

Termination der Mitose: Die Rolle der Phosphatase Cdc14 beim M/G1-Übergang in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Albert Neutzner
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Mitberichter: Prof. Dr. Dieter Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 2002

Institut für Industrielle Genetik
der Universität Stuttgart

2002

1. Zusammenfassung	3
2. Zusammenfassung in englischer Sprache	5
3. Einleitung	7
3.1. Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
3.2. Der Zellteilungszyklus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
3.3. Die CDC Gene	9
3.4. Molekulare Mechanismen der Zellteilung	9
3.4.1. Die Regulation der zyklinabhängigen Kinase	9
3.4.2. Proteolyse im Zellteilungszyklus	10
3.4.2.1. Das Ubiquitin-Proteasomsystem	11
3.4.2.2. SCF-Komplexe	11
3.4.2.3. Der Anaphase Promoting Complex APC	12
3.4.3. Das mitotic exit network MEN	13
3.4.4. Die CDK-antagonistische Phosphatase Cdc14 – das Gründungsmitglied der Cdc14 Phosphatasefamilie	14
3.4.5. Der Phosphataseinhibitor Net1	16
3.4.6. Cdc5 – eine Kinase aus der Polo Familie	16
3.4.7. Die Kinase Cdc15	19
3.4.8. Das MEN in anderen Organismen	20
3.4.9. Kontrollsysteme im Zellteilungszyklus	21
3.4.9.1. Das Spindelkontrollsystem	21
3.4.10. Komponenten des MEN und ihre Zytokinesefunktion	22
4. Aufgabenstellung	25
5. Material	26
5.1. Nukleinsäuren	26
5.2. Proteine	26
5.3. Enzyme	26
5.4. Antikörper	26
5.5. Chemikalien	27
5.6. Sonstige Materialien	28
5.7. Geräte	28
5.8. Medien	30
5.8.1. Bakterienmedien	30
5.8.2. Hefemedien	30
5.9. Puffer und Lösungen	37

6. Methoden	39
6.1. Arbeiten mit Bakterien	39
6.1.1. Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium	39
6.1.2. Transformation von <i>E.coli</i>	39
6.1.2.1. Herstellung elektrokompeter Zellen	39
6.1.2.2. Elektroporation	39
6.1.3. Proteinproduktion in <i>E.coli</i>	40
6.1.4. Produktion und Reinigung von ^{MBP} Cdc14 und ^{MBP} Cdc14-Derivaten	40
6.1.5. Produktion und Reinigung von Net1 ^{His6}	41
6.2. Arbeiten mit Hefe	41
6.2.1. Kultivierung von Hefen in Flüssigmedium	41
6.2.2. Aufbewahrung von Hefen	42
6.2.3. Kreuzung haploider Hefestämme	42
6.2.4. Sporulation diploider Stämme und Tetradenanalyse	42
6.2.5. Lithiumacetatmethode zur Hefetransformation (nach Gietz et al. 1992)	43
6.2.6. Test des Wachstumsverhaltens von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihen	43
6.3. Färbung und Mikroskopie von Hefezellen	43
6.3.1. Fixierung von Hefezellen mit Ethanol	43
6.3.2. Fixierung von Hefezellen mit Formaldehyd	44
6.3.3. Färbung von Hefezellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	44
6.3.4. Immunofluoreszenz	44
6.3.5. Durchflußzytometrie	45
6.4. Molekularbiologische Methoden	45
6.4.1. Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i>	45
6.4.1.1. Plasmidpräparation nach der Kochlysatzmethode	45
6.4.1.2. Plasmidpräparation mit dem JETspin-Kit	46
6.4.2. DNA-Präparation aus Hefe	46
6.4.2.1. Gesamt-Hefe-DNA-Präparation	46
6.4.2.2. Kolonie-PCR	46
6.4.3. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	47
6.4.4. Agarosegelelektrophorese	47
6.4.5. Klonierung von DNA-Fragmenten	47
6.4.6. Restriktionsverdau	48
6.4.7. Gelelution	48
6.4.8. Ligation von Vektor und DNA-Fragment	48
6.4.9. Transformation des Ligationsansatzes	48
6.4.10. Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	48
6.5. Protein-chemische Methoden	49
6.5.1. Herstellung von Proteinrohextrakten aus Hefezellen	49
6.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
6.5.3. Coomassiefärbung von SDS-Gelen	50
6.5.4. Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen	50
6.5.5. Immunpräzipitation	51
6.5.6. Messung der zyklinassoziierte Kinase	51
6.5.7. Cdc5-Kinaseassay	52
6.5.8. Phosphataseassay	52

6.6 Northern Blot	53
6.7 Plasmide	54
6.8. Oligonukleotide	55
6.9. Hefestämme	56
7. Ergebnisse	57
7.1. Vorarbeiten	57
7.2. Einordnung von Cdc14 in das MEN	59
7.2.1. Cdc14 wirkt unabhängig von Dbf2	59
7.3. Der Sic1-Anstieg nach Überproduktion von Cdc14 ist unabhängig von funktionellem APC	60
7.4. Cdc14 und die Aktivierung des APC	61
7.4.1. Cdc5 wird nach Überexpression von <i>CDC14</i> degradiert	61
7.4.2. Cdc14 kann die Degradation von Pds1 einleiten	62
7.4.3. Überproduktion von Cdc14 beeinflusst die Menge an Clb5	63
7.4.4. Cdc14 Überproduktion beeinflusst die Stabilität des Zyklins Clb3	65
7.4.5. Cdc14 ist eine in vitro Phosphatase für Hct1	67
7.5. Cdc14 initiiert ein Transkriptionsprogramm	68
7.6. Cdc14 und Cdc15	71
7.7. Cdc14 und Dbf2	73
7.8. Cdc14 beeinflusst Septinringe	74
7.9. Erhöhte Mengen an enzymatisch inaktiven Cdc14i führen zur Akkumulation von Sic1	75
7.10. Mögliche Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase	77
7.10.1. Cdc14 ist ein in vitro Substrat für Clb2-Cdc28 Kinase	77
7.10.2. Cdc14 besitzt sechs potentielle CDK-Consensusstellen	78
7.10.3. Cdc14-M6 wird nicht mehr von Clb2-CDK phosphoryliert	79
7.10.4. Überproduktion von Cdc14-Phosphorylierungsmutanten	80
7.11. Regulation von Cdc14 durch Cdc5	83
7.11.1. Die Überexpression von <i>CDC5</i> führt zur Sic1-Akkumulation	83
7.11.2. Die Cdc5-vermittelte Sic1-Akkumulation ist unabhängig von Clb2Degradation	84
7.11.3. Die Cdc5-vermittelte Sic1-Akkumulation ist von Cdc14 abhängig	86
7.11.4. Der Cdc5-vermittelte Sic1-Anstieg ist unabhängig von Cdc15 und Dbf2	87
7.11.5. Erhöhte Cdc5-Mengen führen zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus	88
7.11.6. <i>CDC5</i> -Überexpression führt zur Auflösung der Cdc14-Net1 Interaktion	89
7.11.7. Cdc14 und Net1 sind Phosphoproteine	90
7.11.8. Cdc14 und Net1 sind in vitro Substrate für Cdc5-Kinase	91
7.11.9. Cdc14 und Net1 werden zellzyklusabhängig phosphoryliert	92
7.11.10. Zwei Wege innerhalb des MEN	94

8. Diskussion	96
8.1. Die Funktionen von Cdc14	96
8.1.1. Cdc14 aktiviert den APC	96
8.1.2. Cdc14 aktiviert Sic1	98
8.1.3. Cdc14 beeinflusst die Transkription am M/G1-Übergang	98
8.1.4. Cdc14 und die Kinase Cdc15	99
8.1.5. Cdc14 und die Kinase Dbf2	99
8.1.6. Cdc14 und Septine	100
8.2. Mögliche Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase	100
8.3. Regulation von Cdc14 durch die Polokinase Cdc5	102
8.4. Modell der Vorgänge am Ende der Mitose	109
9. Literaturverzeichnis	108
10. Lebenslauf	117
11. Abkürzungsverzeichnis	118
12. Danksagungen	120

1. Zusammenfassung

Hauptregulatoren des eukaryotischen Zellteilungszyklus sind die zyklinabhängigen Kinasen (CDKs). Eine aktive zyklinabhängige Kinase setzt sich aus einer inaktiven katalytischen Untereinheit und einem positiv regulatorischen Zyklin zusammen. Die koordinierte Aktivierung und Inaktivierung dieser Kinasen ermöglicht der Zelle das Voranschreiten im Teilungszyklus. Die Regulation der zyklinabhängigen Kinasen erfolgt im wesentlichen auf zwei Wegen. Zum einen fluktuieren die Zyklin-Mengen durch zellzyklusabhängige Transkription und Degradation. Zum anderen werden die CDKs durch die Bindung von Inhibitoren an die Zyklin-CDK Komplexe inaktiviert.

Ein wichtiger Schritt im Zellteilungszyklus ist die Beendigung der Mitose und der damit verbundene Übergang in die nächste G1 Phase. Für diesen Vorgang ist die vollständige Inaktivierung aller zyklinabhängigen Kinasen essentiell. Ein Signaltransduktionsnetzwerk - das mitotic exit network MEN - reguliert diesen Prozess. Komponenten des MEN sind neben anderen die Kinasen Cdc15 und Cdc5 sowie die Phosphatase Cdc14. Haupteffektor dieses Signaltransduktionsnetzwerkes ist Cdc14. Diese Phosphatase wirkt antagonistisch zur zyklinabhängigen Kinase und dephosphoryliert viele Substrate der CDK. Auf diesem Weg bewirkt die Aktivierung des MEN die Cdc14-vermittelte Stabilisierung des Inhibitors zyklinabhängiger Kinasen Sic1 und die proteolytische Degradation der mitotischen Zyklone. Die Phosphatase Cdc14 erlaubt somit den Zellen den Übertritt in den nächsten Zellzyklus.

Ziel der Arbeit war es, die Aufgaben und die Regulation der Phosphatase Cdc14 zu untersuchen. Es wurde gefunden, dass Cdc14 ein genereller Aktivator der Proteindegradation am Ende der Mitose ist. Diese wird durch den Ubiquitinligasekomplex APC (anaphase promoting complex) vermittelt. Erhöhte Mengen an Cdc14 führen zum Abbau der Zyklone Clb2, Clb3 und Clb5. Verantwortlich dafür ist der APC-Substratspezifitätsfaktor Hct1. Weiterhin ist der Anaphaseinhibitor Pds1 unter Bedingungen hoher Cdc14 Mengen nicht stabil. Cdc14 löst die Proteolyse dieser Proteine durch Dephosphorylierung von Hct1 aus. Cdc14 ist hier der Gegenspieler der zyklinabhängigen Kinase, die Hct1 durch Phosphorylierung inaktiv hält. Cdc14 ist somit ein geschwindigkeitsbestimmender Faktor für die Inaktivierung der mitotischen CDKs am Ende der Mitose durch Proteolyse der positiv regulatorischen Zyklone.

Ein weiterer Befund ist, dass Cdc14 einen zweiten Weg zur Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose positiv beeinflusst. Cdc14 aktiviert den Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen Sic1 sowohl transkriptionell als auch posttranslational. Dadurch wird ein Anstieg von Sic1 ausgelöst, das seinerseits wiederum die zyklinabhängige Kinase inaktiviert.

Ein weiteres Substrat für die Phosphatase Cdc14 ist die MEN-Kinase Cdc15. Cdc15 ist Teil des MEN und selbst an der Aktivierung von Cdc14 beteiligt. Aktiviertes Cdc14 seinerseits dephosphoryliert Cdc15 und beeinflusst dadurch dessen Lokalisierung an den Spindelpolen. Die Spindelpollokalisierung von Cdc15 ist wichtig für den korrekten Ablauf der Zytokinese. Cdc14 ist somit ebenso wie viele andere MEN-Komponenten auch an der Regulation der Trennung von Mutter- und Tochterzelle beteiligt.

Neben der Untersuchung der Aufgaben von Cdc14 war auch die Regulation von Cdc14 selbst ein Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Zuerst wurde die Möglichkeit der Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase untersucht. Viele Regulatoren des Zellteilungszyklus stehen unter direkter Kontrolle der CDK. Es wurde gefunden, dass Cdc14 ein *in vitro* Substrat für die zyklinabhängige Kinase ist. Die Entfernung aller potentiellen Phosphorylierungsstellen in Cdc14 für die zyklinabhängige Kinase ergab, dass unter Umständen die Phosphorylierung an zwei Positionen im nicht essentiellen C-Terminus von Cdc14 zu einer Aktivierung von Cdc14 beitragen kann.

Im weiteren konnte gezeigt werden, dass die Polokinase Cdc5 die Aktivierung von Cdc14 bewirkt. Nach einem gängigen Modell wird die Aktivität von Cdc14 durch seine Lokalisierung im Nucleolus reguliert. Die Phosphatase wird dort von ihrem Inhibitor Net1 während der meisten Zeit des Teilungszyklus verankert und inaktiv gehalten. Erst zu Beginn der Anaphase wird Cdc14 aus dem Nucleolus freigesetzt und dadurch aktiviert. Es wurde gefunden, dass hohe Mengen an Cdc5 zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus und zum Verlust der Interaktion mit dem Inhibitor Net1 führen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Cdc14 und sein Inhibitor Net1 während der Anaphase phosphoryliert werden. Hohe Mengen an Cdc5 bewirken ebenfalls eine solche Phosphorylierung von Cdc14 und Net1. Die weitere Untersuchung ergab, dass beide Proteine Substrate für Cdc5 *in vitro* sind und ihre Phosphorylierung *in vivo* von funktioneller Polokinase abhängt. Cdc5 ist folglich ein Aktivator der CDK-antagonistischen Phosphatase Cdc14.

Aufgrund der geschilderten Ergebnisse und der Literaturdaten wird vorgeschlagen, dass Cdc14 durch Cdc5-vermittelte Phosphorylierung und zusätzlich mit Hilfe anderer Komponenten des MEN aktiviert wird. Dies führt auf zwei Wegen zur Beendigung der Mitose. Zum einen aktiviert Cdc14 den APC durch Dephosphorylierung von Hct1 und löst somit die Degradation mitotischer Zykline aus. Zum anderen stabilisiert Cdc14 den Inhibitor Sic1 und inaktiviert dadurch die zyklinabhängige Kinase. Nachdem der Austritt aus der Mitose vollzogen ist, hat Cdc14 eine weitere Rolle bei der Regulation der Zytokinese durch die Dephosphorylierung der Kinase Cdc15. Die Aktivierung von Cdc14 ist demnach der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Übergang von der M Phase in den nächsten Teilungszyklus.

2. Zusammenfassung in englischer Sprache

The cyclin dependent kinases (CDKs) are key regulators of the eukaryotic cell cycle. Coordinated activation and inactivation of these kinases is essential for the progression through the cell cycle. Regulation of the cyclin dependent kinase is achieved by two mechanisms. First, cyclin levels are regulated by stage specific transcription and by ubiquitin mediated degradation. Cyclins are the positive regulatory subunits of an active CDK. Second, binding of CDK inhibitors like Sic1 inactivate active CDK complexes.

The exit from mitosis is an important cell cycle transition. Downregulating cyclin dependent kinase activity is essential for this process. A signal transduction network - the mitotic exit network MEN - controls the M/G1 transition. Members of this network are among others the kinase Cdc15, the polo-like kinase Cdc5 and the phosphatase Cdc14. Cdc14 is the main target and effector of the MEN. Cdc14 acts as an antagonist to the cyclin dependent kinase and leads to the dephosphorylation of various substrats of the CDK. Therefore, activation of Cdc14 initiates the proteolytic destruction of mitotic cyclins and stabilises the CDK inhibitor Sic1. This leads to the inactivation of the cyclin dependent kinase and allows entry into the next cell cycle.

Understanding the function and the regulation of the phosphatase Cdc14 was the intention of this work. It was found, that Cdc14 is a general activator of the protein degradation at the end of mitosis. This protein degradation is controlled by the ubiquitin ligase APC (anaphase promoting complex) and its substrate specificity factor Hct1. High levels of Cdc14 initiate the degradation of the cyclins Clb2, Clb3 and Clb5 in a Hct1 dependent manner. In addition, the anaphase inhibitor Pds1 is unstable under these conditions. Cdc14 promotes the degradation of these proteins by the dephosphorylation of Hct1. Hct1 is under negative control of the cyclin dependent kinase itself. Therefore, Cdc14 is a rate limiting factor for the inactivation of the CDK at the end of mitosis.

Additionally, Cdc14 influences a second independent pathway for inactivation of the CDK activity at the end of mitosis. Cdc14 positively regulates the CDK inhibitor Sic1 on a transcriptional and a posttranslational level. This results in an accumulation of Sic1 and the inhibition of the cyclin dependent kinase.

Another target of Cdc14 is the MEN kinase Cdc15. Cdc15 is essentially involved in the activation of Cdc14. It was found that activated Cdc14 dephosphorylates Cdc15 and thereby alters the spindle pole body localisation of Cdc15. This altered localisation is important for Cdc15's function in regulating cytokinesis. Therefore, Cdc14 - like other members of the MEN - is a regulator of cytokinesis.

In addition, the regulation of Cdc14 itself was under investigation. Many cell cycle regulators are under control of the cyclin dependent kinase itself. Therefore, a possible regulation of the phosphatase Cdc14 by the CDK was investigated. It was found that Cdc14 is an in vitro substrate for the cyclin dependent kinase. To further analyse this finding, all six potential recognition sites for the CDK in Cdc14 were mutated. The characterisation of this mutant proteins

revealed that the phosphorylation of two of these sites located in the non essential C terminal region of Cdc14 may be involved in the activation of this phosphatase.

Furthermore, the regulation of Cdc14 by the polo like kinase Cdc5 was shown. According to a recent model, interaction with the phosphatase inhibitor Net1 traps and inactivates Cdc14 in the nucleolus. Release of Cdc14 from the nucleolus during anaphase leads to the activation of this phosphatase. It was found that elevated levels of Cdc5 caused an release of Cdc14 from the nucleolus and a loss of interaction between Cdc14 and Net1. Further analysis revealed that Cdc14 and Net1 get phosphorylated during anaphase. *CDC5* overexpression mimicked this phosphorylation. Furthermore, Cdc14 and Net1 are in vitro substrates for Cdc5 kinase and the phosphorylation of both proteins depends on Cdc5 activity. Therefore, Cdc5 is an activator of the CDK antagonistic phosphatase Cdc14.

Based on our results and the literature data, we propose that Cdc14 gets activated by Cdc5-dependent phosphorylation in combination with other members of the MEN. Then, Cdc14 promotes exit from mitosis by two mechanisms. First, Cdc14 dephosphorylates Hct1 and therefore promotes Clb2 degradation. Second, Cdc14 stabilises Sic1. This is a twofold negative regulation of the CDK. Besides the role of Cdc14 in eliminating CDK activity, Cdc14 influences cytokinesis by dephosphorylating the kinase Cdc15. In summary, Cdc14 is the main effector and the main target of the signal transduction network MEN that regulates the M/G1 transition.

3. Einleitung

3.1. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein viel untersuchter Modellorganismus, der zur Erforschung zahlreicher komplexer biologischer Vorgänge herangezogen wird (Übersicht in Alberts et al. 1995). Die Bäckerhefe hat einige Besonderheiten, die sie als Modellorganismus besonders geeignet macht. Sie ist ein Eukaryot und besitzt als solcher die grundlegend gleichen Eigenschaften, wie auch höhere Eukaryoten. Zu vielen Genen der Hefe gibt es orthologe Gene im Menschen; diese erfüllen dort die gleichen Funktionen. Dies geht soweit, dass menschliche Gene in der Lage sind Mutationen in Hefegenen zu komplementieren (Li et al. 1997). Die Bäckerhefe ist aber auch ein Einzeller, der sich im Gegensatz zu höheren Zellen leicht im Labor handhaben lässt. Weiterhin ist die Genomsequenz der Bäckerhefe schon seit längerer Zeit bekannt und zusammen mit gut etablierten Methoden zur genetischen Manipulation lassen sich leicht Hefestämme mit bestimmten Eigenschaften erzeugen.

S. cerevisiae ist ein homothallischer diploider Organismus. Sie besitzt einen einfachen Chromosomensatz von sechzehn Chromosomen auf denen die Gene für mindestens 6000 Genprodukte liegen. Bei ausreichendem Nährstoffangebot wachsen und teilen sich die Zellen. Kommt es zu einer Mangelsituation, dann durchlaufen die diploiden Zellen eine Meiose und bilden dauerhafte Sporen. Bei ausreichendem Nährstoffangebot wachsen die Sporen wieder aus und paaren sich mit haploiden Zellen des komplementären Paarungstyps. Dies führt zur Bildung diploider Zellen, wie sie normalerweise in der Natur vorkommen.

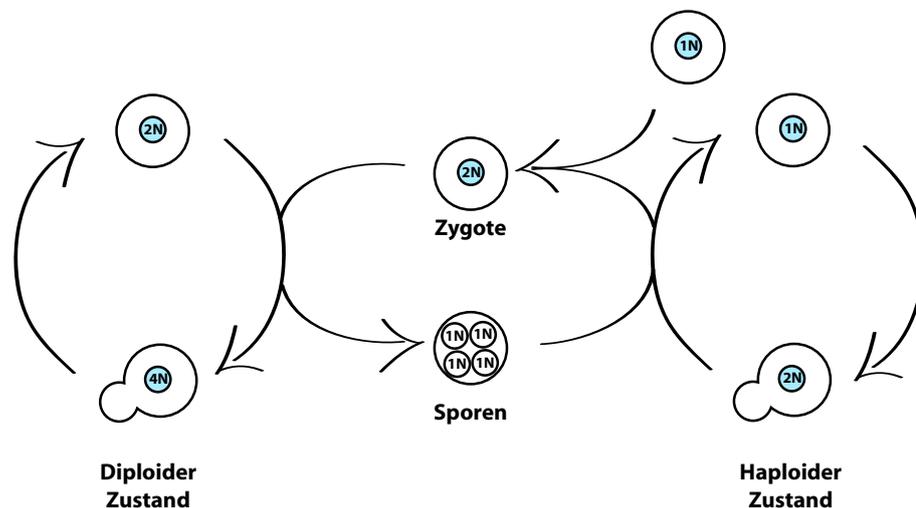


Abbildung 1

Der Lebenszyklus der Hefe *S. cerevisiae*. Dargestellt ist der mögliche Übergang zwischen der diploiden ($2N$, $4N$) und haploiden ($1N$, $2N$) Lebensweise der Bäckerhefe. Sporenbildung wird durch Nährstoffmangel ausgelöst. Es handelt sich um eine Meiose, die von einer diploiden Zelle durchgeführt werden kann. Die Sporen können auswachsen und durch Bildung einer Zygote wieder eine diploide Zelle bilden. Stämme, die ihren Matingtyp nicht wechseln können (Laborstämme) können stabil als haploide Stämme gehalten werden. Mit Wildtypstämmen ist das nicht möglich; diese kreuzen sofort wieder. Die N -Zahl gibt das Vielfache des einfachen Chromosomensatzes an.

Im Labor werden heterothallische Stämme genutzt, die stabil als haploide Stämme gehalten werden können. Heterothallische Stämme haben die Fähigkeit zum Paarungstypwechsel verloren und diploidisieren nicht. Dies erleichtert die genetische Manipulation und durch Kreuzung lassen sich leicht neue Stämme herstellen.

S. cerevisiae vermehrt sich durch Knospung, d.h. es kommt nicht wie bei vielen anderen Eukaryoten zur Einschnürung und Querteilung der Zelle; vielmehr bildet die sog. Mutterzelle eine Knospe, die im Verlauf des Teilungszyklus wächst und später als Tochterzelle abgeschnürt wird. Abbildung 1 zeigt ein Schema des Lebenszyklus der Bäckerhefe. Trotz dieser Unterschiede gilt: die grundlegenden Mechanismen der Zellteilung sind zwischen der Bäckerhefe und höheren Eukaryoten stark konserviert.

3.2. Der Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Der Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* lässt sich wie auch der Zellteilungszyklus anderer eukaryotischer Zellen in vier Hauptphasen (G1, S, G2 und M) unterteilen (s. Abbildung 2, Übersicht in Lew et al. 1997). Die G1-Phase ist die Wachstumsphase. Die Zelle muss vor der Initiation des Teilungszyklus eine kritische Masse erreichen, um die Teilung erfolgreich abschließen zu können. Am Ende der Wachstumsphase steht der sog. START

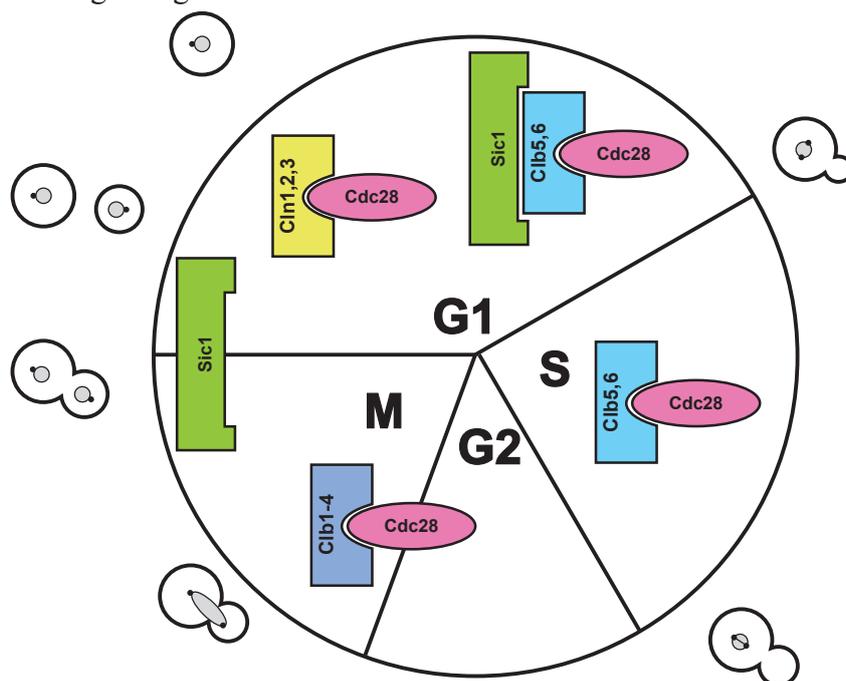


Abbildung 2 Der Zellteilungszyklus der Hefe *S. cerevisiae*. Dargestellt sind die vier Phasen des Zellteilungszyklus (G1, S, G2, M). Dazu wurde schematisch die Morphologie der Zellen bzw. der Kerne in Beziehung gesetzt. Weiterhin sind die Zyklin-Cdc28 Komplexe sowie der Inhibitor Sic1 in der entsprechenden Zeitspanne eingezeichnet.

Punkt. Zu diesem Zeitpunkt muss die Zelle zwischen den drei Entwicklungsmöglichkeiten Teilung, Paarung oder Meiose wählen. Hat die Zelle den START Punkt erst überschritten, muss der Teilungszyklus vollständig durchlaufen werden. Auf die G1 Phase folgt die S Phase. Diese Phase ist charakterisiert durch die Verdopplung der genetischen Information. Gleichzeitig

beginnt die Zelle mit der Bildung der Knospe. Damit wird auch schon die spätere Teilungsebene festgelegt. Auf die S Phase folgt die G2 Phase, die in der Hefe nicht besonders ausgeprägt ist. Anschließend erfolgt die Aufteilung der genetischen Information zwischen der Mutter und der Tochterzelle in der M Phase. Die M Phase lässt sich weiter unterteilen. Im Gegensatz zu anderen Eukaryoten kommt es bei Ascomycten wie der Hefe nicht zum Auflösen der Kernhülle in der Prophase; man spricht in diesem Fall von Endomitose. Nachdem die replizierten und kondensierten Chromosomen während der Metaphase durch die Mikrotubulispindel an die Spindelpolkörper gebunden wurden, werden sie in der Anaphase nach Verlust der Chromatidenkohäsion durch die Elongation der mitotischen Spindel auf die Mutter- und die Tochterzelle verteilt. Die M Phase endet mit der Zytokinese, während der Mutter- und Tochterzelle endgültig physikalisch getrennt werden. Mit der Zytokinese endet der Teilungszyklus, beide Zellen befinden sich wieder in der G1 Phase und können in einen neuen Teilungszyklus eintreten.

3.3. Die CDC Gene

Zur Erforschung des Zellteilungszyklus der Hefe *S. cerevisiae* wurden Teilungszyklusmutanten erzeugt (Hartwell 1978). Es handelt sich um konditionale Mutationen, die Wachstum bei niedriger Temperatur erlaubten aber bei hoher Temperatur zu einem einheitlichen Arrestphänotyp führten. Mit diesem Ansatz konnten über siebzig sog. *cell division cycle* oder *CDC* Gene isoliert werden. Durch die Charakterisierung dieser Mutanten ist es möglich, den Zellteilungszyklus molekular zu untersuchen.

3.4. Molekulare Mechanismen der Zellteilung

3.4.1. Die Regulation der zyklinabhängigen Kinase

Der eukaryotische Zellteilungszyklus ist ein streng regulierter Prozess. Hauptregulatoren des Teilungszyklus sind die sog. zyklinabhängigen Kinasen (CDKs – *cyclin dependent kinases*) (Übersichten in Morgan 1997, Nigg 2001). Ihre Aktivität steuert das Voranschreiten der Zelle durch den Teilungszyklus. Die zyklinabhängigen Kinasen selbst sind auf vielfältige Weise reguliert. Eine aktive zyklinabhängige Kinase besteht aus der eigentlichen katalytischen Untereinheit mit dem aktiven Zentrum und einem Zyklin. Die katalytische Untereinheit an sich ist inaktiv und wird erst durch Bindung eines Zyklins in den aktiven Zustand versetzt.

In der Hefe existiert nur eine katalytische Untereinheit, die vom Gen *CDC28* codiert wird. Cdc28 kann zusammen mit neun Zyklinen einen aktiven Kinasekomplex bilden. In der G1-Phase bildet Cdc28 zusammen mit den G1-spezifischen Zyklinen Cln1-3, in der S-Phase mit den Zyklinen Clb5 und Clb6 und in der M-Phase mit den mitotischen Zyklinen Clb1-4 die zyklinabhängige Kinase. Wie der Name Zyklone schon andeutet schwankt die Menge dieser Proteine während des Zellteilungszyklus. Die Zyklone sind also nur zu bestimmten Zeiten im Zellteilungszyklus vorhanden und bilden nur zu diesen Zeitpunkten aktive CDK Komplexe. Die Interaktion verschiedener Zyklone mit Cdc28 zu unterschiedlichen Zeiten des

Zellteilungszyklus stellt so unterschiedliche zyklinabhängige Kinasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten zur Verfügung. Dies erklärt wie eine einzige katalytische Untereinheit wie Cdc28 an so verschiedenen Vorgängen wie dem isotropen Wachstum in der G1 Phase und dem anisotropen Wachstum während der Bildung der Knospe als entscheidender Hauptregulator beteiligt sein kann. Ein Mechanismus der Regulation der zyklinabhängigen Kinase ist folglich die Steuerung der Menge an Zyklinen. Die meisten Zykline werden einerseits zellzyklusabhängig transkribiert (Übersicht in Morgan 1997) und dementsprechend auch nur zu diesen Zeiten gebildet. Wichtiger als die zellzyklusspezifische Bildung der Zykline ist aber ihre Instabilität, die durch eine regulierte ubiquitinvermittelte Degradation zustande kommt (Übersichten in Zachariae & Nasmyth 1999, Tyers & Jorgensen 2000). Nachdem der entsprechende CDK-Komplex seine Aufgabe erfüllt hat, werden die Zykline proteolytisch degradiert und somit die entsprechenden Zyklin-CDK Komplexe inaktiviert.

Lange Zeit erachtete man die Zyklindegradation als den entscheidenden Mechanismus zur Regulation der CDK. Neben den positiven Regulatoren gibt es aber auch Inhibitoren zyklinabhängiger Kinasen (CKI). Ein Vertreter dieser Klasse ist Sic1. Sic1 bindet an B Typ Zyklin-Cdc28 Komplexe und inhibiert diese. Sic1 ist ein Protein, das wie Zykline nur zu bestimmten Zeiten im Teilungszyklus vorhanden ist. So verhindert das Vorhandensein von Sic1 den Beginn der S Phase durch Inhibition der S Phasen spezifischen Zyklin-Cdc28 Komplexe. Sic1 ist außerdem entscheidend am Abschalten der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose beteiligt (Schwab et al. 1997). Wie unten näher erläutert, ermöglicht das Binden von Sic1 an Zyklin-Cdc28 Komplexe zusammen mit der Degradation der Zykline das Abschalten der Kinase am Ende der Mitose.

Eine andere Möglichkeit der Regulation zyklinabhängiger Kinasen ist Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der katalytischen Untereinheit (Übersicht in Nigg 2001). Dieser Mechanismus ist in höheren Eukaryoten und in *S. pombe* von essentieller Bedeutung. So ist in der Hefe *S. pombe* die Dephosphorylierung von cdc2 - der katalytischen Untereinheit für die CDK - an den Threoninresten 14 und 15 essentiell für Aktivität des Kinasekomplexes. Diese Dephosphorylierung wird von der Phosphatase cdc25 am Übergang von der G2 in die M Phase katalysiert. Zuvor werden diese Threoninrest von der Kinase wee1 im phosphorylierten Zustand gehalten. Die Aktivität der zyklinabhängigen Kinase steht demnach unter der Kontrolle einer aktivierenden Phosphatase und einer inaktivierenden Kinase. In der Hefe *S. cerevisiae* spielt diese Regulation der zyklinabhängigen Kinase nur eine untergeordnete, nicht essentielle Rolle.

3.4.2. Proteolyse im Zellteilungszyklus

Eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellteilungszyklus spielt die ubiquitinvermittelte Proteindegradation (Übersichten in Zachariae & Nasmyth 1999, Tyers & Jorgensen 2000). Wichtige Hauptregulatoren wie die Zykline und der Inhibitor Sic1 werden durch gezielte Proteolyse in ihrer Menge streng reguliert und ihr Vorhandensein wird so auf bestimmte Zeitspannen während des Zellteilungszyklus beschränkt.

3.4.2.1. Das Ubiquitin-Proteasomsystem

Das Ubiquitinsystem bildet zusammen mit dem Proteasomensystem die Maschinerie für den regulierten gerichteten Proteinabbau in der Zelle (Übersicht in Weissman 2001). Es vermittelt die Modifikation zum Abbau bestimmter Proteine mit Ubiquitin. Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren langes Polypeptid, das über seinen C-Terminus mit den ϵ -NH₂-Gruppen von Lysinresten verknüpft werden kann. Die Markierung von Zielproteinen mit Ubiquitin führt meist zur Bildung einer Polyubiquitinkette. Ubiquitin ist das Erkennungssignal für eine Protease – das Proteasom. Vom Proteasom erkannte Proteine werden degradiert. Die Übertragung von Ubiquitin ist ein mehrstufiger Prozess. Zuerst wird Ubiquitin in einer ATP abhängigen Reaktion über eine Thioesterbindung an ein sog. E1 Enzym gebunden. Dieser Schritt dient zur Aktivierung von Ubiquitin. In der Hefe existiert mit Uba1 nur ein solches E1 Enzym. In einem zweiten Schritt wird Ubiquitin auf eines von elf E2 Enzymen übertragen. Ubiquitin ist wiederum über eine Thioesterbindung an das E2 Enzym gebunden. Vom E2 Enzym ausgehend gibt es drei Wege über die Ubiquitin auf das Zielsubstrat übertragen werden kann. Ubiquitin kann direkt vom E2 Enzym ohne Mitwirkung eines anderen Faktors auf das Zielprotein übertragen werden. Viel häufiger ist allerdings die Mitwirkung eines E3 Enzym genannten Faktors bei der Übertragung des Ubiquitinrests vom E2 Enzym auf das Zielsubstrat. Dieser vermittelt entweder die Übertragung des Ubiquitinrests direkt vom E2 Enzym auf das Zielmolekül, oder der Ubiquitinrest wird über ein E3-Ubiquitinintermediat auf das Zielsubstrat übertragen. Um ein Protein für einen effektiven Abbau zu markieren, muss eine Polyubiquitinkette am Zielprotein synthetisiert werden. Diese Polyubiquitinkette ist das Erkennungssignal für die Degradationsmaschinerie, die vom sog. Proteasom gebildet wird. Für das Fortschreiten des Zellteilungszyklus sind zwei Proteinkomplexe mit E3-Aktivität essentiell. Diese Komplexe sind zum einen der sog. SCF-Komplex und zum anderen der anaphase promoting complex (APC). Beide teilen im Prinzip den gleichen Aufbau auch wenn ihre Substraterkennung und Aktivität auf verschiedene Weise reguliert ist.

3.4.2.2. SCF-Komplexe

Die SCF-Komplexe wurden bei der Untersuchung der Zyklin- und CKI-Degradation entdeckt (Übersicht in Jorgensen & Tyers 1999). Bei den SCF-Komplexen handelt es sich um verschiedene Komplexe mit gleichartigem Aufbau. Der Kernkomplex setzt sich aus mindestens fünf verschiedenen Proteinen zusammen. Es handelt sich dabei immer um ein sog. Cullin, das das Rückgrat des Komplexes bildet. An dieses Cullin (Cdc53 in *S. cerevisiae*) binden dann Skp1, ein RING H2 Protein und Cdc34. Cdc34 besitzt E2-Enzymaktivität und katalysiert die Übertragung des Ubiquitinrests auf das Substrat. Die Substraterkennung erfolgt über ein sog. F-Box Protein. Dieses bindet an den Kernkomplex über Skp1 und das RING H2 Protein. Der SCF-Komplex erhält also seine Substratspezifität über ein gebundenes F-Box Protein. Durch diese Vielzahl an Substraterkennungsproteinen erhält der SCF-vermittelte Degradationsweg eine hohe Selektivität. SCF-Komplexe erkennen meist nur phosphorylierte Substrate. Die Regulation der Substratstabilität erfolgt also auf Ebene des Substrats und nicht auf Ebene des

E3-Enzyms. Sic1 ist ein klassisches Beispiel für ein SCF-Substrat (Feldmann et al. 1997). Sic1 inhibiert während der G1-Phase Clb5/6-CDK Komplexe und verhindert so den Beginn der S-Phase. Damit S-Phase beginnen kann muss Sic1 degradiert werden. Dies geschieht durch die Phosphorylierung von Sic1 durch G1 Zyklin-CDK Komplexe. Diese sind am G1/S Übergang aktiv und bewirken die SCF abhängige Degradation von Phospho-Sic1. Das essentielle F-Box Protein Cdc4 ist verantwortlich für die Erkennung von Sic1. Ist Cdc4 inaktiv so kann Sic1 nicht abgebaut werden und die S-Phase kann nicht beginnen.

SCF-Komplexe kommen in allen bisher untersuchten Eukaryoten vor und es sind eine Vielzahl verschiedener F-Box Proteine bekannt. Am Beispiel der SCF-Komplexe zeigt sich erneut, dass grundlegende Regulationsmechanismen zwischen verschiedenen Eukaryoten stark konserviert sind.

3.4.2.3. Der Anaphase Promoting Complex APC

Der APC ist das zweite wichtige E3-Enzym während des Zellteilungszyklus (Übersichten in Jorgensen & Tyers 1999, Morgan 1999, Peters 1999, Zachariae & Nasmyth 1999, Weissman 2001). Im Gegensatz zum SCF, der während des ganzen Teilungszyklus aktiv ist, ist die Aktivität des APC auf den Zeitraum zwischen Anaphase und G1 beschränkt. APC-Aktivität ist dabei wichtig für den Beginn der Anaphase und das Abschalten der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose. Der APC enthält mindestens zwölf Untereinheiten (Zachariae et al. 1998a); es finden sich die gleichen funktionellen Untereinheiten, wie sie auch im SCF vorhanden sind. Apc2 ist ein Cullin, Apc11 besitzt eine RING H2 Domäne und Ubc10 ist ein E2-Enzym. Auch für den APC sind Substratspezifitätsfaktoren analog den F-Box Proteinen bekannt. Es handelt sich um Cdc20 und Hct1 (Schwab et al. 1997, Visintin 1997). Diese beiden Proteine binden an den APC und vermitteln den Kontakt zwischen Substrat und Ubiquitinierungsaktivität. Es gibt in vielen Organismen orthologe Proteine zu diesen Substratspezifitätsfaktoren. In Drosophila sind z.B. das Cdc20 verwandte fizzy und das Hct1-Ortholog fizzy-related bekannt. Diese Proteine besitzen sog. WD40 Wiederholungseinheiten, die Protein-Protein Wechselwirkungen vermitteln können. Die Substraterkennung des APC ist im Gegensatz zum SCF nicht über Phosphorylierung der Substrate, sondern über die Regulation der Spezifitätsfaktoren Cdc20 und Hct1 gesteuert. Im Fall von Hct1 wurde dies im Detail untersucht. Hct1 ist ein Substrat der zyklinabhängigen Kinase und wird von dieser phosphoryliert (Zachariae et al. 1998b). Phospho-Hct1 kann zwar seine Substrate – z.B. das B-Typ Zyklin Clb2 - binden, aber es ist nicht in der Lage das Substrat zum APC zu bringen. Nur unphosphoryliertes Hct1 bindet an den APC und leitet so die Degradation seiner Substrate ein. Der APC kann somit in Gegenwart hoher zyklinabhängiger Kinase nicht die Degradation von Hct1-Substraten bewirken. Ganz im Gegenteil zum SCF. Dieser kann nur phosphorylierte Substrate abbauen.

Die beiden großen Ubiquitinligasen APC und SCF ergänzen sich also, um das Umschalten von hoher zu niedriger CDK-Aktivität und umgekehrt zu katalysieren.

3.4.3. Das mitotic exit network MEN

Von besonderem Interesse ist die Regulation der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose. Für das Fortschreiten des Teilungszyklus von der M Phase in die nächste G1 Phase ist das Abschalten der zyklinabhängigen Kinase notwendig. Dies geschieht auf zwei Wegen. Einerseits führt die APC-abhängige ubiquitinvermittelte Degradation der B-Typ Zyklone zu einer Inaktivierung der CDK, andererseits werden Zyklin-CDK Komplexe durch den Inhibitor Sic1 am Ende der Mitose inhibiert. Weder Degradation noch Inhibition für sich ist essentiell (Schwab et al. 1997); jeder der beide Wege reicht aus, um die CDK abzuschalten. Beide Wege zusammen führen zu einer schnellen und effektiven Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase. Diese beiden Wege stehen unter der Kontrolle eines Signaltransduktionsnetzwerkes, das für den Austritt aus der Mitose und die anschließende Zytokinese essentiell ist (Jaspersen et al. 1998). Das mitotic exit network MEN besteht aus mehreren Komponenten (Übersichten in Hoyt 2000, Bardin & Amon 2001, McCollum & Gould 2001). Die Kinasen Cdc5, Cdc15, Dbf2 und Mob1, das kleine G-Protein Tem1 mit seinem positivregulatorischem GEF (guanin-nucleotid exchange factor) Lte1 und seinem GAP-Komplex (GTPase activating protein) Bub2-Bfa1 und die Phosphatase Cdc14 werden zum MEN gerechnet. Mutationen in den essentiellen Genen dieses Signalweges führen zu einem Arrest am Ende der Mitose. Dieser Arrest ist gekennzeichnet durch Zellen mit großer Knospe, elongierter Spindel und hoher CDK-Aktivität. Eine Vielzahl genetischer Interaktionen zeigt die enge Verflechtung innerhalb dieses Netzwerkes. So rettet eine moderate Überexpression von *CDC14* den Wachstumsdefekt von fast allen anderen MEN Komponenten (Jaspersen et al. 1998). Hohe Mengen an Cdc15 supprimieren die Wachstumsdefekte von *cdc5-1* und *tem1-3* Mutanten. Weiterhin besteht eine wechselseitige Suppression zwischen der Polokinase Cdc5 und dem G-Protein Tem1.

Der Haupteffektor des MEN ist die Phosphatase Cdc14 (Visintin et al. 1998, Shou et al. 1999). Von ihr wird angenommen, dass sie der Gegenspieler und negative Regulator der zyklinabhängigen Kinase ist. Cdc14 ist in der Lage, beide Wege zum Abschalten der zyklinabhängigen Kinase zu aktivieren. Zum einen führt Cdc14 zur Dephosphorylierung von Sic1. Dephosphoryliertes Sic1 wird nicht mehr vom SCF erkannt und ist somit stabil. Weiterhin wird Swi5 dephosphoryliert. Swi5 ist der Transkriptionsfaktor für Sic1. Swi5 kann nur in seiner unphosphorylierten Form in den Kern transportiert werden, um Sic1 transkriptionell zu aktivieren (Nasmyth et al. 1990, Moll et al. 1991). Zum anderen ist Cdc14 in der Lage Hct1 zu dephosphorylieren. Dieses unphosphorylierte Hct1 ist die aktive Form und kann mitotische Zyklone der Degradation zuführen. Die Aktivierung von Sic1 und Hct1 durch Cdc14 führt somit zur Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase. Diese Inaktivierung ist die Voraussetzung für den Austritt aus der Mitose und den Beginn eines neuen Teilungszyklus. Neueste Ergebnisse geben einen Einblick in das Signal, das die Aktivierung von Cdc14 durch das MEN hervorruft (Pereira et al. 2000, Bardin et al. 2000). Eine entscheidende Rolle spielt dabei die GTPase Tem1. Nach einer Modellvorstellung soll Tem1-GTP die aktive Form sein wohin gegen Tem1-GDP die inaktive Form darstellen soll. Zwei regulatorische Mechanismen wirken nach diesem Modell

auf Tem1. Die schwache GTPase Aktivität von Tem1 kann durch den GTPase aktivierenden heterodimeren Komplex aus Bub2 und Bfa1 verstärkt werden. Dies führt zu Tem1-GDP, das nun in einem inaktiven Zustand vorliegt. Der Austausch von an Tem1 gebundenem GDP gegen GTP soll durch den GEF Lte1 katalysiert werden. Das heißt Lte1 führt zur Aktivierung von Tem1. Essentiell für die Regulation von Tem1 ist die Lokalisierung der beteiligten Komponenten. Tem1 ist an den Spindelpolen lokalisiert, genauso wie der negative Regulator Bub2-Bfa1. Der Aktivator Lte1 dagegen ist am Kortex der Knospe lokalisiert. Solange also der Kern und damit die Spindelpole sich noch in der Mutterzelle befinden bleibt Tem1 in seiner inaktiven GDP-gebundenen Form. Trennt sich aber der Kern, so gelangt Tem1 in die Nähe seines Aktivators Lte1. Es wird vermutet, dass die Bewegung des Kerns in die Tochterzelle gemessen wird und über die Aktivierung von Tem1 das MEN aktiviert wird. Aktiviertes Tem1 soll dann Cdc15 aktivieren, welches seinerseits den Kinasekomplex Dbf2-Mob1 positiv beeinflusst (Mah et al. 2001). Das Anschalten des MEN durch das Einwandern des Kerns in die Knospe führt letztlich zur Aktivierung von Cdc14. Cdc14 selbst ist auch über seine Lokalisierung reguliert. Von der G1-Phase bis zur Anaphase ist Cdc14 im Nucleolus lokalisiert. Dies geschieht durch Interaktion mit dem Phosphataseinhibitor Net1 (s.u.). Erst zu Beginn der Anaphase wird Cdc14 aus dem Nucleolus freigesetzt und kann die Abschaltung der zyklinabhängigen Kinase bewirken. Wie das MEN im Detail die Freisetzung von Cdc14 bewirkt ist nicht bekannt. Sicher ist, dass das Zusammenspiel aller MEN Komponenten wichtig ist für einen geregelten Ablauf des Austritts aus der Mitose, der durch die Freisetzung der Phosphatase Cdc14 aus dem Nucleolus eingeleitet wird. Die vorliegende Arbeit zeigt unter anderem einen regulatorischen Mechanismus für die Freisetzung von Cdc14 auf. Sowohl Cdc14 als auch Net1 sind Phosphoproteine. Die Kinase Cdc5 ist in der Lage sowohl Cdc14 als auch Net1 zu phosphorylieren. Die phosphorylierten Spezies von Net1 und Cdc14 interagieren nicht mehr, was zu einer Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus führt.

3.4.4. Die CDK-antagonistische Phosphatase Cdc14 – das Gründungsmitglied der Cdc14 Phosphatasefamilie

Cdc14 ist Bestandteil des Signaltransduktionsnetzwerkes am Ende der Mitose. Eine konditionale Mutante von Cdc14 führt zu einem Arrest spät in der Mitose mit elongierter Spindel und hoher CDK-Aktivität. Mittlerweile sind auch in anderen Organismen orthologe Phosphatasen bekannt, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu einer Phosphatasefamilie zusammengefasst werden können. Abbildung 3 zeigt eine Gegenüberstellung verschiedener Cdc14-Phosphatasen aus verschiedenen Organismen. Aufschluss über die Regulation von Cdc14 ergab sich aus der Untersuchung der Lokalisierung dieser Phosphatase. Cdc14 ist während der meisten Zeit des Zellteilungszyklus im Nucleolus zu finden (Shou et al. 1999, Übersicht in Visintin & Amon 2000). Nur in der Zeitspanne vom Beginn der Anaphase bis zur Telophase befindet sich Cdc14 im gesamten Kern und im Zytoplasma. Cdc14 wird im Nucleolus von seinen Bindungspartner und Inhibitor Net1 festgehalten. Die Freisetzung aus dem Nucleolus ist nach heutiger Auffassung gleichbedeutend mit der Aktivierung von Cdc14 und dem Beginn des

3.4.5. Der Phosphataseinhibitor Net1

Das 1189 Aminosäuren große Net1 (auch Cfi1, Visintin et al. 1999) ist ein Strukturprotein des Nucleolus. Es bildet das Rückgrat des sog. RENT Komplexes (Shou et al. 1999). RENT steht für regulator of nucleolar silencing and telophase. Wie der Name andeutet ist dieser Komplex an der Regulation der Telophase und am Silencing der rDNA beteiligt. Bestandteile des RENT Komplexes sind neben Net1 und dem Protein unbekannter Funktion Ypl126w die Phosphatase Cdc14 und die Histondeacetylase Sir2. Sir2 ist über die Modulation der Histonmodifikation an der Integrität der rDNA Tandemrepeats beteiligt. Sir2 stellt somit die Verbindung zwischen RENT-Komplex und Silencing her (Straight et al. 1999). Wie oben beschrieben wird die telophasevermittelnde Phosphatase Cdc14 von Net1 im Nucleolus festgehalten und inhibiert. Der RENT-Komplex ist durch die Bindung der Phosphatase Cdc14 an der Regulation der Telophase beteiligt. Trotz der wichtigen Rolle von Net1 bei der Regulation von Cdc14 ist die Deletion von *NET1* nicht letal. In Zellen ohne Net1 befindet sich Cdc14 nicht nur im Nucleolus sondern auch im Nucleus und darüber hinaus im Zytoplasma. Die Integrität des Nucleolus dagegen ist deutlich beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass Cdc14 nicht nur über seine Bindung an Net1 reguliert wird, sondern dass noch ein weiterer Inhibitions- oder ein zusätzlicher Aktivierungsmechanismus für Cdc14 existiert muss.

3.4.6. Cdc5 – eine Kinase aus der Polo Familie

Cdc5 ist Teil einer unter den Eukaryoten stark konservierten Familie von Serin/Theronin Kinasen. Das erste Mitglied und der Namensgeber dieser Familie ist das *Drosophila* Protein Polo (Übersicht in Glover et al. 1998). Die Mitglieder dieser Familie werden charakterisiert durch einen hohen Verwandtschaftsgrad der aminoterminalen Kinasedomäne und das Vorhandensein von sog. Poloboxen am C-Terminus. Abbildung 4 zeigt eine Gegenüberstellung einiger Mitglieder dieser Kinasefamilie. Das Gen *polo* wurde zuerst als Mutante identifiziert, die Zentrosomendefekte im *Drosophila*embryo hervorruft (Sunkel und Glover 1988). Weitere Untersuchungen von Mitgliedern der Polo Kinasefamilie zeigten eine Rolle für diese Proteine an vielen Punkten des Zellteilungszyklus auf. Sie sind wichtig für die Ausbildung einer bipolaren Spindel in Säugerzellen, die Reifung von Säugerzentrosomen, den Beginn der Anaphase durch Aufhebung der Schwesterchromatidkohäsion in Hefe, die Anpassung an den DNA-Schadenskontrollpunkt, die Aktivierung des APC in vielen Eukaryoten und die Regulation der Zytokinese.

Im folgenden soll die *S. cerevisiae* Polokinase Cdc5 näher beschrieben werden. Abbildung 4 zeigt, dass Cdc5 um einiges größer ist als vergleichbare Polokinasen. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Polofamilie besitzt Cdc5 sog. destruction boxes. Es handelt sich dabei um aminoterninale Sequenzen, die Instabilität von Proteine bewirken. Der Besitz von destruction boxes führt zur Erkennung durch das APC-Degradationssystem und die anschließende Degradation. Demzufolge ist Cdc5 ein instabiles Protein, das nur zu bestimmten Zeiten im Zellteilungszyklus nachweisbar ist. Während der G1- bis zur G2 Phase wird Cdc5

nicht gebildet. Erst zu Beginn der Mitose ist Cdc5 in der Zelle vorhanden. Es bleibt bis zum Ende der Mitose nachweisbar, um dann APC^{Hct1}-abhängig abgebaut zu werden. Die früheste bekannte Funktion von Cdc5 liegt am Beginn der Anaphase. Die Anaphase wird ausgelöst durch den Verlust des Zusammenhalts der Schwesterchromatiden. Diese Kohäsion wird durch das Kohäsionprotein Scc1 vermittelt. Scc1 wird zu Beginn der Anaphase durch die Separase genannte Protease Esp1 proteolytisch gespalten; dies führt zur Trennung der Schwesterchromatiden durch die mitotische Spindel. Cdc5 phosphoryliert Scc1 zu diesem Zeitpunkt und begünstigt damit dessen Prozessierung (Alexandru et al. 2001). Eine weitere Funktion von Cdc5 ist es, den APC zu aktivieren (Charles et al. 1998). Mutationen in Cdc5 führen zu einer Akkumulation von Proteinen, die normalerweise APC^{Hct1}-abhängig degradiert werden. Das APC-Substrat Cdc5 stimuliert demnach seine eigene Degradation.

Cdc5 ist weiterhin Bestandteil des Signaltransduktionswegs am Ende der Mitose. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Phosphatase Cdc14 durch Polokinase untersucht. Es wurde gefunden, dass Cdc5 in der Lage ist, direkt oder indirekt die Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 zu bewirken. Dies führt zur Freisetzung und somit zur Aktivierung von Cdc14. Cdc5 kann demnach den Austritt aus der Mitose durch Regulation von Cdc14 auslösen. Neueste Daten zeigen, dass Cdc5 das MEN noch auf eine andere Weise beeinflusst (Hu et al. 2001). Cdc5 phosphoryliert Bfa1 und inhibiert damit das Zweikomponenten GAP Bfa1-Bub2. Bfa1-Bub2 ist ein Inhibitor der GTPase Tem1, von der angenommen wird, dass sie an oberster Stelle des MEN steht und für die Aktivierung des MEN entscheidend ist. Die Inhibition des Inhibitors Bfa1-Bub2 durch Cdc5 bewirkt somit die Aktivierung von Tem1. In der Folge führt dies zum Auslösen des Austritts aus der Mitose. Cdc5 löst die Aktivierung von Cdc14 und damit den M/G1 Übergang auf zwei verschiedenen Wegen aus.

Cdc5 besitzt noch eine zusätzliche Funktion bei der Zytokinese (Song et al. 2000, Song et al. 2001). Dafür gibt das Lokalisierungsmuster von Cdc5 einen Hinweis. Cdc5 lokalisiert in Abhängigkeit seiner Polobox an den Spindelpolen und am Mutter-Tochter-Übergang. Wird diese Lokalisierung verhindert, führt dies zu einem Defekt bei der Trennung von Mutter und Tochterzelle.

Cdc5 ist eine multifunktionelle Kinase, die von Beginn der Anaphase bis zur endgültigen Trennung der Zellen während der Zytokinese an vielen Prozessen beteiligt ist. *S. cerevisiae* Polo erfüllt demzufolge die gleichen Aufgaben wie die anderen Mitglieder der Polokinasefamilie aus anderen Organismen. Dies zeigt erneut, dass die grundlegenden Vorgänge bei der Zellteilung in den verschiedensten Organismen auf gleiche Art und Weise reguliert werden.

3.4.7. Die Kinase Cdc15

Die Kinase Cdc15 ist ein Bestandteil des Signaltransduktionsweg am Ende der Mitose. Es handelt sich um ein 110 kDA Protein, das eine Verwandtschaft zu MAP Kinase Kinase Kinasen (MAPKKK) aufweist (Schweitzer & Philippsen 1991). Solche Kinasen sind an vielen Signaltransduktionswegen beteiligt. Cdc15 zeigt ein interessantes Lokalisationsmuster (Menssen et al. 2001). Cdc15 befindet sich während des gesamten Teilungszyklus am Mutterspindelpolkörper (SPB). Cdc15 ist während dieser Zeit am Tochtterspindelpol nicht nachweisbar. Erst am Ende der Mitose verändert Cdc15 seine Lokalisierung. Kurz vor der Zytokinese findet sich Cdc15 dann auch am Tochtterspindelpol. Dieser Lokalisierung am zweiten Spindelpol geht die Aktivierung von Cdc14 und das Abschalten der zyklinabhängigen Kinase voraus. Diese Lokalisierungsdaten sind in der Literatur nicht unumstritten. In Abhängigkeit der verwendeten Untersuchungsmethode wird berichtet, dass Cdc15 nicht während der ganzen Zeit des Teilungszyklus am alten Spindelpol lokalisiert (Cenamora et al. 1999), oder nach der Anaphase symmetrisch an beiden Spindelpolen lokalisiert (Xu et al. 2000). Die von Menssen beschriebene Lokalisierung wurde mit GFP-markiertem endogenen Cdc15 durchgeführt - was der in vivo Situation am nächsten kommt – und wird hier deshalb favorisiert.

Die Lokalisierung von Cdc15 am zweiten Spindelpol wird vermutlich durch seine Cdc14-abhängige Dephosphorylierung ausgelöst. Cdc15 ist während des gesamten Teilungszyklus phosphoryliert. Erst am Ende der Mitose kommt es zur Dephosphorylierung. Eine weitere Ebene der Regulation von Cdc15 wird von der GTPase Tem1 kontrolliert (Pereira et al. 2001). Wie oben erwähnt lokalisiert Tem1 auch am Spindelpol und wird durch die Wanderung des Spindelpols in die Tochterzelle aktiviert. Tem1 ist in der Lage mit Cdc15 zu interagieren und führt so vermutlich zu dessen Aktivierung. Cdc15 seinerseits kann dann den Kinasekomplex Dbf2-Mob1 aktivieren (Mah et al. 2001). Dies ist ein weiterer Schritt in der Aktivierung der Phosphatase Cdc14 durch Komponenten des MEN. Der genaue weitere Weg von Dbf2 zu Cdc14 ist noch nicht bekannt. Man weiß aber, dass Tem1, Cdc15 und Dbf2-Mob1 benötigt werden, um Cdc14 aus dem Nucleolus freizusetzen. Hier für scheint aber die Lokalisierung von Cdc15 nicht wichtig zu sein, denn das Verhindern der Lokalisierung von Cdc15 am Spindelpol führt nicht zu einem Defekt beim Austritt aus der Mitose, sondern inhibiert die Zytokinese (Menssen et al. 2001). Zusammenfassend kann man sagen, dass Cdc15 mindestens zwei Funktionen erfüllen muss. Zum einen wird die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus und damit der Austritt aus der Mitose von Cdc15 zusammen mit Tem1 und Dbf2 kontrolliert. Zum anderen besitzt Cdc15 eine Rolle bei der Zytokinese, die durch Cdc14 aktiviert zu werden scheint. Cdc15 ist zuerst an der Freisetzung von Cdc14 beteiligt, um dann selbst von Cdc14 für eine neue Aufgabe aktiviert zu werden.

3.4.8. Das MEN in anderen Organismen

In anderen Organismen existieren zum MEN homologe Wege. Der M/G1-Übergang in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* steht unter Kontrolle des septation initiation network (SIN) (Übersicht in Bardin & Amon 2001). Wie der Name andeutet ist die vorrangige Aufgabe des SIN die Kontrolle der Septumbildung in *S. pombe* und damit die Kontrolle der Zytokinese. Mutationen in SIN Genen verhindern Zytokinese. Aber das SIN hat zusätzlich eine – wenn auch untergeordnete – Rolle beim Abschalten der zyklinabhängigen Kinase. Wie oben erwähnt ist auch das MEN an der Regulation der Zytokinese beteiligt. MEN und SIN regulieren also das Abschalten der zyklinabhängigen Kinase und die Zytokinese. Die Akzente bei MEN und SIN sind aber unterschiedlich. Die überwiegende Mehrzahl der MEN Mutanten verursacht einen Defekt beim Austritt aus der Mitose wohingegen die Zytokinese nur sekundär verhindert wird. Mutationen in SIN Genen dagegen verursachen einen Zytokinesedefekt. Auch die Regulation der Phosphatase – Cdc14 in *S. cerevisiae* clp1/flp1 in *S. pombe* – zeigt Unterschiede. Beide Phosphatasen sind zwar im Nucleolus lokalisiert und werden dort auch wohl beide inaktiv gehalten (für clp1 wird dies bisher nur vermutet). Ein Unterschied besteht aber bei der Freisetzung von Cdc14 bzw. clp1 aus dem Nucleolus (Trautmann et al. 2001). Für die Freisetzung von Cdc14 sind die MEN Gene essentiell. Mutationen in den MEN Genen führen zu einem Arrest mit lokalisiertem Cdc14. Die Phosphatase clp1 dagegen wird ohne die Mitwirkung der SIN Gene freigesetzt. Eine Mutation der SIN Gene führt aber dazu, dass clp1 nicht delokalisiert bleibt, sondern wieder im Nucleolus lokalisiert. Dies scheint auf einen unterschiedlichen Mechanismus der Freisetzung der Phosphatase hinzudeuten. Es gibt aber Beobachtungen, dass auch Cdc14 schon früh in der Mitose freigesetzt wird und dann wieder im Nucleolus lokalisiert, aus dem es dann durch die Wirkung des MEN wieder freigesetzt wird. Dies sind nur vorläufige Beobachtungen, die aber zeigen, dass die Regulation der Phosphatasefreisetzung am Ende des Teilungszyklus zwischen *S. cerevisiae* und *S. pombe* nicht gänzlich anders reguliert ist. Cdc14 und clp1 haben beide eine Funktion beim Abschalten der zyklinabhängigen Kinase. Cdc14 bewirkt die Degradation von Zyklinen und die Akkumulation des Inhibitors Sic1. Der Mechanismus der clp1-induzierten Inhibition der CDK ist anders. Die zyklinabhängige Kinase in *S. pombe* wird über Phosphorylierung am Tyrosin an Position 15 gesteuert. Tyr15-phosphorylierte CDK ist inaktiv. In *S. pombe* gibt es die Kinase wee1, die cdc2 (die katalytische Untereinheit der CDK in *S. pombe*) an dieser Stelle phosphoryliert und infolgedessen inaktiviert. Der Gegenspieler zu wee1 ist die Phosphatase cdc25. Cdc25 dephosphoryliert cdc2 an Tyr15 und aktiviert sie somit. Clp1 ist nun in der Lage cdc25 zu dephosphorylieren und infolge dessen zu inaktivieren. Somit verhindert clp1 durch Inhibition der cdc25 Phosphatase die Aktivierung von CDK. Dies ist ein gänzlich anderer Mechanismus der CDK Inaktivierung. Das Ergebnis ist das gleiche. Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase durch die MEN/SIN gesteuerte Phosphatase.

Die Situation in höheren Organismen ist nicht so gut erforscht. Man kennt aber auch aus höheren Organismen verwandte Proteine zu MEN Komponenten. So sind die Cdc14-Homologen

CDC14A und B aus dem Menschen, humanes GAPCENA als Homologes zu Bub2/Bfa1, und die Cdc5 homologe Kinase Polo aus *Drosophila* bekannt. Die Existenz dieser Proteine legt nahe, dass der Austritt aus der Mitose und die anschließende Zytokinese auch in höheren Organismen auf ähnliche Art und Weise reguliert werden wie dies in der Hefe *S. cerevisiae* der Fall ist.

3.4.9. Kontrollsysteme im Zellteilungszyklus

Der eukaryotische Zellteilungszyklus ist die streng geordnete Abfolge verschiedener Prozesse. Für eine produktive Zellteilung ist es essentiell, dass diese Reihenfolge genau eingehalten wird. Würde z.B. die Zytokinese stattfinden bevor die genetische Information auf Mutter- und Tochterzelle verteilt ist, so würde dies die Lebensfähigkeit der Nachkommen dieser Teilung gefährden. Für das geordnete Fortschreiten des Zellteilungszyklus sind Kontrollsysteme verantwortlich, die die Einhaltung der Reihenfolge der Ereignisse sicherstellen (Übersicht in Clarke & Giménez-Abián 2000). Die Aktivierung eines solchen Kontrollsystems resultiert in einem Zellzyklusarrest bzw. einer Verlangsamung der Zellteilung. Dies eröffnet der Zelle die Möglichkeit den gestörten Vorgang richtig durchzuführen bevor der Teilungszyklus wieder aufgenommen wird. Im folgenden soll auf das Spindelkontrollsystem eingegangen werden, das beim Austritt aus der Mitose eine wichtige Rolle spielt.

3.4.9.1. Das Spindelkontrollsystem

Ein essentieller Vorgang bei der Teilung jeder Zelle ist die Verteilung der Schwesterchromatiden während der Anaphase. Für die Aufrechterhaltung der genetischen Integrität der resultierenden Nachkommen einer Zellteilung ist es von essentieller Bedeutung, dass der mitotische Spindelapparat mit höchster Effizienz und Genauigkeit arbeitet. Ein Fehler bei der Verteilung der Schwesterchromatiden führt zu Aneuploidie und ist bei höheren Organismen eine Hauptursache für das Auftreten von Tumoren. Die Weitergabe der Schwesterchromatiden an die Mutter- und die Tochterzelle wird von der mitotischen Spindel bewerkstelligt. Die Integrität der mitotischen Spindel wird dabei von zwei Kontrollsystemen überwacht (Übersicht in Burke 2000, Hoyt 2001). Das Spindelanheftungskontrollsystem misst das vollständige Anheften der mitotischen Spindel an die Kinetochore der Schwesterchromatiden. Das Spindelpositionierungskontrollsystem hingegen misst die richtige Orientierung der Spindel in Bezug zur Teilungsebene und überwacht das Voranschreiten der Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase. Diese beiden Kontrollsysteme zusammen inhibieren in Antwort auf einen Spindelschaden die zwei wichtigen Übergänge – Anaphase und Austritt aus der Mitose - während der M Phase.

Das Spindelanheftungskontrollsystem verhindert den Beginn der Anaphase, solange nicht alle Kinetochoren an die mitotische Spindel angeheftet sind und unter Zug stehen. Anaphase wird durch den Verlust der Schwesterchromatidkohäsion ausgelöst. Wichtig für diesen Prozess ist die APC^{Cdc20} induzierte Degradation des Anaphaseinhibitors Pds1. Durch Inhibition des APC-Spezifitätsfaktor Cdc20 verhindert das Spindelanheftungskontrollsystem die Proteolyse von Pds1 und damit den Beginn der Anaphase. Beteiligt an dieser Inhibition von Cdc20 ist der

Kinasekomplex Bub1 und Bub3, die Kinase Mps1 und der Komplex aus Mad1, Mad2 und Mad3. Alle diese Proteine lokalisieren an freien Kinetochoren und scheinen ein Signal zu generieren, das zur Inhibition der Pds1-Degradation durch Bindung von Mad2 und vermutlich Mad3 an Cdc20 führt. Um nach einem Spindelschaden den Teilungszyklus anzuhalten, genügt es nicht den Beginn der Anaphase zu verhindern. Zusätzlich muss auch das Abschalten der mitotischen zyklinabhängigen Kinase, das zum Austritt aus der Mitose führt, verhindert werden. Dies wird durch das Spindelpositionierungskontrollsystem blockiert. Daran sind die Proteine Bub2 und Bfa1 beteiligt. Zusammen bilden Bub2 und Bfa1 einen GTPase-aktivierenden Komplex, der in der Lage ist das G-Protein Tem1 zu inhibieren (Pereira et al. 2000). Wie oben beschrieben ist die Aktivierung vom Tem1 vermutlich der erste Schritt bei der Aktivierung des Signaltransduktionsnetzwerks, das die negative Regulation der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose bewirkt. Demnach verhindert die Inhibition von Tem1 diesem Modell zufolge das Abschalten der CDK zu diesem Zeitpunkt.

Aber auch das Spindelanheftungskontrollsystem scheint einen Einfluss auf die Ereignisse am Ende der Mitose zu haben. So ist der Anaphaseinhibitor – der von diesem Kontrollsystem stabilisiert wird - auf noch unverstandene Weise in der Lage, die Aktivierung von Hct1 und damit die Degradation der mitotischen Zykline zu verhindern (Cohen-Fix et al. 1999, Tinker-Kulberg et al. 1999). Dies zeigt, dass das Abschalten der mitotischen zyklinabhängigen Kinase von beiden Spindelkontrollsystemen inhibiert werden kann.

Zusammen bewirken beide Kontrollsysteme in Antwort auf einen Spindelschaden einen Zellzyklusarrest; dies gibt der Zelle die Möglichkeit den vorliegenden Schaden zu reparieren und die Zellteilung in einer produktiven Weise abzuschließen. Die Wichtigkeit dieser Mechanismen wird unterstrichen durch das Vorhandensein derselben Komponenten und Kontrollsysteme in allen untersuchten eukaryotischen Systemen.

3.4.10. Komponenten des MEN und ihre Zytokinesefunktion

Für einen produktiven Zellteilungszyklus ist es essentiell, dass die endgültige physikalische Trennung von Mutter und Tochter präzise mit dem Fortschreiten des Kernzyklus koordiniert ist. Den Vorgang der eigentlichen Trennung einer neugeborenen Zelle von der Mutterzelle nennt man Zytokinese (Übersicht in Field et al. 1999). Sie ist der letzte Schritt des Zellteilungszyklus und darf erst nach der vollständigen und richtigen Verteilung der genetischen Information auf Mutter und Tochter stattfinden. Eine zu frühe Zytokinese könnte zu Zellen führen, die über einen unvollständigen Chromosomensatz verfügen. Neben dem Kern müssen auch andere Organellen richtig verteilt werden, um zu einer lebensfähigen Tochterzelle zu kommen.

In der Bäckerhefe beginnt der Prozess der Zytokinese sehr früh im Teilungszyklus. Schon während der G1 Phase wählt die Mutterzelle die zukünftige Knospungsstelle und damit die Teilungsebene durch Bildung einer Landmarke aus. Nach dem Überschreiten des START-Punktes – damit hat das Programm Zellteilung irreversibel begonnen - kommt es zu einer massiven Umlagerung des Aktinzytoskeletts. Die in der G1 Phase isotrop verteilten Aktinflecken werden umorganisiert und sammeln sich an der Knospungsstelle. Weiterhin werden viele

Actinkabel in diese Richtung ausgebildet, die den Transport von Vesikeln zur Knospe lenken. Im Zuge der Knospung kommt es zur Ausbildung des sog. Septinrings. Es handelt sich um eine ringförmige Struktur aus Intermediärfilamenten, die von den Septinen Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 gebildet werden. Sie dienen wahrscheinlich als Stützstruktur für viele andere Proteine, die eine Funktion bei der Zytokinese spielen. Eine weitere prominente Struktur ist der kontraktile Aktomyosinring. In ihm finden sich Aktinfilamente und das Motorprotein Myosin, das für die Kontraktion dieses Ringes verantwortlich ist. Dieser Ring führt durch seine Kontraktion letztlich zur Abtrennung der Tochterzelle. Wie oben erwähnt darf die Zytokinese als abschließender Schritt erst stattfinden, wenn alle anderen Prozesse korrekt beendet sind. Vorbedingung für den Beginn der Zytokinese ist die Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose. Nach der Kernteilung kommt es zur Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase. Dieser Vorgang wird durch das oben erwähnte Kontrollsystem MEN reguliert. Im Anschluss an die Inaktivierung der CDK scheinen viele dieser Proteine eine Funktion bei der Zytokinese einzunehmen. Ein Beispiel ist die Kinase Cdc15. Cdc15 zeigt ein bemerkenswertes Lokalisationsmuster (Menssen et al. 2001). Während des ganzen Teilungszyklus ist Cdc15 am schon vorhandenen Spindelpol lokalisiert. Am neu gebildeten Spindelpol lässt sich hingegen kein Cdc15 nachweisen. Nach dem Abschalten der zyklinabhängigen Kinase kommt es zu einer Cdc14-abhängigen Dephosphorylierung von Cdc15 und einer Lokalisierung am Spindelpol in der Tochterzelle. Diese Spindelpollokalisierung scheint für die Durchführung der Zytokinese wichtig zu sein. Die Expression einer nicht mehr lokalisierenden Cdc15-Mutante verhindert nicht den Austritt aus der Mitose sehr wohl aber Zytokinese. Die Zellen bilden lange Ketten mit richtig positionierten Kernen.

Auch von Mob1 existieren Mutanten, die einen Austrittsdefekt oder einen Zytokinesedefekt aufweisen. Dies scheint sich auch in seiner Lokalisierung widerzuspiegeln. Mob1 lokalisiert während der Anaphase an den Spindelpolen und ist während der Zytokinese am Mutter-Tochter-Übergang zu finden (Luca et al. 2001). Auch Dbf2 hat zwei Aufgaben. Dbf2 zeigt ein ähnliches Lokalisierungsmuster wie Mob1. Es ist an den Spindelpolen lokalisiert und spät in der Mitose zeigt sich eine Lokalisierung am Mutter-Tochter-Übergang. Dieses Lokalisierungsmuster lässt auch bei Dbf2 eine Zytokinesefunktion vermuten (Frenz et al. 2000).

Die Polokinase Cdc5 besitzt neben der Regulation der CDK ebenfalls eine Aufgabe bei der Durchführung der Zytokinese. Diese Kinase muss am Mutter-Tochter-Übergang lokalisieren, damit Zytokinese stattfinden kann; der genau molekulare Zusammenhang zwischen dieser Lokalisierung von Cdc5 und der Zytokinese ist aber noch nicht näher charakterisiert (Song et al. 2000, Song et al. 2001). Diese Zweiteilung der Aufgaben der Mitglieder des MEN scheint ein durchgängiges Motiv zu sein. Zuerst aktiviert das MEN Cdc14 und inaktiviert dadurch die zyklinabhängige Kinase. Anschließend verändern die Proteine ihre Lokalisation und führen an ihrem neuen Ort zur Initiation der Zytokinese. Für Cdc15 ist gezeigt, dass diese Kinase sich selbst durch die Aktivierung von Cdc14 in einen anderen Zustand bringt, der für die Zytokinesefunktion zuständig ist. Ob Cdc14 auch beim Umschalten der anderen Proteine direkt beteiligt ist ist nicht klar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das MEN zuerst die

zyklinabhängige Kinase abschaltet und sich selbst dann durch seine eigene Aktivierung in die Lage versetzt Zytokinese zu initiieren. Dies zeigt einen Mechanismus auf, der das Abschalten der Kinase und die Zytokinese in die richtige zeitliche Reihenfolge bringt.

4. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es die Aufgaben der Phosphatase Cdc14 und ihre Regulation durch das Signaltransduktionsnetzwerk am Ende der Mitose zu untersuchen. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass es eine Gruppe von Genen gibt, die eine Rolle am Ende der Mitose spielt. Über das Zusammenspiel der entsprechenden Genprodukte war nichts näheres bekannt. In einer vorausgehenden Arbeit (Neutzner 1998) wurde versucht Cdc14 näher zu charakterisieren. Dazu wurde das Mittel der Überexpression gewählt. Es stellte sich heraus, dass Cdc14 ein limitierender Faktor für die Degradation von B Typ Zyklinen und ein positiver Regulator für Sic1 ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Cdc14 noch weiter charakterisiert und außerdem wurde versucht die Regulation von Cdc14 zu verstehen. Ein Teilprojekt dieser Arbeit war die Frage, ob auch die zyklinabhängige Kinase einen direkten regulatorischen Einfluss auf Cdc14 besitzt. Im weiteren war insbesondere die Rolle von Cdc5 bei der Regulation von Cdc14 interessant. Als durch andere Arbeitsgruppen bekannt wurde, dass Net1 eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von Cdc14 spielt wurde auch Net1 einer näheren Untersuchung in Bezug auf Regulation durch das MEN unterzogen.

5. Material

5.1. Nukleinsäuren

1-kb-DNA-Marker	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
dNTPs	Pharmacia
[γ P ³²]-ATP	Amersham, Buckinghamshire (England)
Heringsspermien-DNA	Roche Diagnostics
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg; Interactiva, Ulm

5.2. Proteine

Histon H1	Roche Diagnostics
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics

5.3. Enzyme

Lysozym	Fluka, Buchs (Schweiz)
λ -Proteinphosphatase	New England Biolabs,
Novozym 234	NovoBiolabs, Bagsværd
Pfu-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
RNaseA	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics
Taq-Polymerase	Biomaster

5.4. Antikörper

9E10	Monoklonaler Mausantikörper gegen das c-myc-Epitop (Evan et al. 1985)
12CA5	Monoklonaler Mausantikörper gegen das HA1-Epitop (Field et al. 1988)
anti-Cdc28	Affinitätsgereinigtes Kaninchenantiserum gegen Cdc28 von Carl Mann
anti-Mouse-Alexa488	MoBiTec, Göttingen
anti-Mouse-Alexa546	MoBiTec, Göttingen
anti-Mouse-IgG-HRP	Dianova, Hamburg
anti-Rabbit-Alexa488	MoBiTec, Göttingen
anti-Rabbit-IgG-HRP	Dianova, Hamburg
anti-Rat-Alexa488	MoBiTec, Göttingen
anti-Rat-Alexa546	MoBiTec, Göttingen
anti-Sic1	Kaninchenserum gegen Sic1 von Mike Tyers

5.5. Chemikalien

1-Butanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid 30%/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Adenin	Fluka, Buchs (Schweiz)
Agarose ultra pure	Gibco, Paisley (Schottland)
Aminosäuren	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Biomol, Hamburg
Bacto Pepton	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit
β -Glycerophosphat	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Fluka, Buchs (Schweiz)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Coomassie-Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
DAPI	Sigma, St. Louis
D-Galaktose	Gerbu, Gaiberg
D-Glukose	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid (DMFA)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
D-Raffinose	Serva, Heidelberg
D-Saccharose	Roth, Karlsruhe
D-Sorbitol	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Gerbu, Gaiberg
Euroagar	Difco, Detroit
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Igepal	Sigma, St.Louis
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Lithiumacetat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Magermilchpulver (Glücksklee)	Nestlé, Frankfurt am Main
Magnesiumchlorid	Sigma, St.Louis

Material

Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumhydroxid 1 M	Merck, Darmstadt
N,N,N',N', Tetra- methyldiamin (TEMED)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Perchloressigsäure (20%)	Fluka, Buchs (Schweiz)
p-Phenylendiamin	Sigma, St.Louis
Polyethylenglykol 3350 (PEG)	Sigma, St.Louis
Ponceau S	Fluka, Buchs (Schweiz)
Propidiumiodid	Sigma, St.Louis
Salzsäure 1 M	Merck, Darmstadt
Talonsäulen	Clontech Laboratoreis Inc., Palo Alto (USA)
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Fluka, Buchs (Schweiz)
Uracil	Fluka, Buchs (Schweiz)
Xylen Cyanol	Serva, Heidelberg
YeastNitrogenBase o.AS und o. NH_4SO_4	Difco, Detroit

5.6. Sonstige Materialien

CEA RP Röntgenfilme	CEA, Strängas (Schweden)
Filterpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Glasperlen (0,45-0,5mm)	Braun Biotech, Melsungen
Nitrocellulosefilter	Schleicher&Schuell, Dassel
Sterilfilter (0,2 μm)	Schleicher&Schuell, Dassel
Tetenal Superfix S/W-Fixierer	Tetenal, Norderstedt
Tetenal Ultrafin S/W-Entwickler	Tetenal, Norderstedt

5.7. Geräte

Bildbearbeitung

Photoshop 6.0	Adobe
Illustrator 9.0	Adobe

Durchflußcytometer

CA-III	Partec
JFaxes	Neutzner

Elektroblotapparatur

Semi-Dry-Blotter	Peqlab
------------------	--------

5.8. Medien

Lösungen wurden immer mit H₂O_{mp} (wenn nicht anders angegeben) angesetzt. H₂O_{mp} steht für Wasser, das mit einer Milliporeanlage vollständig gesäubert und entsalzt wurde.

5.8.1. Bakterienmedien

LB-Flüssigmedium:

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Yeast Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
NaOH	0,3 mM
LB-Agarplatten	LB mit 17 g/l Euroagar

Zur Selektion auf Plasmide mit dem *bla* Gen wurde Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Zur Selektion auf Plasmide mit dem Gen für eine Kanamycinresistenz wurde Medium mit 25 µg/ml Kanamycin verwendet.

SOC

Bacto Trypton	20 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	10 mM
Nach dem Autoklavieren:	
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM

5.8.2. Hefemedien

Novozymmedium

Sorbitol	1 M
Tris/HCl, pH7,5	10 mM
EDTA	1 mM
Dithiothreitol	50 mM
Novozym	2 mg/ml

Prä-Sporulationsmedium

Bacto Yeast Extract	8 g/l
Bacto Pepton	3 g/l
Glucose	100 g/l
Adenin	50 mg/l

Selektivmedium

10x YeastNitrogenBase	100 ml/l
10x Dropout -5	100 ml/l
Zucker	20 g/l

Je nach Auxotrophiemarker der zu kultivierenden Stämme wurden Adenin (50 mg/l), Histidin (50 mg/l), Leucin (100 mg/l) Tryptophan 100 mg/l) oder Uracil (50 mg/l) zugesetzt.

Selektivplatten

Zugabe von 17 g/l Bacto Agar zum Selektivmedium

Sporulationsmedium

Kaliumacetat	10 g/l
Bacto Yeast Extract	1 g/l
Glucose	0,5 g/l
10xDropout ++	0,1x

Vollmedium (XY)

Bacto Pepton	20 g/l
Bacto Yeast Extract	10 g/l
Tryptophan	0,2 g/l
KH_2PO_4	10 mM
Adenin	0,1 g/l
Zucker (nach Autoklavieren)	20 g/l

XY-Agarplatten

Zugabe von 17 g/l Bacto Agar zu XY-Vollmedium

5.9. Puffer und Lösungen1000x Ampicillin

Ampicillin	100 mg/ml in 50% Ethanol
------------	--------------------------

Agarose-Gel-Ladepuffer

Tris/HCl, pH 7,8	10 mM
EDTA	1 mM
Bromphenolblau	2,5 mg/ml
Xylen Cyanol	2,5 mg/ml
Glycerin	300 mg/ml

Material

10x Cdc14-Puffer

Imidazol	500 mM pH6.9
DTT	10 mM
EDTA	10 mM

2x Cdc5-Puffer

HEPES	100 mM pH7.4
Kaliumacetat	120 mM
MgCl ₂	20 mM
MnCl ₂	10 mM

Coomassieentfärbelösung

Ethanol	45%
Eisessig	10%
H ₂ O	

Coomassiefärbelösung

Coomassie	
BrilliantBlue G250	0,2%
Methanol	30%
Eisessig	10%
H ₂ O	

DAPI

Glycerin	900 mg/ml
PBS	0,1%
p-Phenylendiamin	1 mg/ml
DAPI	100 µg/ml

Drop out -5

Alanin	50 mg/l
Arginin	50 mg/l
Asparagin	50 mg/l
Asparaginsäure	100 mg/l
Cystein	50 mg/l
Glutamin	50 mg/l
Glutaminsäure	100 mg/l
Glycin	50 mg/l
(myo-)Inositol	50 mg/l
Isoleucin	50 mg/l

Lysin	50 mg/l
Methionin	50 mg/l
p-Aminobenzoessäure	5 mg/l
Phenylalanin	50 mg/l
Prolin	50 mg/l
Serin	100 mg/l
Threonin	100 mg/l
Tyrosin	50 mg/l
Valin	100 mg/l

Dye (Northern)

50% Glycerin	5 ml
0.5M EDTA	10 µl
Bromphenolblau	0,01 g
Xylen Cyanol	0,01 g

EasyPrepPuffer

Tris/HCl, pH8,0	10 mM
EDTA	1 mM
Saccharose	150 mg/ml
Lysozym	2 mg/ml
RNaseA	0,2 mg/ml
BSA	0,1 mg/ml

20% Galaktose

Galaktose	200 g
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltrieren	

20% Glucose

Glucose	200 g
H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren	

Hybridisierungspuffer (Northern):

EDTA	1 mM
NaPO ₄ pH7.2	0,5 M
SDS	7%

Material

400x Kanamycin

Kanamycin	10 mg/ml in Wasser
-----------	--------------------

Kinase-Reaktions-Mix

2x KRB	2 µl
³² P-γ-ATP	2,5 µCi
Histon H1 (2mg/ml)	0,5 µl
ATP	10 µM
H ₂ O	ad 5 µl

Histon H1 war in 2xKRB ohne DTT gelöst.

2x KRB

Tris pH7,5	100 mM
MgCl ₂	20 mM
DTT	2 mM

2x Lämmli-Puffer

Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
SDS	40 mg/ml
Glycerin	200 mg/ml
Bromphenolblau	400 µg/ml
β-Mercaptoethanol	10%

Laufpuffer (Northern)

1xMOPS	
Formaldehyd	180 ml/l

LETS

LiCl	0,1 M
EDTA	0,01 M
Tris/Cl pH7.4	0,01 M
SDS	0,2%

10x LRB (pH 9,0)

Tris-Base	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	10 g/l

MBP-Säulenpuffer

Tris/Cl pH7.4	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

20xMOPS

MOPS pH7.1	0,5 M
NaAC-Puffer	0,1 M
EDTA	0,01 M

Mounting Medium

Glycerin	900 mg/ml
PBS pH7.2	0.1%
p-Phenylendiamin	1 mg/ml
DAPI	100 µg/ml

Northern Ladepuffer

MOPS	625 µl
Formaldehyd	1429 µl
Formamid	500 µl
Dye(Northern)	650 µl

1x PBS

NaCl	100 mM
H ₂ NaPO ₄	20 mM
HNaPO ₄	80 mM

40% PEG in 1xTe/LiAc

40% Polyethylenglykol 3350 in 1xTE/Lithiumacetat

Ponceau S

Ponceau S	1 g
Eisessig	50 ml
H ₂ O	ad 1 l

Material

Proteaseinhibitoren

200x PefaBloc	100 mg/ml in H ₂ O
2000x Antipain	5 mg/ml in 100% Methanpl
833x Chymostatin	2 mg/ml in 100% DMSO
300x Aprotinin	5 mg/ml in H ₂ O
1000x Pepstatin	5 mg/ml in 100% DMSO
1000x Leupeptin	5 mg/ml in 20% DMSO

Puffer 3

NaCl	100 mM
Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
NaF	50 mM
EDTA	5 mM
Igepal CA-630	0,1%
β-Glycerophosphat	60 mM

Puffer B

Sorbitol	1,2 M
KPO ₄ pH7.5	100 mM

10% Raffinose

Raffinose	100 g
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltrieren	

RNase A

Tris/HCl pH 7.5	10 mM
NaCl	15 mM
RNase A	10 mg/ml
15' kochen und anschließend langsam abkühlen lassen	

Sammelgel für SDS-PAGE

(2 Stück)

0,5 M Tris/HCl pH6,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
30% Acrylamid-Mix	670 µl
10% APS	100 µl
TEMED	5 µl
H ₂ O	3 ml

10xSSC

NaCl	1,5 M
Na-Citrat	0,15 M
pH7.0 mit HCl einstellen	

50x TAE

Tris-Acetat, pH 8,0	2 M
EDTA	50 mM

10x TBS

Tris/HCl, pH 7,6	200 mM
NaCl	1,37 M

TBS-T

10xTBS	100 ml
10% Tween 20	10 ml
H ₂ O	ad 1 l

10x TE

Tris/HCl, pH 7,5	100 mM
EDTA	10 mM

1xTE/LiAc

Tris/HCl, pH7,5	10 mM
EDTA	1 mM
Lithiumacetat, pH7,5	100 mM

Transferpuffer

Glycin	2,9 g
Tris-Base	5,8 g
10% SDS	3,7 ml
Methanol	100 ml
H ₂ O	ad 1 l

Trenngel für SDS-PAGE

(2 Stück 7%ig)

1,5 M Tris/HCl pH8,8	3,5 ml
10% SDS	140 µl
30% Acrylamid-Mix	3,2 ml
10% APS	80 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O	7,16 ml

Trenngel für SDS-PAGE

(2 Stück 9%ig)

1,5 M Tris/HCl pH8,8	5 ml
10% SDS	200 µl
30% Acrylamid-Mix	6 ml
10% APS	120 µl
TEMED	12 µl
H ₂ O	8,7 ml

Trenngel für SDS-PAGE

(2 Stück 12%ig)

1,5 M Tris/HCl pH8,8	3 ml
10% SDS	120 µl
30% Acrylamid-Mix	4,8 ml
10% APS	72 µl
TEMED	7,2 µl
H ₂ O	3,96 ml

6. Methoden

Die geschilderten Methoden wurden im Prinzip wie beschrieben (Sambrook et al. 1989, Adams et al. 1997) durchgeführt.

6.1. Arbeiten mit Bakterien

Als Wirt zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α benutzt. Zur heterologen Expression von Hefeproteinen wurden die *E. coli* Stämme XL1Blue (Stratagene) und BL21Codon+ (Stratagene) verwendet.

6.1.1. Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium

Bakterien wurden in LB-Medium bei 37°C im Roller übernacht kultiviert. Zur Selektion auf plasmidhaltige Bakterien wurde antibiotikahaltiges LB-Medium verwendet. Zur heterologen Expression von Hefegenen wurden andere (s. unten) Kultivierungsbedingungen gewählt.

6.1.2. Transformation von *E. coli*

6.1.2.1. Herstellung elektrokompenter Zellen

Sechs 1-Liter Schikanekolben mit jeweils 200 ml LB wurden 1:100 aus einer Übernachtskultur von DH5 α angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen für 15' auf Eis abgekühlt und anschließend bei 3000 upm und 4°C 15 Minuten in sterilen GSA-Bechern geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem Wasser (4°C) gewaschen (150 ml pro GSA-Becher). Die Zellen nicht vortexen, sondern sanft durch Schwenken resuspendieren. Die Zellen wurden wie zuvor nochmals zentrifugiert und gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen aus je drei GSA-Bechern in 30 ml 10% glycerinsäurefreiem Glycerin resuspendiert und in 50 ml Falconröhrchen überführt und bei 3000 upm 10 Minuten in der Hereaus Megafuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 10% Glycerin aufgenommen. 100 μ l Aliquots wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert.

6.1.2.2. Elektroporation

Durch Elektroporation (Dower et al. 1988) können elektrokompente *E. coli*-Zellen mit einem gewünschten Plasmid transformiert werden. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass die Zellwände von Bakterien durch das kurzzeitige Anlegen einer hohen Spannung für Plasmid-DNA durchlässig werden.

Dazu wurden elektrokompente Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 50 μ l Bakteriensuspension wurden mit 2-10 μ l Plasmid-DNA in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipetiert. Die DNA muß vor der Elektroporation gegen Wasser dialysiert werden, um störende Salze zu entfernen. Die Elektroporation wurde nach einer einminütigen Inkubation auf Eis durchgeführt (Kapazität 25 μ F, Widerstand 200 Ω). Anschließend wurde sofort 1 ml SOC-Medium (37°C) zur Bakteriensuspension gegeben und für 1 h bei 37°C gerollert, um die Expression des

Resistenzgens zu ermöglichen. Danach wurden verschiedenen Verdünnungen des Ansatzes auf LB-Amp-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

6.1.3. Proteinproduktion in *E. coli*

Zur heterologen Produktion von Proteinen wurden *E. coli* XL1-Blue Zellen verwendet, die mit dem Helferplasmid pUWS520 transformiert waren. Dieses Helferplasmid trägt das Gen für eine Arginin-tRNA, die nicht von *E. coli* produziert werden kann. Das Plasmid mit dem heterologen Gen unter Kontrolle des rhamnoseinduzierbaren rhaP-Promotors wurde in elektrokompetente XL1-Blue Zellen transformiert und auf Ampicillinplatten selektiert. Zur Optimierung der Proteinexpression wurde eine Übernachtskultur der Zellen in frischem Medium auf eine OD₆₀₀ von 0.1 verdünnt mit 0.2% Rhamnose induziert. Die Kulturen wurden bei 25, 30 und 37°C inkubiert. Proben wurden nach 5, 7 und 9 Stunden (bei 30 und 37°C) bzw. nach 9 und 24 Stunden entnommen und auf Trockeneis gelagert. Die Proteinextrakte wurden durch Einfrieren und Auftauen unter Zugabe von Lysozym und DNase I hergestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Produktion des gewünschten Proteins im löslichen Überstand und im unlöslichen Pellet durch SDS-PAGE überprüft. Für die Produktion von Net1^{His6} wurden die Zellen immer frisch transformiert. Für die Produktion von ^{MBP}Cdc14 und ^{MBP}Cdc14-Derivaten wurden die Zellen aus Glycerinkulturen angeimpft.

6.1.4. Produktion und Reinigung von ^{MBP}Cdc14 und ^{MBP}Cdc14-Derivaten

Zur heterologen Expression von *CDC14* wurde der Stamm XL1Blue (transformiert mit pUBS522) verwendet. *CDC14* wurde für die Expression in den Expressionsvektor pJOE2955 kloniert (pWS927). Dies ergab eine Translationsfusion zwischen Cdc14 und dem Maltosebindenden Protein (MBP) unter der Kontrolle des mit Rhamnose induzierbaren Rhamnosepromotors. Zur Selektion auf die verwendeten Plasmide wurde Medium benutzt, das sowohl Ampicillin zur Selektion auf das Expressionskonstrukt als auch Kanamycin zur Selektion auf des Helferplasmid enthält. Die Produktion von ^{MBP}Cdc14 erfolgte in diesem Medium nach Zugabe von 0.2% Rhamnose für 24 Stunden bei 25°C. Nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall Zentrifuge im SS34 Rotor mit 5000 upm für 10 Minuten) geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Dazu wurde zum Zellpellet 1:1 MBP-Säulenpuffer zugegeben und auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde 1/30 Volumen Lysozym (10 mg/ml in Wasser) zugegeben und der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Pellet auf Trockeneis eingefroren und anschließend wieder auf Eis aufgetaut. Es wurde wieder Lysozym zugegeben. Zusätzlich wurden 10 Unit DNase I und 10 mM MgCl₂ und 1 mM MnCl₂ zum Ansatz hinzugefügt und wieder für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Klärung des Zelllysates wurde der Ansatz 30 Minuten zentrifugiert (Sorvall 4°C 9000 upm). Der Proteingehalt des geklärten Lysates wurde nach Messung der Proteinkonzentration mittels Bradfordtest (Bradford 1976) durch Verdünnung mit MBP-Säulenpuffer auf 2.5 mg/ml Gesamtprotein eingestellt. Zur Reinigung des Proteins

wurde das verdünnte geklärte Lysat auf eine 1,5 ml Amyloseresinsäule (New England Biolabs) aufgegeben. Zuvor war die Säule mit dem achtfachen Säulenvolumen MBP-Säulenpuffer äquilibriert worden. Zum Waschen der Säule wurde das zwölfwache Säulenvolumen MBP-Säulenpuffer auf die Amyloseresinsäule gegeben. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch 2 ml Säulenpuffer mit 10 mM Maltose. Durch den Überschuss an Maltose im Elutionspuffer wurde^{MBP}Cdc14 von der Amylosesäule abgelöst. Das Eluat wurde in Fraktionen von ca. 500 µl aufgefangen. Durch Bradfordtest und SDS-PAGE wurde die Menge bestimmt und der Reinheitsgrad des produzierten Proteins überprüft. Zur Konzentrierung des gereinigten Proteins wurden BioMax50 Ultrafiltrationseinheiten (Millipore) nach Vorgabe des Herstellers verwendet.

6.1.5. Produktion und Reinigung von Net1^{His6}

Zur heterologen Expression von *NET1* wurde das Gen in den Expressionsvektor pJOE3053 kloniert. Dies ergab ein Konstrukt für eine Translationsfusion zwischen Net1 und dem His6-Epitop unter Kontrolle des hybriden Lactose/Rhamnose Promotors. Zur Expression von *NET1^{His6}* wurde das Expressionskonstrukt frisch in XL1Blue mit pUBS520 transformiert. Dies war notwendig, da kein stabiler Klon von XL1Blue mit dem Expressionskonstrukt gefunden werden konnte. Die Produktion von Net1^{His6} wurde in LB-Medium mit Ampicillin, Kanamycin und 0,2% Rhamnose bei 25°C für 24 Stunden durchgeführt. Die Herstellung des geklärten Proteinslysats erfolgt wie für Cdc14 beschrieben. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte mit Talonsäulen der Firma Clontech nach Vorschrift des Herstellers. Mittels Bradfordtest und SDS-PAGE wurde die Menge und die Reinheit des eluierten Fusionsproteins überprüft. Das gereinigte Protein wurde mittels BioMax50 Ultrafiltrationseinheiten (Millipore) konzentriert.

6.2. Arbeiten mit Hefe

6.2.1. Kultivierung von Hefen in Flüssigmedium

Vollmedium (XY-Medium mit Glucose oder Raffinose) wurde zur Kultivierung von Hefestämme verwendet. Die Inkubation von Vorkulturen erfolgte übernacht bei Raumtemperatur für temperatursensitive Mutanten; nicht temperatursensitive Mutanten konnten auch bei 30°C kultiviert werden. Um Zellen für die Herstellung von Proteinextrakten zu gewinnen, wurden entsprechende Mengen (20 ml pro zu erntendem Zeitwert) Vollmedium mit am Vortag angeimpft und übernacht bei Raumtemperatur im Wasserbad geschüttelt. Die Kulturen wurden so angeimpft, dass am nächsten Tag eine wachsende Kultur mit einer OD₆₀₀ um 0.5 vorlag. Diese Kultur konnte nun für das gewünschte Experiment eingesetzt werden.

Um temperatursensitive Mutanten zu arretieren, wurden die entsprechenden Kulturen wie oben beschrieben bei RT angezogen und anschließend bei 37°C weiterinkubiert. Für einen Arrest in der G1 Phase wurden bei RT 50 ng/ml α -Faktor (Bardwell et al. 1994) zum Medium gegeben. Um Zellen in der G2 Phase zu arretieren, wurden 15 µg/ml Nocodazol (Straigh & Murray 1997) dem Medium zugesetzt. Die Kontrolle des jeweiligen Arrests erfolgte mikroskopisch.

6.2.2. Aufbewahrung von Hefen

Hefezellen können einige Tage in Flüssigkultur bei Raumtemperatur oder einige Wochen in Form von Kolonien auf Agarplatten, die mit Parafilm versiegelt sind, bei 4°C gelagert werden. Um Stämme für unbestimmte Zeit zu konservieren wurde 1,5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes geerntet, mit 750 µl 15%igem Glycerin versetzt und bei minus 70°C gelagert.

6.2.3. Kreuzung haploider Hefestämme

Um diploide Stämme zu erzeugen, wurden zwei haploide Stämme verschiedenen Paarungstyps gekreuzt. Dazu wurden je 100 µl einer frisch gewachsenen Übernachtskultur des jeweiligen Stammes miteinander vermischt und für mindestens sechs Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann zur Selektion auf diploide Zellen auf entsprechende Selektionsplatten plattiert und bei 30°C 2-3 Tage inkubiert. Falls keine Selektion auf Diploide möglich war, wurde mit dem Mikromanipulator je eine Zellen des einen Stammes auf einer XYD-Platte neben die des anderen Stamms gelegt. Die Fähigkeit zur Sporulation war in diesen Fällen das Indiz für eine erfolgreiche Kreuzung.

6.2.4. Sporulation diploider Stämme und Tetradenanalyse

Diploide Zellen durchlaufen unter guten Wachstumsbedingungen einen normalen Zellzyklus mit G1-Phase, DNA-Replikation in der S-Phase, G2- und M-Phase mit anschließender Zytokinese. Wenn jedoch die Wachstumsbedingungen nicht optimal sind (z.B. Stickstoffmangel), arretieren diploide Zellen kurz in der G1-Phase und treten aus dem normalen Zellteilungszyklus aus. Anschließend durchlaufen die Zellen eine Meiose und bilden haploide Sporen. Diese Sporen, also die haploiden Meioseprodukte, werden von einem Ascus umschlossen und bilden eine sogenannte Tetrade. Die Sporen können schlechte Wachstumsbedingungen einige Zeit überdauern und teilen sich erst wieder, wenn geeignete Wachstumsbedingungen vorliegen. Über die Sporulation können haploide Stämme erzeugt werden, die über die gewünschten Eigenschaften des diploiden Stammes verfügen.

Diploide Zellen wurden in 2 ml Präspo-Medium angesetzt und übernacht bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Die Zellen wurden in 1 ml Spo gewaschen (2000 upm 2') und anschließend in 2 ml Spo-Medium aufgenommen und für drei Tage bei Raumtemperatur gerollert. Wie oben beschrieben waren Tetraden entstanden, die einer Tetradenanalyse unterzogen werden konnten. Dazu wurden 100 µl des Sporulationsansatzes mit 100 µl Novozymmedium 20' bei RT behandelt. Dadurch wurde die Ascushülle verdaut und die Sporen wurden freigesetzt. Jeweils vier zusammenhängende Sporen aus einer Tetrade wurden mit dem Mikromanipulator auf einer Vollmediumsplatte vereinzelt. Die Sporen wuchsen im Verlauf von drei bis vier Tagen zu Kolonien heran, die aus haploiden Zellen bestanden.

6.2.5. Lithiumacetatmethode zur Hefetransformation

Hefezellen können nach Behandlung mit Alkaliionen sehr effektiv DNA aufnehmen. Bei der angewandten Methode kam Lithium in Form von Lithiumacetat zur Verwendung (Gietz et al. 1992). 20 ml XYD wurden aus Übernachtskulturen des zu transformierenden Stammes 1:20 angeimpft und für ~3 h inkubiert. Anschließend wurden pro Transformationsansatz 1×10^7 Zellen (entspricht 1 OD_{600}) geerntet und in 1 ml sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml 1xTE/LiAc gewaschen und in 50 μl 1xTE/LiAc pro Transformationsansatz aufgenommen.

Der Transformationsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 5 μl einzelsträngige DNA (Heringsspermien-DNA, 10 mg/ml, 5' gekocht)
- 50 μl Hefesuspension
- zu transformierende DNA (je nach Konzentration bis 10 μl)
- 300 μl 40% PEG in 1xTE/LiAc

Der Ansatz wurde auf dem Rad bei 30°C 20' und anschließend 15' bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden danach kurz abzentrifugiert, in 150 μl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ aufgenommen und auf eine entsprechende Selektivplatte ausplattiert. Die Selektivplatten wurden bei entsprechender Temperatur zwei bis vier Tage inkubiert, bis Kolonien zu sehen waren.

6.2.6. Test des Wachstumsverhaltens von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihen

Dieser Test diente zur genaueren Ermittlung des Wachstumsverhaltens verschiedener Stämme unter bestimmten Bedingungen. So kann z.B. die Toxizität der Überexpression von bestimmten Genprodukten in unterschiedlichen Stämmen auf diese Art ermittelt werden.

Eine frische Übernachtskultur des entsprechenden Stammes wurde mit Wasser auf eine OD_{600} von 0,6 verdünnt. Von dieser Verdünnung aus wurden fünf weitere 1:10 Verdünnungen hergestellt. Von jeder dieser Verdünnungen wurden 5 μl auf eine entsprechende Vollmediumsagarplatte getropft. Nach dem Trocknen des Tropfens wurde die Platte bei den entsprechenden Bedingungen inkubiert, bis eventuelle phänotypische Unterschiede sichtbar wurden.

6.3. Färbung und Mikroskopie von Hefezellen

6.3.1. Fixierung von Hefezellen mit Ethanol

Hefezellen können in 70% Ethanol fixiert für längere Zeit bei 4°C aufbewahrt werden. Hefezellen werden dazu geerntet und in 150 μl Wasser aufgenommen. Die Zellen werden dann durch Zugabe von 350 μl 100% Ethanol, der langsam zugetropft wird, fixiert.

6.3.2. Fixierung von Hefezellen mit Formaldehyd

Die Inkubation von Hefezellen in Medium mit Formaldehyd führt zur Fixierung der Zellen durch Quervernetzung der enthaltenen Proteine. Derart fixierte Zellen eignen sich für verschiedene Färbungen, wie z.B. indirekte Immunfluoreszenz. Auch die Beobachtung von Proteinen, die mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) markiert sind, ist in solchen Zellen möglich.

Zur Fixierung wurden die zu untersuchenden Zellen mit 4,5 % Formaldehyd behandelt. 4,4 ml der Kultur wurden mit 610 µl Formalin versetzt für eine gewisse Zeit bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Für die Detektion von Spindelpolkomponenten erwies sich eine Fixierungszeit von zehn Minuten als optimal. Zur Färbung von Tubulin, Septin (Cdc11), Net1 und Cdc14 wurden die Zellen für eine Stunde fixiert.

6.3.3. Färbung von Hefezellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

DAPI bindet spezifisch an Nukleinsäuren und lässt sich dann mit dem UV-Licht einer Quecksilberdampfampe zu einer blauen Fluoreszenz anregen. Mit dieser Methode lässt sich der Zellkern von fixierten Zellen anfärben. Neben dem Zellkern werden auch die Mitochondrien angefärbt.

Ethanolfixierte Hefezellen wurden in 1 ml 50 mM Natriumcitrat gewaschen und in 500 µl Natriumcitrat aufgenommen. Anschließend wurden sie mit sieben Ultraschallpulsen behandelt, um die Zellen zu vereinzeln. Von der Zellsuspension wurden 5-10 µl auf einen Objektträger ausgestrichen und nach kurzem aber nicht vollständigen Antrocknen mit DAPI überschichtet. Zu langes Trocknen führt dazu, daß die Zellen nicht mehr vereinzelt sind, sondern sich zusammenlagern. Das Präparat konnte nun mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan von Zeiss) unter UV-Licht im Phasenkontrast analysiert werden.

6.3.4. Immunofluoreszenz

Für die Lokalisierung von Proteinen in formaldehydfixierten Zellen wurde die Immunfluoreszenz verwendet (Pringle et al. 1991). Mittels spezifischen bzw. epitopspezifischen primären Antikörpern und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern können Proteine angefärbt werden. Die Fluoreszenz lässt sich dann im Fluoreszenzmikroskop untersuchen und lokalisieren.

Dazu wurden die formaldehydfixierten Zellen mit Puffer B 2 min bei 2000 upm in der Hereaus Megafuge pelletiert und in Puffer B aufgenommen. Um die Zellen für den Antikörper zugänglich zu machen wurden sie mit Zymolyse bei 37°C auf dem Roller (5 mg/ml in Wasser) je nach Wachstumsbedingung für 20 bis 45 Minuten verdaut. Die verdauten Zellen wurden auf 12-well Objektträger aufgebracht. Die Objektträger waren mit Polylysine beschichtet (je 10 µl 10 mg/ml Polylysine kurz einwirken lassen; dreimal mit 40 µl Wasser waschen; 10' in Wasser waschen; jeweils für eine Stunde trocknen lassen). Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl PBS/BSA (1 mg/ml) geblockt und übernacht mit dem entsprechenden Antikörper in

PBS/BSA inkubiert. Die Objektträger wurden für die Inkubation in einer feuchten Kammer (verschlossenes Plastikgefäß mit feuchtem Papierhandtuch) aufbewahrt. Am zweiten Tag wurden die Zellen siebenmal mit 20 µl PBS/BSA gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in PBS/BSA inkubiert. Die Zellen wurden wieder siebenmal mit PBS/BSA gewaschen, mit Mounting Medium überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Das Deckglas wurde mit durchsichtigem Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenz konnte mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Zur Dokumentation wurde ein Kodak Elite Chrom 400 Diafilm verwendet.

6.3.5. Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie kann der DNA-Gehalt fixierter und gefärbter Zellen bestimmt werden (Haase & Lew 1997). Dies ermöglicht festzustellen, in welchem Teil des Zellteilungszyklus sich die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung befunden haben.

Dazu wurden die ethanolfixierten Zellen in 1 ml 50 mM Natriumcitrat gewaschen, anschließend in 500 µl Natriumcitrat aufgenommen und mit Ultraschall behandelt. Nach Messung der OD_{600} wurde durch Verdünnung mit Natriumcitrat eine Zellsuspension mit einer $OD_{600}=0,5$ - dies entspricht ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml - eingestellt. Die Zellen wurden einer RNasebehandlung unterzogen, indem sie eine Stunde bei 50°C mit 12,5 µl einer 10 mg/ml RNaseA-Lösung inkubiert wurden. Zur weiteren Verringerung unspezifische Signale wurden die Zellen für eine Stunde bei 50°C mit 50 µl einer 10 mg/ml Proteinase K-Lösung inkubiert. Danach wurden die Zellen übernacht bei 4°C auf dem Roller mit 37,5 µl Propidiumiodid (800 µg/ml) gefärbt. Nach Verdünnung der Probe in 1x PBS (50 µl Probe auf 2 ml PBS) konnte der DNA-Gehalt der Zellen mit dem CA-III von Partec gemessen werden. Die Datendateien wurden mit dem Programm JFaxes (Albert Neutzner) ausgewertet.

6.4. Molekularbiologische Methoden

6.4.1. Plasmidpräparation aus *E. coli*

6.4.1.1. Plasmidpräparation nach der Kochlysatmethode

Mit dieser Methode können Plasmide mit hoher Kopienzahl (z.B. pUC-Derivate) schnell, einfach und kostengünstig aus *E. coli* präpariert werden (Berghammer & Auer 1993). Die erhaltene DNA ist noch mit Proteinen verunreinigt; sie kann aber ohne weiteres für Restriktionsanalysen, Klonierungen und für Hefetransformationen verwendet werden.

Dazu wurden 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in einem 2 ml-Eppendorf-safe-lock-Gefäß 2' bei 14000 upm geerntet. Das Pellet wurde in 40 µl EasyPrepPuffer resuspendiert, für 1' im Wasserbad gekocht, 1' auf Eis abgekühlt und 15' bei 14000 upm abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA und war fertig für die weitere Verwendung.

6.4.1.2. Plasmidpräparation mit dem JETspin-Kit

Mit dieser Methode kann man große Mengen hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* isolieren. Die isolierte DNA kann für jede Art von Reaktion eingesetzt werden. Die Plasmidpräparation beruht auf alkalischer Lyse der Bakterien und Reinigung der DNA von Proteinen und RNA über eine Anionenaustauschchromatographiesäule.

Verwendet wurden die Lösungen aus dem JETspinKit der Firma Genomed nach der Anleitung des JETspin-Protokolls.

6.4.2. DNA-Präparation aus Hefe

6.4.2.1. Gesamt-Hefe-DNA-Präparation

Die Isolierung genomischer DNA beruht auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand, anschließender Zellyse durch Detergenzbehandlung und alkoholischer Fällung der DNA (Fujimura & Sakuma 1993, Cryer et al. 1975). Die isolierte DNA kann für PCR-Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente verwendet werden.

5 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, in 1 ml Wasser gewaschen und in 100 µl Tris/EDTA/SDS (Tris/HCl pH7,5 50 mM; EDTA 20 mM; SDS 10 mg/ml) resuspendiert. Anschließend wurden Glaskügelchen bis knapp unter den Meniskus der Suspension gegeben, der Ansatz wurde 5' im Kühlraum in der Retschmühle geschüttelt; nach Zugabe von 500 µl Tris/SDS/EDTA wurde die Lösung 10' bei 70°C inkubiert; nach Zugabe von 200 µl 5 M Kaliumacetat, 10' auf Eis, 5' Zentrifugation bei 14000 upm, wurde der Überstand abgenommen und mit 1 ml 100% Ethanol wurde die DNA gefällt. Das Präzipitat wurde kurz abzentrifugiert und nach entfernen des Ethanols wurde das Pellet 15' getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl 1xTE und 50 µl RNase A (1 mg/ml) aufgenommen, bei 65°C 30' inkubiert und mit 500 µl 100% Isopropanol wurde die DNA wieder gefällt. Vor dem Trocknen wurde das Pellet mit 70% Ethanol abgespült. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 50 µl 1xTE gelöst.

6.4.2.2. Kolonie-PCR

Zur Überprüfung von Hefestämmen auf DNA-Ebene – z.B. zur Überprüfung der Deletion eines Gens – wurde die Kolonie-PCR verwendet (Adams et al. 1997). Hierzu wurde nicht gereinigte DNA in die PCR eingesetzt, sondern eine geringe Menge Hefezellen wurde in einem speziellen PCR-Mix resuspendiert. Diese Methode eignet sich, um schnell eine größere Anzahl von Stämmen zu untersuchen.

2 µl 10x Kolonie-PCR Puffer (0.125 Tris/Cl pH8.5; 0.56 M KCl)

1.2 µl 25 mM MgCl₂

0.4 µl 10 mM dNTPs

10 pM Primer 1 + 2

0.5 µl Taq

ad 20 µl Wasser

Der Reaktionsmix wurde folgendem Temperaturprofil unterzogen:

94°C 1 min; Anneling Temperatur 1 min; 72°C 2-3 min für 35 Zyklen.

Durch die Wahl geeigneter Primer konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen auf DNA-Ebene durch Agarosegelelektrophorese der entstandenen PCR-Produkte festgestellt werden.

6.4.3. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind, doppelsträngige DNA sequenzabhängig durch Hydrolyse zweier Phosphodiesterbindungen zu schneiden. Es entstehen lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente mit 5'- oder 3'-überhängenden bzw. glatten Enden. Restriktionsverdau werden in Verbindung mit einer Agarosegelelektrophorese zur Erstellung von Restriktionskarten, zur Längenbestimmung von DNA-Molekülen oder zur Klonierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Restriktionsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

DNA 0,5-2 µg

Restriktionsendonukleasen 1-10 U

10xPuffer

ad H₂O_{mp} zum 10fachen Volumen des zugegebenen 10xPuffers

Die Inkubation erfolgte mindestens für eine Stunde bei der vom Hersteller des Enzyms vorgegebenen Temperatur.

6.4.4. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Man macht sich die in Abhängigkeit zur Größe unterschiedliche Beweglichkeit von verschiedenen DNA-Fragmenten zu Nutze. Je größer ein Fragment, desto kleiner seine Beweglichkeit im Agarosegel bei einer angelegten Spannung. Um die DNA im Agarosegel sichtbar zu machen, gibt man Ethidiumbromid, das sich spezifisch an und in DNA einlagert, in das Gel. Ethidiumbromid hat die Eigenschaft nach Bindung an DNA und Anregung mit UV-Licht zu leuchten.

Dazu wurden 0,7%ige Agarosegele (1 g Agarose ultra pure in 70 ml 1x TAE mit 100 µl 0,5 mg/ml Ethidiumbromid) verwendet. DNA-Fragmente konnten durch das Anlegen einer Spannung an das Gel (80 V) in Richtung des Stromflusses aufgetrennt werden. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde die Elektrophorese für dreißig bis neunzig Minuten durchgeführt.

6.4.5. Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung eines DNA-Fragments, d.h. den Einbau in einen Vektor und anschließende Vermehrung, umfasst mehrere Schritte.

6.4.6. Restriktionsverdau

Der erste Schritt beim Klonieren eines DNA-Fragments ist der Verdau von Vektor und Fragment mit Restriktionsendonukleasen. Dadurch wird der zirkuläre Vektor linearisiert. Durch den Verdau entstehen weiterhin zueinander komplementäre bzw. glatte Enden, die an einander binden können und als Substrat für die T4-DNA-Ligase dienen.

6.4.7. Gelelution

Zur Isolierung der durch den Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente wurde eine Agarosegelelektrophorese mit anschließender Reinigung der Fragmente aus dem Gel durchgeführt. Dazu wurde der Jetsorb-Kit der Firma Genomed verwendet. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Fähigkeit von Glasmilch, einzelsträngige DNA unter hohen Salzkonzentrationen zu binden und bei niedrigen Salzkonzentrationen wieder freizusetzen. Die Gelelution wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

6.4.8. Ligation von Vektor und DNA-Fragment

Aliquots der aus dem Gel eluierten DNA wurde zur Abschätzung der Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen. Zur Ligation von Vektor und Insert wurde ein 2-facher Überschuß an Insert gegenüber Vektor verwendet. Die entsprechenden Mengen an Vektor und Insert wurden zusammen mit 1U T4-DNA-Ligase und 2 µl Ligasepuffer in 20 µl Gesamtvolumen 4 Stunden bzw. übernacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dies führte zur Bildung von zirkulären rekombinanten Plasmiden, die sich in Bakterien vermehren und anschließend gewinnen ließen.

6.4.9. Transformation des Ligationsansatzes

Der Ligationsansatz wurde nach der Inkubation zwanzig Minuten gegen Wasser auf einem Filter mit 0,2 µm Porenweite dialysiert. Anschließend wurden 10 µl des Ansatzes in *E. coli* DH5α transformiert. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf Transformanten auf ampicillinhaltigen LB-Agar plattiert und übernacht bei 37°C inkubiert. Die Ligation wurde durch Isolierung der Plasmide und anschließendem analytischem Restriktionsverdau untersucht.

6.4.10. Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction - PCR, Mullis et al. 1986) dient zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Sequenzen mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase und mit zu den 3'-OH Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragments komplementären Oligonukleotiden (Primern). Der PCR-Ansatz enthält neben der sog. Template-DNA, der thermostabile DNA-Polymerase, Primern, 10xPuffer mit MgCl₂ noch die vier Desoxynukleotide. Der PCR-Ansatz wird folgendem Temperaturprofil unterzogen:

1. Hitzedenaturierung der DNA (94°C)
2. Abkühlung zur Hybridisierung der synthetischen Oligonukleotide an ihre komplementäre

Zielsequenz (Temperatur abhängig von Sequenz und Länge der Primer)

3. DNA-Synthese durch die thermostabile *Taq*-Polymerase (72°C)

Dieses Programm wird zwischen zehn und dreißig mal wiederholt. Es kommt dadurch zu einer idealerweise exponentiellen Anreicherung der gewünschten Fragmente. Die PCR lässt sich auf vielfältige Weise einsetzen. So konnten durch eine PCR mit genomischer DNA bestimmte Mutationen nachgewiesen werden, oder es konnten DNA-Fragmente zur Klonierung gewonnen werden.

6.5. Protein-chemische Methoden

6.5.1. Herstellung von Proteinrohextrakten aus Hefezellen

Die Proteinextrakte werden durch mechanischen Aufschluss von Hefezellen mit Glaskügelchen hergestellt.

Dazu wurden 10 - 20 OD₆₀₀ einer wachsenden Hefekultur geerntet (2000 upm; 2'; Megafuge), in 1 ml kaltem Wasser aufgenommen, in ein Schraubdeckelgefäß mit Glaskügelchen überführt und in der Eppendorffzentrifuge bei 14000 upm kurz abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde die Probe unverzüglich auf Trockeneis eingefroren und konnte so bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert werden. Zum Zellaufschluß wurden nach Zugabe von 150 µl Puffer 3 mit Inhibitoren die Proben in der Retschmühle 5' bei maximaler Energie im Kühlraum aufgeschlossen. Nach dem Aufschluß wurde ein 100 µl Aliquot der Probe mit 2xLämmli-puffer versetzt und 6' im Heizblock gekocht, ein 5 µl Aliquot wurde mit Wasser 1:10 verdünnt. Dieses zweite Aliquot diente zur Bestimmung des Proteingehalts der Probe.

Die Proteinbestimmung erfolgte folgendermaßen: 5 µl des 1:10 verdünnten zweiten Aliquots wurden mit Wasser noch mal 1:100 verdünnt; zu dieser Verdünnung wurden 500 µl Bradfordreagenz gegeben, gemischt und nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD₅₉₅ als Maß der Proteinkonzentration bestimmt.

6.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch nach ihrer Masse aufgetrennt werden (Lämmli 1970). Man arbeitet hierbei unter denaturierenden Bedingungen, d.h. Sekundärstrukturen der Proteine werden durch SDS und β-Mercaptoethanol zerstört. SDS bindet zudem in konstantem Gewichtsverhältnis an Proteine und erzeugt so durch seine Eigenladung negativ geladene Proteinmoleküle, die eine im umgekehrten Verhältnis zu ihrer Masse stehende elektrophoretische Mobilität zeigen. Proteingele bestehen aus einem großporigem, wenige Ladungsträger enthaltendem Sammelgel, in dem die Proteine in einer Bande stark konzentriert werden, wenn sie auf das engmaschige, viele Ladungsträger enthaltende Trenngel stoßen, werden die Proteine aufgetrennt. Der Anteil von Acrylamid am Trenngel (7-12%) wurde je nach Größe und Modifikation der zu untersuchenden Proteine gewählt.

Das Sammelgel wurde erst kurz vor dem Gellauf gegossen. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden pro Spur ca. 15 µg Protein aufgetragen und die Elektrophorese wurde

mit 10 mA pro Gel durchgeführt. Nachdem die blaue Lauffront aus dem Gel gewandert war, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Trenngel konnte für einen Western Blot oder für eine direkte Färbung des Gel mit Coomassie verwendet werden.

6.5.3. Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Der Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen erfolgt mittels Coomassiefärbung. Coomassie bindet spezifisch an Proteine und färbt diese blau. Dazu wurde ein SDS-Gel für 30' in Coomassiefärbelösung bei RT geschüttelt. Zur Entwicklung der Färbung wurde überschüssiger Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit Coomassieentfärber entfernt. Sobald ein gut sichtbares Proteinbandenmuster erkennbar war, wurde das SDS-Gel in 7%iger Essigsäure fixiert. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert. Um das Gel zu konservieren, wurde das Gel in einem Geltrockenrahmen zwischen Zellophan für mindestens drei Tage im Abzug getrocknet.

6.5.4. Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Ein Western Blot dient zum Übertragen von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran und zum anschließenden Nachweis der einzelnen Proteine auf dieser Membran (Towbin et al. 1979). Die Detektion der Proteine beruhte auf einem immunologischen Nachweis. Hierzu wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper gegen das interessierende Protein inkubiert; dieser Antikörper konnte nun mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet war und seinerseits mit dem Enzym HRP (Peroxidase aus Meerrettich) gekoppelt war nachgewiesen werden. Bei der eigentlichen Nachweisreaktion katalysierte dabei die HRP die Oxidation von Luminol. Luminol emittiert dabei Licht der Wellenlänge 420nm, das mit einem Röntgenfilm als Autoradiogramm durch Schwärzung des Films sichtbar gemacht werden kann.

Zum Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurde folgender Aufbau benutzt: Auf die Graphitanode der Elektrobloitingapparatur wurden drei in Transferpuffer getränkte Filter aus Whatman GB004 gelegt. Darauf kam die gewässerte und dann in Transferpuffer getränkte Membran, auf die dann ihrerseits das ebenfalls in Transferpuffer getränkte Trenngel gelegt wurde. Zum Abschluß wurden noch mal drei getränkte Filter aufgelegt. Nach Auflegen der Kathode erfolgte der Transfer der Proteine für 70' bei einem konstantem Strom von 40 mA pro Gel. Nach dem Transfer wurde die Membran 5' mit Ponceau S gefärbt. Die Färbung diente zur Dokumentation der aufgetragenen Proteinmengen. Nach dem Färben wurde die Membran für mindestens eine Stunde in 5%igem Milchpulver (5% Milchpulver in TBS-T) bewegt, um unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper übernacht bei 4°C mit in 5%igem Milchpulver verdünnter Antikörperlösung. Nach dem dreimaligen fünfminütigen Waschen der Membran in TBS-T, wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper inkubiert (2 h, RT, in 5%igem Milchpulver). Anschließend wurde die Membran wieder 3x5' mit TBS-T gewaschen und dann

in TBS gelagert. Sofort im Anschluß erfolgte der Nachweis der HRP auf der Membran. Zur Lichtnachweisreaktion wurde die Chemiluminescence Blotting Substrate-Lösung der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Dazu wurden 800 µl Reagenz B mit 8 µl Reagenz A gemischt und auf der Membran gleichmäßig verteilt. Im Dunkeln wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, um die entsprechenden Proteinbanden als Autoradiogramm sichtbar zu machen.

6.5.5. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient zur Reinigung gewünschter Proteine aus einem Proteinrohextrakt (Harlow & Lane 1998). Man macht sich dabei die hohe Affinität von spezifischen Antikörpern zu ihrem Antigen, gegen das sie erzeugt wurden, zu nutze. Man inkubiert einen Proteinrohextrakt, der das gewünschte Protein enthält, mit einem spezifischen Antikörper gegen das gewünschte Protein und fällt diese Immunkomplexe mit einer Sepharosematrix, an die das Protein A aus *Staphylococcus aureus* gebunden ist. Protein A bindet spezifisch die schweren Ketten von Antikörpern. So wird das gewünschte Protein über einen Antikörper und über Protein A an eine Sepharosematrix gebunden und lässt sich so leicht aus dem Proteinextrakt durch Zentrifugation und Waschen reinigen.

Zur Vorgehensweise im einzelnen:

Aufschluß der Zellen für die IP:

Zur Probe wurden 150 µl Puffer gegeben, die Probe wurde 5' bei 4°C in der Retschmühle geschüttelt und 10' bei 14000 upm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 120 µl in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 15' bei 4°C und 14000 upm zentrifugiert. 100 µl dieses Überstandes wurden aliquotiert; 5 µl werden für eine Proteinbestimmung 1:10 verdünnt, 20 µl wurden für ein Proteingel in 20 µl 2xLämmli-Puffer gekocht und der Rest wurde für die IP verwendet.

Für die IP wurden zwischen 60 µg und 300 µg Gesamtprotein (errechnet aus der vorher durchgeführten Proteinbestimmung) eingesetzt. Dazu wurde eine entsprechende Menge des Lysats mit Puffer 3 auf 500 µl aufgefüllt. Dann wurde der erste Antikörper in entsprechender Verdünnung zugegeben, die Probe für zwei Stunden bei 4°C inkubiert und nach Zugabe von zweimal mit 20 µl Puffer 3 gewaschener Protein-A-Sepharosematrix nochmals zwei Stunden bei 4°C auf dem Roller inkubiert.

Danach wurde das Präzipitat dreimal mit Puffer 3 (je 3" 14000upm). Das Protein war nun gereinigt und konnte für die gewünschte Reaktion eingesetzt werden. Falls sich an die Reinigung eine enzymatische Reaktion (Kinaseassay bzw. Phosphataseassay) anschloss, wurde das Präzipitat weitere dreimal mit dem entsprechenden Reaktionspuffer gewaschen.

Bei der Präzipitation von Net1 bzw. Cdc14 wurden dem Puffer 3 sechs Proteaseinhibitoren zugesetzt (s. 5.9), um die Proteolyse dieser Protein im Gesamtlysat zu verlangsamen.

6.5.6. Messung der zyklinassoziierte Kinase

Mit dieser Technik wurde die zyklinassoziierte (Clb2^{HA3}, Clb3^{HA3}, Clb5^{HA3}) Kinaseaktivität in Immunpräzipitaten von Proteinrohextrakten gemessen. Um die Aktivität dieser Kinase in

Proben zu bestimmen wurde Histon H1 als Kinasesubstrat eingesetzt. Für die Untersuchung der Erkennung durch die Kinase wurde rekombinant hergestelltes ^{MBP}Cdc14 und Net1^{His6} in genutzt.

Das Präzipitat, das man durch die IP mit 12CA5, einem Antikörper spezifisch für das HA-Epitop, erhielt, wurde dreimal mit Kinasepuffer (KRB) gewaschen werden. Nach dem zweiten Waschen wurden das Präzipitat in 50 µl Kinasepuffer aufgenommen und aliquotiert. 10 µl wurden für eine Westernanalyse des IP-Materials in 10 µl 2xLämmli-Puffer gekocht. Das übrige Material wurde in die Kinasereaktion eingesetzt. Dazu musste der ganze Überstand vollständig entfernt werden, so dass die Matrix trocken lag.

Anschließend wurden 10 µl ebenfalls auf 30°C vorgewärmter Kinase-Reaktion-Mix (5 µCi pro Ansatz ^γ³²P-ATP) zugegeben wurden. Die Mischung wurde 30' bei 30°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 2xLämmli-Puffer und dreiminütiges Kochen gestoppt wurde. Die Probe konnte bei -70°C bis zum nächsten Tag eingefroren werden.

Ein Teil der Probe wurde auf ein 9%iges SDS-Gel aufgetragen; nach dem Gellauf wurde das Gel im Gelrockner für zwei Stunden auf ein Filterpapier (Whatman GB002) aufgetrocknet. Von diesem getrockneten Gel wurde dann ein Autoradiogramm durch Auflegen eines Röntgenfilms angefertigt.

6.5.7. Cdc5-Kinaseassay

Zur Untersuchung der Substratspezifität von Cdc5 wurde ein Cdc5-Kinaseassay durchgeführt. Dazu wurde ^{Myc}Cdc5 mittels 9E10 Antikörpern und Protein A Agarose gereinigt (vgl. 4.5.5) und in eine Kinasereaktion eingesetzt. Als Substrate dienten ^{MBP}Cdc14 bzw. Net1^{His6}. Der Cdc5-Kinasereaktionsansatz setzte sich zusammen aus Cdc5-Präzipitat, 2xCdc5-Puffer, 5 µg Substrat, 5 µCi ^γ³²P-ATP, 50 µM ATP in einem Volumen von 60 µl. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 30' bei 30°C. Um den möglichen Einbau von radioaktivem Phosphat in die eingesetzten Substrate zu detektieren, wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Trocknung und Autoradiographie des Gels durchgeführt.

6.5.8. Phosphataseassay

Proteinmodifikationen machen sich oft durch ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel bemerkbar. So kann die Phosphorylierung von Proteinen eine stark verlangsamtes Laufverhalten des Proteins bewirken. Um zu überprüfen, ob es sich bei der beobachteten Modifikation tatsächlich um Phosphorylierung handelt, wird das Protein durch Immunpräzipitation gereinigt und das Präzipitat wird mit λ-Proteinphosphatase behandelt. Zur Kontrolle wird das Präzipitat nur mit Phosphatasepuffer inkubiert. Hat sich nach der Phosphatasebehandlung das Laufverhalten des zu untersuchenden Proteins geändert, so handelt es sich bei der beobachteten Modifikation um Phosphorylierung. Die Phosphatasebehandlung wurde wie vom Hersteller (NEB) vorgeschlagen mit 400U λ-Proteinphosphatase für eine Stunde bei 30°C durchgeführt.

6.6 Northern Blot

Zellen wurden in 250 µl LETS resuspendiert und in 2 ml Reaktionsgefäße mit 300 µl Phenol (LETS äquilibriert) und Glasbeads geben. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch zweimal 15s starkes mischen. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden 200 µl LETS zugeben. Der klare Überstand wurde abgenommen und in einem neuem Gefäß 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Nach kurzem mischen und zentrifugieren wurde der Überstand ohne die Interphase abgenommen und mit 0,1 Volumen 5 M LiCl und 2,5 Volumen 100% Ethanol vermischt und übernacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde das Präzipitat 15' bei 4°C abzentrifugiert und je einmal mit 70% und 80% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl DEPC-Wasser (100 µl DEPC pro Liter H₂O, übernacht rühren und anschließend autoklavieren) resuspendiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl RNA-Lösung mit 18 µl DEPC-Wasser gemischt; diese Verdünnung wurde 1:200 in Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm diente als Maß für die RNA-Konzentration. Die übrigen 18 µl RNA wurden mit 63 µl Ladepuffer (Northern) gemischt und für 15' bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Zur Auftrennung der RNA wurden gleiche RNA-Mengen auf ein Formaldehydgel aufgetragen (1x MOPS, 18% Formaldehyd, 1% Agarose). Der Gellauf erfolgte bei 80 bis 90 V für 2 bis 3 h; dabei wurde der Laufpuffer ständig mit einer Peristaltikpumpe umgewälzt.

Der Transfer der RNA auf eine Nitrozellulosemembran geschah folgendermaßen: Das Gel wurde in DEPC-Wasser gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Der Transfer der RNA aus dem Gel erfolgt übernacht mittels Saugblot und 10x SSC als Laufmittel. Zur Fixierung der RNA wurde die feuchte Membran im Stratagene Crosslinker nach Vorgabe des Herstellers mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde die Membran für 30'' mit Methylenblau (0.03% Methylenblau in 0.3M NaAcetat pH5.2 mit Essigsäure eingestellt) gefärbt und durch Entfärben mit Wasser wurde die RNA sichtbar gemacht. Zur Hybridisierung der Membran wurde diese bei 65°C im Rollerofen für 3 h in Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Zwischenzeitlich wurde die Sonde markiert. Dazu wurde das Random-primed labelling Kit (Roche Diagnostics) mit 100 ng Sondenfragment und 50 µCi α-³²P-ATP nach Vorgabe des Herstellers verwendet. Die markierte Sonde wurde in 2 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und die Membran wurde damit übernacht bei 65°C im Rollerofen inkubiert. Um überschüssige Sonde zu entfernen, wurde die Membran 2-3 mal mit Waschpuffer (1xSSC, 1% SDS) je 10' gewaschen. Das Waschen wurde mittels Geigerzähler kontrolliert und solange fortgesetzt bis keine Abnahme der Aktivität mehr festzustellen war. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt. Der Nachweis erfolgt mittels Autoradiographie übernacht bei -70°C in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie.

6.7. Plasmide

Plasmidname	Beschreibung
pFA6a	Vektor für PCR-vermittelte Epitopmarkierung
pJOE2955	Expressionsvektor für MBP-Fusionsproteine unter Kontrolle des Rhamnosepromotors (von Josef Altenbuchner)
pJOE3053	Expressionsvektor für His6-markierte Proteine unter Kontrolle des Hybriden lac/rha Promotors
pUWS520	Helferplasmid für Proteinexpression mit Arg4 tRNA
YEpCDC14	genomisches <i>SmaI/XbaI</i> Fragment von <i>CDC14</i> in YEPlac181 (von A. Toh-e, Universität von Tokyo)
pWZV87	Vektor für PCR-vermittelte Epitopmarkierung mit Myc9 mit <i>TRP1</i> aus <i>Klyveromyces lactis</i> (von Wolfgang Zachariae)
pWO139	Konstrukt zur Deletion von <i>PEP4</i> . <i>PEP4</i> mit Insertion des <i>URA3</i>
pWS174	Konstrukt zur Deletion von <i>HCT1</i> . <i>HCT1</i> mit Insertion von <i>HIS3</i>
pWS176	Konstrukt zur Deletion von <i>HCT1</i> . <i>HCT1</i> mit Insertion von <i>LEU2</i>
pWS217	Konstrukt zur Deletion von <i>BARI</i> . <i>BARI</i> mit Insertion von <i>HIS3</i>
pWS219	pRS306 (Sikorski & Hieter 1989) mit dem <i>GAL1</i> Promotor und dem <i>CYC</i> Terminator von p414 in <i>SacI/KpnI</i> .
pWS250	pWS219 mit einer Myc3 Kasette.
pWS251	PCR-Amplifikat von <i>CDC14</i> mit WS85/144; Fragment kloniert in <i>SpeI/HindIII</i> in pWS250
pWS313	<i>GAL^{-Myc3}CDC14C289A</i>
pWS420	Ein genomischer Klon von <i>CDC5</i> als <i>XhoI/SacII</i> fragment (2,9kb) (von Julia Charles)
pWS423	Konstrukt zur Deletion von <i>BUB2</i>
pWS432	<i>GAL-CDC5</i> mit <i>URA3</i>
pWS433	<i>GAL-MycCDC5 mit URA3</i>
pWS470	<i>TEF2^{-HA3}SIC1</i> mit <i>LEU2</i>
pWS471	<i>SIC1^{-HA3}SIC1</i> mit <i>LEU2</i>
pWS778	<i>GAL^{-Myc3}CDC14-1/2/3/4/5/6.PS</i> mit <i>TRP1</i>
pWS781	<i>GAL^{-Myc3}CDC14-1/2.PS</i> mit <i>TRP1</i>
pWS782	<i>GAL^{-Myc3}CDC14-3/4.PS</i> mit <i>TRP1</i>
pWS783	<i>GAL^{-Myc3}CDC14-5/6.PS</i> mit <i>TRP1</i>
pWS881	C-terminales <i>EcoRI/HindIII</i> Fragment von <i>Cdc14</i> in <i>YIplac128</i> (Ref) mutiert mit WS199 and WS200. In <i>SpeI/BamHI</i> (neu eingeführt) wurde ein Fragment codierend für <i>HA4</i> kloniert
PWS936	<i>NET1</i> wurde mit WS320/321 von genomischer DNA PCR-amplifiziert und in <i>NdeI</i> von pJOE3053 kloniert; Expression von <i>NET1^{His6}</i> unter Kontrolle des Rhamnosepromotors
pWS927	<i>CDC14</i> wurde mit WS249/50 PCR-amplifiziert und in <i>BamHI</i> and <i>HindIII</i> von pJOE2955 kloniert. Expression von <i>^{MBP}CDC14</i> unter Kontrolle des Rhamnose promotors
pWS937	C-terminales <i>EcoRI/HindIII</i> Fragment von <i>CDC14</i> in <i>YIplac128</i> (Ref) mutagenisiert mit WS199/200. Das <i>CDC14</i> -Fragment trägt eine 10xHA Kasette in neu eingefügten <i>SpeI/BamHI</i> Erkennungsstellen.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide. Die beschriebenen Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet (Laborsammlung) oder hergestellt. Gezeigt sind der Plasmidname und eine kurze Beschreibung.

6.8. Oligonukleotide

Primer	Sequenz
WS84	TTCCCAGTCACGACGTTG sequencing primer
WS199	AAGCGCCGCGGTGGTACTAGTGGATCCAGTGGCTCCATCAAGAAATA Mutagenese von <i>CDC14</i> (SpeI/BamHI-Stellen im C-Terminus)
WS200	TATTTCTTGATGGAGCCACTGGATCCACTAGTACCACCGGCGGCGCTT s. WS199
WS206	GCTCTAGATTTTCGTGTAATAGTCCCTGCA 3'Primer für <i>SIC1</i> -Promotor mit <i>XbaI</i>
WS207	CGGAATTCATGTTGCACCCACACA 5'Primer für <i>TEF2</i> -Promotor mit <i>XbaI</i>
WS208	GCTCTAGAGTTTGTAAATTATAGTTCGTTG 3'Primer für <i>TEF2</i> -Promotor mit <i>EcoRI</i>
WS245	GAAGAAGCCAAGTGGTGGATTTGCATCATTAATAAAAGATTTCAAGAAAAA TCCGGTTCTGCTGCTAGT PCR-Epitopmarkierung von <i>NET1</i>
WS246	CTTGATTATTTTTTTTTTACTAGCTTTCTGTGACGTGTATTCTACTGAGACTT TCTGGTACCTCGAGGCCAGAAGAC s. WS245
WS287	TCTCGGTGCATATGATTACGCCCCGGAAGATACTGATGAG Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch T26A
WS288	CTCATCAGTATCTTCCGGGGCGTAATCATATGCACCGAGA Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch T26A
WS289	CTCGTTCAGGCATGGGCCCCGCATCAAGTGCTTC Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch T109A
WS290	GAAGCACTTGATGCGGGGCCATGCCTGAACGAG Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch T109A
WS291	GACTTCAATGTACTCGCCCCGGATTTTATTGCATTTG Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch T182A
WS292	CAAATGCAATAAAATCCGGGGCGAGTACATTGAAGTC Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch T182A

Methoden

WS293	CGGATTTTATTGCATTTGCGGCACCACAAGAGGACCATC Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch S190A
WS294	GATGGTCCTCTTGTGGTGCCGCAAATGCAATAAAATCCG Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch S190A
WS295	ATTAAGAGATTTAACCATGGCACCGCCATCCAACGGTC Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch T393A
WS296	GACCGTTGGATGGCGGTGCCATGGTTAAATCTCTTAAT Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch T393A
WS297	CCGTCCCACAGACTGCCCCGGGTCAGCCGAGAAAG Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch S429A
WS298	CTTTCTCGGCTGACCCGGGGCAGTCTGTGGGACGG Mutagenese von <i>CDC14</i> Austausch S429A
WS249	CGGGATCCATGCGTAGGAGTGTATACCTC 5'Primer für <i>CDC14</i> mit <i>BamHI</i>
WS250	CCGAAGCTTTTATTTCTTGATGGAGCCACTTAT 3'Primer für <i>CDC14</i> mit <i>HindIII</i>
WS320	GGGAATTCATATGTACAAGCTACAAGTGGTCTTG 5'Primer für <i>NET1</i> mit <i>NdeI</i>
WS321	GGGAATTCATATGTTTTTTCTTGAAATCTTTTATTAATGATG 3'Primer für <i>NET1</i> mit <i>NdeI</i>
WS339	AACGGACTGGAACACTCAGACCCCTTTTCAACCTTTTACCGGATCCCCGGGT TAATTAA Epitopmarkierung von <i>DBF2</i> mit pFA-System
WS340	TATATCGCGGCGAATGCAAGACAAGAATTCATTTTTACGGAATTCGAGCTCG TTTAAAC s. WS339
WS591	CCTGAAACAGAGAGAAGTCGATTACTGTACACCGTGCCTCCTTCTGAATTCCG AGCTCGTTTAAAC <i>GAL</i> ^{-HA3} <i>NET1</i> durch PCR-Markierung mit pFA6a-GALHA
WS592	TCGCCTGAAGACTCGGAGGCACCAAGACCACTTGTAGCTTGTACATGCACTG AGCAGCGTAATCTG s. WS591

Tabelle 2. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Gezeigt ist der Name des Oligonukleotides (Primer), seine Sequenz und seine Einsatzmöglichkeit.

6.9. Hefestämme

Stamm	Relevanter Genotyp
K699	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,-15 leu2-3,-112 ssd1-d trp1-1 ura3-2</i>
K6213	<i>MATα cdc5::CDC5^{HA3}-URA3</i>
OCF1522	<i>MATa PDS1^{HA3}-URA3</i>
3E2	<i>MATa CLB2^{HA3}</i>
W389	<i>MATa CLB2^{HA3} clb5::CLB5^{HA3}-LEU2</i>
W390	<i>MATa ura3::GAL1-HAHCT1-URA3</i>
W491	<i>MATa clb3::CLB3^{HA3}-HIS3</i>
W702	<i>MATa ura3::GAL1-Myc³ CDC14::URA3 CLB2^{HA3}</i>
W783	<i>MATa ura3::GAL1^{Myc3} CDC14-URA3 cdc23-1 CLB2^{HA3}</i>
W784	<i>MATa ura3::GAL1-Myc³ CDC14-URA3 CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2</i>
W862	<i>MATα hct1-Δ1::LEU2 PDS1^{HA3}-URA3</i>
W950	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³ CDC14-URA3 PDS1^{HA3}-URA3</i>
W974	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³ CDC14C289A-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W977	<i>MATa cdc5-1 (von Julia Charles)</i>
W1140	<i>MATa ura3::GAL1-Myc³ CDC14-URA3, CLB2^{HA3} dbf2-2</i>
W1141	<i>MATα CLB2^{HA3} dbf2-2</i>
W1144	<i>MATa cdc23-1 CLB2^{HA3}</i>
W1145	<i>MATa ura3::GAL1-CDC14-URA3, CLB2^{Myc12} leu2::TEF2-^{HA3} SIC1-LEU2</i>
W1146	<i>MATa ura3::GAL1-CDC14-URA3 CLB2^{Myc12} leu2::SIC1-^{HA3} SIC1-LEU2</i>
W1220	<i>MATa CLB2^{HA3} Δbub2::LEU2</i>
W1263	<i>MATa cdc5-1 Δbub2::LEU2 CLB2^{HA3}</i>
W1265	<i>MATα cdc5-1 CLB2^{HA3}</i>
W1294	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³ CDC14-URA3 CLB3^{HA3}-HIS3</i>
W1305	<i>MATa ura3-GAL1-Myc³ CDC5 CLB2^{HA3}</i>
W1512	<i>MATα ura3:: GAL1-Myc³ CDC14-URA3 PDS1^{HA3}-URA3 hct1-Δ1::LEU</i>
W1520	<i>MATa ura3::pGAL1-Myc³ CDC14-URA3 CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2 hct1-Δ::LEU2</i>
W1521	<i>MATα ura3::pGAL1-Myc³ CDC14-URA3 CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2 cdc20-3</i>
W1524	<i>MATa CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2 hct1-Δ::LEU2</i>
W1525	<i>MATa CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2 cdc20-3</i>
W1528	<i>MATα ura3::pGAL1-Myc³ CDC14::URA3 CLB3^{HA3}::HIS3 hct1-Δ::LEU2</i>
W1529	<i>MATα ura3::pGAL1-Myc³ CDC14::URA3 CLB3^{HA3}::HIS3 cdc20-3</i>
W1532	<i>MATa CLB3^{HA3}::HIS3 hct1-Δ::LEU2</i>
W1533	<i>MATa CLB3^{HA3}::HIS3 cdc20-3</i>
W1535	<i>MATa ura3::pGAL1-Myc³ CDC14::URA3 CDC5^{HA3}::URA3</i>
W1555	<i>MATa ura3::GAL1-Myc³ CDC5::URA3 CLB2^{HA3}</i>
W1556	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³ CDC5::URA3 CLB2^{HA3} Δhct1::LEU2</i>
W1558	<i>MATa ura3::GAL1-Myc³ CDC5::URA3 CLB2^{HA3} cdc15-2</i>
W1560	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³ CDC5::URA3 CLB2^{HA3} dbf2-2</i>
W1582	<i>MATa cdc5-1 ura3:GAL1-CDC15^{GFP}-URA3</i>
W1649	<i>MATa leu2::SIC1-^{HA3} SIC1-LEU2</i>
W1664	<i>MATα CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2 cdc5-1</i>
W1665	<i>MATα CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2 cdc15-2</i>
W1668	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³ CDC5-URA3 CDC14^{HA4}-LEU2</i>
W1827	<i>MATa ura3::GAL1-Myc³ CDC5-URA3 leu2::SIC1-^{HA3} SIC1-LEU2</i>
W1828	<i>MATa ura3::GAL1-Myc³ CDC5-URA3 leu2::SIC1-^{HA3} SIC1-LEU2 Δhct1::HIS3</i>

W1829	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³CDC5-URA3 leu2::SIC1-HA³SIC1-LEU2 cdc14-3</i>
W1895	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³CDC5K110M-URA3 CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2</i>
W1974	<i>MATα NET1^{Myc9}:KITrp1 CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2 Δhct1-4::HIS3</i>
W1975	<i>MATα ura3::GAL1-CDC5-URA3 NET1^{Myc9}:KITrp1 CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2 Δhct1-4::HIS3</i>
W2021	<i>MATα Δbub2::LEU2 SIC1^{HA3}</i>
W2023	<i>MATα SIC1^{HA3} ura3::GAL1-Myc³CDC5-URA3 Δbub2::LEU2</i>
W2062	<i>MATα CLB2^{Myc12}-HIS3 leu::TEF2-GFP CDC15-LEU2</i>
W2063	<i>MATα cdc14::CDC14^{Myc9}-URA3 leu::TEF2-GFP CDC15-LEU2</i>
W2109	<i>MATα DBF2^{HA3}-HIS3S.p.</i>
W2111	<i>MATα ura3::GAL-Myc³CDC14-URA3 DBF2^{HA3}-HIS3S.p.</i>
W2114	<i>MATα DBF2^{HA3}-HIS3S.p. cdc14-3</i>
W2119	<i>MATα trp1::GAL-Myc³CDC14-1/2/3/4/5/6.PS-TRP1 CLB2^{HA3}</i>
W2120	<i>MATα trp1::GAL-Myc³CDC14-1/2.PS-TRP1 CLB2^{HA3}</i>
W2121	<i>MATα trp1::GAL-Myc³CDC14-3/4.PS-TRP1 CLB2^{HA3}</i>
W2122	<i>MATα trp1::GAL-Myc³CDC14-5/6.PS-TRP1 CLB2^{HA3}</i>
W2137	<i>MATα NET1^{Myc9}-TRP1 CDC14^{HA4}-LEU2 Δbar1-HIS3</i>
W2362	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³CDC14-333::URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2363	<i>MATα ura3::GAL1-Myc³CDC14-374::URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2372	<i>MATα NET1^{Myc9}-KITRP1 cdc15-2</i>
W2374	<i>MATα NET1^{Myc9}-KITRP1 cdc14-3</i>
W2531	<i>MAT ura3::GAL1-CDC5-URA3 NET1^{Myc9}-KITRP Δhct1::HIS3</i>
W2532	<i>MATα ura3::GAL1-CDC5-URA3 CDC14^{HA4}-LEU2 Δhct1::HIS3</i>
W2534	<i>MATα ura3::GAL1-CDC5-URA3 NET1^{Myc9}-KITRP CDC14^{HA10}-LEU2 Δhct1::HIS3</i>
W2535	<i>MATα NET1^{Myc9}-KITRP CDC14^{HA10}-LEU2 Δhct1::HIS3</i>
W2635	<i>MATα NET1^{Myc9}-KITRP1 Δpep4::URA3 cdc5-1</i>
W2714	<i>MATα/α ura3::GAL1-MYC³CDC5-URA3</i>
W2715	<i>MATα/α ura3::GAL1-MYC³CDC5-URA3 his3::GAL1-HA³NET1-SpHIS5</i>
W2732	<i>MATα CDC14^{HA4}-LEU2 NET1^{Myc9}-KITRP1 cdc5-1 Δbar1::HIS3</i>
W2733	<i>MATα CDC14^{HA4}-LEU2 NET1^{Myc9}-KITRP1 cdc15-2 Δbar1::HIS3</i>
W2734	<i>MATα ura3::GALL-CDC5 cdc15-2</i>
W9313	<i>MATα cdc15-2</i>

Tabelle 3.

Hefestämme. Zusammengestellt sind die Hefestämme, die im Lauf dieser Arbeit hergestellt oder verwendet (Laborsammlung) wurden. Der Name eines Stammes besteht aus dem Buchstaben „W“ gefolgt von einer fortlaufenden Nummer. In der Spalte „Relevanter Genotyp“ ist sind die Veränderungen aufgeführt die den jeweilige Stamm vom Ausgangsstamm K699 unterscheiden. Für alle anderen Genorte ist der Stamm dann Wildtyp.

7. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Funktion und Regulation der Phosphatase Cdc14 zu untersuchen. Am Anfang der Arbeit stand der Versuch, Cdc14 in das Signaltransduktionsnetzwerk am Ende der Mitose einzuordnen. Ein besonderer Schwerpunkt lag auf dem Zusammenspiel der Phosphatase Cdc14 mit der Polokinase Cdc5.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Aufgabe von Cdc14 bei der Aktivierung der APC-vermittelten Proteindegradation. Die Wirkung der Überexpression von *CDC14* auf verschiedene APC-Substrate wurde untersucht.

Ein weiteres Teilprojekt beschäftigte sich mit der Frage einer möglichen Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase. Dazu wurden Cdc14-Derivate hergestellt und untersucht, die nicht mehr durch zyklinabhängige Kinase phosphorylierbar waren.

7.1. Vorarbeiten

Die vorliegende Arbeit setzt frühere Untersuchungen fort (Neutzner 1998). Dort wurde die Auswirkung der Überexpression von *CDC14* untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Überexpression von *CDC14* letal ist. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass nach Überexpression von *CDC14* das Zyklin Clb2 degradiert wurde. Diese Degradation war abhängig von einem funktionellen APC und vom Substratspezifitätsfaktor Hct1. Weiterhin konnte eine Cdc14-abhängige Aktivierung des Inhibitors zyklinabhängiger Kinasen Sic1 beobachtet werden. Der Abbau von Zyklinen und der Anstieg von Sic1 zusammen führte zum Abschalten der zyklinabhängigen Kinase.

Schlussfolgerung dieser Arbeit war, dass Cdc14 einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim Abschalten der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose und beim Übertritt der Zelle in die nächste G1 Phase katalysiert.

7.2. Einordnung von Cdc14 in das MEN

Das sog. mitotic exit network (MEN) ist ein Signaltransduktionsnetzwerk, das den Austritt aus der Mitose kontrolliert. Publierte genetische Daten zeigen, dass es vielfältige Wechselwirkungen und Rückkopplungsmechanismen im MEN gibt (Jaspersen et al. 1998). Dies macht eine genaue Einordnung von Cdc14 in das MEN schwierig. Aus einer früheren Arbeit (Neutzner 1998) war bekannt, dass die Phosphatase Cdc14 nicht auf funktionelles Cdc15 angewiesen ist, um den Austritt aus der Mitose zu bewirken. Cdc14 wirkt in ein genetisches Schema übertragen neben bzw. unterhalb von Cdc15. Im folgenden sollte die Cdc14 weiter in das MEN eingeordnet werden.

7.2.1. Cdc14 wirkt unabhängig von Dbf2

Die Kinase Dbf2 spielt eine Rolle beim Austritt aus der Mitose. Zellen, die eine konditionale *dbf2-2* Mutation tragen, arretieren unter restriktiven Bedingungen am Ende der Mitose mit replizierter DNA, elongierter Spindel und hoher zyklinabhängiger Kinaseaktivität (Fitzpatrick

et al. 1998). Um eine mögliche Abhängigkeit der Cdc14-Aktivität von funktioneller Dbf2-Kinase zu untersuchen, wurde Cdc14 in Zellen überproduziert, die aufgrund eines *dbf2-2* Allels am Ende der Mitose arretiert waren. Als Vergleich diente ein Stamm ohne *CDC14*-Überexpressionskonstrukt. Wie Abbildung 5 zeigt, führt nach Induktion mit Galaktose ein Übermaß an Cdc14 in Zellen des Stammes W1140 zu einer raschen Degradation von Clb2 und einem starken Anstieg von Sic1. Die Behandlung des Kontrollstamm mit Galaktose beeinflusst dagegen weder die Menge des Zyklins Clb2 noch an die von Sic1. Dies zeigt, dass Cdc14 für die Aktivierung der Degradationsmaschinerie und die Stabilisierung von Sic1 nicht auf funktionelles Dbf2 angewiesen ist. Cdc14 liegt also genetisch gesehen unterhalb oder neben Dbf2.

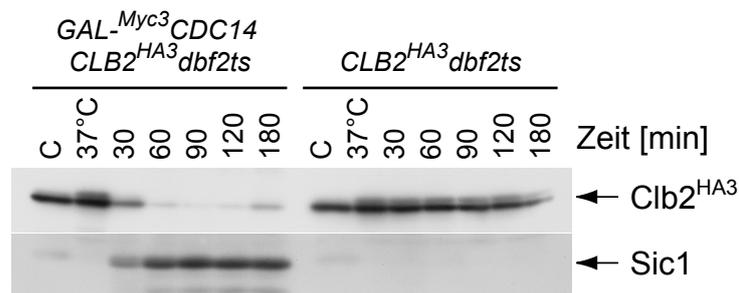


Abbildung 5

Cdc14 wirkt unabhängig von Dbf2. Die Wirkung der Überexpression von *CDC14* auf Clb2 und Sic1 in Zellen am *dbf2-2* Arrestpunkt wurde untersucht. Dazu wurden Zellen von W1140 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC14-URA3 CLB2^{HA3} dbf2-2*) und W1141 (*CLB2^{HA3} dbf2-2*) durch Inkubation bei 37°C arretiert. Zur Induktion von *CDC14* wurde 2% Galaktose zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert. Der obere Teil zeigt einen mit anti-HA entwickelten Blot zum Nachweis von Clb2^{HA3}; der untere Teil zeigt den Nachweis von Sic1 mit dem anti-Sic1 Antikörper.

Die Tatsache, dass Dbf2-defiziente Zellen spät in der Mitose arretierten zeigt aber, dass während eines normalen Teilungszyklus Dbf2-Aktivität für die Aktivierung von Cdc14 benötigt wird. Aktiviertes Cdc14 wirkt dann aber unabhängig von Dbf2.

7.3. Der Sic1-Anstieg nach Überproduktion von Cdc14 ist unabhängig von funktionellem APC

Die Überexpression von *CDC14* führt zu einem Anstieg des Inhibitors zyklinabhängiger Kinasen Sic1. Dieser Anstieg ist durch eine direkte Aktivierung von Sic1 oder durch eine mehr indirekte Wirkung von Cdc14 erklärbar. So führt die Degradation von Clb2 zu einer Verminderung der CDK-Aktivität. Da Sic1 durch CDK-abhängige Phosphorylierung instabil gehalten wird (Übersicht in Deshaies & Ferrel 2001), könnte durch Cdc14 indirekt eine Stabilisierung von Sic1 durch das Abschalten der CDK erreicht werden. Ein früheres Experiment zeigte (Neutzner 1998), dass dieser Sic1-Anstieg unabhängig von Hct1 erfolgen kann. Die Clb2-Abnahme nach Cdc14-Überproduktion ist also nicht für die Stabilisierung nötig. Um zu überprüfen, ob die Degradation eines anderen APC Substrates für den Sic1-Anstieg verantwortlich ist, wurde Cdc14 in einer *cdc23-1* Mutante überproduziert. Diese

Mutante hat einen schweren APC-Defekt. Schon bei permissiver Temperatur wachsen die Zellen sehr langsam und können Clb2 nicht mehr degradieren. Unter diesen Bedingungen lässt sich ein Sic1-Anstieg beobachten, der vergleichbar der Wildtypsituation ist (s. Abbildung 6). Dieses Experiment zeigt, dass der Cdc14-vermittelte Sic1-Anstieg in der Tat nicht von der Degradation von APC-Substraten abhängig ist, sondern dass es sich um einen direkten Mechanismus der Sic1-Aktivierung handeln muss.

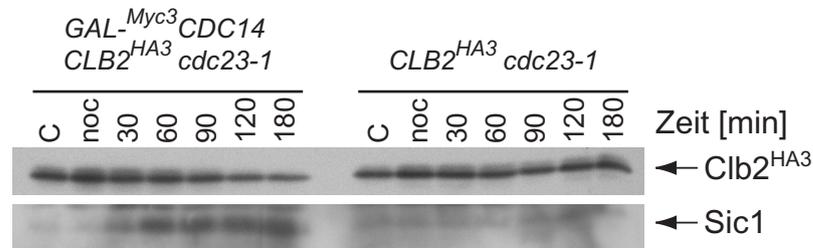


Abbildung 6 Erhöhte Mengen an Cdc14 führen zur Akkumulation von Sic1 ohne Clb2-Degradation. Zellen der Stämme W783 (*ura3::GAL1^{Myc3} CDC14-URA3 cdc23-1 CLB2^{HA3}*) und W1144 (*cdc23-1 CLB2^{HA3}*) wurden durch Behandlung mit Nocodazol arretiert und anschließend mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert. Clb2^{HA3}-Mengen wurden mit dem 12CA5 (α -HA) Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Sic1 erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen Sic1.

7.4. Cdc14 und die Aktivierung des APC

Aus Vorarbeiten (Neutzner 1998) war bekannt, dass Cdc14 vermutlich ein direkter Aktivator der Ubiquitinligase APC ist. Dies sollte im weiteren näher untersucht werden. Dazu wurde das Mittel der Überexpression von *CDC14* gewählt und die Auswirkungen erhöhter Cdc14-Mengen auf die APC-Substrate Clb3, Clb5, Pds1 und Cdc5 untersucht. Durch die Untersuchung von *HCT1*-Deletionsstämmen nach Behandlung mit Cdc14 sollte der Mechanismus der Cdc14-vermittelten APC-abhängigen Degradation von Proteinen geklärt werden.

7.4.1. Cdc5 wird nach Überexpression von *CDC14* degradiert

Die Kinase Cdc5 gehört zur weitverbreiteten Familie der Polo-Kinasen. Cdc5 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Mitose und ist ein Mitglied des MEN. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Familie besitzt Cdc5 im N-terminalen Teil eine destruction box (vgl. 3.4.6). Cdc5 ist demnach ein instabiles Protein, das am Ende der Mitose APC^{Hct1} vermittelt degradiert wird. Es sollte untersucht werden, ob Cdc14 eine Rolle bei der Regulation der Cdc5-Menge spielt. Dazu wurde Cdc14 in nocodazolbehandelten Zellen überproduziert und die Cdc5-Mengen wurden im Western Blot verfolgt. Im Nocodazolarrest ist Cdc5 ein stabiles Protein, da der APC^{Hct1} unter diesen Bedingungen inaktiv ist. Wie Abbildung 7 zeigt führt die Überexpression von *CDC14* zur Degradation von Cdc5 unter Bedingungen, unter denen dieses Protein normalerweise stabil ist. Dies zeigt der Vergleich mit dem Kontrollstamm. In diesem ändert sich die Cdc5-Menge nach Zugabe von Galaktose nicht. Die Phosphatase Cdc14 ist demnach fähig, die Menge an Cdc5 negativ zu beeinflussen, indem sie die APC^{Hct1}-abhängige

Degradation der Polokinase induziert.

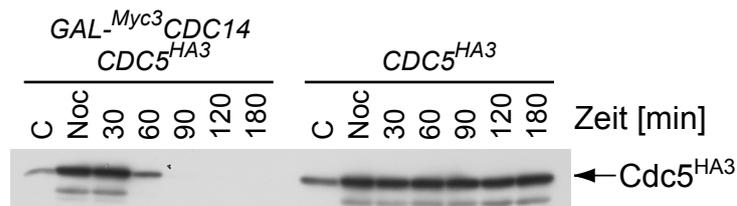


Abbildung 7

Cdc14 kann die Degradation von Cdc5 induzieren. Um die Auswirkung der Überexpression von *CDC14* auf Cdc5 zu untersuchen, wurden nocodazolbehandelte Zellen des Stammes W1535 (*ura3::pGAL1-Myc3 CDC14::URA3 CDC5^{HA3}::URA3*) mit Galaktose induziert um die Expression von *CDC14* zu induzieren. Zellen des Stammes K6213 (*CDC5^{HA3}::URA3*) ohne *CDC14*-Überexpressionskonstrukt dienten als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot wurde die Menge an Cdc5 untersucht.

7.4.2. Cdc14 kann die Degradation von Pds1 einleiten

Der Anaphaseinhibitor Pds1 ist beteiligt an der zeitlich geordneten Trennung der Schwesterchromatiden (Übersicht in Murray 1999). Zu Beginn der Anaphase wird Pds1 APC-abhängig abgebaut. Dies führt zur Aktivierung der Separase Esp1, die ihrerseits das Kohäsionprotein Scc1 spaltet (Uhlmann et al. 2000). Scc1 ist ein Protein, das ursächlich am Zusammenhalt der Schwesterchromatiden beteiligt ist. Die Spaltung von Scc1 bewirkt den Verlust der Schwesterchromatidkohäsion. Die Degradation von Pds1 ist vom APC-Spezifikationsfaktor Cdc20 abhängig. So bewirkt die Überexpression von *CDC20* aber nicht die von *HCT1* die Proteolyse des Anaphaseinhibitors (Schulze Lutum 1999).

Der Einfluss der Überexpression von *CDC14* auf die Stabilität von Pds1 sollte untersucht werden. Abbildung 8A zeigt, dass Pds1 nach Überexpression von *CDC14* sowohl in asynchronen als auch in nocodazolarretierten Zellen im Gegensatz zum Vergleichsstamm degradiert wird. Weiterhin lässt sich beobachten, dass Pds1 in diesen Experimenten Cdc14-abhängig demodifiziert – wahrscheinlich dephosphoryliert - wird. Die langsamerlaufende Pds1-Bande repräsentiert eine durch zyklinabhängige Kinase hervorgerufene Phosphorylierung von Pds1. Es wurde nicht untersucht, ob Cdc14 die direkte Phosphatase für Pds1 ist, oder ob die beobachtete Demodifikation von Pds1 nur ein indirekter Nebeneffekt der hohen Cdc14 Menge ist.

Da Cdc14 die Hct1-abhängige Degradation von APC-Substraten einleiten kann, wurde die Cdc14-induzierte Pds1-Degradation in einem *hct1*-Deletionsstamm untersucht. Abbildung 8B zeigt, dass Pds1 nach Deletion von *HCT1* unter Bedingungen hoher Cdc14-Aktivität vollständig stabilisiert ist. Die oben beobachtete Demodifikation von Pds1 kann weiterhin beobachtet werden. Die Stabilisierung von Pds1 im *hct1*-Deletionsstamm ist insofern bemerkenswert, da Pds1 ein Cdc20, aber kein Hct1-Substrat ist. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass Cdc14 nicht nur Hct1, sondern auch Cdc20 aktivieren kann. Dazu müsste aber ein Cdc20-Inhibitor postuliert werden, der nach Aktivierung von Cdc14 Hct1-abhängig degradiert würde. Ansonsten könnte die Deletion von *HCT1* nicht zur beobachteten Inhibition der Cdc14-

induzierten Pds1-Degradation führen.

Eine andere Erklärung wäre, dass Cdc14 in der Lage ist Hct1 oder die Substrate auf eine neue Art zu verändern. Hct1 würde dann auch die sogenannten Cdc20-Substrate erkennen und der Degradation zuführen können.

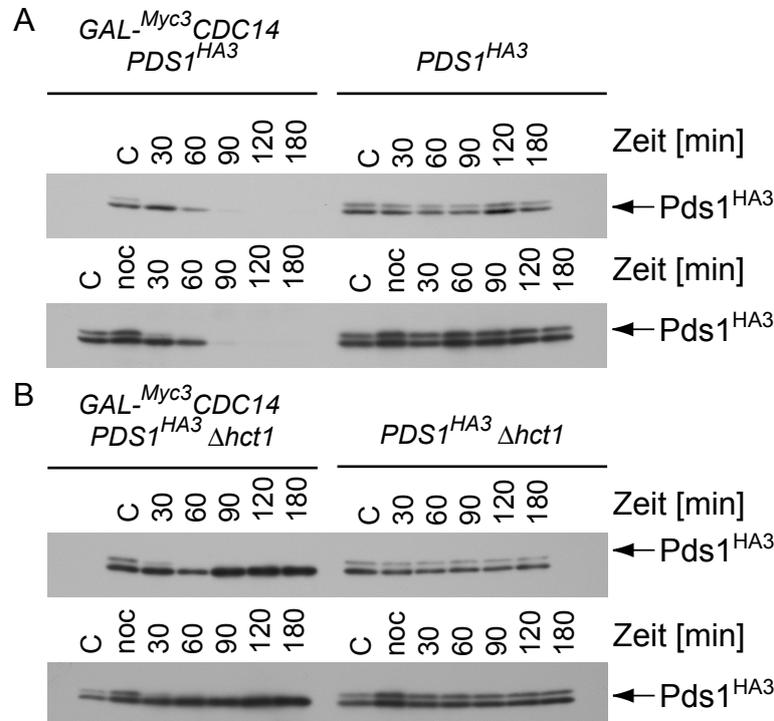


Abbildung 8

(A) Cdc14 aktiviert die Degradation von Pds1. Um die Wirkung der Überexpression von *CDC14* auf Pds1 zu untersuchen wurden Zellen des Stammes W950 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC14-URA3 PDS1^{HA3}*) mit Galaktose behandelt. Die Behandlung von Stamm OCF1522 (*PDS1^{HA3}*) mit Galaktose diente als Kontrolle. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Pds1 Menge wurde mittels Western Blot verfolgt. Die obere Teilabbildung zeigt das Experiment in asynchronen Zellen. Die untere Teilabbildung zeigt das Experiment in nocodazolarretierten Zellen (B) Cdc14 induzierte Pds1 Degradation ist von Hct1 abhängig. Um zu untersuchen, ob Hct1 an der Cdc14-induzierten Pds1 Degradation beteiligt ist, wurde Stamm W1512 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC14-URA3 PDS1^{HA3}-URA3 hct1-Δ1::LEU2*) mit Galaktose behandelt. Stamm W862 (*hct1-Δ1::LEU2 PDS1^{HA3}-URA3*) diente als Kontrolle. Dieses Experiment wurde in asynchronen Zellen (Teilabbildung A und B jeweils oben) bzw. nocodazolarretierten Zellen (Teilabbildung A und B jeweils unten) durchgeführt.

7.4.3. Überproduktion von Cdc14 beeinflusst die Menge an Clb5

Das B-Typ Zyklone Clb5 und Clb6 sind zusammen an der Regulation der S-Phase beteiligt (Morgan 1997). Clb5 wird schon in der G1-Phase gebildet. Während dieser Phase wird es durch den Inhibitor zyklinabhängiger Kinase Sic1 inaktiv gehalten. Nach Überschreiten des START Punktes wird Sic1 durch die Wirkung der Cln-Cdc28 Komplexe phosphoryliert und anschließend SCF-abhängig degradiert. Dies führt zu einer Aktivierung der schon vorhandenen Clb5-CDK Komplexe. Diese Kinase ist für den Beginn der S-Phase und den Wechsel von anisotropen zum isotropen Wachstum der Knospe verantwortlich. Clb5 ist ebenso wie die

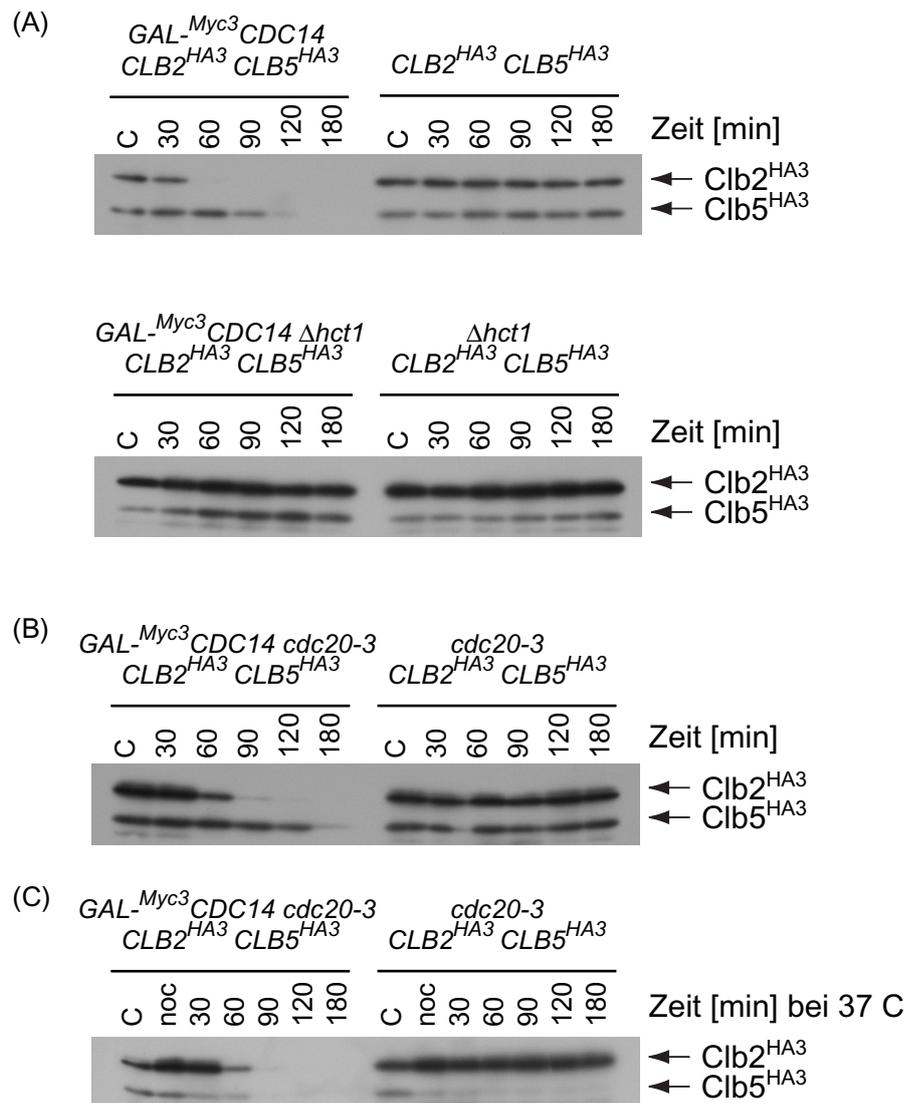


Abbildung 9

Hohe Mengen an Cdc14 leiten die Degradation des Zyklins Clb5 ein. (A) Die Cdc14-induzierte Degradation von Clb5 ist abhängig von Hct1. Wachsende Zellen der Stämme W784 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC14-URA3 CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2*), W389 (*CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2*), W1520 (*ura3::pGAL1-Myc3 CDC14-URA3 CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2 hct1-Δ::LEU2*) und W1524 (*URA3 CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2 hct1-Δ::LEU2*) wurden mit Galaktose behandelt. Dies führte zur Expression von *CDC14* in den Stämmen W784 und W1520. Die Galaktosebehandlung der Stämme W389 und W1524 diente als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot (12CA5) wurden die Mengen an Clb5^{HA3} und Clb2^{HA3} untersucht. (B) Cdc14 bewirkt eine teilweise Cdc20-unabhängige Degradation von Clb5. Zellen der Stämme W1521 (*ura3::pGAL1-Myc3 CDC14-URA3 CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2 cdc20-3*) und W1525 (*CLB2^{HA3} CLB5^{HA3}-LEU2 cdc20-3*) wurden bei Raumtemperatur mit Galaktose behandelt. Dies führte zur Produktion von Cdc14 in W1521. In einem weiteren Experiment wurden die Zellen der Stämme W1521 und W1525 nach Arretierung mit Nocodazol vor der Behandlung mit Galaktose zu 37°C gebracht. Clb5^{HA3}- und Clb2^{HA3}-Mengen wurden wie in A analysiert.

anderen Zyklone ein instabiles Protein. Clb5 wird durch den APC^{Cdc20} erkannt und anschließend durch das Proteasom degradiert. Clb5 scheint ausschließlich ein Cdc20-Substrat zu sein. So führt die Überexpression von *CDC20*, aber nicht die von *HCT1* zur vorzeitigen Degradation

von Clb5 (Schulze Lutum 1999).

Die Wirkung erhöhter Mengen an Cdc14 auf die Stabilität des Zyklins Clb5 sollte nun untersucht werden. Dazu wurde Cdc14 in Stämmen überproduziert, die epitopmarkiertes Clb2 und Clb5 trugen. Zusätzlich war in diesen Stämme *HCT1* bzw. *CDC20* mutiert. Als Kontrolle dienten Stämme, die nach Behandlung mit Galaktose kein Cdc14 überproduzierten. Wie Abbildung 9A zeigt, wird Clb2 wie erwartet unter Bedingungen hoher Cdc14 Menge rasch degradiert. Auch die Menge an Clb5 nimmt ab. Diese Abnahme ist langsamer als im Fall von Clb2. Der Kontrollstamm zeigt, dass beide Zykline in asynchronen Zellen immer nachweisbar sind. Die Deletion von *HCT1* führt zur Stabilisierung von Clb2, d.h. Clb2 wird nach Cdc14 Überproduktion nicht mehr degradiert. Überraschenderweise gilt dies auch für das Zyklin Clb5. Im Gegensatz zum Wildtypstamm wird Clb5 in einer *hct1* Mutante nach Überexpression von Cdc14 nicht mehr degradiert.

Die Mutation von *CDC20* (*cdc20-3*) führt dagegen bei Raumtemperatur nicht zu einer vollständigen Stabilisierung von Clb5 (s. Abbildung 9B). Clb5 wird aber mit einer etwas verlangsamten Kinetik nach Überexpression von *CDC14* degradiert. Um die Cdc14 induzierte Clb5 Degradation in einer *cdc20-3* Mutante weiter zu untersuchen, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Zellen eines *cdc20-3* Stammes wurden nach Behandlung mit Nocodazol bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Galaktose wurde die Expression von *CDC14* induziert. Als Kontrolle diente ein *cdc20-3* Stamm ohne *CDC14* Überexpressionskonstrukt. Abbildung 9C zeigt, dass Clb5 im Gegensatz zu Clb2 nach Behandlung mit Nocodazol nicht akkumuliert. Zu diesem Zeitpunkt hat die Degradation von Clb5 nämlich schon begonnen und Clb5 ist nur noch schwach nachzuweisen. Die Expression von *CDC14* führt zur vollständigen Degradation von Clb5 unter diesen Bedingungen. Neunzig Minuten nach Induktion mit Galaktose sind weder Clb2 noch Clb5 nachweisbar. Der Kontrollstamm zeigt, dass Clb5 ohne Cdc14-Überproduktion unter diesen Bedingungen durchaus stabil und nachweisbar bleibt. Die Mutation von Cdc20 scheint in den beiden beschriebenen Experimenten keinen vollständig stabilisierenden Einfluss auf Clb5 auszuüben. Dagegen reicht die Deletion von Hct1 aus, damit neben Clb2 auch Clb5 stabil ist und nicht mehr Cdc14-abhängig degradiert werden kann. Wie schon im Fall von Pds1 scheint Cdc14 eine Hct1-abhängige Degradation von Cdc20-Substraten auslösen zu können. Der genaue Mechanismus bleibt unklar, aber es zeigt sich, dass Hct1 unter bestimmten Bedingungen die Aufgaben von Cdc20 übernehmen kann. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtungen bleibt aber im Dunkeln und bedarf weiterer Untersuchungen.

7.4.4. Cdc14 Überproduktion beeinflusst die Stabilität des Zyklins Clb3

Das Zyklin Clb3 spielt neben Clb2 eine wichtige Rolle am Ende der Mitose. Clb3 wird im Gegensatz von Clb2 nicht nur von APC^{Hct1}, sondern auch von APC^{Cdc20} erkannt und anschließend vom Proteasom degradiert (Schulze Lutum 1999). Es sollte überprüft werden, ob die Überexpression von *CDC14* auch die Menge des Zyklins Clb3 beeinflussen kann. Dazu

wurde *CDC14* in Stämmen überexprimiert, die epitopmarkiertes Clb3^{HA3} produzierten. Die Experimente wurden mit Stämmen durchgeführt, die zusätzlich eine Deletion von *HCT1* bzw. die Mutation *cdc20-3* trugen. Als Kontrolle dienten entsprechende Stämme, die *CDC14* nur vom eigenen Promotor aus exprimierten. Wie Abbildung 10 zeigt, wird Clb3 nach Überproduktion von Cdc14 rasch degradiert. Weiterhin ist die Degradation von Clb3 Hct1-abhängig. Die

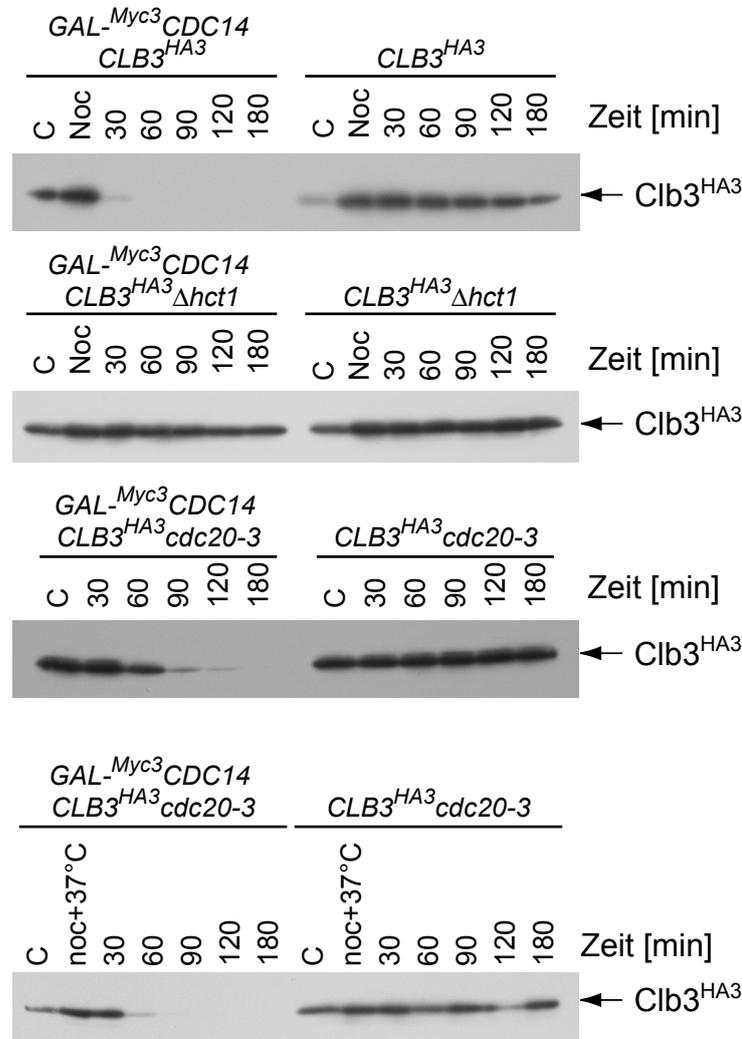


Abbildung 10

Hohe Mengen an Cdc14 führen zur Degradation des Zyklins Clb3. Zur Untersuchung der Auswirkung hoher Cdc14-Mengen auf Clb3 wurden Zellen der Stämme W1294 (*GAL1-Myc3 CDC14-URA3 CLB3^{HA3}-HIS3*) und W491 (*CLB3^{HA3}-HIS3*) mit Nocodazol behandelt und anschließend zur Expression von *CDC14* mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot (12CA5) wurde Clb3^{HA3} nachgewiesen. Um die Hct1-Abhängigkeit der Cdc14-induzierten Clb3 Degradation zu untersuchen, wurden Zellen der Stämme W1528 (*ura3::pGAL1-Myc3 CDC14::URA3 CLB3^{HA3}::HIS3 hct1-Δ::LEU2*) und W1532 (*CLB3^{HA3}::HIS3 hct1-Δ::LEU2*) nach Nocodazolbehandlung mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitwerten wurden Proben entnommen und die Clb3^{HA3}-Menge wurde mittels Western Blot analysiert. Zur Untersuchung der Cdc20-Abhängigkeit der Cdc14-induzierten Clb3 Degradation wurden Zellen der Stämme W1529 (*ura3::pGAL1-Myc3 CDC14::URA3 CLB3^{HA3}::HIS3 cdc20-3*) und W1533 (*CLB3^{HA3}::HIS3 cdc20-3*) asynchron bzw. nach Behandlung mit Nocodazol und Inkubation bei 37°C mit Galaktose induziert. Proben zur Western Blot Analyse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen.

Deletion von *HCT1* verhindert die Cdc14-induzierte Clb3-Abnahme. Nach Aktivierung durch Cdc14 scheint Hct1 in der Lage zu sein, die Degradation von Clb3 zu vermitteln. Die Deletion von Hct1 führt zu einer vollständigen Stabilisierung von Clb3. Das Bild für die Cdc14-induzierte Clb3-Degradation im *cdc20-3* Hintergrund ist nicht einheitlich. In asynchronen *cdc20-3* Zellen verursacht die Überexpression von Cdc14 eine langsamere Degradation von Clb3 als in einem vergleichbaren Wildtypstamm. Wird dagegen Cdc14 in Zellen des gleichen Stamm überproduziert, die durch Behandlung mit Nocodazol arretiert wurden und vor Induktion mit Galaktose für dreißig Minuten bei restriktiver Temperatur inkubiert wurden, kann man eine dem Wildtyp vergleichbar rasche Clb3 Degradation beobachten. Diese beiden Experimente zeigen, dass Cdc14 in der Lage ist, die Degradation von Clb3 unabhängig von Cdc20 zu induzieren. Ein funktionelles Hct1 dagegen ist nötig, damit Cdc14 die Degradation von Clb3 einleiten kann.

7.4.5. Cdc14 ist eine in vitro Phosphatase für Hct1

APC-Aktivität ist auf Ebene seiner Spezifitätsfaktoren reguliert. So wird die Bindung von Hct1 an den APC durch Cdc28-abhängige Phosphorylierung verhindert (Zachariae et al. 1998b). Nur unphosphoryliertes Hct1 ist in der Lage, Substrate an den APC zu bringen und sie so der Degradation zuzuführen. Die Überexpression von *CDC14* leitet die Degradation vieler Substrate von APC^{Hct1} wie z.B. Clb2 und Cdc5 ein. Diese Cdc14-induzierte Degradation kann durch die Deletion des APC-Spezifitätsfaktor Hct1 blockiert werden. Somit könnte die beobachtete Cdc14-induzierte Hct1-abhängige Degradation durch eine Dephosphorylierung und damit Aktivierung von Hct1 durch Cdc14 erklärt werden. Um diese Frage zu klären, wurde ^{HA3}Hct1 unter Kontrolle des Galaktosepromotors produziert und durch Immunopräzipitation gereinigt. Dieses Präzipitat wurde mit Alkalischer Phosphatase, heterolog produziertem ^{MBP}Cdc14 bzw. inaktivem ^{MBP}Cdc14C283A behandelt (Grandin et al. 1998). Die Kontrollreaktionen enthielten nur den entsprechenden Reaktionspuffer. Abbildung 11 zeigt, dass die Behandlung von Hct1 mit Alkalischer Phosphatase zu einem vollständigen Verlust der langsamer laufenden Proteinspezies führt. Dies bestätigt noch einmal, dass Hct1 ein Phosphoprotein ist (Zachariae et al. 1998b). Die Behandlung des Hct1-Präzipitats mit aktivem ^{MBP}Cdc14 resultierte ebenfalls in einer Dephosphorylierung von Hct1. Die Dephosphorylierung von Hct1 in diesem Ansatz war aber nicht vollständig. Wurde das Präzipitat hingegen mit inaktivem Cdc14C289A oder mit Puffer inkubiert, blieb die Phosphorylierung von Hct1 erhalten. Dies zeigt, dass Cdc14 – wenn hier auch nur unvollständig - in der Lage ist, Hct1 in vitro zu dephosphorylieren. Die Cdc14-induzierte Aktivierung des APC lässt sich durch eine Cdc14-vermittelte Dephosphorylierung von Hct1 erklären. Diese Interpretation wird auch durch Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen gestützt (Visintin et al. 1998).

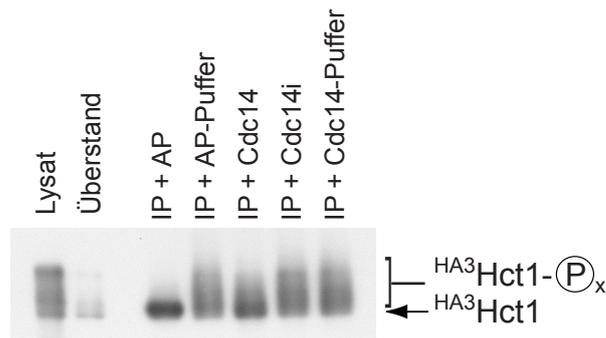


Abbildung 11

Cdc14 kann Hct1 in vitro dephosphorylieren. HA3 Hct1 wurde durch Immunopräzipitation aus Stamm W390 (*ura3::GAL1- HA3 HCT1-URA3*) gereinigt. Das Präzipitat wurde mit MBP-Cdc14 für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Behandlung des Präzipitats (IP) mit Alkalischer Phosphatase (AP), mit inaktivem Cdc14 (Cdc14i) und mit den entsprechenden Puffern diente als Kontrolle. Der Phosphorylierungsstatus von HA3 Hct1 wurde durch Western Blot nachgewiesen. Die Spur Lysat zeigt HA3 Hct1 vor der Präzipitation. Die Spur Überstand zeigt das Lysat nach der Präzipitation.

7.5. Cdc14 initiiert ein Transkriptionsprogramm

Der Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen Sic1 wird auf zweifache Weise reguliert. Zum einen wird Sic1 durch zyklinabhängige Kinasen phosphoryliert und dadurch destabilisiert (Übersicht in Deshaies & Ferrel 2001). Phospho-Sic1 ist ein Substrat für die SCF^{Cdc4} vermittelte Degradation. Die Dephosphorylierung bzw. die Verhinderung der Phosphorylierung von Sic1 führt folglich zu einer Stabilisierung von Sic1. Zum anderen ist die Transkription von Sic1 reguliert. Sie hängt vom Transkriptionsfaktor Swi5 ab (McBride et al. 1999). Swi5 ist ebenfalls ein Substrat für die zyklinabhängige Kinase. Phospho-Swi5 wird im Zytoplasma zurückgehalten und kann in Folge dessen die Transkription seiner Zielgene nicht anschalten (Nasmyth et al. 1990, Moll et al. 1991). Es ist bekannt, dass die Überexpression von *CDC14* einen Sic1-Anstieg verursacht. Nun sollte untersucht werden, ob diese Sic1-Akkumulation aufgrund einer posttranslationalen und/oder einer transkriptionellen Regulation zustande kommt. Dazu wurde das *SIC1* Gen unter die Kontrolle des konstitutiven *TEF2*-Promotors gebracht. Dies hatte zur Folge, dass *SIC1* konstitutiv transkribiert wurde. In einem solchen Stamm wurden die Wirkung der Überexpression von *CDC14* auf Sic1-Mengen untersucht. Ein dem Wildtyp vergleichbares Verhalten würde auf eine posttranslationale Regulation von Sic1 durch Cdc14 hindeuten.

Abbildung 12 zeigt, dass die Menge an Sic1 zu einem großen Anteil über die Instabilität des Proteins reguliert wird. Die Behandlung mit Nocodazol arretiert die Zellen in einem Zustand mit hoher CDK Aktivität. Wie der Vergleichsstamm (W1146) zeigt, ist in diesem Arrest Sic1 nicht nachweisbar. Der Stamm mit transkriptionell dereguliertem Sic1 zeigt unter diesen Bedingungen eine starke Verminderung der Menge an Sic1. Offensichtlich wird aber so viel Sic1 gebildet, dass Sic1 nicht vollständig instabil gehalten werden kann. Die Überexpression von *CDC14* bewirkt in beiden Fällen einen starken Anstieg der Sic1 Menge. Da im Stamm W1145 die transkriptionelle Regulation von Sic1 ausgeschaltet ist, stabilisiert Cdc14 demnach

Sic1 posttranslational. Wie andere Gruppen gezeigt haben, ist Cdc14 eine direkte Phosphatase für Sic1 und bewirkt durch die Dephosphorylierung von Sic1 dessen Stabilisierung (Visintin et al. 1998).

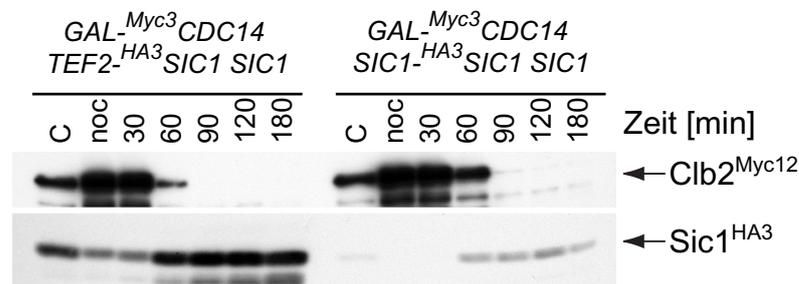


Abbildung 12 Cdc14 reguliert Sic1 posttranskriptionell. Die Wirkung der Überexpression von *CDC14* auf transkriptionell dereguliertes Sic1 wurde untersucht. Dazu wurden Zellen der Stämme W1145 (*ura3::GAL1-CDC14-URA3, CLB2^{Myc12} leu2::TEF2^{-HA3}SIC1-LEU2*) und W1146 (*ura3::GAL1-CDC14-URA3 CLB2^{Myc12} leu2::SIC1^{-HA3}SIC1-LEU2*) durch Behandlung mit Nocodazol arretiert. Durch Zugabe von Galaktose wurde *CDC14* im Stamm W1145 induziert. Die Behandlung von Stamm W1145 mit Galaktose diente als Kontrolle. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Mengen von Clb2^{Myc12} und ^{HA3}Sic1 wurden mittels Western Blot analysiert.

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob Cdc14 neben der posttranslationalen Aktivierung von Sic1 zusätzlich dessen Transkription positiv beeinflussen kann. Dazu wurden die *SIC1*-mRNA Mengen nach Überexpression von *CDC14* mittels Northern Blot Analyse untersucht. Abbildung 13A beschreibt folgendes Experiment: Das *SIC1* Gen wurde unter Kontrolle des konstitutiven Promotors *TEF2* bzw. unter der Kontrolle seines eigenen Promotors exprimiert. Vor Induktion mit Galaktose wurden die Zellen durch Behandlung mit Nocodazol arretiert. Man erkennt, dass das *SIC1*-Transkript im Nocodazol-arrest nicht nachweisbar ist, wenn *SIC1* unter Kontrolle des eigenen Promotors steht. Im Fall der konstitutiven Expression von Sic1 erkennt man nur eine leichte Abnahme in mit Nocodazol behandelten Zellen. Dies könnte daran liegen, dass in diesem Stamm auch noch *SIC1* unter Kontrolle des eigenen Promotors vorhanden war. Dessen Anteil am gesamten *SIC1*-Transkript wurde durch die Behandlung mit Nocodazol vermindert. Durch Zugabe von Galaktose wurde die Expression von *CDC14* induziert. Im Fall von *SIC1* unter Kontrolle seines eigenen Promotors erkennt man, dass es zu einem starken Anstieg des *SIC1*-Transkripts kommt. Im Fall des konstitutiv exprimierten *SIC1* fällt der Anstieg an Transkript nur schwach aus und ist wohl auf das in diesem Stamm noch vorhandene Sic1 unter Kontrolle des eigenen Promotors zurückzuführen. Um den Wirkmechanismus des beobachteten Cdc14-abhängigen Anstiegs an *SIC1*-Transkript näher zu charakterisieren, wurde der Anstieg von *SIC1* mRNA in einer APC defizienten Mutante untersucht. Die Mutation des APC verhindert den Cdc14-induzierten Zyklinabbau. Somit wäre ein beobachteter Anstieg von *SIC1* Transkript nicht als ein indirekter Effekt des Abschaltens der zyklinabhängigen Kinase, sondern als ein direktes Beeinflussen der Transkription von *SIC1* durch Cdc14 zu werten. Abbildung 13B zeigt, dass wie im Vergleichsstamm die Menge an

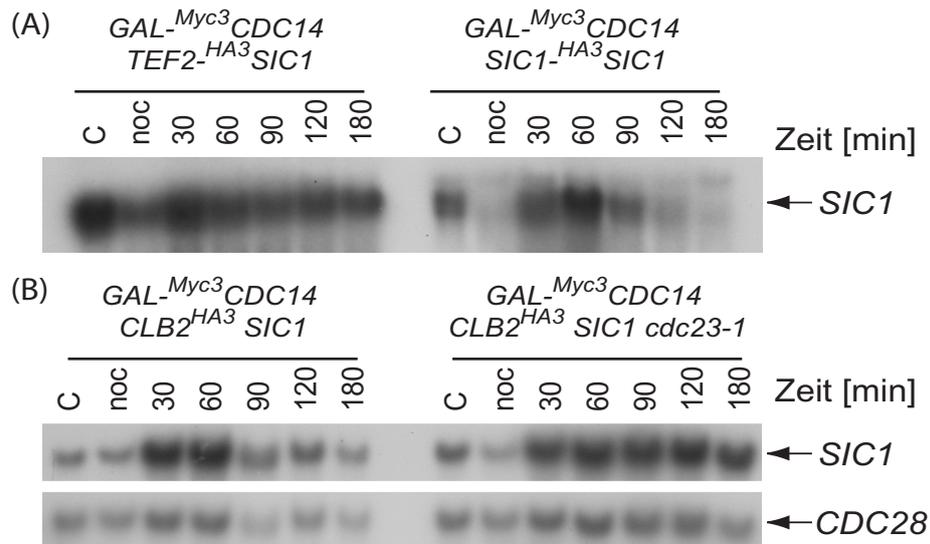


Abbildung 13

Cdc14 stimuliert die Transkription von *SIC1*. (A) Hohe Mengen an *Cdc14* beeinflussen positiv die Transkription von *SIC1*. Zellen der Stämme W1145 (*ura3::GAL1-CDC14-URA3, CLB2^{Myc12} leu2::TEF2-HA3 SIC1-LEU2*) und W1146 (*ura3::GAL1-CDC14-URA3 CLB2^{Myc12} leu2::SIC1-HA3 SIC1-LEU2*) wurden nach Behandlung mit Nocodazol durch Zugabe von Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die gesamte RNA wurde isoliert. Nach einem Formaldehydgel und Blot auf Nitrocellulose wurde die *SIC1* mRNA mittels einer ³²P-markierten Sonde gegen *SIC1* nachgewiesen. (B) *Cdc14* stimuliert die Transkription unabhängig vom Abschalten der zyklinabhängigen Kinase. Die Produktion von *Cdc14* wurde in Zellen der Stämme W702 (*ura3::GAL1-MYC3 CDC14::URA3 CLB2^{HA3}*) und W783 (*ura3::GAL1^{Myc3} CDC14-URA3 cdc23-1 CLB2*) wurden nach Behandlung mit Nocodazol durch Zugabe von Galaktose induziert. Für die Gewinnung der RNA wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Der Nachweis der *SIC1* mRNA erfolgte wie in A. Zur Kontrolle der korrekten Beladung wurde mittels einer ³²P markierten Sonde die Menge des konstitutiven Transkripts von *CDC28* nachgewiesen.

SIC1-mRNA nach Überexpression von *CDC14* im *cdc23-1* Hintergrund deutlich zunimmt. Dies zeigt, dass *Cdc14* in der Lage ist, direkt die Transkription von *SIC1* zu stimulieren. Literaturdaten belegen, dass *Cdc14* den Transkriptionsfaktor für Sic1 Swi5 dephosphoryliert und damit aktiviert (Visintin et al. 1998). Die gemachte Beobachtung der zweifachen - transkriptionellen und posttranslationalen - Aktivierung von Sic1 durch *Cdc14* deckt sich mit den genannten Literaturdaten. *Cdc14* ist eine direkte Phosphatase für Sic1 selbst und auch für den Transkriptionsfaktor von Sic1 Swi5.

Die folgenden Daten entstammen einer Zusammenarbeit mit Kurt Fellenberg, Nicole Hauser, Benedikt Brors, Jörg Hoheisel und Martin Vingron (Fellenberg et al. 2001). *Cdc14* gilt als Aktivator des Transkriptionsfaktors Swi5. Swi5 ist phosphoryliert und lokalisiert in dieser Form im Zytoplasma. Wird Swi5 von *Cdc14* dephosphoryliert, dann kann es in den Kern gelangen und die Transkription von Sic1 anschalten. Um zu untersuchen, ob auch noch andere Gene nach Überexpression von *CDC14* in ihrem Transkriptionsstatus beeinflusst werden, wurde versucht ein Transkriptionsprofil nach Überexpression von *CDC14* zu erstellen. Dazu wurde ein DNA-

Mikroarray benutzt, das das ganze Hefegenom repräsentiert. Die Analyse wurde im Labor von Jörg Hoheisel am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg durchgeführt. DNA-Microarrays sind ein Werkzeug, um gleichzeitig die Transkriptmenge aller bekannten Hefegene in einem Experiment zu bestimmen. Dazu wurden alle bekannten offenen Leseraster (open reading frames - ORFs) der Hefe mittels PCR amplifiziert und in einer geordneten Weise auf einen Träger aufgebracht. Aus den zu untersuchenden Proben wurde die mRNA isoliert und über reverse Transkription in Gegenwart von radioaktiv markierten Nukleotiden in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde mit dem DNA-Array hybridisiert. Die Stärke des jeweiligen Hybridisierungssignals wurde gemessen und diente als Maß für die Transkription eines Genes. Die Daten aus vier Markierungen und Hybridisierungen wurden gemittelt und mit Hilfe von Computerprogrammen ausgewertet.

Im vorliegenden Fall wurden folgende Proben analysiert: Zellen eines Stammes der *CDC14* unter Kontrolle des *GALI*-Promotors exprimiert und ein Wildtypstamm ohne dieses Überexpressionskonstrukt. Die Zellen wurden mit Nocodazol behandelt. Nach Erreichen des Arrestpunktes wurde ein Teil der Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert und in Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff getropft und die entstehenden Zellkugeln auf Trockeneis gelagert. Anschließend wurden die Zellen mit 2% Galaktose für eine Stunde induziert und ebenfalls wie oben beschrieben geerntet. Die Analyse ergab, dass hohe Cdc14-Mengen zur transkriptionellen Aktivierung von *SIC1* führen. Weiterhin wurde auch *CTS1* von Cdc14 aktiviert. *CTS1* ist eine Endochitinase, die eine Rolle bei der Zellseparation nach der Zytokinese spielt (Kuranda et al. 1991). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass durch die Aktivierung von Cdc14 nicht nur die zyklinabhängige Kinase negativ beeinflusst wird, sondern dass auch nachfolgende Schritte wie Zytokinese reguliert werden. Weitere Gene wurden gefunden, die nach Überexpression von *CDC14* aktiviert worden sind. *RME1* ist ein negativer Regulator der Meiose. Crh1 ist ein Protein, das an der Bildung der Zellwand beteiligt ist. Über *PST1* sind keine näheren Informationen erhältlich. Außerdem wurden noch folgende Gene gefunden, über die keine näheren Informationen verfügbar sind: *YBR071W*, *PIR1*, *YGR086C*, *YLR194C* und *YFL006W*. Für diese Gene wurde aber schon früher gezeigt (Spellman et al. 1998), dass sie am M/G1-Übergang transkribiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cdc14 durch die Aktivierung von Swi5 nicht nur Sic1 beeinflusst, sondern auch ein ganzes Set an Genen aktiviert. Cdc14 ist demnach an der transkriptionellen Regulation beim Austritt aus der Mitose bzw. bei der Zytokinese beteiligt.

7.6. Cdc14 und Cdc15

Diese Daten entstammen einer Zusammenarbeit mit Ruth Menssen (Menssen et al. 2001). Die Kinase Cdc15 ist ebenso wie Cdc14 Bestandteil des MEN und ist beteiligt am Abschalten der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose. Zellen die eine *cdc15-2* Mutation tragen, arretieren bei restriktiver Temperatur als Zellen mit großer Knospe, elongierter Spindel, hoher Clb-Kinaseaktivität und lokalisiertem Cdc14 (Vistintin et al. 1999). Dies zeigt, dass Cdc15 an der Aktivierung von Cdc14 beteiligt ist.

Im Gegenzug ist aktiviertes Cdc14 in der Lage, seinerseits Cdc15 zu regulieren. Cdc15 ist ein Phosphoprotein, dessen Phosphorylierungsstatus sich im Laufe des Zellteilungszyklus ändert. Während der meisten Zeit des Teilungszyklus ist Cdc15 phosphoryliert, am Ende der Mitose nach der Freisetzung von Cdc14 kommt es zu einer Dephosphorylierung von Cdc15 (Menssen et al 2001). Wie gezeigt werden konnte, ist Cdc14 sowohl in vitro als auch in vivo eine Phosphatase für Cdc15. Die beobachtete Dephosphorylierung von Cdc15 im Teilungszyklus wird demnach von aktiviertem Cdc14 hervorgerufen.

Weiterhin zeigt Cdc15 ein interessantes Lokalisierungsmuster. Es lokalisiert die meiste Zeit des Teilungszyklus am alten Spindelpol. Erst in der Telophase ändert sich die Lokalisation von Cdc15. Es ist dann an beiden Spindelpolen zu finden. Der Phosphorylierungsstatus von Cdc15 bestimmt dessen Lokalisierung am Tochterspindelpol. So verhindern hohe Mengen an stabilem Clb2 Δ db – und damit hohe Clb2-Kinaseaktivität - die Lokalisierung von Cdc15 am zweiten Spindelpol. Ein mutiertes Cdc15 ohne CDK-Erkennungsstellen zeigt dagegen unter diesen Bedingungen die Lokalisierung am Spindelpol in der Tochterzelle. Um den genauen Zeitpunkt der Tochterspindelpollokalisierung von Cdc15 in Bezug auf die Freisetzung und Aktivierung von Cdc14 zu bestimmen, wurde die SPB Lokalisation von Cdc15^{GFP}, Cdc14^{Myc9}

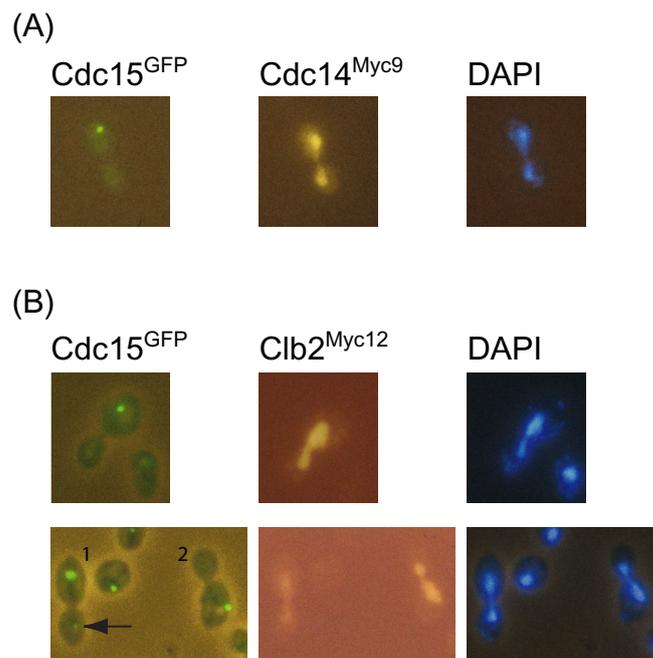


Abbildung 14

Der Austritt aus der Mitose beginnt vor der Lokalisierung von Cdc15 am zweiten Spindelpol. (A) Cdc14 wird vor der Relokalisierung von Cdc15 aus dem Nucleolus freigesetzt. Durch Elutriation wurden G1-Zellen von Stamm W2063 (*cdc14::CDC14^{Myc9}-URA3 leu2::TEF2-GFP CDC15-LEU2*) gewonnen. Die Zellen wurden in den Zellzyklus entlassen. Der Nachweis von Cdc14^{Myc9} erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe von 9E10 (anti-Myc) und anti-Maus Alexa 546 Antikörpern. Cdc15^{GFP} wurde durch Anregung der GFP-Markierung mit Licht der Wellenlänge 545 nm nachgewiesen. (B) Cdc15 lokalisiert nach Beginn der Zyklindegradation am zweiten Spindelpol. Durch Elutriation wurden G1-Zellen von Stamm W2062 (*CLB2^{Myc12}-HIS3 leu2::TEF2-GFP CDC15-LEU2*) gewonnen. Der Nachweis von Clb2^{Myc9} und Cdc15^{GFP} erfolgte wie in A beschrieben. Der Pfeil zeigt auf den Spindelpol in der Tochterzelle an dem Cdc15 beginnt zu lokalisieren. In dieser Zelle ist die Degradation von Clb2 im Gange.

und Clb2^{Myc12} untersucht. Die Freisetzung von Cdc14 wurde als Aktivierung gewertet. Abbildung 14A zeigt, dass die Freisetzung von Cdc14 vor der Lokalisation von Cdc15 am zweiten Spindelpolkörper stattfindet. Die Lokalisierung von Cdc15 am Spindelpol in der Tochterzelle ist demnach keine Voraussetzung für die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus. Sie findet vielmehr nach der Aktivierung von Cdc14 statt.

Der Nachweis von Clb2 konnte Aufschluss über den Beginn des Austritts aus der Mitose geben. Der Austritt aus der Mitose fällt zusammen mit der Degradation von Clb2. Abbildung 14B zeigt, dass die Lokalisierung von Cdc15 am Tochterspindelpol nach der Freisetzung von Cdc14 und dem Beginn des Clb2-Abbaus stattfindet. Cdc14 ist in Zellen, die eine Lokalisierung von Cdc15 an beiden Spindelpolkörpern zeigen, nicht mehr nur im Nucleolus lokalisiert, sondern ist im ganzen Kern nachweisbar. Weiterhin lässt sich beobachten, dass in Zellen mit Cdc15 an beiden Spindelpolen Clb2 nur noch schwach bis gar nicht mehr nachweisbar ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lokalisation von Cdc15 am zweiten Spindelpol nicht für die Regulation des Austritts aus der Mitose notwendig ist. Vielmehr lässt sich feststellen, dass Cdc15 erst nach der Aktivierung des MEN – gemessen an der Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus – am zweiten Spindelpol lokalisiert. Diese Beobachtung stärkt auch die Vermutung, dass die Dephosphorylierung von Cdc15 durch Cdc14 für die Lokalisierung von Cdc15 am zweiten Spindelpol mit verantwortlich ist. Cdc14 ist in der Lage, die Dephosphorylierung von Cdc15 zu bewirken und die Aktivierung von Cdc14 fällt zeitlich mit der Lokalisierung von Cdc15 am zweiten Spindelpol zusammen.

7.7. Cdc14 und Dbf2

Die Proteinkinase Dbf2 ist wie auch die Phosphatase Cdc14 Bestandteil des Signaltransduktionswegs, der den Austritt aus der Mitose und die Zytokinese reguliert. Die Aktivität von Dbf2 wird über seinen Phosphorylierungsstatus reguliert (Mah et al. 2001). Die MEN-Kinase Cdc15 kann Dbf2 phosphorylieren und in Folge dessen aktivieren.

Es sollte untersucht werden, ob es Hinweise auf eine Regulation von Dbf2 durch Cdc14 gibt. Dazu wurde *CDC14* in einem Stamm überexprimiert, der epitopmarkiertes *DBF2^{HA3}* unter Kontrolle des eigenen Promotors produzierte. Dieses Experiment wurde sowohl mit asynchronen als auch mit nocodazolarretierten Zellen durchgeführt. In beiden Fällen führte die erhöhte Menge von Cdc14 zu einer Demodifikation von Dbf2, die wahrscheinlich einer Dephosphorylierung entspricht (Abbildung 15A). Bei Überexpression von *CDC14* in nocodazolarretierten Zellen zeigte sich, dass sich die Menge an Dbf2 verringerte. Die Untersuchung des Modifikationsstatus von Dbf2 in einer *cdc14-3* Mutante zeigt, dass Dbf2 in dieser Mutante unter restriktiven Bedingungen hypermodifiziert ist (Abbildung 15B). Beide Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Cdc14 ein Phosphatase für Dbf2 ist. Die beobachtete Cdc14-abhängige Demodifikation von Dbf2 könnte auf eine Regulation von Dbf2 durch Cdc14 hinweisen. Dbf2 ist wichtig für den Austritt aus der Mitose und damit auch für die Aktivierung von Cdc14. Aktiviertes Cdc14 seinerseits könnte dann Dbf2 durch

Dephosphorylierung beeinflussen. Dies ist nur eine Annahme und bedarf noch weiterer Untersuchung.

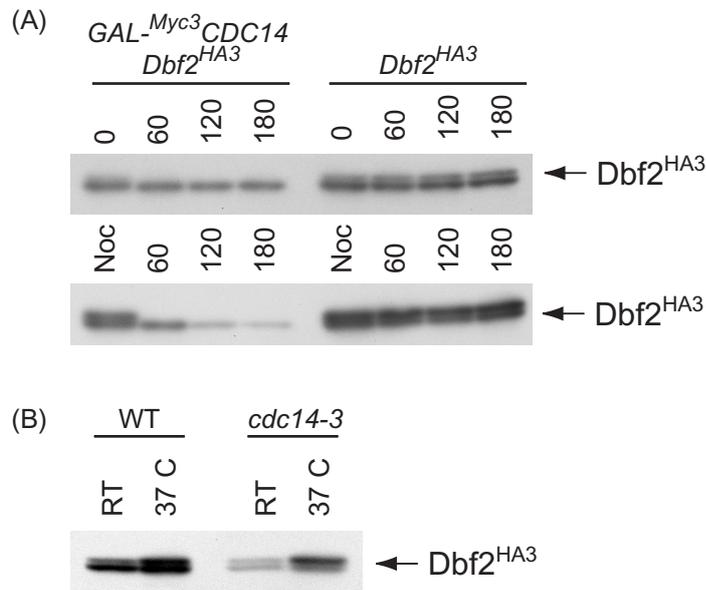


Abbildung 15 Cdc14 beeinflusst die Modifikation von Dbf2. (A) Erhöhte Mengen von Cdc14 führen zur Demodifikation von Dbf2. Zellen der Stämme W2111(*ura3::GAL-Myc3CDC14-URA3 DBF2^{HA3}-HIS5S.p.*) und W2109 (*DBF2^{HA3}-HIS5S.p.*) wurden asynchron (oben) bzw. nocodazolarretiiert (unten) mit Galaktose behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und mittels Western Blot (12CA5) wurde Dbf2^{HA3} nachgewiesen. (B) Zellen der Stämme W2109 (*DBF2^{HA3}-HIS5S.p.*) und W2114 (*DBF2^{HA3}-HIS5S.p. cdc14-3*) wurden bei Raumtemperatur bzw. nach 3h Inkubation bei 37°C geerntet. Dbf2 wurde wie in A mittels Western Blot nachgewiesen.

7.8. Cdc14 beeinflusst Septinringe

Die Septine Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 sind wichtige Strukturproteine des Mutter-Tochter-Übergangs (Übersicht in Field et al. 1999). Sie bilden ein 10nm Intermediärfilament an der Knospungsstelle und bieten eine Gerüststruktur für verschiedene andere Proteine, die an der Zytokinese beteiligt sind. So kann sich der für das endgültige Abschnüren der Tochterzelle wichtige kontraktile Actomyosinring nicht ausbilden, wenn der Septinring gestört ist. Aus einer früheren Arbeit war bekannt, dass die Überexpression von *CDC14* einen Arrest in G1 hervorruft. Die Neusynthese von DNA ist blockiert und die Bildung der Knospe findet nicht statt (Neutzner 1998). Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine hohe Menge an Cdc14 auf die Bildung der Knospe besitzt. Dazu wurde die Lokalisation des Septins Cdc11 mit indirekter Immunfluoreszenz nach Überexpression von *CDC14* in nocodazolarretiierten Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass eine erhöhte Menge von Cdc14 zur Auflösung der Septinringe führte (Abbildung 16). Ohne die Überexpression von *CDC14* waren die Septinringe weitaus stabiler. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Überproduktion von Cdc14 im Nocodazolarrest zu einer Art Zytokinese führte. Der Verdau der Zellen mit Zymolyase - ein notwendiger Schritt für die Färbung mit Antikörpern - führte zu einem Auseinanderfallen

der Zellen. Obwohl die Zellen keine Kernteilung durchgeführt hatten, hatten sie die Zytokinese durchlaufen. Mutterzelle und Knospe wurden nur noch durch die Zellwand zusammengehalten.

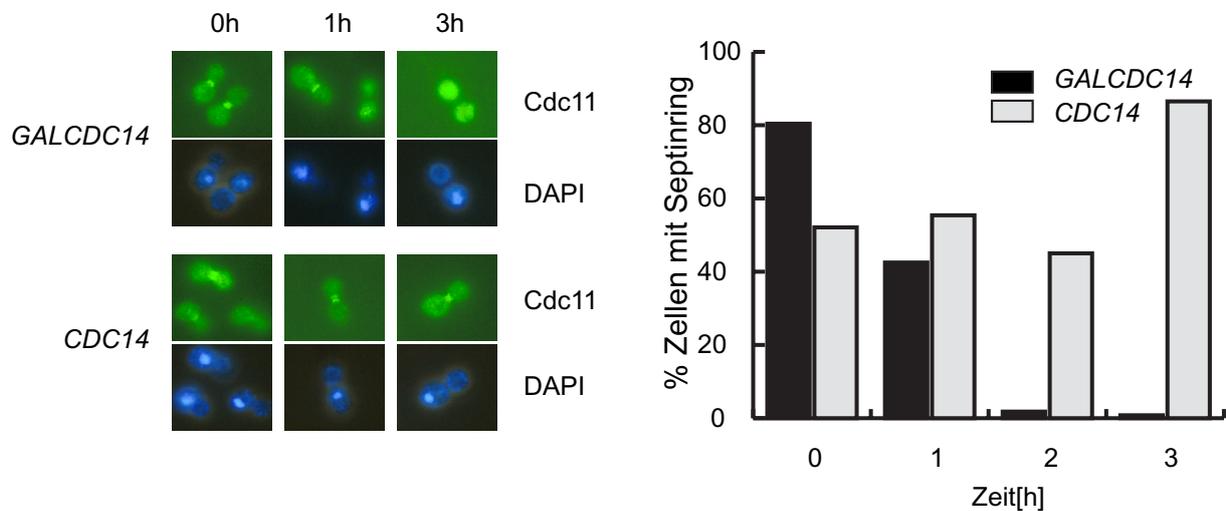


Abbildung 16 Erhöhte Cdc14-Mengen führen zum Verschwinden der Septinringe. Indirekte Immunfluoreszenz wurde verwendet, um das Septin Cdc11 zu lokalisieren. Zellen der Stämme W702 (*ura3::GAL1-MYC3CDC14::URA3CLB2^{HA3}*) und 3E2 (*CLB2^{HA3}*) wurden nach Behandlung mit Nocodazol mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen fixiert und Cdc11 wurde mit α -Cdc11 Kaninchenserum und α -Kaninchen Alexa488 nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden durch Fotografieren dokumentiert und durch Auszählung ausgewertet.

7.9. Erhöhte Mengen an enzymatisch inaktiven Cdc14i führen zur Akkumulation von Sic1

Die Phosphatase Cdc14 gehört zur Familie der Cysteinphosphatasen (Faumann & Saper 1996). Das Cystein an Position 283 der Aminosäuresequenz ist essentiell für die enzymatische Funktion von Cdc14. Es bildet ein Intermediat mit der zu entfernden Phosphatgruppe des Zielsubstrates aus. Der Austausch des Cysteinrests 283 gegen einen Alaninrest führt zur vollständigen Inaktivierung von Cdc14 (Cdc14i) (Grandin et al. 1998). Die Überexpression eines solchen *CDC14*-Derivates kann – bei besonders starker Überproduktion - toxisch sein (Neutzner 1998). Die Ursache der Letalität hoher Mengen Cdc14i sollte untersucht werden. Dazu wurde die Wirkung der Überexpression von *CDC14i* bzw. *CDC14* auf Clb2 und Sic1 Mengen bestimmt. Abbildung 17 zeigt, dass erhöhte Mengen an Cdc14i – im Gegensatz zu aktivem Cdc14 - nicht in der Lage sind, die Degradation von Clb2 einzuleiten. Der Nachweis des überproduzierten ^{Myc3}Cdc14/^{Myc3}Cdc14i zeigt, dass Stamm W974 weitaus mehr Cdc14i produziert als aktives Cdc14 von Stamm W702 gebildet wird. Trotz dieser sehr starken Überexpression von Cdc14i bleibt die Clb2-Menge unbeeinflusst. Überraschenderweise führt aber die Überproduktion von Cdc14i wie die von Cdc14 zu einem starken Anstieg von Sic1. Dieser Anstieg ist durchaus dem Sic1-Anstieg nach Überexpression von *CDC14* vergleichbar.

Der Anstieg von Sic1 unter Bedingungen hoher Cdc14i Konzentration lässt sich auf zwei Arten erklären. Entweder ist für den Anstieg von Sic1 die Aktivität von Cdc14 nicht essentiell. Dies stünde im Widerspruch zu den Literaturdaten, die zeigen, dass Cdc14 eine Phosphatase für Sic1 und Swi5 ist. Oder durch die Überexpression von *CDC14i* kommt es zu einem

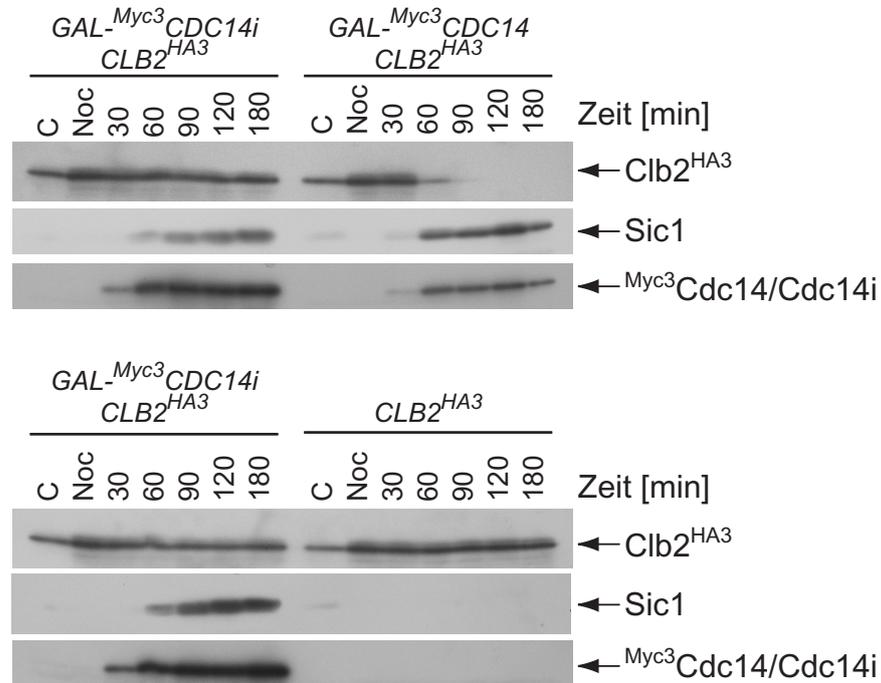


Abbildung 17

Hohe Mengen an inaktivem Cdc14i führen zum Anstieg von Sic1. Um die Auswirkungen von hohen Mengen an Cdc14i zu untersuchen, wurden Zellen der Stammes W974 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC14i CLB2^{HA3}*) nach Behandlung mit Nocodazol mit Galaktose induziert. Als Kontrolle wurden Zellen der Stämme W702 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC14 CLB2^{HA3}*) und 3E2 (*CLB2^{HA3}*) der gleichen Behandlung unterzogen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert. Sic1 wurde mittels Kaninchenserum gegen Sic1, Clb2^{HA3} mit 12CA5 (anti-HA) und Myc3 Cdc14/Myc3 Cdc14i mit 9E10 (anti-Myc) nachgewiesen. Der Nachweis der Cdc14-Derivate diente zur Kontrolle der Expressionsmengen.

Titrationseffekt. Die große Menge an inaktivem Cdc14i könnte durch Verdrängung zur Freisetzung des vorhandenen aktiven Cdc14 aus dem Nucleolus führen. Es wurde versucht diese Hypothese zu verifizieren. Die Lokalisierung von endogenem Cdc14^{GFP} nach Überexpression von *CDC14i* wurde untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnte keine signifikante Freisetzung von endogenem Cdc14^{GFP} unter diesen Bedingungen festgestellt werden. Dies widerlegt aber nicht, dass nicht doch eine kleine Menge Cdc14 freigesetzt wurde, die unterhalb der Nachweisgrenze lag. Falls der beobachtete Sic1-Anstieg durch freigesetztes Cdc14 verursacht wird, dann würden schon sehr geringe Mengen an aktivem freien Cdc14 für die Regulation von Sic1 ausreichen. Die Einleitung der Clb2-Degradation dagegen würde eine weitaus höhere Cdc14-Aktivität voraussetzen.

7.10. Mögliche Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase

Nach einem gängigen Modell der Regulation von Cdc14 wird dieses durch seinen Inhibitor Net1 im Nucleolus verankert und inaktiviert (Shou et al. 1999, Visintin et al. 1999). Neben dieser Regulation von Cdc14 durch seinen Inhibitor Net1 muss aber noch eine andere Ebene der Cdc14-Inhibition postuliert werden. Denn die Deletion von *NET1* ist - trotz der dadurch verursachten Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus - nicht letal. Delokalisiertes Cdc14 ist demnach nicht unbedingt gleich aktivem Cdc14.

Viele Regulatoren des Zellteilungszyklus stehen unter Kontrolle der zyklinabhängigen Kinase. Phosphorylierung durch zyklinabhängige Kinasen ist für die Inhibition einer Vielzahl von Zellzyklusregulatoren wie z.B. Hct1, Sic1 und Swi5 verantwortlich. Es ist daher denkbar, dass auch die Phosphatase Cdc14 selbst unter Kontrolle der CDK steht. Ziel dieses Teilprojektes war es deshalb eine mögliche Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase Cdc28 zu untersuchen.

7.10.1. Cdc14 ist ein in vitro Substrat für Clb2-Cdc28 Kinase

Viele Proteine werden durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität reguliert. Eine wichtige Kinase im Zellteilungszyklus ist die zyklinabhängige Kinase Cdc28. Um eine mögliche Phosphorylierung von Cdc14 durch CDK zu untersuchen wurde, ^{MBP}Cdc14 heterolog in *E.coli* produziert und gereinigt. ^{MBP}Cdc14 wurde in einem in vitro Kinaseassay mit Clb2-assoziiierter Kinase inkubiert. Wie Abbildung 18 zeigt, wird ^{MBP}Cdc14 spezifisch von Clb2-Kinase phosphoryliert. Ebenso wird inaktives Cdc14i - wenn auch schlechter - von Clb2-assoziiierter Kinase erkannt. Histon H1 diente als Positivkontrolle. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass MBP kein Substrat für Clb2-Kinase ist. Der beobachtete Einbau von Phosphat ist demnach spezifisch für Cdc14. Dieses Experiment zeigt, dass Cdc14 ein Substrat für Cdc28 sein kann. Es zeigt nicht, ob Cdc14 unter physiologischen Bedingungen wirklich von CDK phosphoryliert wird. Die gemachte Beobachtung legt aber nahe, dass Cdc14 ein in vivo Substrat für die zyklinabhängige Kinase ist.

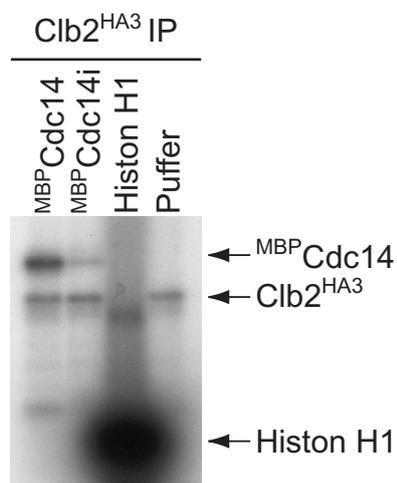


Abbildung 18 Cdc14 ist ein Substrat für Clb2-Kinase in vitro. Heterolog exprimiertes ^{MBP}Cdc14 bzw. ^{MBP}Cdc14C289A (^{MBP}Cdc14i) wurde mit aus Hefe immun gereinigter Clb2^{HA3}-Kinase und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Inkubation von Clb2-Kinase mit Histon H1 und Puffer diente als Kontrollreaktion. Der Einbau von radioaktivem Phosphat in Proteine wurde durch Autoradiographie detektiert.

7.10.2. Cdc14 besitzt sechs potentielle CDK-Consensusstellen

Wie oben gezeigt (7.10.1), kann Cdc14 von CDK phosphoryliert werden. Eine Vorgehensweise, um die Relevanz eines solchen Befundes zu überprüfen, ist es, eine veränderte Version des Proteins herzustellen, die nicht mehr phosphoryliert werden kann. Der minimale Konsensus für eine CDK-Phosphorylierungsstelle ist Threonin/Serin gefolgt von Prolin (T/S P). Abbildung 19 zeigt die Aminosäuresequenz von Cdc14. Die sechs möglichen Erkennungs- und Phosphorylierungsstellen für zyklinabhängige Kinasen sind gekennzeichnet.

```

1  MRRSVYLDNT IEF LRGRVYL GAYDYTPEDT DELVFFTVED
41 AIFYNSFHLD FGPMNIGHLY RFAVIFHEIL NDPENANKAV
81 VFYSSASTRQ RANAACMLCC YMILVQAWTP HQVLQPLAQV
121 DPPFMPFRDA GYSNADFEIT IQDVVYGVWR AKEKGLIDLH
161 SFNLESYEKY EHVEFGDFNV LTPDFIAFAS PQEDHPKGYL
201 ATKSSHLNQP FKSVLNFFAN NNVQLVVRLN SHLYNKKHFE
241 DIGIQHLDLI FEDGTCPDLS IVKNFVGAAE TIIKRGKIA
281 VHCKAGLGRT GCLIGAHLIY TYGFTANECI GFLRFIRPGM
321 VVGPQQHWLY LHQNDFREWK YTTRISLKPS EAIGGLYPLI
361 SLEEYRLQKK KLKDDKRVAQ NNIEGELRDL TMTPPSNGHG
401 ALSARNSSQP STANNGSNSF KSSAVPQTSP GQPRKGQNGS
441 NTIEDINNNR NPTSHANKV VIESNNSDDE SMQDTNGTSN
481 HYPKVSRRKN DISSASSRM EDNEPSATNI NNAADDTILR
521 QLLPKNRRVT SGRRTTSAAG GIRKISGSIK K

```

Abbildung 19 Cdc14 besitzt sechs potentielle Phosphorylierungsstellen für zyklinabhängige Kinase. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von Cdc14 im Ein-Buchstabencode. Unterstrichen sind die minimalen Consensusstellen für die Erkennung durch CDK – Serin gefolgt von Prolin (SP)bzw. Threonin gefolgt von Prolin (TP). Quelle der Sequenzdaten: Saccharomyces Genome Database (SGD). Erste potentielle Phosphorylierungsstelle: T26; zweite Position: T109; dritte Position: T182; vierte Position: S190; fünfte Position: T393; sechste Position: S429.

Durch gezielte Mutagenese wurden alle potentiellen Phosphorylierungsstellen durch Alanin gefolgt von Prolin ausgetauscht. Alanin kann nicht phosphoryliert werden hat aber eine zu Serin bzw. Threonin vergleichbare Struktur.

Abbildung 20 zeigt die angewendete Mutationsstrategie. Der Erfolg der zielgerichteten Mutagenese wurde durch Sequenzierung bestätigt.

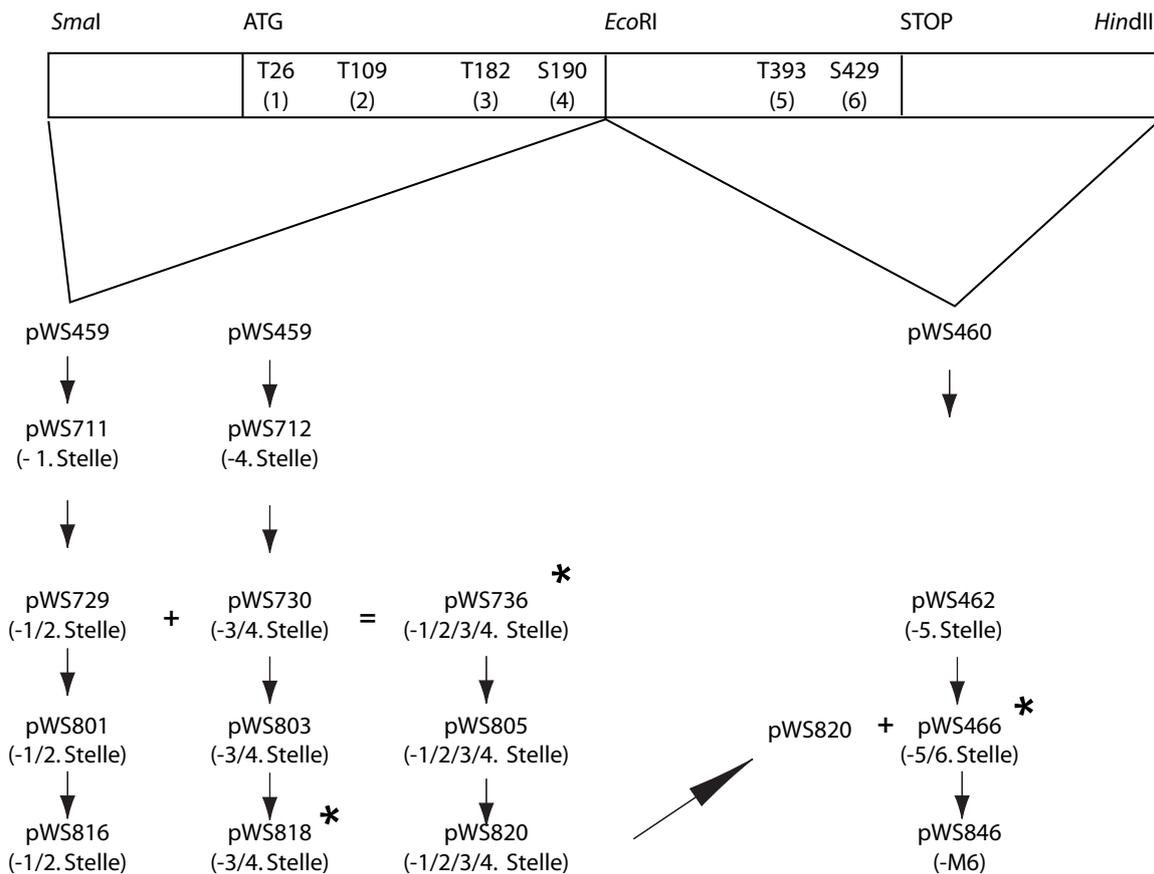


Abbildung 20

Mutagenesestrategie für die Eliminierung aller CDK-Consensusstellen in Cdc14. Ausgangspunkt war ein genomischer Klon von *CDC14* (*SmaI* bis *HindIII*). Eine *EcoRI* Schnittstelle wurde verwendet, um zwei Subklone für die folgende Mutagenese zu klonieren. pWS459 und pWS460 waren Ausgangspunkt für die Mutagenese. Parallel wurde die erste, die vierte und die fünfte Konsensusstelle ausgetauscht. In einer zweiten Runde folgte der Austausch der zweiten, dritten und sechsten Stelle. Über eine *EcoRV* Schnittstelle wurden die Fragmente mit den mutierten ersten vier Consensusstellen fusioniert. Über die *EcoRI* Schnittstelle konnte das Fragment mit der fünften und sechsten mutierten Phosphorylierungsstelle angefügt werden. pWS846 enthielt dann ein Fragment mit dem ganzen *CDC14-M6* Gen. Die mit * gekennzeichneten Konstrukte wurden sequenziert (MWG Biotech) und dienten als Ausgangsplasmide für die Herstellung von Expressionskonstrukten.

7.10.3. Cdc14-M6 wird nicht mehr von Clb2-CDK phosphoryliert

Um den Erfolg der Mutagenese von Cdc14 und die Spezifität der beobachteten Phosphorylierung von Cdc14 durch Clb2-Kinase zu überprüfen, wurden verschiedene Derivate von Cdc14 als MBP-Fusionsproteine in *E. coli* heterolog produziert und anschließend gereinigt. Diese gereinigten Proteine wurden in einem *in vitro* Kinaseassay mit Clb2-Kinase inkubiert. Abbildung 21 zeigt, dass ein Cdc14-Derivat ohne potentielle CDK-Erkennungsstellen (Cdc14-M6) im Gegensatz zum Wildtypprotein kein *in vitro* Substrat mehr für Clb2-Kinase ist. Offensichtlich werden von Clb2-Kinase mehrere bis alle der potentiellen Erkennungsstellen in Cdc14 benutzt. Denn alle untersuchten Zwischenstufen zeigen immer noch eine gewisse Phosphorylierung. Erst der Austausch aller möglichen Erkennungsstellen führt dazu, dass dieses Cdc14-Derivat (Cdc14-M6) keine Substrat mehr für Clb2-Kinase ist.

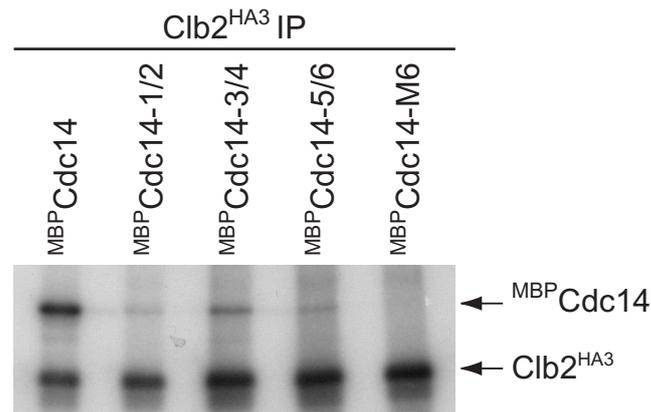


Abbildung 21

Cdc14-M6 ist kein Substrat für Clb2-Kinase. Verschiedene Varianten von Cdc14 wurden heterolog in *E.coli* produziert, aufgereinigt und in einen Clb2-Kinaseassay eingesetzt. 5 μg $^{\text{MBP}}$ Cdc14, $^{\text{MBP}}$ Cdc14-1/2 (die erste und zweite Phosphorylierungsstelle ausgetauscht), $^{\text{MBP}}$ Cdc14-3/4 (die dritte und vierte Phosphorylierungsstelle ausgetauscht), $^{\text{MBP}}$ Cdc14-5/6 (die fünfte und sechste Phosphorylierungsstelle ausgetauscht) und $^{\text{MBP}}$ Cdc14-M6 (alle Phosphorylierungsstelle ausgetauscht) wurden mit aus Hefe gereinigter Clb2^{HA3}-Kinase (12CA5-Immunpräzipitat) und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Einbau von radioaktivem Phosphat in Proteine wurde durch Autoradiographie gemessen.

7.10.4. Überproduktion von Cdc14-Phosphorylierungsmutanten

Zur näheren Charakterisierung der Cdc14-Phosphoderivate wurden diese in der Hefe überproduziert und die Auswirkung auf die Mengen an Clb2 und Sic1 wurden untersucht. Diese Experimente ergaben, dass sich die Wirkung von Cdc14 auf Clb2 und Sic1 Mengen auf der Ebene der Phosphorylierung trennen lassen. Abbildung 22 zeigt, dass die Cdc14-induzierte Clb2-Degradation nach Überproduktion von Cdc14-M6 teilweise und nach Überproduktion von Cdc14-5/6 ganz verhindert ist. Die Überexpression der anderen *CDC14*-Derivate dagegen löst immer noch die Degradation von Clb2 aus. Dies gilt sowohl in asynchronen als auch in nocodazolarretierten Zellen. Ein Sic1-Anstieg ist dagegen in allen Fällen nachzuweisen. Sowohl die Überexpression von *CDC14-M6* als auch die von *CDC14-5/6* führt zu einem starken Anstieg von Sic1. Alle getesteten Derivate von Cdc14 haben noch das Potential, die Sic1-Mengen positiv zu beeinflussen. Dahingegen scheint die Phosphorylierung an den Stellen 5 und 6 wichtig zu sein für die Fähigkeit von Cdc14, Clb2-Degradation einzuleiten. Diese Trennung der Cdc14 Funktionen in Sic1 Anstieg und Clb2 Degradation ist aber nicht ohne Probleme. So führt die Überproduktion eines katalytisch inaktiven Cdc14i, das anstelle des Cysteins 283 im aktiven Zentrum ein Alanin besitzt, zwar nicht zur Degradation von Clb2 bewirkt aber weiterhin einen starken Anstieg von Sic1 (vgl. 7.9). Dieses Ergebnis kann auf zwei Arten interpretiert werden. Der Sic1 Anstieg nach Überexpression von *CDC14* benötigt nicht die Phosphataseaktivität von Cdc14; diese Erklärung steht im Widerspruch zu den Literaturdaten, nach denen Cdc14 Sic1 durch Dephosphorylierung direkt aktiviert. Eine weitere Erklärung wäre, dass durch die starke Überexpression von Cdc14C/A das endogene von Cdc14 von seinem Inhibitor Net1 verdrängt und somit aktiviert wird. Auch diese Interpretation

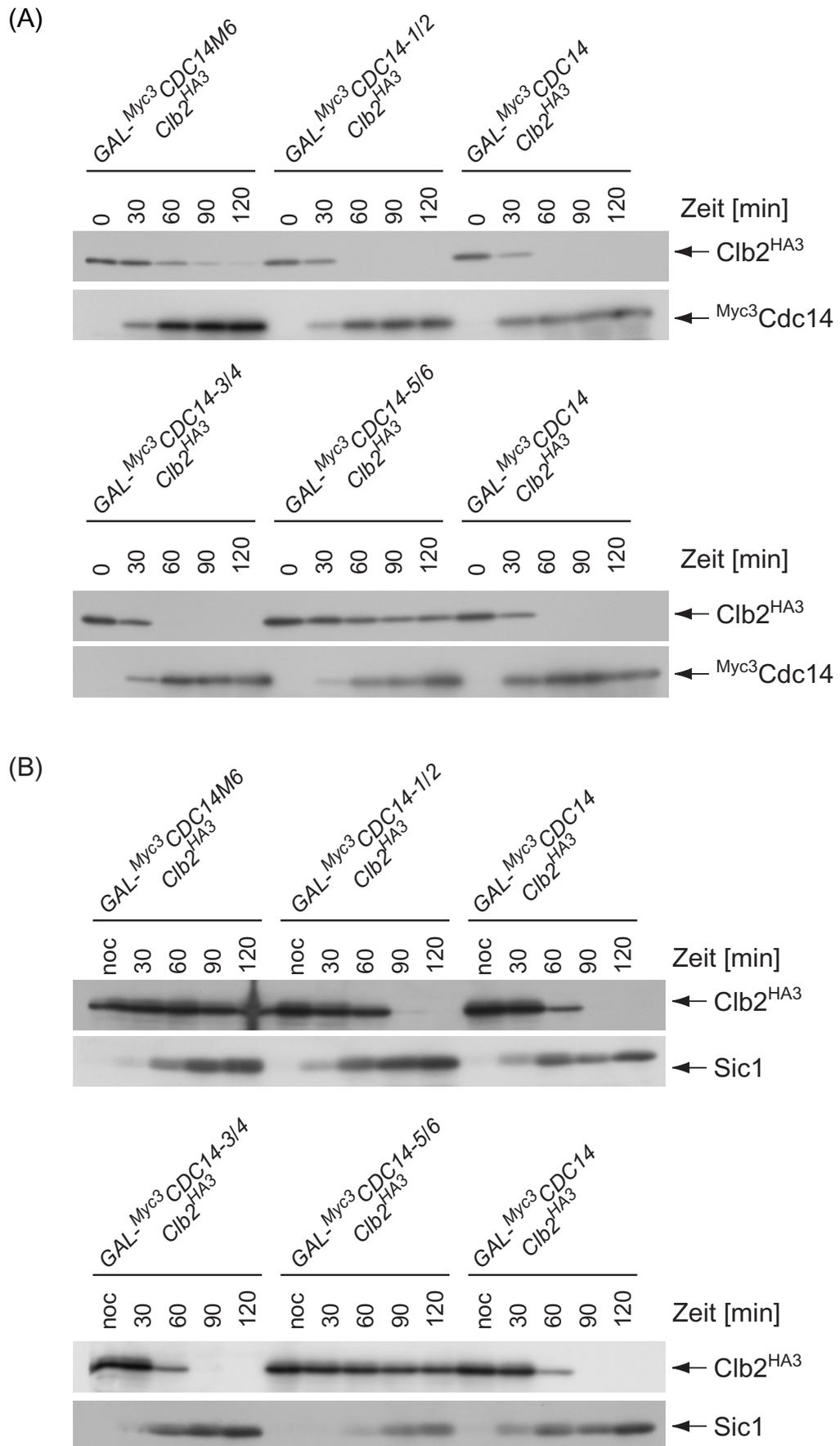


Abbildung 22

Die Auswirkung erhöhter Mengen verschiedener Cdc14-Phosphoderivate auf Clb2 und Sic1. (A) Überproduktion von Cdc14-Derivaten in asynchronen Zellen. Zellen der Stämme W2119 (*trp1::GAL^{-Myc3}CDC14-1/2/3/4/5/6.PS-TRP1 CLB2^{HA3}*), W2120 (*trp1::GAL^{-Myc3}CDC14-1/2.PS-TRP1 CLB2^{HA3}*), W2121 (*trp1::GAL^{-Myc3}CDC14-3/4.PS-TRP1 CLB2^{HA3}*), W2122 (*trp1::GAL^{-Myc3}CDC14-5/6.PS-TRP1 CLB2^{HA3}*) und W702 (*ura3::GAL1^{-Myc3}CDC14-URA3 CLB2^{HA3}*) wurden mit Galaktose behandelt, um die Expression von *CDC14*-Derivaten zu induzieren. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert. Die Clb2-Mengen wurden mit 12CA5 (anti-HA) nachgewiesen. Um die Bildung der Cdc14-Derivate zu kontrollieren, wurde ^{Myc3}Cdc14 mit Hilfe des 9E10 Antikörpers nachgewiesen. (B) Überproduktion von Cdc14 Mutanten in nocodazolarretierten Zellen. Um die Auswirkung der Überexpression von *CDC14*-Mutanten auf die Sic1-Mengen zu untersuchen, wurden die in A genannten Stämme nach Behandlung mit Nocodazol mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitwerten wurden Proben entnommen und mit Hilfe von Western Blot Analyse untersucht. Zur Kontrolle wurde auch die Auswirkung der Überexpression auf Clb2 untersucht. Clb2^{HA3} wurde mit dem 12CA5 (anti-HA) Antikörper und Sic1 mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen Sic1 nachgewiesen.

ist kritisch, da die Bindung zwischen Cdc14C283S und Net1 stark vermindert ist (Traverso 2001). Um diese Frage weiter zu untersuchen, wurde die Lokalisierung von Cdc14^{GFP} nach Überexpression von inaktivem *CDC14i* untersucht. Es wurde gefunden, dass die Lokalisierung des endogenen mit GFP markierten Cdc14 nicht durch das Vorhandensein von Cdc14C/A beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression einer inaktiven Variante von *CDC14* scheint also nicht dazu geeignet, das immer auch vorhandene endogene Cdc14 in einer detektierbaren Weise freizusetzen. Eine geringe Menge an aktivem Cdc14 könnte allerdings schon ausreichen, um einen Sic1 Anstieg auszulösen, ohne zur Degradation von Clb2 zu führen. Warum allerdings das vorhandene Sic1 dann nicht in der Lage ist, die CDK zu inhibieren und so indirekt eine Degradation von Clb2 auszulösen bleibt allerdings unklar.

Um die Funktion der fünften und sechsten potentiellen Phosphorylierungsstelle weiter zu untersuchen, wurde eine verkürzte Version von Cdc14 hergestellt. Dazu wurde der C-Terminus

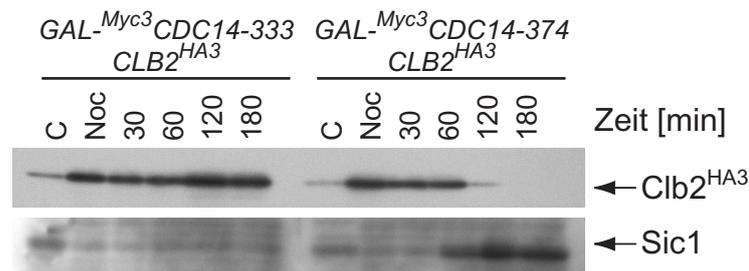


Abbildung 23

Erhöhte Mengen an Cdc14-374 aber nicht Cdc14-333 führen zur Degradation von Clb2 und zur Akkumulation von Sic1. Zellen der Stämme W2362 (*ura3::GAL1^{-Myc3}CDC14-333::URA3 CLB2^{HA3}*) und W2363 (*ura3::GAL1^{-Myc3}CDC14-374::URA3 CLB2^{HA3}*) wurden durch Behandlung mit Nocodazol arretiert. Durch Zugabe von Galaktose wurde die Expression von *CDC14-333* bzw. *CDC14-374* induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert. Clb2^{HA3} wurde mit 12CA5 Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Sic1 erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen Sic1.

von Cdc14, der die beiden Phosphorylierungsstellen enthält, hinter Position 374 deletiert (Cdc14-374). Wie in Abbildung 23 zu sehen, bewirkte die Überexpression von *CDC14-374* immer noch eine Verminderung der Clb2 Menge und einen Anstieg von Sic1. Eine weitere Verkürzung von Cdc14 führte zum Funktionsverlust des Proteins. Nach Überexpression von *CDC14-333* (Aminosäure 1-333) konnte weder Clb2-Degradation noch ein Anstieg von Sic1 festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die CDK-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Cdc14 einen aktivierenden Einfluss auf Cdc14 haben. So führt die Verhinderung der Phosphorylierung an diesen Stellen zu einer Inhibition von Cdc14 bezüglich Clb2-Degradation. Wohingegen die Deletion dieser gesamten Region zu einem funktionsfähigen Protein führt. Dies ließe sich mit einer Konformationsänderung von Cdc14 nach der Phosphorylierung an den Stellen fünf und sechs erklären. Ein unphosphorylierter C-Terminus würde die Phosphataseaktivität inhibieren. Ein phosphorylierter C-Terminus dagegen würde nicht länger inhibierend wirken. Durch die Deletion des C-Terminus würde ein aktives Cdc14 geschaffen, das nicht durch seinen C-Terminus inhibiert wird. Diese mögliche Erklärung wird durch eine Beobachtung von Traverso unterstützt. Er findet, dass Cdc14-375 *in vitro* eine 1,5fach höheren Aktivität besitzt als das gesamte Cdc14. Weiterhin ist dieser C-Terminus nicht für die Bindung an den Inhibitor Net1 wichtig. Cdc14-375 bindet noch immer an Net1. Diese Hypothese erklärt die existierenden Daten. Eine andere Erklärung wäre, dass die Mutation der fünften und sechsten Phosphorylierungsstelle in Cdc14 zu einem kompletten Funktionsverlust des resultierenden Proteins führt. Die Deletion des gesamten C-Terminus müsste dagegen aber ein funktionelles Protein ergeben. Dies scheint nicht wahrscheinlich, ist aber nicht auszuschließen.

7.11. Regulation von Cdc14 durch Cdc5

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass Cdc14 ein limitierender Faktor für die Aktivierung des Inhibitors zyklinabhängiger Kinasen Sic1 ist (Neutzner 1998, Visintin et al. 1998). Es wurde untersucht, ob auch erhöhte Mengen anderer Komponenten des Signaltransduktionsnetzwerkes am Ende der Mitose zur Aktivierung von Sic1 führen können. Ein solches Verhalten könnte auf eine direkte Regulation von Cdc14 hindeuten, da Cdc14 als Effektor des MEN und damit als direkter Aktivator von Sic1 gilt. Es wurden die Kinasen Dbf2 und Cdc5 überproduziert und das Verhalten von Sic1 analysiert. Im Gegensatz zur Überproduktion von Dbf2 (Daten nicht gezeigt) führte die Überexpression von *CDC5* zu einem starken Anstieg von Sic1. Im weiteren wurde deshalb das Verhältnis von Cdc5 und Cdc14 untersucht.

7.11.1. Die Überexpression von *CDC5* führt zur Sic1-Akkumulation

Der Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen Sic1 wird durch die Phosphatase Cdc14 am Ende der Mitose aktiviert. Dies geschieht durch Dephosphorylierung von Sic1 selbst und dessen Transkriptionsfaktor Swi5 (Visintin et al. 1998). Es wurde überprüft, ob dies auch nach Überexpression von *CDC5* auftritt. Dazu wurde Cdc5 unter Kontrolle des galaktoseinduzierbaren *GAL1* Promotors in nocodazolbehandelten Zellen überproduziert (persönliche Mitteilung

Katarina Creutzberger, s. Abbildung 24). Eine HA3-markierte Kopie von Sic1 unter Kontrolle des Sic1-Promotors diene zum Nachweis von Sic1. Als Vergleich diene ein Stamm ohne *CDC5*-Überexpressionskonstrukt. Wachsende Zellen der beiden Stämme wurden mit Nocodazol arretiert. Nach Erreichen des Arrests wurde Galaktose zugegeben, um die Cdc5-Produktion anzuschalten. Im Nocodazolarrest ist Sic1 normalerweise nicht nachweisbar. Im Cdc5-überproduzierenden Stamm dagegen akkumulierte Sic1 im Vergleich zum Kontrollstamm. Als Ladekontrolle diene der Nachweis von Cdc28. Um zu überprüfen, ob die Kinaseaktivität von Cdc5 verantwortlich ist für die Akkumulation von Sic1, wurde eine kinaseinaktive Variante von Cdc5 – Cdc5K110M – überproduziert (Lee et al. 1995, persönliche Mitteilung von Melanie Neutzner). Im Vergleich zur Überexpression von Wildtyp-*CDC5* führt eine erhöhte Menge an Cdc5K110M ohne Kinaseaktivität nicht zur Akkumulation von Sic1. Die Wirkung von Cdc5 auf Sic1 beruht also auf seiner enzymatischen Aktivität und nicht auf einem eher indirekten Titrations- oder Verdrängungseffekt.

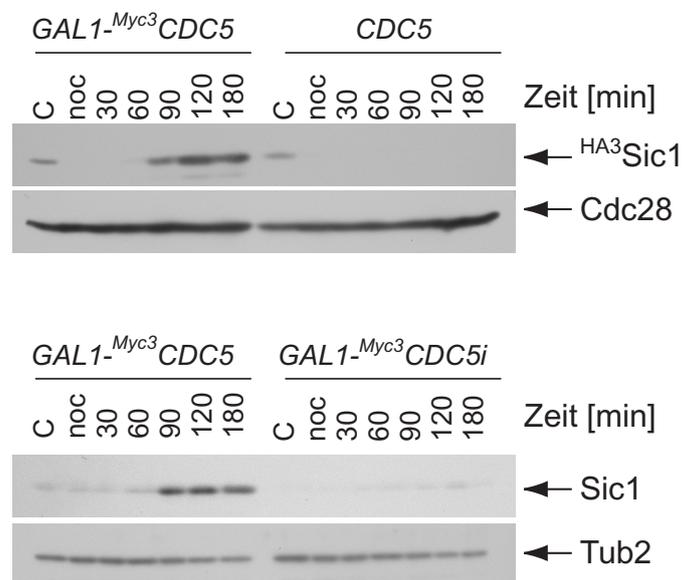


Abbildung 24

Die Überexpression von enzymatisch aktivem aber nicht von enzymatisch inaktivem Cdc5 beeinflusst die ^{HA3}Sic1 Menge. (A) Um den Einfluss einer erhöhten Cdc5 Menge auf Sic1 zu untersuchen, wurden Zellen des Stammes W1649 (*leu2::SIC1-HA3SIC1-LEU2*) nocodazolarretiert und mit 2% Galaktose behandelt. Dies führte zur Induktion von *CDC5*. Als Kontrolle diene Stamm W1827 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3 leu2::SIC1-HA3SIC1-LEU2*), der kein *CDC5*-Überexpressionskonstrukt besaß. ^{HA3}Sic1 wurde mit α -HA (12CA5) Antikörpern nachgewiesen. Der Nachweis von Cdc28 mittels α -Cdc28 Antikörpern und Western Blot diene zur Kontrolle der Beladung. (B) Enzymatische Aktivität von Cdc5 essentiell ist für den Anstieg von Sic1. Zellen des Stammes W1668 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3 CDC14^{HA4}-LEU2*) wurden durch Behandlung mit Nocodazol in der M Phase arretiert. Die Zugabe von Galaktose induzierte die Produktion von Cdc5 bzw. Cdc5i. Die Wirkung auf Sic1 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Western Blot analysiert. Sic1 wurde mit einem polyklonalen α -Sic1 Kaninchenserum nachgewiesen. Der Nachweis von β -Tubulin (Tub2) mittels polyklonalem Kaninchenserum diene als Ladekontrolle.

7.11.2. Die Cdc5-vermittelte Sic1-Akkumulation ist unabhängig von Clb2-Degradation

Sic1 wird durch die Wirkung der zyklinabhängigen Kinase instabil gehalten. Phospho-Sic1 ist ein Substrat für die SCF-vermittelte ubiquitinabhängige Proteindegradation (Übersicht in Deshaies & Ferrel 2001). Weiterhin inhibiert die zyklinabhängige Kinase die Transkription von Sic1 durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Swi5. Die Überexpression von *CDC5* führt zur Degradation des Zyklins Clb2 und damit zur Abschaltung der zyklinabhängigen Kinase (Charles et al. 1998). Somit könnte die Cdc5-vermittelte Sic1-Akkumulation auch indirekt über das Abschalten der CDK erklärt werden. Das Abschalten der CDK über den Weg der Zyklindegradation würde zur Verhinderung der Phosphorylierung von Sic1 und Swi5 führen. Um zu untersuchen, ob die Wirkung von Cdc5 auf Sic1 indirekt über die Degradation von Zyklinen und der damit verbundenen Inaktivierung der CDK oder auf einem direkteren Weg erfolgt, wurde Cdc5 in eine *hct1*-Deletionsstamm überproduziert. In solch

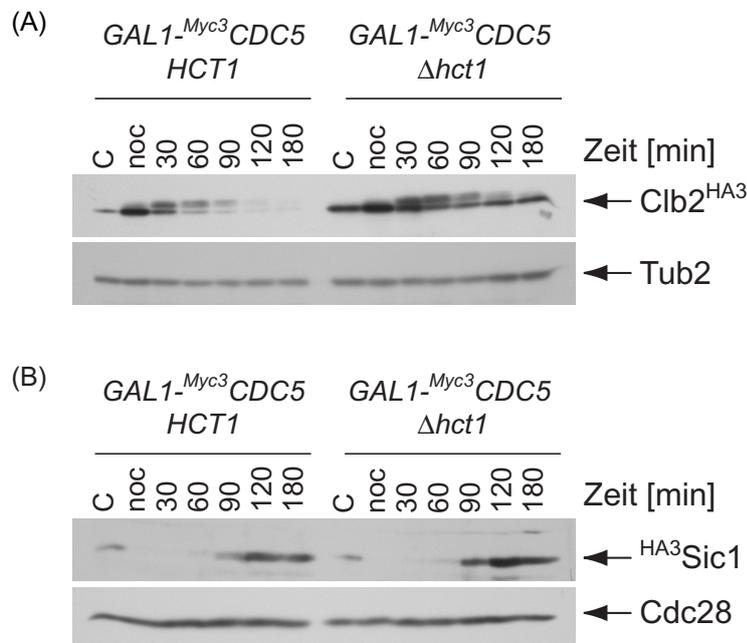


Abbildung 25

Erhöhte Mengen von Cdc5 beeinflussen die Sic1-Menge unabhängig von Zyklindegradation. (A) Erhöhte Cdc5 Kinaseaktivität verursacht eine Hct1-abhängige Degradation von Clb2. Um die Wirkung von Cdc5 Überproduktion auf Clb2 zu untersuchen, wurde Cdc5 in nocodazolarretierten Zellen der Stämme W1305 (*ura3-GAL1-Myc3 CDC5 CLB2^{HA3}*) und W1556 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC5::URA3 CLB2^{HA3} Δhct1::LEU2*) überproduziert. Die Auswirkung auf die Clb2^{HA3}-Menge wurde zu den angegebenen Zeitwerten mittels Western Blot und anti-HA Antikörpern untersucht. Der Nachweis von β -Tubulin (Tub2) diente zur Kontrolle der Beladung. (B) Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5* auf Sic1 in Abhängigkeit von *HCT1* zu untersuchen, wurden Zellen von Stamm W1827 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC5-URA3 leu2::SIC1-HA3 SIC1-LEU2*) und W1828 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC5-URA3 leu2::SIC1-HA3 SIC1-LEU2 Δhct1::HIS3*) durch Nocodazolbehandlung arretiert und durch Zugabe von Galaktose induziert. Die HA³Sic1-Menge wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Western Blot (12CA5) untersucht. Der Nachweis von Cdc28 mit anti-Cdc28 Antikörpern diente als Ladekontrolle.

einem Stamm ist die Degradation von späten mitotischen Zyklinen inhibiert, denn Hct1 ist der Spezifitätsfaktor für diese Zyklone. Die Deletion von *HCT1* bewirkt somit eine Stabilisierung von Clb2. Überexpression von *CDC5* bewirkt in der Tat die Degradation von Clb2 und die Deletion von *HCT1* in solch einem Stamm stabilisiert wie erwartet Clb2 (Abbildung 25A). Trotzdem akkumuliert Sic1 nach Überexpression von *CDC5* auch in einem *hct1*-Deletionsstamm (Abbildung 25B). Dies zeigt, dass Cdc5 nicht indirekt Sic1 stabilisiert, sondern ein direkterer Einfluss möglicherweise über Cdc14 denkbar ist.

7.11.3. Die Cdc5-vermittelte Sic1-Akkumulation ist abhängig von funktionellem Cdc14

Die Phosphatase Cdc14 ist in der Lage, die Akkumulation von Sic1 einzuleiten (Neutzner 1998, Visintin et al. 1998). Erhöhte Mengen an Cdc5 können denselben Effekt hervorrufen (7.11.1). Die Überexpression von *CDC5* in Cdc14-defizienten Zellen sollte nun klären, ob Cdc5 zur Aktivierung von Sic1 aktives Cdc14 benötigt, oder ob es einen weiteren Cdc14-unabhängigen

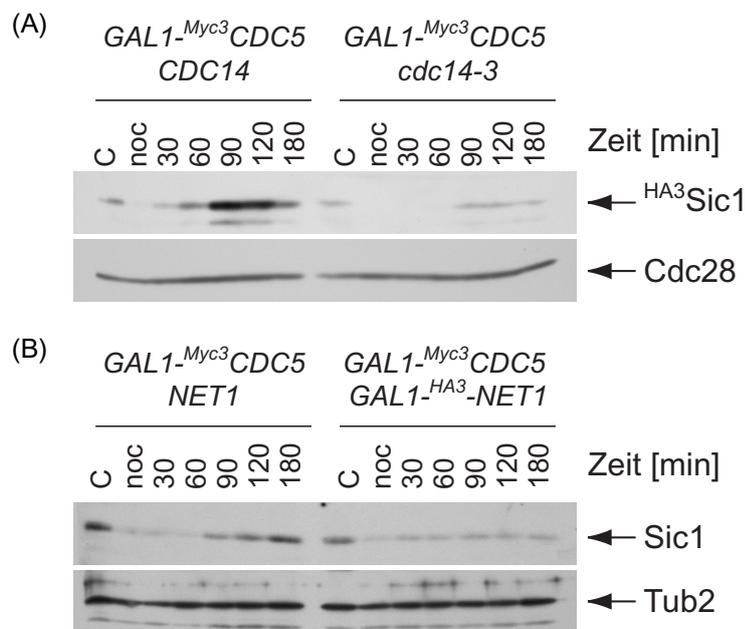


Abbildung 26: Erhöhte Mengen an Cdc5 führen zu einem Cdc14-abhängigen Anstieg von Sic1. (A) Der Cdc5-vermittelte Sic1-Anstieg ist von funktionellem Cdc14 abhängig. Die Induktion von *CDC5* durch Galaktosezugabe in nocodazolarretierten Zellen der Stämme W1827 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5-URA3 leu2::SIC1-HA³SIC1-LEU2*) und W1829 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5-URA3 leu2::SIC1-HA³SIC1-LEU2 cdc14-3*) und der Nachweis von HA³Sic1 mittels Western Blot (12CA5) diente zur Untersuchung der Cdc14-Abhängigkeit der Cdc5-Wirkung. Die Menge an Cdc28 (Western Blot mit anti-Cdc28) diente als Ladekontrolle. (B) Erhöhte Mengen des Cdc14-Inhibitors Net1 verhindern die Wirkung von Cdc5 auf Sic1. Durch Zugabe von Galaktose zu nocodazolarretierten Zellen von Stamm W2714 (*MATa/α ura3::GAL1-MYC³CDC5-URA3*) wurde *CDC5* und in Zellen von Stamm W2715 (*MATa/α ura3::GAL1-MYC³CDC5-URA3 his3::GAL1-HA³NET1-SpHIS5*) zusätzlich *NET1* induziert. Sic1-Mengen wurden durch Western Blot (polyklonales α-Sic1 Kaninchenserum) nachgewiesen. Die gleichmäßige Beladung wurde durch Nachweis von β-Tubulin (Tub2) überprüft.

Weg zu aktivem Sic1 gibt. Dazu wurde Cdc5 in nocodazolbehandelten *cdc14-3* Zellen, die bei restriktiver Temperatur inkubiert wurden, überproduziert. Als Kontrolle diente ein vergleichbar behandelter Wildtypstamm. Der Kontrollstamm zeigt eine starke Sic1-Akkumulation unter diesen Bedingungen. Im Gegensatz dazu ist der *cdc14-3* Stamm nicht in der Lage, Sic1 anzuhäufen (Abbildung 26A). Im Kontrollstamm sind nur sehr geringe Mengen an Sic1 nachweisbar. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Cdc28. Die Cdc14-abhängige Sic1-Akkumulation zeigt, dass Cdc5 funktionelles Cdc14 benötigt, um Sic1 zu aktivieren. Cdc5 wirkt demnach im Cdc14-Weg der Sic1-Aktivierung. Um diesen Befund zu erhärten wurde, Cdc5 zusammen mit Net1 überproduziert. Net1 ist ein Inhibitor von Cdc14. Bindung von Cdc14 an Net1 blockiert das aktive Zentrum von Cdc14 und inhibiert damit dessen Phosphataseaktivität (Traverso et al. 2001). Beeinflusst Cdc5 über die Aktivierung von Cdc14 die Menge an Sic1, dann sollte die zusätzliche Überexpression von Net1 den Sic1-Anstieg nach Überproduktion von Cdc5 verhindern. Wie Abbildung 26B zeigt ist dies der Fall. Sic1 steigt in einem Stamm, der sowohl Cdc5 als auch Net1 überproduziert nicht mehr an. Diese beiden Experimente zeigen, dass Cdc5 aktives Cdc14 benötigt, um einen Sic1-Anstieg zu bewirken.

7.11.4. Der Cdc5-vermittelte Sic1-Anstieg ist unabhängig von Cdc15 und Dbf2

Um Cdc5 in den Kontext des MEN einzuordnen, wurde die Abhängigkeit des Cdc5-induzierten Sic1-Anstiegs von Cdc15 bzw. Dbf2 untersucht. Dazu wurde Cdc5 bei 37°C in nocodazolbehandelten *cdc15-2* bzw. *dbf2-2* Zellen überproduziert. Sollte Cdc5 aktives Cdc15 oder Dbf2 für seine Wirkung auf Sic1 benötigen, dann müsste die Mutation einer dieser beiden Kinasen den Sic1-Anstieg unter Bedingungen hoher Cdc5-Kinase verhindern. Abbildung 27 zeigt, dass der Cdc5-vermittelte Sic1-Anstieg weder durch die Mutation *cdc15-2* noch die von *dbf2-2* verhindert wird. Daraus kann man schließen, dass Cdc5-Überproduktion unabhängig von Cdc15 und Dbf2 zur Aktivierung von Cdc14 führt. Cdc5 steht funktionell unterhalb bzw. neben Cdc15 und Dbf2 im MEN.

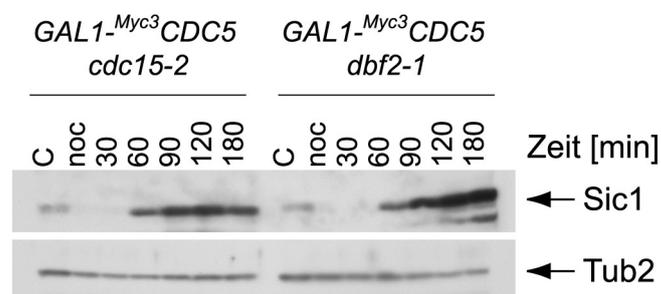


Abbildung 27

Cdc5 steht nicht oberhalb von Cdc15 und Dbf2. Die Auswirkung erhöhter Cdc5 Kinase in *cdc15-2* bzw. *dbf2-2* Mutanten diente zur Einordnung von Cdc5 im MEN. Dazu wurde Cdc5 bei 37°C in nocodazolarretierten Zellen von Stamm W1558 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC5::URA3 CLB2^{HA3} cdc15-2*) bzw. W1560 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC5::URA3 CLB2^{HA3} dbf2-2*) überproduziert. Die Sic1 Proteinmenge wurde mittels Western Blot (polyklonales α -Sic1 Kaninchenserum) gemessen. Der Nachweis von β -Tubulin (Tub2) diente zur Kontrolle der Beladung.

7.11.5. Erhöhte Cdc5-Mengen führen zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus

Cdc14 ist während der meisten Zeit des Teilungszyklus im Nucleolus lokalisiert (Shou et al. 1999). Es liegt dort im Komplex mit seinem Inhibitor Net1 vor und wird von diesem inaktiv gehalten. Zu Beginn der Anaphase wird Cdc14 aus dem Nucleolus freigesetzt und aktiviert. Erhöhte Cdc5-Mengen bewirken über die Aktivierung von Cdc14 die Akkumulation von Sic1. Dieser Anstieg sollte demnach mit einer Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus einhergehen. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde die Lokalisation von Cdc14 nach Überexpression von *CDC5* untersucht. Als Kontrolle diente ein Stamm ohne *CDC5*-Überexpressionskonstrukt. Abbildung 28 zeigt, dass die Überproduktion von Cdc5 in 60% der Zellen ohne Knospe zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus in den Kern führt. Dahingegen weisen nur 11% der Kontrollzellen die gleiche Färbung auf. In Zellen ohne Knospe – also G1-Zellen – ist Cdc14 normalerweise nicht delokalisiert. Es handelt bei der vergleichsweise geringen Freisetzung von Cdc14 im Kontrollstamm vermutlich um mitotische Zellen, die aufgrund der Aufarbeitung für die Immunfluoreszenz ihre Knospe verloren haben. Es lässt sich also feststellen, dass die Überexpression von *CDC5* zu einer signifikanten Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus in den gesamten Kern führt. Dies geschieht zu Zeitpunkten, zu denen Cdc14 normalerweise noch im Nucleolus lokalisiert ist.

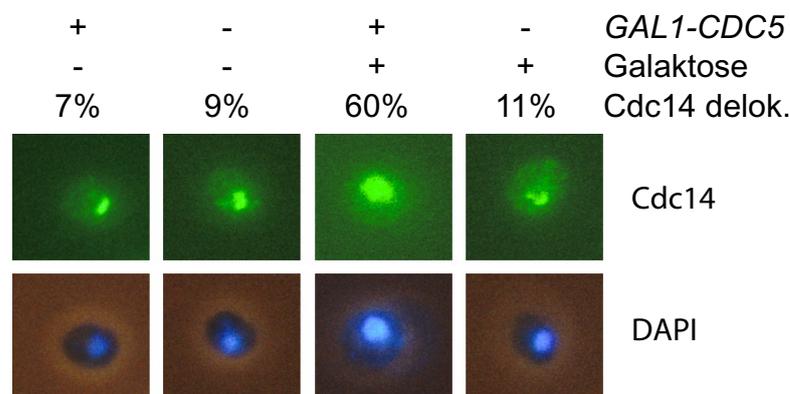


Abbildung 28

Cdc5 kann Cdc14 aus dem Nucleolus freisetzen. Die Lokalisierung von Cdc14^{HA10} nach Überexpression von *CDC5* diente zum Nachweis der Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus. Dazu wurden Zellen des Stammes W2534 (*ura3::GAL1-CDC5-URA3 NET1^{Myc9}-K.I.TRP1 CDC14^{HA10}-LEU2 Δhct1::HIS3*) bzw. W2535 (*NET1^{Myc9}-K.I.TRP1 CDC14^{HA10}-LEU2 Δhct1::HIS3*) für 90 min. mit Galaktose induziert. Cdc14^{HA10} wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die gleichzeitige Färbung der Zellen mit DAPI diente zur Darstellung der Kernmorphologie.

7.11.6 *CDC5*-Überexpression führt zur Auflösung der Cdc14-Net1 Interaktion

Cdc14 wird durch die Interaktion mit Net1 im Nucleolus festgehalten und inaktiviert (Shou et al. 1999, Visintin et al. 1999). Führt die Überexpression von *CDC5* zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus, dann sollte die Interaktion zwischen Cdc14 mit seinem Inhibitor Net1 aufgehoben sein. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde die Bindung von Cdc14 an Net1 mittels Coimmunopräzipitation untersucht. Dazu wurden Stämme benutzt, die HA-markiertes Cdc14 und Myc-markiertes Net1 produzierten. Als Kontrolle dienten Stämme, die nur jeweils eines dieser Protein als epitopmarkierte Version produzierten. Die beiden oberen Teile der Abbildung 29 zeigen Western Blots der Proteinlysate der untersuchten Stämme. Man erkennt, dass in Spur zwei der ersten Teilabbildung kein Cdc14^{HA4} und in Spur eins der zweiten Teilabbildung kein Net1^{Myc9} nachgewiesen werden kann. Es handelt sich hierbei um die

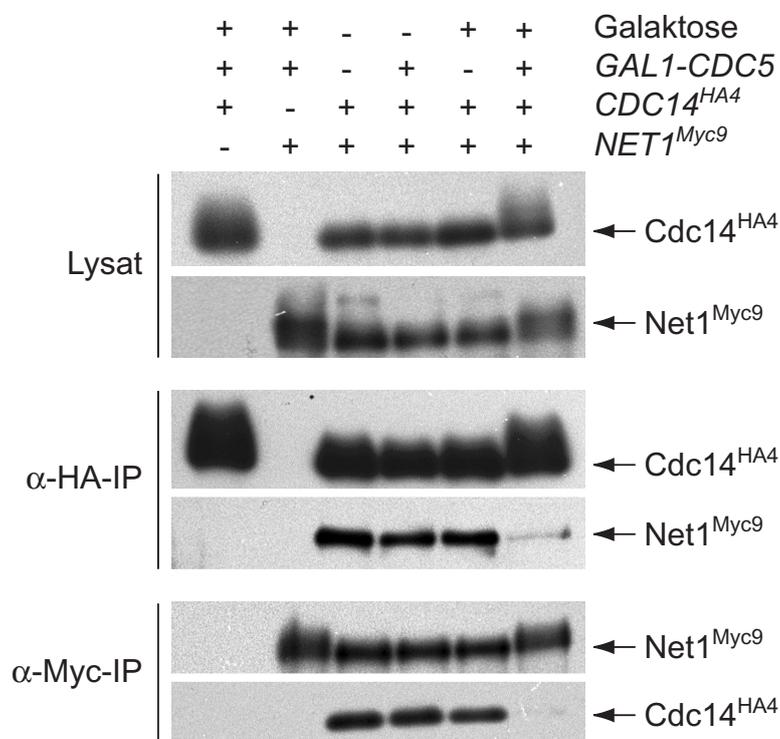


Abbildung 29

Erhöhte Cdc5-Mengen führen zum Verlust der Cdc14-Net1 Interaktion. Die Untersuchung von Cdc14 bzw. Net1 Präzipitaten auf den eventuell mitgereinigten jeweiligen Bindungspartner diente als Methode zum Nachweis der Cdc14-Net1 Interaktion. Zellen der Stämme W2532 (*ura3::GAL1-CDC5-URA3 CDC14^{HA4}-LEU2 Δhct1::HIS3*), W2531 (*ura3::GAL1-CDC5-URA3 NET1^{Myc9}-KITRP Δhct1::HIS3*), W1974 (*NET1^{Myc9}:KITrp1 CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2 Δhct1-4::HIS3*) und W1975 (*ura3::GAL1-CDC5-URA3 NET1^{Myc9}:KITrp1 CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2 Δhct1-4::HIS3*) wurden vor bzw. nach 90 min. Behandlung mit Galaktose geerntet. Aus Proteinlysaten der Proben wurden mit 12CA5 (α -HA) bzw. 9E10 (α -Myc) und Protein A Agarose Cdc14^{HA4} bzw. Net1^{Myc9} gereinigt. Proben der Lysate (Lysat) vor der Präzipitation und die Präzipitate (α -HA-IP oben und α -Myc-IP oben) bzw. die kopräzipitierten Proteine (α -HA-IP unten und α -Myc-IP unten) wurden mittels Western Blot untersucht.

Lysate der Kontrollstämme. In diesen Stämmen war immer nur ein Protein epitopmarkiert. Teilabbildung drei zeigt den Western Blot der Immunpräzipitation mit dem anti-HA Antikörper. Hier wurde Cdc14^{HA4} präzipitiert. In Teilabbildung vier wurden diese Präzipitate mit dem anti-Myc Antikörper auf das Vorhandensein von Net1^{Myc9} untersucht. Man erkennt, dass in der sechsten Spur der vierten Teilabbildung Net1 kaum nachzuweisen ist; wohingegen dort in den Spuren drei bis fünf Net1^{Myc9} in gleicher Menge copräzipitiert werden konnte. Das Material in der sechsten Spur stammt von Zellen, die Cdc5 überproduzierten. Net1^{Myc9} copräzipitiert nach Überexpression von *CDC5* nicht mehr mit Cdc14^{HA4}. Dasselbe gilt für den umgekehrten Ansatz. Net1^{Myc9} wird präzipitiert und das Vorhandensein von Cdc14^{HA4} in den Präzipitaten wird untersucht. In Spur sechs des sechsten Teils der Abbildung 29 lässt sich nach Überexpression von *CDC5* kein Cdc14^{HA4} mehr nachweisen. Dieses Experiment zeigt, dass die Interaktion von Cdc14 und Net1 durch die Wirkung von Cdc5 aufgelöst werden kann. Es ist nicht klar, ob es sich um eine direkte oder indirekte Wirkung von Cdc5 auf den Komplex handelt.

Eine weitere Beobachtung kann aus diesem Experiment gewonnen werden. Sowohl Cdc14^{HA4} als auch Net1^{Myc9} zeigen nach Überexpression von *CDC5* ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel. Dies deutet auf eine von Cdc5 verursachte Modifikation beider Proteine hin.

7.11.7. Cdc14 und Net1 sind Phosphoproteine

Modifikation von Proteinen verändert in vielen Fällen deren Laufverhalten im SDS-Gel. Oft ruft eine Phosphorylierung dieses Verhalten der Proteine hervor. In 7.11.6 konnte ein verändertes Laufverhalten von Cdc14 und Net1 nach Überexpression von *CDC5* festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob Cdc5-Überproduktion zu einer Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 führt, wurde ein Phosphataseassay durchgeführt. Dazu wurde Cdc14^{HA4} bzw. Net1^{Myc9} aus Zellen vor bzw. nach Überexpression von *CDC5* durch Immunpräzipitation gereinigt. Diese Präzipitate wurden mit λ -Proteinphosphatase behandelt bzw. einer Behandlung mit Puffer unterzogen. Abbildung 30 zeigt, dass die Behandlung mit Phosphatase zu einem Verschwinden der langsamer laufenden Proteinspezies führt wohin gegen die Behandlung mit Puffer das Laufverhalten von Cdc14 und Net1 nicht verändert. Dies beweist, dass die Überproduktion von Cdc5 eine Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 hervorruft. Ob es sich um eine direkte Phosphorylierung von Cdc14 und/oder Net1 durch Cdc5 handelt oder ob Cdc5 eine Kinase aktiviert, die ihrerseits die beiden Proteine phosphoryliert, kann mit diesem Experiment nicht entschieden werden. Dazu muss die Kinasereaktion *in vitro* rekonstituiert werden (vgl. 7.11.8).

Abbildung 31 Cdc14 und Net1 sind in vitro Substrate für Cdc5 Kinase. (A) Um zu überprüfen, ob Cdc14 ein Substrat für Cdc5 Kinase ist, wurde ein Kinaseassay durchgeführt. Dazu wurde heterolog produziertes MBP-Cdc14 mit der spezifischen Protease Faktor Xa behandelt, um das MBP von Cdc14 abzuschneiden. Cdc5-Kinase wurde aus Stamm W1555 nach 90 Minuten Induktion mit Galaktose durch Immunpräzipitation gereinigt. Cdc14 wurde für 30 min mit ^{Myc3}Cdc5-Kinase und 5 µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation von Cdc5 nur mit Puffer bzw. mit gereinigtem MBP. Der Einbau von radioaktivem Phosphat in Proteine wurde mit Autoradiographie untersucht. (B) Net1 wurde als Substrat in einen Kinaseassay mit Cdc5-Kinase eingesetzt. Dazu wurde heterolog exprimiertes Net1^{6xHis} mit aus Hefe gereinigtem ^{Myc3}Cdc5 und 5 µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Als Kontrolle diente ein bakterielles Kontrolllysat bzw. Puffer. Autoradiographie diente zur Bestimmung des Einbaus von radioaktivem Phosphat in Proteine.

7.11.9. Cdc14 und Net1 werden zellzyklusabhängig phosphoryliert

Cdc14 und Net1 werden von Cdc5 in vivo und in vitro phosphoryliert (s. 7.11.8). Um zu untersuchen, ob beide Proteine auch normalerweise während des Zellteilungszyklus phosphoryliert sind, wurde ein Experiment mit einer synchronen Kultur durchgeführt. Dazu wurde ein Stamm der sowohl Cdc14 als auch Net1 als epitopmarkierte Versionen produzierte durch Behandlung mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase synchronisiert. Nach Erreichen des G1-Arrestpunktes wurden die Zellen in frisches Medium ohne α -Faktor entlassen und es wurden Proben für Western Blot, mikroskopische Auszählung und Durchflusszytometrie entnommen. Abbildung 32A zeigt, dass sowohl Cdc14 als auch Net1 zellzyklusabhängig phosphoryliert sind. Beide Proteine sind von der G1-Phase über die S und G2 bis zur Anaphase unphosphoryliert. Zu oder kurz nach Beginn der Anaphase werden beide Proteine zeitgleich phosphoryliert. Mit dem Eintreten in die nächste G1-Phase verschwindet die Modifikation wieder. Dies zeigt, dass Cdc14 und Net1 in einer zellzyklusabhängigen Weise phosphoryliert werden und zwar während der Zeitspanne der Cdc14-Aktivität. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Phosphorylierung vermutlich um ein Ereignis handelt, das der Aktivierung von Cdc14 dient. Die beobachtete Phosphorylierung fällt außerdem in die Zeitspanne, in der Cdc5 aktiv ist (Cheng et al. 1998). Um zu überprüfen, ob Cdc5 auch unter physiologischen Bedingungen die Kinase für Cdc14 und Net1 ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt (Abbildung 32B). Stämme mit epitopmarkierten Cdc14 bzw. Net1 und Mutationen in den Genen *CDC5*, *CDC15* bzw. *CDC14* wurden durch Inkubation bei 37°C am entsprechenden Arrestpunkt arretiert. Als Kontrolle wurden Wildtypstämme mit dem Spindelgift Nocodazol behandelt. Nach Behandlung mit Nocodazol bzw. im *cdc15-2* Arrest sind sowohl Cdc14 also auch Net1 hyperphosphoryliert, d.h. die Kinase für beide Proteine ist zu diesem Zeitpunkt aktiv. Im *cdc5-1* Arrest dagegen sind beide Proteine nicht phosphoryliert. Theoretisch könnte eine zusätzliche Kinase postuliert werden, die nur im *cdc5*-Arrest inaktiv ist, aber im Cdc15-Arrest aktiv sein sollte. Beide Arrestpunkte sind aber bei den meisten untersuchten Parametern nicht unterscheidbar. Die Existenz einer solchen hypothetischen Kinase ist sehr unwahrscheinlich, aber nicht ganz ausgeschlossen.

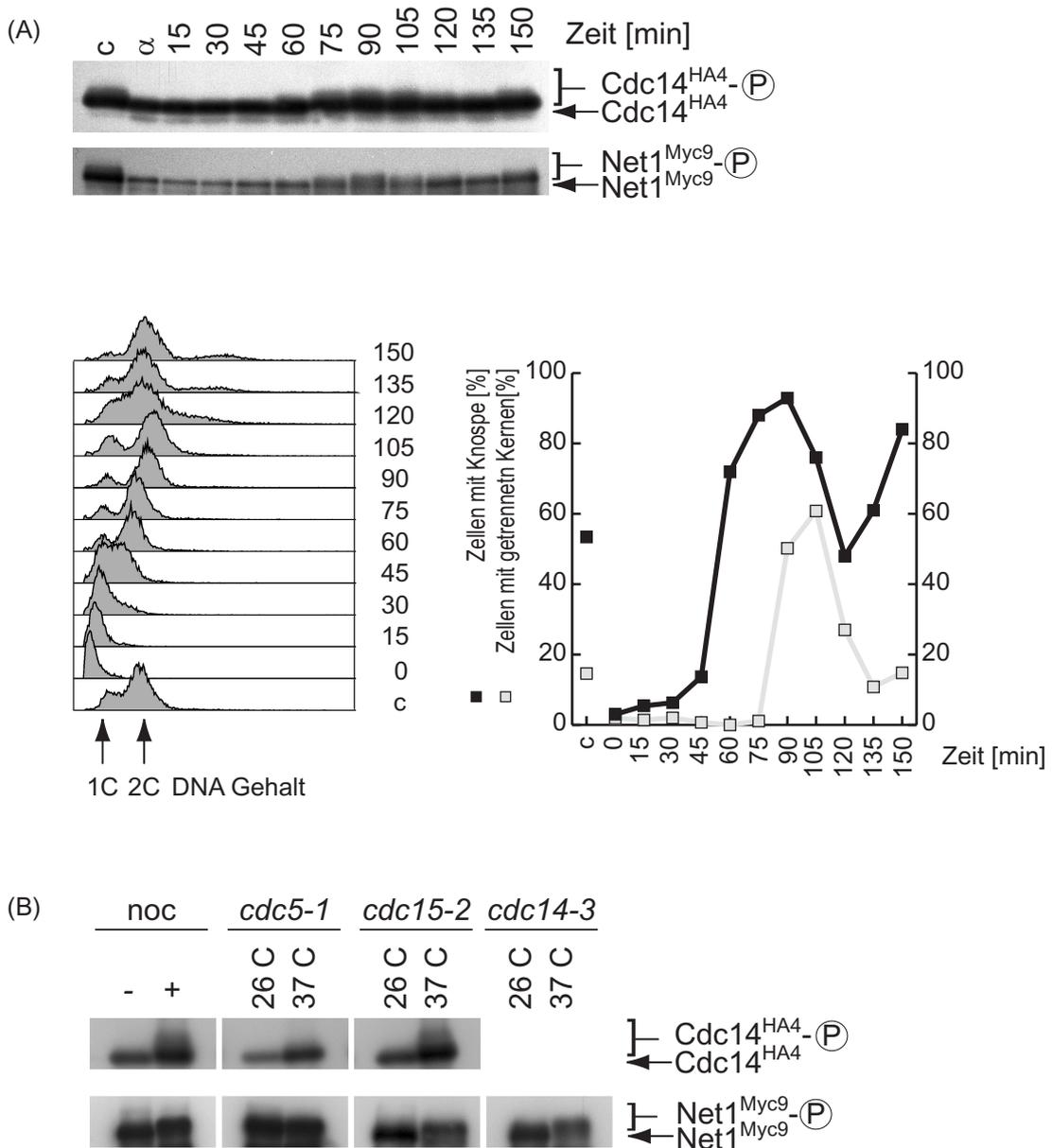


Abbildung 32

Die Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 ist zellzyklusabhängig reguliert. (A) Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 im Verlauf des Zellteilungszyklus. Zellen des Stammes W2137 (*NET1^{Myc9}-K.I.TRP1 CDC14^{HA4}-LEU2 Δbar1-HIS3*) wurden durch Behandlung mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1 Phase arretiert und anschließend synchron in den Teilungszyklus entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Der Phosphorylierungsstatus von Cdc14^{HA4} und Net1^{Myc9} wurde durch Western Blot Analyse (12CA5 bzw. 9E10) untersucht. Zur Bestimmung des Zellzyklusstadiums wurde der Knospungsindex nach DAPI-Färbung bzw. der DNA-Gehalt mittels Durchflußcytometrie bestimmt. (B) Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 in verschiedenen Zellzyklusarresten. Zellen der Stämme W2137 (*NET1^{Myc9}-K.I.TRP1 CDC14^{HA4}-LEU2 Δbar1-HIS3*), W1664 (*CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2 cdc5-1*), W1665 (*CDC14::CDC14^{HA4}-LEU2 cdc15-2*) und W2374 (*NET1^{Myc9}-K.I.TRP1 cdc14-3*) wurden vor bzw. nach Behandlung mit Nocodazol (noc) oder Inkubation bei 37°C geerntet. Mittels Western Blot Analyse (12CA5 bzw. 9E10) wurde der Phosphorylierungsstatus von Cdc14^{HA4} und Net1^{Myc9} bestimmt.

7.11.10. Zwei Wege innerhalb des MEN

Diese Daten entstammen einer Zusammenarbeit mit Melanie Neutzner. Ziel war es, die Anordnung der einzelnen Komponenten innerhalb des MEN aufzuklären. Eine erste Beobachtung, dass es sich beim MEN nicht um einen klassischen Signaltransduktionsweg handelt, sondern mehr um ein Netzwerk mit verschiedenen Wechselwirkungen, war die Suppression der *cdc5-1* Mutation durch eine Deletion von *BUB2*. Bub2 ist Teil des negativen Regulators des G-Proteins Tem1. Die Deletion von *BUB2* sollte also ein Aktivierung von Tem1 bewirken. Wurde nun Bub2 im *cdc5-1* Hintergrund deletiert, war der Stamm in der Lage bei restriktiver Temperatur wieder zu wachsen. In ein genetisches Schema übertragen bedeutet dieses Ergebnis, dass Cdc5 entweder unterhalb von Tem1 oder in einem parallelen Weg dazu wirksam ist (persönliche Mitteilung von Melanie Neutzner). Daten von anderen Arbeitsgruppen deuten auf eine enge Verbindung zwischen Cdc15 und Tem1 hin. So rettet die Überexpression von *CDC15* die Deletion von Tem1; weiterhin lässt sich eine direkte Interaktion zwischen Tem1 und Cdc15 nachweisen (Pereira et al. 2000). Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch nicht geklärt. Nach der Aktivierung von Cdc15 kommt es zur Aktivierung der Dbf2-Kinase durch eine Cdc15-abhängige Phosphorylierung. Es gibt starke Hinweise, dass Tem1 Cdc15 reguliert welches seinerseits Dbf2 aktiviert. Dies wirft die auf Frage wo genau Cdc5 in diesen Weg eingeordnet werden kann. Wie in 7.11.4 gezeigt, kann Cdc5 genetisch gesehen nur neben oder unterhalb von Cdc15 und Dbf2 aber nicht oberhalb wirken. Eine mögliche Erklärung für diese

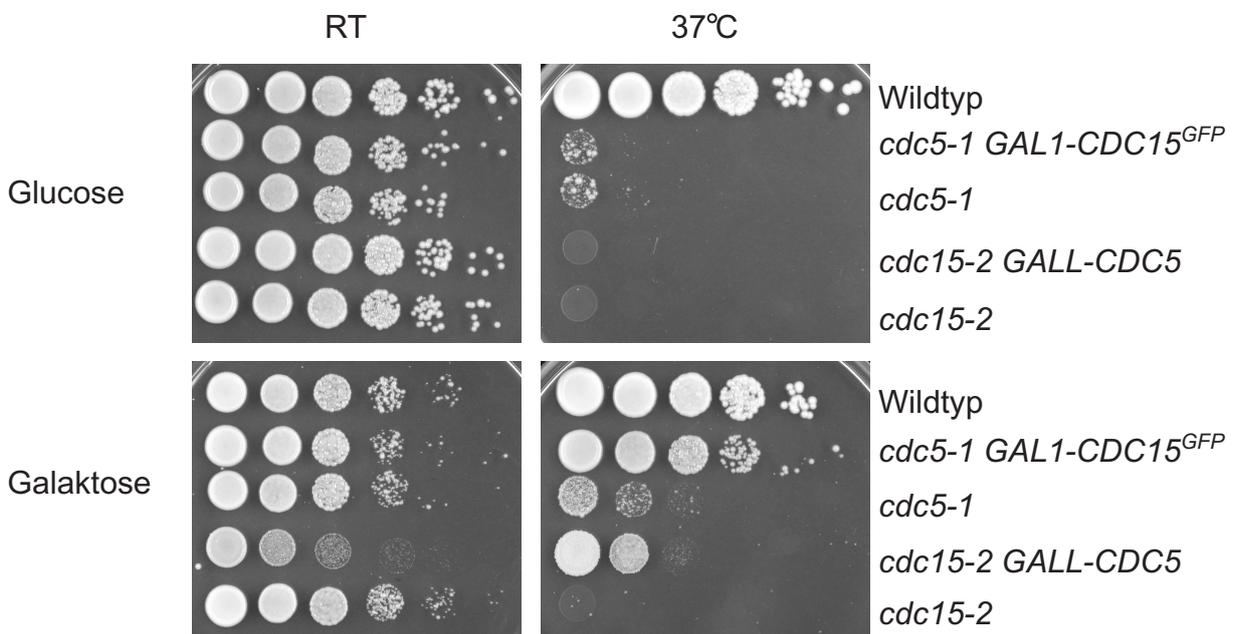


Abbildung 33

Zwei Wege innerhalb des MEN. Um wechselseitige Suppression von Cdc5 und Cdc15 zu untersuchen wurden Wachstumstests auf Vollmediumsplatten mit bzw. ohne Induktion von Überexpressionskonstrukten verwendet. Zellen der Stämme K699 (wt), W1582 (*cdc5-1 ura3::GAL1-CDC15^{GFP}-URA3*), W977 (*cdc5-1*), W2734 (*MATa ura3::GALL-CDC5 cdc15-2*), W9313 (*cdc15-2*) wurden ausgehend von $3 \cdot 10^6$ Zellen in einer 1:10 Verdünnungsreihe auf Vollmediumsplatten mit Glucose bzw. Galaktose aufgetropft. Die Agarplatten wurden bei Raumtemperatur inkubiert.

Beobachtung ist ein paralleler Weg, auf dem Cdc5 den Austritt aus der Mitose aktivieren kann. Ein genetischer Hinweis für einen parallelen Weg ist die sog. wechselseitige Suppression. Wie Abbildung 33 zeigt, rettet die Überexpression von *CDC15* den letalen Phänotyp einer *cdc5-1* Mutante. Die Zellen sind wieder in der Lage bei restriktiver Temperatur zu wachsen. Auch kann die schwache Überexpression von *CDC5* vom galaktoseinduzierbaren *GALL*-Promotor partiell den Defekt einer *cdc15-2* Mutante bei 37°C retten. Trotz der schwachen Überexpression von Cdc5 schadet diese den Zellen, deshalb ist es auch nicht verwunderlich, dass nur eine partielle Suppression von *cdc15-2* erreicht wird. Eine plausible Erklärung für diesen Befund ist, dass Cdc5 und Cdc15 auf unterschiedlichen nicht essentiell voneinander abhängigen Wegen den Austritt aus der Mitose bewerkstelligen können. Cdc14 und der Austritt aus der Mitose stehen demnach unter mindestens zweifacher Kontrolle. Keiner der Wege allein kann unter physiologischen Bedingungen den Austritt aus der Mitose bewirken. Zusammen bzw. nur bei starker Aktivierung eines der Wege wird das Ende der Mitose eingeleitet.

8. Diskussion

Hauptregulatoren des Zellteilungszyklus eukaryotischer Zellen sind die zyklinabhängigen Kinasen (Übersichten in Morgan 1997, Nigg 2001). Wichtige Schritte im Teilungszyklus werden vollzogen durch die Aktivierung bzw. Inaktivierung dieser Kinasen. Ein solcher Schritt ist der Austritt aus der Mitose und der Übergang in den nächsten Teilungszyklus. Für diesen Vorgang ist das vollständige Abschalten der zyklinabhängigen Kinase essentiell. Reguliert wird der Austritt aus der Mitose durch das Signaltransduktionsnetzwerk MEN (mitotic exit network) (Übersichten in Cerutti & Simanis 2000, Bardin & Amon 2001, McCollum & Gould 2001). Mitglieder dieses Signalweges sind die Kinasen Cdc15, Cdc5 und Dbf2 mit seinem Bindungspartner Mob1, das G-Protein Tem1 mit seinen Regulatoren Lte1 und Bfa1/Bub2 und die Phosphatase Cdc14. Cdc14 ist der Effektor des MEN und eine wichtige Aufgabe des MEN besteht in der Aktivierung dieser Phosphatase. Cdc14 wirkt antagonistisch zur zyklinabhängigen Kinase. Zielsubstrate für Cdc14 sind Proteine, die durch CDK phosphoryliert wurden. So führt die Aktivierung von Cdc14 zum Anschalten der APC^{Hct1} abhängigen Proteindegradation und zur Aktivierung des Inhibitors zyklinabhängiger Kinasen (CKI) Sic1. Beides zusammen führt zum Abschalten der CDK und schafft damit die Voraussetzung für den Austritt aus der Mitose.

8.1. Die Funktionen von Cdc14

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aufgaben von Cdc14 am Ende der Mitose näher zu charakterisieren. Der Einfluss von Cdc14 auf die Aktivierung des APC und das Zusammenspiel mit den MEN-Kinasen Cdc15 und Dbf2 wurde untersucht.

8.1.1. Cdc14 aktiviert den APC

Zwei Vorgänge führen zum Austritt aus der Mitose und zum Übergang in den nächsten Teilungszyklus. Zum einen muss die Ubiquitinligase APC^{Hct1} aktiviert werden, zum anderen wird der Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen Sic1 in seiner Menge positiv reguliert. Beides wird durch das Signaltransduktionsnetzwerk am Ende der Mitose über die Effektorphosphatase Cdc14 gesteuert.

Hct1 ist ein Substratspezifitätsfaktor für den APC und ist essentiell für die Erkennung und Degradation von mitotischen Zyklinen wie Clb2 (Schwab et al. 1997, Zachariae et al. 1998b, Schwab et al. 2001). Hct1 wird von zyklinabhängigen Kinasen phosphoryliert und somit inaktiviert. Denn nur unphosphoryliertes Hct1 ist in der Lage, seine Substrate an den APC zu bringen. Dephosphorylierung von Hct1 wäre dann ein Schalter, um den Beginn der Degradation mitotischer Zykline einzuleiten. Wie in 7.3 zu sehen, führt die Überexpression von *CDC14* zur Degradation des B Typ Zykline Clb2 (Neutzner 1998, Visintin et al. 1998). Ein Mechanismus, der diese Beobachtung erklärt zeigt Abbildung 11. Die Behandlung von Phospho-Hct1 mit Cdc14 Phosphatase in vitro führt zur Dephosphorylierung von Hct1. Cdc14 verursacht die Degradation von Clb2 durch Dephosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung von Hct1. Die Überexpression von *CDC14* verursacht aber nicht nur die Degradation von

Clb2, sondern auch die der Polokinase Cdc5 (s. 7.4.1). Cdc5 ist wie auch Clb2 ein Substrat für APC^{Hct1}. Demzufolge kann für die Degradation der Polokinase derselbe Hct1-abhängige Mechanismus der Cdc14-induzierten Degradation postuliert werden.

Neben den Hct1-Substraten Clb2 und Cdc5 werden aber auch die Mengen der Zykline Clb3 und Clb5 und die Mengen des Anaphaseinhibitors Pds1 durch Überproduktion von Cdc14 vermindert (s. 7.4). Für Clb3 ist bekannt, dass es zu einem Teil von APC^{Hct1} erkannt werden kann. Seine Degradation lässt sich folglich mit dem oben beschriebenen Mechanismus erklären. Für Clb5 und Pds1 ist die Situation anders. Aus früheren Überexpressionstudien ist klar, dass diese beiden Proteine nicht durch den APC^{Hct1}, sondern nur durch den APC^{Cdc20} der Degradation zugeführt werden (Schulze Lutum 1999). Neuere Interaktionsstudien zeigen weiterhin (Schwab et al. 2001, Hilioti et al. 2001), dass nur Cdc20 aber nicht Hct1 mit Clb5 und Pds1 interagiert. Trotzdem lässt sich die Cdc14-vermittelte Degradation von Clb5 und Pds1 nur durch die Deletion von *HCT1* und nicht durch die Mutation von *CDC20* blockieren. Der existierende Widerspruch zwischen diesen beiden Beobachtungen lässt sich auf zwei Wegen erklären. Eine Erklärung wäre, dass Cdc14 die Aktivierung von Cdc20 auf bisher unverstandene Weise bewirkt. Diese Cdc20-Aktivierung wäre aber von Hct1 abhängig. Schließlich blockiert die Deletion von *HCT1* die Degradation von Clb5 und Pds1 (s. 7.4.2, 7.4.3). Denkbar wäre die Hct1-induzierte Degradation eines hypothetischen Inhibitors für Cdc20. Eine andere Erklärung für die Cdc14-induzierte Degradation von Clb5 und Pds1 wäre folgende: Cdc14 ist in der Lage Hct1 bzw. diese Substrate in einer solchen Weise zu modifizieren, dass Hct1 auch diese Substrate der Ubiquitinierung durch den APC zuführen kann. Die zweite Erklärung wird unterstützt von der Tatsache, dass Hct1 ein Dosissuppressor für die *cdc20-1* Mutation ist (Schwab 1996). D.h. ein Übermaß an Hct1 ist in der Lage, *cdc20-1* Mutanten zu Wachstum bei restriktiver Temperatur zu verhelfen. Ebenso wie hohe Mengen Hct1 supprimiert die gleichzeitige Deletion von *PDS1* und die von *CLB5* ebenfalls eine *CDC20* Mutation (Shirayama et al. 1999). Pds1 und Clb5 sind demnach die einzigen essentiellen Substrate für APC^{Cdc20}. Da die Degradation von Pds1 und Clb5 essentiell für das Fortschreiten des Teilungszyklus ist, muss Hct1 zur Suppression von *cdc20-1* sowohl die Degradation von Pds1 als auch von Clb5 vermitteln können. Es ist denkbar, dass hohe Mengen an Cdc14 Bedingungen schaffen, die das Potential von Hct1 zur Erkennung von Pds1 und Clb5 ermöglichen. Die physiologische Relevanz der Cdc14-vermittelten Pds1-Degradation ist zunächst unklar. Die Proteolyse von Pds1 leitet den Beginn der Anaphase ein. Zu diesem Zeitpunkt ist Cdc14 nach dem heutigen Modell aber noch im Nucleolus lokalisiert und inaktiv. Literaturdaten (Cohen-Fix & Koshland 1999) zeigen aber, dass Pds1 zu Beginn der Anaphase nicht vollständig degradiert wird. Ein bestimmter Anteil persistiert und soll den Beginn der Zyklindegradation durch Inhibition von Hct1 verhindern. Demnach könnte die beobachtete Cdc14-vermittelte Pds1-Degradation einen Mechanismus aufzeigen, über den dieser Rest an Pds1 entfernt wird, damit der Austritt aus der Mitose stattfinden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cdc14 ein genereller Aktivator des APC ist. Es kann die Degradation sowohl früher als auch später Substrate einleiten und bewirkt dadurch das

vollständige Abschalten der zyklinabhängigen Kinase und leitet so den Übertritt in die nächste G1 Phase ein.

8.1.2. Cdc14 aktiviert Sic1

Das Abschalten der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose wird nicht nur durch die Degradation, sondern auch die Inhibition der CDK durch Sic1 hervorgerufen. Beide Mechanismen ergänzen sich bei dieser Aufgabe (Schwab et al. 1997).

Cdc14 beeinflusst nicht nur wie oben beschrieben die Degradation der Zykline, sondern auch die Inhibition der zyklinabhängigen Kinase durch Sic1.

Wie schon früher gezeigt, verursachen hohe Mengen an Cdc14 den Anstieg von Sic1 (Neutzner 1998). Diese Aktivierung von Sic1 beruht nicht auf einem indirekten Mechanismus, sondern auf der direkten transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation von Sic1 (s. 7.5). Wie von Visintin gezeigt (Visintin et al. 1998), kann Cdc14 Sic1 dephosphorylieren und damit stabilisieren. Phospho-Sic1 ist ein instabiles Protein, da es von der Ubiquitinligase SCF^{Cdc4} erkannt und anschließend degradiert wird. Die direkte Dephosphorylierung von Sic1 durch Cdc14 kann also den Cdc14-abhängigen Anstieg von Sic1 erklären. Ein denkbarer indirekter Mechanismus (s. 7.3), demzufolge der Sic1-Anstieg durch das Abschalten der CDK nach Degradation der mitotischen Zykline erklärt werden könnte, konnte ausgeschlossen werden. Die Überexpression von *CDC14* in Stämmen mit defektem APC (*cdc23-1*) zeigte, dass der Cdc14-vermittelte Sic1-Anstieg von der Degradation der mitotischen Zykline entkoppelt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *SIC1*-mRNA unter Bedingungen hoher Cdc14 Mengen ansteigt (s. 7.5). Cdc14 aktiviert Sic1 also auch auf transkriptioneller Ebene. Und in der Tat konnte gezeigt werden, dass Cdc14 eine Phosphatase für den Transkriptionsfaktor Swi5 ist (Visintin et al. 1998). Swi5 wird normalerweise von CDK phosphoryliert und lokalisiert in dieser Form im Zytoplasma. Unphosphoryliertes Swi5 dagegen kann in den Kern gelangen und dort die Transkription seiner Zielgene – unter anderem Sic1 – bewirken.

Die gemachten Beobachtungen und die genannten Literaturdaten unterstützen das Modell, dass Cdc14 als Effektor des MEN wirkt und die Aktivierung der Hct1-abhängigen Degradation und die Inhibition der zyklinabhängigen Kinase durch Sic1 zu seinen Aufgaben zählt.

8.1.3. Cdc14 beeinflusst die Transkription am M/G1-Übergang

Neben der Stimulation der Sic1-Transkription bewirkt Cdc14 auch die Expression verschiedener anderer Gene (s. 7.5, Fellenberg et al. 2001). Dazu gehören das Gen *CTS1* für eine Endochitinase, die zellzyklusregulierten Gene *RME1*, *CRH1* und *PST1*. Des weitern stimuliert Cdc14 die Expression der Gene *YBR071W*, *PIR1*, *YGR086C*, *YLR194C* und *YFL006W*. Von diesen Genen wurde gezeigt, dass sie am M/G1-Übergang exprimiert werden (Spellman et al. 1998). Cts1 ist eine Endochitinase, die eine Rolle beim Umbau der Zellwand im Zuge der Zytokinese haben soll (Kuranda et al. 1991). Die Aufgabe der anderen aktivierten Gene ist unklar, aber sie werden zu einem Zeitpunkt während des normalen Teilungszyklus transkribiert, der vermuten lässt, dass sie ebenfalls eine Funktion am Ende der Mitose haben.

Neben seiner Aufgabe bei der Aktivierung des APC löst Cdc14 ein Transkriptionsprogramm aus, das wahrscheinlich am Austritt aus der Mitose und an der Zytokinese beteiligt ist.

8.1.4. Cdc14 und die Kinase Cdc15

Die Kinase Cdc15 ist Bestandteil des Signaltransduktionswegs am Ende der Mitose und ist essentiell für den M/G1-Übergang. Cdc15 zeigt ein interessantes Lokalisierungs- und Modifikationsmuster. Während des ganzen Teilungszyklus von der G1 bis zur Telophase befindet sich Cdc15 an dem Spindelpol, der in der Mutterzelle verbleibt. Außerdem ist Cdc15 während dieser ganzen Zeit phosphoryliert. Erst nach der Freisetzung von Cdc14, an der Cdc15 beteiligt ist, kommt es zu einer Dephosphorylierung von Cdc15 und seiner Lokalisation am Spindelpol in der Tochterzelle. Dieses Lokalisierungsmuster ist nicht unumstritten in der Literatur (Cenamor et al. 1999, Xu et al. 2000). Die von uns beobachtete Lokalisierung erfolgte mit GFP markiertem endogenen Cdc15 in lebenden Zellen. Dies kommt der in vivo Situation am nächsten und sollte auch die authentische Lokalisierung von Cdc15 zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass Cdc14 die Phosphatase für Cdc15 ist und aller Wahrscheinlichkeit nach die Dephosphorylierung von Cdc15 durch Cdc14 einer der Auslöser ist für die Lokalisation am Spindelpol in der Knospe. Vermutlich hängt diese Lokalisierung von Cdc15 an beiden Spindelpolen zusammen mit seiner Funktion bei der Zytokinese. Wird nämlich diese Lokalisierung verhindert, so führt dies zu einem starken Zytokinesedefekt (Menssen et al. 2001). Ein weiterer Hinweis, dass Cdc15 an der Regulation der Zytokinese beteiligt ist, kommt aus dem Vergleich mit dem orthologen *cdc7* aus *S. pombe*. Diese Kinase ist notwendig für die Septumbildung und damit für die Zytokinese (Übersicht in Bardin & Amon 2001).

Cdc14 reguliert aber nicht nur Cdc15, sondern die Phosphatase wird ihrerseits offensichtlich auch von Cdc15 reguliert. Zellen mit einem defekten Cdc15 (*cdc15-2*) arretieren am Ende der Mitose mit lokalisiertem Cdc14 (Visintin et al. 1999). Dies bedeutet, dass Cdc15 seinerseits für die Aktivierung von Cdc14 nötig ist. Der genaue Mechanismus dieser Cdc15-abhängigen Aktivierung von Cdc14 ist unbekannt. Aber ein gängiges Modell in der Literatur postuliert, dass nachdem Cdc15 von Tem1 aktiviert worden ist, dies seinerseits den Kinasekomplex Dbf2-Mob1 positiv beeinflusst. Dieses Ereignis soll dann zur Aktivierung von Cdc14 führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cdc14 nach seiner Aktivierung durch Cdc15 seinerseits Cdc15 beeinflusst und diesem so eine neue Funktion bei der Zytokinese zuweist.

8.1.5. Cdc14 und die Kinase Dbf2

Die Kinase Dbf2 gehört wie auch Cdc15 zum Signaltransduktionsnetzwerk am Ende der Mitose und ist essentiell für die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus. Dbf2 erfüllt aber auch noch weitere Aufgaben; so ist diese Kinase integraler Bestandteil des Ccr4 Transkriptionskomplexes (Liu et al. 1997), der für die Genexpression am M/G1-Übergang wichtig ist. Weiterhin ist bekannt, dass Dbf2 in der Telophase in Abhängigkeit der MEN Proteine Cdc15, Cdc5 und Cdc14 am Mutter/Tochter-Übergang lokalisiert. Dies legt eine Funktion für Dbf2 bei der Durchführung der Zytokinese nahe (Frenz et al. 2000).

Wichtig für die Aktivität von Dbf2 ist dessen Interaktionspartner Mob1 (Mah et al. 2001). Erst in Verbindung mit Mob1 bildet Dbf2 einen Kinasekomplex, der von Cdc15 erkannt und durch Phosphorylierung aktiviert werden kann. Dieser aktive Kinasekomplex soll seinerseits auf unbekannte Weise die Aktivierung von Cdc14 bewirken.

Cdc14 wird aber nicht nur von Dbf2 reguliert; möglicherweise existiert auch eine Regulation von Dbf2 durch Cdc14. In 7.7 ist gezeigt, dass Cdc14 die Dephosphorylierung von Dbf2 bewirken kann. Möglicherweise besteht wie bei Cdc15 ein Zusammenhang zwischen der Cdc14-abhängigen Dephosphorylierung von Dbf2 und einer Funktion bei der Zytokinese. Zumal die Lokalisierung am Septinring abhängig von aktivem Cdc14 ist. Dies ist aber nur eine hypothetische Annahme und bedarf noch der weiteren Überprüfung.

8.1.6. Cdc14 und Septine

Septine sind Strukturproteine an der Verbindungsstelle zwischen Mutter- und Tochterzelle (Übersicht in Field et al. 1999). Als solche sind sie essentiell für den richtigen Zusammenbau der Zytokinesemaschinerie - insbesondere des kontraktiven Actomyosinrings - an dieser Stelle. Wie oben beschrieben haben viele Proteine des MEN neben ihrer Aufgabe bei der Aktivierung der Phosphatase Cdc14 eine weitere wichtige Funktion bei der Durchführung der Zytokinese. Die Untersuchung der Auswirkung hoher Cdc14-Mengen ergab, dass aktives Cdc14 ausreicht, damit Zytokinese stattfindet (s. 7.8). So konnte in Zellen, die sich durch Behandlung mit dem Spindelgift Nocodazol in einem Metaphasearrest befanden, allein durch die Überexpression von *CDC14* eine Art Zytokinese ausgelöst werden. Die Instabilität des Septinrings unter Bedingungen hoher Cdc14-Aktivität deutet in die gleiche Richtung. Nach der Zytokinese gibt es einen kurzen Zeitraum in der G1 Phase während dem kein Septinring in der Zelle nachweisbar ist. Erst nach der Auswahl der zukünftigen Knospungsstelle bildet sich der Septinring aufs neue. Das Auflösen der Septinringe zeigt, dass hohe Mengen an Cdc14 ausreichen, um Zellen in einen G1 Zustand zu bringen. Dies zeigte auch die Tatsache (Neutzner 1998), dass die Überproduktion von Cdc14 in G1-Zellen zu einer Inhibition der S-Phase führt. Die Zellen verharren also in der G1 Phase.

Hier zeigt sich wiederum, dass Cdc14 nicht nur eine Funktion beim Austritt aus der Mitose hat, sondern auch an der Regulation der Zytokinese beteiligt ist.

8.2. Mögliche Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase

Hauptregulator des Zellteilungszyklus ist die zyklinabhängige Kinase. Für den Übertritt von der M in die nächste G1 Phase muss die zyklinabhängige Kinase abgeschaltet werden (Übersicht in Nigg 2001). Die Proteine Hct1 und Sic1, die diesen Schritt bewirken, stehen unter negativer Kontrolle der zyklinabhängigen Kinase selbst (Zachariae et al. 1998b, Übersicht in Deshaies & Ferrel 2001). Eine hohe Aktivität der zyklinabhängigen Kinase verhindert somit ihre eigene Abschaltung.

Nach dem gängigen Modell des MEN ist die Lokalisierung von Cdc14 im Nucleolus durch Bindung an Net1 der entscheidende regulatorische Mechanismus für Cdc14 (vgl. 3.4.3). Nichtsdestotrotz ist die Deletion von *NET1* und die damit verbundene Freisetzung von Cdc14 nicht letal (Shou et al. 1999). Deshalb muss eine andere Ebene der negativen Regulation von Cdc14 postuliert werden. Im Rahmen der Arbeit wurde deshalb die Möglichkeit einer Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase selbst untersucht. Die naheliegende Vermutung der negativen Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase konnte nicht bestätigt werden; vielmehr ergab sich ein komplexes Bild der Regulation von Cdc14.

Ausgangspunkt der Untersuchung war die Beobachtung, dass Clb2-assoziierte Kinase in der Lage ist, heterolog produziertes Cdc14 *in vitro* zu phosphorylieren (s. 7.10.1). Cdc14 ist also ein potentiell Substrat für die zyklinabhängige Kinase. Die Konsensusstelle für Phosphorylierung durch die zyklinabhängige Kinase ist ein Serin- bzw. Threoninrest gefolgt von einem Prolinrest. Cdc14 besitzt sechs solcher potentielle Erkennungsstellen für die CDK. Der Austausch dieser sechs Serin bzw. Threoninrest gegen Alanin ergab ein Cdc14-Derivat (Cdc14-M6, s. 7.10.2), das *in vitro* nicht mehr von CDK phosphoryliert werden konnte. Die oben beschriebene CDK-abhängige Phosphorylierung von Cdc14 ist also spezifisch und findet an mehreren der genannten Konsensusstellen statt (s. 7.10.3). Überexpressionstudien mit verschiedenen *CDC14*-Derivaten ergaben, dass die Stellen fünf und sechs – eine oder beide zusammen - wichtig sind für die Einleitung der Degradation von Zyklinen (s. 7.10.4). Können diese Stellen nicht mehr phosphoryliert werden, so führen hohe Mengen an Cdc14 nicht mehr zur Degradation von Clb2. Der Anstieg von Sic1 dagegen bleibt von dieser Mutation unbeeinflusst. Dieser kann nach Überexpression von *CDC14-5/6* immer noch beobachtet werden. Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Interpretationen. Die Phosphorylierung von Cdc14 an den Stellen fünf und sechs sind wichtig für seine Funktion bezüglich der Aktivierung der Degradationsmaschinerie. Die Aktivierung von Sic1 wäre dann unabhängig von dieser Modifikation von Cdc14. Eine andere mögliche Erklärung für die gemachten Beobachtungen wäre folgende: Die Zerstörung der fünften und sechsten Phosphorylierungsstelle führt zu einer vollständigen Inaktivierung von Cdc14. Dagegen spricht die Beobachtung, dass die Überproduktion von Cdc14-5/6 weiterhin einen Anstieg von Sic1 verursachen kann. Allerdings bewirkt auch die Überexpression von enzymatisch inaktivem *CDC14i* (vgl. 7.9) einen Anstieg von Sic1 ohne die Degradation von Clb2 einzuleiten. Es könnte sich also bei Cdc14-5/6 tatsächlich um eine inaktive Form von Cdc14. Dagegen spricht aber, dass sich diese beiden Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Cdc14 befinden. Dieser C-Terminus kann aber vollständig entfernt werden (s. 7.10.4) und Cdc14 ist weiterhin in der Lage, die Degradation von Clb2 und den Anstieg von Sic1 auszulösen. Offensichtlich ist der C-Terminus von Cdc14 nicht essentiell für seine Funktion. Dies könnte als Hinweis gewertet werden, dass die Mutation der fünften und sechsten Phosphorylierungsstelle nicht zu einem enzymatisch inaktiven Protein führt, sondern dass diese beiden Stellen wirklich phosphoryliert sein müssen, damit Cdc14 Clb2-Degradation auslösen kann.

Die Interpretation, dass die Cdc14 an der fünften und/oder sechsten CDK-Erkennungsstelle

phosphoryliert sein muss, steht im Gegensatz zur Eingangsvermutung der negativen Regulation von Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase. Die Beobachtung, dass die zyklinabhängige Kinase aber auch durchaus ihre Gegenspieler aktivieren kann ist aber nicht ungewöhnlich. So ist für die Aktivierung des APC^{Cdc20} eine aktive zyklinabhängigen Kinase nötig (Rudner et al. 2000a, Rudner & Murray 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Daten auf eine Regulation der Phosphatase Cdc14 durch die zyklinabhängige Kinase hindeuten. Aufgrund der komplexen Beobachtungen lässt sich aber auch die Möglichkeit nicht vollständig ausschließen, dass die zyklinabhängige Kinase keinen direkten Einfluss auf die Aktivität von Cdc14 besitzt.

8.3. Regulation von Cdc14 durch die Polokinase Cdc5

Die Aktivierung der Phosphatase Cdc14 zu Beginn der Anaphase ist Voraussetzung für den Austritt aus der Mitose. Cdc14 lokalisiert von G1 bis zur Anaphase im Nucleolus. Dort wird es von seinem spezifischen Inhibitor Net1 verankert. Die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus wird vom Signaltransduktionsnetzwerk MEN reguliert.

Ein Mitglied des MEN ist die Polokinase Cdc5. Die Polokinase ist ein multifunktionelles Protein und besitzt Aufgaben vom Beginn der Anaphase bis zur Durchführung der Zytokinese. So wird die Trennung der Schwesterchromatiden durch die Phosphorylierung des Kohäsins Scc1 durch Cdc5 stark begünstigt (Alexandru et al. 2001). Weiterhin besitzt Cdc5 eine Rolle bei der Aktivierung des APC (Charles et al. 1998) und ist an der Regulation des Austritts aus der Mitose beteiligt. Zudem ist die Lokalisierung von Cdc5 am Spindelpol und am Mutter/Tochter-Übergang essentiell für eine produktive Zytokinese (Song et al. 2000, Song et al. 2001).

Im Rahmen der Arbeit wurde die Rolle von Cdc5 bei der Regulation des Austritts aus der Mitose näher untersucht. Die Ausgangsbeobachtung war, dass erhöhte Mengen an Cdc5 zur Akkumulation des Inhibitors zyklinabhängiger Kinasen Sic1 führen (s. 7.11.1). Derselbe Effekt kann auch durch Überexpression von *CDC14* hervorgerufen werden. Die Annahme lag nahe, dass Cdc5 über Aktivierung von Cdc14 diesen Sic1-Anstieg hervorruft. In der Tat verhindert die Mutation von *CDC14* (*cdc14-3*) und die Überexpression des Cdc14-Inhibitors *NET1* diesen Cdc5-induzierten Sic1-Anstieg (s. 7.11.3). Cdc5 reguliert demnach Sic1 über die Aktivierung von Cdc14. Eine Aktivierung von Cdc14 muss aber mit der Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus in den gesamten Kern einhergehen. Und tatsächlich, nach Überexpression von *CDC5* findet sich in einem Großteil der Zellen Cdc14 nicht mehr im Nucleolus, sondern ist über den ganzen Kern verteilt (s. 7.11.5). Diese Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus konnte durch eine unabhängige Herangehensweise bestätigt werden. Unter Bedingungen hoher Cdc5-Kinase ist der Komplex aus Cdc14 und Net1 aufgelöst (s. 7.11.6). Da hohe Mengen an Cdc5 zur Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 führen ist es wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von Cdc14 und/oder Net1 für dieses Auflösen des Komplexes verantwortlich ist. Die Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 nach Überexpression von *CDC5* beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf einer direkten Phosphorylierung dieser beiden Proteine durch Cdc5-Kinase. In vitro Studien haben nämlich gezeigt, dass Cdc5 Cdc14 und Net1 direkt zu

phosphoryliert. Weiterhin hängt die Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 von funktionellem Cdc5 ab. Im *cdc5-1* Hintergrund liegen beide Proteine in unphosphorylierter Form vor. Eine andere Interpretation lässt sich aber nicht ganz ausschließen: Cdc5 könnte auch eine andere unbekannte Kinase aktivieren, die ihrerseits Cdc14 und Net1 phosphoryliert. Die Tatsache, dass die Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 mit dem Beginn der Anaphase zusammenfällt (s. 7.11.9) unterstützt die Hypothese des Verlust der Interaktion zwischen Cdc14 und Net1 durch eben diese Modifikation. Cdc14 wird nach dem Beginn der Anaphase aus dem Nucleolus freigesetzt und zum gleichen Zeitpunkt werden beide Proteine modifiziert.

Cdc5 bewirkt demnach den Austritt aus der Mitose durch direkte Aktivierung von Cdc14, indem es zu dessen Freisetzung aus dem Nucleolus beiträgt. Dies könnte auch die beobachtete Aktivierung des APC erklären. Von Cdc5 aktiviertes Cdc14 dephosphoryliert Hct1 und führt somit zu seiner und zur Degradation von Clb2 durch den APC^{Hct1}. Die Aktivierung von Cdc14 durch Cdc5 erklärt auch die beobachtete Sic1-Akkumulation nach Überexpression der Polokinase.

Die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus durch die Aktivität von Cdc5 ist aber nicht der alleinige Weg zur Aktivierung dieser Phosphatase. Auch die anderen Proteine des MEN sind essentiell für diese Aktivierung. Ohne die Wirkung von Tem1, Cdc15 und Dbf2 bleibt Cdc14 unter normalen Bedingungen im Nucleolus lokalisiert. Dies führt zu einem Modell der zwei Wege innerhalb des MEN, die gemeinsam zum Austritt aus der Mitose führen. Demnach geschieht die Freisetzung von Cdc14 aus dem Komplex mit Net1 nach Integration mehrerer Signale. Eines dieser Signale ist die Phosphorylierung des Komplexes durch Cdc5; bei starker Überbetonung dieses Signals reicht dies zur Aktivierung von Cdc14 aus. Ein anderes Signal wird vermutlich über den Tem1, Cdc15, Dbf2-Weg vermittelt. Zusammen mit möglicherweise weiteren Signalen führt das Signaltransduktionsnetzwerk MEN zur Freisetzung und Aktivierung von Cdc14. Gestützt wird dieses Modell der zwei Wege durch die Beobachtung der wechselseitigen Suppression zwischen Cdc5 und Cdc15 (s. 7.11.10). Sowohl Cdc5 als auch Cdc15 sind in der Lage bei Überproduktion den Defekt der jeweils anderen Kinase auszugleichen. Ein solches Verhalten wird - in ein genetisches Schema übertragen - als Hinweis auf zwei parallele Wege gedeutet.

8.4. Modell der Vorgänge am Ende der Mitose

Die regulatorischen Vorgänge, die am Austritt aus der Mitose und den Übergang in die nächste G1-Phase beteiligt sind, sind vielfältig. Essentiell für diesen Übergang ist das Abschalten der zyklinabhängigen Kinase. Dieser Vorgang wird reguliert von einem Signaltransduktionsweg zu dem die Kinasen Cdc5, Cdc15, Dbf2-Mob1, das G-Protein Tem1 mit seinen Regulatoren Bub2-Bfa1 (GAP – negativer Regulator) und Lte1 (GEF – positiver Regulator) und die Phosphatase Cdc14 gezählt werden (Jaspersen et al. 1998, Übersichten in Cerutti & Simanis 2000). Die meisten dieser Proteine besitzen zwei Funktionen bei der Beendigung des Zellteilungszyklus (Übersichten in McCollum & Gould 2001, Bardin & Amon 2001). Zuerst wirken sie zusammen und führen zur Aktivierung von Cdc14. Dies bewirkt das Abschalten der zyklinabhängigen

Kinase. Anschließend sind diese Proteine aber auch an der Durchführung des Zytokinese beteiligt. Nach neuesten Modellen reguliert das MEN das Abschalten der CDK folgendermaßen (s. Abbildung 34): Auslöser für die Aktivierung des MEN scheint die Messung der räumlichen Position des Spindelpolkörpers zu sein. Das G-Protein Tem1 ist hauptsächlich an dem der Knopse zugewandten Spindelpol lokalisiert. Zusätzlich zu Tem1 befindet sich auch noch der Komplex aus Bfa1 und Bub2 am Spindelpol. Als negativer Regulator bewirkt Bfa1-Bub2, dass Tem1 in dieser Situation in seiner inaktiven Form vorliegt. Lte1, der Aktivator von Tem1, lokalisiert nur in der Knospe. Solange sich also Tem1 am Spindelpol in der Mutterzelle befindet kann es nicht aktiv werden, da Lte1 und Tem1 räumlich voneinander getrennt sind. Kommt es nun zur Anaphase B und damit zur Elongation der mitotischen Spindel in die Tochterzelle gelangt Tem1 in die Nähe seines Aktivator und es wird angenommen, dass dies der entscheidende Schritt zur Aktivierung von Tem1 ist. Durch die Messung der Wanderung von Tem1 in die Knospe wird sichergestellt, dass der Beginn des Austritts aus der Mitose gekoppelt ist an die erfolgreiche Verteilung der Schwesterchromatiden auf Mutter- und Tochterzelle.

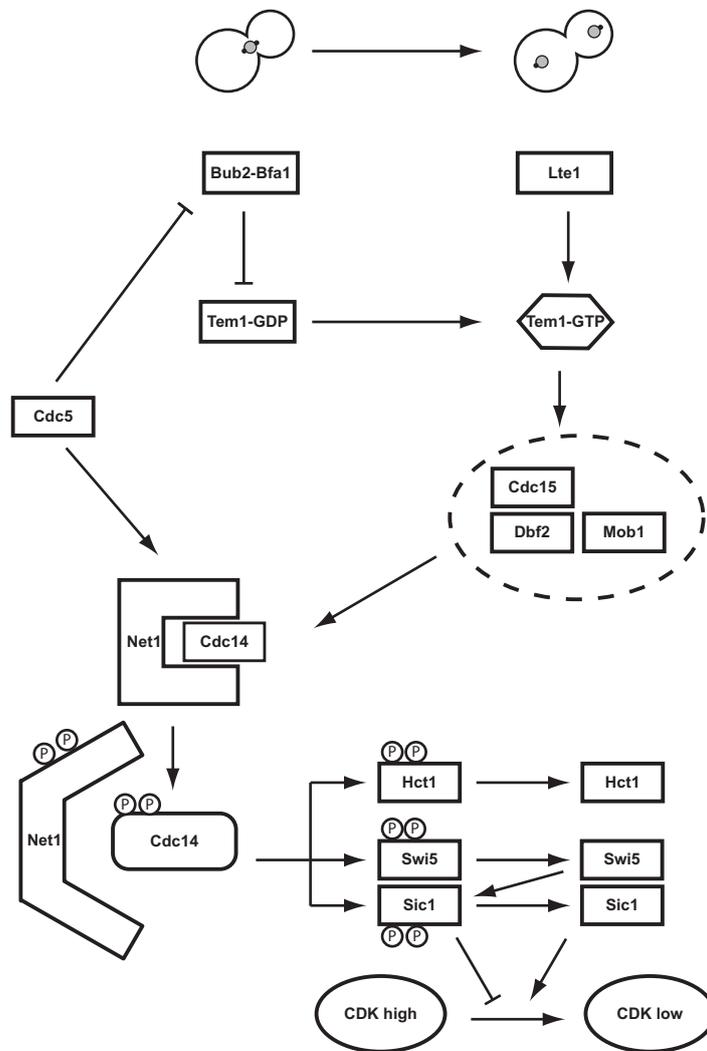


Abbildung 34

Ein Modell der Zusammenhänge im Signaltransduktionsnetzwerk am Ende der Mitose MEN. Beschreibung s. 8.4. Ein aktivierender Einfluss wird durch einen Pfeil dargestellt. Ein inhibierender Einfluss wird durch einen Inhibitions Pfeil dargestellt. (P) deutet die Phosphorylierung eines Proteins an.

Anschließend soll dann aktiviertes Tem1 die Aktivität der Kinase Cdc15 steuern (Gruneberg et al. 2000). Tem1 interagiert mit Cdc15 am Spindelpol und die Überexpression von *CDC15* supprimiert die Deletion von *TEM1*. Diese Befunde deuten auf eine Regulation von Cdc15 durch Tem1 hin. Das Signal, das durch die Wanderung von Tem1 in die Knospe generiert wurde, wird von Cdc15 auf den Kinasekomplex Dbf2-Mob1 weitergeleitet (Mah et al. 2001). Demnach phosphoryliert Cdc15 Dbf2 und beeinflusst so dessen Aktivität positiv. Diese Aktivierung von Dbf2 durch Cdc15 findet aber nur statt, wenn Dbf2 an seinen Interaktionspartner Mob1 gebunden hat. Dies zeigt auch eine Rolle für Mob1 beim Austritt aus der Mitose auf. Welche Schritte zwischen der Aktivierung von Dbf2 und der Freisetzung von Cdc14 liegen ist unbekannt. Nichts desto trotz sind Tem1, Cdc15 und Dbf2 an der Aktivierung von Cdc14 beteiligt. Mutationen in diesen Genen führen zu einem Arrest ohne Freisetzung von Cdc14.

Es gibt aber zusätzlich zum postulierten Weg Tem1, Cdc15 und Dbf2 einen weiteren Weg zur Aktivierung von Cdc14 (diese Arbeit). Die Polokinase Cdc5 bewirkt die Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 und führt so zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus. Cdc5 benötigt für diese Wirkung auf den Cdc14-Net1 Komplex nicht die Hilfe von Cdc15 und Dbf2. Cdc5 steht somit neben dem oben beschriebenen Weg. Nach neuesten Daten scheint Cdc5 noch ein weiteres Ziel im MEN zu besitzen (Hu et al. 2001). Cdc5 ist demnach in der Lage den negativen Regulator von Tem1 Bfa1 zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren. Dies sollte dann über den Tem1-Cdc15-Dbf2 Weg zur Aktivierung von Cdc14 führen. Cdc5 beeinflusst damit die Aktivierung von Cdc14 auf zwei verschiedenen Wegen. Einerseits auf einem direkten Weg durch Phosphorylierung von Cdc14 und Net1, andererseits durch Stimulierung des anderen Weges, der auf Cdc14 wirkt. Keiner dieser beiden beschriebenen Weg kann für sich allein die Aktivierung von Cdc14 bewerkstelligen. Dies spricht für ein kooperatives Modell. Zwei Wege zusammen führen zur Freisetzung von Cdc14 am Ende der Mitose. Da die Aktivierung von Cdc14 unwiderruflich das Abschalten der zyklinabhängigen Kinase einleitet, ist durchaus zu erwarten, dass dieser Vorgang streng reguliert ist. Ein solches Modell der mehrfachen Wege zur Aktivierung von Cdc14 gibt Raum für die Integration verschiedener Signale auf dem Komplex Cdc14-Net1. Erst nachdem alle notwendigen Vorgänge abgeschlossen und die entsprechenden Signale durch das MEN weitergeleitet worden sind, kommt es zur endgültigen, unwiderruflichen Aktivierung der CDK-antagonistischen Phosphatase Cdc14.

Wie oben erwähnt, haben verschiedene Komponenten des MEN auch eine Aufgabe bei der Zytokinese. Für die Polokinase Cdc5 konnte gezeigt werden, dass sie an den Spindelpolen und am Mutter/Tochter-Übergang poloboxabhängig lokalisiert (Song et al. 2001). Wird diese Lokalisation verhindert, dann führt dies zu Zellen, die nicht mehr in der Lage sind Zytokinese durchzuführen. Dabei scheint nicht der Aufbau des Zytokineseapparates aus Septin- und Actomyosinring, sondern die Auslösung der Konstriktion gestört zu sein.

Die Kinase Cdc15 ist, neben ihrer Rolle beim Abschalten der CDK, auch an der Zytokinese beteiligt. Wie oben erwähnt, lokalisiert Cdc15 nach der Aktivierung von Cdc14 am Spindelpol in der Tochterzelle. Diese Relokalisierung geht einher mit der Dephosphorylierung von Cdc15 durch Cdc14. Wird diese Lokalisierung von Cdc15 am Spindelpol verhindert, so führt dies zu

Zellen, die zwar lebensfähig sind, aber keine Zytokinese mehr durchführen können (Menssen et al. 2001). Ein weiterer Hinweis, dass Cdc15 an der Regulation der Zytokinese beteiligt ist, ist die Existenz der *cdc15-lyt* Mutante (Cenamor et al. 1999). Diese mutierte Form von Cdc15

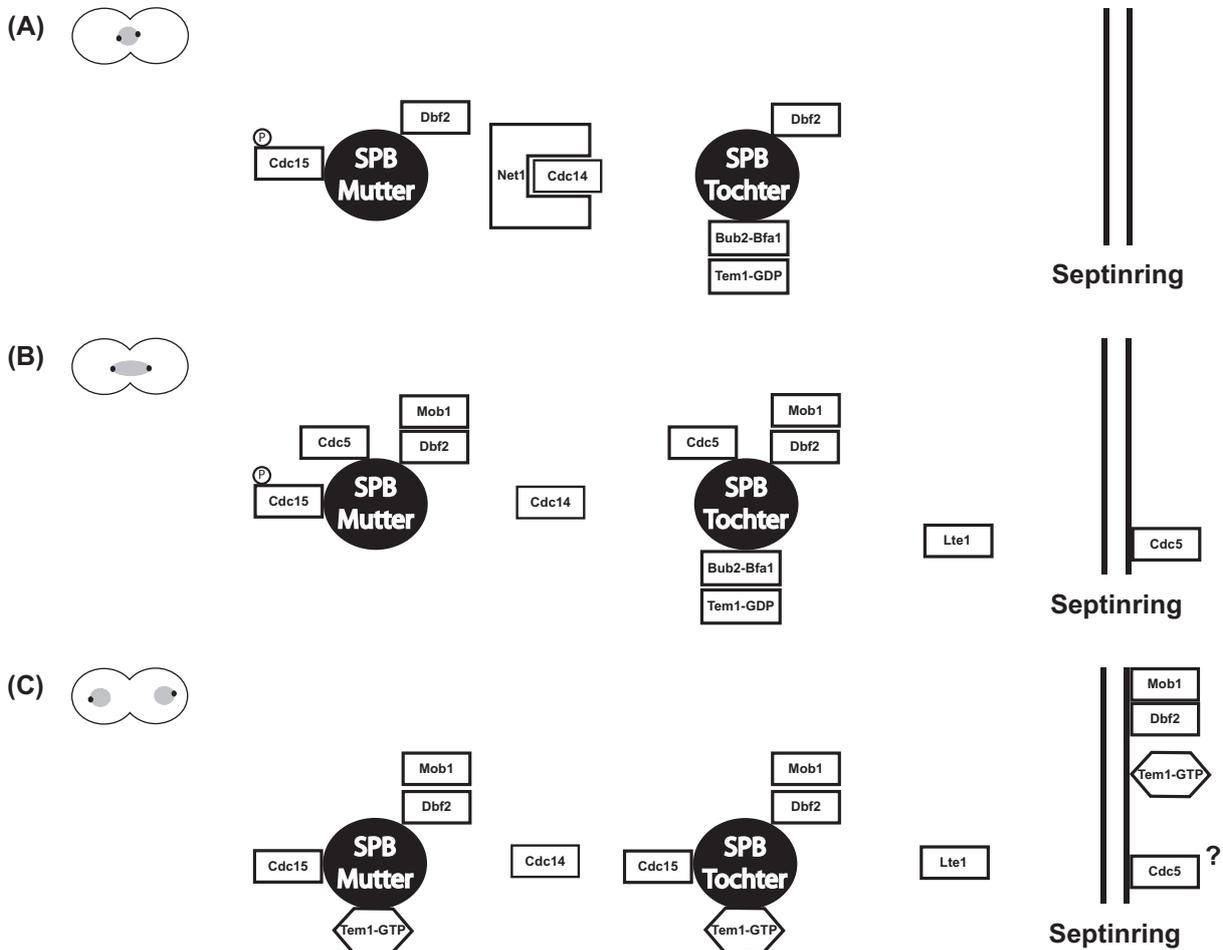


Abbildung 35

Modell der zellzyklusabhängigen Lokalisierung verschiedener MEN Proteine an den Spindelpolen und am Mutter/Tochter-Übergang. (A) Lokalisierungen in einer Zelle vor der Anaphase. Cdc14 liegt im Komplex mit Net1 im Nucleolus vor. Cdc15 ist phosphoryliert und lokalisiert asymmetrisch an dem Spindelpol, der später in der Mutterzelle verbleiben wird (Menssen et al. 2001). Dbf2 lokalisiert an beiden SPB (Frenz et al. 2000). Der Komplex aus Bub2-Bfa1 und Tem1 befindet sich zu diesem Zeitpunkt an dem der Tochterzelle zugewandten SPB (Pereira et al. 2000). Tem1 bindet zu diesem Zeitpunkt über Bub2 an den Spindelpol. (B) Zelle nach Beginn der Anaphase. Cdc14 wurde aus dem Nucleolus freigesetzt. Die Lokalisierung von Cdc15, Tem1 und dem Bub2-Bfa1 Komplex ist unverändert. Cdc5 lokalisiert am Spindelpol und am Mutter/Tochter-Übergang (Shirayama et al. 1998, Song et al. 2000). Mob1 lokalisiert an beiden Spindelpolen, vermutlich durch Bindung an Dbf2 (Luca et al. 2001, Mah et al. 2001). (C) Zelle nach der Anaphase vor der Zytokinese. Cdc15 befindet sich nach der Dephosphorylierung durch Cdc14 an beiden Spindelpolen (Menssen et al. 2001). Tem1 wurde durch Lte1 aktiviert und befindet sich an beiden Spindelpolen (Pereira et al. 2000). Diese SPB-Lokalisierung von Tem1 ist unabhängig von Bub2-Bfa1. Weiterhin befindet sich Tem1 am Mutter/Tochter-Übergang. Dort sind auch Dbf2 und Mob1 - wahrscheinlich im Komplex - zu finden (Frenz et al. 2000, Luca et al. 2001). Cdc5 lokalisiert zu diesem Zeitpunkt nicht mehr am SPB (Shirayama et al. 1998); die Lokalisierung am Septinring wurde nicht untersucht.

kann noch den Austritt aus der Mitose, aber keine Zytokinese mehr durchführen. Dieses Allel von Cdc15 besitzt also einen spezifischen Zytokinesedefekt.

Auch die dritte MEN Kinase Dbf2 ist an der Regulation der Zytokinese beteiligt (Frenz et al 2000). Sie lokalisiert während der meisten Zeit des Teilungszyklus an den Spindelpolkörpern. Spät in der Mitose kommt es zu einer Lokalisierung von Dbf2 am Mutter/Tochter-Übergang. Diese Lokalisierung wird durch Mutationen im MEN verhindert. Dbf2 wird wohl durch Komponenten des MEN reguliert, um anschließend eine Aufgabe bei der Zytokinese auszuführen.

Es scheint sich also um ein durchgängiges Muster zu handeln, dass Komponenten des MEN zuerst an der Aktivierung der CDK-antagonistischen Phosphatase beteiligt sind, um sich anschließend an anderer Stelle an der Regulation der Zytokinese zu beteiligen. Eine Zusammenfassung dieser beschriebenen Lokalisationen und die bisher bekannten Protein-Protein-Wechselwirkungen, die zu diesen Lokalisierungen führen, ist in Abbildung 35 dargestellt.

Das Modell der zwei Funktionen des MEN deckt sich auch mit der Beobachtung, dass orthologe Proteine zu MEN-Komponenten in *S. pombe* an der Regulation der Septumbildung und der anschließenden Zytokinese beteiligt sind. Auch diese Proteine – die das sog. Septation Initiation Network SIN bilden – spielen eine Rolle beim Abschalten der zyklinabhängigen Kinase in *S. pombe* (Übersicht in Bardin & Amon 2001, vgl. 3.4.8). Die Regulation der Vorgänge, die am M/G1-Übergang stattfinden, ist demnach konserviert zwischen verschiedenen Organismen.

9. Literaturverzeichnis

Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, Stearns T (1997) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN 0-87969-508-0

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) *Molekularbiologie der Zelle* 3. Auflage 1039ff. VCH Verlag

Alexandru G, Uhlmann F, Mechtler K, Poupart MA (2001) Phosphorylation of the Cohesin Subunit Scc1 by Polo/Cdc5 Kinase Regulates Sister Chromatid Separation in Yeast. *Cell* 105:459-472

Bardin AJ, Amon A: MEN and SIN (2001) What's the difference? *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* 2:815-826

Bardin AJ, Visintin R, Amon A (2000) A Mechanism for Coupling Exit from Mitosis to Partitioning of the Nucleus. *Cell* 102:21–31

Bardwell L, Cook JG, Inouye CJ, Thorner J (1994) Signal propagation and regulation in the mating pheromone response pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Developmental Biology* 166:363-379

Berghammer H, Auer B (1993) „Easypreps“: Fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* 14:528-529

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-54.

Burke DJ (2000) Complexity in the spindle checkpoint. *Current Opinion in Genetics & Development* 10:26-31

Cenamor R, Jiménez J, Cid VJ, Nombela C, Sánchez M (1999) The Budding Yeast Cdc15 Localizes to the Spindle Pole Body in a Cell-Cycle-Dependent Manner. *Molecular Cell Biology Research Communications* 2:178–184

Cerutti L and Simanis V (2000) Controlling the end of the cell cycle. *Current Opinion in Genetics & Development* 9:65–69

- Charles JF, Jaspersen SL, Tinker-Kulberg RL, Hwang L, Szidon A, Morgan DO (1998) The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Current Biology* 8:497–507
- Clarke DJ, Giménez-Abián JF (2000) Checkpoints controlling mitosis. *BioEssays* 22:351-363
- Cheng L, Hunke L, Hardy CFJ (1998) Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Polo-like kinase Cdc5p. *Molecular and Cellular Biology* 18(12):7360-7370
- Cohen-Fix O, Koshland D (1999) Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes & Development* 13:1950-1959
- Cryer DR, Eccleshall R, Marmur J (1975) Isolation of yeast DNA. *Methods in Cell Biology* 12:39-44
- Deshaies RJ, Ferrell JE (2001) Multisite phosphorylation and the countdown to S phase. *Cell* 107:819-822
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16:6127-6145
- Evan G, Lewis G, Ramsey G, Bishop JM (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc protooncogen. *Molecular and Cellular Biology* 5:3610-3616
- Faumann EB, Spaer MA (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences* 21:413-417
- Feldmann RM, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ (1997) A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91:221-230
- Fellenberg K, Hauser N, Brors B, Neutzner A, Hoheisel JD, Vingron M (2001) Correspondence analysis applied to microarray data. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98(19):10781-10786
- Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson I, Lerner RA, Wigler M (1988) Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitop addition method. *Molecular and Cellular Biology* 8:2159-2165

Field C, Li R, Oegema K (1999) Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Current Opinion in Cell Biology* 11:68–80

Fitzpatrick PJ, Toyn JH, Millar JB, Johnston LH (1998) DNA replication is completed in *Saccharomyces cerevisiae* cells that lack functional Cdc14, a dual-specificity protein phosphatase. *Molecular Genetics and Genomics* 258:437-441.

Frenz LM, Lee SE, Fesquet D, Johnston LH (2000) The budding yeast Dbf2 protein kinase localises to the centrosome and moves to the bud neck in late mitosis. *Journal of Cell Science* 113:3399-3408

Fujimura H, Sakuma Y (1993) Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeast. *Biotechniques* 14:538-539

Gietz D, St-Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* 20:1425.

Glover David M, Hagan Iain M, Tavares Álvaro AM (1998) Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes & Development* 12:3777-3787

Grandin N, de Almeida A, Charbonneau M (1998) The Cdc14 phosphatase is functionally associated with the Dbf2 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* 258:104-116

Gruneberg U, Campbell K, Simpson C, Grindlay J, Schiebel E (2000) Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *The EMBO Journal* 19(23):6475-6488

Harlow E, Lane D (1998) Using Antibodies. Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN 0-87969-544-7.

Hartwell LH (1978) Cell division from a genetic perspective. *The Journal of Cell Biology* 77:627-637

Haase SB, Lew DJ (1997) Flow cytometric analysis of DNA content in budding yeast. *Methods in Enzymology* 283:322-332

Hilioti Z, Chung YS, Mochizuki Y, Hardy CF, Cohen-Fix O (2001) The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. *Current Biology* 11:1643

- Hoyt MA (2000) Exit from Mitosis: Spindle Pole Power. *Cell* 102:267–270
- Hoyt MA (2001) A new view of the spindle checkpoint. *The Journal of Cell Biology* 154(5):909-911
- Hu F, Wang Y, Liu D, Li Y, Qin J, Elledge SJ (2001) Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP Complex by Cdc5 and Cell Cycle Checkpoints. *Cell* 107:655-665
- Jaspersen SL, Charles JF, Tinker-Kulberg RL, Morgan DO (1998) A Late Mitotic Regulatory Network Controlling Cyclin Destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 9:2803-2817
- Jorgensen P, Tyers M (1999) Altered states: programmed proteolysis and the budding yeast cell cycle. *Current Opinion in Microbiology* 2:610-617
- Kuranda MJ, Robbins PW (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 266:19758-67
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee KS, Yuan YLO, Kuriyama R, Erikson RL (1995) Plk is an M-Phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Molecular and Cellular Biology* 15(12):7143-7151
- Lew DJ, Weinert T, Pringle JR (1997) Cell Cycle Control in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory Press *Yeast* III:607-695
- Li L, Ernsting BR, Wishart MJ, Lohse DL, Dixon JE (1997) A Family of Putative Tumor Suppressors Is Structurally and Functionally Conserved in Humans and Yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 272:29403-29406
- Liu HY, Toyn J H, Chiang YC, Draper MP, Johnston LH, Denis CL (1997) *DBF2*, a cell cycle regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex. *The EMBO Journal* 16:5289-5298.
- Luca FC, Mody M, Kurischke C, Roof DM, Giddings TH, Winey M (2001) *Saccharomyces cerevisiae* Mob1p is required for Cytokinesis and Mitotic Exit. *Molecular and Cellular Biology* 21(20):6972-6983

Mah AS, Jang J, Deshaies RJ (2001) Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 98(13):7325-7330

McBride HJ, Yu Y, Stillman DJ (1999) Distinct Regions of the Swi5 and Ace2 Transcription Factors Are Required for Specific Gene Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 274(30):21029–21036

McCollum D, Gould KLK (2001) Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends in Cell Biology* 11(2):89-95

Menssen R, Neutzner A, Seufert W (2001) Asymmetric spindle pole localization of yeast Cdc15 kinase links mitotic exit and cytokinesis. *Current Biology* 11:345-50

Moll T, Tebb G, Surana U, Robitsch H, Nasmyth K (1991): The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor *SWI5*. *Cell* 66(4):743-58

Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annual Reviews of Cell & Developmental Biology* 13:261-91

Morgan DO (1999) Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nature Cell Biology* 1:E47-E53

Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology* 51:263-273

Murray A (1999) A snip separates sisters. *Nature* 400:19-21

Nasmyth K, Adolf G, Lydall D, Seddon A (1990) The identification of a second cell cycle control on the HO promoter in yeast: cell cycle regulation of Swi5 nuclear entry. *Cell* 62(4):631-47

Neutzner A (1998) Untersuchungen zur Rolle von *CDC14* im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit am Institut für Industrielle Genetik Universität Stuttgart

Nigg EA (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews* 2:21-32

-
- Pereira G, Höfken T, Grindlay J, Manson C, Schiebel E (2000) The Bub2p Spindle Checkpoint Links Nuclear Migration with Mitotic Exit. *Molecular Cell* 6:1-10
- Pereira G, Tanaka TU, Nasmyth K, Schiebel E (2001) Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *The EMBO Journal* 20: 6359-6370
- Peters JM (1999) Subunits and Substrates of the Anaphase-Promoting Complex. *Experimental Cell Research* 248: 339–349
- Pringle JR, Adams AE, Drubin DG, Haarer BK (1991) Immunofluorescence methods for yeast. *Methods in Enzymology* 194:565-602.
- Rudner AD, Hardwick KG, Murray AW (2000) Cdc28 activates exit from mitosis in budding yeast. *The Journal of Cell Biology* 149(7):1361-1376
- Rudner AD, Murray AW (2000) Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *The Journal of Cell Biology* 149(7): 1377-1390
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN 0-87969-309-6
- Schulze Lutum A (1999) *Proteindegradation im Zellteilungszyklus der Hefe Saccharomyces cerevisiae: Charakterisierung der Regulatoren Cdc20 und Hct1*. Verlag Ulrich E. Grauer- ISBN 3-86186-248-4
- Schwab M (1996) *Genetische Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Dosissuppressoren der cdc20-1 Mutation der Hefe Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit Institut für Industrielle Genetik Universität Stuttgart
- Schwab M, Schulze Lutum A, Seufert W (1997) Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 90:683-693
- Schwab M, Neutzner M, Möcker D, Seufert W (2001) Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *The EMBO Journal* 20(18):5165-75
- Schweitzer B, Philippsen P (1991) *CDC15*, an essential cell cycle gene in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes a protein kinase domain. *Yeast* 7:265-273

Shirayama M, Tóth A, Gálová M, Nasmyth K (1999) APC^{Cdc20} promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* 402:203-207

Shirayama M, Zachariae W, Ciosk R, Nasmyth K (1998) The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 17(5): 1336-1349

Shou W, Seol JH, Shevchenko A, Baskerville C, Moazed D, Chen ZWS, Jang J, Shevchenko A, Charbonneau H, Deshaies RJ (1999) Exit from Mitosis Is Triggered by Tem1-Dependent Release of the Protein Phosphatase Cdc14 from Nucleolar RENT Complex. *Cell* 97:233-244

Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122:19-27

Song S, Grenfell TZ, Garfield S, Erikson R, Lee KS (2000) Essential Function of the Polo Box of Cdc5 in Subcellular Localization and Induction of Cytokinetic Structures. *Molecular and Cellular Biology* 20:286-298

Song S, Lee KS (2001) A Novel Function of *Saccharomyces cerevisiae* CDC5 in Cytokinesis. *The Journal of Cell Biology* 152(3):451-469

Spellmann PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular Biology of the Cell* 9 :3273-3297.

Straight AF, Murray AW (1997) The spindle assembly checkpoint in budding yeast. *Methods in Enzymology* 283:425-440

Straight AF, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RJ, Johnson AD, Moazed D (1999) Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 97:245-256

Sunkel CE, Glover DM (1988) polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *Journal of Cell Sciences* 89:25-38

Tinker-Kulberg RL, Morgan DO (1999) Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes & Development* 13: 1936-1949

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76:4350-4
- Trautmann S, Wolfe BA, Jorgensen P, Tyers M, Gould KL, McCollum D (2001) Fission yeast Clp1 phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Current Biology* 11:931-940
- Traverso EE, Baskerville C, Liu Y, Shou W, James P, Deshaies RJ, Charbonneau H (2001) Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast. *Journal of Biological Chemistry* 276:21924-31.
- Tyers M, Jorgensen P (2000) Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics & Development* 10:54-64
- Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA, Koonin EV, Nasmyth K (2000) Cleavage of Cohesin by the CD Clan Protease Separin Triggers Anaphase in Yeast. *Cell* 103: 375–386
- Visintin R, Prinz S, Amon A (1997) *CDC20* and *CDH1*: A Family of Substrate-Specific Activators of APC-Dependent Proteolysis. *Science* 278:460-463
- Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, Amon A (1998) The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent Phosphorylation. *Molecular Cell* 2:709–718
- Visintin R, Hwang ES, Amon A (1999) Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase to the nucleolus. *Nature* 398:818-823
- Visintin R, Amon A (2000) The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Current Opinion in Cell Biology* 12:372-377
- Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews* 2:169-178
- Xu S, Huang HK, Kaiser P, Latterich M, Hunter T (2000) Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in budding yeast. *Current Biology* 10:329–332
- Zachariae W, Nasmyth K (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes & Development* 13:2039-2058

Zachariae W, Shevchenko A, Andrews PD, Ciosk R, Galova M, Stark MJ, Mann M, Nasmyth K (1998a) Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: Identification of a subunit related to cullins. *Science* 279: 1216–1219

Zachariae W, Schwab M, Nasmyth K, Seufert W (1998b) Control of Cyclin Ubiquitination by CDK-Regulated Binding of Hct1 to the Anaphase Promoting Complex. *Science* 282:1721-1724

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Neutzner, Albert
Anschrift: Bromberger Straße 20
70374 Stuttgart
e-mail: albert_neutzner@web.de
Geburtsdatum, -ort: 31. Juli 1971, Aalen (Württemberg)

Ausbildung:

1978-1981 Buchenberg Grundschule Ellwangen
1981-1982 Grund- und Hauptschule Schwabsberg
1982-1991 Peutinger Gymnasium Ellwangen
1991-1992 Zivildienst im Kinderheim Graf Ellwangen
10/1992-03/1998 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart
04/1997-03/1998 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Seufert am Institut für Industrielle Genetik Universität Stuttgart. Thema: Untersuchungen zur Rolle von CDC14 im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.
04/1998- 05/2002 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Seufert am Institut für Industrielle Genetik Universität Stuttgart. Thema: Termination der Mitose: Die Rolle der Phosphatase Cdc14 beim M/G1-Übergang in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

11. Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletion eines Gens
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APC	Anaphase Promoting Complex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cdc	Cell division cycle
CDK	Zyklinabhängige Kinase – cyclin dependent Kinase
CKI	Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen – cyclindependent kinase inhibitor
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
d.h.	das heißt
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde
H ₂ O _{mp}	Doppelt deionisiertes Wasser
HA-Epitop	Hämagglutinin-Epitop
HRP	Meerrettichperoxidase
IP	Immunpräzipitation
kb	1000 Basenpaare
<i>K.l.</i>	<i>Klyveromyces lactis</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
MBP	Maltosebindendes Protein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
Myc	Das c-myc Epitop

ng	Nanogramm
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
OD _{xxx}	optische Dichte bei xxx nm Wellenlänge
ORF	Offenes Leseraster – open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rpm	rounds per minute – Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Spaltheife)
SCF	Ubiquitinligasekomplex aus <u>S</u> kp1, <u>C</u> ullin und <u>F</u> -Box Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ts	Temperatursensitiv
U	Unit (Enzymmenge)
V	Volt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

12. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Prof. Wolfgang Seufert für das ergiebige Promotionsthema und die hervorragende Betreuung während meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an Prof. Dieter Wolf für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Danke auch an Prof. Ralf Mattes.

Mein herzlicher Dank geht an meine ehemaligen Laborkollegen Richard „Richie“ Albang, Annegret Schulze Lutum und Michael Schwab; von ihnen habe ich die praktischen Dinge gelernt.

Danke auch an Ruth Menssen für die gute Zusammenarbeit, überhaupt für das gute Verhältnis in Labor und Schreibraum und natürlich besonders für die Coauthorschaft beim Cdc15-Paper.

Vielen Dank auch an all die anderen Kollegen aus dem gelben, violetten, grünen, roten und blauen Labor.

Danke an meine Eltern für ihre Unterstützung und für die Ermöglichung meines Studiums.

Mein letzter und herzlicher Dank geht an meine Frau Melanie. Sie hat mich immer unterstützt und stand mir in schwieriger Zeit zur Seite.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.