bereits nachgewiesen werden konnte. Vorhergehende Arbeiten konnten eine Interaktion mit dem Co-Aktivat Fzr nachweisen (Grosskortenhans, 2001) und auch mit den beiden Untereinheiten Cdc23 und Cdc27 war der Nachweis einer Interaktion möglich (Querings, 2006). In dieser Arbeit wurde die Interaktion mit der APC/C-Untereinheit Cdc23 noch einmal in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment bestätigt (Abb. 2.23). Die Interaktion von Rca1 und Cdc23 konnte nur im Wachstumsassay nachgewiesen werden, während im Farbasay nichts auf eine Interaktion hindeutete. Dies kann auf eine schwache Interaktion zurückzuführen sein oder das N-terminale Epitop verhindert eine bessere Bindung, wie es in der Literatur bereits häufig beschrieben worden ist. Auch die Interaktion mit Rca1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte nur in einer Richtung nachgewiesen werden, wenn 4xHA-Cdc23 an die Aktivierungsdomäne und MYC-Rca1 an die Bindedomäne fusioniert war. Andersherum konnte auch mit dem Wachstumsassay keine Interaktion festgestellt werden, die somit als Beispiel für eine Epitopmarkierung angebracht werden kann, die wahrscheinlich die Interaktion zwischen Rca1 und Cdc23 verhindert. In einem weiteren Experiment wurde die Interaktion zwischen Rca1 und Cdc23 in *Drosophila*-Schneiderzellen mit einer Co-Immunpräzipitation bestätigt (Abb. 2.24). Dabei konnte HA-Rca1 als Co-Präzipitat von 4xFLAG-Cdc23 nachgewiesen werden und auch 4xFLAG-Cdc23 konnte im Präzipitat von HA-Rca1 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ob es sich bei der Interaktion zwischen Rca1 und der APC/C-Untereinheit Cdc23 um die Bindung von Rca1 als Inhibitor oder um die

Bindung als Substrat an den APC/C handelt, kann mit Interaktionsstudien nicht aufgeklärt werden. Vielmehr dienen die Interaktionsstudien dem Nachweis, dass Rca1 allgemein mit dem APC/C-Komplex interagiert und die Möglichkeit offen lässt, dass Rca1 als ein Substrat des APC/C abgebaut wird.

3.2 Der Abbau von Rca1 in Schneiderzellen

Für die Identifizierung von Rca1 als Substrat des APC/C^{Fzr}-Komplexes ist es hilfreich, die Abbausequenz/en in Rca1 zu kennen, um weitere Rückschlüsse auf den Abbaumechanismus ziehen zu können.

In den bisherigen Arbeiten wurde der Abbau von Rca1 in *Drosophila*-Embryonen untersucht. Dort beginnt der Rca1-Abbau während der Embryogenese beim Übergang der Mitose 16 zur ersten G1-Phase von Zellzyklus 17. Wenn sich alle epidermalen Zellen in der G1-Phase befinden, kann HA-Rca1 über eine Antikörperfärbung des fixierten Embryos nicht mehr nachgewiesen werden (Grosskortenhans und Sprenger, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass ein um die ersten 203 Aminosäuren verkürztes Rca1 in der G1-Phase abgebaut wird, während eine Deletion der ersten 255 Aminosäuren zu einem in der G1-Phase stabilen Rca1 führt (Zielke, 2006). Pablo Radermacher konnte diese Region auf einen kleinen Bereich zwischen Aminosäure 220-234 weiter eingrenzen (Radermacher, 2009).

Aufgrund der Methodik konnte in *Drosophila*-Embryonen nur eine „ja/nein“-Aussage über den Rca1-Abbau in der G1-Phase getroffen werden. Die Abbaukinetik blieb dabei unbeachtet. Um den Abbau von Rca1 live verfolgen zu können und auch mehrere Rca1-Derivate mit geringem Aufwand untersuchen zu können, wurde ein GFP-Expressionssystem in Schneiderzellen etabliert, in dem der Abbau von Rca1 unter dem Mikroskop live verfolgt werden konnte.

3.2.1 Die Etablierung des Messsystems

3.2.1.1 Auf den Abbau Einfluss-nehmende Faktoren

Für die Untersuchung des Rca1-Abbaus in der G1-Phase wurden Schneiderzellen transient mit Plasmiden transfiziert. Die Expression der auf den Plasmiden kodierten Proteine wurde über einen Metallothionein-Promotor induziert. Die Ermittlung der Abbausequenz erfolgte mit Hilfe von live-cell-imaging-Aufnahmen und der Durchflusszytometrie.

rie. Dazu wurde neben dem GFP- oder Cherry-epitopmarkierten Rca1 ein Kontrollprotein co-exprimiert. Das verwendete Rca1-Derivat wurde entweder mit einem N-terminalen HA-NLS-GFP oder einem C-terminalen GFP fusioniert. Während die N-terminale GFP-Fusion keinen Einfluss auf die Aktivität von Rca1 besitzt, scheint die C-terminale Epitopmarkierung einen negativen Einfluss auf die Aktivität auszuüben (Abb. 2.29 C). Aller Wahrscheinlichkeit nach behindert das relativ große GFP-Protein am C-terminalen Ende Rca1 in seiner Funktion. Aus den Studien der Rca1-Funktionalität ist bekannt, dass eine C-terminale Deletion um sieben Aminosäuren ausreichend ist, um Rca1 vollständig zu inaktivieren (Abb. 2.48 d). Im humanen Ortholog Emi1 ist der RL-Tail mit den beiden Aminosäuren Arginin-Leucin (RL) am C-Terminus für die Inhibierung des APC/C-Komplexes verantwortlich. Auch in Rca1 ist der RL-Tail hoch konserviert und könnte eine ähnliche Funktion besitzen. Ein GFP am C-Terminus blockiert wahrscheinlich diesen RL-Tail, was der Grund für die Inaktivierung von Rca1 sein dürfte. Eine N-terminale GFP-Epitopmarkierung hingegen kann keinen oder zumindest nur einen geringen Einfluss nehmen. Interessanterweise zeigten einfache N- bzw. C-terminale Cherry-Epitope ähnliche Effekte. N-terminales Cherry-Rca1 ist aktiv, C-terminales Rca1-Cherry genauso wie Rca1-GFP inaktiv (Abb. 2.30). Während die Rca1-Aktivität stark von der Fusion des Fluorochroms beeinflusst wird, zeigt eine einfache Cherry- oder GFP-Epitopmarkierung eine geringe Einflussnahme auf die G1-Stabilität. Während für ein N- und C-terminales Cherry-Epitop kein signifikanter Unterschied im Abbauverhalten festgestellt werden konnte, wird Rca1-GFP etwas langsamer als HA-NLS-GFP-Rca1 in G1 abgebaut (Abb. 2.29). Aus der Literatur ist bekannt, dass Epitopmarkierungen häufig einen Einfluss auf die Stabilität ausüben können. Auch die Anzahl an Epitopmarkierungen kann dabei eine Rolle spielen. Ein 3xCherry- und auch ein 3xGFP-Fluorochrom an Geminin_Del-102-192 führte sowohl bei einer N-terminalen wie auch bei einer C-terminalen Fusion zu einer vollständigen Stabilisierung des Proteins (Kawall, 2011). Auch bei 3xCherry-Rca1 trat eine Stabilisierung auf, während Rca1-3xCherry noch abgebaut werden konnte (Abb. 2.30). Wie aus den verschiedenen Epitopmarkierungen ersichtlich wird, ist für die Untersuchung der Rca1-Stabilität eine einheitliche Verwendung eines Epitops zwingend erforderlich, um eine Aussage treffen zu können. Da eine N-terminale Epitopmarkierung weder Aktivität noch Stabilität von Rca1 erkennbar beeinflusste, wurde in den Untersuchungen einheitlich die N-terminale HA-NLS-GFP-Epitopmarkierung verwendet.

Rca1 besitzt im N-terminalen Bereich eine NLS-Sequenz, die dazu führt, dass Rca1 zu Beginn der G1-Phase in den Zellkern aufgenommen wird. Im Verlauf der G1-Phase ist Rca1 einem Abbau unterworfen und wird im Zellkern abgebaut. Die Untersuchung eines GFP-Rca1-Derivates mit deletierter NLS-Sequenz führte zu einer Gleichverteilung von Rca1 im Zytoplasma und im Kern. Durch die anteilige zytoplasmatische Lokalisierung weist Rca1 im Vergleich zu vorgeschaltetem HA-NLS-GFP einen deutlich schlechteren Abbau in der G1-Phase auf (Abb. 2.34 B). Vermutlich findet der Abbau von Rca1 größtenteils im Kern statt und nur geringfügig im Zytoplasma. Aus diesem Grund wurde vorsorglich eine NLS-Sequenz vor das Fluorochrom fusioniert, um den Abbau aller Rca1-Derivate einheitlich im Zellkern untersuchen zu können. Das ebenfalls vorhandene HA-Epitop besitzt für die Untersuchung der G1-Stabilität im Durchflusszytometer und im live-cell-imaging keine primäre Funktion, es wurde aber in Experimenten zur Rca1-Stabilität nach 4xFlag-Fzr-Überexpression für die Detektion von Rca1 im Westernblot benötigt (Abb. 2.16).

Bei den Untersuchungen der HA-NLS-GFP-Rca1-Deletionen auf ihre G1-Stabilität wurde anfänglich eine Linker-Sequenz zwischen GFP und Rca1 verwendet. Der Linker soll dem Fluorochrom in seiner Struktur etwas mehr Beweglichkeit verleihen, so dass Rca1 in seiner Funktion weniger eingeschränkt ist. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Linker destabilisierend wirkte, was zu einem Zellzyklus-unabhängigen Abbau von Rca1 führte. Untersuchungen der Kontrolle HA-NLS-GFP-(linker) zeigten bei diesem an sich stabilen Protein eine Zellzyklus-unabhängige Instabilität (Abb. 2.32 A, b). Ohne Linker konnte die HA-NLS-GFP-Kontrolle gut detektiert werden (Abb. 2.32 B), so dass die Instabilität eindeutig auf den Linker zurückzuführen war.

Eine genaue Sequenzanalyse ergab für die 21 Aminosäuren lange Sequenz keine besonderen Auffälligkeiten bezüglich der Zusammensetzung auf basische-, saure oder aromatische Aminosäuren. Die Sequenz beinhaltet jedoch ein R-x-x-L-Motiv, eine Erkennungssequenz für den APC/C-vermittelten Abbau (Abb. 2.31). Zwar kann durch dieses Motiv die Instabilität in der G1-Phase erklärt werden, die generelle Instabilität von Rca1, die durch den Linker hervorgerufen wird, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt.

In den weiteren Experimenten wurde deshalb eine N-terminale HA-NLS-GFP-Fusion an das Rca1-Derivat verwendet, das außer einem Glycin (G) und Serin (S) – resultierend aus der verwendeten BamHI-Schnittstelle – keinen weiteren Linker zwischen GFP und Rca1-Derivat besitzt. Zusätzlich gewährleistet die NLS-Sequenz die Aufnahme des Rca1-Derivates in den Zellkern.

3.2.1.2 Etablierung der Methoden

Die Untersuchung des Rca1-Abbaus sollte in zwei voneinander unabhängigen Methoden erfolgen. Im live-cell-imaging wurden transfizierte Schneiderzellen unter dem Mikroskop über 48 h live verfolgt und in Abbaukurven der Verlauf der Fluoreszenzintensität von GFP- oder Cherry-markierten Rca1-Proteinen in einer Zelle dargestellt. Die Abbaukurven von 10 unabhängigen Zellen eines Rca1-Derivats wurden in einer Kurve zusammengefasst, welche die Abbaukinetik eines Rca1-Derivates in der G1-Phase darstellt (Abb. 2.3 und 2.4).

In einer zweiten Methode wurden im Durchflusszytometer die Zellzyklusprofile der GFP- und Cherry-transfizierten Schneiderzellen sowie der untransfizierten Zellen bestimmt (Abb. 2.25 B und C). Sollte der Rca1-Abbau eines GFP-epitopmarkierten Rca1-Derivats untersucht werden, wurde HA-NES-3xCherry als stabile Kontrolle verwendet. Aus den Durchflusszytometriemessungen ergab sich für ein stabiles HA-NLS-GFP eine relative G1-Stabilität von 1,0 (Abb. 2.25 E) und für das C-terminale Rca1-GFP-Fusionsprotein ein Wert von 0,35 (Abb. 2.26 D). Je schneller ein Protein in der G1-Phase abgebaut wird, desto weniger Zellen werden im Durchflusszytometer im Vergleich zum Kontrollprotein detektiert. Aus diesem Grund liegt der Wert von HA-NLS-CyclinB_Del-286-530-2xGFP mit 0,14 (Abb. 2.27 D) auch unterhalb von Rca1-GFP, da es deutlich schneller abgebaut wird (Abb. 2.7).

Beide Methoden, die Berechnung der G1-Stabilität aus den Daten der Durchflusszytometrie und die Ermittlung der Abbaukinetik in Abbaukurven aus live-cell-imaging-Aufnahmen, ergeben ähnliche Stabilitätswerte für die jeweiligen Rca1-Derivate. Um die Werte beider Methoden vergleichen zu können, wurde in den Abbaukurven der Zeitpunkt $t=200$ min nach Beginn der Anaphase als Referenzpunkt gewählt. Zu dieser Zeit ist der Abbau von Rca1 nahezu abgeschlossen und die meisten Zellen sollten sich noch in der G1-Phase befinden. Mit diesen Berechnungen wurden für das stabile Kontrollprotein HA-NLS-GFP die Werte Durchflusszytometer/Abbaukurve von 0,99/0,99 erhalten, während für das in der G1-Phase instabile Rca1-GFP die Werte 0,35/0,37 erhalten wurden (Abb. 2.29).

Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Überexpression eines aktiven Rca1 einen G1-S-Phase-Übergang induzieren kann, so dass die Zellen sehr kurz in der G1-Phase verweilen oder direkt in die S-Phase eintreten. In den Abbaukurven wurde hingegen mithilfe des Kontrollplasmids auf Zellen selektioniert, die sich in der G1-Phase befanden. Dieser Nachweis erfolgte für ein GFP-Rca1-Derivat über ein co-transfiziertes, inaktives und

abbaubares Rca1-3xCherry. Nach der Zellteilung die Signalintensität von Rca1-3xCherry bis zum „normalen“ Level ab, konnten die Zellen eine G1-Phase etablieren und auch über einen ausreichend langen Zeitraum aufrechterhalten, so dass der Abbau des GFP-Rca1-Derivats in den Abbaukurven bestimmt werden konnte. Im Durchflusszytometer hingegen wird der DNA-Gehalt aller Zellen bestimmt. Da die Überexpression eines aktiven Rca1 neben einer Verkürzung der G1-Phase auch den direkten Eintritt in die S-Phase zur Folge haben kann (unveröffentlichte Daten), wird Rca1 in einigen Fällen nicht mehr abgebaut und das Verhältnis von GFP zu Cherry verringert sich. So ergibt sich zum Beispiel für das aktive HA-NLS-GFP-Rca1 ein Wert von 0,66 im Vergleich zum Wert von 0,22 aus den Abbaukurven. Die Veränderung des Zellzyklusprofils durch den G1-S-induzierenden Effekt von Rca1 führte zu kleinen G1-Populationen, bei denen der G1-Abbau von Rca1 in Zellzyklusprofilen des Durchflusszytometers nicht mehr verlässlich bestimmt werden konnte. Allerdings konnte durch das Zellzyklusprofil die Aktivität der verschiedenen Rca1-Derivate quantifiziert werden, mit der ein G1-S-Phase-Übergang induziert wurde.

So ergab sich für das aktive HA-NLS-GFP-Rca1 der Wert 4,31 (Abb. 2.28 C), während der Wert eines inaktiven HA-NLS-GFP bei 1,72 liegt (Abb. 2.28 B). Die relative Rca1-Funktionalität ergibt sich aus der Normierung durch das aktivste Rca1, HA-NLS-GFP-Rca1. Je geringer der Wert ist, desto weniger aktiv ist das zu untersuchende Rca1-Derivat. Ein Wert von 0,40 ($1,72/4,31$) entspricht einem vollständig inaktiven Protein (Abb. 2.28 D). Wird anhand dieser zweiten Formel eine Aktivität bei einem Rca1-Derivat festgestellt, führt das zwangsläufig zu einer Abweichung des ursprünglichen Wertes für die G1-Stabilität und die Messungen im Durchflusszytometer können nicht für die Bestimmung des Rca1-Abbaus herangezogen werden. In diesem Fall wurde auf die Werte der Abbaukurven zurückgegriffen.

Da das HA-NLS-GFP vor allen Rca1-Derivaten identisch ist, wird es in Zukunft mit *Rca1 abgekürzt.

3.2.2 Die Eingrenzung der Abbausequenz/en in Rca1

In früheren Arbeiten in *Drosophila*-Embryonen konnte die Sequenz, die für den Abbau von Rca1 benötigt wird, bereits auf einen kleinen Bereich eingegrenzt werden (Zielke, 2006; Radermacher, 2007). Dies wurde im Zellkultursystem noch einmal verifiziert, um zu überprüfen, ob dies auch für Schneiderzellen zutrifft.

Ein Sequenzvergleich von Rca1 mit Emi1 hat ergeben, dass Rca1 mehrere funktionale Domänen mit Emi1 gemeinsam hat (Kapitel 2.6.3.1, Abb. 2.3). Für Emi1 konnte gezeigt werden, dass für den Abbau zwei Domänen notwendig sind. Neben einer Phosphorylierung an der GSK3-Phosphorylierungsstelle müssen auch mehrere Cdk1-Phosphorylierungsstellen phosphoryliert werden, damit der SCF^{βTRCP}-vermittelte Abbau erfolgen kann (Guardavacaro, 2003; Hansen, 2004; Margottin-Goguet, 2003; Moshe, 2004). Die Untersuchung der konservierten Bereiche in Rca1 konnte zeigen, dass keine der Domänen alleine für den Abbau von Rca1 verantwortlich ist (Abb. 2.35). Zwar war für *Rca1 (a), *Rca1_dCdk1-P (b) und für *Rca1_dGSK (e) in der Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten eine Stabilisierung zu erkennen, die Berechnung der Rca1-Funktionalität zeigte jedoch für alle drei Rca1-Derivate eine Aktivität an. Weil die Überexpression eines aktiven Rca1-Derivates in Schneiderzellen die erhaltenen Werte der Durchflusszytometrie unbrauchbar werden lassen (3.2.1), wurden die Werte der Abbaukurven der Auswertung zu Grunde gelegt. Hierbei zeigte sich für keines der untersuchten Rca1-Derivate eine Stabilisierung (Abb. 2.35 C, D). Im Gegensatz zu Emi1, wo die Deletion der GSK3-Phosphorylierungsstelle oder der Cdk1-Phosphorylierungsstellen ausreichte, um eine vollständige Stabilisierung herbeizuführen, konnte bei Rca1 kein stabilisierender Effekt durch die Deletion der für den Emi1-Abbau verantwortlichen Domänen erzielt werden. Dieses Ergebnis spiegelt auch in Schneiderzellen den unterschiedlichen Abbau von Rca1 wieder, wie er bereits in *Drosophila*-Embryonen gezeigt werden konnte. Weiterhin offen bleibt die Möglichkeit, dass es neben einer dieser Domänen einen zweiten Bereich gibt, der für den Abbau von Rca1 hinreichend ist. In diesem Fall könnte erst durch die Deletion beider Abbausequenzen eine Stabilisierung von Rca1 erreicht werden.

In *Drosophila*-Embryonen konnte durch N-terminale Verkürzungen eine Stabilisierung von Rca1 nach 234 Aminosäuren erzielt werden, während die Deletion der ersten 220 Aminosäuren noch zu einem Abbau führte (Radermacher, 2009). In Schneiderzellen konnten übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Während *Rca1_Del-1-220 als aktives Rca1 in Abbaukurven noch einem Abbau unterworfen war, kam es bei einer Verkürzung um weitere 14 Aminosäuren bei dem Rca1-Derivat *Rca1_Del-1-234 zu einer deutlichen Stabilisierung (Abb. 2.36). Dieser 14 Aminosäuren umfassende Bereich beinhaltet neben zwei Lysinen (K) auch ein Serin (S) und ein Threonin (T) (Abb. 2.37). Diese modifizierbaren Aminosäuren kommen generell für eine Ubiquitylierung (K) oder eine Phosphorylierung (S, T) in Frage und könnten damit direkt am Abbau von

Rca1 beteiligt sein. Die Deletion der 14 Aminosäuren langen Region in Rca1 (*Rca1_Del-221-234) konnte jedoch keine Stabilisierung von Rca1 in der G1-Phase herbeiführen (Abb. 2.37 c). Erst mit der zusätzlichen N-terminalen Deletion der ersten 203 Aminosäuren wurde *Rca1_Del-1-203_Del-221-234 stabilisiert und zeigte nur noch einen geringfügigen Abbau in den Abbaukurven und im Durchflusszytometer (Abb. 2.37 d). In einer zielgerichteten Punktmutagenese im verkürzten *Rca1_Del-1-203 wurden drei der vier modifizierbaren Aminosäuren (S224A, K228R, T232V) mutiert, ohne dass sich dadurch ein stabilisierender Effekt – wie er bei der Deletion der 14 Aminosäure langen Sequenz zu sehen war – ergab (Abb. 2.37 e, f). Zwar steht die Untersuchung der Aminosäure K221 noch aus, dennoch legt dieses Ergebnis den Schluss nahe, dass der Abbau von Rca1 nicht durch eine Modifizierung in dem kurzen Bereich ausgelöst wird. Es muss vielmehr in Betracht gezogen werden, dass die Deletion dieses Bereichs möglicherweise einen negativen Effekt auf die nahegelegene KEN-Box ausübt und dies zur Stabilisierung führt.

Allerdings war die Stabilisierung von Rca1 durch die Deletion der Aminosäuren 221-234 erst mit einer zusätzlichen Deletion der ersten 203 Aminosäuren zu erkennen. Im N-terminalen Bereich von Rca1 muss demnach eine zweite Abbausequenz lokalisiert sein, die alleine ebenfalls hinreichend ist, den Abbau von Rca1 in der G1-Phase einzuleiten. Die Spaltung von Rca1 in ein N-terminales und ein C-terminales Rca1 konnten diesen Verdacht bestätigen (Abb. 2.44). Beide Rca1-Hälften zeigten ein nahezu identisches Abbauverhalten in den Abbaukurven. Interessanterweise ergab ein Vergleich des Abbaus beider Rca1-Hälften mit *Rca1 eine Verdopplung der Halbwertszeit (50%-Signalintensität) und auch eine Verdopplung des Zeitpunktes in dem der minimale Endwert (20%-Signalintensität) erreicht wurde (50%-Wert: *Rca1 bei 80 min, N- und C-terminales *Rca1 bei 160 min bzw. bei 150 min; 20%-Wert: *Rca1 bei 150 min, N- und C-terminales *Rca1 bei 340 min bzw. 310 min) (Abb. 2.8 D). Diese Werte legen nahe, dass beide Abbausequenzen zu gleichen Teilen am Abbau von Rca1 beteiligt sind.

Um die Abbausequenz im C-terminalen Rca1 (*Rca1_Del-1-203) weiter einzugrenzen, wurden C-terminale Rca1-Deletionen vorgenommen (Abb. 2.38). Dabei zeigte sich, dass das Rca1-Fragment *Rca1_Del-1-203_Del-299-411 noch abgebaut werden kann, während die nächst größere Deletion *Rca1_Del-1-203_Del-268-411 im Durchflusszytometer keinen Abbau mehr aufwies. Das dadurch erhaltene „kleinste abbaubare Fragment“ (KAF, *Rca1_Del-1-203_Del-299-411) wurde durch weitere Verkürzungen deutlich stabilisiert. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Deletion am N-Terminus oder am

C-Terminus eingefügt wurde (Abb. 2.39). Da sich die Abbausequenz nicht weiter einschränken ließ, stellte sich die Frage, ob das KAF im Gesamten eine Abbausequenz darstellt, oder ob es sich hierbei um zwei Abbausequenzen handelt, die zusammenwirken müssen, um einen Abbau einleiten zu können.

Direkt am N-Terminus des KAFs ist die KEN-Box-Domäne lokalisiert, die eine bekannte Erkennungssequenz für APC/C^{Fzr}-Substrate darstellt. Wurde in diese KEN-Box die Punktmutation KEN-KAA (E215A-N216A) eingeführt und die KEN-Box dadurch derart verändert, dass eine Substraterkennung über den APC/C^{Fzr}-Komplex nicht mehr stattfinden kann, zeigte sich beim KAF eine deutliche Stabilisierung (Abb. 2.42 e). Im Gegensatz zu einer N-terminalen Deletion wird mit der Einführung von zwei Punktmutationen die Struktur des KAFs nur minimal geändert, so dass die erzielte Stabilisierung mit großer Wahrscheinlichkeit auf die veränderte Substraterkennung zurückzuführen ist. Aufgrund der zweiten Abbausequenz im N-terminalen Teil von Rca1 (Rca1_Del-204-411) wurde dieser stabilisierende Effekt bei der Untersuchung der KEN-Box-Domäne im „volle Länge“-Rca1 nicht entdeckt, da die zweite Abbausequenz die KEN-Box-Funktion vermutlich vollständig übernehmen kann.

Ein Sequenzvergleich des KAFs aus verschiedenen *Drosophila*-Spezies lieferte neben einer hohen Konservierung im N-terminalen Bereich, in der die KEN-Box lokalisiert ist, zusätzlich eine hohe Konservierung in der C-terminalen Region. Dieser Bereich zwischen den Aminosäuren 264-288 von Rca1 umfasst 25 Aminosäuren (Abb. 2.41 A), darunter mehrere modifizierbare Aminosäuren (1 Serin, 1 Lysin, 2 Cysteine) und auch überdurchschnittlich viele Arginine (6x), die häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (DeLano, 2002). Im Rca1-Ortholog Emi1 wurde ein konservierter Bereich identifiziert, der als Unterstützung für die schwache D-Box-Domäne für eine korrekte Platzierung von Emi1 am APC/C-Komplex sorgt (Frye, *et al.*, 2013). Dieser 20 Aminosäuren umfassende Bereich wurde als Linker bezeichnet und ist bei Emi1 zwischen D-Box und ZBR lokalisiert (Abb. 1.3), während sich die 25 Aminosäuren umfassende Linkerregion in Rca1 zwischen KEN-Box und ZBR befindet. Aufgrund dieser gefundenen Analogie, könnte die Linkerregion in Rca1 – genauso wie bei Emi1 – für eine stabile Anlagerung und vor allem für eine richtige Positionierung von Rca1 an den APC/C^{Fzr} sorgen, damit die ZBR den APC/C^{Fzr}-Komplex in der G2-Phase inaktiv halten kann. Die Stabilisierung, die bei der C-terminalen Verkürzung des KAFs um 31 Aminosäuren gesehen wurde, könnte mit der neuen Linker-Funktion erklärt werden. Da durch die Deletion nahezu die gesamte Linkerregion betroffen ist, ist möglicherweise die KEN-

Box-Domäne alleine zu schwach, um eine ausreichend starke Interaktion mit dem APC/C^{Fzr}-Komplex herstellen zu können.

Um die neu identifizierte Linkerregion in Rca1 näher zu charakterisieren, wurden einzelne konservierte Aminosäuren im KAF in ein Alanin mutiert und auf ihre G1-Stabilität im Vergleich zum ursprünglichen KAF getestet. Dabei führte eine Punktmutation in der Linkerregion in den meisten Fällen zu einer Destabilisierung (Abb. 2.41). Eine Ausnahme bildeten die beiden Punktmutationen R275A und K277A, sowie die Doppelmutante R275A-K277A, die zu einer Stabilisierung führten (Abb. 2.42). Möglicherweise kommt diesen beiden Aminosäuren eine besondere Bedeutung in der Protein-Protein-Wechselwirkung zuteil, so dass eine Veränderung einer dieser beiden Aminosäuren dazu führt, dass die Interaktion der Linkerregion mit dem APC/C^{Fzr}-Komplex soweit abgeschwächt wird, dass die KEN-Box-Domäne alleine nicht mehr ausreichend ist, um eine APC/C-Bindung herbeiführen zu können.

Dieses Argument wird mit der KAF-Doppelmutante KEN-KAA_K277A bekräftigt (Abb. 2.42 f), da sowohl eine KEN-Box-Mutation wie auch eine Punktmutation im essentiellen Bereich der Linkerregion die Interaktion mit dem APC/C soweit abschwächt, dass eine stabile Bindung nicht mehr stattfinden kann. Trifft diese Hypothese zu, wäre das der Grund, warum die Doppelmutation zu keiner weiteren Stabilisierung führt.

Während die Punktmutanten R275A und K277A zu einer Stabilisierung führten, konnte für alle anderen Punktmutationen im KAF eine Destabilisierung festgestellt werden. Anhand der bisherigen Argumentation würde die Destabilisierung – hervorgerufen durch die verschiedenen Punktmutanten – eine stärkere APC/C^{Fzr}-Bindefähigkeit bedeuten. Eine besonders deutliche Destabilisierung des KAF war bei der Punktmutante R280A zu sehen (Abb. 2.43 b). Eine mögliche Erklärung für diesen starken Effekt ist die Veränderung der großen Seitenkette mit einer positiv geladenen Guanidingruppe bei Arginin hin zu einer kurzen und hydrophoben Seitenkette bei Alanin. Solch eine starke Veränderung kann einen großen Effekt auf benachbarte Aminosäuren besitzen. Um die Veränderung etwas moderater zu gestalten, wurde in einer weiteren Punktmutante das Arginin in ein Lysin mutiert, das anstatt der Guanidingruppe ein primäres Amin in der Seitenkette trägt. Allerdings zeigte auch die Punktmutation R280K einen deutlich stärkeren destabilisierenden Effekt (Abb. 2.43 c). Da das Arginin im Zentrum des am höchsten konservierten Bereiches lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass diesem Bereich eine wichtige Funktion in der Linkerregion zuteil wird. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Funktion dieses Bereiches und vor allem der Linkerregi-

on näher charakterisieren zu können. Es zeichnet sich jedoch ab, dass Rca1 in der C-terminalen Region zwei Bereiche besitzt, die für eine Interaktion mit dem APC/C notwendig sind. Dabei handelt es sich zum einen um die KEN-Box und zum anderen um die Linkerregion, die vermutlich für die korrekte Platzierung am APC/C sorgt, damit die ZBR-Domäne den APC/C^{F^{zr}}-Komplex inhibieren kann.

Neben der Abbausequenz im C-terminalen Teil von Rca1 (*Rca1_Del-1-203), konnte auch im N-terminalen Teil von Rca1 (Rca1_Del-204-411) ein Abbau in der G1-Phase beobachtet werden (Abb. 2.44). Um die Abbausequenz in diesem Bereich weiter einzugrenzen, wurden N-terminale Deletionen vorgenommen (Abb. 2.45). Dabei zeigten die Auswertungen ein uneinheitliches Bild. Während N-terminale Deletionen in der G1-Phase teilweise vollständig stabilisiert waren (Abb. 2.45 d, g), zeigte das kürzeste Fragment, das nur aus der F-Box-Domäne besteht (*Rca1_Del-1-154_Del-204-411, Abb. 2.45), eine deutliche Instabilität an. Die F-Box-Region bildet eine recht strukturierte Domäne aus (Frye, *et al.*, 2013), die durch die Deletionen in einer nicht vorhersagbarer Weise beeinflusst werden könnte. Die dadurch fehlerhaft gefalteten Proteine könnten generell eine allgemeine, nicht abschätzbare Instabilität hervorrufen. Aufgrund der generell aufgetretenen G1-Instabilität in den Daten der Durchflusszytometrie für die N-terminale Deletion der ersten 100 Aminosäuren, lässt sich keine Aussage über die Stabilität der noch weiter verkürzten Rca1-Deletionen treffen (Abb. 2.45). Jedoch zeichnete sich zwischen Aminosäure 50 und 75 sowohl bei der Auswertung der G1-Stabilität im Durchflusszytometer als auch bei den Abbaukurven eine deutliche Stabilisierung des N-terminalen Rca1 ab (Abb. 2.45 c, d). Aus diesem Grund wurden weitere N-terminale Rca1-Deletionen erstellt, um die Abbausequenz genauer eingrenzen zu können. In diesen N-terminalen Rca1-Derivaten war die F-Box deletiert, so dass die generelle Instabilität, die durch die F-Box hervorgerufen worden ist, wieder ausgegrenzt werden konnte. Dabei zeigte sich für *Rca1_Del-76-411 eine Instabilität in der G1-Phase, wohingegen *Rca1_Del-1-75_Del-151-411 stabilisiert vorlag (Abb. 2.46). Dieses Ergebnis deutet auf eine Abbausequenz in den ersten 75 Aminosäuren hin.

Allerdings sind die Ergebnisse für die Eingrenzung der Abbausequenz im N-terminalen *Rca1_Del-204-411 nicht sehr aussagekräftig, da für die Auswertung nur die Abbaukurven verwendet werden konnten, während die Daten aus der Durchflusszytometrie von Messung zu Messung teilweise deutlich voneinander abwichen.

Insgesamt konnten in Rca1 mehrere Bereiche ausgemacht werden, die für einen Rca1-Abbau in der G1-Phase verantwortlich gemacht werden können. Neben der Abbause-

quenz im N-terminalen Bereich, die vermutlich zwischen Aminosäure 50-75 lokalisiert ist (Abb. 2.45 c und d), konnte in der C-terminalen Hälfte von Rca1 neben der KEN-Box auch die Linkerregion als zusätzliche Region identifiziert werden, die für den Abbau notwendig ist (Abb. 2.42). Bei letzteren handelt es sich allerdings um keine autarken Abbausequenzen sondern beide bilden gemeinsam eine Abbausequenz aus.

3.2.3 Das Rca1 Funktions- und Degradationsmodell

Während die bisherigen Analysen der Eingrenzung der Abbausequenzen dienten, konnten aus den Daten der Durchflusszytometrie zusätzlich auch Aussagen über die Aktivität von Rca1 erhalten werden.

Die Schwierigkeit bei den Auswertungen beruht auf den zwei verschiedenen Funktionen von Rca1: Neben der Inhibierung des APC/C^{Fzr}-Komplexes in der G2-Phase und am G2/M-Phase-Übergang (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002), konnte auch eine Interaktion mit Komponenten des SCF-Komplexes nachgewiesen werden (Zielke, 2006). Rca1-Überexpressionsstudien konnten zeigen, dass die Überexpression von Rca1 verfrühte S-Phasen induzieren kann, für die die F-Box auch notwendig ist (persönliche Mitteilung Martina Frank). Die Deletion dieser Domäne führte auch in Schneiderzellen zu einem vollständigen Funktionsverlust (Abb. 2.47 b). Neben der F-Box führte auch eine Mutation in der KEN-Box (KEN-KAA) und der ZBR-Domäne (C351S) zu einem vollständigen Funktionsverlust (Abb. 2.47 c, d). In Emi1 führte neben der Mutation in der D-Box und der Mutation in der ZBR-Region auch eine Deletion des RL-Tails zu einem inaktiven Emi1. Es konnte gezeigt werden, dass der RL-Tail die Bindestelle für das humane E2 UBE2S blockiert, so dass der APC/C-Komplex keine Polyubiquitylierungen mehr durchführen konnte (Frye, *et al.*, 2013). Auch bei Rca1 führte die Deletion des RL-Tails zu einem vollständigen Verlust der Funktionalität, so dass auch für Rca1 eine Funktion des RL-Tails sehr wahrscheinlich ist (Abb. 3.1).

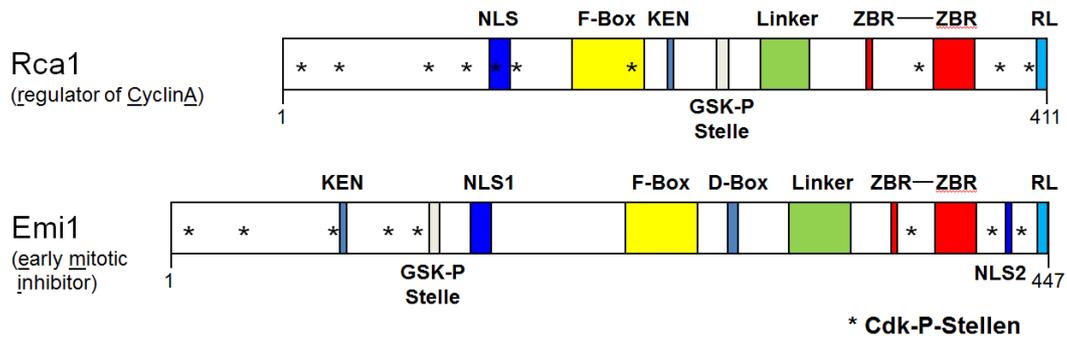


Abbildung 3.1: Erweiterter struktureller Vergleich von Rca1 und Emi1

Schematische Darstellung von *Drosophila*-Rca1 und *Vertebraten*-Emi1.

An der inhibitorischen Funktion von Rca1 ist neben der ZBR und der KEN-Box auch die neu identifizierte Linkerregion und der neu identifizierte RL-Tail beteiligt.

Beide Domänen sind auch in Emi1 vorhanden, so dass Rca1 neben der **NLS** (Kernlokalisationssequenz), **F-Box** (SCF-Interaktionsmotiv), **GSK-P-Stelle** (bei Emi1 Erkennungssequenz für den SCF^{βTRCP}-vermittelten Abbau), **ZBR** (Zinkbinderegion, APC/C-Inhibition) und ***Cdk-P-Stellen** (mögliche Phosphorylierungsstellen der Cdk1), zwei weitere funktionelle Domänen mit Emi1 gemeinsam hat.

Dieser Funktionalitätsverlust war vollständig und zeigte auch bei der Dreifachmutante *Rca1_E215A-N216A_C351S_Del-405-411 keinen größeren Effekt (Abb. 2.48). Der Verlust der Aktivität ist dabei vollkommen unabhängig von der Stabilität, da selbst die Dreifachmutante noch einen normalen Abbau besitzt (Abb. 2.48). Selbst bei der Deletion der N-terminalen Abbausequenz offenbart sich für die Dreifachmutante ein verhältnismäßig guter Abbau (Abb. 2.48 h). Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen im KAF, für das gezeigt werden konnte, dass die Inaktivierung der KEN-Box zu einer Stabilisierung des gesamten Rca1-Fragments führt (Abb. 2.42). Die neueren Ergebnisse zeigen jedoch, dass im N-terminal verkürzten Rca1-Derivat eine KEN-Box-Mutation zu keiner Stabilisierung führt. Eine Erklärung hierfür liefert der Vergleich verschiedener Rca1-Deletionen mit dem Pendant mit zusätzlich eingeführter C351S-Mutation in der ZBR-Region (Abb. 2.49). Darin ist zu erkennen, dass die Einführung einer zusätzlichen C351S-Mutation in der ZBR in allen Fällen zu einer Destabilisierung des Rca1-Derivates führt. Zwar geht mit der Punktmutation C351S die Fähigkeit verloren, den APC/C-Komplex in der G2-Phase zu inaktivieren, wodurch die Rca1-Derivate einem stärkeren Abbau unterworfen sein dürften, dies erklärt jedoch nicht, warum ein Rca1-Derivat wie das KAF mit KEN-Box-Mutation, das keine Interaktionsfähigkeit mit dem APC/C^{Fzr}-Komplex mehr besitzen sollte und nicht mehr als APC/C-Substrat zu erkennen sein sollte, dennoch abgebaut wird.

Aus den ermittelten Daten der G1-Stabilität und Rca1-Funktionalität zusammen mit den Abbaukurven kann das für Emi1 gezeigte Modell (Frye, *et al.*, 2013) auf Rca1 übertragen werden und wird durch die Ermittlung der Abbausequenz noch weiter ergänzt:

Der Abbau von Rca1 wird über zwei distinkte Abbausequenzen eingeleitet. Neben einem N-terminal lokalisierten Bereich kann auch die KEN-Box zusammen mit der Linkerregion den Abbau einleiten. Für den Abbau muss Rca1 an den APC/C-Komplex binden, was vermutlich über die KEN-Box als Erkennungssequenz geschieht. Dabei wird die KEN-Box nur von dem Aktivator Fzr erkannt, der mithilfe der WD40-Domäne zusammen mit Apc10/Doc1 eine Substrat-Bindestelle ausbildet, so dass das E2-Enzym in der Lage ist, das Ubiquitinmolekül an das Substrat zu übertragen

Die Linkerregion verstärkt die Bindung an den APC/C^{Fzr}-Komplex und stellt zusätzlich die richtige Positionierung der ZBR-Domäne her, damit Rca1 den APC/C-Komplex inaktiv halten kann (Abb. 3.2 A). Neben der Inaktivierung des APC/C über die ZBR blockiert der RL-Tail von Rca1 die Bindestelle des polyubiquitylierenden E2-Enzyms Ube2S an den APC/C, so dass Substrate, die an den APC/C-Komplex binden können, keine Polyubiquitylierungen erfahren und somit auch nicht im Proteasom abgebaut werden (Abb. 3.2 A). In einem *in vitro*-Ubiquitylierungsassay konnte Emi1 durch eine Punktmutation in der ZBR von einem Inhibitor zu einem Substrat des APC/C-Komplexes verwandelt werden (Miller, *et al.*, 2006). Solch ein Mechanismus ist auch für Rca1 denkbar. Dazu müsste eine Phosphorylierung zum Beispiel in der Nähe der ZBR die APC/C-Inhibition aufheben. Auch der RL-Tail, der eine Polyubiquitylierung verhindert, könnte durch diese oder eine weitere Phosphorylierung die Bindestelle für Ube2S freigeben. Unterstützt wird dieses Modell vom KAF (kleinstes abbaubares Rca1-Fragment), das über die KEN-Box und die Linkerregion noch an den APC/C^{Fzr} binden kann, aber durch den fehlenden C-Terminus nicht mehr in der Lage ist, eine inhibierende Wirkung auszuüben. Dadurch wird KAF als Substrat erkannt und polyubiquityliert (Abb. 3.2 B). Durch die Deletion der inhibierenden Elemente wurde KAF von einem Inhibitor in ein Substrat des APC/C^{Fzr} umgewandelt und wird wie ein normales APC/C-Substrat ubiquityliert (Abb. 3.2 C). Während bei APC/C-Substraten eine Veränderung der Erkennungssequenz häufig zur Stabilisierung führt, konnte dies für Rca1 nicht gezeigt werden (Abb. 2.35 d), da Rca1 im N-terminalen Bereich noch eine weitere Abbausequenz besitzt (Abb. 2.44 c). Erst ohne den N-Terminus führte eine Punktmutation in der KEN-Box (KEN-KAA) im KAF zu einer Stabilisierung, da die Linkerregion alleine für eine Substratbindung an den APC/C-Komplex nicht ausreichend ist. Ebenso benötigt die

KEN-Box als relativ schwache Erkennungssequenz die Linkerregion für eine feste Bindung. Eine Punktmutation in der Linkerregion an Position R275A bzw. K277A führte trotz intakter KEN-Box zu einem stabileren Rca1-Fragment (Abb. 2.42).

Die drei Domänen, KEN-Box (+ Linker), ZBR und RL-Tail tragen auf unterschiedlichen Wegen zur Inhibierung des APC/C^{Fzr}-Komplexes bei, müssen aber zusammenwirken, um die Inhibierung aufrecht halten zu können. Die F-Box-Domäne hingegen ist nicht an der Inhibition des APC/C-Komplexes beteiligt, sondern ermöglicht es Rca1 als Aktivatorprotein des SCF-Komplexes als negativer Regulator für den G1-S-Phase-Übergang bestimmte Substrate für den Abbau zu markieren.

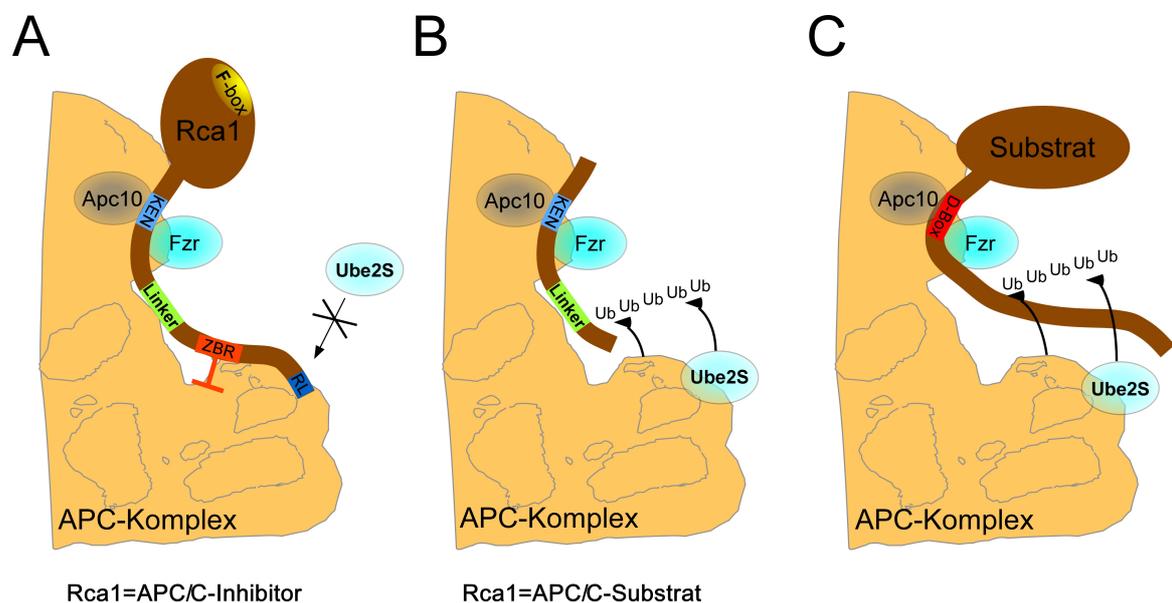


Abbildung 3.2: Modell: Rca1 – Inhibitor und Substrat des APC/C^{Fzr}

(A) Rca1 bindet über die KEN-Box-Erkennungssequenz an den APC/C^{Fzr}-Komplex. Die Linkerregion verstärkt die Bindung und stellt zusätzlich die richtige Positionierung der ZBR-Domäne her, so dass Rca1 den APC/C-Komplex inaktiv halten kann. Der RL-Tail blockiert die Bindestelle des polyubiquitylierenden E2-Enzyms Ube2S an den APC/C und verhindert dadurch Polyubiquitylierungen.

(B) Das kleinste abbaubare Fragment KAF kann über die KEN-Box und die Linkerregion noch an den APC/C^{Fzr} binden. Die fehlende ZBR und der fehlende RL-Tail lassen KAF zu einem APC/C-Substrat werden.

(C) Ein normales APC/C-Substrat besitzt keine inhibitorischen Domänen und wird nach Bindung an den APC/C-Komplex ubiquityliert.

3.3 Die Etablierung eines *Drosophila*-spezifischen *in vitro*-Ubiquitylierungsassays

Im Verlaufe dieser Arbeit verdichteten sich die Hinweise, dass Rca1 vom Inhibitor des APC/C^{Fzr}-Komplexes in der G2-Phase zu einem späteren Zeitpunkt selbst als Substrat erkannt und abgebaut werden könnte (3.1). Um einen direkten Nachweis erbringen zu können, dass Rca1 spezifisch vom APC/C^{Fzr} abgebaut wird, ist es wichtig, einen *in vitro*-Assay zu etablieren, in dem die Ubiquitylierung durch den APC/C direkt nachgewiesen werden kann. In einem ersten Experiment wurde getestet, ob Rca1 in Hefen ebenfalls APC/C spezifisch abgebaut wird, es konnte jedoch keine Destabilisierung in der G1-Phase festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei Rca1 handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor vom *Drosophila*-APC/C^{Fzr} und der Verdacht liegt nahe, dass Rca1 auch nur von einem *Drosophila*-APC/C-Komplex als Substrat erkannt wird. Daher war es von Bedeutung, einen *Drosophila*-spezifischen Ubiquitylierungsassay zu etablieren. Langfristig gesehen soll dieser Assay nicht nur dem Nachweis von Rca1 als Substrat dienen, sondern auch zur Identifizierung der Abbausequenz und des Bereiches beitragen, der für die Inhibition zuständig ist.

Die Etablierung eines Ubiquitylierungsassays basierend auf *Drosophila*-Komponenten wurde dabei Schritt für Schritt durchgeführt. Zu Beginn wurden die einzelnen Komponenten aufgereinigt, die an einer Ubiquitylierung über den *Drosophila*-APC/C^{Fzr} beteiligt sind. Dies beinhaltete das E1-Enzym 6xHis-Uba1 (2.4.1.3) und die beiden E2-Enzyme Effete-6xHis (2.4.1.4.3) und Vihar-6xHis (2.4.1.4.2) aus *Drosophila*. Weil in einer vorherigen Arbeit in einem *in vitro*-Assay mit gekauftem, humanem Ubch5b als E2-Enzym eine Polyubiquitylierung von *in vitro* translatiertem (IVT) CyclinB-N285 gesehen werden konnte (Höfer, 2011), wurde das humane Ubch5b-6xHis ebenfalls aufgereinigt und in dem Assay als Positivkontrolle verwendet. In einem Ubiquitin-E2-Aktivitätsassay wurden die Enzyme auf ihre Fähigkeit getestet, die ersten beiden Schritte der Ubiquitylierungskaskade durchzuführen: die Aktivierung von Ubiquitin durch das E1-Enzym und die Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf das E2-Enzym. Dies konnte durch mehrere Beobachtungen sowohl für gekauftes, humanes E1- und E2-Enzym als auch für die aufgereinigten 6xHis-Uba1 (E1) und Effete-6xHis (E2) bestätigt werden (2.4.1.5, Abb. 2.58-2.60). Die Übertragung eines FLAG-Ubiquitins auf Ubch5b und Effete-6xHis wurde in einem Westernblot mit FLAG-Antikörper nachgewiesen und die Menge an eingesetztem Enzym über den His-Antikörper überprüft. Mit großer

Wahrscheinlichkeit ist zwischen dem FLAG-Ubiquitin und dem E1- bzw. E2-Enzym eine Thioesterbindung geknüpft worden, da eine Behandlung mit DTT wieder zur Reduktion der Thioesterbindung führte und eine deutliche Abnahme des Signals zur Folge hatte. Für eine vollständige Reduktion reichte vermutlich die Menge an zugegebenem DTT nicht aus. Während das gekaufte E1-Enzym im FLAG-Blot durch Bindung von FLAG-Ubiquitin ein starkes Signal zeigte und auch im His-Blot nachgewiesen werden konnte, fehlte ein Signal von 6xHis-Uba1. Interessanterweise fand auch in Abwesenheit eines E1-Enzyms eine Übertragung von FLAG-Ubiquitin auf die E2-Enzyme statt. Möglicherweise führt ein Überschuss an FLAG-Ubiquitin und E2-Enzym zu einer langsamen Knüpfung einer Thioesterbindung, was als Artefakt des *in vitro*-Aktivitätstests angesehen werden kann.

Von den verschiedenen 6xHis-Uba1 Aufreinigungen zeigte das monomere 6xHis-Uba1 aus der Gelfiltration eine Aktivität, obwohl im FLAG-Blot kein gebundenes FLAG-Ubiquitin am 6xHis-Uba1 nachgewiesen werden konnte (2.4.1.5, Abb. 2.59). Dies lässt vermuten, dass eine geringe Menge an E1-Enzym ausreicht, um FLAG-Ubiquitin zu übertragen. Aber erst nach einer 10-fachen Aufkonzentrierung des aktiven 6xHis-Uba1 konnte auch 6xHis-Uba1 im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 2.60).

Nachdem aktive Komponenten der *Drosophila*-Ubiquitylierungskaskade erfolgreich aufgereinigt werden konnten, stellte sich als nächstes die Frage, ob mit den aufgereinigten Komponenten eine APC/C^{Cdh1/Fzr}-Ubiquitylierung im Kaninchen Retikulozytenlysat stattfindet. In einem früheren Experiment konnte eine Ubiquitylierung von IVT CyclinB_N285-10xHA im Retikulozytenlysat nachgewiesen werden (Höfer, 2011). Da es sich bei CyclinB aber um ein Substrat sowohl des APC/C^{Fzy} als auch des APC/C^{Fzr} handelt, sollte ein reines APC/C^{Fzr}-Substrat zur Anwendung kommen. Untersuchungen in *Drosophila*-Schneiderzellen ergaben, dass ein C-terminal verkürztes und epitopmarkiertes Geminin_Del-102_192-GFP noch als Substrat vom APC/C^{Fzr} erkannt und in der G1-Phase abgebaut wird (Kawall, 2010). Aus diesem Grund wurde Geminin_Del-102-192-10xHA im Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert und eine erste Ubiquitylierungsreaktion mit UbcH5b angesetzt. Dabei waren nach 60 Minuten klare Polyubiquitylierungsbanden von Geminin_Del-102-192-10xHA zu erkennen, während die Ausgangsmenge an verkürztem Geminin reduziert war (2.4.1.6, Abb. 2.61).

Um langfristig die Ubiquitylierungsreaktion ohne Retikulozytenlysat durchführen zu können, wurde das verkürzte Geminin ebenfalls in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt. Ein direkter Vergleich von aufgereinigtem Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis mit

IVT Geminin_Del-102-192-10xHA ergab eine deutlich bessere Ubiquitinylierungsreaktion für das aufgereinigte Geminin (2.4.2.1, Abb. 2.62). Warum in diesem Ansatz keine Ubiquitinylierung von IVT Geminin_Del-102-192-10xHA zu sehen war, ist unklar. Zwar war in dem Retikulozytenlysat deutlich weniger Substrat vorhanden als beim aufgereinigten Geminin, aber selbst eine deutlich stärkere Laserintensität beim Einscannen des Westernblots brachte keine erkennbaren Ubiquitinylierungsbanden zum Vorschein. Mit der Untermischung von FLAG-Ubiquitin in die Ubiquitinylierungsreaktion konnte ein inaktives Retikulozytenlysat als Ursache jedoch ausgeschlossen werden. Wird FLAG-Ubiquitin in der Ubiquitinylierungskaskade verwendet, werden alle ubiquitinylierten Proteine im FLAG-Blot sichtbar. Da im Retikulozytenlysat eine Vielzahl an E3-Ligasen aktiv sind, zeigt FLAG-Ubiquitin eine generelle Aktivität aller E3-Ligasen und die Ubiquitinylierung unspezifischer Proteine an. Nachdem im Experiment auch das aufgereinigte Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis polyubiquitinyliert wurde, wurde im Folgenden nur noch mit diesem als Substrat weitergearbeitet.

Als nächstes galt es, die Aktivität der aufgereinigten E2-Enzyme miteinander zu vergleichen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Substratspezifität von E2-Enzymen sehr unterschiedlich sein kann. Manche binden sehr spezifisch nur an eine E3-Ligase, andere wiederum können mehrere E3-Ligasen aktivieren. Ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal der E2-Enzyme beinhaltet ihre Funktion. Manche sind ausschließlich für die Monoubiquitinylierung zuständig, während andere ein bereits monoubiquitinyliertes Protein mit weiteren Ubiquitinmolekülen zu einer Ubiquitinkette verlängern können (Barford, 2011). Neben den bereits im Aktivitätsassay eingesetzten E2-Enzymen UbcH5b und Effete-6xHis wurden zusätzlich noch UbcH5b-6xHis (2.4.1.4.1) und Vihar-6xHis (2.4.1.4.2) aufgereinigt und zu diesem Vergleich herangezogen (2.4.2.2, Abb. 2.63).

Das gekaufte, humane E2-Enzym UbcH5b (Enzo) zeigte dabei die größte Aktivität und konnte deutlich mehr Substrat ubiquitinylieren als UbcH5b-6xHis und Effete-6xHis, die in etwa die gleiche Effizienz zeigten. Vihar-6xHis hingegen konnte das Substrat Geminin-10xHA-6xHis kaum ubiquitinylieren. Da der Ubiquitinylierungsassay im Kaninchen Retikulozytenlysat durchgeführt wurde, ist es nicht verwunderlich, dass ein Vertebraten E2-Enzym die Vertebraten Ubiquitin-Ligasen besser stimulieren kann als Effete oder Vihar aus *Drosophila*. UbcH5b ist als ein unspezifisches E2-Enzym bekannt, das in einer Zelle mehrere Ubiquitin Ligasen aktivieren kann (Barford, 2011). Da bisher nicht gezeigt werden konnte, dass im Retik-Lysat spezifisch der APC/C-Komplex für die

Ubiquitylierung von Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis verantwortlich ist, müssen alle Ubiquitin-Ligasen als potentielle Kandidaten in Betracht gezogen werden. In diesem Fall würde UbcH5b verstärkt Einfluss nehmen. Damit kann jedoch nicht erklärt werden, warum die Aktivität des aufgereinigten UbcH5b-6xHis im Vergleich zu UbcH5b (Enzo) so deutlich abfällt. Die Ursache könnte in der methodischen Aufreinigung zu suchen sein. Ebenso wahrscheinlich könnte das C-terminale 6xHis-Epitop die Aktivität der E2-Ligasen einschränken, womit nicht nur UbcH5b-6xHis, sondern auch Effete-6xHis und Vihar-6xHis betroffen wären. Letzteres zeigte im Assay keinerlei Aktivität. In der Literatur wird die Funktion von Vihar der frühen Mitosephase und somit APC/C^{Fzy} zugewiesen (Mathe, *et al.*, 2004). Dies würde zumindest die geringe Aktivität in der Ubiquitylierung eines APC/C^{Fzr}-Substrates erklären. Aufgrund dessen wurde es für weitere Assays nicht weiterverwendet und Effete-6xHis blieb als einziges *Drosophila* E2-Enzym übrig. Nachdem ein *in vitro*-Ubiquitylierungsassay etabliert werden konnte, in dem eine Ubiquitylierung von Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis erfolgte, sollte als nächstes ein Nachweis der spezifischen Ubiquitylierung von Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis über den APC/C^{Fzr} erbracht werden.

Dazu wurde Retikulozytenlysat mit NEM/DTT behandelt, um die dort vorhandene Ubiquitylierungsmaschinerie zu inaktivieren. NEM modifiziert dabei Thioestergruppen und inaktiviert die Cysteine in den aktiven Zentren der E1-, E2- und einiger E3-Enzyme. DTT wiederum quentscht das überschüssige NEM, so dass durch Zugabe der Ubiquitylierungsmaschinerie aus den aufgereinigten *Drosophila*-Komponenten eine Aktivierung der Ubiquitylierungskaskade wieder möglich wird. In einem ersten Vorexperiment wurde zunächst das NEM/DTT vorbehandelte Retik-Lysat auf seine Fähigkeit überprüft, neben dem Substrat Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis auch unspezifische Proteine zu ubiquitylieren (2.4.3.1). Es zeigte sich, dass nach NEM/DTT-Behandlung die Zugabe der bisherigen Komponenten nicht ausreichte, um die Ubiquitylierungsmaschinerie wieder zu reaktivieren. Weder für Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis, noch für unspezifische Proteine konnte eine Polyubiquitylierung nachgewiesen werden, was gleichbedeutend ist mit einer erfolgreichen Inaktivierung sämtlicher E3-Ligasen im Retikulozytenlysat.

Der im Ansatz fehlende APC/C-Komplex wurde aus *Drosophila*-Fliegen präzipitiert (2.4.3.1.1) und zusammen mit den aufgereinigten Komponenten zum Retik-Lysat gegeben, in dem zuerst durch IVT der APC/C-Aktivatoren 4xFLAG-Fzr hergestellt wurde

(2.4.3.1.1), bevor durch NEM/DTT-Behandlung die Inaktivierung der Ubiquitylierungsmaschinerie erfolgte.

In anderen Organismen konnte bereits gezeigt werden, dass der APC/C-Komplex über eine Präzipitation einer APC/C-Untereinheit co-präzipitiert werden kann (Zachariae, *et al.*, 1998b). Obwohl dies in *Drosophila* noch nicht bekannt ist, wurde angenommen, dass sich der APC/C-Komplex ebenfalls über eine APC/C-Untereinheit, in diesem Fall GFP-Cdc16 aus *Drosophila*-Fliegen, präzipitieren lässt. Die einzige Möglichkeit des Nachweises lieferte die Detektion im Westernblot über GFP-Antikörper. Alle anderen APC/C-Untereinheiten sind jedoch ohne Epitopmarkierung, weshalb ein Nachweis des co-präzipitierten APC/C-Komplexes ohne spezielle Antikörper nicht möglich ist. Noch ungewisser war die Frage, ob bei der Präzipitation auch der Co-Aktivatör Fzr präzipitiert werden kann, weshalb Fzr vorsichtshalber im Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert wurde.

In diesem Ubiquitylierungsassay konnte die Ubiquitylierung von Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis im NEM/DTT-inaktiviertem Retik-Lysat und dem IVT Co-Aktivatör 4xFLAG-Fzr wieder hergestellt werden, wenn zur Ubiquitylierungsmaschinerie zusätzlich der co-präzipitierte APC/C-Komplex hinzugegeben wurde (2.4.3.1.2, Abb. 2.66). Solange dieses Ergebnis noch nicht verifiziert wurde, muss es aufgrund einiger offener Fragen kritisch hinterfragt werden. Zwar konnte im GFP-Blot die APC/C-Untereinheit GFP-Cdc16 nachgewiesen werden, der Nachweis von anderen APC/C-Untereinheiten würde jedoch Klarheit verschaffen, ob wirklich der gesamte APC/C-Komplex co-präzipitiert werden konnte. Einen interessanten Aspekt erbrachte eine Arbeit, in der berichtet wurde, dass die NEM Behandlung von Retikulozytenlysat eine inhibierende Wirkung auf Cdc20/Fzy besitzt (Enquist-Newman, *et al.*, 2008). Nachdem die *in vitro*-Translation von 4xFLAG-Fzr vor der NEM/DTT-Inaktivierung stattgefunden hat, wurde Fzr vermutlich ebenso inaktiviert und hätte im Ubiquitylierungsassay keinen aktivierenden Effekt als Co-Aktivatör auf den APC/C-Komplex ausüben können. Dies könnte allerdings auch bedeuten, dass eine zusätzliche Zugabe von 4xFLAG-Fzr gar nicht notwendig ist, da genug Fzr bei der Co-Präzipitation des APC/C-Komplexes präzipitiert werden konnte.

Bisher wurde für die Etablierung eines *in vitro*-Ubiquitylierungsassays immer auf das Kaninchen-Retikulozytenlysat als Puffersystem zurückgegriffen, weil es zellähnliche Bedingungen bereitstellt, die für die Reaktionen in einer Ubiquitylierungskaskade dringend erforderlich sind. In einem ersten Versuch wurde das Retikulozytenlysat

durch einfachen Thioesterpuffer ersetzt, wie er beim Ubiquitin-E2-Aktivitätsassay zum Einsatz kommt. In diesem Puffersystem scheinen ähnliche Bedingungen vorzuherrschen, wie sie für eine Ubiquitinylierungsreaktion notwendig sind. Es konnte jedoch keine Ubiquitinylierung von Geminin-Del-102-192-10xHA-6xHis detektiert werden. Eine mögliche Begründung ist beim co-präzipitierten APC/C-Komplex zu finden. Während bei der Nullkontrolle auf dem GFP-Blot ein deutliches GFP-Cdc16-Signal zu erkennen ist, fehlte das GFP-Cdc16-Signal beim Ubiquitinylierungsansatz vollständig. Natürlich trifft auch in diesem Fall die bereits diskutierte Möglichkeit zu, dass kein aktiver APC/C-Komplex co-präzipitiert werden konnte. Aber selbst mit einer geringen Menge an aktivem APC/C könnte in diesem Fall die Menge an co-präzipitiertem Fzr zu gering ausfallen, als dass der APC/C^{Fzr}-Komplex aktiviert werden könnte.

Eine zusätzliche Möglichkeit, die aufwändige und unsichere Immunpräzipitation des APC/C-Komplexes zu umgehen, besteht in der Verwendung eines *Drosophila*-Extraktes. Ein solcher Extrakt wurde bereits erfolgreich für die Transkription und Translation verwendet und scheint ein geeignetes Milieu für biochemische Reaktionen bereitzustellen (Medenbach, *et al.*, 2011). Eine Schwierigkeit besteht darin, *Drosophila*-Embryonen zu verwenden, die in der Embryonalentwicklung gerade in einer Phase angelangt sind, in der Fzr als Co-Aktivator exprimiert wird. Interessanterweise konnte nur in einem *Drosophila*-Extrakt aus 0-8 Stunden alten Embryonen eine Polyubiquitinylierung von Geminin_Del-102-192-10xHA-6xHis erzielt werden (2.4.3.2, Abb. 2.67), während ein *Drosophila*-Extrakt aus 0-12 Stunden alten Embryonen zu keiner Ubiquitinylierung führte (Daten nicht gezeigt). Ob es sich hierbei allerdings um eine spezifische APC/C^{Fzr}-Ubiquitinylierung handelt, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Da in frühen Embryonalstadien in *Drosophila* noch kein Fzr vorhanden ist, hängt die Aktivität des Ubiquitinylierungsassays stark vom Alter der abgelegten Embryonen ab. Dieses Problem könnte umgangen werden, wenn Fzr auf einem alternativen Weg hergestellt werden könnte. Eine Aufreinigung in *E. coli* kommt nicht in Frage, da Fzr, um seine Aktivität zu erlangen, eine korrekte Faltung erfahren muss. Für die korrekte Faltung benötigt Fzr eine eukaryotische Kompartimentierung, die *E. coli* nicht besitzt. Ein bekanntes, eukaryotisches Expressionssystem ist das Baculovirus-System. Dabei handelt es sich um einen Virus, der SF21-Insektenzellen befällt und dort die Expression des gewünschten Proteins einleitet. Neben Fzr benötigt auch Rca1 für eine korrekte Faltung eine eukaryotische Kompartimentierung und wurde in einer ersten Testexpression mit einem FLAG-Epitop in SF21-Zellen überexprimiert. Die weitere Aufreinigung über eine

FLAG-Säule schlug hingegen fehl, weil FLAG-Rca1 nicht an die Säule gebunden hat (2.4.3.3, Abb. 2.68). Zu einem Einsatz von aufgereinigtem FLAG-Rca1 oder FLAG-Fzr ist es in einem Ubiquitylierungsassay deshalb noch nicht gekommen. Zuvor benötigt die Überexpression im Baculo-System noch einige weitere Optimierungsschritte. Zum einen befand sich das meiste FLAG-Rca1 in den Zellkernen, was zu einer geringen Ausbeute im Überstand führte. Zum anderen müssen bei der weiteren Aufreinigung über die FLAG-Säule Bedingungen geschaffen werden, mit denen FLAG-Rca1 und wahrscheinlich auch FLAG-Fzr an die Säule binden und eine weitere Aufreinigung möglich macht.

Neuere Studien zeigen, dass die Aktivität von Fzr zusätzlich vom „*Heat shock protein*“ Chaperon Hsp83, dem *Drosophila*-Ortholog von Hsp90, abhängt (Bandura, *et al.*, 2013). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass für die Aktivierung des APC/C durch Fzr das Chaperon CCT notwendig ist (Camasses, *et al.*, 2003). Während es an dieser Stelle noch mehrere Faktoren abzuklären gilt, konnte die Etablierung eines APC/C^{Fzr}-Ubiquitylierungsassays an anderer Stelle bereits einen entscheidenden Schritt vorankommen. So konnte Matthias Kies in seiner Masterarbeit (2013) mit dem volle Länge Geminin_{10xHA-6xHis} eine noch stärkere Ubiquitylierung erreichen.

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Herstellung und Amplifikation aller Plasmide und Vektoren wurde in dieser Arbeit der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α verwendet.

Genotyp: *F*-, ϕ 80dlacZ_M15_(lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+)*
phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1

Für die Überexpression von Proteinen wurde der BL21-CodonPlus (DE3)-Rosetta Stamm verwendet (NEB).

Genotyp: MiniF lacIq(CamR) / *fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-37::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--TetS) endA1 Δ (mcrC-mrr)114::IS10*
Plasmid pRARE2 *argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL, metT, thrT, tyrU, thrU argX Camr*

4.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Ausgehend von Einzelkolonien oder Glycerinkulturen wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) bei 37 °C entsprechend der vermittelten Antibiotikaresistenz durch das Plasmid in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum (5.7.1) (Sambrook, *et al.*, 1989) angezogen. Bei Anzucht im Flüssigmedium wurden bei kleineren Volumina bis 5 ml Glasröhrchen, für größere Volumina Erlenmeyerkolben verwendet. Für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Bakterien sorgte ein gleichmäßiges Schütteln der Flüssigkulturen bei ca. 200 UpM.

4.1.2 Herstellung elektrokompenter DH5 α -Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 2x 750 ml TB-Medium mit jeweils 40 OD₆₀₀-DH5 α -Zellen aus einer Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden ca. 20 h bei 25 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 geschüttelt, auf Eis abgekühlt und bei 4 °C und 3000 UpM für 15 Minuten pelletiert und in insgesamt sechs Portionen geerntet. Jedes Zellpellet wurde zweimal mit 150 ml kaltem und sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in insgesamt 12 ml kaltem 10%igem Glycerin aufgenommen

und erneut abzentrifugiert (4000 UpM, 10 min). Nach Wiederaufnahme in 2 ml 10%igen Glycerin wurden die Zellen in 100 µl Fraktionen zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

4.2 Arbeiten mit Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde mit den beiden Stammhintergründen AH109 und Y187 des Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) gearbeitet.

4.2.1 Kultivierung von Hefestämmen in Flüssigmedium

Für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* wurde XY-Vollmedium verwendet, das je nach Verwendung 2% Glukose (D), Galaktose (G) oder Raffinose (R) als Kohlenstoffquelle enthielt (5.7.2). Stämme mit aufgenommenem Plasmid wurden unter Selektionsdruck in einem Selektionsmedium entsprechend dem Selektionsmarker (*HIS3*, *LEU2*, *TRP1*, *URA3*) kultiviert. Derart ist auch eine Selektion auf mehrere Plasmide möglich. Dies kommt u.a. beim Hefe-Zwei-Hybrid-System zur Anwendung (4.2.4). Für experimentelles Arbeiten wurden über Nacht Vorkulturen in einem Volumen von 5 ml bei 25 °C angezogen. Die Kultivierung von größeren Kulturen fand in Erlenmeyerkolben im Wasserschüttelbad bei 25 °C statt.

4.2.2 Aufbewahrung von Hefestämmen

Hefestämme können einige Wochen bei 4 °C auf Selektionsplatten aufbewahrt werden. Um sie jedoch dauerhaft zu konservieren, wurden 2 ml einer Übernachtskultur in XYD-Medium geerntet, in 1 ml 15%igem Glycerin aufgenommen und bei -70 °C eingefroren.

4.2.3 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

Hefezellen werden durch eine Behandlung mit Lithiumacetat-Ionen kompetent für die Aufnahme fremder DNA gemacht (Gietz und Woods, 2002).

Dazu wurden 2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur (OD_{600} von ca. 0,7-1) abzentrifugiert (2000 UpM, 2 min) und zweimal in 1 ml sterilem H_2O_{dest} gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurde der vorbereitete Transformationsmix

50% PEG 3350	240 µl
1 M LiAc	36 µl
Heringsperma DNA	50 µl
DNA verd. in sterilem H ₂ O	34 µl

direkt auf das Pellet pipettiert und mehrmals für 10 Sekunden auf dem Vortex-Mixer gemischt. Der Transformationsansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerollert und anschließend 15 Minutenlang bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Die Zellen wurden 12 s bei 13200 UpM abzentrifugiert, je nach vorhandener Zellzahl in entsprechendem Volumen sterilem Wasser (zwischen 250-500 µl) aufgenommen und auf zwei entsprechenden Selektivplatten ausplattiert. Wurde ein Plasmid mit einem Antibiotika-Marker transformiert, wurde der abzentrifugierte Ansatz in 5 ml Vollmedium aufgenommen und für 3 bis 5 h bei 30 °C im Roller inkubiert, um die Ausprägung der Resistenz zu ermöglichen. Danach wurden die Stämme wie oben beschrieben abzentrifugiert, in sterilem Wasser aufgenommen und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen waren Transformanden auf den Platten zu sehen.

4.2.4 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

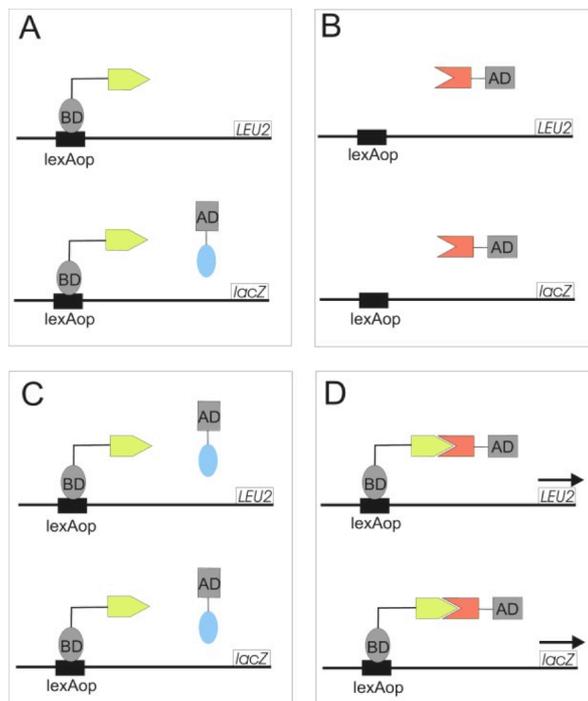


Abbildung 4.1: Das Hefe-Zwei-Hybrid-System
(A und B) keine Transkriptionsaktivierung mit einem Fusionsprotein alleine; (C) keine Interaktion der Proteine, keine Transkriptionsaktivierung; (D) Interaktion beider Proteine

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine *in vivo*-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Brachmann und Boeke, 1997; Fields und Sternglanz, 1994). Grundlage hierfür ist ein Transkriptionsfaktor, der zwei verschiedene Domänen besitzt, eine DNA-Bindedomäne (BD), die an einen *lexA*-Operator bindet, und eine Transkriptionsaktivator-domäne (AD). Werden beide Teile getrennt voneinander exprimiert, wirkt keines als vollständiger Transkriptionsfaktor

und die Transkription der Reportergene *LEU2* und *lacZ* bleibt abgeschaltet (Abb. 4.1 A und B).

Erst durch ihr gemeinsames Zusammenwirken kommt es zum Transkriptionsstart. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden die beiden Domänen auf zwei verschiedene Plasmide verteilt und mit unterschiedlichen Proteinen gekoppelt. In einer Suche können so sämtliche Proteine miteinander auf Interaktion getestet werden. Findet zwischen zwei Proteinen keine Interaktion statt, wird auch die Transkription nicht aktiviert (Abb. 4.1 C). Erst wenn beide Proteine miteinander interagieren, wird durch das Zusammenspiel der DNA-Bindedomäne und der Transkriptionsaktivator-domäne die Expression der Reportergene angeschaltet (Abb. 4.1 D). *LEU2* kodiert für ein essentielles Genprodukt im Leucin-Biosyntheseweg, so dass Hefen nur bei interagierenden Proteinen auf Agarplatten ohne Leucin wachsen können (Wachstumstest). *lacZ* kodiert für die β -Galaktosidase aus *E. coli*. Dieses Enzym kann die chromogene Substanz X-Gal hydrolysieren, wodurch ein blaues Endprodukt entsteht (Farbnachweis).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Hefe-Zwei-Hybrid-System das Matchmaker™ GAL4-Two-Hybrid-System 3 (Clontech) verwendet, um die Interaktion der APC/C-Untereinheit Cdc23 mit Rca1 nachzuweisen. Dazu wurden vor die „multiple cloning site“ (MCS) der beiden Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren pGADT7 (2 μ , Leu2) und pGBKT7 (2 μ , Trp1) zuerst verschiedene Einfach- und Mehrfachepitope (HA, FLAG, Myc) kloniert und in diese Vektoren sowohl Rca1 als auch Cdc23 gebracht, um sowohl AD-Rca1 – BD-Cdc23 als auch BD-Rca1 – AD-Cdc23 auf Interaktion testen zu können. Alle Konstrukte stehen dabei unter der Kontrolle des konstitutiven ADH1-Promotors und sind N-terminal an die Aktivierungs- (im pGADT7-Vektor) und die DNA-Bindedomäne (im pGBKT7-Vektor) fusioniert.

Die beiden Plasmide wurden in zwei unterschiedliche Hefestämme transformiert, pGADT7-Vektoren in den Mat a-Stamm AH109, pGBKT7-Vektoren in den Mat α -Stamm Y187. Als Positivkontrolle diente eine Hefekreuzung beider Stämme mit den Vektoren pGADT7-T und pGBKT7-p53, als Negativkontrolle pGADT7-Lam mit pGBKT7-p53. Um eine Autoaktivierung ausschließen zu können, wurden außerdem jeweils die Ausgangsvektoren (Leervektoren) mit dem Gegenvektor kombiniert (5.10.1 und 5.10.5).

4.2.4.1 X-Gal-Reaktions-Nachweis

Um die Interaktion zwischen zwei Proteinen im X-Gal-Platten-Assay nachweisen zu können, macht man sich den Umstand zunutze, dass beide Stämme AD109 und Y187 unter *GAL1 (URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ)* bzw. *MEL1 (URA3::MEL1UAS-MEL1 TATA-lacZ)* Promotorkontrolle *lacZ* herstellt. Dies geschieht allerdings nur, wenn der Transkriptionsfaktor GAL4 an die UAS bindet. Damit GAL4 binden kann, müssen die beiden Fusionsproteine mit der Aktivator- (pGADT7) und der Bindedomäne (pGBKT7) jedoch miteinander interagieren.

Durch die Verwendung der chromogenen Substanz X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) kann die Expression von β -Galaktosidase auf den Selektivplatten nachgewiesen werden. Dabei spaltet das Enzym β -Galaktosidase das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff als Abbauprodukt. Eine Blaufärbung zeigt somit eine Interaktion der zu untersuchenden Fusionsproteine an.

Für den X-Gal-Farbassay wurden die haploiden Hefestämme zuerst miteinander gekreuzt und auf Selektivplatten SD-Leu-Trp (Kontrollplatte ohne Galaktose) und SRG-Leu-Trp (mit Galaktose) ausgestrichen.

Nach Inkubation der Platten bei 30 °C für zwei bis drei Tage wurden die SRG-His-Trp-Platten mit 10 ml folgender Komponenten überschichtet:

1% Agarose	5 ml
1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0	5 ml
DMFA	600 μ l
10% SDS	100 μ l
X-Gal (20 mg/ml in DMFA)	75 μ l

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h bei 30 °C wurden die Platten auf 4 °C gelagert bis eine Blaufärbung eintrat.

4.2.4.2 Wachstumstest

Für den Wachstumstest wurden die diploiden Hefezellen auf Selektivmedium SD-Leu-Trp-His-Ade ausgestrichen. Dabei dienten Leucin und Tryptophan als Selektionsmarker auf die beiden Plasmide pGADT7 und pGBKT7 und Histidin und Adenin zur Überprüfung der Interaktion zwischen den Fusionsproteinen. Das Wachstum des Hefestammes ist nur dann gewährleistet, wenn durch die Interaktion beider Fusionsproteine der Transkriptionsfaktor GAL4 die Auxotrophie der beiden Ausgangsstämme AD109 und Y187 (*LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3*, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*) komplementieren kann.

Der Vorteil des Wachstumstests ist seine Sensitivität gegenüber den Farbassays. So reicht eine geringe Interaktion beider Fusionsproteine bereits aus, um ein Wachstum zu ermöglichen.

4.3 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

4.3.1 Fliegenhaltung und Zucht

Die Fliegenstammsammlung wurde in mit Schaumstoffstopfen verschlossenen Futterröhrchen bei 18 °C aufbewahrt. Einzelne für Experimente benötigte Fliegenstämme wurden in größere Kollektionskäfige umgeschüttelt und zur Expansion in eine wärmere Umgebungstemperatur von 24 °C gestellt.

4.3.2 Dechorionisieren von *Drosophila*-Embryonen

Für mikroskopische Aufnahmen wurde der entsprechende Fliegenstamm in einen kleinen Kollektionskäfig überführt und mit einer Apfelagarplatte verschlossen. Als Futter diente etwas Hefe in der Mitte der Apfelagarplatte. Die Fliegen legten ihre Embryonen auf die Apfelagarplatte ab. Anschließend konnten die Embryonen mittels eines Pinsels von der Oberfläche abgesammelt werden. Je nachdem, welches Entwicklungsstadium der Embryonen betrachtet werden sollte, wurde die Legezeit der Fliegen entsprechend angepasst.

Die gewonnenen Embryonen wurden in einem kleinen Sieb gesammelt, in PBS-T gewaschen und dadurch Hefereste und Verunreinigungen entfernt. In einer Lösung aus 50%

Chlorbleiche (Klorix) wurden die Embryonen 3 Minuten dechorionisiert und im Anschluss so lange mit Wasser gewaschen, bis kein Chlorgeruch mehr wahrnehmbar war. Für Untersuchungen unter dem Mikroskop wurden die Embryonen mit einer Präpariernadel auf einem 4 cm langen Apfelsaftagarstreifen unter dem Binokular aufgereiht und mit Heptankleber auf einem Deckgläschen fixiert. Um ein Austrocknen der Embryonen zu verhindern, wurden sie mit 10 S Voltalef Öl überschichtet. Das Deckgläschen konnte in eine Aussparung eines Objektträgers eingesetzt und die Embryonen unter dem Mikroskop betrachtet werden.

4.3.3 Das UAS/Gal4-System

Für die Expression in *Drosophila* wurde das UAS/Gal4-System verwendet (Brand und Perrimon, 1993). Es ermöglicht die ektopische Expression von Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Gewebe. Dieses binäre System besteht aus einer UAS- und einer Gal4-Treiberlinie. In der Gal4-Linie wird der hefespezifische Transkriptionsfaktor Gal4 unter der Kontrolle eines Fliegenpromotors exprimiert. Die UAS-Linie enthält die „*upstream activator sequence*“ (UAS) des Gal4-Genes mit einem basalen Promotor, hinter den das zu exprimierende Konstrukt kloniert wird. Die Expression dieser Konstrukte erfolgt durch die Kreuzung einer Gal4-Linie mit einer UAS-Linie. Der modulare Aufbau des UAS/Gal4-Systems hat den Vorteil, dass durch die Verwendung verschiedener Promotoren in den Gal4-Linien, das zu untersuchende Protein zu unterschiedlichen Zeiten oder gewebespezifisch exprimiert werden kann.

4.4 Genetische und molekularbiologische Methoden

4.4.1 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli* (*E. coli*)

4.4.1.1 Plasmidschnellisolierung

Besonders geeignet ist diese Methode zur Überprüfung einer größeren Anzahl an Proben, da Plasmide mit hoher Kopienzahl schnell aus *E. coli* isoliert werden können (Berghammer und Auer, 1993). Jedoch eignet sich die Plasmid-DNA nicht zum Aufbewahren oder Sequenzieren, da der Verunreinigungsgrad hoch ist.

2 ml einer Übernachtskultur wurden 4 Minuten bei 13200 UpM pelletiert und in 40 µl Easy-Prep-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 1 Minute lang bei

100 °C aufgeköcht, 1 Minute auf Eis heruntergekühlt und danach 15 Minuten bei 13200 UpM abzentrifugiert. Im Überstand befand sich die Plasmid-DNA, von der 5 µl in einem Restriktionsverdau auf Richtigkeit überprüft wurden.

4.4.1.2 Plasmidpräparation mit dem peqGOLD Plasmid *Miniprep Kit*

Für die Säulenreinigung von Plasmid-DNA aus einer über Nacht Kultur von 50-100 ml *E. coli* DH5α wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit (peqlab Biotechnologie GmbH) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl sterilem Wasser eluiert und kann bei 4 °C aufbewahrt werden. Das Protokoll des Herstellers – ausgelegt auf 5 ml – wurde dabei auf das größere Volumen von 50-100 ml angepasst.

4.4.2 Messung von Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung

Eine photometrische Konzentrationsbestimmung eines Plasmids ist u.a. notwendig, wenn es zum Sequenzieren gegeben oder eine Transfektion durchgeführt werden soll. Dazu wurde mit dem Spektrophotometer die Absorption der Proben bei 260 nm und 280 nm gemessen. Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion (E) bezeichnet. Die Extinktion errechnet sich dabei aus dem Lambert-Beerschen Gesetz, $E = \epsilon cd$ (E=Extinktion; ϵ =molarer Extinktionskoeffizient ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$); c=Konzentration der Lösung ($mol \cdot l^{-1}$); d=Schichtdicke in cm). Einer Extinktion von eins entsprechen 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, wobei reine DNA einen Quotienten $A_{260/280}$ von 1,8 besitzt.

4.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine weit verbreitete Standardmethode dar, um kleine Mengen an Matrizen DNA innerhalb kurzer Zeit zu amplifizieren (Mullis, *et al.*, 1992).

Experimentell wird DNA mit Oligonukleotiden, Taq-Polymerase, freien Nukleotiden und Puffer versetzt. Die Vervielfältigung des Templates erfolgt in drei Schritten: Durch Erhitzen auf 95 °C kommt es zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge. Während der Annealing-Phase lagern sich die spezifischen Oligonukleotide an den zu amplifizierenden Bereich der denaturierten Einzelstränge an, um in der Elongationsphase mithilfe des Enzyms Taq-Polymerase diese zu polymerisieren. Die Wiederholung dieser Schritte/Zyklen führt zur exponentiellen Amplifikation der DNA. Taq-Polymerase

ist ein hitzestabiles Enzym, das aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde und dessen Temperaturoptimum bei 72 °C liegt.

Als Matrize diente isolierte genomische DNA oder Plasmid-DNA. Anwendung fand die Polymerasekettenreaktion bei der Klonierung von Genen in Vektoren, bei der ortsspezifischen Mutagenese von Rca1 und als Vorstufe zur RNA-Interferenz.

4.4.3.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Diese Methode wurde präparativ eingesetzt, um in ein Plasmid-Fragment über entsprechende Forward- und Reverseprimer die passenden Restriktionsschnittstellen einzufügen. Dazu wurden Oligonukleotide eingesetzt, die nach ihrer komplementären Basensequenz zur korrekten Bindung an das DNA-Fragment noch eine weitere, wenige Basenpaar lange Basensequenz enthielt, um die benötigte Schnittstelle einzubauen.

Für diese PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

10x KOD Hot Start DNA Puffer	5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	3 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	3 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)	1 µl
DNA-Matrize (20 pmol)	1 µl
Steriles Wasser	26 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

Denaturierung	95 °C	2 min	25 Zyklen
Denaturierung	95 °C	20 s	
Annealing	54 °C	20 s	
Extension	70 °C	50 s	
Restamplifikation	72 °C	10 min	

Sowohl die Annealingtemperatur als auch die Amplifikationszeit wurden an die Oligonukleotide, die DNA-Matrize und an die Länge des zu vervielfältigenden Fragments angepasst. Die eingesetzte Matrizen-DNA-Lösung hatte eine Konzentration von 20 pmol.

4.4.3.2 Ortsspezifische Mutagenese eines Gens mittels PCR

Die hier verwendete Methode zur ortsspezifischen Mutagenese bedient sich einer speziellen linearen Amplifikation von DNA (Braman, *et al.*, 1996). Die gewünschte Mutation wird durch die verwendeten Oligonukleotide von ca. 50-60 bp Länge in das Gen eingebracht. Das Oligonukleotidpaar ist bis auf die neu einzuführenden Basen homolog zu dem Bereich der eingesetzten DNA-Matrize und bindet an die entsprechende Stelle im Gen. Das komplette Plasmid, das nicht größer als 10 kb sein sollte, wird amplifiziert. Die als Matrize in die PCR eingesetzten Plasmide wurden aus *E. coli* (dam⁺) Stämmen isoliert, so dass diese eine Dam-Methylierung an jedem Adenin der Sequenz GATC der DNA besitzen, wohingegen von der KOD-Polymerase neu synthetisierte Plasmide unmethyliert vorliegen. Das Restriktionsenzym *DpnI* unterscheidet beim Verdau zwischen modifizierter und nicht-modifizierter DNA und entfernt die methylierten, nicht-mutagenisierten Plasmid-Stränge. Die Punktmutation wurde zudem so konstruiert, dass in diesem Bereich eine neue Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde. So konnte mithilfe eines Kontrollverdau anhand eines unterschiedlichen Bandenmusters auf dem Agarosegel überprüft werden, ob die gewünschte Mutation eingeführt worden ist. Um weitere durch die KOD-Polymerase zufällig eingeführte Mutationen ausschließen zu können, wurden die positiv getesteten Punktmutanten sequenziert (4.4.10).

In dieser Arbeit wurde die Methode eingesetzt, um verschiedene, hoch konservierte Aminosäuren im Rca1-Gen gezielt zu verändern.

Für diese PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

10x KOD Hot Start DNA Puffer	5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	2 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	5 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	5 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)	1 µl
DNA-Matrize	0,5 µl
Steriles Wasser	26,5 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

Denaturierung	95 °C	4 min	15 Zyklen
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	58 °C	1 min	
Elongation	72 °C	6 min	
Restamplifikation	72 °C	5 min	

4.4.4 Restriktionsverdau von DNA

Beim Restriktionsverdau, dem Hydrolysieren von DNA an definierter Stelle, kommen sogenannte Restriktionsendonukleasen zum Einsatz. Alle verwendeten Enzyme und die dazugehörigen Restriktionspuffer wurden von den Firmen NEB und Fermentas bezogen. Enzymatische Verdaue wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei sich die Bedingungen je nach verwendetem Enzym in Temperatur, Puffer, Inkubationszeit und BSA-Zugabe unterschieden.

Folgender Standard-Restriktionsansatz wurde meistens verwendet:

DNA	0,5-1 µg
10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym	je 5-10 U
Steriles Wasser	ad to 20 µl

4.4.5 Dephosphorylierung

Bei manchen Klonierungen war es notwendig, die 5' Phosphatgruppe der Desoxyribose an den Vektorenden zu entfernen, um eine Religation zu verhindern. Dazu wurde 2 µl des 10x Reaktionspuffers und 1 µl der Shrimp Alkaline Dephosphatase (NEB) zum Reaktionsmix hinzugeben und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert.

4.4.6 Gelelektrophorese von DNA

Sowohl die analytische als auch die präparative Auftrennung von DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese Methode wurde außerdem zur Überprüfung der Reinheit sowie zur Identifizierung und Trennung von Restriktions- und PCR-

Fragmenten angewendet. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments im elektrischen Feld hängt von seiner Größe ab (Ausubel, *et al.*, 2005). Daher ist es möglich, DNA-Fragmente in einem Agarosegel der Größe nach aufzutrennen. Unter elektrophoretischen Bedingungen ist das Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren ionisiert. Somit liegen die Poly(desoxy)nukleotide als Polyanionen vor und bewegen sich von Kathode zu Anode (Sambrook, *et al.*, 1989). Die interkalierende Substanz Ethidiumbromid (EtBr) lagert sich zwischen die Basen der Nukleinsäure an. Nach Anregung des EtBr durch UV-Licht kann die DNA indirekt sichtbar gemacht werden.

Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente wurden zwischen 0,7-2,5%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Agarose-Menge in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach kurzem Abkühlen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelapparatur gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 10x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde als Größenstandard der 1 kb Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas) mit aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 80 Volt und einer Laufzeit von 45–80 min.

Die DNA Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und mithilfe eines Thermoprinters ausgedruckt bzw. für eine exakte Konzentrationsabschätzung als Datei gespeichert und mit ImageJ ausgewertet.

4.4.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

4.4.7.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Weist ein aufgetrenntes PCR-Produkt Mehrfach-Banden auf, weil die verwendeten Oligonukleotide unspezifische DNA amplifiziert haben, oder will man eine bestimmte Bande nach einem Restriktionsverdau gewinnen, können die korrekten DNA-Banden auf dem Gel identifiziert, ausgeschnitten, extrahiert und aufgereinigt werden. Dies erfolgte mit dem Agarose Gel Extraktions Kit (Qiagen) und wurde wie im Handbuch beschrieben durchgeführt. Die Eluation der DNA erfolgte in 30-50 µl sterilem Wasser.

4.4.7.2 Aufreinigen von DNA-Fragmenten

Sofern die analytische Auftrennung eines PCR-Produktes nur eine spezifische Bande und ansonsten nur unspezifische, kurzkettige Oligonukleotide aufwies, wurden letztere mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) entfernt und die gewünschte Bande aufgereinigt. Ebenso fand das Kit Anwendung, wenn Enzyme und kurzkettige Nukleotide nach einem Restriktionsverdau entfernt werden mussten. Dabei wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

4.4.8 Ligation

Mit der Ligation können zuvor unabhängig geschnittene DNA-Fragmente mit einheitlicher Schnittstelle mithilfe des Ligase-Enzyms wieder zusammengefügt werden. Die Ligation wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Ein molares Verhältnis von 6:1 (Insert/Vektor) wurde in der Reaktion zusammen mit 2 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) eingesetzt, mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

4.4.9 Transformation mittels Elektroporation

100 µl elektrokompente DH5α-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 100 µl sterilem Wasser verdünnt und je nach Konzentration der Plasmid-DNA, mit 0,1–2 µl Plasmid-DNA versetzt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte, UV-gelinkte Elektroporationsküvette luftblasenfrei überführt. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Parametern: Feldstärke 12,5 kV/cm, Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 µF und Kondensatorspannung 2,5 kV. Nach dem Stromimpuls wurden die Zellen unverzüglich in 1 ml und 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium überführt und für 1-2 h zur phänotypischen Expression des Antibiotikaresistenz-Gens bei 37 °C gerollert. Anschließend wurden je nach Art des transformierten Plasmides zwischen 5 und 300 µl der Zellen auf Selektiv-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.4.10 Sequenzierung

Für die Verifizierung von klonierten Plasmiden wurde Plasmid-DNA zur Sequenzierung zu SeqLab nach Göttingen geschickt. Die Proben für die Sequenzierung hatten ein Endvolumen von 7 µl mit einer DNA-Endkonzentration zwischen 600-700 ng und 20 µM des Sequenzierprimers. Die per E-Mail als Elektropherogramm oder reine Auflistung der Basenabfolge erhaltenen separaten Sequenzen der Forward- und/oder Reversesequenzierung wurden mit dem Programm Align X von Vector NTI zusammengefügt, überprüft und ausgewertet.

4.4.11 RNA-Interferenz (RNAi)

Die Synthese doppelsträngiger Ribonukleinsäuren und deren Einsatz in der Zellkultur von *Drosophila melanogaster* basiert auf der Methode von Clemens (Clemens, *et al.*, 2000). Verschiedene kodierende DNA-Fragmente, deren endogene mRNAs durch RNA interference degradiert werden sollen, wurden durch die Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert.

Zu diesem Zweck wurden Plasmide erstellt, bei denen auf jedem Strang die entsprechende DNA Sequenz von einem T7-Promotor flankiert wurde. Dieser Promotor stellt die spezifische Bindestelle für die DNA abhängige T7-RNA-Polymerase dar, wodurch es möglich war *in vitro* jeweils eine einzelsträngige RNA-Sequenz in sense- und antisense Richtung aus der DNA-Sequenz herzustellen. Zur Effizienzsteigerung der Transkription wurde vorab die spezifische DNA-Sequenz inklusive der beiden T7-Promotoren mittels PCR-Reaktion amplifiziert (4.4.3.1) und erst im zweiten Schritt die Transkription nach folgendem Ansatz durchgeführt:

PCR-Produkt	20 µl
5x Ultimate Puffer	10 µl
NTP-Mix	5 µl
RNase Inhibitor	1,5 µl
T7-RNA-Polymerase	1,5 µl
H ₂ O	ad to 50 µl

Die Transkription erfolgte bei 42 °C für 4-8 h.

4.5 Proteinanalytische Methoden

4.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen

Proteinextrakte wurden durch mechanischen Aufschluss der Hefezellen mittels Glasperlen hergestellt. Hierfür wurden aus einer logarithmisch wachsenden Übernachtskultur 10-15 OD Zellen geerntet und für 2 Minuten bei 2000 UpM abzentrifugiert, in 1 ml kaltem Wasser gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde je nach Menge in 150-300 µl Puffer 3 resuspendiert, in ein Schraubdeckel-Gefäß mit vorgelegten Glasperlen (0,3 g) überführt und auf Trockeneis schockgefroren. Um Proteasen zu unterdrücken, wurden die Proben für den Zellaufschluss auf Eis aufgetaut und in der Retschmühle im Kühlraum bei maximaler Frequenz für 5 Minuten mechanisch aufgeschlossen. Um Zellfragmente von den Proteinen abzutrennen, wurde bei 13200 UpM für 3 Minuten in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. 30 µl des Überstandes wurden mit 2x Lämmli-Auftragspuffer versetzt und 5 Minuten bei 100 °C gekocht.

4.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 5 µl des Lysat Überstandes zur Proteinbestimmung 1:1000 mit Wasser verdünnt und mit 500 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde im Photometer die OD₅₉₅ bestimmt. Als Referenz diente eine Probe mit 500 µl Wasser und 500 µl Bradford-Reagenz. Die Bestimmung der relativen Proteinkonzentrationen war für eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels nötig.

4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden (Ausubel, *et al.*, 2005). Durch das Detergenz SDS und das reduzierende β-Mercaptoethanol werden die Proteine denaturiert. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS an die Proteine an und sorgt dafür, dass diese unabhängig ihrer Eigenladung im elektrischen Feld zur Anode wandern. Je nach Dichte des Polyacrylnetzwerkes und ihrer Größe werden die Proteine unterschiedlich stark zurückgehalten. Ein Polyacrylamidgel besteht aus zwei unterschiedlichen Schichten, dem Sammel- und dem Trenngel, die sich hinsichtlich der Polyacrylamidkonzentration, der

Ionenstärke und des pH-Wertes unterscheiden. Gemäß seines Namens werden im großporigen Sammelgel alle Proteine in einer engen Bande aufkonzentriert und erst im engmaschigeren Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt. Je höher der prozentuale Anteil an Polyacrylamid im Trenngel ist, desto besser ist die Auftrennung im niedermolekularen Bereich.

Es wurden 1,5 mm dicke Gele gegossen und je nach Proteingröße Trenngele von 8-16% Polyacrylamid verwendet. Durch die Konzentrationsbestimmung nach Bradford bzw. der Zellzahlbestimmung anhand der Durchflusszytometrie (4.10), konnten die Probetaschen neben einem Proteinmarker immer mit einer äquivalenten Menge an Protein beladen werden. Die anschließende Gelelektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 200 V durchgeführt und das Trenngel im Anschluss für eine Western-Analyse weiter verwendet.

4.5.4 Färbung mit Coomassie

In einigen Fällen wurden die Proteine nach dem Gellauf direkt im Gel durch Färbung mit Coomassie nachgewiesen. Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der Proteine unspezifisch anfärbt.

Das Gel wurde für 10 Minuten in der Coomassie Färbelösung inkubiert und konnte in Wasser wieder langsam entfärbt werden. Das Wasser wurde so lange alle 5 Minuten gewechselt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

4.5.5 Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Die Western-Blot-Analyse dient dazu, Proteine spezifisch in Bezug auf die Auftrennung und Lokalisation im Acrylamidgel nachzuweisen. Dabei wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Für den Transfer der Proteine wurde ein im Transferpuffer getränktes Whatman GB005 Papier auf eine Graphitelektrode der Elektrobplot-Apparatur gelegt. Darauf wurde die Nitrozellulose-Membran, das Gel und abschließend ein ebenso in Transferpuffer getränktes Whatman GB005 Papier luftblasenfrei geschichtet und die Apparatur mit der zweiten Elektrode verschlossen. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA pro cm² für 1,5 h durchgeführt. Der Nachweis der an die Membran gebundenen Proteine erfolgte über spezifische Antikörper.

Für die Detektion wurde die Membran in 5% Milchpulver, PBS/ 0,1% Tween 20 und 0,01% Natriumazid (PBS-T) 30 Minuten lang zur Absättigung unspezifischer Bindestellen geblockt. Um den Proteintransfer und die gleichmäßige Beladung der Proben zu überprüfen, gibt es an dieser Stelle die Möglichkeit, die Proteinbanden auf der Membran mit Ponceau S anzufärben und zu dokumentieren. In einem angeschlossenen Waschschriff mit 5% Milchpulver in PBS-T lässt sich die Membran wieder entfärben.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper fand zumeist über Nacht bei 4 °C mindestens jedoch über 2 h mit 5% Milchpulver in PBS-T statt. Danach erfolgte zunächst ein dreimaliger Waschschriff der Membran mit je 10 ml PBS-T für 5 Minuten unter Schwenken bei Raumtemperatur, bevor mit dem sekundären Antikörper – ebenfalls wieder in 7 ml 5% Milchpulver in PBS-T – für zwei Stunden inkubiert wurde. Abschließend wurden ungebundene Antikörper durch kurzes, dreimaliges Waschen in 10 ml PBS-T entfernt. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System.

4.5.6 Färbung mit Ponceau S

Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet und somit eine Möglichkeit darstellt, eine gleichmäßige Beladung bzw. den Proteintransfer auf die Membran zu überprüfen.

Die Membran wurde für 10 Minuten in Ponceau S gefärbt und im Anschluss mit Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden gegenüber dem Hintergrund sichtbar wurden. Ein längeres Waschen entfernte das Ponceau S wieder vollständig.

4.6 Ubiquitylierungsassay

Für einen Ubiquitylierungsassay mit dem *Drosophila*-APC/C werden mehrere Komponenten benötigt. Neben den Enzymen E1, E2, E3 (APC/C), das Substrat, sowie Ubiquitin, ATP und die Aktivatoren (1.4).

Die beiden Substrate Geminin und CyclinB wurden durch *in vitro*-Translation in Retikulozytenlysat (4.6.1) hergestellt. Geminin wurde desweiteren ebenfalls durch Überexpression in Bakterien gewonnen (4.7.1). Als Aktivator des APC/C wurde das Protein Fzr *in vitro* translatiert. Um in Zukunft nicht mehr auf das Retikulozytenlysat angewiesen zu sein, wurde in einem weiterführenden Schriff begonnen, FLAG-Fzr in Sf-21 Zellen mithilfe des Baculovirus aufzureinigen (4.7.2). Der APC/C wurde durch Immunpräzipitati-

on aus transgenen GFP-Cdc16 bzw. GFP-Cdc27 Fliegen gewonnen (4.6.2), ein *Drosophila*-Embryonenextrakt zugegeben oder das Retikulozytenlysatsat als Quelle für Ubiquitinligasen verwendet. Das humane E1-Enzym, sowie das humane E2-Enzym UbcH5 wurden käuflich erworben (Enzo), das *Drosophila*-spezifische E1-Enzym Uba1 sowie die E2-Enzyme Effete und Vihar durch Überexpression in *E. coli* aufgereinigt. Ubiquitin wurde entweder ohne Epitopmarkierung oder mit einem FLAG-Epitop eingesetzt und wurde käuflich bezogen (Enzo, Biomol).

Für die Etablierung des Ubiquitylierungsassays wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Ansätze pipettiert. Nach Zugabe aller Komponenten wurde zu der Probe mit dem Zeitwert 0 Minuten direkt 1:1 4x LSB zugegeben und eingefroren. Die restlichen Proben wurden für 60 Minuten bei 30 °C inkubiert und die Reaktion nach der vorgegebenen Zeit ebenfalls durch 4x LSB gestoppt. Alle Proben wurden für 5 Minuten aufgeköcht und bis zur Analyse im Western-Blot eingefroren.

4.6.1 *in vitro*-Translation

Die zellfreie Genexpression stellt eine moderne Methode der Proteinsynthese dar und wird zumeist angewendet, wenn eukaryotische Proteine zu ihrer Reifung einen komplizierten Faltungsprozess und/oder posttranslationelle Modifizierungen durchlaufen müssen, die in prokaryotischen zellulären Systemen, wie zum Beispiel bei der Überexpression in *E. coli*, nicht möglich sind und zu einem fehlgefalteten, inaktiven oder instabilen Protein führen würden.

Die Expression *in vitro*, ausgehend von einem DNA-Plasmid, wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Transkription *in vitro*, gefolgt von der Translation der erhaltenen mRNA. Zur Überprüfung der hergestellten Proteine dienten Epitope am N- oder C-Terminus, wodurch sie mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpernachweis detektiert werden konnten.

4.6.1.1 Linearisieren von Plasmiden

Vor der *in vitro*-Translation wurden die verwendeten Plasmide mit einem geeigneten Restriktionsenzym kurz nach der kodierenden Region des gewünschten Proteins linearisiert. Falls auf den Plasmiden nach der kodierenden Region eine 3'UTR („*untranslated region*“) des Gens oder vom Xenopus β -Globin-Gen vorhanden war, wurde eine Schnittstelle nach dieser Sequenz gesucht. Die Linearisierung gewährleistete eine definierte

Länge der entstehenden RNA, da nur die gewünschten Teile des Plasmids transkribiert wurden. Der Verdau erfolgte mit 2 µg DNA in einem 20 µl Ansatz (4.4.4). Anschließend wurden 2 µl auf ein Gel aufgetragen und die erfolgte Linearisierung kontrolliert.

4.6.1.2 *in vitro*-Transkription

Bei der *in vitro*-Transkription wird mithilfe einer viralen RNA-Polymerasen RNA synthetisiert. Die Transkription erfolgte hierbei von Plasmiden, die den entsprechenden viralen Promotor vor der kodierenden Region der gewünschten Proteine enthielten. In dieser Arbeit kamen Plasmide mit T7- oder SP6-Promotoren zum Einsatz.

Folgender Transkriptionsansatz wurde verwendet:

400 ng linearisierte Plasmid-DNA	4 µl
5x Transkriptionspuffer	0,8 µl
10 mM NTP-Mix	0,8 µl
RNA-Polymerase (SP6 oder T7)	0,5 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
H ₂ O	ad to 20 µl

Der Ansatz wurde 4 h bei 42 °C (T7) bzw. 37 °C (SP6) inkubiert.

Das Transkriptionsergebnis wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. Hierfür wurden 2,5 µl mit 1 µl 10x Auftragspuffer versetzt, auf 10 µl mit H₂O verdünnt und zusammen mit einem DNA-Standard auf das Gel aufgetragen.

Der Arbeitsplatz und die Pipetten wurden vorher stets mit 1% SDS gereinigt und Filterspitzen, RNase-freie Reaktionsgefäße sowie RNase-freies Wasser (Biopak) verwendet.

4.6.1.3 *in vitro*-Translation

Für die Herstellung von Proteinen aus RNA werden zumeist Zelllysate verwendet. Diese enthalten alle nötigen Komponenten für die Translation. Es erfolgt nur noch die Zugabe der entsprechenden RNA, diverser Aminosäuren, sowie von RNase-Inhibitoren, um den Abbau der zugegebenen RNA zu verhindern.

In dieser Arbeit wurde mit einem Kaninchen-Retikulozytenlysate (Promega) gearbeitet, in dem die endogene RNA entfernt wurde. Zusätzlich wurden ein Energieregenerations-

system bestehend aus Phosphokreatinen und Phosphokreatinkinase sowie eine Mischung aus tRNAs hinzugefügt.

Translationsansatz:

Rabbit Retikulozytenlysats	14 µl
Aminosäuremix 1 mM	0,4 µl
RNase-Inhibitor 1 mM	0,4 µl
RNA	1,25 µl
H ₂ O	ad to 20 µl

Je nach Bedarf wurde ein Mehrfachansatz mit bis zu 100 µl Gesamtvolumen in einem PCR Reaktionsgefäß angesetzt und für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde im Anschluss mit 4x LSB-Puffer versetzt und im Western-Blot überprüft.

4.6.2 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation handelt es sich um eine Affinitätschromatographie, bei der ein Antikörper, der kovalent an eine Gelmatrix gebunden ist, das für ihn spezifische Antigen, z.B. ein Protein, bindet. Hierfür können Proteine eines Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen oder Fliegen genauso verwendet werden wie *in vitro* synthetisierte Proteine. Die gebundenen Proteine können durch bestimmte Wasch- und Elutionsbedingungen gereinigt werden. Um die Interaktion von Proteinen *in vitro* zu untersuchen, wird eine Sonderform der Immunpräzipitation, die Co-Immunpräzipitation durchgeführt, bei der nicht nur das an den Antikörper gebundene Protein, sondern auch dessen Bindungspartner nachgewiesen bzw. co-präzipitiert werden können. Aufgrund dieser Eigenschaft eignet sich die Immunpräzipitation zur Isolierung ganzer Proteinkomplexe. In dieser Arbeit wurde versucht, den APC/C aus den beiden transgenen Fliegenstämmen 430 (poly-Ub-GFP-Cdc16) und 431 (poly-Ub-GFP-Cdc27) zu präzipitieren. Als Negativkontrolle wurde die Immunpräzipitation mit dem w- Stamm durchgeführt. Die Stämme wurden in Kollektionskäfigen expandiert und bis zur Verwendung bei -70 °C aufbewahrt. Für die Immunpräzipitation wurden ca. 200 tiefgefrorene Fliegen unter Zugabe von 1 ml IP-Puffer so lange in einem Glashomogenisator homogenisiert, bis keine intakten Fliegen mehr erkennbar waren. Das Homogenisat wurde bei 4 °C und 4000 UpM für 4 Minuten zentrifugiert und die Proteinschicht (durch die Zentrifugation entstanden

drei Schichten; eine obere Fettschicht, eine mittlere Proteinlösung und eine untere Schicht mit Zellresten) in ein neues Gefäß überführt. In einem anschließenden Sonifizierungsschritt auf Eis (5x 10 Sekunden mit 20% Intensität) wurden die verbliebenen, noch unaufgeschlossenen Zellen lysiert und nach Zentrifugation die Proteinschicht in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu der Proteinschicht wurde 30 µl präabsorbierter GFP-Antikörper gegeben und für 30 Minuten auf einem Roller bei 4 °C inkubiert. Nun wurden die äquilibrierten ProteinG-Sepharose-Beads hinzugegeben und für weitere 2 h auf einem Roller inkubiert. Nach der Inkubation wurde zweimal mit IP-Puffer gewaschen und sämtliche Flüssigkeit mithilfe einer Hamiltonspritze mit einer 27 G-Kanüle vollständig abgenommen. Für den *in vitro*-Ubiquitylierungsassay wurden die Beads dann in den Ansatz eingebracht.

4.6.3 Inaktivierung von Retikulozytenlysat durch NEM

Um Ubiquitin-Ligasen im Retikulozytenlysat zu inaktivieren, wurde das Retik-Lysat nach der *in vitro*-Translation eines Zielproteins durch Zugabe von 10 mM N-Ethylmaleinimid (NEM) für 10 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Dabei bildet NEM eine kovalente Thioesterbindung mit Sulfhydrylgruppen aus und reduziert unter anderem die Cysteine der Ubiquitin-übertragenden Enzyme. Die Verlängerung der Ubiquitinketten durch Ubiquitin-Ligasen wird dadurch dauerhaft blockiert. Um wiederum den Überschuss an NEM zu inaktivieren wurde Dithiothreitol (DTT) in einer Endkonzentration von 25 mM zugesetzt und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Enquist-Newman, *et al.*, 2008). Das inaktivierte Retikulozytenlysat wurde so in den Ubiquitylierungsassay eingesetzt.

4.6.4 Ubiquitin-E2 Aktivitätsassay

Der Ubiquitin-E2 Aktivitätsassay dient der Überprüfung einzelner Komponenten des Ubiquitin-Abbau-Weges auf ihre Aktivität. Dazu werden E1-Enzym, E2-Enzym und FLAG-Ubiquitin nach folgendem Ansatz in einem geeigneten Puffersystem miteinander vermischt. Die Mengenangaben entsprechen dabei den eingesetzten Mengen der gekauften Produkte (E1, UbcH5, FLAG-Ubiquitin), da die selbst aufgereinigten Proteine noch zu viel unspezifisches Protein enthalten und keine Konzentrationsbestimmung möglich ist.

E1-Enzym	1,5 µl (2 µg)
E2-Enzym	1,0 µl (2 µg)
FLAG-Ubiquitin	2,0 µl (6,5 µg)
10xThioesterpuffer	2,0 µl
H ₂ O	ad to 20 µl

Die Ansätze wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, während der das FLAG-Ubiquitin an das E1-Enzym bindet und es an das E2-Enzym weitergibt. Durch Zugabe von 20 µl nicht reduzierendem SDS-Sample-Puffer wird die Reaktion gestoppt, ohne dass die Thioesterbindung zwischen dem Ubiquitin und dem E1- bzw. dem E2-Enzym zerstört wird. 15 µl von dieser Probe werden entnommen, in einem neuen Eppi mit 0,8 µl 1 M DTT versetzt und für 5 Minuten aufgekocht. Durch diesen Hitzeschritt wird die Thioesterbindung zwischen E1- bzw. E2-Enzym und dem FLAG-Ubiquitin wieder reduziert.

Die restlichen 25 µl der nicht reduzierten Probe werden bei 30 °C für 15 Minuten inkubiert und anschließend von beiden Ansätzen jeweils 15 µl auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

Bei aktivem E1- und E2-Enzym sollte im Westerblot mit einem FLAG-Antikörper das FLAG-Ubiquitin am E1- bzw. am E2-Enzym gebunden haben und zu detektieren sein, während bei der reduzierten Probe die Thioesterbindung zwischen FLAG-Ubiquitin und den beiden Enzymen zumindest größtenteils wieder verlorengegangen sein sollte.

4.7 Proteinbiochemische Methoden

4.7.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Mithilfe des pET-Expressionssystems (Novagen; 5.10.1) können Proteine im bakteriellen System synthetisiert und anschließend aufgereinigt werden.

Das pET-Expressionssystem ist speziell für eine optimierte Überexpression rekombinanter Plasmide in *E. coli* konzipiert worden. Vor der Klonierungsstelle des Zielgens befindet sich ein starker T7-Promotor, der nahezu sämtliche Ressourcen der Zelle auf die Expression des entsprechenden Zielgens verwendet. Erst durch Zugabe von Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird die bis dahin inaktive Transkription induziert, wodurch auch toxische Proteine exprimiert werden können.

Die Expression hängt zudem auch vom verwendeten Bakterienstamm ab. In dieser Arbeit wurde mit dem *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus (DE3)-Rosetta (NEB) gearbeitet. In diesem Stamm wurden die Gene der meisten Proteasen deletiert, so dass durch einen verminderten proteolytischen Abbau des rekombinanten Proteins eine verbesserte Proteinstabilität gewährleistet wird. Die Produktion heterologer Proteine in *E. coli* hängt unter anderem auch von der Abundanz bestimmter tRNAs ab. Für bestimmte Basentriplets besitzt *E. coli* verhältnismäßig wenige tRNA-Moleküle, wodurch es bei hohen Expressionsraten zu einem Translationsabbruch oder dem Einbau falscher Aminosäuren in die wachsende Peptidkette kommen kann. Durch Einführung zusätzlicher tRNAs codierender Gene wurde eine hohe Expressionsrate heterologer Gene in *E. coli* gewährleistet.

Der *E. coli* Stamm wurde mit dem entsprechenden pET21 Vektor transformiert (4.4.9) und auf LB-Agarplatten mit den notwendigen Antibiotikaresistenzen ausgestrichen. Nach einer über Nacht Inkubation bei 37 °C konnten Einzelkolonien auf die Produktion von rekombinanten Proteinen hin analysiert werden.

4.7.1.1 Testexpression im analytischen Maßstab

Um zu überprüfen, ob sich die klonierten Gene überexprimieren lassen und in welcher Fraktion des Zellextraktes sich das Protein befindet, wurde eine Probeexpression durchgeführt. Hierbei wurde ein Ansatz von 20 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, aus einer frischen über Nacht Kultur einer Einzelkolonie auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C mit 200 UpM geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4–0,6 wurde der Ansatz auf vier Ansätze á 5 ml aufgeteilt, drei der Kulturen mit 0,5 mM IPTG induziert und bei 18 °C, 25 °C und 37 °C die Überexpression gestartet, während die vierte Probe uninduziert blieb und ebenfalls bei 37 °C kultiviert wurde. Nach Inkubation für 4 h bzw. über Nacht wurden jeweils 4 ml Aliquots der Zellen abgenommen und die löslichen (= Überstand Ü) bzw. unlöslichen (= Pellet P) Proteinfractionen nach folgendem Schema getrennt und analysiert:

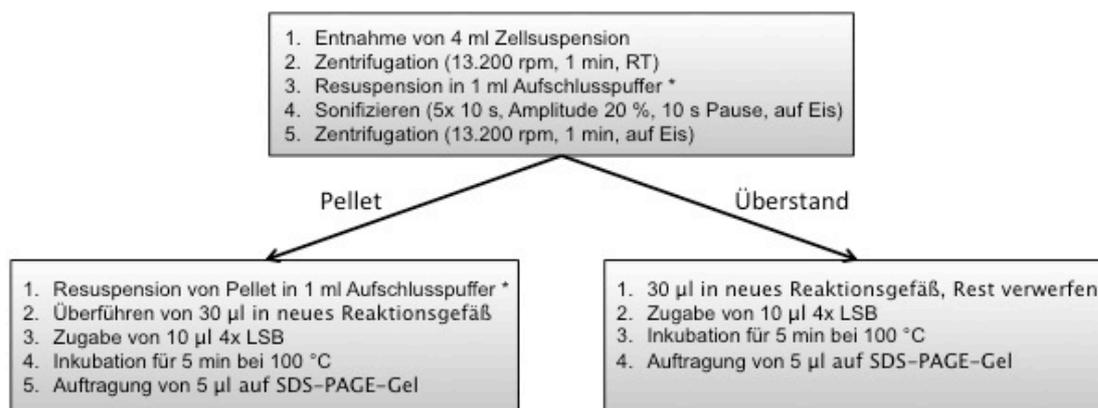


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Vorgehens einer Testexpression

Das Protokoll wurde mit allen vier Proben parallel durchgeführt und im Anschluss auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

Die Überexpression wurde anhand einer Coomassiefärbung überprüft.

* Aufschlusspuffer (Puffer A): 20 mM HEPES (pH 7,7), 500 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol

4.7.1.2 Expression von Proteinen im präparativen Maßstab

Zur Aufreinigung der Proteine in großem Maßstab wurden insgesamt 2 l LB-Kulturmedium auf zwei 3 l Glaskolben verteilt und mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Beide Ansätze wurden mit einer frischen Vorkultur aus einer Einzelkolonie auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 120 UpM im Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{600} zwischen 0,4–0,6 wurde mit 0,5 mM IPTG induziert.

Die Expression erfolgte über Nacht. Danach wurden die Zellen geerntet (Sorvall RC5B plus, GS3 Rotor, 4000 UpM, 10 min, 4 °C) und das Zellpellet mit 20 ml Puffer A (Abb. 4.2) pro 1 l Kultur resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen auf Eis sonifiziert (Amplitude 20%; 4 Minuten mit 20 s Ultraschall, 20 s Pause). Die Lösung wurde zentrifugiert (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 14000 UpM, 30 min, 4 °C) und der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wurde in 100 ml Puffer A resuspendiert (1/20 vom ursprünglichen Volumen), jeweils 30 μ l mit 10 μ l 4x LSB versetzt, für 5 Minuten aufgeköcht und bis zur Auftragung eingefroren.

Weil der Überstand für die Affinitätschromatographie frei von Zellfragmenten sein muss, wurde dieser erneut zentrifugiert (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 14000 UpM, 30 min, 4 °C) und in ein neues Gefäß überführt. In einer angeschlossenen Filtration mit einer Filtergröße von 0,45 μ m wurden die restlichen Zellfragmente entfernt und die Probe anschließend auf die Säule aufgetragen.

4.7.1.3 Proteinreinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie

Die Metallchelat-Affinitätschromatografie wurde mit der Säule HisTrap™ FF crude 5 ml (GE Healthcare) durchgeführt. Diese Säule besteht aus Sepharose 6 Medium und dem daran gebundenem Chelator, der sechs Koordinationsstellen besitzt, an drei Koordinationsstellen können Metallionen (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} oder Fe^{3+}) immobilisiert werden, die anderen drei stehen zur Komplexbildung von Stickstoff- und Schwefelatomen von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung. Proteine, die gentechnisch mit einem (His)₆-Tag fusioniert wurden, binden sehr spezifisch an die Säule, da die Metallionen zusätzliche Koordinationsstellen für die Histidine bereitstellen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgt durch Anlegung eines Imidazolgradienten, wobei die Imidazolmoleküle mit den chemisch äquivalenten Histidinseitenketten des Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren.

Die Säule wurde bereits mit Nickelionen beladen geliefert, wurde aber bei Bedarf nach Angaben des Herstellers neu beladen. Die Reinigung wurde an der Chromatografie-Anlage ÄKTA™ Purifier 10 (GE Healthcare) nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate:	5 ml/min
Equilibrierung:	10 ml
Beladen:	ca. 50 ml Proteinlösung in Puffer A
Waschen:	25 ml Laufpuffer
Eluieren:	150 ml Gradient von 15-500 mM Imidazol mit Puffer B, Fraktionen à 2 ml
Reinigung der Säule:	25 ml Puffer B
Equilibrierung:	25 ml Puffer A
Spülen und Lagerung der Säule:	25 ml H ₂ O; 15 ml 20% Ethanol
Zusammensetzung Puffer A (Aufschlusspuffer) : 20 mM HEPES (pH 7,7), 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol	
Zusammensetzung Puffer B (Elutionspuffer) : 20 mM HEPES (pH 7,7), 100 mM KCl, 1 M Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol	

Das gesamte Elutionsvolumen wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt (RediFrac, Pharmacia) und die Absorption bei 260 nm und 280 nm kontinuierlich gemessen. Somit ließen sich bei der Auswertung Protein-enthaltende Fraktionen identifizieren. Anhand der

Absorption wurden 5 µl Aliquots der Protein-enthaltenden Fraktionen ausgewählt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (4.5.3). Eine Coomassiefärbung gab Aufschluss über die Reinheit der Proteinaufreinigung (4.5.4).

4.7.1.4 Dialyse von Proteinlösungen

Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und in Dialyseschläuche für Proteine größer als 10 kDa gefüllt. Anschließend erfolgte die Dialyse gegen mindestens den 100-fachen Volumenüberschuss an Puffer A ohne Imidazol über Nacht bei 4 °C. Am Morgen wurde der Puffer erneuert und für weitere 6 Stunden dialysiert.

4.7.1.5 Weitere Aufreinigung mittels Gelfiltration

Gelfiltrationsmaterialien bestehen aus Dextranmolekülen. Diese bilden ein Netzwerk aus porösen Teilchen mit Zwischenräumen und wirken ähnlich einem Molekularsieb. Niedermolekulare Substanzen dringen in die Poren des Materials ein und werden verlangsamt. Größere Moleküle hingegen eluieren im Ausschlussvolumen des Materials in den ersten Fraktionen.

Es wurde eine Superdex™ 75 Gelfiltrationssäule mit einem Säulenvolumen von 120 ml an einer Chromatographie-Anlage ÄKTA Basic 10 better (GE Healthcare) verwendet. Auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule wurden mithilfe des High Load™-Systems (Pharmacia) insgesamt 3 ml einer Proteinlösung über einen Auftragsloop injiziert. Die Flussrate betrug 1 ml/min bei 4 °C. Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts wurde die Säule mit Proteinen bekannter Größe kalibriert, wobei die Elution mithilfe der Absorptionsspektroskopie bei 280 nm überwacht wurde. Protein enthaltende Fraktionen wurden abermals gepoolt.

4.7.1.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden mithilfe der Roti®-Spin MINI (ROTH, 10 kDa) über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Volumen des einzukonzentrierenden Proteins.

4.7.1.7 Lagerung von gereinigtem Protein

Die Proteine wurden in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert.

4.7.2 Das Baculovirus-Expressionssystem

Das Baculovirus-Expressionssystem dient der Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen und ist eines der meist verwendeten Systeme zur Genexpression (Kost, *et al.*, 2005).

Baculoviren sind pathogene, doppelsträngige DNA-Viren, die Larven von Motten und Schmetterlingen befallen. In der Umwelt sind die Viruspartikel von Aggregaten des kristallinen Proteins Polyhedrin umgeben, was den Viren Schutz vor UV-Strahlung und Temperaturschwankungen bietet (Harrap, 1972). Erst im basischen Milieu des Intestinaltraktes der Larven werden die Polyhedrinaggregate aufgelöst und die Virionen freigesetzt (Hu, 2005). Der Polyhedrin-Promotor gilt als der stärkste bekannte eukaryotische Promotor. Wird das Gen von Polyhedrin gegen ein beliebiges Gen ausgetauscht, hat dies keinerlei Auswirkungen auf die Virulenz des Baculovirus in Insektenzellen. Durch den starken Promotor werden extrem hohe Ausbeuten nativer Proteine erreicht, die außerdem in den eukaryotischen Insektenzellen posttranslational modifiziert werden. Aber erst die Ungefährlichkeit der Viren für den Menschen - Baculoviren wirken nur auf Larven von Motten und Schmetterlingen pathogen (Hu, 2005) - macht das Baculovirus-system zum idealen Expressionssystem rekombinanter, eukaryotischer Proteine.

Das hier verwendete *Bac-to-Bac*-System (Invitrogen) nutzt rekombinante Baculovirus-DNA, die neben einer Kanamycinresistenz über eine Zielsequenz für das Transposon Tn7 (mini-*att*Tn7) verfügt und inmitten eines *lacZ*-Gens liegt. Dieses sogenannte Bacmid kann als Plasmid in *Escherichia coli* amplifiziert werden. Für die virale Amplifikation wird die spezielle Bakterienzelllinie DH10Bac benötigt, welche das zu exprimierende Gen flankiert von Tn7-Elementen enthält. Mithilfe eines ebenfalls in der DH10Bac-Zelllinie vorhandenen Helferplasmids, welches die für die Transposition von Tn7 nötigen Funktionen enthält, wird das zu exprimierende Gen in die baculovirale DNA eingeführt (Fitzgerald, *et al.*, 2006).

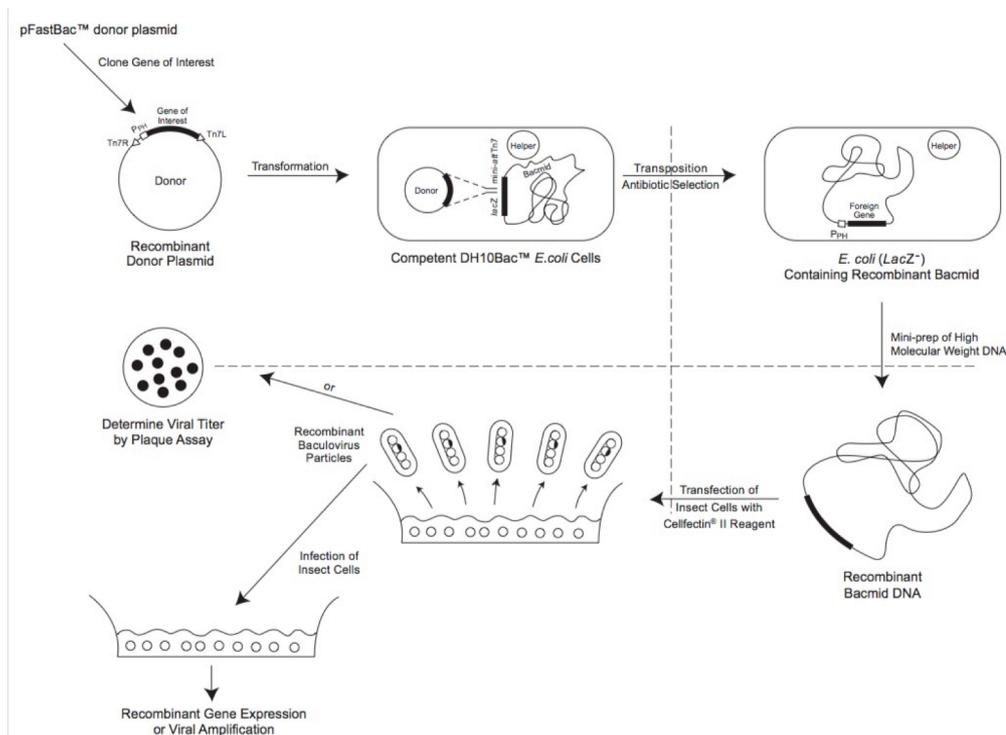


Abbildung 4.3: Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA mit DH10Bac-*E. coli*-Zellen
(aus Invitrogen, *Bac-to-Bac*, Baculovirus Expressions-System)

Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, wird durch Rekombination des Transposons in die mini-attTn7 Kopplungsstelle auf dem Bacmid das Leseraster der *lacZ*- α -Gene unterbrochen. Somit erscheinen die Bakterien mit dem aufgenommenen, rekombinanten Bacmid in Gegenwart von X-Gal und IPTG farblos, Kolonien mit dem ursprünglichen, unveränderten Bacmid sind blau gefärbt. Nach Amplifikation der DNA und anschließender Aufreinigung, kann die DNA direkt zur Transfektion von SF21-Zellen benutzt werden. Sobald das Bacmid von den Insektenzellen aufgenommen worden ist, beginnt die Zelle mit der Herstellung der rekombinanten Viren und das gewünschte Gen wird exprimiert (Invitrogen, *Bac-to-Bac*, Baculovirus Expressions-System). Eine genaue Beschreibung der Überexpression in SF21-Zellen erfolgt in Kapitel 4.8.2.

4.8 Arbeiten in der Zellkultur

In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Zelllinien gearbeitet. Für die Analyse von Rca1 aus *Drosophila melanogaster* wurden adhärenente *Drosophila*-Schneiderzellen verwendet, während für die Aufreinigung von FLAG-Rca1 und FLAG-Fzr für den Ubiquitinierungssassay die Insektenzellen SF21 zum Einsatz kamen.

4.8.1 *Drosophila*-Schneiderzellen

4.8.1.1 Auftauen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellsuspension sofort nach dem Auftauen mit 5 ml Kompletmedium in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Lösung wurde bei 1000 UpM für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit dem Zellgift DMSO sofort entfernt. Das Zellpellet wurde in 6 ml Kompletmedium resuspendiert, in eine kleine Kulturflasche überführt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach zwei Tagen wurde das Nährmedium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

4.8.1.2 Kultivierung

Für sämtliche Experimente mit Rca1 wurden adhärenente S2R+-Schneiderzellen verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 25 ml oder 200 ml Gewebekulturflaschen bei 27 °C. Dem Zellkulturmedium (Promocell und Pan Biotech) wurden 10% fötales Rinderserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Mix zugesetzt. Das Promocell Medium musste zusätzlich noch mit 1,8 mg/l L-Glutamin versetzt werden. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

4.8.1.3 Splitten

Die Zellen wurden zweimal die Woche im Verhältnis 1:4 gesplittet. Das alte Medium wurde hierfür mit einer Pasteurpipette entfernt und die adhärenenten Schneiderzellen einmal mit sterilem 1xPBS gewaschen, um Zellfragmente zu entfernen. Um die Zellen von der Gewebekulturflasche abzulösen, wurden sie für 5 Minuten mit 5 ml Trypsinlösung inkubiert. Anschließend ließen sich die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren leicht ablösen und wurden bei 1000 UpM für 2 Minuten in einem Falconröhr-

chen in der Zentrifuge Multifuge 3 L pelletiert. Der Trypsinüberstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 8 ml Zellkulturmedium resuspendiert. 2 ml dieser Suspension wurden in eine neue Gewebekulturflasche mit 15 ml frischem Medium überführt.

4.8.1.4 Zellzahlbestimmung in Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Für Experimente mit dem Durchflusszytometer (4.10) oder für mikroskopische Aufnahmen mittels live-cell-imaging (4.9) war es von Bedeutung, eine bestimmte Anzahl an Zellen auszusäen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 μl der Zellsuspension der gesplitteten Zellen (4.8.1.3) mit 80 μl Trypan-Blau gemischt und davon 20 μl in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer pipettiert (Gesamtfläche 16 mm^2 , Tiefe 0,2 mm, Rauminhalt 3,2 μl). Die Zählkammer enthält 16 große Quadrate, jeweils unterteilt in 16 kleinere Quadrate. Es wurde ein komplettes großes Quadrat ausgezählt und der Durchschnitt der Zellen für ein kleines Quadrat berechnet. Dieser Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor 0,32 multipliziert, woraus sich die Zellzahl $\times 10^6$ pro ml Zellsuspension ergibt. Trypan-Blau ist ein Farbstoff, der in lebende Zellen nicht eindringen kann, wodurch sie unter dem Mikroskop in einem blauen Umfeld weiß hervorscheinen und gut ausgezählt werden können.

4.8.1.5 Aussäen und Transfektion

Je nach Anwendung unterschied sich die Anzahl an ausgesäten Zellen. Für live-cell-imaging Aufnahmen wurden in eine 8-Well fassende IBIDI Schale pro Napf jeweils zwischen 65.000-70.000 Zellen in 280 μl Medium ausgesät. Bei Messungen am Durchflusszytometer kamen fast ausschließlich 6-Well Platten zum Einsatz, in die je Napf zwischen 650.000-700.000 Zellen in 3 ml Medium ausgesät wurden. Bei geringerem Bedarf an Zellen standen auch 12-Well Platten zur Verfügung, in die 180.000–200.000 Zellen in 1 ml Medium gegeben wurden.

Die Transfektion mit der gewünschten Plasmid-DNA erfolgte zumeist einen Tag nach Aussaat der Zellen frühestens jedoch nach 6 h. Je nach ausgesäter Zellzahl wurden die Zellen mit einer unterschiedlichen Menge an Plasmid-DNA transfiziert. Für die 6-Well Transfektionskammern wurden 750-800 ng an Plasmid-DNA-Menge pro Napf eingesetzt, für eine 12-Well waren es 300-375 ng an Plasmid-DNA. Für die eigentliche Transfektion wurden 150 μl (50 μl bei 12 Well) Medium (ohne FBS und Penicillin/Streptomycin) in Reaktionsgefäße vorgelegt, die entsprechende Menge an Plasmid-DNA hinzugegeben und gut vermischt. Als Transfektionsreagenz wurde Fugene HD

(Roche oder Promega) verwendet. Sofort nach Zugabe von 3 μl (6-Well) bzw. 1 μl (12-Well) Fugene HD Transfektionsreagenz wurde das Reaktionsgefäß 2-3 Sekunden lang gemischt und der Ansatz nach 15 Minuten Inkubationszeit auf die Zellen pipettiert. Am Abend desselben Tages oder am nächsten Morgen wurde die Expression des jeweiligen Proteins durch Zugabe von CuSO_4 -Lösung (Endkonzentration: 500 μM) induziert. Ein auftretendes Problem der transienten Transfektion ist die zufällige Verteilung der eingesetzten Plasmide. So kommt es durchaus vor, dass Zellen unter dem Mikroskop ein starkes GFP-Signal, aber nur ein schwaches oder sogar gar kein Cherry-Signal aufweisen. Für die Analyse des Rca1-Abbaus wurden mittels live-cell-imaging Zellen ausgewählt, die sowohl im GFP- als auch im Cherry Kanal gut detektierbare Signale zeigten.

4.8.1.6 Einfrieren

Als Einfriermedium wurden 4,5 ml frisches Medium mit 4,5 ml Zellüberstand mit 1 ml sterilem DMSO vermischt.

Die einzufrierenden Zellen wurden wie unter 4.8.1.3 beschrieben trypsinisiert, in 4 ml Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (4.8.1.4). Nach erneutem abzentrifugieren wurde das Pellet in kaltem Einfriermedium resuspendiert, so dass die Zellsuspension eine Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml besaß. 1 ml davon wurde in vorgekühlte 1,5 ml Cryoröhrchen pipettiert, bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und nach vier Tagen zur Langzeitkonservierung in einen Stickstofftank ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) überführt.

4.8.2 SF21-Insektenzellen

4.8.2.1 Kultivierung

SF21-Zellen stammen aus den Ovarzellen des Heerwurmes *Spodoptera frugiperda*, (Patterson, *et al.*, 1995). Die Zellen wurden vom Lehrstuhl Biochemie III der Universität Regensburg von der Arbeitsgruppe Prof. Gernot Längst aus einer bereits wachsenden Kultur bereitgestellt und in einem Volumen von 20 ml SF-900 II Medium (Invitrogen) in 250 ml Erlenmeyerkolben bei 27 °C und 75 UpM kultiviert. Dabei wurde extrem auf steriles Arbeiten geachtet, da dem Medium keine Antibiotika zugesetzt waren.

4.8.2.2 Splitten

Bei SF21-Zellen muss darauf geachtet werden, dass sie sich ständig im logarithmischen Wachstum befinden, d.h. im Bereich von Zelldichten zwischen $0,5 \times 10^6$ und $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml. Deshalb wurde jeden Tag mithilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt (gleiches Vorgehen wie bei Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, 4.8.1.4). Dabei wurde auch die Anzahl an toten Zellen mitbestimmt, wobei der Anteil nicht über 5% der gesamten Zellzahl betragen sollte. Ab einer Zelldichte von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml wurden die Zellen wieder auf ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml und ein Gesamtvolumen von 20 ml ausgedünnt.

4.8.2.3 Transfektion von SF21-Zellen und Gewinnung von V0

Zur Transfektion von SF21-Zellen wurden logarithmisch wachsende Zellen einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in SF-900 II Medium verwendet. Davon wurden je 2 ml in 5 der 6 Näpfe einer 6-Well-Platte ausgesät. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen im 6-Well verteilt und für 15 Minuten bei RT inkubiert, wodurch sich die Zellen am Boden des Wells absetzten. In der Zwischenzeit wurde Bacmid-DNA für zwei parallele Transfektionen in Duplicaten vorbereitet. Hierfür wurden jeweils 100 µl SF-900 II Medium in Reaktionsgefäße vorgelegt, ca. 50 – 100 µg Bacmid-DNA hinzugegeben und gut vermischt. Parallel dazu wurde als Negativkontrolle ein Well SF21-Zellen ohne Bacmid-DNA transfiziert. Ein weiteres Well enthielt 2 ml SF-900 II Medium ohne Zellen. Als Transfektionsreagenz wurde Fugene HD (Roche oder Promega) verwendet. Sofort nach Zugabe von 6 µl Fugene HD Transfektionsreagenz wurde das Reaktionsgefäß 2-3 Sekunden lang gevortext und für 15 Minuten inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich die

Lipid-Komplexe mit der eingeschlossenen Bacmid-DNA aus und jeder Ansatz wurde gleichmäßig auf zwei Wells verteilt. Nach dem Absetzen der Insektenzellen in der 6-Well wurde das überstehende Medium von den fünf Näpfen mit Zellen abgesaugt, einmal mit 2 ml SF-900 II Medium gewaschen und mit 3 ml Medium überschichtet. Die 6-Wells wurden mit Parafilm verschlossen, um Kontaminationen zu vermeiden, und bei 27 °C inkubiert. Nach 48 – 60 h wurde der Überstand abgenommen und für jedes Bacmid vereinigt, d.h. pro transfiziertem Bacmid erhielt man ca. 6 ml Virusstock V0, der bei 4 °C gelagert wurde.

Für einen ersten Test, ob die Transfektion mit der Bacmid-DNA funktioniert hatte, wurden erneut 3 ml Medium auf die Zellen gegeben und diese nach weiteren 24 – 48 h bei 27 °C mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen, und mit Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten aufgekocht. Die Expression der gewünschten Proteine konnte im Western-Blot über Antikörperfärbung oder über Coomassiefärbung untersucht werden.

Unter Verwendung des eYFP-Bacmids, welches im Bacmid ein eYFP-Gen enthält, konnte die Effizienz der Proteinexpression und damit der Transfektion verfolgt werden (Bieniossek, *et al.*, 2008). Dazu wurden die Zellen mit dem Fluorimeter PTI unter Verwendung eines entsprechenden Filters analysiert.

4.8.2.4 Infektion von SF21-Zellen mit Viruslösung V0

Zur Amplifikation von Baculoviren wurde eine geringe-MOI-Infektion („*Low Multiplicity Of Infection*“) mit dem Virusstock V0 durchgeführt. Dazu wurden logarithmisch wachsende SF21-Zellen in 20 ml Medium mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml durch einfache Zugabe von 10 – 50 μ l V0-Stock infiziert. Nach 24, 48 und 72 h wurde die Zellzahl bestimmt und die Zelldichte auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Nach 48-72 h erreichten die Zellen den „dpa“ („*day after proliferation arrest*“) und es erfolgte keine Zellteilung mehr. Zu diesem Zeitpunkt haben die Baculoviren alle Zellen befallen und ihnen auf Kosten der eigenen Zellteilung die Produktion der Virenpartikel aufgezwungen. Von diesem Zeitpunkt an wurde 48 h später der Überstand durch Zentrifugieren bei 800 UpM, 15 Minuten bei RT gewonnen. Dieser Virusstock V1 hatte eine deutlich höhere Konzentration als V0. Der Virusstock konnte bei 4 °C gelagert und für nachfolgende Infektionen verwendet werden. Die Zellpellets wurden bis zur Testaufreinigung in flüssigem Stickstoff verwahrt.

4.8.2.5 Titration der Viruslösung V1

Für eine optimale Proteinanreicherung sollte jede Zelle nur von einem Virus infiziert werden. Um für nachfolgende Infektionen ein optimales Virus-Zellen-Verhältnis zu bestimmen, wurde eine Titration der Viruslösung V1 durchgeführt. Dazu wurden in alle sechs Näpfe eines 6-Wells 2 ml einer mit $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml logarithmisch wachsenden SF21-Zellkultur ausgesät und für 15 Minuten bei 27 °C inkubiert. Danach wurden verschiedene Konzentrationen von V1-Stock zugegeben (0, 1, 5, 25, 50, 100 μ l) und bei 27 °C inkubiert. 24 bzw. 48 h nach Infektion wurde unter dem Fluoreszenz-Mikroskop der Anteil an leuchtender und somit der Anteil an eYFP-Bacmid infizierter Zellen ermittelt, wobei nach 48 h ein Großteil der Zellen infiziert sein sollte. Um das optimale Verhältnis von zugegebenem Virus V1 zu infizierten Zellen zu bestimmen, konnte das Zellpellet nach einem Waschschrift mit PBS und nach Aufschluss der Zellen für eine Testreinigung im kleinen Maßstab verwendet werden.

4.8.2.6 Infektion mit optimalem V1/Zell-Verhältnis

Mit der Ermittlung des optimalen Verhältnisses zwischen Zellen und Virus kann die Infektion der Zellen in größerem Maßstab durchgeführt werden. Die Arbeitsschritte entsprechen dabei den Vorhergehenden (4.8.2.5). Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch eine Aufreinigung in großem Maßstab nicht mehr durchgeführt, da sich herausgestellt, dass die Viruskonzentration des V1-Stocks zu gering war, um ein optimales Virus/Zell-Verhältnis erreichen zu können.

4.8.2.7 Aufschluss von SF21-Insektenzellen

Die eingefrorenen und bei -80 °C gelagerten SF21-Zellpellets (4.8.2.4) der V1-Stock Herstellung wurden mit 1 ml Lysepuffer/ 10^6 Zellen versetzt und gut resuspendiert. Durch mehrmaliges Auftauen bei Raumtemperatur und Einfrieren in flüssigem Stickstoff und einer angeschlossenen Sonifizierung (fünf Wiederholungen zu je 30 s, 30 s Pause, auf Eis) wurden die meisten Zellkerne aufgebrochen. Unlösliche Bestandteile dieses Zellextrakts wurden durch Zentrifugation bei 4500 UpM, 15 Minuten bei 4 °C abgetrennt. Der dabei erhaltene Überstand enthielt die löslichen Proteine.

4.9 Live-cell-imaging

Die live-cell-imaging-Aufnahmen entstanden mit dem konfokalen, inversen Mikroskopsystem Cell Observer® SD (Carl Zeiss).

4.9.1 Mikroskopsystem

Für die live-cell-imaging-Aufnahmen kam das Mikroskop Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) zur Anwendung. Die Bilder und die daraus entstandenen Filme wurden mit dem Objektivtyp Plan-Apochromat mit einer 20-fachen Vergrößerung und der Digitalkamera Axio-Cam MRm Rev3 aufgenommen. Die Pixelanzahl dieser Kamera beträgt 1388 x 1040 mit einer Pixelgröße von 6,45 µm x 6,45 µm.

Als Lichtquelle kam die Spinning-Disc-Laser-Technologie (Yokogawa Electric Corporation) zum Einsatz. Für die Detektion des GFP Signals wurde der OPSL-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 100 mW verwendet, für die Detektion des Cherry Signals der Dioden Laser bei einer Wellenlänge von 561 nm und einer Leistung von 40 mW.

4.9.2 Vorbereitung der Zellkulturzellen

Zellen für das live-cell-imaging wurden wie unter 4.6.1.5 beschrieben auf ibidi-Objekträger vorbereitet. Zwischen Kupfersulfatzugabe und den mikroskopischen Aufnahmen lagen mindestens 36, besser jedoch 48 h. Für die Aufnahmen unter dem Mikroskop wurde das alte Medium abgesaugt und durch 350 µl frisches Medium mit CuSO₄ ersetzt.

4.9.3 Bedingungen am Mikroskop

Als Systemsoftware wurde das Programm AxioVision (Carl Zeiss) genutzt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h verfolgt. Um die Zellen bei einer konstanten physiologischen Temperatur von 27 °C unter dem Mikroskop zu kultivieren, wurde am Mikroskop eine Temperaturkammer (ibidi) verwendet, die mit einer Vorlaufzeit von mindestens 4h vorgeheizt wurde. Für Multipositionsaufnahmen war das Mikroskopsystem mit einem vollautomatischen Tisch ausgestattet. Die Einstellungen am Mikroskop waren so gewählt, dass von jeder Position im 10 Minuten-Rhythmus Aufnahmen im

Durchlicht- (DIC), sowie im GFP- und Cherry-Kanal mit jeweils drei Z-Stapeln gemacht wurden. Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mithilfe des Programmes ImageJ.

4.10 Durchflusszytometrie

Am Durchflusszytometer („*Fluorescenc Activated Cell Sorting*“ (FACS)) wurde in dieser Arbeit der DNA-Gehalt von Zellen und somit die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellteilungsstadien bestimmt. Dabei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom verteilt, mit einem Laser angeregt und das Fluoreszenzlicht jeder einzelnen Zelle vermessen. Um die DNA detektieren zu können, wurden die Zellen mit dem Fluorochrom Hoechst 33342 angefärbt, welches aktiv in lebende Zellen aufgenommen wird und dort bevorzugt an AT-reiche Sequenzen bindet (Arndt-Jovin und Jovin, 1977). Bei Anregung mit Licht im UV-Bereich kann die Fluoreszenz detektiert werden.

4.10.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Durchflusszytometrie wurden Schneiderzellen in 6-Wells oder 12-Wells ausgesät, transfiziert und induziert (4.8.1.5). Die Zellen wurden für 2-3 Tage kultiviert. Am Tag der Analyse wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit PBS/5 mM EDTA überschichtet, um Zellfragmente zu entfernen. Durch eine Behandlung mit 1 ml Trypsin für 5 Minuten wurden die Zellen vom Boden des 6-Wells gelöst und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vom Boden entfernt. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 4 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert. Das Trypsin wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml PBS/5 mM EDTA erneut gewaschen und abzentrifugiert, bevor die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen wurden. Bevor der DNA-Gehalt der Zellen am Durchflusszytometer bestimmt werden konnte, wurden sie mit 1,5 µl Hoechst 33342 versetzt. Bis zur ersten Messung wurde nun das Durchflusszytometer vorbereitet und so lange mit PBS gewaschen, bis bei einer einstellbaren Durchlaufgeschwindigkeit von 10 weniger als 10 counts/s angezeigt wurden. Die Messung der ersten Probe, welche als Kontrolle die untransfizierten Schneiderzellen enthielt, begann 20 Minuten nach der Zugabe von Hoechst.

4.10.2 Messung am Durchflusszytometer

Für die Durchflusszytometrie stand das Gerät CyFlow[®]-space-flow-cytometer (Partec) zur Verfügung. Die Datenerfassung und die Darstellung erfolgte mit dem mitgelieferten Programm FloMax[®].

Folgende technischen Instrumente wurden für die Messungen eingesetzt: Als Laser und Lichtquelle diente die UV-LED (365 nm) und der Sapphire 561 Laser. Um die Fluoreszenzen detektieren zu können, wurden drei verschiedene Detektoren und Filter verwendet, der FL1-Bandpass-Filter BP 527/30 für grüne Fluoreszenz (GFP), der FL2-Bandpass-Filter BP 455/50 für die blaue Fluoreszenz (Hoechst) und der FL3-Bandlongpass Filter BP603/75 für die rote Fluoreszenz (Cherry).

In den einzelnen Messungen wurde immer die gesamte Zellpopulation eingesetzt, da die Transfektionsrate bzw. die Signalstärke der GFP-positiven Zellen recht gering war und dies eine hohe Durchlaufrate zwingend notwendig machte. Die einzelnen Proben wurden mit einer maximalen Durchflussgeschwindigkeit von 1200 Zellen pro Sekunde vermessen (counts/s).

Neben den gewünschten Transfektionen wurden in jedem Experiment auch immer nicht transfizierte S2R⁺-Zellen gemessen. Die Histogramme der untransfizierten Zellen dienen der Erstellung von Gates, um eine Selektion für eine bestimmte Auswahl an Zellen im DNA-Profil zu treffen. Um mehrere Bedingungen für eine Auswertung zu berücksichtigen, wurde die Schnittmenge einer oder mehrerer Gates in Form von Kombinationsgates gebildet.

In Abbildung 4.4 sind die verschiedenen Histogramme einer Beispielmessung im Programm FloMax[®] dargestellt. In dieser Probe waren Schneiderzellen mit einem HA-NLS-GFP-Rca1-Protein, sowie einer NES-3xCherry Transfektionskontrolle transient transfiziert.

Bei der Durchflusszytometrie werden nicht nur Zellen, sondern auch Zellfragmente und andere Partikel erfasst. Die Menge an Verunreinigung in der Probe kann anhand der Darstellungen in den Histogrammen A und B abgelesen werden, in denen zum einen der FSC, zum anderen der SSC gegen die gemessene Anzahl an Partikeln (counts) aufgetragen worden ist. Der FSC („*forward scatter*“; Abb. 4.4 A) ist ein Maß für die Partikelgröße, während der SSC („*side scatter*“; Abb. 7.4 B) ein Maß für die Zell-Morphologie ist. In beiden Fällen spiegelt der große Peak die Zellen wieder, die jeweiligen kleineren Erhebungen davor entsprechen den Verunreinigungen. Werden FSC und SSC gegeneinander aufgetragen (Abb. 4.4 D), so sind die Zellen in dem mit “R1” bezeichneten Gate zu finden

und Verunreinigungen links bzw. links unterhalb. Die Farbe spiegelt dabei die Anzahl an Partikeln/Zellen wieder; je dunkler desto mehr counts wurden in diesem Bereich detektiert.

Werden die Kanäle FL1 und FL3 gegen counts aufgetragen, so lassen sich GFP-positive (FL1; Abb. 4.4 C), sowie Cherry-positive Zellen (FL3; Abb. 4.4 E) innerhalb der gesetzten Gates RN1 bzw. RN2 nachweisen, während untransfizierte Zellen außerhalb der Gates im Bereich zwischen 0 und 1 zu finden sind. Wird der FL1 Kanal gegen FSC abgebildet (Abb. 4.4 H), sind GFP-positive Zellen ab dem Wert von 1 in ihrer Häufigkeit dargestellt, sofern das Gate RN1 zugrunde gelegt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gates (sowohl GFP- als auch Cherry-) an die Messung der untransfizierten Zellen zu Beginn des Experiments angepasst.

Ist der FL2 Kanal gegen die counts aufgetragen (Abb. 4.4 F), wird der DNA-Gehalt aller Zellen in Form eines Zellzyklusprofils angezeigt. Dabei entspricht der erste Peak den Zellen mit einem einfachen (1C), der zweite Peak Zellen mit einem doppelten Chromosomensatz (2C). Die S-Phase-Zellen in denen die DNA gerade synthetisiert wird, befindet sich dazwischen. Im Histogramm, bei dem FL2 nach FL2-W aufgetragen ist (Abb. 4.4 G), können einzelne Zellen in der G2/M-Phase von zwei assoziierten Zellen in G1, die den gleichen DNA-Gehalt besitzen, unterschieden werden. Assoziierte Zellen treten vermehrt auf, wenn die counts/s Rate durch eine zu hohe Flussgeschwindigkeit den Wert von 1200 überschreitet und der Laser nicht mehr effizient genug zwischen einzelnen Zellen unterscheiden kann. Durch Setzen eines Gates (bei FL2-W Werten zwischen 200-400; nicht dargestellt), können die Falsch-positiven wieder aus den Berechnungen genommen werden.

4.10.3 Auswertung der Daten

Die erhaltenen Rohdaten wurden im Anschluss mit dem Programm FCS Express (De Novo Software) ausgewertet.

Für eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Datensätze, wurden die Gates der GFP- und Cherry-positiven Zellen (Abb. 4.4 C und E; RN1, RN2) anhand der untransfizierten S2R+ Zellen unter das Limit von 0,25% GFP- bzw. Cherry-positiver Zellen gesetzt. Zudem wurden die Gates für die Zellen (Abb. 4.4 D; R1) und für den DNA-Gehalt (Abb. 4.4 G; nicht eingezeichnet) angepasst.

Für die weitere Analyse der Daten wurde ein Makro in Excel verwendet. Dazu wurden die einzelnen Kanäle (Cherry-negative-, Cherry-positive-, GFP-negative-, GFP-positive-, Cherry- und GFP-positive- sowie negative Zellen) exportiert.

Je nach Fragestellung wurde die Berechnungsformel etwas modifiziert (2.3.1.1 und 2.3.1.2).

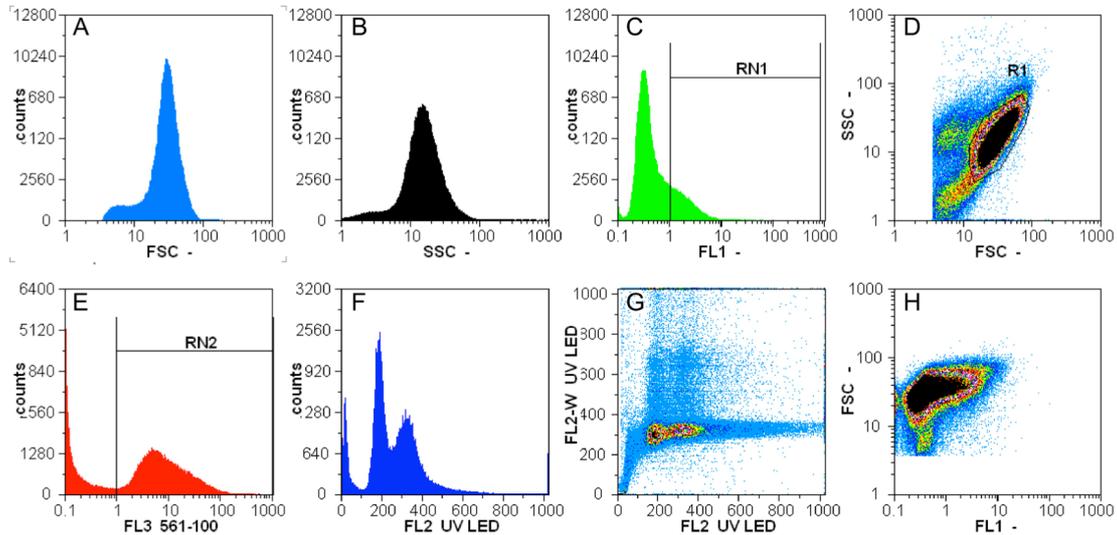


Abb 4.4: Darstellung der Histogramme bei der Messung mit der Software FloMax®

Histogramme von S2R⁺-Zellen, die mit einem HA-NLS-GFP markiertem Rca1 Protein sowie einer HA-NES-3xCherry Transfektionskontrolle transfiziert wurden.

A: forward scatter (FSC) gibt das Maß für die Partikelgröße an. Die Menge an Zellfragmenten und Verunreinigungen wird anhand der Höhe der Schulter angezeigt.

B: side scatter (SSC) ist das Maß für die Partikel-Morphologie. Verunreinigungen bilden auch hier eine Schulter aus.

C: FL1 entspricht dem GFP-Kanal. GFP-positive Zellen liegen innerhalb des dargestellten Gates RN1 bei Werten >1, GFP-negative Zellen bei Werten <1.

D: Auftragung von FSC gegen SSC. Zellen liegen innerhalb des R1 Gates, Zellfragmente und andere Verunreinigungen außerhalb. Die farbliche Abstufung von Hell nach Dunkel verdeutlicht die Häufigkeit der gemessenen Partikel in den Bereichen.

E: FL3 entspricht dem Cherry-Kanal. Cherry-positive Zellen liegen innerhalb des dargestellten Gates RN2 bei Werten >1, Cherry-negative Zellen bei Werten <1.

F: FL2 zeigt die Gesamtverteilung der Zellen im Zellzyklusprofil an. Um die Zellen sichtbar zu machen, wurde die DNA mit dem interkalierenden Reagenz Hoechst angefärbt.

G: Auftragung von FL2 gg FL2-W. Darstellung von Partikeln, die DNA enthalten. Kann als Maß verwendet werden, um eine einzelne Zelle mit doppeltem Chromosomensatz (G2/M) von zwei assoziierten Zellen in G1 zu unterscheiden.

H: Auftragung von FL1 gegen FSC, GFP-positive Zellen sind ab dem Wert >1 in ihrer Häufigkeit dargestellt. GFP negative Zellen sind bei Werten von <1 einzuordnen.

5 Material

5.1 Nukleinsäuren

Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTPs und NTPs	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Oligonukleotide (vgl. 8.9)	MWG-Biotech AG, Ebersberg

5.2 Enzyme und Proteine

BSA	Bioline GmbH, Luckenwalde
Color Plus Proteinmarker	New England Biolabs, Ipswich (USA)
E1-Enzym (human rekombinant) (HisTag)	Enzo Live Sciences GmbH, Lörrach
E2-Enzym UbcH5b (human rekombinant)	Enzo Live Sciences GmbH, Lörrach
FLAG-Ubiquitin	Biomol GmbH, Hamburg
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt
Lysozym	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Novozym 234	NovoBiolabs, Bagsvard (Danemark)
Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protease Inhibitor Single-Use Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
ProteoBlock™ Protease Inhibitor Cocktail	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteasom Inhibitor MG-132	Enzo Live Sciences GmbH, Lörrach
RNase A	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNase Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich (USA) Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
T7 Transkription Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
Taq-Polymerase	Biomaster GmbH, Windeck
Trypsin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach Promocell GmbH, Heidelberg
Ubiquitin	Enzo Live Sciences GmbH, Lörrach

5.3 Antikörper und Seren

5.3.1 Primäre Antikörper und Antiseren

Tabelle 1: Liste der verwendeten primären Antikörper

Name	Nummer	Verdünnung	Beschreibung
12CA5 (α -ha)	357 AG Seufert	1:100	Monoklonaler Mausantikörper gegen das HA-Epitop (Field, <i>et al.</i> , 1988)
16B12 (α -ha)	373	1:5000	Monoklonaler Mausantikörper gegen das HA-Epitop (HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg)
9E10 (α -myc)	AG Seufert	1:100	Monoklonaler Mausantikörper gegen das MYC-Epitop (Evan, <i>et al.</i> , 1985)
M2 (α -FLAG)	374	1:5000	Monoklonaler Mausantikörper gegen das FLAG-Epitop (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
tetra-His (α -his)	AG Seufert	1:2000	Monoklonaler Mausantikörper gegen 4- oder 6xHistidin (Qiagen GmbH, Hilden)
GFP	294	1:2000	Monoklonaler Kaninchenantikörper gegen das GFP-Epitop (Torrey Pines Biolabs)
GFP (Serum)	363a	1:180	Monoklonaler Kaninchenantikörper gegen das GFP-Epitop
GFP (präabs.)	363a	1:100	Präabsorbierter monoklonaler Kaninchenantikörper gegen das GFP-Epitop

Die angegebenen Verdünnungen der Antikörper beziehen sich auf die Verwendung im Western Blot. Für die Immunpräzipitation wurden davon abweichende Mengen eingesetzt (4.6.2).

5.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper

Name	Nummer	Verdünnung	Beschreibung
Ziege- α -Maus IR-Dye 680	364	1:5000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Ziege- α -Kaninchen IR-Dye 680	366	1:5000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Ziege- α -Maus IR-Dye-800CW	367	1:5000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Ziege- α -Kaninchen IR-Dye-800CW	369	1:5000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

5.4 Chemikalien

2-Methyl-2-butanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid 30% / Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose ultra pure	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aminosäuren	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka, Deisenhofen und Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Pepton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Fluka, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G250	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylformamid (DMFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Euroagar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
FBS (Fötale Kälberserum)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Fugene HD	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim Promega GmbH, Mannheim
G418-Sulfat (Kanamycin)	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt
D-Galaktose	Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg
D-Glukose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Glutamin	Promocell GmbH, Heidelberg AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin <i>p.a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hoechst H 33258	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hygromycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Imidazol	AppliChem GmbH, Darmstadt
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Lithiumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Milchunion eG Lasana, Everswinkel
Magnesium(II)chlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natrium- β -Glycerophosphat	Fluka, Deisenhofen
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen

Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
p-Aminobenzoessäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
PCR Purification Kit	Qiagen GmbH Germany, Hilden
Penicillin/Streptomycin 100x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Polyethylenglykol PEG 3350	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Ponceau S	Fluka, Deisenhofen
D-Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Schneider Drosophila Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
	Promocell GmbH, Heidelberg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N',Tetramethyldiamin)	Fluka, Deisenhofen
Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylen-Cyanol FF	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)

5.5 Verbrauchsmaterialien

1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml ReagiergefäÙe	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l Pipettenspitzen	G. Kisker GbR, Steinfurt
15 ml, 50 ml Falcon Tube	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
CompactPrep Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen GmbH Germany, Hilden
Deckgläser 24 x 32 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dialysemembran VS 0,025 μ m	Millipore GmbH, Schwalbach
Dialyseschläuche	Spectrum Laboratories, Inc., Breda
Glasperlen (0,45 - 0,5 mm)	Braun Biotech, Melsungen
Greiner LIA Plate white 96-Well	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Immersionsöl 518N	Zeiss, Jena
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel

Nucleo Spin Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG, Braunschweig
PCR Gefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
peqGOLD Plasmid Mini Kits	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH Germany, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH Germany, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH Germany, Hilden
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
	Nalge Nunc International Corp., Rochester (U.S.A.)
Whatman GB004 und GB005	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Zellkulturflaschen CELLSTAR	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur 6-Well Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkultur µ-Slide 8-Well	ibidi GmbH, Martinsried
Zellkultur 12-Well Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

5.6 Geräte und Software

5.6.1 Geräte

ÄKTAprime™ plus mit Rekorder Rec 102 mit HisTrap™ FF crude 5 ml	GE Healthcare, Freiburg
Brutschrank Tv50b (für E.coli)	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Brutschrank WB 120 K (für Hefen)	Mytron Bio- und Solartechnik GmbH, Heilbad Heiligenstadt
Brutschrank (Schneiderzellen)	Heraeus, Hanau
Digitalkamera E-500	Olympus, Hamburg
Durchflusszytometer CyFlow Space	Partec, Münster
Elektroblotapparatur Semi-Dry SEDEC M	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektroporationsapparatur Easyject Prima	Equibio, Maidstone Kent (UK)
Elektroporationsküvetten	Equibio, Maidstone Kent (UK)
	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Frogger	DAN-KAN Corp., Massachusetts (USA)

Gelapparatur für Acrylamidgele, Minigel	
Twin G42	Biometra, Göttingen
Gelapparatur für Agarosegele, HE33	Hofer, San Francisco (USA)
Heizblock	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Magnetrührer MR2000 und MR2002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
pH-Meter 766 Caltimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschman Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Reagenzglasroller TC-7	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Retschmühle MM200 und MM2000	Kurt Retsch GmbH, Haan
Rotator	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Schüttelwasserbad	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Schüttelwasserbad Aquatron	Infors AG, Einsbach
Schüttelinkubator VorTemp56	Labnet International Inc., Berkshire (UK)
Sonopuls-Ultraschall-Homogenisator HD2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spannungsgerät EV243	Consort, Turnhout (Belgien)
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla (USA)
UV-Tisch TF-20 M	Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée (Frankreich)
Vortex Mixer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Waage Kern EW6200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage Mettler AE50	Mettler Toledo Intl. Inc., Greifensee (Schweiz)
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Wippe	Bachhofer, Reutlingen
Wippe Rocky	Labortechnik Frobel GmbH, Lindau
Zählkammer Fuchs Rosenthal	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zentrifugen 5415 D, 5415 R und 5810	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus, Hanau

5.6.2 Software

Axio Vision LE Rel. 4.7	Carl Zeiss Vision
Canvas Version 11	ACD Systems of America, Inc.
FCS Express Version 4 (4.01.0018)	De Novo Software
Endnote X4.0.2	Niles Software Inc.
FilemakerPro 10.0v3	Filemaker Inc.
ImageJ	Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA)
Microsoft Office	Microsoft Corporation
Odyssey Infrared Imaging System Application Software Version 3.0	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Unicorn Version 5.0	GE Healthcare, Freiburg
Vektor NTI 11.0	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.7 Medien und Agarplatten

5.7.1 Bakterienmedien

LB-Flüssigmedium (autoklaviert) (Sambrook, <i>et al.</i> , 1989)	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	NaOH	0,3 mM
SOC-Flüssigmedium (sterilfiltriert)	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

Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde zusätzlich 1,7% Euroagar zugegeben. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenzen wurde das entsprechende Antibiotikum **Ampicillin** (Stammlösung 100 mg/ml in 50% Ethanol, Endkonzentration 100 µg/ml), **Kanamycin** (Stammlösung 50 mg/ml in Ethanol, Endkonzentration 50 µg/ml) oder **Chloramphenicol** (Stammlösung 50 mg/ml in Ethanol, Endkonzentration 50 µg/ml in Flüssigmedium bzw. 34 µg/ml in Platten) zugefügt.

5.7.2 Hefemedien

Vollmedium (XY) (autoklaviert)	Bacto Pepton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	Tryptophan	200 mg/l
	Adeninsulfat	100 mg/l
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	Zucker (nach dem Autoklavieren zugeben)	20 g/l

Selektivmedium (S)	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	100 ml/l	
	10x Drop-out -5	100 ml/l	
	Zucker	20 g/l	
	Adenin	50 mg/l	
	Histidin	(Entsprechend der Selektion zugegeben)	50 mg/l
	Leucin	100 mg/l	
	Tryptophan	100 mg/l	
Uracil	50 mg/l		

Als Zucker wurden folgende autoklavierte Stammlösungen eingesetzt: Glukose (20%) und Galaktose. Je nach Auxotrophiemarker wurde Selektivmedium ohne die entsprechenden Aminosäuren bzw. Basen verwendet. Für die Herstellung von festen Medien wurden 1,7% Bacto Agar zugegeben.

Verwendete Stammlösungen zur Herstellung von Hefemedien:

100x Adenin	Adeninsulfat	5 g/l
10x Drop-out ++	10x Drop-out -5 mit:	
	Adenin	500 mg/l
	Histidin	500 mg/l
	Leucin	1000 mg/l
	Tryptophan	1000 mg/l
	Uracil	500 mg/l
10x Drop-out -5	Alanin	500 mg/l
	Arginin	500 mg/l
	Asparagin	500 mg/l
	Aspartat	1000 mg/l
	Cystein	500 mg/l
	Glutamin	500 mg/l
	Glutamat	1000 mg/l
	Glycin	500 mg/l
	(myo-)Inositol	500 mg/l
	Isoleucin	500 mg/l
	Lysin	500 mg/l
	Methionin	500 mg/l
	Phenylalanin	500 mg/l
	Prolin	500 mg/l
	Serin	1000 mg/l
	Threonin	1000 mg/l
Tyrosin	500 mg/l	
Valin	1000 mg/l	
p-Aminobenzoesäure	50 mg/l	
20% Galaktose (autoklaviert)	Galaktose	200 g/l
20% Glukose (autoklaviert)	Glukose	200 g/l
100x Histidin	Histidin	5 g/l
100x Leucin	Leucin	10 g/l
100x Lysin	Lysin	5 g/l
100x Tryptophan	Tryptophan	10 g/l
50x Uracil	Uracil	2,5 g/l
10x YNB	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
	Ammoniumsulfat	50 g/l

Galaktose und Glukose wurden autoklaviert, alle anderen Stammlösungen wurden sterilfiltriert.

5.7.3 Drosophilafutter und Apfelagarplatten

Fliegenfutter (650 kg Mengenansatz)	Agar	240 g
	H ₂ O	10 l
	Maismehl	2,4 kg
	Trockenhefe	430 g
	Sojamehl	300 g
	Malzextrakt	2,4 kg
	Zuckerrübensirup	630 kg
	H ₂ O	15 l
	Propionsäure	190 ml

Der Agar wurde für 2,5 h mit 10 l Wasser verkocht, im Anschluß die Zuckerrübensirup-mischung zugegeben und für weitere 4,5 h gekocht. Nach Abkühlung auf 60 °C wurde die Propionsäure hinzugegeben und das Futter in Glasröhrchen abgefüllt.

Apfel-Agar (500 ml)	Saccharose	40 g/l
	Apfelsaft	
	Nipagin	15%
	Agar	12 g
	H ₂ O	600 ml

Die Saccharose wurde bei 60 °C in Apfelsaft gelöst und Nipagin (in 98% EtOH_{techn.} gelöst) zugeben. Dieses Nipagin-Apfelsaft-Zucker-Gemisch wurde mit dem Agar vermengt und Platten gegossen.

5.8 Puffer und Lösungen

Coomassie Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue G250	0,1%
	Essigsäure	10%
	Ethanol (techn.)	40%
Coomassie Entfärbelösung	Essigsäure	10%
	Ethanol	40%
DNA-Auftragspuffer	Bromphenolblau	0,25%
	Xylencyanol (optional)	0,25%
	Glycerin	50,0%
	EDTA	1 mM
	Tris/HCl pH, 7,8	10 mM
DNA-Auftragspuffer für Konzentrationsbestimmung	Bromphenolblau	0,25%
	Saccharose	40,0%
EasyPrep-Puffer	Tris/HCl pH, 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	15% (w/v)
	Lysozym	2 mg/ml
	RNase A	0,2 mg/ml
	BSA	0,1 mg/ml
HisTag Puffer A (Lyse-Puffer) (Summers und Jackson, 2009)	HEPES, pH 7,7	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	10 mM
	β-Mercaptoethanol	10 mM
HisTag Puffer B (Elutions-Puffer) (Summers und Jackson,	HEPES, pH 7,7	20 mM
	KCl	100 mM
	Imidazol	1 M

2009)	β -Mercaptoethanol	10 mM
Injektionspuffer (10x)	Natriumphosphat-Puffer, pH 6,8 KCl	1 mM 50 mM
IP-Puffer	Tris/HCl, pH 7,5 MgCl ₂ Na- β -Glycerophosphat, pH 7,3 EDTA, pH 8,0 EGTA, pH 8,0 Glycin 50 ml Ansatz hergestellt; vor dem Experiment frisch zugeben: Igepal DTT Protease-Inhibitor	10 mM 15 mM 80 mM 20 mM 20 mM 10% 0,20% 0,5 mM 1:100
Klorix	Chlorbleiche (Natriumhypochlorid) in H ₂ O	50,0%
LSB (Lämmli Auftragspuffer 4x)	Tris/HCl, pH 6,8 SDS Glycerin Bromphenolblau β -Mercaptoethanol	240 mM 80 mg/ml 400 mg/ml 800 μ g/ml 20%
Nipagin (15%)	Nipagin in 98% Ethanol techn.	15 g
Novozym-Lösung	Sorbitol Tris/HCl, pH 7,5 EDTA DTT Novozym	1 M 10 mM 1 mM 50 mM 2 mg/ml
PBS (1x)	NaCl Na ₂ HPO ₄ KCl KH ₂ PO ₄ pH 7,2 mit NaOH eingestellt	140 mM 10 mM 2,7 mM 1,8 mM
PBS-T	10 xPBS Tween 20 (20%)	100 ml/l 5 ml/l
PEG/LiAc	10 x TE 1M LiAc, pH 7,5 50% Polyethylenglykol 3350	100 ml/l 100 ml/l 800 ml/l
Ponceau S	Ponceau S Eisessig	1 g/l 50 ml/l
Proteinase K	Proteinase K TE	10 mg/ml 1 ml
Puffer A (Aufschlusspuffer)	HEPES (pH 7,7) NaCl Imidazol β -Mercaptoethanol	20 mM 500 mM 10 mM 10 mM
Puffer B (Elutionspuffer)	HEPES (pH 7,7) KCl Imidazol β -Mercaptoethanol	20 mM 100 mM 1 M 10 mM
RNase A	RNase A Tris/HCl, pH 7,5 NaCl	10 mg/ml 10 mM 15 mM
SDS-PAGE	Wasser	1,5 ml

Sammelgel (1 Stück, 4%ig) Angaben aus Molecular Cloning - A Laboratory Manual (Sambrook, <i>et al.</i> , 1989)	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 Acrylamid 30%/Bisacrylamid 10% SDS 10% APS TEMED	625 µl 335 µl 25 µl 25 µl 2,5 µl
SDS-PAGE Trenngel (1 Stück, 9%ig) Angaben aus Molecular Cloning - A Laboratory Manual (Sambrook, <i>et al.</i> , 1989)	Wasser 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 Acrylamid 30%/Bisacrylamid 10% SDS 10% APS TEMED	4,4 ml 2,5 ml 3,0 ml 100 µl 100 µl 10 µl
SDS-Sample-Puffer (nicht reduzierend)	Tris pH 6,8 Glycerin SDS Bromphenolblau (2% Lösung) H ₂ O	4,8 ml 4,0 ml 0,8 g 0,1 ml auf 10 ml
TAE (50x) (1 l)	Tris/Acetat, pH 8,0 EDTA pH 8,0 mit Eisessig eingestellt	242,3 g 18,6 g
TBS (10x) (5 l)	Tris-Base NaCl pH 7,6 mit HCl eingestellt	121 g 400,5 g
TE (10x)	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA	100 mM 10 mM
Thioesterpuffer (10x)	HEPES pH 7,5 NaCl ATP MgCl ₂	100 mM 1 M 400 µM 20 mM
Transferpuffer (1 l) Für Proteine < 100 kDa	Tris-Base Glycin SDS (10%) Methanol	3,63 g/l 14,4 g/l 4 ml/l 200 ml
Transferpuffer (1 l) Für Proteine > 100 kDa	Tris-Base Glycin SDS (10%) Methanol	3,63 g/l 14,4 g/l 10 ml/l 100 ml
Turbo-LRB (Lämmli Laufpuffer, 10x)	Tris-Base Glycin SDS	250 mM 9,46 M 10 g/l

5.9 Oligonukleotide

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für ortsspezifische Mutagenese

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
SPO_028 →	ATATGGATCCAACGAGTCTGGCTACAC	Deletionsprimer BamH1-d25-rca1
SPO_029 →	ATATGGATCCGCTGAGGGCGAAAACCTGTCCG	Deletionsprimer BamH1-d50-rca1
SPO_030 →	ATATGGATCCCAGGAGCAGGACCTTTACTG	Deletionsprimer BamH1-d75-rca1
SPO_031 →	ATATGGATCCCCTTTCTCTATGACTCCGCG	Deletionsprimer BamH1-d100-rca1
SPO_036 →	AATCTAACCAAAGAGAATCCTCACGTGCCCTT- GCAGACCTCGAACCATAGCAGCCTGGCC	

SPO_037 →	AATCCTCACGTGCCAGGGCGGTGCAGC	
SPO_038 →	GTGCCCAAGCGGTGCGCCCATGTGCCCAAGGC	
SPO_039 →	CAGCCATGTGCCAGGGCAAACCACAC	
SPO_040 →	GTGCCCAAGGCAAACCACGTAGTGCCATT-GCAGAC	
SPO_041 →	GTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTG	AmpS-Reparatur-Primer für das pAlter-System
SPO_042 →	GTTGCCATTGCGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC	AmpR-Knockout-Primer für das pAlter-System
SPO_043 →	GCCGGGCTCTTGCGGGATATCGTCCA	TetS-Reparatur-Primer für das pAlter-System
SPO_044 →	GCCGGGCTCTTGCGGGCGTCCATTCC	TetR-Knockout-Primer für das pAlter-System
SPO_046 →	ATAAGGATCCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	
SPO_047 ←	TTAATCTAGACTACTTGTACAGCTCGTCCAT-GCCG	
SPO_048 →	ATATCCATGGGACAGAACCACCGACTCAA	
SPO_049 ←	ATATGGATCCCCAAAACAGAGCCGCTTGAGC	Einfügen von C-terminaler BamHI Schnittstelle in Rca1
SPO_053 →	ATATCCATGGGATCGAGCATCCACCTGATG	
SPO_059 →	AGAGAATCCTCA-CGTGCCGCGGGTGCAGCCATGTGCC	Forward Mutageneseprimer Rca1-K221R und S224A; SacII Schnittstelle eingeführt
SPO_060 ←	GGGCACATGGGCGCACCGCCGCGGCACGTGAG-GATTCTCT	Reverse Mutageneseprimer Rca1-K221R und S224A; SacII Schnittstelle eingeführt
SPO_068 →	ATATGGATCCAAGCGACGCAAGAAACACTT	Deletionsprimer BamH1-d115-rca1
SPO_069 →	ATATGGATCCCTGCTCTTTCCCCACATAGA	Deletionsprimer BamH1-d133-rca1
SPO_070 →	ATATGGATCCGACATCGTGGCCAAGCTGGC	Deletionsprimer BamH1-d154-rca1
SPO_071 →	ATATGGATCCCAGAACCACCGACTCAAATT	Deletionsprimer BamH1-d203-rca1
SPO_072 ←	ATATACTAGTCCCGATCCAGACATGATAAGATA	Umklonierung von Hygromycinresistenz durch Einfügen von C-terminaler Spe1-Schnittstelle
SPO_084 →	TGAAGCTTCGTACGCTGCAGGGATCCATGGT-GAGC	PCR BamH1-3xCherry aus pFSR048 amplifiziert
SPO_085 ←	GGCGGCGGCTCGACGGCGGGCGGGTCTAG-AGCTTGTACAG	PCR 3xCherry-XbaI aus pFSR048 amplifiziert
SPO_091 →	ATATGGATCCGGATCGAGCATCCACCTGATG-GACG	Deletionsprimer mit BamHI-Schnittstelle um Rca1-d255 hinter GFP zu klonieren
SPO_098 ←	CGCGACTTGGAGCGCTATAGTCTAGACAT	Rca1-1-203-Stop-XbaI
SPO_100 ←	CCTCTATCTAGACTAGTTCTTCCCTGTGATTT-TCG	C-terminale Verkürzung von Rca1 um 7 AS
SPO_101 →	ATATGGATCCATGAGCGCCTATTATCGGCG	BamHI-ATG-Rca1
SPO_103 ←	ATGTCTAGACTAACC GCCGTAGAAGCGATT	C-terminale Verkürzung von Rca1 1-150-Stop-XbaI
SPO_104 ←	ATGTCTAGACTAGTGGCCACTGGGCGTGTT	C-terminale Verkürzung von Rca1 1-75-Stop-XbaI
SPO_105 ←	GCTCAAGCGGCTCTGTTTTTAGTCTAGAATAT	Einfügen von XbaI-Schnittstelle am C-terminalen Ende von Rca1; Stop-

		XbaI
SPO_106 ←	CTATCTAGACTAGCTCGAGTTGCCCGAGTCCAT	C-terminale Verkürzung von Rca1 1-255-Stop-XbaI
SPO_107 ←	CCTCTATCTAGACTACAGTCGCTCCCGTGGCAT	C-terminale Verkürzung von Rca1 um 24 AS
SPO_108 ←	CTATCTAGACTAACGCTCGCCGGGATGCGACTT-GCA	C-terminale Verkürzung von Rca1 um 43 AS
SPO_109 ←	CTATCTAGACTAGGCGAAGTTATATGGCGG	C-terminale Verkürzung von Rca1 um 67 AS (vor ZBR)
SPO_110 →	CCTCTATCTAGACTATAGGTTTTCGCCACACTT	C-terminale Verkürzung von Rca1 um 112 AS
SPO_138 →	TATAGAATTCATGGCGATGCAGAAGTTCTT	Umklonierung APC/C-UE Cdc23 in Matchmakerplasmide pGADT7 und pGBKT7
SPO_139 ←	ATATGGATCCCTAATCGATGGATACGCTGG	Umklonierung APC/C-UE Cdc23 in Matchmakerplasmide pGADT7 und pGBKT7
SPO_140 →	TATAGAATTCCTCACATTCTTCTCCGGATCC	Umklonierung Rca1 in Matchmakerplasmide pGADT7 und pGBKT7
SPO_141 ←	ATATGTCGACTCCTTCACAAAGATCCTCTA	Reverseprimer zum Umklonieren von Rca1 in Matchmakerplasmide pGBKT7
SPO_142 ←	ATATGAGCTCTCCTTCACAAAGATCCTCTA	Reverseprimer zum Umklonieren von Rca1 in Matchmakerplasmide pGADT7
SPO_143 ←	TATATCTAGATCCCAGACGGTCACGTAGCC	Amplifizierung der 1. Hälfte des Fzr-Fragments aus RG-037-Fzr-HA mit eingefügter XbaI-Schnittstelle
SPO_144 →	ATATGAATTCTGTGGCGCCAATAAGCAGA	Amplifizierung der 2. Hälfte des Fzr-Fragments aus RG-037-Fzr-HA mit eingefügter NcoI-Schnittstelle
SPO_145 →	TATAGAATTCATGTTTAGTCCCGAGTACCA	Amplifizierung der 1. Hälfte des Fzr-Fragments aus RG-037-Fzr-HA; ohne HA-tag mit EcoRI
SPO_146 ←	TCAAGCGGCTCTGTTTTTAGGAATTCTATA	Umklonierung von Rca1 in pGal-ARSCEN Plasmid für Überexpression in Hefe
SPO_148 →	TATAGGATCCCAGAACCACCGACTCAAATT-GAATCTAACCAAAGCGGCTCCTCACGTGCC	Mutageneseprimer mit gleichzeitiger Rca1-Verkürzung und Einführung von BamHI
SPO_151 →	TATAATCGATCCATGGATTACAAGGACGAT-GACGATAAGG	Amplifizierung von FLAG-SkpA aus SQ-042 mit ClaI-Schnittstelle (für Y2H)
SPO_153 ←	TATACTCGAGTTACTTCTCCTCGCACCA-CTCGTTC	Amplifizierung von FLAG-SkpA aus SQ-042 mit XhoI-Schnittstelle (für Klonierung in Y2H pGADT7)
SPO_154 →	TATACATATGGAGAAAAAACTATCTAG-AACTAGTATG	Umklonierung 4xHA aus pWS674 mit NdeI Schnittstelle (Reverseprimer CO_402)
SPO_155 →	TATACATATGAAAACCCCGGATTCTAGAA-GATCTATG	Umklonierung 3xFLAG aus pWS2216 mit NdeI Schnittstelle (Reverseprimer CO_402)
SPO_156 ←	TATACTGCAGTTACTTCTCCTCGCACCA-	Amplifizierung von FLAG-SkpA aus

	CTCGTTC	SQ-042 mit PstI-Schnittstelle (für Klonierung in Y2H pGBKT7)
SPO_157 →	TATACCCGGGCATGGATTACAAGGACGAT-GACGATAAGG	Amplifizierung von FLAG-SkpA aus SQ-042 mit XmaI-Schnittstelle (für Klonierung in Y2H pGBKT7) im Leseraster
SPO_202 →	TATATCTAGACTAGGATCCGGAGAAGAATGT-GAG	Stop-Codon direkt nach GFP-Linker
SPO_209 →	ATATATGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC	Deletion des Linkers zwischen GFP und Rca1 (GFP-BamHI)
SPO_210 →	ATATTCTAGACTAGGATCCCTTG-TACAGCTCGTCCATGC	GFP-BamH1-STOP-XbaI nach Deletion des Linkers zwischen GFP und Rca1
SPO_216 →	TATAACATGTCCTACCCATATGATGTTCCAGAT-TAC	Umklonierung von HA-CycB-N285-10xHA in pFASTBac THT_A
SPO_218 →	TATACCCGGGAATGATGATTCA-AGAGCCCGTGCAG	Forwardprimer um Cdc27 in pGBKT7 zu klonieren
SPO_219 ←	TATAGCGGCCGCCTAGTAGTCGCTGTGCTAGCTTCCG	Reverseprimer um Cdc27 in pGBKT7 zu klonieren
SPO_220 →	TATACCCGGGAATGCGTCGCTACTCCACAG	Forwardprimer um Cdc16 in pGBKT7 zu klonieren
SPO_221 ←	TATAGCGGCCGCCTAGGTATCGAAGCTCATTTCC	Reverseprimer um Cdc16 in pGBKT7 zu klonieren
SPO_222 ←	TATAGAGCTCCTAGGTATCGAAGCTCATTTCC	Reverseprimer um Cdc16 in pGADT7 zu klonieren
SPO_223 →	TATACCCGGGATGCGTCGCTACTCCACAGC	Forwardprimer um Cdc16 in pGADT7 zu klonieren
SPO_224 ←	TCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGG	Reverse Polyhedrin Sequenzierprimer für pFastBacTHT
SPO_225 →	AAATGATAACCATCTCGCAAATAAA	Forward Polyhedrin Sequenzierprimer für pFastBacTHT
SPO_227 ←	ATATCTCGAGGGTGTCTTGTGCTTCTCGTAG-AAG	XhoI Primer for Vihar
SPO_229 ←	ATATCTCGAGCATAGCATACTTTCTAGTCCACTC	XhoI Primer for Effete
SPO_236 →	ATATGCGGCCGCATCTAGACTAAAAACAGAGC	NdeI Primer for CycB-N285-10xHA
SPO_235 ←	ATATCTCGAGTGCATAGTCCGGGACGTCATAGGG	XhoI Primer for CycB-N285-10xHA
SPO_243 →	ATATCATATGTCGAGCGGTCAGCAATT	Uba1-ATG-Oligo
SPO_247 ←	ATATTCTAGATTAACCACCACGGAGACGAAG-GACC	Ubiquitin-Stop-Xba
SPO_248 →	ATATCCATGGCGTTAAAAAGAATCAATAAGG	NcoI Primer for Effete
SPO_249 →	ATATCCATGGCGCAGAATATCAGCCCCGAG	NcoI Primer for Vihar
SPO_255 →	TATATCTAGACATATGTCGAGCGGTCAGCAATT-GATGG	Uba1-ATG-Oligo-XbaI-NdeI
SPO_256 →	CCGAGCCAGCAGCAACGCGG	Uba1-Sal
SPO_257 ←	TTGGCGAATTGCAGCACCAG	Uba1-Sal bw
SPO_261 ←	TGGCGGCCGCTCTAGAGGCGCTCTCGAGACAT-GCATAGTC	CycB-N285-10xHA in pet21a (XhoI)
SPO_262 →	ATATATCATATGGTGGGCACAACACTG	CycB-N285-10xHA in pet21a (NdeI)
SPO_263 ←	TATATCTAGACTACACCCTTCCGGCATCCACGTC	C-terminale Deletion von Rca1 dC140

SPO_264 →	ATATGGATCCTTGTGCGAAACTCTGCCTATT	N-terminale Rca1-Deletion Rca1-d298
SPO_270 →	ATATGCTAGCATGGTGGGCACAACACTG	Klonierung von CycB-N285 in pET24a Vektor, Einführen von N-terminaler Nhe1-Schnittstelle
SPO_271 →	ATATGCTAGCATGGCTTCGAGCGCTGCC	Klonierung von Geminin 1_101 in pET24a Vektor, Einführen von N-terminaler Nhe1-Schnittstelle
SPO_293 →	GTGGATGCCG- GAAGGGTGTCTGCGCGCAGACGCAGCGCGTCA- AGTGTCCG	Einführen einer Punktmutation E272A mit neuer BssHII-Schnittstelle
SPO_294 →	AGGGTGTCTGCGCGAGCAGACGCAGGCCGTGCGCAT GGTGTCTGCGCGAGCAGACGCAGGCCGTGCGCAT- GCCCCGATGCGGTTCGAGGCAGCCG	Einführen zweier Punktmutationen R276A_K278A mit neuer Sph1-Schnittstelle
SPO_295 →	ACGCAGCGCGTCAAGTGTCCGGCAT- GCGGCCGAGGCAGCCGGTTTTTCATAAGCGAG	Einführen einer Punktmutation R281A mit neuer EagI-Schnittstelle

(Mit dem →-Pfeil wird der Forwardprimer angedeutet, ←-Pfeil entspricht dem Reverseprimer)

5.10 Plasmide und Vektoren

5.10.1 Verwendete Stammplasmide

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Stammplasmide

Plasmid	Beschreibung	Organismus/Verwendung	Nummer	Quelle/Referenz
pAlter ^R -1 Vector ^(a)	2μ, Amp ^R ; Tet ^S	<i>E. coli</i> / Mutagenesevektor	pNZ-001	Promega (AG Sprenger)
pBlueskript II KS+	2μ, Amp ^R ;	<i>E. coli</i> / Klonierungsvektor	pFSR-092	Stratagene, (Alting-Mees und Short, 1989) (AG Seufert)
Matchmaker pGBKT7-BD	2μ, Kan ^R ; Gal4-BD_MYC	<i>S. cerevisiae</i> / Interaktionsvektor	pFSR-213	Clontech Laboratories, Inc. (AG Dresselhaus)
Matchmaker pGADT7-AD	2μ, Amp ^R ; Gal4-AD_HA	<i>S. cerevisiae</i> / Interaktionsvektor	pFSR-214	Clontech Laboratories, Inc. (AG Dresselhaus)
Matchmaker pGBKT7-53	2μ, Kan ^R ; Gal4-BD_MYC-53	<i>S. cerevisiae</i> / Interaktionsvektor	pFSR-215	Clontech Laboratories, Inc. (AG Dresselhaus)
Matchmaker pGBKT7-Lam	2μ, Kan ^R ; Gal4-BD_MYC-lam	<i>S. cerevisiae</i> / Interaktionsvektor	pFSR-216	Clontech Laboratories, Inc. (AG Dresselhaus)
pET21a(+)	T7-Promotor-MCS-His ₆ -Tag-T7-Terminator, Amp ^R	<i>E. coli</i> / Expressionsvektor	pOT-178	Novagene, Darmstadt (AG Sprenger)
pET24a(+)	T7-Promotor-MCS-His ₆ -Tag-T7-Terminator, Kan ^R	<i>E. coli</i> / Expressionsvektor	pFSR-549	Novagene, Darmstadt (AG Sterner)
pET28a(+)	T7-Promotor-His ₆ -Tag-MCS-T7-Terminator, Kan ^R	<i>E. coli</i> / Expressionsvektor	pOT-218	Novagene, Darmstadt (AG Sprenger)
pFast-Bac HT_a	Amp ^R , Gentamycin ^R , ATG-6xHis-TEV-MCS-SV40 pA-Tn7L	<i>Baculovirus</i> / Expressionsvektor	pFSR-471	(AG Meister)

5.10.2 Plasmide von Klonierungszwischenstufen

Tabelle 5: Plasmide von Klonierungszwischenstufen

Name	Nummer	Stammhintergrund	Verwendungszweck
Gal4-AD_HA_3xFLAG	pFSR-253	Matchmaker pGADT7-AD	Hefe-2-Hybrid Interaktionsstudien
Gal4-AD_HA_4xHA	pFSR-238	Matchmaker pGADT7-AD	Hefe-2-Hybrid Interaktionsstudien
pGAL1-MYC3-Rca1-tCYC1	pFSR-239		Komplementationsstudie
pGAL1-MYC3-Rca1-tCYC1	pFSR-295		Komplementationsstudie
pGAL1-MYC3-tCYC1 ARSCEN	pFSR-212		Komplementationsstudie
pGAL1-Rca1-tCYC1	pFSR-292		Komplementationsstudie
GFP-C-term	pFSR-049		Rca1-Punktmutanten
HA-Rca1_Del-1-203_K228R	pFSR-073	pAlter	Rca1-Punktmutanten
HA-Rca1_Del-1-203_K228R_T232V	pFSR-089	pAlter	Rca1-Punktmutanten
HA-Rca1_Del-1-203_S224A_V233L	pFSR-072	pAlter	Rca1-Punktmutanten
HA-Rca1_Del-1-203_T232V	pFSR-074	pAlter	Rca1-Punktmutanten
HA-Rca1_Del-221-234	pFSR-050	pAlter	Rca1-Punktmutanten
Rca1_Del-1-203	pFSR-085	pBSII Bluescript KS+	Rca1-Punktmutanten
Rca1_Del-1-203_K221R_S224A	pFSR-098	pBSII Bluescript KS+	Rca1-Punktmutanten
Rca1_Del-1-203_K221R_S224A_T232V	pFSR-097	pBSII Bluescript KS+	Rca1-Punktmutanten
Rca1_Del-1-203_K228R	pFSR-087	pBSII Bluescript KS+	Rca1-Punktmutanten
Rca1_Del-1-203_S224A_T232V	pFSR-091	pBSII Bluescript KS+	Rca1-Punktmutanten
Rca1_Del-1-203_S224A_V233L	pFSR-086	pBSII Bluescript KS+	Rca1-Punktmutanten
Rca1_Del-1-203_T232V	pFSR-088	pBSII Bluescript KS+	Rca1-Punktmutanten
10xHA	pFSR-560	pET24a	Ubiquitynylierungsassay
CycB_Del-292-530_2xHA_103aa	pFSR-522		Ubiquitynylierungsassay
CycB_Del-292-530_10xHA_77aa	pFSR-548		Ubiquitynylierungsassay
Uba1-1.Teilklonierung	pFSR-519		Ubiquitynylierungsassay
Uba1-2.Teilklonierung	pFSR-520		Ubiquitynylierungsassay

5.10.3 Plasmide für Rca1-Derivate mit GFP-Epitopmarkierung

Tabelle 6: Verwendete Plasmide für GFP-epitopmarkierte Rca1-Derivate

Name	GFP(H)	GFP(D)	GFP(G)	Verwendungszweck
GFP		pFSR-359 (-) pFSR-360 (+)	pFSR-399 (-) pFSR-400 (+)	Kontrolle Durchflusszytometer
HA-NLS-3xGFP		pFSR-128 (3xGFP D-C-C)		Kontrolle Durchflusszytometer
Rca1	pFSR-024 (-)	pFSR-007 (-)	pFSR-425 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_C351S		pFSR-110 (-)	pFSR-669 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_dCdk1-P			pFSR-516 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_dGSK			pFSR-667 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_E215A-N216A-(KEN-KAA)			pFSR-670 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_E215A-N216A-(KEN-KAA)_C351S		pFSR-146 (-)		Live-cell-imaging / FACS

Rca1_E215A-N216A-(KEN-KAA)_C351S_Del-405-411		pFSR-163 (-)	pFSR-731 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_E215A-N216A-(KEN-KAA)_Del-405-411		pFSR-166 (-)	pFSR-730 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_Del-299-411			pFSR-545 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-025_Del-221-234		pFSR-059 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-050_Del-204-411			pFSR-588 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-075_Del-151-411		pFSR-174 (-)	pFSR-619 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-075_Del-204-257			pFSR-616 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-075_Del-204-411			pFSR-589 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-075_Del-221-234		pFSR-061 (-)	pFSR-460 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-100_Del-204-411		pFSR-175 (-)	pFSR-620 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-100_Del-221-234		pFSR-062 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-115_Del-204-411			pFSR-591 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-115_Del-221-234		pFSR-101 (-)	pFSR-461 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-133_Del-204-411			pFSR-592 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-133_Del-221-234		pFSR-102 (-)	pFSR-462 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-154_Del-204-411			pFSR-593 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-154_Del-221-234		pFSR-103 (-)	pFSR-463 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-117-134_Del-204-411			pFSR-700 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203	pFSR-064 (-)	pFSR-084 (-) pFSR-245 (+)	pFSR-426 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_C351S		pFSR-113 (-) pFSR-384 (+)	pFSR-422 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del_344-411			pFSR-429 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del_368-411			pFSR-428 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del_387-411			pFSR-427 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-221-234	pFSR-144 (-)	pFSR-104 (-)	pFSR-434 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-221-234_C351S			pFSR-543 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-221-234_Del-258-411		pFSR-233 (-) pFSR-277 (+)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-258-411		pFSR-276 (+) pFSR-182 (-)	pFSR-401 (-) pFSR-402 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-268-411			pFSR-550 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411		pFSR-181 (-)	pFSR-430 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_C278A			pFSR-654 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_C281A			pFSR-649 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_D264A			pFSR-650 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_E215A_N216A-(KEN-KAA)_E271A			pFSR-628 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_E215A_N216A-(KEN-KAA)_R275A_K277A			pFSR-629 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_E271A			pFSR-625 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_F288A			pFSR-658 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_K277A			pFSR-671 (+)	Live-cell-imaging / FACS

Rca1_Del-1-203_Del-299-411_Q272A			pFSR-652 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_Q274A			pFSR-653 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R267A			pFSR-651 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R275A			pFSR-672 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R275A_K277A			pFSR-626 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R280A			pFSR-627 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R280K			pFSR-697 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R283A			pFSR-655 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_R286A			pFSR-657 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-299-411_S285A			pFSR-656 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-345-411		pFSR-180 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-368-411		pFSR-179 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-368-411_C351S			pFSR-508 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-387-411		pFSR-178 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-387-411_C351S			pFSR-507 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-405-411		pFSR-328 (-)	pFSR-732 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-405-411-Frameshift		pFSR-165 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)		pFSR-355 (+)	pFSR-420 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_C351S		pFSR-385 (+)	pFSR-423 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_C351S_Del-405-411			pFSR-734 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_Del-221-234_Del-258-411		pFSR-234 (-) pFSR-247 (+)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_Del-405-411			pFSR-733 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_R280A_Del-299-411			pFSR-630 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A-N216A-(KEN-KAA)		pFSR-329 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A-N216A-(KEN-KAA)_C351S		pFSR-176 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A-N216A-(KEN-KAA)_C351S_Del-405-411		pFSR-162 (-) pFSR-183 (+)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A-N216A-(KEN-KAA)_Del-258-411		pFSR-232 (-) pFSR-275 (+)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A-N216A-(KEN-KAA)_Del-405-411		pFSR-167 (-) pFSR-356 (+)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_K214A-(KEN-AEN)		pFSR-320 (-) pFSR-357 (+)	pFSR-421 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_K221R-S224A		pFSR-100 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_K221R-S224A-T232V		pFSR-099 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_K228R_T232V		pFSR-096 (-)	pFSR-458 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_K228V		pFSR-076 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_K277A			pFSR-676 (+)	Live-cell-imaging / FACS

Rca1_Del-1-203_K277A_C351S			pFSR-677 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_S224A_V233L		pFSR-075 (-)	pFSR-457 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_T232V		pFSR-077 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-220		pFSR-108 (-)	pFSR-432 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-220_Del-268-411			pFSR-551 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-220_Del-299-411			pFSR-546 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-122-134_Del-204-411			pFSR-693 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-234		pFSR-109 (-)	pFSR-433 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-234_Del-268-411			pFSR-552 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-234_Del-299-411			pFSR-547 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-25_Del-117-134_Del-204-411			pFSR-699 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-25_Del-122-134_Del-204-411			pFSR-694 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-255	pFSR-063 (-)	pFSR-145 (-) pFSR-246 (+)	pFSR-544 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-255_C351S		pFSR-387 (-) pFSR-386 (+)	pFSR-424 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-255_Del-299-411			pFSR-518 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-255_Del-344-411			pFSR-517 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-298			pFSR-553 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-298_C351S			pFSR-615 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-50_Del-221-234		pFSR-060 (-)		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-151-411		pFSR-172 (-)	pFSR-617 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-59_Del-121-411			pFSR-674 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-164-203		pFSR-051 (-) MF	pFSR-668 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-164-203_C351S		pFSR-482 (-) AW		Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-203-257		pFSR-078 (-)	pFSR-459 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-204-411		pFSR-149 (-)	pFSR-431 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-221-234		pFSR-071 (-)	pFSR-666 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-368-411_C351S			pFSR-510 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-387-411_C351S			pFSR-509 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-405-411		pFSR-164 (-)	pFSR-729 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-51-411			pFSR-673 (+)	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-75-411		pFSR-173 (-)	pFSR-618 (+)	Live-cell-imaging / FACS

Im Labor von Prof. Sprenger sind verschiedene GFP-Epitope im Umlauf. Zur Unterscheidung wurden diese alphabetisch mit GFP(A) – GFP(H) durchnummeriert. In dieser Arbeit kamen einige davon zum Einsatz: **GFP(H)** entspricht dabei einer C-terminalen GFP-Fusion, **GFP(D)** einem N-terminalen GFP mit Linkerregion und **GFP(G)** einem N-terminalen GFP ohne Linkerregion.

Plasmide mit einem (+) in der Tabelle besitzen eine zusätzliche N-terminale Fusion mit HA-NLS direkt vor dem GFP-Epitop, bei (-) gekennzeichneten beginnt die Translation direkt beim GFP-Epitop.

5.10.4 Plasmide für Rca1-Konstrukte mit Cherry-Epitopmarkierung

Tabelle 7: Verwendete Plasmide für Cherry-epitopmarkierte Rca1-Konstrukte

Name	N-term 1xCherry	N-term 3xCherry	C-term 1xCherry	C-term 3xCherry	Verwendungszweck
HA-NES-3xCherry				pFSR-127	Kontrolle Durchflusszytometer (FACS)
HA-NLS-3xCherry				pFSR-140	Kontrolle Live-cell-imaging
Rca1	pFSR-404 (+)	pFSR-003 (-)	pFSR-070 (-)	pFSR-115 (-) pFSR-116 (-) 2xCherry	Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203	pFSR-409 (-)	pFSR-414 (+)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_C351S	pFSR-411 (-)	pFSR-416 (+)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-221-234_Del-258-411		pFSR-381 (+) pFSR-390 (-)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_Del-258-411	pFSR-403 (-)	pFSR-379 (+) pFSR-388 (-)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_C351S	pFSR-412 (-)	pFSR-417 (+)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_Del-221-234_Del-258-411		pFSR-382 (+) pFSR-391 (-)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_E215A_N216A-(KEN-KAA)_Del-258-411		pFSR-380 (+) pFSR-389 (-)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-203_K214A-(KEN-AEN)	pFSR-410 (-)	pFSR-415 (+)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-1-255_C351S	pFSR-413 (-)	pFSR-418 (+)			Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-151-411	pFSR-301 (-)				Live-cell-imaging / FACS
Rca1_Del-204-411	pFSR-300 (-)				Live-cell-imaging / FACS

Plasmide mit einem (+) in der Tabelle besitzen eine zusätzliche N-terminale Fusion mit HA-NLS direkt vor dem Cherry-Epitop, bei (-) gekennzeichneten beginnt die Translation direkt beim Cherry-Epitop.

5.10.5 Plasmide für Hefe-Zwei-Hybrid-System

Tabelle 8: Verwendete Plasmide für das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Name	Nummer	Verwendungszweck
Gal4-AD_HA-Rca1	pFSR-221	Interaktionsstudien
Gal4-AD_HA_4xHA-Rca1	pFSR-236	Interaktionsstudien
Gal4-AD_10xHA-Rca1	pFSR-312	Interaktionsstudien
Gal4-AD_HA_3xFLAG-Rca1	pFSR-235	Interaktionsstudien
Gal4-AD_13xFLAG-Rca1	pFSR-313	Interaktionsstudien
Gal4-BD_MYC-Rca1	pFSR-222	Interaktionsstudien
Gal4-AD_HA-SkpA	pFSR-315	Interaktionsstudien
Gal4-AD_FLAG-SkpA	pFSR-314	Interaktionsstudien
Gal4-AD_HA_3xFLAG-SkpA	pFSR-256	Interaktionsstudien
Gal4-BD_MYC_HA_SkpA	pFSR-321	Interaktionsstudien

Gal4-AD_HA-Cdc23	pFSR-220	Interaktionsstudien
Gal4-AD_HA_4xHA-Cdc23	pFSR-237	Interaktionsstudien
Gal4-AD_HA_3xFLAG-Cdc23	pFSR-254	Interaktionsstudien
Gal4-BD_MYC-Cdc23	pFSR-219	Interaktionsstudien
Gal4-AD_HA-3xFLAG-Cdc16	pFSR-467	Interaktionsstudien

5.10.6 Plasmide für Ubiquitinierungssassay

Tabelle 9: Verwendete Plasmide für den Ubiquitinierungssassay

Name	Nummer	Verwendungszweck
pER-His-GFP	pFSR-521	Kontrolle Überexpression
6xHis-Uba1	pFSR-523	Überexpression <i>E. coli</i>
CyclinB_Del-292-530-10xHA-6xHis	pFSR-565	Überexpression <i>E. coli</i>
Eff-6xHis	pFSR-472	Überexpression <i>E. coli</i>
Geminin_Del-102-192_10xHA-6XHis	pFSR-566	Überexpression <i>E. coli</i>
UbcH5b-6xHis	pOT-200	Überexpression <i>E. coli</i>
Ubiquitin-6xHis	pOT-201	Überexpression <i>E. coli</i>
Vihar-6xHis	pFSR-473	Überexpression <i>E. coli</i>
4xFLAG-Fzr	pFSR-599	<i>in vitro</i> -Translation
HA-CyclinB_Del-292-530-13xFLAG	pFSR-602	<i>in vitro</i> -Translation
HA-NLS-Geminin_Del-102-192-10xHA	pFSR-571	<i>in vitro</i> -Translation
HA-NLS-Geminin_Del-102-192-13xFLAG	pFSR-612	<i>in vitro</i> -Translation
pFastBacTHT_a-FLAG-Fzr	pFSR-440	Überexpression Baculo-System
pFastBacTHT_a-FLAG-Rca1	pFSR-439	Überexpression Baculo-System
pFastBacTHT_a-HA-CyclinB-Del-292-530-10xHA	pFSR-504	Überexpression Baculo-System

5.10.7 Plasmide für Vergleich von APC/C-Substraten

Tabelle 10: Verwendete Plasmide für den Vergleich von APC/C-Substraten

Name	Nummer	Verwendungszweck
HA-NLS-CyclinB_Del-292-530-3xCherry	pFSR-623	Live-cell-imaging
HA-NLS-CyclinB_Del-292-530-tagRFP	pFSR-624	Live-cell-imaging
HA-NLS-CyclinB_Del-292-530-2xGFP	pFSR-207	Live-cell-imaging
HA-NLS-GFP-Fzy	pFSR-444	Live-cell-imaging
HA-NLS-Geminin_Del-102-192-Cherry	pFSR-160	Live-cell-imaging
HA-NLS-Geminin_Del-102-192-3xCherry	pFSR-159	Live-cell-imaging
HA-NLS-Geminin_Del-102-192-GFP	pFSR-186	Live-cell-imaging
HA-NLS-GFP-Rca1	pFSR-425	Live-cell-imaging
Rca1-GFP	pFSR-024	Live-cell-imaging
Rca1-3xCherry	pFSR-115	Live-cell-imaging

5.11 Hefestämme

Tabelle 11: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenzen
AH109	MAT _a , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, gal80LYS2 :: GAL1 ^{UAS} -GAL1 ^{TATA} -HIS3; GAL2 ^{UAS} -GAL2 ^{TATA} -ADE2, URA3 :: MEL1 ^{UAS} -MEL1 ^{TATA} -lacZ, MEL1	(James, <i>et al.</i> , 1996) Clontech Laboratories, Inc.
Y187	MAT _α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4, met ⁻ , gal80, URA3 :: GAL1 ^{UAS} -GAL1 ^{TATA} -lacZ, MEL1	(Harper, <i>et al.</i> , 1993)

6 Literaturverzeichnis

- Alting-Mees, M.A., and Short, J.M. (1989).** pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res* 17, 9494.
- Amon, A. (1999).** The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 9, 69-75.
- Andrews, B., and Measday, V. (1998).** The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet* 14, 66-72.
- Araki, M., Yu, H., and Asano, M. (2005).** A novel motif governs APC-dependent degradation of Drosophila ORC1 in vivo. *Genes Dev* 19, 2458-2465.
- Arndt-Jovin, D.J., and Jovin, T.M. (1977).** Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J Histochem Cytochem* 25, 585-589.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (2005).** *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Bandura, J.L., Jiang, H., Nickerson, D.W., and Edgar, B.A. (2013).** The Molecular Chaperone Hsp90 Is Required for Cell Cycle Exit in Drosophila melanogaster. *PLoS genetics* 9, e1003835.
- Barford, D. (2011).** Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 366, 3605-3624.
- Bauer, M. (2011).** Analyse von G1/S-Regulatoren in Drosophila Schneiderzellen. *Masterarbeit*.
- Benmaamar, R., and Pagano, M. (2005).** Involvement of the SCF complex in the control of Cdh1 degradation in S-phase. *Cell Cycle* 4, 1230-1232.
- Berghammer, H., and Auer, B. (1993).** "Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in E. coli. *Biotechniques* 14, 524, 528.
- Bieniossek, C., Richmond, T.J., and Berger, I. (2008).** MultiBac: multigene baculovirus-based eukaryotic protein complex production. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 5*, Unit 5 20.
- Brachmann, R.K., and Boeke, J.D. (1997).** Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. *Curr Opin Biotechnol* 8, 561-568.
- Braman, J., Papworth, C., and Greener, A. (1996).** Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* 57, 31-44.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993).** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brzovic, P.S., and Klevit, R.E. (2006).** Ubiquitin transfer from the E2 perspective: why is UbcH5 so promiscuous? *Cell cycle* 5, 2867-2873.
- Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2001).** D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev* 15, 2381-2395.

- Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A., and Zachariae, W. (2003).** The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Molecular cell* 12, 87-100.
- Campbell, S.D., Sprenger, F., Edgar, B.A., and O'Farrell, P.H. (1995).** Drosophila Wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates Drosophila Cdc2 in vitro. *Mol Biol Cell* 6, 1333-1347.
- Carroll, C.W., Enquist-Newman, M., and Morgan, D.O. (2005).** The APC Subunit Doc1 Promotes Recognition of the Substrate Destruction Box. *Curr Biol* 15, 11-18.
- Castro, A., Vigneron, S., Bernis, C., Labbe, J.C., and Lorca, T. (2003).** Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box-independent pathway. *Mol Cell Biol* 23, 4126-4138.
- Chen, D., Wang, Q., Huang, H., Xia, L., Jiang, X., Kan, L., and Sun, Q. (2009).** Effete-mediated degradation of Cyclin A is essential for the maintenance of germline stem cells in Drosophila. *Development* 136, 4133-4142.
- Ciechanover, A., and Schwartz, A.L. (1994).** The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *Faseb J* 8, 182-191.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E. (2000).** Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6499-6503.
- Cohen-Fix, O., and Koshland, D. (1997).** The metaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis. *Curr Opin Cell Biol* 9, 800-806.
- de Nooij, J.C., Graber, K.H., and Hariharan, I.K. (2000).** Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo is regulated by cyclin E. *Mechanisms of development* 97, 73-83.
- de Nooij, J.C., Letendre, M.A., and Hariharan, I.K. (1996).** A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during Drosophila embryogenesis. *Cell* 87, 1237-1247.
- DeLano, W.L. (2002).** Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr Opin Struct Biol* 12, 14-20.
- den_Elzen, N., and Pines, J. (2001).** Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* 153, 121-136.
- Dienemann, A., and Sprenger, F. (2004).** Requirements of cyclin a for mitosis are independent of its subcellular localization. *Curr Biol* 14, 1117-1123.
- Dong, X., Zavitz, K.H., Thomas, B.J., Lin, M., Campbell, S., and Zipursky, S.L. (1997).** Control of G1 in the developing Drosophila eye: rca1 regulates Cyclin A. *Genes Dev* 11, 94-105.
- Dube, P., Herzog, F., Gieffers, C., Sander, B., Riedel, D., Muller, S.A., Engel, A., Peters, J.M., and Stark, H. (2005).** Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. *Mol Cell* 20, 867-879.
- Edgar, B.A., and Datar, S.A. (1996).** Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNAs terminates Drosophila's early cell cycle program. *Genes Dev* 10, 1966-1977.
- Edgar, B.A., and Lehner, C.F. (1996).** Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* 274, 1646-1652.

- Edgar, B.A., and Orr-Weaver, T.L. (2001).** Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105, 297-306.
- Edgar, B.A., Sprenger, F., Duronio, R.J., Leopold, P., and O'Farrell, P.H. (1994).** Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 8, 440-452.
- Eldridge, A.G., Loktev, A.V., Hansen, D.V., Verschuren, E.W., Reimann, J.D., and Jackson, P.K. (2006).** The *evi5* oncogene regulates cyclin accumulation by stabilizing the anaphase-promoting complex inhibitor *emi1*. *Cell* 124, 367-380.
- Enquist-Newman, M., Sullivan, M., and Morgan, D.O. (2008).** Modulation of the mitotic regulatory network by APC-dependent destruction of the *Cdh1* inhibitor *Acm1*. *Mol Cell* 30, 437-446.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., and Bishop, J.M. (1985).** Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-3616.
- Eytan, E., Moshe, Y., Braunstein, I., and Hershko, A. (2006).** Roles of the anaphase-promoting complex/cyclosome and of its activator *Cdc20* in functional substrate binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2081-2086.
- Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B., and Deshaies, R.J. (1997).** A complex of *Cdc4p*, *Skp1p*, and *Cdc53p/cullin* catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor *Sic1p*. *Cell* 91, 221-230.
- Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I.A., Lerner, R.A., and Wigler, M. (1988).** Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8, 2159-2165.
- Fields, S., and Sternglanz, R. (1994).** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10, 286-292.
- Fitzgerald, D.J., Berger, P., Schaffitzel, C., Yamada, K., Richmond, T.J., and Berger, I. (2006).** Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nature methods* 3, 1021-1032.
- Foe, I.T., Foster, S.A., Cheung, S.K., DeLuca, S.Z., Morgan, D.O., and Toczyski, D.P. (2011).** Ubiquitination of *Cdc20* by the APC occurs through an intramolecular mechanism. *Curr Biol* 21, 1870-1877.
- Foe, V.E. (1989).** Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* 107, 1-22.
- Frye, J.J., Brown, N.G., Petzold, G., Watson, E.R., Grace, C.R., Nourse, A., Jarvis, M.A., Kriwacki, R.W., Peters, J.M., Stark, H., et al. (2013).** Electron microscopy structure of human APC/C-EMI1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase shutdown. *Nat Struct Mol Biol*.
- Garnett, M.J., Mansfeld, J., Godwin, C., Matsusaka, T., Wu, J., Russell, P., Pines, J., and Venkitaraman, A.R. (2009).** UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit. *Nat Cell Biol* 11, 1363-1369.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002).** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., et al. (2003).** A protein interaction map of *Drosophila* melanogaster. *Science* 302, 1727-1736.

- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991).** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Peters, J.M. (2000).** The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8973-8978.
- Grosskortenhaus, R. (2001).** Charakterisierung der Zellzyklusfunktion von *rca1* (*regulator of cyclin A*) in *Drosophila melanogaster*. Ph.D.-Thesis *Ph.D.*
- Grosskortenhaus, R., and Sprenger, F. (2002).** Rca1 inhibits APC-Cdh1(Fzr) and is required to prevent cyclin degradation in G2. *Dev Cell* 2, 29-40.
- Guardavaccaro, D., Kudo, Y., Boulaire, J., Barchi, M., Busino, L., Donzelli, M., Margottin-Goguet, F., Jackson, P.K., Yamasaki, L., and Pagano, M. (2003).** Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev Cell* 4, 799-812.
- Haas, A.L., and Rose, I.A. (1982).** The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *The Journal of biological chemistry* 257, 10329-10337.
- Hansen, D.V., Loktev, A.V., Ban, K.H., and Jackson, P.K. (2004).** Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* 15, 5623-5634.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993).** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Harper, J.W., Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2002).** The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev.* 16, 2179-2206.
- Harrap, K.A. (1972).** The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II. The virus particle. *Virology* 50, 124-132.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974).** Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51.
- Hattori, K., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., and Nakayama, K. (1999).** Molecular dissection of the interactions among I κ B α , FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of I κ B α . *J Biol Chem* 274, 29641-29647.
- Hayes, M.J., Kimata, Y., Wattam, S.L., Lindon, C., Mao, G., Yamano, H., and Fry, A.M. (2006).** Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nat Cell Biol* 8, 607-614.
- Hendrickson, C., Meyn, M.A., 3rd, Morabito, L., and Holloway, S.L. (2001).** The KEN box regulates Clb2 proteolysis in G1 and at the metaphase-to-anaphase transition. *Curr Biol* 11, 1781-1787.
- Hershko, A. (1988).** Ubiquitin-mediated protein degradation. *The Journal of biological chemistry* 263, 15237-15240.
- Hoeller, D., Hecker, C.M., Wagner, S., Rogov, V., Dotsch, V., and Dikic, I. (2007).** E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. *Molecular cell* 26, 891-898.

- Höfer, S. (2011).** Etablierung von APC/C (Anaphase Promoting Complex / Cyclosome) Aktivitätsassays. Diploma thesis.
- Hsu, J.Y., Reimann, J.D., Sorensen, C.S., Lukas, J., and Jackson, P.K. (2002).** E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* 4, 358-366.
- Hu, Y.C. (2005).** Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin* 26, 405-416.
- Huang, J.Y., and Raff, J.W. (2002).** The dynamic localisation of the *Drosophila* APC/C: evidence for the existence of multiple complexes that perform distinct functions and are differentially localised. *J Cell Sci* 115, 2847-2856.
- Hyun, S.Y., Sarantuya, B., Lee, H.J., and Jang, Y.J. (2013).** APC/C(Cdh1)-dependent degradation of Cdc20 requires a phosphorylation on CRY-box by Polo-like kinase-1 during somatic cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 436, 12-18.
- Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., and Nasmyth, K. (1995).** Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* 81, 269-278.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D. (2000).** The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *10*, 429-439.
- Jacobs, H., Richter, D., Venkatesh, T., and Lehner, C. (2002).** Completion of Mitosis Requires Neither *fzr/rap* nor *fzr2*, a Male Germline-Specific *Drosophila* Cdh1 Homolog. *Curr Biol* 12, 1435.
- Jacobs, H.W., Keidel, E., and Lehner, C.F. (2001).** A complex degradation signal in Cyclin A required for G1 arrest, and a C-terminal region for mitosis. *Embo J* 20, 2376-2386.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996).** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O. (1999).** Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Current Biology* 9, 227-236.
- Johnston, L.A., and Edgar, B.A. (1998).** Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 394, 82-84.
- Kawall, K. (2010).** Etablierung von APC/C-Sensoren in *Drosophila melanogaster*. Diploma-Thesis.
- Kies, M. (2011).** Analyse von *rca1*-Allelen und Herstellung von transgenen *Drosophila* zur Bestimmung von Rca1-Aktivität in vivo. Bachelor Thesis.
- King, R.W., Glotzer, M., and Kirschner, M.W. (1996).** Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell* 7, 1343-1357.
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M.W. (1995).** A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81, 279-288.
- Knoblich, J.A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., and Lehner, C.F. (1994).** Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77, 107-120.

- Kost, T.A., Condreay, J.P., and Jarvis, D.L. (2005).** Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23, 567-575.
- Kraft, C., Vodermaier, H.C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.M. (2005).** The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol Cell* 18, 543-553.
- Kramer, E.R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M., and Peters, J.M. (1998).** Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol* 8, 1207-1210.
- Kramer, E.R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Peters, J.M. (2000).** Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* 11, 1555-1569.
- Lane, M.E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y.N., Lehner, C.F., and Vaessin, H. (1996).** Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87, 1225-1235.
- Lee, T.V., Ding, T., Chen, Z., Rajendran, V., Scherr, H., Lackey, M., Bolduc, C., and Bergmann, A. (2008).** The E1 ubiquitin-activating enzyme Uba1 in *Drosophila* controls apoptosis autonomously and tissue growth non-autonomously. *Development* 135, 43-52.
- Lehner, C.F., and O'Farrell, P.H. (1989).** Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell* 56, 957-968.
- Leverson, J.D., Joazeiro, C.A., Page, A.M., Huang, H., Hieter, P., and Hunter, T. (2000).** The APC11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. *Mol Biol Cell* 11, 2315-2325.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013).** Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079-3093.
- Littlepage, L.E., and Ruderman, J.V. (2002).** Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev.* 16, 2274-2285.
- Lukas, C., Sorensen, C.S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J.M., Bartek, J., and Lukas, J. (1999).** Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* 401, 815-818.
- Luo, L., and Kessel, M. (2004).** Geminin coordinates cell cycle and developmental control. *Cell Cycle* 3, 711-714.
- Manchado, E., Eguren, M., and Malumbres, M. (2010).** The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem Soc Trans* 38, 65-71.
- Margottin-Goguet, F., Hsu, J.Y., Loktev, A., Hsieh, H.M., Reimann, J.D., and Jackson, P.K. (2003).** Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* 4, 813-826.
- Mathe, E., Kraft, C., Giet, R., Deak, P., Peters, J.M., and Glover, D.M. (2004).** The E2-C vihar is required for the correct spatiotemporal proteolysis of cyclin B and itself undergoes cyclical degradation. *Curr Biol* 14, 1723-1733.

- Matuschewski, K., Hauser, H.P., Treier, M., and Jentsch, S. (1996).** Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *The Journal of biological chemistry* 271, 2789-2794.
- Matyskiela, M.E., and Morgan, D.O. (2009).** Analysis of activator-binding sites on the APC/C supports a cooperative substrate-binding mechanism. *Mol Cell* 34, 68-80.
- Matyskiela, M.E., Rodrigo-Brenni, M.C., and Morgan, D.O. (2009).** Mechanisms of ubiquitin transfer by the anaphase-promoting complex. *J Biol* 8, 92.
- McGarry, T.J., and Kirschner, M.W. (1998).** Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93, 1043-1053.
- Medenbach, J., Seiler, M., and Hentze, M.W. (2011).** Translational control via protein-regulated upstream open reading frames. *Cell* 145, 902-913.
- Miller, J.J., Summers, M.K., Hansen, D.V., Nachury, M.V., Lehman, N.L., Loktev, A., and Jackson, P.K. (2006).** Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev* 20, 2410-2420.
- Morgan, D.O. (2007).** *The Cell Cycle - Principle of Control* Oxford University Press.
- Moshe, Y., Bar-On, O., Ganoh, D., and Hershko, A. (2011).** Regulation of the action of early mitotic inhibitor 1 on the anaphase-promoting complex/cyclosome by cyclin-dependent kinases. *The Journal of biological chemistry* 286, 16647-16657.
- Moshe, Y., Boulaire, J., Pagano, M., and Hershko, A. (2004).** Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7937-7942.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1995).** Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270, 86-90.
- Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007).** Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201-205.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1992).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.
- Murray, A.W. (2004).** Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Murray, A.W., Solomon, M.J., and Kirschner, M.W. (1989).** The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339, 280-286.
- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006).** Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-381.
- Nasmyth, K. (1993).** Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol* 5, 166-179.
- Neufeld, T.P., de_la_Cruz, A.F., Johnston, L.A., and Edgar, B.A. (1998).** Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93, 1183-1193.
- Nurse, P., Thuriaux, P., and Nasmyth, K. (1976).** Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 146, 167-178.
- O'Farrell, P.H., Edgar, B.A., Lakich, D., and Lehner, C.F. (1989).** Directing cell division during development. *Science* 246, 635-640.

- Orr-Weaver, T.L. (1994).** Developmental modification of the *Drosophila* cell cycle. Trends in genetics : TIG 10, 321-327.
- Passmore, L.A. (2004).** The anaphase-promoting complex (APC): the sum of its parts? Biochemical Society transactions 32, 724-727.
- Passmore, L.A., Barford, D., and Harper, J.W. (2005).** Purification and assay of the budding yeast anaphase-promoting complex. Methods in enzymology 398, 195-219.
- Passmore, L.A., McCormack, E.A., Au, S.W., Paul, A., Willison, K.R., Harper, J.W., and Barford, D. (2003).** Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. Embo J 22, 786-796.
- Patterson, R.M., Selkirk, J.K., and Merrick, B.A. (1995).** Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. Environmental health perspectives 103, 756-759.
- Peters, J.M. (2006).** The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. Nat Rev Mol Cell Biol 7, 644-656.
- Peters, J.M., Tedeschi, A., and Schmitz, J. (2008).** The cohesin complex and its roles in chromosome biology. Genes Dev 22, 3089-3114.
- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W. (2000).** The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by *cdh1*. Genes Dev 14, 655-665.
- Pimentel, A.C., and Venkatesh, T.R. (2005).** rap gene encodes Fizzy-related protein (Fzr) and regulates cell proliferation and pattern formation in the developing *Drosophila* eye-antennal disc. Dev Biol 285, 436-446.
- Pines, J. (2011).** Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. Nature reviews. Molecular cell biology 12, 427-438.
- Querings, S. (2006).** Analysis of Rca1 function at the G1-S transition in *Drosophila melanogaster*. Ph.D.-Thesis *Ph.D.*
- Radermacher, P. (2007).** Untersuchungen zur Lokalisierung und Stabilität des Zellzyklus-Proteins Rca1 in *Drosophila melanogaster*. Diploma-Thesis *Diplomarbeit*.
- Raff, J.W., Jeffers, K., and Huang, J.-y. (2002).** The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. J. Cell Biol. 157, 1139-1149.
- Rape, M., and Kirschner, M.W. (2004).** Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. Nature 432, 588-595.
- Reber, A., Lehner, C.F., and Jacobs, H.W. (2006).** Terminal mitoses require negative regulation of Fzr/Cdh1 by Cyclin A, preventing premature degradation of mitotic cyclins and String/Cdc25. Development 133, 3201-3211.
- Reimann, J.D., Gardner, B.E., Margottin-Goguet, F., and Jackson, P.K. (2001).** Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. Genes Dev 15, 3278-3285.
- Reis, A., Levasseur, M., Chang, H.Y., Elliott, D.J., and Jones, K.T. (2006).** The CRY box: a second APC $cdh1$ -dependent degron in mammalian *cdc20*. EMBO Rep 7, 1040-1045.
- Richardson, H., O'Keefe, L.V., Marty, T., and Saint, R. (1995).** Ectopic cyclin E expression induces premature entry into S phase and disrupts pattern formation in the *Drosophila* eye imaginal disc. Development 121, 3371-3379.

- Russell, P., and Nurse, P. (1986).** cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145-153.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour.
- Sauer, K., Knoblich, J.A., Richardson, H., and Lehner, C.F. (1995).** Distinct modes of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9, 1327-1339.
- Schwickart, M., Havlis, J., Habermann, B., Bogdanova, A., Camasses, A., Oelschlaegel, T., Shevchenko, A., and Zachariae, W. (2004).** Swm1/Apc13 is an evolutionarily conserved subunit of the anaphase-promoting complex stabilizing the association of Cdc16 and Cdc27. *Mol Cell Biol* 24, 3562-3576.
- Shah, J.V., and Cleveland, D.W. (2000).** Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 103, 997-1000.
- Sigrist, S., Jacobs, H., Stratmann, R., and Lehner, C.F. (1995).** Exit from mitosis is regulated by *Drosophila* fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3. *Embo J* 14, 4827-4838.
- Sigrist, S.J., and Lehner, C.F. (1997).** *Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* 90, 671-681.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997).** F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-219.
- Smith, A.V., and Orr-Weaver, T.L. (1991).** The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis: the transition to polyteny. *Development* 112, 997-1008.
- Sprenger, F., Yakubovich, N., and O'Farrell, P.H. (1997).** S-phase function of *Drosophila* cyclin A and its downregulation in G1 phase. *Curr Biol* 7, 488-499.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995).** The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 6, 185-197.
- Sugimoto, N., Kitabayashi, I., Osano, S., Tatsumi, Y., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Matsukage, A., Kiyono, T., and Fujita, M. (2008).** Identification of novel human Cdt1-binding proteins by a proteomics approach: proteolytic regulation by APC/CCdh1. *Mol Biol Cell* 19, 1007-1021.
- Summers, M.K., and Jackson, P.K. (2009).** Biochemical analysis of the Anaphase Promoting Complex: activities of E2 enzymes and substrate competitive (pseudosubstrate) inhibitors. *Methods in molecular biology* 545, 313-330.
- Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Ozkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J., and Yu, H. (2001).** APC2 Cullin Protein and APC11 RING Protein Comprise the Minimal Ubiquitin Ligase Module of the Anaphase-promoting Complex. *Mol Biol Cell* 12, 3839-3851.
- Thomas, B.J., Zavitz, K.H., Dong, X., Lane, M.E., Weigmann, K., Finley, R.L., Jr., Brent, R., Lehner, C.F., and Zipursky, S.L. (1997).** roughex down-regulates G2 cyclins in G1. *Genes Dev* 11, 1289-1298.

- Tugendreich, S., Tomkiel, J., Earnshaw, W., and Hieter, P. (1995).** CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* *81*, 261-268.
- Vidwans, S.J., and Su, T.T. (2001).** Cycling through development in *Drosophila* and other metazoa. *Nat Cell Biol* *3*, E35-E39.
- Vodermaier (2001).** Cell cycle: Waiters serving the Destruction machinery. *Current Biology* *11*, R834–R837.
- Vodermaier, H.C. (2004).** APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol* *14*, R787-796.
- Vodermaier, H.C., Gieffers, C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.M. (2003).** TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr Biol* *13*, 1459-1468.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999).** The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* *68*, 1015-1068.
- Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001).** Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev* *15*, 1361-1372.
- Wang, W., and Kirschner, M.W. (2013).** Emi1 preferentially inhibits ubiquitin chain elongation by the anaphase-promoting complex. *Nat Cell Biol* *15*, 797-806.
- Williamson, A., Wickliffe, K.E., Mellone, B.G., Song, L., Karpen, G.H., and Rape, M. (2009).** Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 18213-18218.
- Yamaguchi, S., Okayama, H., and Nurse, P. (2000).** Fission yeast Fizzy-related protein *srw1p* is a G(1)-specific promoter of mitotic cyclin B degradation. *The EMBO journal* *19*, 3968-3977.
- Zachariae, W., and Nasmyth, K. (1999).** Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* *13*, 2039-2058.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W. (1998a).** Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* *282*, 1721-1724.
- Zachariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P.D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M.J., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998b).** Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* *279*, 1216-1219.
- Zielke, N. (2006).** Functional analysis of the cell cycle regulator Rca1 in *Drosophila melanogaster*. Ph.D.-Thesis.
- Zielke, N., Querings, S., Grosskortenhau, R., Reis, T., and Sprenger, F. (2006).** Molecular dissection of the APC/C inhibitor Rca1 shows a novel F-box-dependent function. *EMBO Reports* *7*, 1266-1272.
- Zur, A., and Brandeis, M. (2001).** Securin degradation is mediated by *fzy* and *fzr*, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *Embo J* *20*, 792-801.

7 Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletion
A	
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
B	
b	Base(n)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	
Cdk	Cyclin abhängige Kinase („ <i>cyclin dependent kinase</i> “)
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
D	
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>Desoxyribonuclein acid</i> “)
dNTP	Desoxyribonucleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	
FACS	„ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “
G	
GFP	„ <i>green fluorescent protein</i> “
H	
HA	Hämagglutinin-Epitop
I	
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IVT	<i>in vitro</i> -Translation
K	
KAF	kleinstes abbaubares Fragment (von Rca1-Deletion)
L	
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium
M	
mRNA	Boten RNA („ <i>messenger</i> “ RNA)
Myc	MYC-Epitop
N	
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
O	
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = x$ nm
ORF	Offener Leserahmen („ <i>open reading frame</i> “)

P	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
	PCR	Polymerasekettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
R	Rca1	„ <i>Regulator of cyclinA</i> “
	Retik-Lysat	Retikulozytenlysats
	RNA	Ribonukleinsäure („ <i>ribonucleic acid</i> “)
	RNase	Ribonuklease
	RT	Raumtemperatur
S	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SDS	Natriumdodecylsulfat („ <i>sodium dodecyl sulphate</i> “)
T	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
	TAE	Tris/Acetat/EDTA
	TBS	Tris-gepufferte Saline
	TE	Tris/EDTA
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	U	UpM
UTR		Untranslatierte Region einer mRNA („ <i>untranslated region</i> “)
üN		über Nacht
W	Wt	Wildtyp
X	XYD	XY-Vollmedium mit Glukose
	XYG	XY-Vollmedium mit Galaktose

Gene und Proteine wurden nach der geltenden Nomenklatur abgekürzt. Die Abkürzung von Aminosäuren und Nukleotiden erfolgte nach den internationalen Regeln. Teilweise wurden gängige Fachausdrücke aus dem Englischen übernommen, wenn kein entsprechender deutscher Fachausdruck existiert oder gebräuchlich ist. Die genormten Bezeichnungen für naturwissenschaftliche Größen und die festgelegten Wertangaben werden unverändert gebraucht. Die in der deutschen Sprache genormten Abkürzungen (Duden) wurden benutzt.

8 Lebenslauf

Christoph Daniel Morgenthaler

Geboren am 11.11.1980
in Regensburg

Anschrift Karl-Stieler-Straße 82
93051 Regensburg

Familienstand ledig
Nationalität deutsch



Schulische Ausbildung:

1987 – 1991 Grundschule Großberg

1991 – 2001 Gymnasium Neutraubling

2001 – 2002 Wehrdienst in Pfreimd und Regensburg

Akademischer Werdegang:

2002 – 2009 **Studium der Biologie** an der Universität Regensburg
Abschluss: Diplom
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Zellbiologie und organische Chemie
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik an der Universität Regensburg unter der Betreuung von Prof. Dr. W. Seufert
Titel: „Genetische Funktionsanalyse des Zellproliferationsproteins Cdc123 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“

2006 – 2007 **Auslandsstudium an der University of Kent**
in Canterbury, England
Abschluss: Diploma in biology with distinction

2009 – 2013 **Promotion** am Lehrstuhl für Genetik an der Universität Regensburg unter der Betreuung von Prof. Dr. F. Sprenger
Titel: „Der Zellzyklusregulator Rca1 – Inhibitor und Substrat des Anaphase-Promoting-Komplexes in *Drosophila melanogaster*“

Regensburg, den 26. November 2013

9 Danksagung

„Wenn man die Fähigkeit hat, die Sonne hinter den
Wolken zu sehen und nicht über die Wolken vor der
Sonne jammert, dann ist das Leben lebenswert.“

Unbekannter Autor

Eine Doktorarbeit anzufertigen ist mehr als die Abarbeitung der anstehenden Arbeit. Es gibt Tage, die sich schier endlos dehnen, bis die mit Spannung erwarteten Ergebnisse vorliegen. Die eigene Erwartungshaltung an die Forschungsergebnisse führt zu schlaflosen Nächten, aufgestaute Emotionen schlagen in Ärger und Frust um, Selbstzweifel und das Gefühl der Unfähigkeit sind weitere unangenehme Begleiterscheinungen. Es gibt Menschen an meiner Seite, die ausgleichend und aufmunternd, beratend und unterstützend auf mich einwirken, mich in schwierigen Phasen neuen Mut schöpfen und das Vorhaben aufs Neue angehen lassen. Diese menschlichen Komponenten bewogen mich nie aufzugeben und brachten mich dem großen Ziel zwar in kleinen, aber beständigen Schritten näher.

Den größten Anteil an der Vollendung dieser Arbeit trug mein Doktorvater Prof. Dr. Frank Sprenger. Mit seinen Ideen und Anregungen eröffnete er mir immer wieder neue Türen. Zudem war mir Prof. Dr. Wolfgang Seufert auch nach meiner Diplomarbeit stets Ansprechpartner und Unterstützer.

Was wäre aus meinem Vorhaben geworden ohne die menschliche Komponente? Ich habe umfassende Kollegialität und Menschlichkeit erfahren an diesem Lehrstuhl, Rücksichtnahme und Geduld von meiner Freundin Dani und meinen Freunden. Nicht vergessen möchte ich meine liebe Familie, meinen Vater Gustav, meine Mutter Christine und meine beiden Geschwister Barbara und Philipp.

Ihr alle habt mich die letzten Jahre über die Wolken getragen, so dass ich die Sonne nie aus den Augen verloren habe.

Dafür danke ich Euch von ganzem Herzen.