

Regulatoren des Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: die Polo-Kinase Cdc5 und der Ubiquitinierungsfaktor Hct1

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

vorgelegt von
Melanie Neutzner
aus Aalen

Hauptberichter: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Mitberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2003

Institut für Industrielle Genetik
der Universität Stuttgart

2003

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Zusammenfassung in englischer Sprache	7
3	Einleitung	9
3.1	Der Zellteilungszyklus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3.2	Die Gruppe der <i>CDC</i> -Gene	10
3.3	Zyklinabhängige Kinasen	10
3.4	Proteolyse treibt den Zellteilungszyklus an	12
3.4.1	Der SCF-Komplex	12
3.4.2	Der APC	13
3.5	Das “mitotic exit network” – MEN	15
3.6	Kontrollsysteme	18
3.6.1	Das Spindelkontrollsystem	18
3.6.2	Das DNA-Schadenskontrollsystem	20
3.7	Die Familie der Polo-Kinasen	22
4	Material	27
4.1	Bakterienstämme	27
4.1.1	<i>E. coli</i> DH5 α	27
4.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	27
4.3	Vektoren und Plasmide	31
4.4	Synthetische Oligonukleotide	34
4.5	Nukleinsäuren, Enzyme, Antikörper	36
4.5.1	Nukleinsäuren	36
4.5.2	Enzyme	36
4.5.3	Antikörper	37
4.6	Chemikalien	37
4.7	Sonstige Materialien	39
4.8	Kits	40
4.9	Geräte	40
4.10	Medien	42
4.10.1	Bakterienmedien	42
4.10.2	Hefemedien	43
4.11	Lösungen	44
4.12	Puffer	46
5	Methoden	48
5.1	Arbeiten mit Bakterien	48
5.1.1	Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium	48
5.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	48
5.1.2.1	Herstellung elektrokompeter Zellen	48
5.1.2.2	Elektroporation	48
5.1.3	Produktion von MBP-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	49

5.1.4	Reinigung von MBP-Fusionsproteinen	49
5.2	Arbeiten mit Hefe	50
5.2.1	Kultivierung von Hefen in Flüssigmedium	50
5.2.2	Aufbewahrung von Hefen	50
5.2.3	Kreuzung haploider Hefestämme	50
5.2.4	Sporulation diploider Hefestämme und Tetradenanalyse	50
5.2.5	Transformation von Hefe nach der Lithiumacetatmethode	51
5.2.6	Test des Wachstumsverhaltens von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihen	51
5.3	Mikroskopie und Färbung von Hefezellen	52
5.3.1	Fixierung von Hefezellen	52
5.3.2	Färbung von Hefezellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	52
5.3.3	Immunfluoreszenz	52
5.4	Synchronisation von Hefekulturen	53
5.5	Molekularbiologische Methoden	54
5.5.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	54
5.5.1.1	Plasmidpräparation (Minilysate) nach der Kochlysatmethode	54
5.5.1.2	Plasmidpräparation mit dem JETspin-Kit	54
5.5.2	DNA-Präparation aus Hefe	55
5.5.2.1	Gesamt-Hefe-DNA-Präparation	55
5.5.3	Agarosegelelektrophorese	55
5.5.4	Gelelution aus Agarosegelen	55
5.5.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	56
5.5.5.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	56
5.5.5.2	Behandlung mit alkalischer Phosphatase	56
5.5.5.3	Ligation von Insert- mit Vektor-DNA	57
5.5.6	Amplifikation von DNA mittels PCR	57
5.5.6.1	Quantitative PCR	57
5.5.6.2	Kolonie-PCR	59
5.5.6.2.1	PCR zur Bestimmung des Paarungstyps	59
5.5.6.3	Gezielte Mutagenese eines Gens mittels PCR	60
5.5.6.4	Deletion und Modifikation von Genen mittels PCR	60
5.6	Protein-chemische Methoden	61
5.6.1	Herstellung von Proteinrohextrakten aus Hefezellen	61
5.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
5.6.3	Coomassiefärbung von SDS-Gelen	62
5.6.4	Western Blot und immunologischer Nachweis der Proteine	63
5.6.5	Quantifizierung von Dot blots mit dem Phosphoimager	63
5.6.6	Immunpräzipitation	64
5.6.7	Affinitätspräzipitation mit MBP-Cdc5	65
5.6.8	Phosphataseassay	65
5.6.9	Kinaseassay	66
6	Ergebnisse	67
6.1	Die Menge von Cdc5 ist zellzyklusabhängig reguliert	67
6.2	Cdc5 wird durch Phosphorylierung reguliert	69
6.2.1	Cdc5 ist ein Phosphoprotein	70
6.2.2	Cdc5 ist <i>in vitro</i> ein Substrat für Cdc28-Kinase	70

6.2.3	Der Verlust der Konsensusstellen für Cdc28-Kinase führt zu einem Funktionsverlust von Cdc5	72
6.2.3.1	Die Mutagenese der Cdc28-Konsensusstellen in Cdc5 führt zu einem Funktionsverlust des Proteins <i>in vivo</i>	72
6.2.3.2	Durch den Austausch der Cdc28-Konsensusstellen ist Cdc5 <i>in vitro</i> kein Substrat mehr für CDK	80
6.2.3.3	Cdc5 interagiert mit Clb2	81
6.2.3.4	Die <i>in vitro</i> Kinaseaktivität von Cdc5 ist abhängig von der dritten Cdc28-Konsensusstelle	82
6.2.4	Die Cdc5-Autophosphorylierung ist abhängig von bestimmten Cdc28-Konsensusstellen	84
6.3	Cdc5 und Pds1	85
6.3.1	Cdc5 interagiert mit Pds1	85
6.3.2	Pds1 beeinflusst die Cdc5-Aktivität	87
6.3.3	Die Überexpression von <i>CDC5</i> bewirkt die Degradation von Pds1 in Nocodazol-arretierten Zellen	88
6.3.4	Die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation ist APCCdc20-abhängig	88
6.3.5	Die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation ist abhängig von Cdc5-Kinaseaktivität	90
6.3.6	Cdc5 phosphoryliert die APC-Komponente Cdc27	91
6.4	Cdc5 und Lte1	92
6.4.1	Cdc5 interagiert mit Lte1	92
6.4.2	Lte1 ist ein Phosphoprotein	94
6.4.3	Die Phosphorylierung von Lte1 ist zellzyklusabhängig reguliert	94
6.4.4	Die Phosphorylierung von Lte1 ist unabhängig von Cdc5	96
6.5	Cdc5 und Hct1	97
6.5.1	Cdc5 interagiert „destruction-box“ unabhängig mit Hct1	97
6.5.2	Cdc5 interagiert „destruction-box“ unabhängig mit Hct1+0	99
6.5.3	Cdc5 interagiert bevorzugt mit phosphorylierten Formen von Hct1	101
6.5.4	Die Phosphorylierung von Hct1 durch Cdc5 ist abhängig von N-terminalen Cdc28-Konsensusstellen in Hct1	102
6.5.5	Cdc5 phosphoryliert Hct1 <i>in vitro</i>	109
6.6	„Multisite“-Phosphorylierung von Hct1	110
6.6.1	Einfluss der Überexpression verschiedener <i>HCT1</i> -Derivate auf die Lebensfähigkeit der Zellen	111
6.6.2	Mobilität verschiedener Hct1-Varianten in der SDS-PAGE	119
6.6.3	Einfluss der Überexpression verschiedener <i>HCT1</i> -Konstrukte auf die Stabilität des Zyklins Clb2	122
6.7	Cdc5 und das DNA-Schadenskontrollsystem	128
6.7.1	Die Überexpression von <i>CDC5</i> überschreibt den <i>cdc13-1</i> -Arrest	129
6.7.2	Die Überexpression von <i>CDC5</i> im <i>cdc13</i> -Arrest führt zur Degradation von Pds1	130
6.7.3	Vergleich der Überexpression von <i>CDC5</i> und <i>CDC5L251W</i>	131
6.7.4	Cdc5 und Scc1	133
6.7.4.1	Cdc5 interagiert mit Scc1	133
6.7.4.2	Die Überexpression von <i>CDC5</i> beeinflusst die Modifikation von Scc1	135
6.7.4.3	Die Degradation von Scc1 ist unbeeinflusst von <i>cdc5L251W</i>	135
6.7.5	Cdc5 und Rad9	138
6.7.5.1	Rad9 ist ein Phosphoprotein	138

6.7.5.2	Die Phosphorylierung von Rad9 ist zellzyklusabhängig reguliert	139
6.7.5.3	Die Überexpression von <i>CDC5</i> beeinflusst die Modifikation von Rad9	141
6.7.5.4	Cdc5 interagiert mit Rad9	142
7	Diskussion	143
7.1	Die Polo-Kinase Cdc5	143
7.2	Der APC-Spezifitätsfaktor Hct1	146
7.2.1	Cdc5 und Hct1	149
7.3	Cdc5 und Lte1	151
7.4	Cdc5 und Pds1	152
7.5	Cdc5 und das DNA-Schadenskontrollsystem	153
8	Literaturverzeichnis	155
9	Lebenslauf	163
10	Abkürzungsverzeichnis	164
11	Danksagungen	165

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Regulatoren der Mitose in der Bäckerhefe: der Kinase Cdc5 und dem APC-Spezifitätsfaktor Hct1.

Cdc5 gehört zur Familie der Polo-Kinasen. Namensgebend für diese Familie von Proteinkinasen ist Polo aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Polo-Kinasen finden sich in hochkonservierter Form in den verschiedensten Organismen bis hin zum Menschen und erfüllen vielfältige Funktionen in der Mitose. So spielen sie beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Reifung und Separation der Centrosomen und sind beteiligt an der Aktivierung der Ubiquitin-Ligase APC (anaphase promoting complex). Zudem kommt ihnen eine wichtige Funktion bei der Regulation der Zytokinese zu. Cdc5 ist die einzige Polo-Kinase in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. *CDC5* ist ein essentielles Gen. Mutanten arretieren am Ende der Mitose mit replizierter DNA, elongierter Spindel und hohen Mengen des mitotischen B-Typ Zyklins Clb2. Cdc5 ist Teil eines Signaltransduktionsnetzwerkes, das am Ende der Mitose zur Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase (CDK) führt. Erhöhte Aktivität von Cdc5 induziert dabei die Degradation des B-Typ Zyklins Clb2 und die Bildung des CDK Inhibitors Sic1. Für den geordneten Ablauf des Teilungszyklus ist es deshalb notwendig, dass Cdc5 in seiner Aktivität genauestens reguliert ist.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich deshalb mit der Regulation der Cdc5-Aktivität durch zyklinabhängige Kinasen. Cdc5 besitzt fünf Konsensusstellen für Phosphorylierung durch CDKs. Durch ortsspezifische Mutagenese und *in vitro* Kinaseassays konnte gezeigt werden, dass Cdc5 tatsächlich ein Substrat für Komplexe aus Cdc28 mit B-Typ Zyklinen ist. Es ergaben sich weiterhin Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von Cdc5 durch CDK positiv auf die Cdc5-Kinaseaktivität wirkt. Zudem zeigt Cdc5 eine intermolekulare Autophosphorylierung. Der Austausch der dritten Cdc28-Konsensusstelle zu einer nicht-phosphorylierbaren Aminosäure hat einen kompletten Funktionsverlust des resultierenden Proteins zur Folge. Es ist allerdings nicht geklärt, ob diese Stelle *in vivo* tatsächlich phosphoryliert wird, oder ob sie beispielsweise aus strukturellen Gründen wichtig ist für die Enzymaktivität von Cdc5.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation des APC-Spezifitätsfaktors Hct1. Hct1 vermittelt am Ende der Mitose die ubiquitinabhängige Degradation von Clb2, indem es dieses bindet und an den APC rekrutiert. Der APC ist eine multimere Ubiquitinligase und vermittelt die Polyubiquitinierung seiner Substrate. Die Bindung von Hct1 an den APC wird von zyklinabhängiger Kinase negativ reguliert. Hct1 besitzt elf Konsensusstellen für eine Phosphorylierung durch Zyklin-Cdc28-Komplexe. Ein Derivat, in dem alle elf Stellen nicht mehr phosphorylierbar sind, ist hyperaktiv. Es sollte nun im Detail geklärt werden, welchen Beitrag die einzelnen Konsensusstellen zur Inaktivierung von Hct1 leisten. Untersucht wurde die Lebensfähigkeit der Zellen nach Überproduktion verschiedener Hct1-Derivate und deren Fähigkeit zur Degradation von Clb2. Zudem wurde das Laufverhalten der verschiedenen Proteine im Western Blot untersucht. Es ergab sich, dass keine der untersuchten Stellen alleine eine vollständige Inaktivierung von Hct1 bewirken kann. Es konnten allerdings Positionen

identifiziert werden, die einen stärkeren Einfluss auf die Hct1-Aktivität haben als andere. Besonders die vier Konsensusstellen im N-Terminus von Hct1 scheinen effizient phosphoryliert zu werden. Aber auch Stellen, die für sich alleine keinen Effekt auf die Hct1-Aktivität haben, bewirken in Kombination mit anderen Positionen eine Inhibierung von Hct1.

Hct1 ist aber nicht nur ein Substrat für CDK, sondern auch für Cdc5-Kinase. Die Überproduktion von Cdc5 bewirkt eine Hyperphosphorylierung von Hct1, die von den ersten vier Cdc28-Konsensusstellen in Hct1 abhängig ist. Zudem interagiert Cdc5 präferentiell mit phosphorylierten Formen von Hct1. In *in vitro* Kinaseassays ist unphosphoryliertes Hct1 ein sehr schlechtes Substrat für Cdc5. Liegt Hct1 allerdings nach Behandlung mit zyklinabhängiger Kinase in phosphorylierter Form vor, wird es ein deutlich besseres Substrat für Cdc5. Diese Ergebnisse belegen, dass beide Gruppen mitotischer Kinasen, zyklinabhängige Kinasen und Polo-Kinasen, bei der Regulation von Hct1 kooperieren.

Weiterhin konnten in dieser Arbeit neue Interaktionspartner von Cdc5 identifiziert werden. So interagiert Cdc5 mit dem Anaphaseinhibitor Pds1. Pds1 wird am Metaphase/Anaphase-Übergang APC-abhängig degradiert. Dieser Prozess ist abhängig von Cdc20, neben Hct1 ein weiterer mitotischer Spezifitätsfaktor des APC. Es konnte nun gezeigt werden, dass erhöhte Mengen an Cdc5 die APC^{Cdc20}-abhängige Pds1-Degradation in Metaphase-arretierten Zellen induzieren. Eine kinase-inaktive Mutante von Cdc5 zeigt diesen Effekt nicht mehr. Gleichzeitig scheint Pds1 aber auch ein Aktivator von Cdc5 zu sein, da die Deletion von *PDS1* die Wirkung der Überexpression von *CDC5* auf Clb2 und Sic1 negativ beeinflusst.

Cdc5 interagiert außerdem mit Lte1. Lte1 ist der GEF (guanine nucleotide exchange factor) des G-Proteins Tem1 und aktiviert dieses durch den Austausch von gebundenem GDP zu GTP. Auf diese Weise stimuliert Lte1 den Austritt aus der Mitose. Lte1 zeigt eine zellzyklusabhängige Phosphorylierung und obgleich vornehmlich phosphorylierte Formen von Lte1 mit Cdc5 interagieren, ist Cdc5 nicht direkt für die Phosphorylierung von Lte1 verantwortlich.

Ein weiterer bisher unbekannter Interaktionspartner von Cdc5 ist Rad9. Rad9 ist Teil eines Kontrollsystems, das bei einer Beschädigung der genomischen DNA zu einem Zellzyklusarrest vor dem Beginn der Anaphase führt. Dadurch bleibt der Zelle Zeit, den Schaden zu reparieren bevor sie sich erneut teilt. Ein derartiger Kontrollmechanismus gewährleistet die Integrität des genetischen Materials, das an die Nachkommen weitergegeben wird. Erhöhte Mengen an Cdc5 beeinflussen die Modifikation von Rad9. Außerdem bewirken sie, dass Zellen, die aufgrund eines DNA-Schadens in der Metaphase arretiert sind, teilweise ihre Kerne teilen und die Spindel auflösen. Dies ist begleitet von einer Degradation von Pds1. Erhöhte Cdc5-Aktivität kann den durch einen DNA-Schaden induzierten Metaphase-Arrest also überwinden. Es konnte somit gezeigt werden, dass Cdc5 zu mehreren Zeitpunkten im Teilungszyklus eine wichtige Rolle spielt.

2 Zusammenfassung in englischer Sprache

This work deals with two mitotic regulators in budding yeast: the kinase Cdc5 and the APC-specificity factor Hct1.

Cdc5 is a member of the polo-kinase family that is named after Polo of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Polo-kinases are highly conserved from yeast to man and fulfil various functions during mitosis. They play a crucial role in maturation and separation of the centrosome and contribute to the activation of the ubiquitin ligase APC. Furthermore, they are important for the regulation of cytokinesis. Cdc5 is the only member of the polo-kinases in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cdc5 function is essential for the cells to survive. Mutants arrest their cell cycle at the end of mitosis with duplicated DNA, an elongated spindle and elevated levels of Clb2 suggesting a mitotic exit defect. Cdc5 is part of a signal transduction network that inactivates cyclin-dependent kinases at the end of mitosis. Elevated levels of Cdc5 induce the degradation of the B-type cyclin Clb2 and the accumulation of the CDK (cyclin-dependent kinase) inhibitor Sic1. Therefore it's most important that Cdc5 itself is regulated in a strict manner.

This work tried to get insights into the regulation of Cdc5 activity by cyclin-dependent kinases. Cdc5 has five consensus sites for phosphorylation by cyclin-dependent kinases. Site-specific mutagenesis and in vitro kinase assays revealed that Cdc5 is in fact a substrate for Cdc28-cyclinB complexes. The data indicate that Cdc5 activity is positively regulated by phosphorylation by CDK. Besides, Cdc5 autophosphorylates itself in an intermolecular fashion. Mutation of the threonine in the third Cdc28-consensus site in Cdc5 results in a loss-of function phenotype of the protein. It's not yet clear if this site is phosphorylated in vivo or if the threonine is important for the overall structure of the protein.

A second part of the work is dealing with the regulation of Hct1, a substrate recognition factor of the APC. Hct1 mediates the ubiquitin-dependent degradation of Clb2 at the end of mitosis. Hct1 binds to Clb2 and recruits it to the ubiquitin ligase APC. Binding of Hct1 to the APC is negatively regulated by cyclin-dependent kinases. There are eleven sites for phosphorylation by CDK in Hct1. A derivative of Hct1 lacking all these sites is hyperactive. So, the impact of single sites on the inactivation of Hct1 was analysed in detail. Induction of Clb2-degradation and survival of the cells after overexpression of various constructs were investigated. The mobility of the different proteins was analysed in western blot experiments. None of the single sites were able to inactivate Hct1 completely. But clearly some sites have a stronger influence on Hct1 inactivation than others. Especially the four Cdc28-consensus-sites in the N-terminal part of Hct1 seemed to be efficiently phosphorylated. Sites, which do not have any influence on Hct1 activity on their own, contribute to the inactivation of Hct1 in combination with other sites.

Additionally, Hct1 is a substrate for Cdc5. Overproduction of Cdc5 causes a hyperphosphorylation of Hct1 that is dependent on the first four Cdc28-consensus sites. Cdc5 interacts preferentially with phosphorylated species of Hct1. Hct1 is a very poor substrate for Cdc5 in vitro, but phosphorylation is strongly enhanced when Hct1 was phosphorylated by CDK. So cyclin-

dependent kinases and polo-kinase clearly cooperate in the regulation of Hct1.

In this work new interaction partners of Cdc5 were identified. Cdc5 interacts with the anaphase inhibitor Pds1. Pds1 is degraded at the metaphase to anaphase transition in an APC^{Cdc20}-dependent manner. Like Hct1 Cdc20 is a mitotic substrate recognition factor of the APC. It was shown that elevated levels of Cdc5 induce the APC^{Cdc20}-dependent degradation of Pds1 in metaphase-arrested cells. For this, kinase activity of Cdc5 is necessary. At the same time Pds1 seems to be an activator of Cdc5 because deletion of *PDS1* influences the ability of Cdc5 to phosphorylate Clb2 and to up regulate the levels of Sic1.

Besides, Cdc5 interacts with Lte1. Lte1 is the GEF (guanine nucleotide exchange factor) of the G-protein Tem1. It converts GDP-bound Tem1 to GTP-Tem1 thereby activating Tem1 and stimulating the exit of mitosis. Lte1 is phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. Though Cdc5 interacts with phosphorylated Lte1 it seems not to be responsible for the phosphorylation of Lte1.

Another so far unknown interaction partner of Cdc5 is Rad9. Rad9 is part of a surveillance mechanism that delays the cell cycle in metaphase in response to DNA damage giving the cell time to repair the damage. This ensures the integrity of the genomic material propagated to the daughter cell. Elevated levels of Cdc5 influence the modification of Rad9. Furthermore, elevated Cdc5 activity promotes nuclear division and disassembly of the spindle in cells arrested due to DNA-damage. This is accompanied by degradation of Pds1. Therefore ectopic expression of *CDC5* can override the DNA-damage induced metaphase arrest.

In summary, it was shown that Cdc5 plays an important role at various stages in the cell division cycle.

3 Einleitung

3.1 Der Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger eukaryotischer Organismus und gehört zur Gruppe der Ascomyceten, da die vier haploiden Meioseprodukte, auch Sporen genannt, von einem Ascus umgeben sind. Die Bäckerhefe ist ein beliebter Modellorganismus, da sie sehr schnell wächst und einfach zu handhaben ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass seit 1996 ihre komplette Genomsequenz bekannt ist. Dies und die Tatsache, dass Hefe sich leicht genetisch manipulieren lässt, macht es möglich, in kurzer Zeit Stämme mit den gewünschten genetischen Eigenschaften herzustellen.

Die Bäckerhefe vermehrt sich durch Knospung, was sie von anderen Eukaryoten unterscheidet. Dabei entsteht eine größere Mutter- und eine kleinere Tochterzelle. Ihr Zellteilungszyklus kann aber wie der anderer Eukaryoten auch ganz allgemein in eine Interphase, während der die Zellbestandteile verdoppelt werden, und in eine M-Phase, während der die verdoppelten Zellbestandteile auf die Mutter- und die Tochterzelle verteilt werden, gegliedert werden. Die Interphase kann weiter in die S- oder Synthese-Phase, in der die DNA repliziert wird, und die G1- bzw. G2-Phase unterteilt werden, die der S-Phase vorausgehen bzw. ihr folgen (Lew et al., 1997). Hat die Zelle einen bestimmten Punkt in der späten G1-Phase, den sogenannten START, überschritten, folgen unweigerlich alle Ereignisse, die mit dem folgenden Zellzyklus verbunden sind. Die Zelle bildet eine Knospe und dupliziert ihre Spindelpolkörper, die mikrotubulorganisierenden Zentren der Hefe. Die Spindelpolkörper werden in der S-Phase, in der die chromosomale DNA repliziert wird, bereits separiert und es bildet sich eine kurze bipolare Mikrotubulispinde. In der G2/M-Phase wandert der Kern dann zur Übergangsstelle zwischen Mutter- und Tochterzelle und es kommt schließlich zur Kernteilung mit anschließender Zytokinese. In der Bäckerhefe ist es schwierig, G2- und M-Phase klar voneinander zu trennen, da die Kernhülle in der Mitose nicht aufgelöst wird, man spricht daher auch von einer Endomitose, und die kondensierten Chromosomen für eine mikroskopische Beobachtung zu klein sind. So kann der genaue Zeitpunkt des Einsetzens der Mitose nicht festgelegt werden und man spricht deshalb von einer G2/M-Phase. Eindeutig festgelegt werden kann aber der Beginn der Anaphase mit der Trennung der Schwesterchromatiden und der Elongation der Spindel.

Vor Überschreiten von START, also in der frühen G1-Phase, sind die Zellen noch in der Lage, auf Umwelteinflüsse zu reagieren. Bei Nährstoffmangel arretieren diploide Zellen ihren Zellzyklus und führen eine meiotische Teilung durch, bei der vier haploide Sporen entstehen. Treffen haploide Zellen in der Prä-START-Phase auf das Paarungspheromon des entgegengesetzten Paarungstyps, führt das ebenfalls zu einem G1-Arrest und die Zelle bereitet sich auf die Paarung vor, durch die wiederum diploide Zellen entstehen. In ihrer natürlichen Umgebung kommt die Bäckerhefe als diploider Organismus vor. Im Labor finden hingegen hauptsächlich haploide Stämme Verwendung.

3.2 Die Gruppe der CDC-Gene

Um Gene zu identifizieren, die am Fortschreiten des Zellteilungszyklus beteiligt sind, wurde nach konditional letalen Allelen gesucht, die unter restriktiven Bedingungen zu einer einheitlichen terminalen Morphologie führen. Diese Gene wurden als *CDC*-Gene (*cell division cycle*) bezeichnet. In Hefe sind über siebzig solcher Gene bekannt. Der Arrestphänotyp liefert einen Hinweis auf den Zeitpunkt im Zellzyklus, zu dem das Gen aktiv sein muss, um ein Fortschreiten des Zellzyklusses zu ermöglichen. Dieser Zeitpunkt ist aber nicht notwendigerweise identisch mit dem Auftreten des Arrestes, sondern kann zeitlich auch vor diesem angesiedelt sein. Späte Ereignisse im Zellzyklus sind auf die erfolgreiche Beendigung früherer Ereignisse angewiesen. So kann z. B. keine Mitose stattfinden, wenn zuvor nicht die DNA repliziert wurde und die Spindelpolkörper verdoppelt wurden (Hartwell et al., 1974). Da die *CDC*-Gene essentiell für das Überleben der Zellen sind, ist es notwendig, Bedingungen zu finden, unter denen die Mutanten wachsen können. Die meisten Mutanten des Zellzyklus sind temperatursensitive Mutanten, in denen das mutierte Protein bei niedriger Temperatur noch seine Funktion erfüllt, bei hoher Temperatur aber inaktiviert wird.

3.3 Zyklinabhängige Kinasen

Zyklinabhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDKs) bestehen aus zwei Komponenten: der katalytischen Untereinheit, die alleine keine Kinaseaktivität besitzt, und einem aktivierenden Zyklin (Morgan, 1997). Zykline haben ihren Namen aufgrund ihres typischen zellzyklusabhängigen Expressionsmusters erhalten (Koch und Nasmyth 1994, Murray 1995). Allen Mitgliedern der Zyklin-Familie ist ein bestimmtes Sequenzmotiv, die sog. *cyclin-box* gemein, die für die Interaktion mit der Kinaseeinheit nötig ist (Poon und Hunter, 1995). CDKs phosphorylieren ihre Zielproteine an Serin- und Threoninresten innerhalb einer bestimmten Sequenzumgebung, sogenannter Konsensussequenzen, die aus einem Serin/Threonin gefolgt von einem Prolin bestehen. In der Bäckerhefe gibt es fünf verschiedene zyklinabhängige Kinasen, aber nur Cdc28 kommt eine essentielle Rolle bei der Regulation des Zellteilungszyklus zu. Cdc28 kann mit neun verschiedenen Zyklinen assoziieren (Andrews und Measday, 1998). Je nachdem mit welchem Zyklin Cdc28 assoziiert ist, erfüllt es andere Aufgaben im Zellzyklus. Der Komplex aus Cdc28 mit den Zyklinen Cln1-3 erfüllt seine Funktionen in der G1-Phase (Richardson et al., 1989). Cln-Cdc28-Kinaseaktivität ist ab START nachweisbar und ist essentiell für die Bildung der Knospe, die Duplikation der Spindelpolkörper, die Aktivierung G1-spezifischer Transkription, die Inaktivierung der Proteolyse der B-Typ-Zykline und die Aktivierung der Sic1-Degradation. Die B-Typ Zykline Clb5 und Clb6 sind notwendig für die Replikation der DNA in der S-Phase (Epstein et al., 1992). Die mitotischen B-Typ Zykline Clb1-4 sind schließlich nötig für die CDK-Aktivität in der Mitose (Nasmyth, 1996). Zellen ohne Clb1-4 können keine bipolare mitotische Spindel bilden und arretieren in der G2-Phase. Die Cdc28-Kinase ist also zu fast jedem Zeitpunkt im Zellzyklus mit einem Zyklin assoziiert, nur beim Austritt aus der Mitose und in der frühen G1-Phase, wenn die mitotischen Zykline bereits

degradiert sind und die G1-Zykline noch nicht synthetisiert sind, kann keine CDK-Aktivität gemessen werden.

Neben der positiven Regulation der Cdc28-Kinase durch Zykline existiert auch eine negative Regulation durch sogenannte CKIs (cyclin dependent kinase inhibitor). Diese binden an den Zyklin-Cdc28-Komplex und inhibieren so dessen Kinaseaktivität. In Hefe sind die drei Inhibitoren Far1, Sic1 und Cdc6 bekannt. Far1 bindet an den Komplex aus Cln-Cdc28-Kinase und führt zu einem G1-Arrest in Antwort auf Paarungspheromon (Peter und Herskowitz, 1994). Sic1 ist dagegen ein Inhibitor von Zyklin B-Cdc28-Komplexen (Mendenhall, 1993). Sic1 ist von der späten M- bis zur frühen S-Phase in der Zelle vorhanden. Durch Inhibition der Clb5/Clb6-Cdc28-Komplexe in der G1-Phase verhindert Sic1 eine vorzeitige Replikation der DNA (Schwab et al., 1994). Zellen ohne Sic1 sind zwar lebensfähig, zeigen aber eine Reihe von Phänotypen, die darauf hinweisen, dass Sic1 eine Rolle in der Mitose spielt (Donovan et al., 1994). Es wird postuliert, dass zwei Mechanismen zur Inaktivierung der Cdc28-Kinase am Ende der Mitose existieren. Zum einen die Degradation der mitotischen B-Typ Zykline und zum anderen die Inhibition der Kinase durch Sic1. Dafür spricht unter anderem der Befund, dass eine Deletion von *HCT1* synthetisch letal ist mit der von *SIC1* (Schwab et al., 1997). Zusammen mit Sic1 trägt Cdc6 zur Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose bei. Cdc6 ist ein DNA-Replikationsfaktor, der essentiell ist für die Bildung von Prä-Replikations-Komplexen an den Replikationsursprüngen. Seine Transkription hängt wie die von Sic1 von dem Transkriptionsfaktor Swi5 ab. Cdc6 besitzt an seinem N-Terminus eine Domäne, die die Bindung an CDK-Komplexe vermittelt (Elsasser et al., 1996, Calzada et al., 2000). Wird diese Domäne deletiert, führt dies zu einem verzögerten Austritt der Zellen aus der Mitose. Die Deletionsmutante von Cdc6 zeigt synthetische Letalität mit der *cdc23-1*- und der *cdc14-1*-Mutante. Sie ist aber ebenfalls synthetisch letal mit einer *sic1*-Deletionsmutante. Dies weist darauf hin, dass Cdc6 in Kooperation mit Sic1 eine Funktion bei der Inhibition der zyklinabhängigen Kinase spielt (Calzada et al., 2001).

Zyklinabhängige Kinasen werden aber nicht nur durch Assoziation mit bestimmten Zyklinen und Inhibitoren reguliert, sondern auch durch kovalente Modifikation. Dabei handelt es sich um reversible Phosphorylierung, die am Beispiel des Cdc28-Homologen Cdc2 aus *Schizosaccharomyces pombe* näher beschrieben werden soll (Gould et al., 1991). Cdc2 besitzt drei Stellen für reversible Phosphorylierung. Die Phosphorylierung am Threoninrest an Position 161 ist dabei essentiell für die Aktivität des Zyklin-Cdc2-Komplexes. Die entsprechende Position in *S. cerevisiae* Cdc28 – T169 – muss ebenfalls phosphoryliert sein, damit der Zyklin-CDK-Komplex aktiv sein kann. Die Kinase, die diese Phosphorylierung ausführt, ist CAK (cyclin dependent kinase activating kinase). Neben der aktivierenden Phosphorylierung an T161 gibt es zwei Positionen, T14 und Y15 (entspricht Y19 in Cdc28), die bei Phosphorylierung zur Inhibition der Kinase führen. Y15 wird von Wee1, T14 von Myt1 phosphoryliert. Die Phosphatase für beide Positionen ist Cdc25.

Die Rolle der Phosphorylierung auf den Aktivierungszustand der Cdc28-Kinase der Bäckerhefe ist nicht so genau untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass eine Phosphorylierung an Y19 für

ein inaktivierendes Signal des Morphologiekontrollsystems wichtig ist (Lew und Reed, 1995). Diese Phosphorylierung inhibiert die CDK im Fall einer stressbedingt gestörten Knospenbildung. Dadurch wird verhindert, dass es zu einer Trennung der Kerne kommt, bevor eine Knospe gebildet wurde, was zur Bildung von Zellen mit zwei Kernen führen würde. Verantwortlich für diese Modifizierung der Cdc28-Kinase ist Swe1, das Homologe des *S. pombe* Proteins Wee1 (Booher et al., 1993). Die Phosphatase für diese Position ist das Cdc25-Homologe Mih1. Im Gegensatz zu Cdc25 in *S. pombe* ist Mih1 nicht essentiell für den Zellzyklus der Bäckerhefe (Giaever et al., 2002).

3.4 Proteolyse treibt den Zellteilungszyklus an

Proteindegradation ist ein weit verbreiteter Mechanismus, um die Menge von Proteinen zu regulieren, da sie sehr schnell abläuft, unidirektional und irreversibel ist. Bei drei wichtigen Prozessen im Zellteilungszyklus spielt spezifische, zeitlich geordnete Proteolyse eine entscheidende Rolle (King et al., 1996). Zum einen am G1/S-Übergang, zum anderen in der Mitose bei der Initiation der Trennung der Schwesterchromatiden am Metaphase-/Anaphase-Übergang und schließlich beim Austritt aus der Mitose. Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, werden mit einer Polyubiquitinkette versehen und dann vom 26S Proteasom degradiert (Hochstrasser, 1995, Weissman, 2001). Die Ubiquitinierung von Proteinen erfordert drei verschiedene Enzymaktivitäten. Das erste Enzym in dieser Reihe ist ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym oder E1. Es katalysiert unter Hydrolyse eines ATPs die Bildung einer Thioesterbindung zwischen einer SH-Gruppe in seinem aktiven Zentrum und dem Carboxyterminus des Ubiquitins. Das so aktivierte Ubiquitin wird dann auf ein E2 Enzym, ein sogenanntes Ubiquitin-konjugierendes Enzym, übertragen. Vom E2 Enzym wird das Ubiquitin entweder direkt oder über eine Ubiquitinligase auf einen Lysinrest des Substrates übertragen. Dieser Prozess wiederholt sich mehrmals, so dass eine Polyubiquitinkette entsteht.

Zwei große Ubiquitinligasen sind in der Hefe an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und werden im Folgenden beschrieben.

3.4.1 Der SCF-Komplex

Der SCF-Komplex ist nach seinen drei Hauptbestandteilen bezeichnet: Skp1, Cdc53/cullin und F-box Proteine (Tyers und Jorgensen, 2000, Weissman, 2001). Das Cullin Cdc53 bildet das Gerüst für die weiteren SCF-Komponenten. Daran binden Skp1 und das RING-Finger Protein Rbx1. Rbx1 ist ein essentieller Bestandteil des SCF und enthält eine RING-H2-Domäne, die zwei Zink-Ionen komplexiert. Für die Degradation von SCF-Substraten ist außerdem Cdc34 notwendig, das als E2- oder ubiquitin-konjugierendes Enzym mit den Kernbestandteilen des SCF-Komplexes kooperiert und das aktivierte Ubiquitin schließlich auf die Substrate überträgt. F-box Proteine können in zwei Subdomänen untergliedert werden. Zum einen die F-box, eine konservierte Region bestehend aus ca. 50 Aminosäuren, die für die Interaktion mit Skp1 nötig ist, und zum anderen eine Domäne, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt. In dem F-box Protein Cdc4 wird diese Aufgabe von einer WD-40 Wiederholungssequenz wahrgenommen.

Verschiedene F-box Proteine erkennen unterschiedliche Substrate und bringen sie an den SCF-Komplex. Für die Degradation der CDK-Inhibitoren Sic1, Far1 und Cdc6 ist beispielsweise das F-box Protein Cdc4 nötig. Die G1-spezifischen Zykline Cln1 und Cln2 werden hingegen abhängig von dem F-box Protein Grr1 degradiert, das statt einer WD40-Wiederholungssequenz eine LRR-Sequenz (leucin rich repeat) für die Interaktion mit seinen Substraten besitzt. Alle SCF-Substrate sind Phosphoproteine. Anders als der APC, der im nächsten Kapitel beschrieben wird, ist der SCF-Komplex zu allen Zeiten im Zellzyklus aktiv. Die Regulation der Degradation erfolgt auf Ebene der Substrate durch deren Phosphorylierung.

Der CDK-Inhibitor Sic1 wird am Ende der Mitose gebildet und vermittelt die Inhibition der CDK-Aktivität beim Austritt aus der Mitose. In der G1-Phase verhindert Sic1 durch Inhibition der Komplexe aus Clb5/Clb6-Cdc28 ein vorzeitiges Einsetzen der DNA-Replikation. Durch die zunehmende Aktivität von Cln-Cdc28-Komplexen in G1 wird Sic1 schließlich phosphoryliert und damit ein Substrat für die Ubiquitinierung durch den SCF und anschließende Degradation durch das 26S-Proteasom (Verma et al., 1997). Dadurch kann die DNA-Replikation beginnen. Sic1 besitzt neun Cdc28-Konsensusstellen. Cdc28-Konsensusstellen sind aber schlechte Bindestellen für das F-box Protein Cdc4. Deshalb müssen mindestens sechs der neun Stellen phosphoryliert sein, damit Sic1 an Cdc4 binden kann. Bei niedriger Cln-Cdc28-Kinaseaktivität wird Sic1 nur unzureichend phosphoryliert und ist damit stabil. Erst wenn die Kinaseaktivität einen gewissen Schwellenwert überschritten hat, wird Sic1 effektiv phosphoryliert, bindet an Cdc4 und wird damit instabil. Dieser Mechanismus gewährleistet einen scharfen zeitlichen Verlauf der Deaktivierung von Sic1 und des G1/S-Überganges (Nash et al., 2001).

3.4.2 Der APC

Eine weitere Ubiquitinligase ist der in Hefe aus mindestens zwölf Untereinheiten bestehende Anaphase Promoting Complex/Cyclosom (APC/C) (Zachariae et al., 1998). Wie sein Name schon andeutet, ist der APC notwendig für den Beginn der Anaphase, APC-Aktivität wird aber auch für den Austritt aus der Mitose benötigt (Zachariae und Nasmyth, 1999, Tyers und Jorgensen, 2000). Außerdem ist der APC während der G1-Phase dafür verantwortlich, dass die CDK-Aktivität Prä-START niedrig bleibt. Die meisten Untereinheiten des APC besitzen ein Gegenstück in Vertebraten. Strukturell ist der APC verwandt zum SCF-Komplex. Wie Cdc53 im SCF gehört Apc2 zur Familie der Cullin-Proteine. Apc11 besitzt wie Rbx1 eine RING-H2-Domäne und interagiert mit Apc2. Der APC gehört wie der SCF also zur Familie der Cullin-RING-H2-Ubiquitinligasen. Drei der APC-Untereinheiten – Cdc16, Cdc23 und Cdc27 - besitzen ein TPR-Motiv (Tetratricopeptid), das vermutlich Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht (Lamb et al., 1994). Cdc26 ist ein Hitzeschockprotein, das die Interaktion von Cdc16, Cdc27 und Apc9 mit den restlichen APC-Untereinheiten stabilisiert (Zachariae et al., 1996). Doc1/Apc10 hingegen ist nötig für die Prozessivität der Ubiquitinierungsreaktion. Indem Doc1 vermutlich die Affinität des Substrates zum APC vergrößert, wird verhindert, dass das Substrat frühzeitig dissoziiert. Für die Entstehung der Multitubiquitinkette, die für die proteasomabhängige Degradation nötig ist, muss das Substrat also nur einmal und nicht

mehrmals hintereinander an den APC binden (Carroll und Morgan, 2002).

Der APC-Kernkomplex assoziiert mit mehreren Mitgliedern einer Familie von WD40-Proteinen, die als Substratspezifitätsfaktoren wirken. Diese interagieren wie die F-box Proteine mit bestimmten APC-Substraten und sorgen so für die Spezifität der Ubiquitinierungsreaktion (Schwab et al., 2001). Durch die regulierte Interaktion der Spezifitätsfaktoren Cdc20 und Hct1 mit dem APC wird die korrekte zeitliche Reihenfolge der Ereignisse während der Mitose gewährleistet. Cdc20 ist wichtig für die Degradation der frühen APC-Substrate Pds1, Clb3 und Clb5. Cdc20 ist selbst ein instabiles Protein und erreicht seine maximale Menge in der G2/M-Phase. Es interagiert nur dann mit dem APC, wenn dieser zuvor phosphoryliert worden ist. An dieser Phosphorylierung sind sowohl zyklinabhängige Kinasen als auch Kinasen der Polo-Familie beteiligt (Kotani et al., 1999). *Cdc20*-Mutanten arretieren in der Metaphase mit hohen Mengen an Pds1. Ein Hefestamm, in dem gleichzeitig *CDC20*, *PDS1* und *CLB5* deletiert sind, ist hingegen lebensfähig. Folglich ist die einzig essentielle Aufgabe von Cdc20 die Degradation von Pds1 und Clb5 (Shirayama et al., 1999). Durch die Degradation des Anaphaseinhibitors Pds1 (Securin) wird die Protease Esp1 (Separase) in die Lage versetzt, die Kohesin-Untereinheit Scc1 zu spalten. Diese dissoziiert dann vom Chromatin, was die Trennung der Schwesterchromatiden und somit den Beginn der Anaphase ermöglicht (Uhlmann et al., 2000). Cdc20-Substrate enthalten konservierte Sequenzmotive, sogenannte „destruction boxes“ (Glotzer et al., 1991), die für die Erkennung durch Cdc20 essentiell sind. Ein anderes Mitglied der WD40-Familie – Hct1 – erkennt seine Substrate anhand eines Sequenzmotives, das aufgrund einer bestimmten Aminosäureabfolge als KEN-box bezeichnet wird (Pfleger und Kirschner, 2000). Dementsprechend interagiert Hct1 auch unabhängig von deren „destruction box“ Sequenzen mit seinen Substraten Clb2 und Cdc5 (Schwab et al., 2001). Die Menge von Hct1 während des Zellzyklus schwankt nicht entscheidend. Die Interaktion mit dem APC wird durch Phosphorylierung des Proteins negativ reguliert. In G1-Zellen ist Hct1 unphosphoryliert, wird aber schon am G1/S-Übergang von zyklinabhängigen Kinasen phosphoryliert. Phosphoryliertes Hct1 kann nicht mit dem APC interagieren. Erst wenn Hct1 am Ende der Anaphase dephosphoryliert wird, kann es die Degradation seiner Substrate vermitteln. Hct1-Mutanten, bei denen sukzessive Sequenzmotive für die Phosphorylierung durch Cdc28-Kinase entfernt worden sind, zeigen entsprechend eine zunehmend verstärkte Clb2-Degradation (Zachariae et al., 1998). Die Phosphorylierung von Hct1 bewirkt außerdem dessen aktiven Transport aus dem Kern. Zwischen der S-Phase und dem Ende der Mitose befindet sich Hct1 im Zytoplasma (Jaquenoud et al., 2002). Dies entspricht dem Zeitraum, zu dem keine APC^{Hct1}-abhängige Degradation stattfindet. Die Phosphorylierung von Hct1 durch zyklinabhängige Kinasen führt also auf zwei Wegen zum Abschalten der APC^{Hct1}-Aktivität: zum einen verhindert sie die Bindung an den APC, zum anderen trennt sie Hct1 räumlich vom APC.

Sowohl Cdc20 als auch Hct1 sind keine integralen Bestandteile des APC, sondern interagieren mit dem APC in substöchiometrischen Mengen. Die Überproduktion beider Proteine führt zur Degradation ihrer jeweiligen Substrate in allen Stadien des Zellteilungszyklus, was zeigt, dass sie die APC-Aktivität limitieren.

Ein weiteres Mitglied dieser Familie von Spezifitätsfaktoren ist Ama1. *AMA1* wird spezifisch in der Meiose exprimiert und ist in der Meiose vermutlich notwendig für die Degradation von Clb1 (Cooper et al., 2000).

3.5 Das “mitotic exit network” – MEN

Ein entscheidender Schritt im Zellteilungszyklus ist das Ende der Mitose. Eine Reihe von Genen ist an der Aufgabe beteiligt, den Übergang von der Telophase in die nächste G1-Phase zu ermöglichen. Temperatursensitive Mutanten dieser Gene arretieren am Ende der Mitose mit großer Knospe, elongierter Spindel, getrennten Kernen und hohen Clb2-Mengen. Da dieser Arrestphänotyp demjenigen gleicht, der durch die Überexpression einer nicht degradierbaren Form von Clb2 hervorgerufen wird (Surana et al., 1993), liegt die Vermutung nahe, dass alle diese Proteine an einem Signaltransduktionsweg beteiligt sind, der am Ende der Mitose zum Abbau von Clb2 und zur Inaktivierung der Cdc28-Kinase führt. Dafür spricht auch, dass in diesen späten mitotischen Mutanten Genprodukte defekt sind, die in Signaltransduktionswegen regulatorische Aufgaben erfüllen können. Es handelt sich dabei um Kinasen wie Cdc5 (Kitada et al., 1993), Cdc15 (Schweizer et al., 1991) und Dbf2/20 (Johnston et al., 1991), das mit Dbf2 interagierende Protein Mob1 (Luca und Winey, 1998), die Phosphatase Cdc14 (Wan et al., 1992), das Spindelpolprotein Nud1 (Gruneberg et al., 2000) und die GTPase Tem1 (Shirayama et al., 1994b). Tem1 wird positiv reguliert durch den GDP/GTP-Austauschfaktor (GEF) Lte1 (Shirayama et al., 1994a) und negativ durch das aus zwei Komponenten bestehende GTPase-aktivierende Protein (GAP) Bub2/Bfa1 (Furge et al., 1998, Geymonat et al., 2003) (Abb1). Entsprechende Mutanten zeigen außerdem ausgeprägte genetische Interaktionen (Jaspersen et al., 1998), die die Existenz eines Signaltransduktionsweges am Ende der Mitose unterstützen. Das Ziel des MEN ist die Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose, was die Voraussetzung für den Abbau der mitotischen Spindel und für die anschließende Zytokinese, das heißt die physikalische Trennung von Mutter- und Tochterzelle, ist. Außerdem können sich nur nach Abschalten der Kinase Prä-Replikationskomplexe an den Replikationsursprüngen bilden. Die DNA-Replikation setzt allerdings erst ein, nachdem wieder CDK-Aktivität in Verbindung mit den B-Typ Zyklinen Clb5 und Clb6 vorliegt. Da sich Prä-Replikationskomplexe nur unter Bedingungen niedriger Kinaseaktivität bilden und Replikation nur unter Bedingungen hoher CDK-Aktivität stattfindet, wird gewährleistet, dass die DNA erst dann verdoppelt wird, wenn zuvor eine Mitose stattgefunden hat.

Tem1 steht vermutlich in diesem Signaltransduktionsweg ganz oben. Es ist ein kleines G-Protein der Ras-Superfamilie und wird vermutlich von Lte1 positiv reguliert, indem dieses den Austausch von GDP durch GTP katalysiert. Lte1 ist nicht essentiell für das Überleben der Zellen, Mutanten zeigen jedoch einen kältesensitiven Phänotyp (Shirayama et al., 1994a). Dieser Effekt kann sowohl durch die Überexpression von *TEM1* als auch die von *CDC15* supprimiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die entsprechenden Genprodukte unterhalb von Lte1 ihre Funktion im MEN erfüllen.

Die Überexpression von *CDC14* rettet sowohl die *cdc15-2*, als auch die *cdc5-1* und die *tem1-*

3-Mutante (Jaspersen et al. 1998). Cdc14 wirkt also unterhalb all dieser Genprodukte. Cdc14 ist eine Phosphatase, deren Überproduktion zur Degradation von Clb2 und zum Anstieg von Sic1 führt (Visintin et al., 1998). Cdc14-Aktivität ist somit limitierend für die Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase. Cdc14 ist das Ziel des „mitotic exit networks“. Das Signal, das durch das MEN weitergeleitet wird, führt schließlich zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus, wo es an Net1 gebunden im RENT-Komplex (regulator of nucleolar silencing and telophase) vorliegt. Net1 verankert Cdc14 aber nicht nur im Nucleolus, sondern inhibiert auch dessen Enzymaktivität (Shou et al., 1999). Eine Mutation in *NET1* supprimiert den letalen Phänotyp der *tem1*-, *cdc15*-, *mob1*- und *dbf2/dbf20*-Mutanten. Dies deutet darauf hin, dass die einzige essentielle Funktion dieser Gene die Freisetzung von Cdc14 ist (Shou und Deshaies, 2002). Cdc14 ist während des gesamten Zellzyklus im Nucleolus und verteilt sich erst in der Anaphase im Kern und im Zytoplasma. Dort dephosphoryliert es dann seine Substrate Hct1, Sic1 und Swi5 (Visintin et al., 1998, Jaspersen et al., 1999). Dephosphoryliertes Hct1 kann dann an den APC binden und die Degradation von Clb2 vermitteln. Der Anstieg der Sic1-Menge wird auf zwei unabhängigen Wegen durch Cdc14 verursacht. Zum einen führt die Dephosphorylierung von Swi5 dazu, dass es vom Zytoplasma in den Kern gelangen und dort seine Rolle als Transkriptionsfaktor von Sic1 erfüllen kann (Toyn et al., 1997). Zum anderen führt die Dephosphorylierung von Sic1 selbst zu einer Stabilisierung des Proteins, da es nur in seiner phosphorylierten Form ein Substrat für den SCF-Komplex ist. Cdc14 aktiviert also zwei Wege, die zusammen zum Abschalten der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose führen: die Degradation der mitotischen Zykline durch Hct1 und die Inhibition der CDK durch Sic1.

Neben dem MEN wurde ein weiterer Weg beschrieben, der für die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus in der frühen Anaphase verantwortlich ist. Dieser Weg wurde für Cdc14 (fourteen) early anaphase release (Stegmeier et al., 2002) mit FEAR bezeichnet. An diesem Weg beteiligt sind die Separase Esp1, die Polo-Kinase Cdc5, das Kinetochorprotein Slk19 und Spo12. Die Aktivität dieser Proteine führt in der frühen Anaphase zu einer transienten Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus. Damit Cdc14 in der Anaphase und Telophase freigesetzt bleibt, wird jedoch das MEN benötigt. Das in der frühen Anaphase ohne Mitwirkung der MEN-Gene *CDC15*, *DBF2* und *TEM1* freigesetzte Cdc14 bindet über die Wechselwirkung mit Bub2/Bfa1 und Tem1 an den Spindelpol und bewirkt eine Aktivierung des MEN. Mit dem Austritt aus der Mitose dephosphoryliert Cdc14 Bfa1, was zur Aktivierung des GAP-Komplexes und damit zur Inaktivierung von Tem1 und des MEN führt. Cdc14 stimuliert in der frühen Anaphase also seine eigene Freisetzung durch Aktivierung des MEN und inaktiviert das MEN am Ende der Mitose auch wieder, so dass die MEN-Aktivität auf einen kurzen Zeitraum in der Anaphase beschränkt bleibt (Pereira et al., 2002). Die Hct1-abhängige Degradation des MEN-Aktivatoren Cdc5 (Charles et al., 1998) führt ihrerseits zur Inaktivierung des MEN. Cdc5 muss im nächsten Zellzyklus erst wieder synthetisiert werden, um das MEN wieder aktivieren zu können. Ein weiterer Mechanismus zur Inaktivierung des MEN ist auf die Tochterzelle beschränkt. Dort wird spezifisch das Protein Amn1 exprimiert. Amn1 konkurriert mit Cdc15 um die Bindung an Tem1. Dies führt zu einer Auflösung des Komplexes aus Tem1 und Cdc15

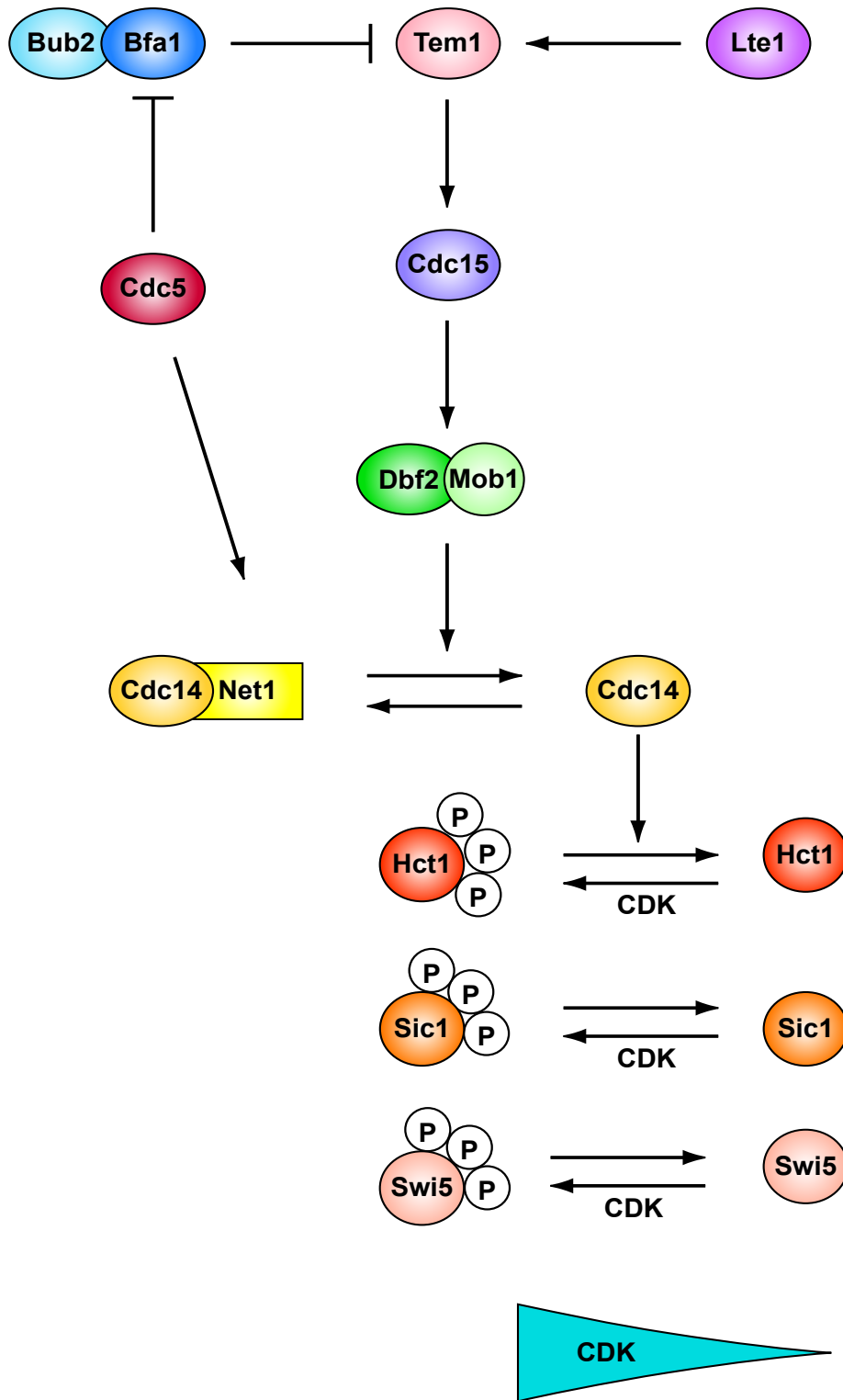


Abb. 1 Modell des “mitotic exit networks” (MEN). Ein Pfeil repräsentiert die Aktivierung einer Komponente, eine Inhibierung wird durch einen Balken dargestellt. Ein P in einem Kreis bedeutet eine Phosphorylierung

und damit zu der Inaktivierung des MEN. Amn1 selbst ist ein instabiles Protein und erreicht sein Maximum in der späten M- bzw. G1-Phase (Wang et al., 2003).

Die Polo-Kinase Cdc5 ist nicht nur Teil des FEAR-Signalweges, sondern ist auch ein integraler Bestandteil des MEN. Cdc5 phosphoryliert Bfa1, was die Funktion des Bfa1/Bub2-Komplexes als GAP von Tem1 beeinträchtigt. Auf diese Weise führt Cdc5 zu einer Aktivierung des MEN (Hu et al., 2001, Geymonat et al., 2003). Cdc5 kann aber auch Net1 phosphorylieren. Das hat *in vitro* eine Auflösung des RENT-Komplexes zur Folge (Shou et al., 2002). Cdc5 phosphoryliert *in vitro* aber nicht nur Net1, sondern auch Cdc14 (Albert Neutzner, pers. Mitteilung). Außerdem führt die Überexpression von *CDC5* zur verfrühten Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus (Shou et al., 2002, Albert Neutzner pers. Mitteilung). Cdc5 scheint die Freisetzung von Cdc14 also auf mindestens zwei unabhängigen Wegen zu stimulieren. Zum einen durch die Aktivierung des MEN über die Phosphorylierung und damit verbundene Inaktivierung von Bfa1 und zum anderen direkt durch die Verringerung der Stabilität des RENT-Komplexes.

Viele der MEN-Komponenten haben auch eine Funktion in der Zytokinese. Die Kinasen Cdc5 (Song et al., 2000), Cdc15 (Xu et al., 1999) und Dbf2 (Frenz et al., 2000) lokalisieren spät in der Mitose nicht nur am Spindelpolkörper, sondern wandern auch an die Übergangsstelle von Mutter- zu Tochterzelle. Diese Relokalisation von Dbf2 ist abhängig von den MEN-Komponenten Cdc5, Cdc15, Cdc14 und Mob1. In *dbf2*-Mutanten ist bei restriktiver Temperatur die Bildung des Actinrings zwischen Mutter- und Tochterzelle beeinträchtigt, was auf eine gestörte Zytokinese hindeutet. Von *CDC15* existieren ebenfalls Mutanten, die den Austritt aus der Mitose bewerkstelligen können, dann aber keine Zytokinese durchführen (Menssen et al., 2001). Es scheint also ein weit verbreiteter Mechanismus zu sein, dass die selben Gene am Austritt aus der Mitose und an der Zytokinese beteiligt sind. Da die Zytokinesefunktion von der „mitotic exit“ Funktion abhängt, wird die korrekte zeitliche Reihenfolge der Ereignisse gewährleistet. Das bedeutet, die Zelle macht erst dann eine Zytokinese, wenn zuvor das genetische Material auf Mutter- und Tochterzelle verteilt worden ist.

3.6 Kontrollsysteme

Für das Überleben der Zelle ist es essentiell, dass bei der Weitergabe der genetischen Information an ihre Nachkommen deren Integrität bewahrt bleibt. Bestimmte Kontrollsysteme, auch „checkpoints“ genannt (Hartwell und Weinert, 1989), überwachen den korrekten zeitlichen Ablauf der Ereignisse, so dass späte Ereignisse wie beispielsweise die Trennung der Schwesterchromatiden verzögert werden, solange frühe Ereignisse wie die DNA-Replikation noch nicht abgeschlossen sind (Clarke et al., 2000). Auf diese Weise wird verhindert, dass Veränderungen an die Nachkommen weitergegeben werden oder es zur Aneuploidie kommt.

3.6.1 Das Spindelkontrollsystem

Das Spindelassemblierungskontrollsystem sorgt dafür, dass die replizierten Chromosomen korrekt mit der mitotischen Spindel verbunden sind bevor sie in der Anaphase auf die Mutter- und Tochterzelle verteilt werden. Es verzögert den Metaphase-/Anaphase-Übergang so lange,

bis alle Schwesterchromatiden über ihre Kinetochoren mit entgegengesetzten Polen der Spindel verbunden sind. Dieser Weg wurde ursprünglich durch Mutationen definiert, die es der Zelle erlauben, in Gegenwart der spindeldepolymerisierenden Substanzen Nocodazol oder Benomyl in ihrem Zellzyklus fortzuschreiten. Diese Mutanten, *BUB1* und *BUB3* (budding uninhibited by benzimidazol, Hoyt et al., 1991) sowie *MAD1*, *MAD2*, *MAD3* (mitotic arrest deficient, Li und Murray, 1991) und *MPS1* (Weiss und Winey, 1996), arretieren bei Behandlung mit diesen Benzimidazolverbindungen nicht wie der Wildtyp vor Beginn der Anaphase als Zelle mit großer Knospe, ungeteiltem Kern und hoher Cdc28-Kinaseaktivität, sondern bilden ohne vorhergehende Zytokinese neue Knospen und replizieren erneut ihre DNA, was schließlich letal ist. Keines dieser Gene außer *MPS1* ist essentiell für das Überleben der Zelle unter normalen Bedingungen. Mps1 ist eine Kinase, deren Überproduktion zu einer konstitutiven Aktivierung des Kontrollsystems führt (Hardwick et al., 1996). Bub1 ist ebenfalls eine Kinase und kann *in vitro* Bub3 phosphorylieren (Roberts et al., 1994). Die Vertebraten-Homologe von Mad1, Mad2, Mad3, Bub1 und Bub3 lokalisieren in der Prophase und in der Prometaphase an Kinetochoren, die nicht mit der mitotischen Spindel verbunden sind. Das Ziel des Kontrollsystems ist Cdc20 (Wassmann und Benezra, 2001). In der Hefe wird nach Aktivierung des Kontrollsystems vermehrt ein Komplex aus Mad2, Mad3, Bub3 und Cdc20 beobachtet (Fraschini et al., 2001). Mad1 und Mad2 lokalisieren normalerweise am Kernporenkomplex. Nach Aktivierung des Kontrollsystems wird Mad2 freigesetzt und akkumuliert an den unbesetzten Kinetochoren (Iouk et al., 2002). Die derzeitigen Modelle schlagen vor, dass Mad2 an unbesetzten Kinetochoren aktiviert wird und dann ein frei diffundierbares Stop-Signal für den Beginn der Anaphase bildet (Shah und Cleveland, 2000). Die Inaktivierung des APC^{Cdc20} durch dieses Stop-Signal führt schließlich zur Stabilisierung von Pds1, wodurch die Zellen in der Metaphase arretieren. Pds1 ist aber auch ein Inhibitor der Zyklin-Degradation am Ende der Mitose. Hohe Mengen an nicht degradierbarem Pds1 verhindern die Clb2-Degradation, indem sie die Dephosphorylierung von Hct1 verhindern. Indem ein frühes Substrat wie Pds1 die Degradation eines späten Substrates wie Clb2 verhindert, wird gewährleistet, dass Zellen erst aus der Mitose austreten, wenn zuvor die Chromosomen auf die Nachkommen verteilt wurden (Cohen-Fix und Koshland, 1999).

Ein weiteres Gen, das ursprünglich von Hoyt et al. ebenfalls aufgrund der Tatsache entdeckt wurde, dass seine Deletion die Zellen hypersensitiv gegen geringe Mengen von spindeldepolymerisierenden Substanzen macht, ist *BUB2*. Genetische Studien definierten zwei Epistasis-Gruppen. Der einen gehören die *MAD*-Gene sowie *BUB1*, *BUB3* und *MPS1* an, die andere besteht aus *BUB2* und *BFA1* (Li, 1999, Fraschini et al., 1999, Alexandru et al., 1999). Das Kontrollsystem, das von Bub2 und Bfa1 gebildet wird, verhindert durch Inhibition von APC^{Hct1} den Austritt aus der Mitose solange, bis ein Spindelpol in die Tochterzelle eingewandert ist. Erst wenn die Tochterzelle ein Äquivalent des genetischen Materials erhalten hat, kommt es zum Austritt aus der Mitose und zur Zytokinese. Dadurch wird die Entstehung einer Aneuploidie verhindert. Der zugrunde liegende Mechanismus beruht auf der speziellen Lokalisation der beteiligten Proteine. Tem1, Bub2 und Bfa1 lokalisieren an der zytoplasmatischen Seite des Spindelpols, der in die Tochterzelle einwandert (Bardin et al., 2000, Pereira et al., 2000). Bub2/

Bfa1 bilden das GAP für Tem1. Solange also Tem1 mit Bub2/Bfa1 assoziiert ist, befindet es sich in seiner GDP-gebundenen Form und ist inaktiv. Das putative GEF von Tem1, Lte1, befindet sich ausschließlich in der Knospe, wobei es an deren Kortex angereichert ist. Wandert nun der Spindelpolkörper in der Anaphase in die Tochterzelle ein trifft Tem1 auf sein GEF Lte1. Dies führt zu einem Austausch von GDP zu GTP an Tem1 und somit zu dessen Aktivierung. Aktives Tem1 aktiviert das MEN, was schließlich zur Freisetzung von Cdc14 führt. Schließlich mündet das Signal in der Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase (Hoyt, 2000).

3.6.2 Das DNA-Schadenskontrollsystem

So wie das Spindelkontrollsystem den Beginn der Anaphase verzögert, wenn die mitotische Spindel beschädigt oder nicht richtig orientiert ist, führt auch ein DNA-Schaden zu einem Arrest der Zellen in der Metaphase. Dieser Mechanismus gewährleistet ebenfalls die Intaktheit des genetischen Material, das an die Nachkommen weitergegeben wird. Ausgelöst wird dieses Kontrollsystem durch einzelsträngige DNA (Zhou und Elledge, 2000, Clarke und Giménez-Abián, 2000). In Hefe ist schon ein einzelner Doppelstrangbruch ausreichend, um das DNA-Schadenskontrollsystem auszulösen. Durch die Verzögerung des Zellzyklus in der Metaphase gewinnt die Zelle Zeit für die Reparatur des Schadens bevor sie in der Anaphase die DNA auf die Mutter- und Tochterzelle verteilt. Es gibt Gene wie z. B. *RAD9* in Hefe, deren Deletion die „Checkpoint“-Antwort komplett aufheben. Bei einem DNA-Schaden schreiten diese Zellen ohne zeitliche Verzögerung durch den Zellzyklus. Die Deletion anderer Gene bewirkt hingegen eine partielle Verzögerung der Anaphase. Das derzeit favorisierte Modell beruht auf verschiedenen genetischen und physiologischen Experimenten (Abb.2). Danach gibt es zwei Gruppen von Sensoren, die den DNA-Schaden erkennen und ein Signal an „Checkpoint“-Kinasen weiterleiten. Die eine Gruppe von Sensoren besteht aus Rad9, die andere besteht aus Rad17, Rad24, Ddc1 und Mec3. Mec1 ist eine Proteinkinase aus der Familie der PI-Kinase-verwandten Kinasen. Ihr Funktionsverlust ist wie der von Rad9 mit einem kompletten Ausfall der „Checkpoint“-Antwort verbunden. *Rad53* und *pds1*-Mutanten können den Beginn der Anaphase partiell verzögern, Doppelmутanten zeigen hingegen ebenfalls einen vollständigen Verlust des Kontrollsystems. Beide Genprodukte wirken in parallelen Wegen. Die Anaphase wird schließlich verhindert, indem die APC^{Cdc20}-abhängig Degradation des Anaphaseinhibitors Pds1 verhindert wird. Pds1 inhibiert die Separase Esp1, die zu Beginn der Anaphase das Kohesin Scc1 spaltet, das dann vom Chromatin dissoziiert und so die Trennung der Schwesterchromatiden erlaubt. In Antwort auf einen DNA-Schaden wird Pds1 hyperphosphoryliert. Pds1 wird sowohl *in vitro* (Sanchez et al., 1999) als auch *in vivo* (Wang et al., 2001) von Chk1 phosphoryliert. Die Chk1-abhängige Phosphorylierung von Pds1 führt zu einer Stabilisierung des Proteins.

In Säugern sind ATR und ATM die strukturellen und funktionellen Homologe zu Mec1. ATM ist bei der Krankheit Ataxia Telangiectasia (AT) mutiert. AT-Patienten leiden unter anderem an einer erhöhten Anfälligkeit für Krebserkrankungen und an einer extremen Sensitivität gegenüber Strahlung. Das Homologe zu Rad53, Chk2, wird in Antwort auf einen DNA-Schaden ATM-abhängig phosphoryliert. Chk2 seinerseits kann Cdc25C phosphorylieren und

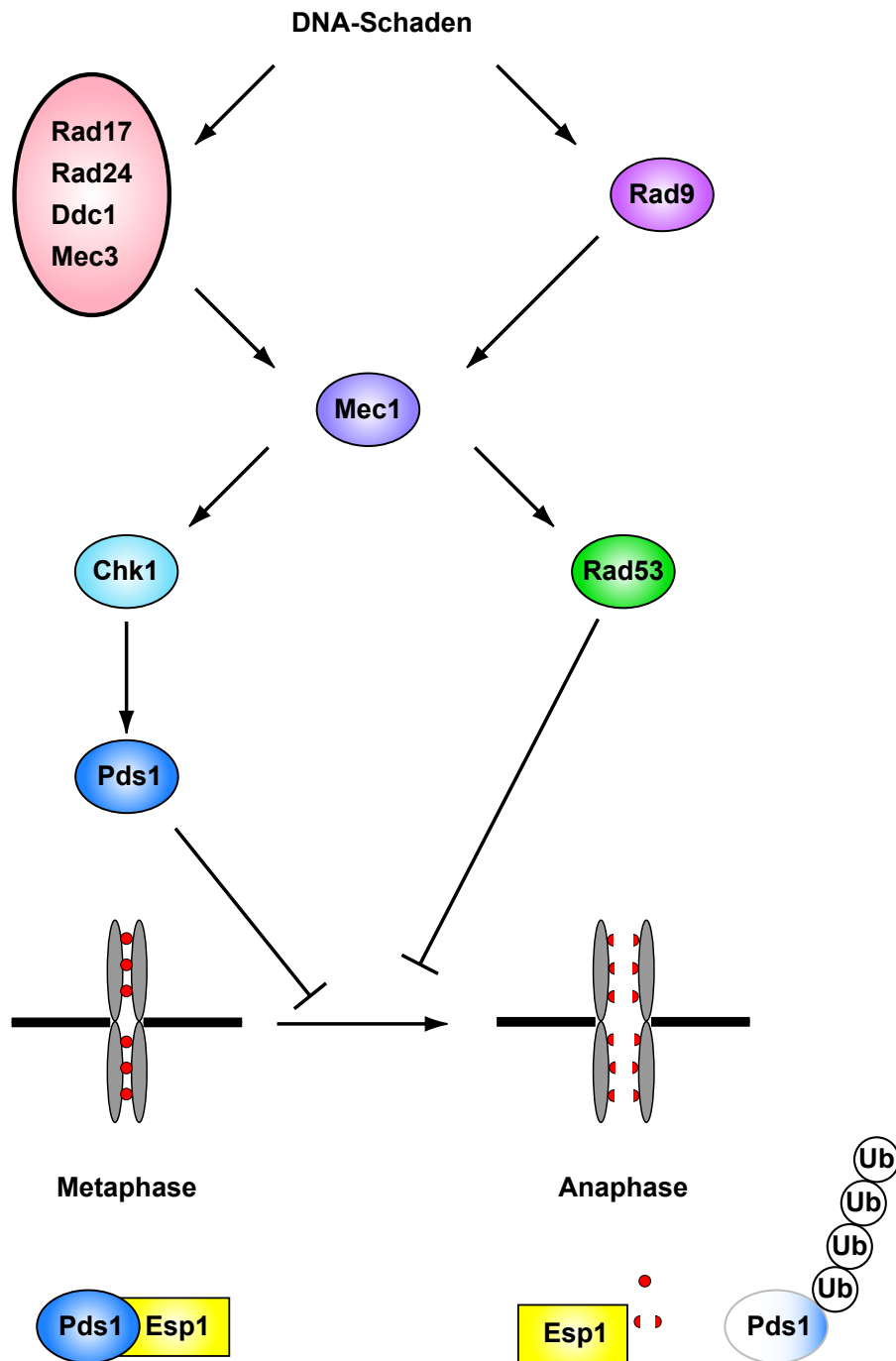


Abb. 2 Modell des DNA-Schadenskontrollsystems. Ein Pfeil repräsentiert die Aktivierung einer Komponente, eine Inhibierung wird durch einen Balken dargestellt. Ub in einem Kreis steht für ein Ubiquitin. Die mitotische Spindel wird durch schwarze Balken dargestellt, rote Kreise repräsentieren den Kohesin-Komplex, der die Schwesterchromatiden (grau) verbindet

damit inaktivieren. Cdc25C ist eine Phosphatase und aktiviert Zyklin B-Cdc2-Komplexe durch Entfernung eines inhibitorischen Phosphatrestes. In Säugern scheint der mitotische Arrest also direkt durch Inhibition der zyklinabhängigen Kinase bewerkstelligt zu werden und nicht durch Verhinderung der Anaphase durch die Stabilisierung von Securin.

3.7 Die Familie der Polo-Kinasen

Namensgebend für diese Gruppe von Proteinkinasen ist das *polo* Gen aus *Drosophila melanogaster*. Polo-Kinasen zeichnen sich durch eine konservierte Kinasedomäne am N-Terminus und eine regulatorische Domäne am C-Terminus aus. Diese besteht aus zwei konservierten Motiven, den Polo-Boxen. Die Polo-Kinase der Bäckerhefe, Cdc5, weist an ihrem N-Terminus zusätzlich zwei „destruction-box“ Motive auf, die für die APC-abhängige Degradation des Proteins essentiell sind. In Säugern gibt es mehrere verschiedene Polo-Kinasen. Dabei ist Plk1 am ähnlichsten zu *polo* aus *Drosophila*. Daneben existieren noch Snk (Plk2) und Fnk/Prk (Plk3), die ebenfalls die strukturellen Charakteristika der Polo-Kinasen aufweisen. Sak (Plk4) hingegen besitzt nur eine Polo-box (Leung et al., 2002). Abb. 3 zeigt einen Sequenzvergleich der Polo-Kinasen aus *S. cerevisiae* (Cdc5), *S. pombe* (Plo1), *D. melanogaster* (Polo), *X. laevis* (Plx1) und dem Menschen (Plk1). Die Ähnlichkeit der verschiedenen Mitglieder der Polo-Kinasen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Plk1 aus der Maus beispielsweise den Defekt der *cdc5-1*-Mutante der Hefe komplementieren kann (Lee und Erikson, 1997). Hierzu ist eine intakte Polo-box essentiell (Lee et al., 1998).

Polo-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen, die MPM-2-Epitope erzeugen können (Logarinho und Sunkel, 1998). Alle Polo-Kinasen haben ein konserviertes Threonin (Position 238 in Cdc5 und 210 in Plk1) innerhalb der Kinasesubdomäne VIII (T-loop, activation loop zwischen den konservierten Bereichen DFG und APE), dessen Phosphorylierung essentiell ist. Der Austausch des Threonins an Position 210 gegen ein Aspartat in Plk1 erhöht dessen Kinaseaktivität mehrfach. Die Überexpression dieser Mutante in Hefe führt zur Akkumulation von Zellen in der G1-Phase. Außerdem entstehen Zellen mit elongierter Knospe, in der mehrere Septinringstrukturen auftreten. Dies ist nicht der Fall, wenn der C-Terminus mit der Polo-box deletiert ist (Lee und Erikson, 1997). In der cAMP-abhängigen Proteinkinase cAPK entspricht das Threonin 210 Threonin 197, das in einer Autophosphorylierungsreaktion phosphoryliert wird. Wie alle bekannten Kinasen, die durch Phosphorylierung im Aktivierungsloop aktiviert werden, gehören auch die Polo-Kinasen zu der Gruppe der RD-Kinasen. Dem katalytischen Aspartat geht also ein Arginin voraus (Johnson et al., 1996).

In *Xenopus* wurde eine Kinase identifiziert, die Plx1 phosphorylieren und aktivieren kann. Diese Kinase, xPlkk1 (polo-like kinase kinase1) wird wiederum selbst durch Phosphorylierung aktiviert. In *Xenopus* existiert also eine Kinasekaskade, die letztendlich zur Aktivierung der Phosphatase Cdc25C und damit zur Aktivierung von Cdc2-Zyklin B führt (Qian et al., 1998). Ähnliches scheint für Säuger zu gelten. In der Maus phosphoryliert und aktiviert SLK (Ste20-like kinase) Plk1.

Polo-Kinasen zeigen ein zellzyklusabhängiges Expressionsmuster. Plk1 wird am S/G2-

Übergang gebildet, erreicht ein Maximum am G2/M-Übergang und verschwindet am Ende der Mitose wieder (Lee et al., 1995). Ähnliches gilt für die Polo-Kinase der Hefe, Cdc5. Das Protein akkumuliert am Ende der S-Phase, erreicht sein Maximum in der Mitose und wird am Ende der Anaphase wiederum degradiert. Parallel dazu steigt auch die Kinaseaktivität an, erreicht ebenfalls in der Mitose ihr Maximum und fällt am Ende der Mitose steil ab (Shirayama et al., 1998, Cheng et al., 1998). Die Kinaseaktivität von Plk1 persistiert in der Mitose dabei länger als die von Cdc2-Zyklus B (Lee et al., 1995). Entsprechend ihrem Aktivitätsmuster erfüllen Polo-Kinasen ihre verschiedenen Funktionen in der Mitose (Glover et al., 1998, Nigg, 1998, Donaldson et al., 2001, Nigg, 2001).

Am G2/M-Übergang stimuliert Plx1 durch Phosphorylierung und Aktivierung von Cdc25C eine positiven „feedback-loop“, der letztendlich zur Aktivierung von Cdc2-Zyklus B und damit zum Eintritt in die Mitose führt. Plk1 phosphoryliert in der Prophase Zyklus B1 innerhalb seiner Kernexportsequenz. Dies hat die Akkumulation von Zyklus B1 im Kern zur Folge (Toyoshima-Morimoto, 2001).

Polo-Kinasen spielen zudem eine wichtige Rolle bei der Separation und Reifung der Centrosomen (Dai et al., 2002). Polo-Mutanten können keine mitotische Spindel ausbilden, sondern weisen stattdessen eine monopolare Spindel auf. Plk1 scheint die Assoziation zwischen Centrosomen und Mikrotubuli zu stimulieren. Dafür spricht auch die Tatsache, dass Plk1 in einem Komplex mit α -, β - und γ -Tubulin vorliegt und alle drei Tubuline *in vitro* phosphorylieren kann (Feng et al., 1999). Polo interagiert außerdem mit dem mikrotubuli-assoziierten Protein Asp. Asp wird von Polo phosphoryliert und dadurch zu einem MPM-2-Epitop. Vermutlich steigert die Phosphorylierung von Asp dessen mikrotubuli-organisierende Aktivität (Avides et al., 2001).

Weiterhin ist die Aktivität von Polo-Kinasen mit entscheidend für den Metaphase/Anaphase-Übergang. Durch die APC-vermittelte Degradation von Securin wird Separase in die Lage versetzt, Untereinheiten des Kohesinkomplexes proteolytisch zu spalten und dadurch die Kohesion zwischen den Schwesterchromatiden aufzuheben. Polo-Kinasen sind an der Aktivierung des APC beteiligt. So kann Plk1 aus der Maus verschiedene APC-Untereinheiten *in vitro* phosphorylieren, was zu einer Erhöhung der APC-Aktivität führt (Kotani et al., 1998). Außerdem scheinen Polo-Kinasen direkt die Aktivität des Proteasoms zu beeinflussen. Plk1 interagiert mit verschiedenen Untereinheiten des 20S-Proteasoms und phosphoryliert zumindest zwei davon auch *in vivo*. Die Phosphorylierung des Proteasoms durch Plk1 erhöht dessen proteolytische Aktivität (Feng et al., 2001). In der Bäckerhefe bewirkt die Überexpression von *CDC5* ebenfalls eine erhöhte APC-Aktivität und eine verstärkte Degradation des B-Typ Zyklus Clb2. Cdc5 ist für den Metaphase/Anaphase-Übergang aber nicht essentiell. Die Überexpression von *CDC5* hat keinen Einfluß auf die Menge des Securins Pds1 (Charles et al., 1998) und im *cdc5*-Arrest ist Pds1 bereits degradiert (Shirayama et al., 1998). Dennoch spielt Cdc5 eine Rolle am Beginn der Anaphase. Am Metaphase/Anaphase-Übergang phosphoryliert Cdc5 die Kohesin-Untereinheit Scc1, was diese anfälliger für die Spaltung durch Separase macht (Alexandru et al., 2001).

Polo-Kinasen kommt zudem eine wichtige Funktion bei der Regulation der Zytokinese zu.

S. pombe plo1-Mutanten zeigen einen starken Zytokinesedefekt. Es entstehen multinukleäre Zellen, da trotz stattfindender Kernteilung weder ein Aktinring noch ein Septum ausgebildet werden. Die Überexpression von plo1 induziert in allen Zellzyklusstadien multiple Septa. In *S. pombe* ist die Zytokinese durch ein Signaltransduktionsnetzwerk, das als SIN (septum initiation network) bezeichnet wird, reguliert (Bardin und Amon, 2001, McCollum und Gould, 2001). Viele der daran beteiligten Genprodukte sind homolog zu Bestandteilen des MEN in *S. cerevisiae*. So steht an dessen Spitze das G-Protein Spg1, das Homologe zu Tem1. Reguliert wird dieses durch das aus zwei Komponenten bestehende GAP Cdc16/Byr4, was dem Komplex aus Bub2/Bfa1 entspricht. Spg1 in seiner GTP-gebundenen Form aktiviert die Kinase Cdc7, das Verwandte zu Cdc15 aus der Bäckerhefe. Plo1 aktiviert auf bisher noch unverstandene Art und Weise diesen Signalweg. In der Bäckerhefe induziert die Überexpression von *CDC5* Zellen mit elongierter Knospe. In dieser Knospe finden sich zusätzliche Septinringstrukturen (Song et al., 2000). Außerdem führt die Überproduktion einer N-terminal verkürzten Variante von Cdc5 zu einem dominant-negativen Zytokinesedefekt (Song und Lee, 2001).

Die vielfältigen Funktionen der Polo-Kinasen in der Mitose werden durch ihr komplexes Lokalisationsmuster widergespiegelt. In der Prometaphase lokalisieren sie an den Centrosomen und an den Kinetochoren. Die Lokalisation an den Centrosomen bleibt bis zur Metaphase aufrechterhalten. In der späten Anaphase lokalisieren Polo-Kinasen dann in der Mitte der mitotischen Spindel. Während der Telophase bzw. der Zytokinese findet man sie schließlich an der Spaltungsfurche (Nigg, 2001). Die Polo-Kinase der Bäckerhefe, Cdc5, lokalisiert an den Spindelpolkörpern, dem Hefeäquivalent des Centrosoms, und an der Übergangsstelle von der Mutter- zur Tochterzelle. Dort interagiert es mit den Septinringkomponenten Cdc11 und Cdc12. Die subzelluläre Lokalisation von Cdc5 ist Polo-box-abhängig (Song et al., 2000, Song und Lee, 2001). Auch für Plk gilt, dass der C-Terminus mit den Polo-Box Motiven für die korrekte Lokalisation des Proteins benötigt wird. Außerdem scheint der C-Terminus durch Bindung an die katalytische Domäne die Kinaseaktivität von Plk negativ zu regulieren. Dieser inhibitorische Effekt wird durch den Austausch des Threonins an Position 210 gegen ein Aspartat aufgehoben (Jang et al., 2002).

Die Wirkungsweise der Polo-box wurde kürzlich aufgeklärt. Bei ihr handelt es sich um eine Domäne, die spezifisch Phospho-Serin und Phospho-Threonin Motive, die meist von einem Prolin gefolgt werden, erkennt und daran bindet. Solche Sequenzmotive werden unter anderem von zyklinabhängigen Kinasen generiert. Auf diese Weise wird die subzelluläre Lokalisation von Plk reguliert und die Erkennung der Substrate gewährleistet. So wird die Lokalisation am Centrosom beispielsweise durch Zugabe eines optimalen Peptidliganden für die Polo-box inhibiert. Neben der Lokalisation wird aber auch die Erkennung von Substraten reguliert (Elia et al., 2003, Silljé und Nigg, 2003).

Polo-Kinasen spielen weiterhin eine wichtige Rolle beim DNA-Schadenskontrollsystem. Dieses Kontrollsystem ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. In Antwort auf eine Schädigung der DNA wird der Zellzyklus in der Metaphase arretiert und der Zelle vor der Teilung somit Zeit für die Reparatur des Schadens gegeben. Kann ein DNA-

Schaden nicht repariert werden, so schreiten Hefezellen nach einem verlängerten Arrest vor der Anaphase dennoch in ihrem Zellzyklus fort. Dieses Phänomen wird als Adaptation bezeichnet. Eine Mutation in *CDC5* (*cdc5-ad*), die den Austausch eines Leucins an Position 251 gegen ein Tryptophan (L251W) zur Folge hat, bewirkt, dass die Zellen adaptationsdefekt sind und somit permanent vor Beginn der Anaphase arretieren (Toczyski et al., 1997). Die Überproduktion von Cdc5^{L251W} in asynchronen Zellen führt wie die des Wildtypproteins zu einer Aktivierung des APC. Im Nocodazol-Arrest und im *cdc13-1*-Arrest stimuliert Cdc5^{L251W} die APC-Aktivierung allerdings weitaus ineffizienter, obwohl die *in vitro* Kinaseaktivität gegenüber dem künstlichen Substrat Casein erhöht ist (Charles et al., 1998). Vermutlich besitzt die *cdc5-ad*-Mutante normale Kinaseaktivität ist aber in der Erkennung bestimmter Substrate eingeschränkt. In Antwort auf einen DNA-Schaden wird Cdc5 abhängig von den „Checkpoint“-Genen *RAD53*, *MEC1* und *RAD9* posttranslational modifiziert (Cheng et al., 1998). Das derzeit vorgeschlagene Modell ordnet Cdc5 dem Rad53-Zweig des DNA-Schadenskontrollsystems zu. Der Funktionsverlust von Cdc5 kann den Präanaphasearrest in *rad53*-Mutanten teilweise wiederherstellen, was darauf hindeutet, dass Rad53 Cdc5 inhibiert. Die Überexpression von *CDC5* im *cdc13-1*-Arrest führt zu Zellen mit elongierten Spindeln. Die Cdc5-Aktivität ist in „checkpoint“-arretierten Zellen demnach limitierend für den Eintritt in die Anaphase (Sanchez et al., 1999).

Die Aktivität des humanen Ortolog von Cdc5, Plk1, wird in Antwort auf einen DNA-Schaden sowohl in der G2-Phase als auch in der Mitose inhibiert (Smits et al., 2000). Vermutlich trägt dies zum Zellzyklusarrest bei, indem dadurch die Aktivierung von Cdc25C verhindert wird, an der Polo-Kinase zumindest in *Xenopus laevis* maßgeblich beteiligt ist (Qian et al., 2001). Die durch einen DNA-Schaden induzierte Inhibition von Plk1 ist abhängig von den „Checkpoint“-Kinasen ATM und ATR (van Vugt et al., 2001). Polo-Kinasen spielen demnach eine wichtige Rolle bei der Überwindung eines Arrestes in Folge von DNA-Schäden.

4 Material

4.1 Bakterienstämme

4.1.1 *E. coli* DH5 α

Wirt für *E. coli*- bzw. Hefeshuttlevektoren war der *E. coli* Stamm DH5 α

Genotyp: supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

Für die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* wurde der Stamm XL1blue mit dem Plasmid pUBS520 eingesetzt.

4.2 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp
3E2	<i>MATa</i> <i>CLB2</i> ^{HA3}
K6213	<i>MATα</i> <i>cdc5::CDC5</i> ^{HA3} - <i>URA3</i>
K6390	<i>MATα</i> <i>cdc5::CDC5</i> ^{Myc15} - <i>URA3</i>
K699	<i>MATa</i> <i>ade2-1 can1-100 his3-11,-15 leu2-3,-112 ssd1-d trp1-1 ura3-2</i>
W1010	<i>MATα</i> <i>ura3::GAL1CLB3</i> ^{HA3} - <i>URA3</i>
W1500	<i>MATa</i> <i>cdc23-1</i>
W1502	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1-TRP1</i>
W1555	<i>MATa</i> <i>ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3 CLB2</i> ^{HA3}
W1559	<i>MATα</i> <i>cdc23-1 ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3 CLB2</i> ^{HA3}
W1619	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3</i>
W1621	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1-TRP1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3</i>
W1648	<i>MATa</i> <i>ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3</i>
W1660	<i>MATα</i> <i>cdc5::GAL1-Myc3CDC5-URA</i>
W1715	<i>MATα</i> <i>ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3</i>
W1739	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+0-TRP1</i>
W1757	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+0-TRP1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3</i>
W1791	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W1792	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W1799	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W1800	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W1801	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+8/9/10/11-TRP1</i>
W1802	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+8/9/10/11-TRP1</i>
W1803	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+9/10/11-TRP1</i>
W1804	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+9/10/11-TRP1</i>
W1805	<i>MATa</i> <i>cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+10/11-TRP1</i>

W1806	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1+10/11-TRP1</i>
W1809	MATa	<i>cdc5::CDC5^{HA3}-URA3 bar1-Δ1::HIS3</i>
W1854	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9</i>
W1855	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9 ura3::GAL1^{-HA3}CDC5-URA3</i>
W1874	MATa	<i>cdc23-1 ura3::GAL1^{-HA3}CDC5-URA3 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1^{T157A}-TRP1</i>
W1875	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1^{T157A}-TRP1</i>
W1930	MATa	<i>cdc23-1 ura3::GAL1^{-HA3}CDC5ΔN70-URA3</i>
W1931	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1-TRP1 ura3::GAL1^{-HA3}CDC5ΔN70-URA3</i>
W1955	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1+0-TRP1 ura3::GAL1^{-HA3}CDC5ΔN70-URA3</i>
W1960	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-URA3 pds1-Δ1::HIS3 clb2::CLB2^{HA3}-TRP1</i>
W1997	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5ΔN70-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W1998	MATa	<i>cdc27::CDC27^{HA3}-TRP1</i>
W2020	MATα	<i>ura3::GAL1-PDS1^{HA3}-URA3 cdc5::GAL1^{-MYC3}CDC5-URA3</i>
W2026	MATa	<i>cdc27::CDC27^{HA3}-TRP1 ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-URA3</i>
W2028	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m2-URA3 CLB3^{HA3}</i>
W2029	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m1-URA3 CLB3^{HA3}</i>
W2030	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m1/2-URA3 CLB3^{HA3}</i>
W2031	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m3-URA3 CLB3^{HA3}</i>
W2032	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m1/2/3-URA3 CLB3^{HA3}</i>
W2038	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m4-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2039	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m5-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2149	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m4/5 CLB2^{HA3}</i>
W2151	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5^{T245D}-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2153	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5^{L251W}-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2156	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m1/2/4/5-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2219	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m1/2/3/4-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2220	MATa	<i>ura3::GAL1^{-Myc3}CDC5-m1/2/3/4/5-URA3 CLB2^{HA3}</i>
W2730	MATa	<i>lte1::GAL1^{-HA3}LTE1-HIS5s.p.</i>
W2798	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1Δ1-74-TRP1</i>
W2799	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL1^{-Myc3}HCT1Δ1-74-TRP1 ura3::GAL1^{-HA3}CDC5-URA3</i>
W2971	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL^{-Myc3}HCT1+0 A42D-TRP1</i>
W2972	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL^{-Myc3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11A42D-TRP1</i>
W2973	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL^{-Myc3}HCT1+0A157D-TRP1</i>
W2974	MATa	<i>cdc23-1 trp1::GAL^{-Myc3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11A157D-TRP1</i>
W2975	MATa	<i>cdc23-1 ura3::GAL1^{-HA3}CDC5-URA3 trp1::GAL^{-Myc3}HCT1+0A42D-TRP1</i>
W2976	MATa	<i>cdc23-1 ura3::GAL1^{-HA3}CDC5-URA3 trp1::GAL^{-Myc3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11A42D-TRP1</i>

W2985	MATa	<i>scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p.</i>
W2987	MATa	<i>scc1::SCC1^{HA14}-HIS5 S.p.</i>
W2988	MATa	<i>scc1::SCC1^{Myc13}-HIS5 S.p.</i>
W3014	MATa	<i>rad9::RAD9^{Myc13}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3</i>
W3016	MATa	<i>rad9::RAD9^{Myc13}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3 bar1-Δ2::LEU2</i>
W3017	MATa	<i>scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p. bar1-Δ2::LEU2</i>
W3019	MATα	<i>cdc5::CDC5^{HA3}-URA3 scc1::SCC1^{Myc13}-HIS5 S.p.</i>
W3020	MATa	<i>cdc5::CDC5^{Myc15}-URA3 scc1::SCC1^{HA14}-HIS5 S.p.</i>
W3024	MATa	<i>cdc23-1 ura3::GAL1-^{HA3}CDC5-URA3 trp1::GAL-^{Myc3}HCT1+0A157D-TRP1</i>
W3025	MATa	<i>cdc23-1 ura3::GAL1-^{HA3}CDC5-URA3 trp1::GAL-^{Myc3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11A157D-TRP1</i>
W3078	MATα	<i>scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p. ura3::GAL1-^{Myc3}CDC5-URA3</i>
W3079	MATa	<i>scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p. ura3::GAL1-^{Myc3}CDC5^{L251W}-URA3</i>
W3080	MATa	<i>rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3 bar1-Δ2::LEU2</i>
W3085	MAT	<i>cdc13-1</i>
W3086	MATa	<i>cdc13-1 ura3::GAL1-^{MYC3}CDC5-URA3</i>
W3087	MATα	<i>rad9::RAD9^{Myc13}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3 ura3::GAL1-^{Myc3}CDC5-URA3</i>
W3089	MATa	<i>scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p. cdc5::cdc5^{L251W}-LEU2 bar1-Δ1::HIS3</i>
W3091	MATa	<i>cdc4-3 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3</i>
W3093	MATα	<i>cdc13-1 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3</i>
W3094	MATa	<i>cdc14-3 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3</i>
W3095	MATα	<i>cdc5-1 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3</i>
W3096	MATα	<i>cdc28-4 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3</i>
W3125	MATα	<i>leu2::GAL1-Pds1^{HA3}-LEU2 cdc16-1</i>
W3138	MATa	<i>ura3::GAL1-^{MYC3}CDC5^{L251W}-URA3 cdc13-1</i>
W3139	MATα	<i>cdc5::CDC5^{HA3}-URA3 lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3</i>
W3142	MATa	<i>lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. bar1-Δ2::LEU2</i>
W3144	MATa	<i>cdc5::CDC5^{HA3}-URA3 lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. bar1-Δ2::LEU2 pep4-Δ::URA3</i>
W3193	MATa	<i>lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. cdc5-1 bar1-Δ2::LEU2</i>
W3252		<i>lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. cdc5-Δ1::HIS5 S.p. ura3::GALL-CDC5-URA3 bar1-Δ2::LEU2</i>
W3296	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+9/10/11-TRP1</i>
W3300	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+10/11-TRP1</i>
W3310	MATa	<i>trp::GALL-^{HA3}HCT1+0-TRP1</i>
W3314	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+8/9-TRP1</i>
W3319	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W3325	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9-TRP1</i>
W3330	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/3-TRP1</i>
W3333	MATα	<i>pds1::PDS1^{HA6}-HIS3</i>

W3335	MATa	<i>pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3</i>
W3352	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1 >1 Integration</i>
W3358	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W3362	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/8/9-TRP1</i>
W3407	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/10/11-TRP1</i>
W3426	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+5/6/7-TRP1 >1 Intrgration</i>
W3530	MATα	<i>pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3 hct1-Δ1::LEU2</i>
W3532	MATα	<i>pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-^{Myc3}CDC5^{K110M}-URA3</i>
W3544	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3545	MATα	<i>trp::GALL-^{HA3}HCT1+0-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3547	MATa	<i>trp::GALL-^{HA3}HCT1+8/9-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3548	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3549	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/8/9-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3551	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/3-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3552	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3553	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3554	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}- URA3</i>
W3558	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W3559	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W3560	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1 >1 Integration</i>
W3561	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1</i>
W3562	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1 >1 Integration</i>
W3563	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+8/9/10/11-TRP1</i>
W3564	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1-TRP1 >1 Integration</i>
W3565	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1-TRP1</i>
W3566	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+2-TRP1 >1 Integration</i>
W3567	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+2-TRP1</i>
W3568	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+3-TRP1</i>
W3569	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+4-TRP1 >1 Integration</i>
W3570	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+8-TRP1 >1 Integration</i>
W3582	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3583	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}- URA3</i>
W3584	MATα	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3585	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3589		<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3591	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+2-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3592	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+3-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3610	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2/3/4-TRP1</i>
W3611	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+3Asp/4Asp-TRP1</i>
W3613	MATa	<i>trp1::GALL-^{HA3}HCT1+1/2-TRP1</i>

W3614	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+1/3-TRP1</i>
W3615	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+2/3-TRP1</i>
W3617	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+3/4-TRP1</i>
W3640	MATa	<i>cdc16-1 pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3</i>
W3641	MATα	<i>cdc23-1 pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3</i>
W3642	MATa	<i>cdc20-3 pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3</i>
W3646	MATα	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+1/2/3/4 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3650	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+1/2 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3651	MATα	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+1/3 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3652	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+2/3-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3654	MATα	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+3/4-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3688	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7-TRP1</i>
W3690	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+4-TRP1</i>
W3691	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7/8-TRP1</i>
W3692	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7/8-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3693	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+4-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3699	MATα	<i>pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 GAL1^{-Myc3} CDC5^{L251W}</i>
W3700	MATα	<i>pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3 cdc13-1</i>
W3701	MATα	<i>pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 cdc13-1</i>
W3711	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+8-TRP1</i>
W3712	MATa	<i>trp1::GALL^{-HA3}HCT1+8-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3</i>
W3830	MATa	<i>pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 cdc13-1 ura3::GAL1^{-MYC3} CDC5^{L251W}-URA3</i>
W3897	MAT	<i>lte1::GAL1^{-HA3}LTE1-HIS5 S.p. ura3::GAL1^{-Myc3} CDC5-URA3</i>
W413	MATa	<i>ura3::GAL-CLB2^{HA3}-URA3</i>
W792	MATa	<i>ura3::GAL1-PDS1^{HA3}-URA3</i>
W814	MATa	<i>ura3::GAL1-CLB5^{HA3}-URA3</i>

Tab. 1 Hefestämme. Die genannten Hefestämme wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet bzw. hergestellt.

4.3 Vektoren und Plasmide

Plasmidname	Beschreibung
pFA6a-13Myc-His3MX6	Konstrukt für PCR-vermittelte Epitopmarkierung mit 13Myc (Longtine et al. 1998)
pFA6a-3HA-His3MX6	Konstrukt für PCR-vermittelte Epitopmarkierung mit 3HA (Longtine et al. 1998)
pFA6a-His3MX6	Konstrukt für PCR-vermittelte Deletion mit dem HIS-Marker (Longtine et al. 1998)
pFA6a-His3MX6-pGAL1-3HA	Konstrukt für PCR-vermittelte Fusion mit dem <i>GAL1</i> -Promotor und einem 3HA-Tag (Longtine et al. 1998)
pJOE2955	Expressionsvektor für MBP-Fusionsproteine unter Kontrolle des Rhamnosepromotors (von Josef Altenbuchner)

pUBS520	Helferplasmid für Proteinexpression mit Arg4 tRNA
pWO139	Konstrukt zur Deletion von <i>PEP4</i> mit <i>URA3</i>
pWS1038	<i>GALI-Myc3HCT+0 A157D</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1039	<i>GALI-Myc3HCT+5/6/7/8/9/10/11 A157D</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1040	<i>GALI-Myc3HCT+0 A42D</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1041	<i>GALI-Myc3HCT+4/5/6/7/8/9/10/11A42D</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1135	<i>GALL-HA3HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1136	<i>GALL-HA3HCT1+5/6/7/8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1137	<i>GALL-HA3HCT1+8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1138	<i>GALL-HA3HCT1+9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1139	<i>GALL-HA3HCT1+10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1140	<i>GALL-HA3HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1148	<i>GALL-HA3HCT1+1/2/3</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1155	<i>GALL-HA3HCT1+0</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1156	<i>GALL-HA3HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1157	<i>GALL-HA3HCT1+8/9</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1174	<i>GALL-HA3HCT1+1/2/8/9</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1175	<i>GALL-HA3HCT1+1/2/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1177	<i>GALL-HA3HCT1+5/6/7</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1198	<i>GALL-HA3HCT1+3/4/5/6/7/8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1201	<i>GALL-HA3HCT1+1</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1202	<i>GALL-HA3HCT1+2</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1203	<i>GALL-HA3HCT1+3</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1204	<i>GALL-HA3HCT1+4</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1205	<i>GALL-HA3HCT1+8</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1206	<i>GALL-HA3HCT1+5/6/7/8</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1213	<i>GALL-HA3HCT1+1/2/3/4</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1219	<i>GALL-HA3HCT1+1/2</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1220	<i>GALL-HA3HCT1+1/3</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1221	<i>GALL-HA3HCT1+2/3</i> mit <i>TRP1</i>
pWS1222	<i>GALL-HA3HCT1+3/4</i> mit <i>TRP1</i>
pWS250	<i>GALI-Myc3</i> -Vektor mit <i>URA3</i>
pWS429	Konstrukt für C-terminales Tagging von <i>CLB2</i> mit HA3 und TRP1- Marker
pWS433	<i>GALI-Myc3CDC5</i> mit <i>URA3</i>
pWS434	<i>GALI-Myc3HCT</i> mit <i>TRP1</i>
pWS448	<i>GALI-HA3CDC5</i> mit <i>URA3</i>
pWS500	<i>GALL</i> -Vektor mit <i>URA3</i>
pWS526	<i>GALI-Myc3HCT1+0</i> mit <i>TRP1</i>
pWS539	<i>GALI-Myc3HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS598	<i>GALI-Myc3HCT1+5/6/7/8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS599	<i>GALI-Myc3HCT1+8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>

pWS600	<i>GAL1-Myc3 HCT1+9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS601	<i>GAL1-Myc3 HCT1+10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS604	<i>CDC5K110M</i> in pJOE2955. Expression von MBP-Cdc5 ^{K110M} unter Kontrolle des Rhamnosepromotors
pWS605	<i>GAL1-Myc3 CDC5K110M</i> mit <i>URA3</i>
pWS614	<i>GAL1-Myc3 HCT+1/2/3/4/5/6/7/8/9/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS615	<i>GAL1-Myc3 HCT+1/2/3/4/5/6/7/8/9</i> mit <i>TRP1</i>
pWS622	<i>GAL1-Myc3 HCT1+1/2/3/5/6/7/8/9/10/11</i> mit <i>TRP1</i>
pWS641	<i>GAL1-Myc3 CDC5m2</i> mit <i>URA3</i>
pWS667	<i>GAL1-Myc3 CDC5ΔN70</i> mit <i>URA3</i>
pWS668	<i>GAL1-HA3 CDC5ΔN70</i> mit <i>URA3</i>
pWS690	<i>GAL1-Myc3 CDC5m1</i> mit <i>URA3</i>
pWS691	<i>GAL1-Myc3 CDC5m1/2</i> mit <i>URA3</i>
pWS706	<i>GAL1-Myc3 CDC5m3</i> mit <i>URA3</i>
pWS707	<i>GAL1-Myc3 CDC5m1/2/3</i> mit <i>URA3</i>
pWS715	<i>GAL1-Myc3 CDC5m4</i> mit <i>URA3</i>
pWS716	<i>GAL1-Myc3 CDC5m1/2/3/4</i> mit <i>URA3</i>
pWS721	<i>GAL1-Myc3 CDC5m5</i> mit <i>URA3</i>
pWS722	<i>GAL1-Myc3 CDC5m1/2/3/4/5</i> mit <i>URA3</i>
pWS745	<i>CDC5m1/2K110M</i> in pJOE2955. Expression von MBP-Cdc5-m1/2 ^{K110M} unter Kontrolle des Rhamnosepromotors
pWS746	<i>CDC5m1/2/3/4/5K110M</i> in pJOE2955. Expression von MBP-Cdc5-m1/2/3/4/5 ^{K110M} unter Kontrolle des Rhamnosepromotors
pWS747	<i>CDC5m3K110M</i> in pJOE2955. Expression von MBP-Cdc5-m3 ^{K110M} unter Kontrolle des Rhamnosepromotors
pWS772	<i>GAL1-Myc3 CDC5T245D</i> mit <i>URA3</i>
pWS774	<i>GAL1-Myc3 CDC5L251W</i> mit <i>URA3</i>
pWS792	<i>GAL1-Myc3 CDC5m4/5</i> mit <i>URA3</i>
pWS798	<i>GAL1-Myc3 CDC5m1/2/4/5</i> mit <i>URA3</i>
pWS799	<i>CDC5m1/2/4/5K110M</i> in pJOE2955. Expression von MBP-Cdc5-m1/2/4/5 ^{K110M} unter Kontrolle des Rhamnosepromotors
pWS990	<i>GAL1-Myc3 HCT1-Δ1-74</i> mit <i>TRP1</i>
pWS999	Konstrukt für PCR-vermitteltes Tagging mit 14HA
pWZV38	Konstrukt für C-terminales Tagging von <i>CDC27</i> mit HA3 und TRP1-Marker (von Wolfgang Zachariae)
pZV77	Deletion von <i>BAR1</i> mit <i>LEU2</i>

Tab. 2 Plasmide. Die genannten Vektoren und Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet bzw. hergestellt.

4.4 Synthetische Oligonukleotide

Oligo	Sequenz und Zweck
WS251	AATCTAGAATGTCGTTGGGTCCTCTTAA 5' Primer für die Amplifikation von <i>CDC5</i> , <i>XbaI</i> -Schnittstelle
WS252	AACTCGAGAATATTGGTTTAATCTACGGTAA 3' Primer für die Amplifikation von <i>CDC5</i> , <i>XhoI</i> -Schnittstelle
WS283	AAGGATCCATGTCGTTGGGTCCTCTTAA 5' Primer für die Amplifikation von <i>CDC5</i> , <i>BamHI</i> -Schnittstelle
WS284	AAAAGCTTAATATTGGTTTAATCTACGGTAA 3' Primer für die Amplifikation von <i>CDC5</i> , <i>HindIII</i> -Schnittstelle
WS306	CAGGCGAAATTTTTGCTGCCATGACAGTTGCTAAAGCCTCAAT Mutagenese von <i>CDC5</i> Austausch K110M, Einführung einer <i>NlaIII</i> -Schnittstelle
WS307	ATTGAGGCTTTAGCAACTGTCATGGCAGCAAAAATTTGCGCTG Mutagenese von <i>CDC5</i> Austausch K110M, Einführung einer <i>NlaIII</i> -Schnittstelle
WS312	AAAGTTATCAGCTTTGTGTAAAGCGCCACCTTCATTAATCAAAACA Mutagenese von <i>CDC5</i> Austausch T70A, Einführung einer <i>HaeII</i> -Schnittstelle
WS313	TGTTTTGATTAATGAAGGTGGCGCTTTACACAAAGCTGATAACTTT Mutagenese von <i>CDC5</i> Austausch T70A, Einführung einer <i>HaeII</i> -Schnittstelle
WS331	AAGAATTCATGCCACCTTCATTAATCAAAA Deletion der ersten 70 Aminosäuren von <i>CDC5</i> , mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
WS341	CCGTGGAGAAGAAAGAACAGAGTAAGATCAAGTCGAATAAAGCTTGCCTCGTCCC CGCC Deletion von <i>CDC5</i> mit dem pFA-System
WS342	GTAATTTTCGTATTTCGTATTTCTTTCTACTTTAATATTGGTGGATGGCGGCGTTAG TATC Deletion von <i>CDC5</i> mit dem pFA-System
WS343	TGCATAGTCAAGTTTGTATAATTGAGCTGAG 5' upstream von <i>CDC5</i> , zur Überprüfung der Deletion von <i>CDC5</i>
WS352	CCGTTCCAAGTTAGTTCATGCCCAATAAAGGGAAATAC Mutagenese von <i>CDC5</i> Austausch T23A
WS354	TAAATACACCATATGCGGAGCGCCTAATTACATCGCACCT Mutagenese von <i>CDC5</i> Austausch T245A
WS356	CCATTTTTACCACATTCTTTACGTCTTGGCGGGACGAAAC Mutagenese von <i>CDC5</i> Austausch S426A
WS358	GTAAATTGGTGACCTACATTGCGCCCTCCCATGAAAGCAC Mutagenese von <i>CDC5</i> Austausch S687A
WS586	CCCTTTAGCCACCCCAACCGTACTCGTGTTATTCGCTCGTTGAATTCGAGCTCG TTTAAAC 5' Primer für die PCR-vermittelte <i>GALI-HA</i> -Fusion von <i>LTE1</i> mit dem pFA-System
WS587	GGATGGAGTCGGGTAGTAATCTTTCTGGCTAAATATTTCCATGCACTGAGCAGCG TAATCTG 3' Primer für die PCR-vermittelte <i>GALI-HA</i> -Fusion von <i>LTE1</i> mit dem pFA-System
WS660	TGAACTGGAACGAGTAAGCGACCCACCTCCTGAAGCTGC Mutagenese von <i>HCT1</i> Austausch A157D

WS661	GCAGCTTCAGGAGGTGGGTCGCTTACTCGTTCCAGTTCA Mutagenese von <i>HCT1</i> Austausch A157D
WS662	GTCCGCCTCACTATTATCGGACCCCTCCAGGCGATCGAG Mutagenese von <i>HCT1</i> Austausch A42D
WS663	CTCGATCGCCTGGAGGGTCCGATAATAGTGAGGCGGAC Mutagenese von <i>HCT1</i> Austausch A42D
WS685	AAAATAGACGCCAAACCTGCACTATTTGAAAGGTTTATCAATGCTCGG Epitopmarkierung von <i>SCC1</i> mit dem pFA-System
WS686	CAGCTTATTGGGTCCACCAAGAAATCCCCTCGGCGTAACTAGGTTGAA Epitopmarkierung von <i>SCC1</i> mit dem pFA-System
WS687	GGGCGAGAAGGGTCAATTGAAGAACCTG 5' upstream von <i>SCC1</i> , zur Überprüfung der Epitopmarkierung von <i>SCC1</i>
WS688	GATATTACGGACAATGATATATACAACACTATTTCTGAGGTTAGACGG Epitopmarkierung von <i>RAD9</i> mit dem pFA-System
WS689	AATCGTCCCTTTCTATCAATTATGAGTTTATATATTTTTATAATTGAA Epitopmarkierung von <i>RAD9</i> mit dem pFA-System
WS690	CCATCAAAGGGAGGAATCATTAATCCAACA 5' upstream von <i>RAD9</i> , zur Überprüfung der Epitopmarkierung von <i>RAD9</i>
WS724	TATATTAGCACATTAACACAAGAAGAGATTAATGAACTATCCACACGG Epitopmarkierung von <i>LTE1</i> mit dem pFA-System
WS725	TTTTACAAGAGGAATTTGGGAACTGGAGGAAAGTGGCACAATACCGAA Epitopmarkierung von <i>LTE1</i> mit dem pFA-System
WS826	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG <i>MAT</i> -Lokus
WS827	GCACGGAATATGGGACTACTTCG <i>MAT</i> -Lokus
WS828	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG <i>MAT</i> -Lokus
WS838	GAACCCATTTCATGAATAATACGCCATCCAGTGCACCACTCAAG Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Threonin an der ersten Cdc28-Konsensusstelle, Einführung einer <i>FokI</i> -Schnittstelle
WS839	CTTGAGTGGTGCCTGGATGGCGTATTATTCATGAATGGGTTG Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Threonin an der ersten Cdc28-Konsensusstelle
WS840	GAATAATGCGCCTTCCAGTTCCCCACTCAAGGGTTCTG Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Serin an der zweiten Cdc28-Konsensusstelle, Einführung einer <i>ApaI</i> -Schnittstelle
WS841	CAGAACCCTTGAGTGGGGAAGGCGCATTATTC Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Serin an der zweiten Cdc28-Konsensusstelle
WS842	CATGAATAATACGCCATCCTCGAGCCCACTCAAGGGTTCTGAAAG Mutagenese von <i>HCT1+1</i> zu Serin an der zweiten Cdc28-Konsensusstelle, Einführung einer <i>BanII</i> -Schnittstelle
WS843	CTTTCAGAACCCTTGAGTGGGCTCGAGGATGGCGTATTATTCATG Mutagenese von <i>HCT1+1</i> zu Serin an der zweiten Cdc28-Konsensusstelle
WS844	CCGCCTCACTATTATCATCTCCATCCAGGCGATCGAGG Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Serin an der dritten Cdc28-Konsensusstelle, Einführung einer <i>FokI</i> -Schnittstelle

WS845	CCTCGATCGCCTGGATGGAGATGATAATAGTGAGGCGG Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Serin an der dritten Cdc28-Konsensusstelle
WS846	CATGGTTATGAACTGGAACGAGTATCGACTCCACCTCCTGAAGCTG Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Threonin an der vierten Cdc28-Konsensusstelle, Einführung einer <i>MlyI</i> -Schnittstelle
WS847	CAGCTTCAGGAGGTGGAGTCGATACTCGTTCCAGTTCATAACCATG Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Threonin an der vierten Cdc28-Konsensusstelle
WS848	CAATCTCAATTTTTTGGATTCCATGAGCCCAGTTAGGCCGGATTCC Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Serin an der achten Cdc28-Konsensusstelle, Einführung einer <i>BanII</i> -Schnittstelle
WS849	GGAATCCGGCCTAACTGGGCTCATGGAATCAAAAAATTGAGATTG Mutagenese von <i>HCT1+0</i> zu Serin an der achten Cdc28-Konsensusstelle
WS871	GCTTCGCTGATTAATTACCCAG <i>GAL</i> -Primer für Integrationszahlbestimmung von <i>GAL</i> -Konstrukten
WS872	GCTTGCACCATCCCATTAACTG Amplifikation von <i>ACT1</i> , Referenzreaktion für Integrationszahlbestimmung von <i>GAL</i> -Konstrukten mit dem Light cycler
WS873	GATTTAGGGTTCATTGGAGCTTCAG Amplifikation von <i>ACT1</i> , Referenzreaktion für Integrationszahlbestimmung von <i>GAL</i> -Konstrukten mit dem Light cycler
WS885	TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG LacZ-Primer für Integrationszahlbestimmung von <i>GAL</i> -Konstrukten

Tab. 3 Synthetische Oligonukleotide. Gezeigt ist der Name des Oligonukleotids, seine Sequenz und sein Zweck.

4.5 Nukleinsäuren, Enzyme, Antikörper

4.5.1 Nukleinsäuren

1-kb-ladder	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
dNTPs	Peqlab, Erlangen
Heringsspermien-DNA	Roche Diagnostics
[γ^{32}]-ATP	Amersham Pharmacia, Buckinghamshire (England)
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg; Interactiva, Ulm

4.5.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (shrimp)	Roche Diagnostics
Lysozym	Fluka, Buchs (Schweiz)
Novozym 234	NovoBiolabs, Bagsværd
Restriktionsendonucleasen	Roche Diagnostics New England Biolabs, Schwalbach
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene

RNaseA	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics
<i>Taq</i> -Polymerase	Biomaster
λ -Proteinphosphatase	New England Biolabs, Schwalbach

4.5.3 Antikörper

12CA5	Monoklonaler Mausantikörper gegen das HA1-Epitop (Field et al. 1988)
9E10	Monoklonaler Mausantikörper gegen das c-myc-Epitop (Evan et al. 1985)
anti-Cdc28	Affinitätsgereinigtes Kaninchenantiserum gegen Cdc28 von Carl Mann
anti-mouse-Alexa488	MoBiTec, Göttingen
anti-mouse-IgG-AP-Konjugat	Dianova, Hamburg
anti-mouse-IgG-HRP-Konjugat	Dianova, Hamburg
anti-rabbit-IgG-HRP-Konjugat	Dianova, Hamburg
anti-rat-Alexa546	MoBiTec, Göttingen
anti-Sic1	polyklonales Kaninchenserum gegen Sic1 von Mike Tyers
anti-Tub2	polyklonales Kaninchenserum gegen β -Tubulin von Eurogentec
YOL1/34	monoklonaler Ratteantikörper
anti-Clb2	polyklonales Kaninchenserum gegen Clb2 (Amon et al. 1994)

4.6 Chemikalien

1-Butanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid 30%/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Adenin	Fluka, Deisenhofen
Agarose ultra pure	Gibco, Paisley (Schottland)
Aminosäuren	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Biomol, Hamburg
Benomyl	Sigma-Aldrich

Bacto Pepton	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit
β -Glycerophosphat	Fluka, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Fluka, Deisenhofen
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, Deisenhofen
Lithiumacetat	Fluka, Deisenhofen
Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt am Main
Magnesiumchlorid	Sigma, St.Louis
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid 1M-Lösung	Merck, Darmstadt

N,N,N',N',Tetramethyldiamin (TEMED)	Fluka, Deisenhofen
Nocodazol	Fluka, Deisenhofen
p-Phenylendiamin	Sigma, St.Louis
Polyethylenglykol 3350 (PEG)	Sigma, St.Louis
Ponceau S	Fluka, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma, St.Louis
Salzsäure 1M	Merck, Darmstadt
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Fluka, Deisenhofen
Uracil	Fluka, Deisenhofen
Xylen Cyanol	Serva, Heidelberg
YeastNitrogenBase o.AS und o. NH ₄ SO ₄	Difco, Detroit

4.7 Sonstige Materialien

Amylose-Resin	New England Biolabs, Schwalbach
BM Chemiluminescence Blotting Substrate	Roche Diagnostics, Mannheim
CEA RP Röntgenfilme	CEA, Strängas (Schweden)
Diafilm 400 ASA Elitechrom	Kodak
Dialysemembran, Typ VS 0,025 µm	Millipore, Eschborn
ECF Substrat für Western	Amersham Pharmacia, Buckinghamshire (England)
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Filterpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Glasperlen (0,45-0,5mm)	Braun Biotech, Melsungen
Multiwellobjektträger	ICN, Aurora (USA)
Nitrocellulosefilter	Schleicher&Schuell, Dassel
ProteinA-Agarose	Santa Cruz
PVDF-Membran Hybond-P	Amersham Pharmacia, Buckinghamshire (England)
Sterilfilter (0,2µm)	Schleicher&Schuell, Dassel
Tetenal Superfix S/W-Negativfixierer	Tetenal, Norderstedt
Tetenal Ultrafin S/W-Filmentwickler	Tetenal, Norderstedt
Ultrafree Centrifugal Filter & Tube, Biomax 50K	Millipore, Bedford (USA)

4.8 Kits

E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
JETsorb Kit	Genomed, Bad Oeyenhausen
JETspin Plasmid Midiprep Kit	Genomed, Bad Oeyenhausen
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Uppsala, (Schweden)

4.9 Geräte

Durchflußcytometer CA-III	Partec
Elektroblotapparatur Sammy Dry	Schleicher & Schuell
Perfect Blue™ Elektroblotter	Peqlab, Erlangen
Gelapparaturen für Agarosegele Modell HE33	Hoefer Scientific Instruments (USA)
Gelapparaturen für SDS-Gele MinigelTwin G42	BioMetra, Göttingen
Heizblock Bioblock Scientific	Barnstead (USA)
Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex-C5	Avestin, Kanada
Kamera Olympus E-10	Olympus
Mikromanipulator MSM System	Singer Instruments (England)
Mikroskope Standard 25	Zeiss, Jena
Axioplan	Zeiss, Jena
Photometer Biotech Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten Pipetman 20 200 1000	Gilson (Frankreich)
Labmate 20 200 1000	Abimed, Langenfeld
Retschmühle MM2000	Retsch, Haan
MM200	Retsch, Haan

Roller	
Model TC-7	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Sonicator	
W-385	Heat-Systems Ultrasonics, Inc., Farmingdale (USA)
Spannungsgeräte	
GPS200/400	Pharmacia, Freiburg
LKB	Bromma (Schweden)
Thermocycler	
Progene	Techne
Thermoschüttler	
Termomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
UV-Licht	
UVT2035	Herolab
Dark Reader	Clare Chemical Research
Waagen	
Universal	Satorius, Göttingen
Research	Satorius, Göttingen
Wasseraufbereitung	
MilliQ	Millipore, Bedford (USA)
Wasserbäder	
Gyrotory G-76	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Innova 3100	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Wippe	
Rocky	Bachhofer
Zentrifugen	
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Hereaus, Göttingen
Sorvall RC-5b	Dupont Instruments, Bad Homburg
Biofuge pico	Hereaus, Göttingen
Biofuge fesco	Hereaus, Göttingen
Phosphoimager	
Storm 860	Molecular Dynamics, Amersham Bioscience, Freiburg
Light Cycler	Roche Diagnostics, Mannheim

4.10 Medien

Medien und Lösungen wurden (wenn nicht anders angegeben) mit H₂O_{mp} angesetzt. Dabei handelt es sich um Wasser, das mit einer Milliporeanlage vollständig gesäubert und entsalzt wurde.

4.10.1 Bakterienmedien

LB-Flüssigmedium

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Yeast Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
NaOH	0,3 mM

LB-Agarplatten Zugabe von 17 g/l Euro-Agar

Zur Selektion auf ampicillinresistente Kolonien wurden 100 µg Ampicillin pro ml LB-Medium aus einer 1000fach konzentrierten Stammlösung zugegeben.

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

TB-Medium

Bacto Trypton	12 g/l
Bacto Yeast Extract	24 g/l
Glycerin	4 ml
H ₂ O	ad 900 ml
autoklavieren	

Nach dem Abkühlen sterile Zugabe von 100 ml 0,17 M KH₂PO₄/0,72 M K₂HPO₄

KH ₂ PO ₄	2,31 g
K ₂ HPO ₄	12,54 g
H ₂ O	ad 100 ml

4.10.2 Hefemedien

Vollmedium (XY)

Bacto Pepton	20 g/l
Bacto Yeast Extract	10 g/l
Tryptophan	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	10 mM
Adenin	0,1 g/l
Zucker (nach Autoklavieren)	20g/l

XY-Agarplatten

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

Selektivmedium

10x YeastNitrogen	100 ml/l
Base	
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

Prä-Sporulationsmedium

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

Sporulationsmedium

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

Novozymmedium

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

4.11 Lösungen

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-Aminobenzoesäure	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

20% Glucose

Glucose	200 g
H ₂ O	ad 1 Liter
autoklavieren	

20% Galaktose

Galaktose	200 g
H ₂ O	ad 1 Liter
sterilfiltrieren	

10% Raffinose

Raffinose	100 g
H ₂ O	ad 1 Liter
sterilfiltrieren	

DAPI

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

Trenngel für SDS-PAGE (2 Stück 9%ig)

1,5M Tris/HCl pH8,8	3,0 ml
10% SDS	0,12 ml
30% Acrylamid-Mix	3,6 ml
10% APS	73 µl
TEMED	7,3 µl
H ₂ O	5,2 ml

Trenngel für SDS-PAGE (2 Stück 7%ig)

1,5M Tris/HCl pH8,8	3,5 ml
10% SDS	0,14 ml
30% Acrylamid-Mix	3,2 ml
10% APS	80 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O	7,16 ml

Sammelgel für SDS-PAGE (2 Stück)

0,5M 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

Ponceau S

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

1xTE/LiAc

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

40% PEG in 1xTE/LiAc

40% Polyethylenglykol 3350 in 1xTE/Lithiumacetat

BradfordlösungCoomassie-Brilliantblue G250 (100 mg/ml)
in 2%iger Perchlorsäure**4.12 Puffer**10x TETris/HCl, pH 7,5 100 mM
EDTA 10 mM50x TAETris-Acetat, pH 8,0 2 M
EDTA 50 mM
HNaPO₄ 80 mMAgarose-Gel-LadepufferTris/HCl, pH 7,8 10 mM
EDTA 1 mM
Bromphenolblau 2,5 mg/ml
Xylen Cyanol 2,5 mg/ml
Glycerin 300 mg/mlPuffer BSorbitol 1,2 M
in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5Puffer 3NaCl 100 mM
Tris/HCl, pH 7,5 50 mM
NaF 50 mM
EDTA 5 mM
Igepal CA-630 0,1%

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%

10x LRB (pH 9,0)

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

10x TBS

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

TBS-T

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

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

Transferpuffer

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

MBP-Säulenpuffer

Tris/HCl, pH 7,4	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

5 Methoden

5.1 Arbeiten mit Bakterien

Für Plasmidpräparationen aus Bakterien wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet. Für die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* wurde der Stamm XL1 blue mit dem Helferplasmid pUWS520 eingesetzt, das eine Kanamycinresistenz vermittelt und die Information für zwei seltene tRNAs trägt.

5.1.1 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium

E. coli DH5 α wurde, sofern er ein Plasmid mit Ampicillinresistenz trug, in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin kultiviert. Die Anzucht erfolgte über Nacht in Reagenzgläsern im Roller bzw. in einem Einsatz auf dem Schüttler oder in Schikanenkolben auf dem Schüttler bei 37°C. *E. coli* XL1 blue mit pUWS520 wurde in LB-Medium mit 25 μ g/ml Kanamycin angezogen.

5.1.2 Transformation von *E. coli*

5.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde *E. coli* DH5 α aus einer Übernachtskultur mit 40 OD₆₀₀ in 750 ml TB-Medium in 2-Liter Schikanenkolben angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,5 auf einem Schüttler bei RT inkubiert, was ungefähr bis zum Mittag des folgenden Tages dauerte. Die Zellen wurden dann bei 3000 upm und 4°C für 15 min in sterilen GSA-Bechern abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 150 ml eisgekühltem Wasser gewaschen. Dabei wurden die Zellen nur durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Nach einem zweiten, identischen Waschschrift, wurden die Zellen in 10 ml 10%igem glycerinsäurefreiem Glycerin resuspendiert und bei 3000 upm 10 min in der Hereaus Megafuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 10% Glycerin aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 50 und 100 μ l Aliquots auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

5.1.2.2 Elektroporation

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine Methode zur Transformation von Bakterien. Sie beruht auf der Tatsache, daß durch das kurzzeitige Anlegen einer hohen Spannung die Zellwand von Bakterien für DNA permeabel wird.

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA (10 μ l gegen H₂O_{mp} dialysierter Ligationsmix) wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und 50 μ l der Bakteriensuspension wurden zupipettiert. Dieser Mix wurde in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 μ F. Die Zellen wurden danach sofort in 1 ml SOC-Medium gegeben, das zuvor auf 37°C vortemperiert wurde. Diese Suspension wurde dann für eine Stunde bei 37°C gerollert, damit sich die Ampicillinresistenz auf dem transformierten Plasmid etablieren konnte. Von diesem Transformationsansatz wurden Aliquots auf LB-Amp-Platten

ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Handelte es sich bei dem Plasmid um pUC- oder pBluescript-Derivate wurden für eine blau-weiß-Selektion LB-Amp-Platten mit IPTG und X-Gal verwendet.

5.1.3 Produktion von MBP-Fusionsproteinen in *E. coli*

Für die heterologe Produktion von MBP-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde der Stamm XL1 blue mit dem Helferplasmid pUBS520 verwendet. Dieses vermittelt eine Kanamycinresistenz und erhöht den Spiegel der Arg4 tRNA. Dadurch soll die Expression von Hefegenen in *E. coli* verbessert werden.

CDC5 oder mutierte Versionen von *CDC5* wurden in den Expressionsvektor pJOE2955 hinter das Gen für das Maltosebindeprotein kloniert. Das daraus resultierende Genprodukt wird unter Kontrolle eines rhamnoseinduzierbaren Promotors exprimiert. Das Plasmid wurde in elektrokompente *E. coli* XL1 blue transformiert und auf Ampicillinplatten selektiert. Eine Vorkultur des *E. coli* Stammes wurde morgens in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt und vier Stunden bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurde zur Induktion des Promotors Rhamnose in einer Endkonzentration von 0,2% zugegeben. Um die Löslichkeit von MBP-Cdc5 zu verbessern, wurde außerdem Ethanol in einer Endkonzentration von 2% zugesetzt. Die Zellen wurden am nächsten Morgen geerntet (Sorvallzentrifuge GSA-Rotor, 10 min, 5000 upm) und mit Wasser gewaschen. Die Zellen wurden entweder bei -70°C gelagert oder direkt aufgeschlossen. Die Herstellung der Proteinextrakte erfolgte durch Aufschluß der Zellen mit einem Hochdruckhomogenisator der Firma Avestin bei einem Druck von 1000-1200 kPa in MBP-Säulenpuffer.

Alternativ wurde der Aufschluß durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Zellen bewerkstelligt. Durch Bildung von Eiskristallen werden die Zellen dabei aufgebrochen. Hierfür wurde das Zellpellet nach dem Ernten auf Trockeneis eingefroren, mit Säulenpuffer versetzt und dann wieder auf Eis aufgetaut. Die Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis mit Lysozym (10 mg/ml 1/30 des Gesamtvolumens) verdaut. Nach erneutem Einfrieren und Auftauen auf Eis wurde zusätzlich zum Lysozym DNase und $MgCl_2/MnCl_2$ (Endkonzentration 10 mM bzw. 1 mM) zugegeben, um die genomische DNA zu verdauen, wodurch die Lösung weniger zähflüssig wurde. Bei beiden Aufschlußmethoden wurde das Zelllysat durch Zentrifugation in der Sorvallzentrifuge (SS34, 9000 upm, 30 min) geklärt.

5.1.4 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von Fusionsproteinen mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) macht man sich die Tatsache zu Nutze, daß MBP mit hoher Affinität an Maltose bzw. dessen Polymer, die Amylose, bindet. Für *in vitro* Tests wurden mit dieser Technik im Laufe der Arbeit verschiedene MBP-Cdc5 Fusionsproteine aus *E. coli* gereinigt.

Der Proteingehalt der Bakterienlysate wurde mittels Bradfordmessung bestimmt und mit einer Eichgeraden aus BSA verglichen. Das Lysat wurde dann mit MBP-Puffer auf 2,5 mg/ml verdünnt bevor es auf eine Tropfsäule aus Amylose-Resin gegeben wurde. Diese wurde aus

aufgeschlämmtem Amylose-Resin (Bindekapazität: 2-4 mg MBP/ml Bettvolumen) gepackt und oben und unten mit einer Fritte abgeschlossen. Die Säule wurde vor Gebrauch mit dem 8fachen Bettvolumen MBP-Puffer äquilibriumiert. Nachdem das ganze Lysat durch die Säule gesickert war, wurde mit dem 12fachen Säulenvolumen gewaschen. Die Elution von MBP-Cdc5 erfolgte durch Zugabe von 8 ml Säulenpuffer, der mit 10 mM Maltose versetzt war. Die Maltose verdrängt die Amylose und setzt so das Protein von der Säule frei. Das Eluat wurde in Fraktionen von 10 Tropfen gesammelt. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch Bradfordmessung bestimmt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung untersucht, um die Reinheit des Fusionsproteins zu untersuchen. Die MBP-Cdc5 Fusionsproteine hatten ihre höchste Konzentration in den Fraktionen 2-4 und waren sehr sauber. Die einzelnen Fraktionen wurden entweder direkt bei -20°C eingefroren oder über eine Ultrafiltrationseinheit der Firma Millipore nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert.

5.2 Arbeiten mit Hefe

5.2.1 Kultivierung von Hefen in Flüssigmedium

Zur Kultivierung von Hefen wurden verschiedene Vollmedien verwendet. Als C-Quelle dienten Glucose, Raffinose oder Sucrose (XYG, XYRaf oder XYSuc). Die Inkubation erfolgte bei temperatursensitiven Mutanten bei Raumtemperatur im Roller oder im Wasserbad bei 26°C . Nicht temperatursensitive Stämme wurden auch bei 30°C inkubiert.

5.2.2 Aufbewahrung von Hefen

Hefekulturen wurden einige Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Auf Agarplatten wurden Hefestämme über 6-8 Wochen im Kühlraum gelagert. Für eine langfristige Konservierung wurden 2 ml einer dicht gewachsenen Übernachtskultur abzentrifugiert und in 1 ml 15% Glycerin resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert.

5.2.3 Kreuzung haploider Hefestämme

Zur Erzeugung diploider Hefestämme wurden haploide Stämme unterschiedlichen Paarungstyps gekreuzt. Trugen die zu kreuzenden Stämme verschiedene Auxotrophiemarker, wurden je 5 μl frischer Übernachtskulturen auf einer XYD-Platte übereinander pipettiert. Am folgenden Tag wurde von der entstandenen Zellmasse ein Teil in Wasser resuspendiert und auf eine entsprechende selektive Minimalmediumsplatte ausgestrichen. Auf diese Weise konnte auf diploide Stämme selektiert werden. War eine solche Selektion auf Diploide nicht möglich, wurden einzelne Zellen beider Stämme mit einem Mikromanipulator auf einer XYD-Platte direkt nebeneinander gelegt und für ca. 3 Tage inkubiert.

5.2.4 Sporulation diploider Hefestämme und Tetradenanalyse

Um aus diploiden Stämmen wieder haploide mit den gewünschten Eigenschaften zu gewinnen, macht man sich die Tatsache zunutze, daß diploide Hefen, wenn sie unter Nährstoffmangel (z.

B. C- oder N-Mangel) geraten, eine Meiose durchlaufen, während der sie vier haploide Sporen bilden. Diese stellen Dauerformen dar, die schlechte Wachstumsbedingungen eine gewisse Zeit überstehen können. Sie werden von einem Ascus umschlossen und bilden eine sogenannte Tetrade.

Um die Sporulation auszulösen, wurden diploide Hefen in dem sehr nährstoffreichen PräSpo-Medium angeimpft und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Die Kultur wurde am nächsten Morgen abzentrifugiert (2000 upm, 2 min) und in 1 ml Spo-Medium gewaschen. Dieses enthält im Gegensatz zu Prä-Spo-Medium sehr wenig Zucker und N-Quellen, dafür aber Kaliumacetat zur Induktion der Sporulation. Für die Sporulation wurden die Zellen dann in 2 ml Spo-Medium aufgenommen und für 3-4 Tage bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Für die Tetradenanalyse wurden 100 µl des Sporulationsansatzes mit 100 µl Novozymmedium gemischt und für 18-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde der Ascus verdaut und die Sporen zugänglich. Jeweils vier zusammenhängende Sporen aus einer Tetrade wurden mit dem Mikromanipulator auf einer Vollmediumsplatte vereinzelt. Die Sporen wuchsen im Verlauf von 3-4 Tagen zu Kolonien aus haploiden Zellen heran.

5.2.5 Transformation von Hefe nach der Lithiumacetatmethode

Durch Behandlung mit Alkaliionen können Hefezellen sehr effektiv dazu gebracht werden, DNA aufzunehmen. Bei der hier verwendeten Methode (nach Gietz et al. 1992) wurde Lithium in Form von Lithiumacetat eingesetzt.

Der zu transformierende Stamm wurde 1:20 aus einer Übernachtskultur in 20 ml XYD angeimpft und für 3-5 Stunden inkubiert. Pro Transformationsansatz wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen (1 OD₆₀₀) geerntet und in 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml 1xTE/LiAc gewaschen und in 50 µl 1xTE/LiAc aufgenommen. Pro Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert:

50 µl Zellen denaturierte Einzelstrang-DNA (Heringsspermien-DNA, 10mg/ml),
bis zu 10 µl zu transformierende DNA (linearisierte Plasmid-DNA),
300 µl 40% PEG in 1xTE/LiAc.

Der Ansatz wurde für 20 min bei RT auf einem Rad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42°C für exakt 15 min einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Suspension wurde dann abzentrifugiert, in 150 µl Wasser resuspendiert und auf einer entsprechenden Selektivplatte ausplattiert. Nach 2-4 Tagen Inkubation konnten Einzelkolonien von der Platte genommen werden.

5.2.6 Test des Wachstumsverhaltens von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihen

Dieser Test diente zur genaueren Ermittlung des Wachstumsverhaltens verschiedener Stämme unter bestimmten Bedingungen. So wurde z. B. der Einfluß der Überexpression eines Gens unter

Kontrolle des *GAL*-Promotors durch Verdünnungsreihen auf Vollmediumsplatten mit Glucose bzw. mit Galaktose als Zuckerquelle untersucht.. Dazu wurde die OD₆₀₀ des zu untersuchenden Stammes bestimmt und mit Wasser auf 25000 Zellen/ μ l eingestellt (1×10^7 Zellen entsprechen ungefähr 1 OD₆₀₀). Diese Suspension wurde in einer Mikrotiterplatte fünf Mal 1:10 mit Wasser verdünnt, so daß im letzten well theoretisch 0,25 Zellen/ μ l sein sollten. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils 5 μ l auf eine entsprechende Agarplatte getropft. Nach dem Trocknen des Tropfens wurde die Platte unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert, bis eventuelle phänotypische Unterschiede sichtbar wurden.

5.3 Mikroskopie und Färbung von Hefezellen

5.3.1 Fixierung von Hefezellen

Um Hefezellen für phänotypische Untersuchungen längere Zeit aufbewahren zu können, wurden sie in 70% Ethanol fixiert. Dazu wurden Hefen geerntet und in 150 μ l Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden unter vortexen langsam 350 μ l 100% Ethanol zugetropft. Vor dem Mikroskopieren wurden die Zellen in 1 ml 50 mM Natriumcitrat gewaschen (3 min, 3000 upm) und anschließend in 500 μ l Natriumcitrat aufgenommen. Um Zellaggregate aufzulösen, wurden die Zellen mit sechs Ultraschallpulsen behandelt.

Um Zellen für die Immunfluoreszenz zu fixieren, wurden 4,4 ml der entsprechenden Kultur mit 610 μ l 37% Formaldehyd versetzt (Endkonzentration 5% Formaldehyd) und im Roller inkubiert. Die Zeit der Fixierung variierte zwischen 10 min und 1 h abhängig vom zu untersuchenden Protein. Danach wurden die Zellen in der Megafuge für 2 min bei 2000 upm abzentrifugiert und in 1 ml Puffer B aufgenommen. Die Zellen konnten für einige Tage im Kühlschrank gelagert werden.

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

DAPI ist eine Substanz, die spezifisch an Nukleinsäuren bindet. Bei Anregung mit dem UV-Licht einer Quecksilberdampfampe kommt es zu einer blauen Fluoreszenz. Auf diese Weise können DNA-haltige Organellen wie der Zellkern und die Mitochondrien in Hefezellen sichtbar gemacht werden. Dazu wurden 5 μ l ethanolfixierter Zellen, die zuvor in Natriumcitrat gewaschen worden waren, auf einen Objektträger getropft und ausgestrichen. Nach kurzem Antrocknen wurden sie mit DAPI überschichtet. Im Fluoreszenzmikroskop konnte dann die Morphologie des Zellkerns untersucht werden.

5.3.3 Immunfluoreszenz

Die Technik der Immunfluoreszenz wurde eingesetzt, um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu untersuchen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz verwendet man einen primären Antikörper, der gegen das interessierende Antigen gerichtet ist, und einen sekundären Antikörper, der gegen den primären gerichtet ist und mit einem Fluorochrom gekoppelt ist. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und in PufferB aufgenommen.

Von einer 1:20 Verdünnung der Zellsuspension wurde die OD_{600} bestimmt und auf 1 OD_{600}/ml mit PufferB eingestellt. Um die Zellwand für den Antikörper permeabel zu machen, wurde die Zellen mit Zymoylase (5 mg/ml, 25 mM DTT) für 20-30 min bei 37°C auf dem Roller verdaut. Die Inkubationszeit hing dabei von dem Medium ab, in dem die Zellen gewachsen waren und war für Zellen aus XYRaffinose/Galaktose grundsätzlich länger als für Zellen aus XYGlucose. Die verdauten Zellen wurden bei 2000 upm für 2 min in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet wurde in 500 μl PufferB aufgenommen. 40 μl dieser Zellsuspension wurden auf einen Multwell-Objekträger gegeben, der zuvor mit Polylysin (1mg/ml, MW>300000) beschichtet worden war. Hierfür wurden 10 μl Polylysine auf den Objekträger gegeben, nach kurzer Einwirkzeit wieder entfernt und getrocknet. Überschüssiges Polylysin wurde dann in zwei Schritten abgewaschen. Zuerst wurde jedes Well dreimal mit 40 μl Wasser gewaschen und danach wurde der ganze Objekträger in einem 50 ml Falconröhrchen mit Wasser für 10 min auf dem Rad inkubiert, nachdem er zwischenzeitlich getrocknet worden war. Die Zellsuspension wurde dann wieder vom Objekträger abpipettiert. Das getrocknete Präparat wurde für 6 min in eiskaltem Methanol inkubiert und für 30 s in eiskaltem Aceton. Nach dem Trocknen wurde 40 μl PBS/BSA (1 mg/ml) aufgetropft, um unspezifische Bindestellen für den Antikörper abzublocken. Der Antikörper wurde ebenfalls in PBS/BSA verdünnt und zwar 1:20 im Falle des 9E10-Kulturüberstandes und 1:100 für den anti-Tubulin-Antikörper aus Ratte. Der Objekträger wurde über Nacht in einer feuchten Kammer mit 10 μl primärem Antikörper inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper abzuwaschen, wurde der Objekträger 7 mal mit 40 μl PBS/BSA gewaschen. Dieser und alle weitere Waschschrte erfolgte immer well für well, um ein Austrocknen des Präparates zu verhindern. Der sekundäre Antikörper, der mit Alexa-Fluor488 bzw. AlexaFluor546 gekoppelt war, wurde 1:250 verdünnt und zwei Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abwaschen des überschüssigen sekundären Antikörpers (7 mal, 40 μl) wurde 1 μl DAPI pro well aufgebracht, der Objekträger mit einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack abgedichtet. Die Fluoreszenz wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Dokumentation wurde ein Kodak Elite Chrom 400 Diafilm verwendet. Die Objekträger konnten in Alufolie eingewickelt bei -20°C aufbewahrt werden.

5.4 Synchronisation von Hefekulturen

In einer asynchronen Hefekultur befinden sich einzelne Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellteilungszyklus. Manchmal ist es allerdings notwendig, daß sich alle Zellen in der gleichen Zellzyklusphase befinden. Man spricht dann von einer synchronen Kultur. Zur Synchronisation von Hefekulturen kann man sich verschiedener Substanzen bedienen, die die Zellen jeweils in einer anderen Zellzyklusphase arretieren.

Eine dieser Substanzen ist das Paarungspheromon α -Faktor, das Zellen des Paarungstyps *MATa* in der G1-Phase arretiert. Stämme, die eine Deletion des *BARI*-Gens enthielten, wurden mit 50 ng/ μl α -Faktor behandelt. Das *BARI*-Gen kodiert für eine extrazelluläre Protease, die das Paarungspheromon degradiert. Fehlt das Genprodukt, reagieren die Zellen auf geringe Konzentrationen von α -Faktor mit einem G1-Arrest. Hydroxyharnstoff (HU) ist ein Stoff, der

Zellen in der frühen S-Phase arretiert. Er hemmt einen Schritt in der Nukleotidbiosynthese und führt so zu einem S-Phasen-Arrest. HU wurde in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Um Zellen in der G2-Phase zu arretieren, behandelt man sie mit Nocodazol. Diese Substanz wirkt auf die Spindeln depolymerisierend und führt so zu einem mitotischen Arrest. Nocodazol wurde in einer Konzentration von 15 µg/ml verwendet. Alle oben genannten Substanzen wurden zu exponentiell wachsenden Kulturen bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 gegeben.

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

5.5.1.1 Plasmidpräparation (Minilytate) nach der Kochlysate-Methode

Diese Methode (nach Berghammer und Auer, 1993) wurde angewandt, wenn Plasmide mit hoher Kopienzahl wie pUC oder pUC-Derivate isoliert werden sollten. Die erhaltene DNA ist zwar noch mit Protein verunreinigt, kann aber ohne weiteres für Restriktionsverdau und Klonierungen eingesetzt werden.

Dazu wurden 2 ml einer Übernachtskultur in einem 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß in der Eppendorfzentrifuge für 4 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in 40 µl Lysis-Puffer durch Vortexen resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension für 1 min im Wasserbad gekocht und sofort für eine weitere Minute auf Eis abgekühlt. Der nach einer 20-minütigen Zentrifugation (14000 upm) bei Raumtemperatur erhaltene Überstand wurde dann direkt für Restriktionsverdau verwendet oder bei -20°C gelagert.

5.5.1.2 Plasmidpräparation mit dem JETspin-Kit

Mit dieser Methode können größere Mengen reiner DNA präpariert werden. Das Prinzip dieses Kits der Firma Genomed beruht auf alkalischer Lyse mit Isopropanol-Fällung und Reinigung der Plasmid-DNA über Bindung an Anionenaustauschchromatographiesäulen.

Aus einer über Nacht gewachsenen Vorkultur wurden 100 ml LB-Amp-Medium 1:100 angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Diese Kultur wurde in 50-ml-Falconröhrchen in der Megafuge bei 5000 upm 10 min abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 4 ml F1-Lösung resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 4 ml-F2-Lösung (enthält NaOH und SDS) dazu gegeben und durch Invertieren gemischt. Zur Neutralisierung wurden 4 ml 3 M Kaliumacetat pH 5,0 zugefügt. Nach 30-minütiger Zentrifugation in der Megafuge (6000 upm) wurde der Überstand in SS34-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 8 ml Isopropanol versetzt. Nach 15 min Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge bei 11000 upm befand sich die DNA im Pellet. Dieses wurde, nachdem es trocken war, in 2,4 ml TE gelöst und mit Lösung F3 auf 4 ml aufgefüllt. Die entstandene Lösung wurde in zwei Schritten auf die mitgelieferten Säulen aufgebracht, die auf Corex-Röhrchen aufgesetzt, bei 4300 upm für 1 min in der Megafuge zentrifugiert wurden. Dabei band die DNA an das Säulenmaterial. Die Säulen

wurden dann mit 3 ml F4-Lösung gewaschen (4300 upm, 5 min). Die DNA wurde anschließend mit 800 µl TE von der Säule eluiert (4300 upm, 2 min).

5.5.2 DNA-Präparation aus Hefe

5.5.2.1 Gesamt-Hefe-DNA-Präparation

Die Isolierung genomischer DNA beruht bei dieser Methode (nach Fujimura & Sakuma, 1993) auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand, anschließender Zellyse durch Detergenzbehandlung und alkoholischer Fällung der DNA. Die isolierte DNA kann für die PCR-Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente verwendet werden.

Eine Übernachtskultur wurde geerntet, in 1 ml Wasser gewaschen und auf Glasperlen zentrifugiert. Zu diesem Ansatz wurden 100 µl Tris/EDTA/SDS (Tris/HCl pH 7,5 50 mM; EDTA 20 mM; SDS 10 mg/ml) gegeben. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch 5-minütige Inkubation des Ansatzes in der Retschmühle im Kühlraum. Nach Zugabe von 500µl Tris/SDS/EDTA wurde die Lösung 10 min bei 70°C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend durch Zugabe von 200 µl 5M Kaliumacetat neutralisiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis und 5 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorfzentrifuge wurde der Überstand in ein 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-fällung unterzogen. Dazu wurde die DNA mit 1 ml 100% Ethanol versetzt und kurz abzentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Pellet 15 min getrocknet. Anschließend wurde es in 300µl 1xTE und 50µl RNase A (1 mg/ml) aufgenommen und bei 65°C 30 min inkubiert. Mit 500µl 100% Isopropanol wurde die DNA wieder gefällt, mit 70% Ethanol abgespült und getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 50 µl H₂O_{mp} oder TE gelöst.

5.5.3 Agarosegelelektrophorese

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung können DNA-Fragmente in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei ist die Laufstrecke im Agarosegel umgekehrt proportional zur Länge der Fragmente. Zur Überprüfung einzelner Arbeitsschritte sowie zur Gewinnung bestimmter doppelsträngiger DNA-Moleküle wurden Gelelektrophoresen in 0,7 bis 1,5%igen (w/v) Agarosegelen in 1x TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Dieses lagert sich an DNA an bzw. in DNA ein und kann durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Als Laufpuffer diente 1x TAE mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Zur Auftrennung der Fragmente wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,1 Volumina 10x Agarose-Gel-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1-kb-Leiter von Gibco.

5.5.4 Gelelution aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Jetsorb-Kit der Firma Genomed verwendet. Das Prinzip dieses Kits basiert auf der Fähigkeit von Glasmilch, DNA unter hohen Salzkonzentrationen zu binden und bei niedrigen Salzkonzentrationen wieder freizusetzen.

Der Kit wurde nach Anweisung des Herstellers eingesetzt, wobei pro 100 mg Gel nur 5 µl Glasmilch verwendet wurden.

Im Verlauf der Arbeit wurde dann zum E.N.Z.A Gel Extraction Kit der Firma Peqlab gewechselt, der ebenfalls nach den Anweisungen des Herstellers eingesetzt wurde. Bei diesem Kit tritt an die Stelle der flüssigen Glasmilch eine Silikamembran, die sich in einer Säule befindet.

5.5.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung eines DNA-Fragments, d.h. den Einbau in einen Vektor und anschließende Vermehrung, umfaßt mehrere Schritte. Zuerst wurden Insert- (PCR-Produkt oder Plasmid-DNA) und Vektor-DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten, die zueinander kompatible Enden erzeugten. Dem konnte eine Dephosphorylierung des Vektors folgen. Beide Fragmente werden anschließend durch Agarosegelelektrophorese und Gelelution gereinigt. Es folgte nun die Ligation der beiden Fragmente und nach Dialyse gegen Wasser deren Transformation in elektrokompente *E. coli*-Zellen. Aus den erhaltenen Transformanten wurde das Plasmid isoliert und durch Restriktionsverdau auf seine Richtigkeit überprüft.

5.5.5.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen eine bestimmte, meist palindrome, doppelsträngige DNA-Sequenz und spalten innerhalb von dieser die DNA durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen. Dabei entstehen überstehende 3'- oder 5'-Enden oder auch glatte Enden.

Für den analytischen Verdau von 1,5-2 µg Plasmid-DNA wurden 2-4 U Restriktionsenzym im vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug dabei 10-15 µl und wurde mit Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 1-2 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur. Wenn vom Hersteller angegeben, wurde BSA in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Für präparative Verdau wurden ca. 5 µg DNA mit 5-10 U Restriktionsenzym 2-3 h verdaut. PCR-Fragmente mit einer Schnittstelle am Ende wurden immer über Nacht verdaut.

5.5.5.2 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Bei Klonierungen, bei denen der Vektor nur mit einem Restriktionsenzym verdaut wurde bzw. mit zwei Enzymen, die kompatible Enden erzeugten, wurde er vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase behandelt, um so durch Entfernen des 5'-Phosphatrestes Vektorreligationen vorzubeugen. Diese Reaktion wurde sofort nach dem Verdau des Vektors im gleichen Ansatz durchgeführt. Dazu wurde 1 U alkalische Phosphatase aus arktischen Garnelen zu dem Verdau gegeben; zusätzlich wurde die entsprechende Menge des vom Hersteller mitgelieferten zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers zugefügt und das Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms stellte man danach die Mischung für 15 min in ein 65°C warmes Wasserbad.

5.5.5.3 Ligation von Insert- mit Vektor-DNA

Für Ligationen wurden Insert- und Vektor-DNA in einem Verhältnis von ungefähr 2:1 eingesetzt. Um die jeweiligen Konzentrationen abzuschätzen, wurden beide Fragmente nebeneinander auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Gesamtvolumen eines Ligationsansatzes betrug 20 µl und setzte sich zusammen aus 1 U T4-DNA-Ligase, Insert- und Vektor-DNA, 2 µl 10x Reaktionspuffer und Wasser. Die Ligationen wurden 3-4 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.5.6 Amplifikation von DNA mittels PCR

Mit Hilfe der PCR („polymerase chain reaction“) können spezifische DNA-Fragmente exponentiell vermehrt werden. Der amplifizierte Bereich wird dabei durch Oligonukleotidprimer festgelegt, die an der gewünschten Stelle an die Matrizen-DNA binden. Eine thermostabile DNA-Polymerase kann dann an die freien 3'-OH-Enden der Primer Desoxyribonukleotide anhängen, jeweils komplementär zum Matrizenstrang. Bei einer PCR werden mehrere Zyklen durchgeführt, wobei ein Zyklus aus der Denaturierung der Matrix-DNA, des Annealings des Primerpaares und der Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase besteht.

Ein PCR-Ansatz setzte sich allgemein zusammen aus:

	Template-DNA
5 µl	10x PCR-Puffer
50 pmol	Vorwärtsprimer
50 pmol	Rückwärtsprimer
1,5µl	3 mM MgCl ₂
10 pmol	dNTP-Mix
3-6 U	<i>Taq</i> -Polymerase

Das Gesamtvolumen betrug 50 µl und wurde mit H₂O_{mp} aufgefüllt.

Die PCR wurde zur Klonierung von Fragmenten, der Epitopmarkierung bzw. Deletion von Genen aber auch zur Überprüfung von genomischen Integrationen eingesetzt.

5.5.6.1 Quantitative PCR

Zur Bestimmung der Integrationszahl von *GAL*-Konstrukten im Hefegenom wurde eine quantitative PCR mit dem Light cycler durchgeführt. Der Light cycler ermöglicht es, die Zunahme eines PCR-Produkts während der Reaktion zu beobachten. Für die quantitative PCR mit genomischer Hefe-DNA wurde der LightCycler FastStart DNA Master SYBR GreenI Kit der Firma Roche verwendet. SYBR Green ist ein DNA-doppelstrang spezifischer Farbstoff, dessen Fluoreszenz stark erhöht wird, wenn er an doppelsträngige DNA bindet. Während der PCR-Reaktion bindet der Farbstoff an das Amplikon, so daß dessen Zunahme durch die Messung der Fluoreszenzzunahme bestimmt werden kann. Die Spezifität der Reaktion wird durch die Analyse der Schmelzkurve des PCR-Produkts gewährleistet. Um die Bildung von Primer-Dimeren und anderen unspezifischen PCR-Produkten zu minimieren, wird im FastStart Kit eine chemisch modifizierte *Taq*-Polymerase eingesetzt, bei der einige Aminosäuren so

verändert sind, daß sie bei Raumtemperatur inaktiv ist. Durch eine Vorinkubation bei hoher Temperatur werden die hitzelablen „Blocking“-Gruppen entfernt und das Enzym so aktiviert. Es handelt sich also um einen chemischen „Hot start“.

Für die Aufgabenstellung, die Zahl der Integrationen von *GAL*-Konstrukten im Genom zu bestimmen, wurden Primer im *GAL*-Promotor und im LacZ-Gen gewählt. Da der LacZ-Anteil von dem zu integrierenden Plasmid stammt und im Hefegenom nicht vorkommt, sollte ein PCR-Produkt nur entstehen, wenn das Konstrukt im Genom auch integriert worden ist. Mit den Primern WS885 (bindet im LacZ) und WS871 (bindet im *GAL*-Promotor) wurde ein 370 bp langes Fragment amplifiziert. Als interne Kontrolle wurde in einem separaten Ansatz mit den Primern WS872 und WS873 ein 664 bp langes Fragment des Actin-Gens *ACT1* amplifiziert. Zur Bestimmung der Integrationszahl wurde der Quotient aus der *GAL*-Amplifikation zu der entsprechenden Actin-Amplifikation gebildet. Um eine Quantifizierung der Amplifikation mit der Light cycler Software 3.5 vornehmen zu können, wurde als Standard ein mit *StuI* linearisierter *GAL*-Vektor (pWS500) eingesetzt. Das Enzym wurde hitzeinaktiviert und der Ansatz wurde dialysiert. Dann wurde der Verdau auf 5 ng/µl eingestellt, mit 0,5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) versetzt und anschließend auf 0,5 pg/µl bzw. 0,05 pg/µl verdünnt. Diese Standards wurden willkürlich auf 10 bzw. 1 gesetzt. In den Light cycler Kapillaren wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet, die sich wie folgt zusammensetzten:

11,6 µl	H ₂ O (PCR grade)
2,4 µl	MgCl ₂ (25 mM, final 4 mM)
1 µl	WS872 bzw WS885 (10 pM)
1 µl	WS873 bzw. WS871
2 µl	LightCycler FastStart DNA Master SYBR GreenI
2 µl	Template

Als Template diente eine 1:100 Verdünnung einer Standard-Hefe-DNA (5.5.2.1).

Die Proben wurden folgendem Temperaturprofil unterworfen:

Programm1: Präinkubation 1 Zyklus

95°C, 10', 20.0 °C/s

Programm2: Amplifikation 45 Zyklen, Quantifizierung

95°C, 10'', 20.0 °C/s

56°C, 5'', 20.0 °C/s

72°C, 26'', 20.0 °C/s

Programm3: Schmelzkurve 1 Zyklus

95°C, 0'', 20.0 °C/s

65°C, 15'', 20.0 °C/s

95°C, 0', 0,1 °C/s

Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

5.5.6.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle Methode, um den Genotyp eines Hefestammes auf DNA-Ebene zu untersuchen. Hierbei wird auf die Präparation von genomischer DNA verzichtet und stattdessen ganze Hefezellen für die PCR eingesetzt. Mit einer gelben Pipettenspitze wurde etwas Zellmaterial von einer Agarplatte gekratzt, in Wasser resuspendiert und für 4 min im Thermocycler gekocht. Der PCR-Ansatz für die anschließende PCR setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl	10x Koloniepuffer (0,125 M Tris-HCl pH 8,5, 0,56 M KCl)
0,6 µl	50 mM MgCl ₂
0,4 µl	10 mM dNTP-Mix
	10 pM Primer 1+2
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)

Der Ansatz wurde mit der Zellsuspension auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsmix wurde folgendem Temperaturprofil unterworfen:

94°C 1', Annealing Temperatur 1', 72°C 2-3' für 35 Zyklen.

Durch die Wahl geeigneter Primer konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen anhand der Größen der entstandenen PCR-Produkte nachgewiesen werden.

5.5.6.2.1 PCR zur Bestimmung des Paarungstyps

Die PCR zur Bestimmung des Paarungstyps eines Hefestammes stellt eine modifizierte Form der Kolonie-PCR dar (Akada et al. 2000). Hierbei wurden Zellen von einer Platte zuerst in 20 µl 0,25% SDS resuspendiert und durch kurzes Vortexen aufgeschlossen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand diente direkt als Template für die PCR. Mit den Primern WS826, WS827 und WS828 entsteht ein 404bp-Fragment, wenn der Stamm den Paarungstyp alpha aufweist. Ist der Stamm *MATa*, wird ein 544 bp-Fragment amplifiziert. Sollte der Stamm diploid sein, werden beide Fragmente gebildet. Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	10x Taq-Puffer
1,5 µl	25 mM MgCl ₂
2,5 µl	2 mM dNTP-Mix
3 µl	Primer-Mix (10 pmol/µl je Primer)
0,15 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
0,5 µl	Überstand

Der Ansatz wurde mit Wasser auf 25 µl aufgefüllt und folgendem Temperaturprofil unterworfen :

1 Zyklus:	94°C, 4'
30 Zyklen:	94°C, 1', 55°C, 1', 72°C, 40''
1 Zyklus:	72°C, 3'

5.5.6.3 Gezielte Mutagenese eines Gens mittels PCR

Die hier verwendete Methode zur gezielten Mutagenese bedient sich einer speziellen linearen Amplifikation von DNA (Papworth et al. 1996). Es wird die Fähigkeit der thermostabilen DNA-Polymerase *Pfu* genutzt, lange DNA-Fragmente fehlerfrei zu polymerisieren. Dazu wird ein komplettes Plasmid, das nicht größer als ca. 10kb sein sollte, amplifiziert. Die verwendeten mutagenen Primer tragen die gewünschte Mutation und binden an die entsprechende Stelle des Plasmids. Das Primerpaar ist auf seiner ganzen Länge komplementär zueinander. Die Amplifizierung des zu mutagenisierenden Plasmids ergibt ein Gemisch aus unveränderten Plasmiden und Plasmiden, die aus neuem und altem Strang bestehen. Da die verwendete Plasmid-DNA aus einem *E.coli*-Stamm isoliert wurde, der aktive DNA-Methylasen besitzt, und da die Amplikons nicht methyliert sind, unterscheidet sich neusynthetisierte und Template-DNA in ihrem Methylierungsmuster. Das Restriktionsenzym *DpnI* unterscheidet nun beim Verdau von DNA zwischen methylierter und unmethylierter DNA. Unmethylierte DNA wird von *DpnI* nicht verdaut. Verdaut man nun den gesamten Mutageneseansatz mit *DpnI*, so führt dies zu einer sehr starken Anreicherung neusynthetisierter Plasmide, die die gewünschte Mutation tragen sollten. Wurde nun die eingeführte Mutation so gewählt, daß eine Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym neu eingeführt oder zerstört wurde, so kann man durch Restriktionsverdau mutierte von unmutierten Plasmiden unterscheiden.

Mutagenesen wurden in folgendem Ansatz durchgeführt:

- 0,5 µl Template-DNA (ca. 250 ng)
- 5 µl WSxxx (10 ng/µl), mutagener Primer
- 5 µl WSxxx (10 ng/µl), mutagener Primer
- 5 µl 10x Turbo-*Pfu*-Puffer
- 5 µl dNTPs
- 2 µl Turbo-*Pfu* (2,5 U/µl)
- 27,5 µl H₂O_{mp}

Für diesen Ansatz wurde folgendes Temperaturprofil gewählt:

15 Zyklen 95°C 30“, 55°C 1“, 72°C 3,5 min/kb

Anschließend wurden 20 µl des Ansatzes für 2 h mit 10 U *DpnI* verdaut und in *E. coli* DH5α transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden angeimpft, um aus ihnen Plasmid-DNA zu präparieren. Diese wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut, um zu überprüfen, ob die gewünschten Schnittstellen eingeführt wurden. Richtige Plasmide sollten im Vergleich zum Ausgangsplasmid ein verändertes Schnittmuster aufweisen.

5.5.6.4 Deletion und Modifikation von Genen mittels PCR

Zur Epitopmarkierung von Proteinen in *S. cerevisiae* bzw. zur Deletion von Genen wurde die Einschnitt-PCR Methode nach Longtine et al. verwendet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das zu verändernde Gen nicht erst kloniert und mutagenisiert werden muß und somit eine große Zeitersparnis auftritt. Der Methode zugrunde liegt die homologe Rekombination

zwischen den Flanken des generierten PCR-Produktes und dem entsprechenden endogenen Genort. Als Template für die PCR dienen Plasmide der pFA-Reihe. Diese Plasmide tragen als selektierbaren Marker das *TRP1*-Gen aus *S. cerevisiae*, das *E. coli kan^r*-Gen, das die Resistenz gegen G418 vermittelt, oder das *his5⁺*-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe*. Der Vorteil der heterologen Marker besteht dabei darin, daß sie keine Homologie zu genomischen Sequenzen besitzen und so keine homologe Rekombination mit dem Genom des zu manipulierenden Stammes stattfinden kann. Mit Hilfe der pFA- Plasmide kann eine myc13- oder eine HA3-Kassette amplifiziert werden. Um eine epitopmarkierte Version eines Gens herzustellen bzw. es zu deletieren, wurden Primer entworfen, die auf einer Länge von 20 bp homolog sind zum Polylinker der pFA-Plasmide und ca. 50 bp Homologie auf beiden Seiten des Zielgens aufweisen. Mit diesen Primern wird eine PCR durchgeführt und das Amplifikat wird in den gewünschten Hefestamm transformiert. Die 50 bp lange Sequenz, die zum Zielgen homolog ist, ermöglicht eine homologe Rekombination am gewünschten Genort, wodurch eine modifizierte Version des Zielgens entstanden ist, auf die über den Marker selektiert werden kann.

Zur Epitopmarkierung von Scc1, Rad9 und Lte1 bzw. zur Deletion von *CDC5* wurde folgende PCR-Reaktion durchgeführt:

0,2 µl	pFA-Plasmid (linearisiert mit <i>HindIII</i>)
5 µl	WSxxx (10 pmol/µl)
5 µl	WSxxx (10 pmol/µl)
5 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer
5 µl	dNTPs (2 mM)
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase

Die Ansätze wurden zuerst für 3 min denaturiert und dann folgendem PCR-Programm unterworfen:

25 Zyklen: 94°C 30'', 56°C 30'', 72°C 1' 30''

Die PCR-Ansätze wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend aus dem Gel gereinigt. Von dem gereinigten Ansatz wurden 10 µl in den gewünschten Hefestamm transformiert.

5.6 Protein-chemische Methoden

5.6.1 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Hefezellen

Die Proteinextrakte wurden durch mechanischen Aufschluß von Hefezellen mittels Glaskügelchen hergestellt. Hierzu wurden Hefezellen in der Megafuge geerntet (2000 upm, 2 min) und in 1 ml eiskaltem Wasser aufgenommen. Diese Suspension wurde in ein Schraubdeckelgefäß mit Glaskügelchen überführt und in der Eppendorffzentrifuge bei 14000 upm kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und die Probe auf Trockeneis eingefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei -70°C gelagert. Zur Herstellung des Proteinextrakts wurden die Proben auf Eis mit 150 µl Puffer 3 mit β-Glycerophosphat versetzt und im Kühlraum in der Retschmühle 5 min bei

maximaler Energie geschüttelt. Nach dem Aufschluß wurden die Proben 3-5 min bei 14000 upm in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Ein 100 µl Aliquot des Überstandes wurde in 100 µl 2x Lämmli-Puffer verdünnt und 5 min im Heizblock gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Weitere 5 µl des Überstandes wurden in 45 µl Wasser verdünnt. Diese Probe diente später zur Bestimmung des Proteingehalts. Dazu wurde die Probe nochmals 1:100 in 500 µl Wasser verdünnt und mit 500 µl Bradfordreagenz versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm bestimmt, was als Maß für die Proteinkonzentration diente. Geeicht wurde das Photometer gegen Bradfordreagenz verdünnt in Wasser.

5.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine im elektrischen Feld gemäß ihrer Masse aufgetrennt werden. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis an Proteine an, so daß diese mit einer negativen Gesamtladung versehen werden und in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Zusätzlich zerstört SDS zusammen mit β -Mercaptoethanol, das sich im Probenpuffer befindet und Disulfidbrücken reduziert, die Sekundärstruktur von Proteinen, so daß man von einer Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen spricht. Als Matrix für die Elektrophorese dient ein Gel aus Polyacrylamid. Im Sammelgel, das großporig ist und wenige Ladungsträger enthält, werden die Proteine in einer Bande konzentriert, bevor sie in das engermaschige Trenngel einwandern, das viele Ladungsträger enthält.

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 9%ige und 7%ige Trenngele verwendet. Pro Spur wurden 1 OD₅₉₅ Protein geladen. Die Elektrophorese wurde in Gelkammern der Firma Biometra durchgeführt, in denen zwei Gele gleichzeitig laufen konnten. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 10 mA angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die blaue Lauffront aus dem Gel gewandert war. Um die Modifikation von Sec1 detektieren zu können, wurde der Gellauf um eine Stunde verlängert. Das Trenngel wurde schließlich für einen Western Blot verwendet.

5.6.3 Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Der Nachweis von Proteinen in SDS-Gele erfolgte durch Färbung mit dem blauen Farbstoff Coomassie Brilliant blue G250. Dabei ist das Farbpigment in einer Mischung aus 30% Methanol und 10% Essigsäure gelöst, wodurch die Proteine gleichzeitig fixiert werden. Nach einer ca. 30 minütigen Inkubation in der Färbelösung wurde der überschüssige Farbstoff durch Waschen in Methanol/Essigsäure entfernt. Gefärbte Gele konnten einige Tage in 7% Essigsäure aufbewahrt werden, für die dauerhafte Konservierung wurden sie allerdings zwischen zwei Lagen Zellophanfolie gespannt in einem Rahmen getrocknet.

5.6.4 Western Blot und immunologischer Nachweis der Proteine

Bei einem Western Blot werden Proteine unter Anlegen einer elektrischen Spannung aus einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen. Die Proteine können anschließend auf der Membran mittels einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden. Hierzu wird die Membran mit einem gegen das interessierende Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Dieser primäre Antikörper kann dann mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist, nachgewiesen werden. Dieser sekundäre Antikörper ist mit dem Enzym HRP (Peroxidase aus Meerrettich) gekoppelt. Dieses katalysiert die Oxidation von Luminol, das dabei Licht der Wellenlänge 420 nm emittiert. Dieses Licht kann mit einem Röntgenfilm durch Schwärzung des Films an der entsprechenden Stelle sichtbar gemacht werden.

Zum Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde folgender Aufbau benutzt: Auf die Graphitanode der ElektrobloTTinapparatur wurden zwei in Transferpuffer getränkte Filter aus Whatmanpapier GB004 gelegt. Darauf kam die gewässerte und dann in Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran, auf die dann ihrerseits das ebenfalls in Transferpuffer getränkte Trenngel gelegt wurde. Zum Abschluß wurden noch zwei Filter aufgelegt. Der Aufbau wurde durch die im Deckel der Apparatur befindliche Kathode abgeschlossen. Zum Blotten wurde pro Gel für 45 min eine Stromstärke von 160 mA eingestellt. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in Wasser geschwenkt und dann für 5 min mit Ponceau S gefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen und die Beladung der einzelnen Spuren zu dokumentieren. Um nun unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper auf der Nitrozellulosemembran abzusättigen, wurde die Membran eine Stunde lang in 5%igem (w/v) Milchpulver (in TBS-T) inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte dann über Nacht in Milchpulver. Der sekundäre Antikörper wurde dann für 2 h, ebenfalls in Milchpulver, auf die Membran gegeben, nachdem diese dreimal für 5 min in 10 ml TBS-T gewaschen worden war, um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Ebenso wurde überschüssiger Sekundärantikörper abgewaschen und die Membran wurde zum Nachweis der Proteine in TBS aufbewahrt. Zur Lichtnachweisreaktion wurde die Chemiluminescence Blotting Substrate-Lösung der Firma Roch verwendet. Dazu wurden 800 µl Reagenz B mit 8 µl Reagenz A gemischt und auf der mit einem Saugpapier abgetupften Membran gleichmäßig verteilt. Die Membran wurde dann mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt. Im Dunkeln wurden nun für unterschiedlich lange Zeiten Röntgenfilme aufgelegt, auf denen nach dem Entwickeln des Films das gesuchte Protein als schwarze Bande sichtbar wurde.

5.6.5 Quantifizierung von Dot blots mit dem Phosphoimager

Um die Menge eines bestimmten epitopmarkierten Proteins in einem Gesamthefelysate relativ zu einem Standard zu bestimmen, wurden Dot blots mittels Chemifluoreszenznachweis am Phosphoimager quantifiziert. Hierzu wurden zuerst Proteinrohextrakte des entsprechenden Stammes hergestellt (5.6.1). Diese wurden mit 1x Lämmli-Puffer auf 0,5 OD₅₉₅/5 µl eingestellt. Von dieser Probe wurden 5 µl auf eine PVDF-Membran aufgebracht, wobei Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden. Da PVDF-Membranen stark hydrophob sind,

wurden sie zuvor in Methanol benetzt (10 s), dann für 10 min in Wasser inkubiert und anschließend in Transferpuffer (15 min) äquilibriumiert. Unter die trocken getupfte Membran wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Whatmann-Papiere GB002 gelegt, damit die Tropfen nicht verliefen. Nachdem die Membran vollständig getrocknet war, wurde sie wieder kurz in Methanol inkubiert und anschließend in TBS-T mit 5 % Milchpulver für mindestens eine Stunde geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte wie für den Western Blot beschrieben. Nicht gebundener primärer Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in 10 ml TBS-T entfernt. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit Alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen für 5 min in 20 ml TBS-T entfernt. Danach wurde die Membran einmal in TBS gewaschen. Für den Chemifluoreszenznachweis wurde 1 ml des ECF- (enhanced chemifluorescence) Substrats auf eine Folie aufgebracht und die Membran mit der Proteinseite nach unten daraufgelegt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase setzt dabei das ECF-Substrat zu einem gelben, fluoreszierenden Stoff um, der an den Stellen präzipitiert, an denen der Antikörper gebunden hat. Nachdem sich das Präzipitat gebildet hatte, wurde die Membran kurz in TBS geschwenkt und dann auf den Phosphoimager gelegt. Der Blot wurde im Kanal Blue Fluorescence gescannt und mit der mitgelieferten Software (Image Quant 5.2) ausgewertet. Für die Angleichung des Hintergrundes wurde die Berechnungsmethode Local Average verwendet.

5.6.6 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) kann ein bestimmtes Protein aus einem Rohextrakt gereinigt bzw. stark angereichert werden. Hierzu wird ein gegen das gesuchte Protein gerichteter Antikörper zum Rohextrakt gegeben und mit diesem inkubiert. Während dieser Inkubation bindet der Antikörper spezifisch an sein Epitop und es entstehen Immunkomplexe. Man macht sich nun die Tatsache zu nutze, daß das Protein A aus *Staphylococcus aureus* an den konstanten Teil von Antikörpermolekülen bindet und hierüber auch an die gesamten Immunkomplexe. Diese können nun gefällt werden, wenn man Protein A verwendet, das an eine Sepharosematrix gebunden ist. Das gewünschte Antigen wird so über den Antikörper und das Protein A an die Sepharosematrix gebunden und kann durch Zentrifugation und mehrere Waschschrte aus dem Rohextrakt gereinigt werden. Ist nun an das Protein, gegen das der Antikörper gerichtet ist, ein weiteres Protein gebunden, wird auch dieses mitgefällt. Man spricht dann von einer Koimmunpräzipitation (CoIP).

Für eine IP wurden die Proben zunächst wie unter Punkt 5.6.1 beschrieben behandelt, die Überstände wurden allerdings einem weiteren Zentrifugationsschritt von 15 min unterworfen, um möglichst alle partikulären Bestandteile zu entfernen. Von diesem Überstand wurden 5 µl für die Proteinbestimmung verwendet. 20 µl wurden in 20 µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 5 min gekocht. Diese Proben stellten den Rohextrakt dar. Die Proteinbestimmung erfolgte wie unter 5.6.1 erläutert. Pro IP wurden ca. 100 OD₅₉₅ Protein eingesetzt. Ein entsprechendes

Aliquot des Überstandes wurde mit Puffer 3, der noch zusätzlich 60 mM β -Glycerophosphat enthielt, auf ein Gesamtvolumen von 500-1000 μ l aufgefüllt. Von einem Zellkulturüberstand von 12CA5-produzierenden Zellen (Antikörper gegen das HA-Epitop) wurden 40 μ l pro IP eingesetzt, im Fall des 9E10 Antikörpers (gegen das c-myc-Epitop) wurden 80 μ l des Überstandes verwendet. Die Rohextrakte wurden auf dem Roller im Kühlraum 2 h mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 25-40 μ l Protein A-Beads zugegeben. Diese wurden zuvor 2 mal in 1ml Puffer 3 mit β -Glycerophosphat gewaschen. Nach weiteren 2 h Inkubation wurde jeder Ansatz 3 mal mit 1 ml Puffer 3 mit β -Glycerophosphat gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Beim letzten Waschschrift wurde der Überstand mit einer Hamilton-Spritze so komplett wie möglich abgenommen. Das Pellet wurde in 30 μ l 2x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 10 min im Heizblock gekocht, um die Proteine zu denaturieren.

5.6.7 Affinitätspräzipitation mit MBP-Cdc5

Die Affinitätspräzipitation stellt eine alternative Methode zur Immunpräzipitation dar. Dabei wird das Testprotein an einer Matrix immobilisiert und untersucht, ob bestimmte Proteine aus einem Zelllysat daran binden. Hier wurde MBP-Cdc5 als Testprotein verwendet, das an Amyloseresin gebunden wurde.

MBP-Cdc5 wurde in *E. coli* exprimiert (5.1.3) und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (2x 30 s, Output 4,5). Nach Bestimmung des Proteingehalts wurde das Lysat mit Amyloseresin unter Rollern in einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß für 2 h inkubiert. Parallel dazu wurden Zelllysate aus Hefezellen hergestellt (5.6.1), die eine epitopmarkierte Version des zu untersuchenden Proteins enthielten. Nach dem Waschen des Amyloseresins wurde es dann mit dem Hefelysat vermischt und nochmals 2 h auf dem Roller inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit Puffer3 entfernt und das Amyloseresin in 1x Lämmli-Puffer gekocht. Anschließend wurde im Western Blot untersucht, ob das epitopmarkierte Protein mit MBP-Cdc5 aus dem Lysat präzipitiert werden konnte. Mit dieser Methode konnten auch noch sehr schwache oder nur transiente Wechselwirkungen nachgewiesen werden.

5.6.8 Phosphataseassay

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen führen häufig zu einem veränderten Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE. Eine Phosphorylierung kann beispielsweise bewirken, daß langsamer laufende Proteinspezies auftauchen. Um zu testen, ob es sich bei solchen langsamer laufenden Formen tatsächlich um phosphorylierte Proteine handelt, wurde ein Phosphataseassay mit der Proteinphosphatase λ durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine dualspezifische Phosphatase aus dem Bakteriophagen λ . Das zu untersuchende Protein wurde aus einem Zelllysat durch Präzipitation gereinigt. Das Präzipitat wurde dann entweder sofort mit 2x Lämmli-Puffer versetzt und für 10 min gekocht oder mit Phosphatasepuffer und Phosphatase (400U) für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle wurde das Präzipitat mit Puffer alleine inkubiert. Ergab sich nach der Behandlung mit Phosphatase im Vergleich

zum Präzipitat und der mit Puffer inkubierten Probe eine Veränderung des Laufverhaltens des Proteins im Western Blot, konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei der beobachteten Modifikation um eine Phosphorylierung gehandelt hat.

5.6.9 Kinaseassay

Die Aktivität einer Kinase kann *in vitro* durch die Messung des Einbaus von radioaktivem Phosphat in ein Substratprotein bestimmt werden. Die Kinase wird dabei aus einem entsprechenden Hefelysat präzipitiert und mit γ - ^{32}P -ATP inkubiert. Im Falle der Messung von Cdc28-assoziiierter Kinaseaktivität wurde der Komplex aus epitopmarkiertem Zyklin (Clb2^{HA3}, Clb3^{HA3} und Clb5^{HA3}) und Cdc28 aus Zyklin überexprimierenden Stämmen mit 12CA5 präzipitiert. Das Präzipitat wurde zuerst drei Mal in Puffer3 gewaschen und dann noch einmal drei Mal in Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT), um die ProteinA-Beads umzupuffern. Die Phosphorylierungsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 30 μl in CDK-Kinasepuffer mit 10 μM ATP und 5 μCi γ - ^{32}P -ATP bei 30°C für 30 min. Danach wurde der Ansatz mit 2xLämmli-puffer versetzt und die Proteine durch Kochen denaturiert. Als Substrat für Cdc28-Kinase wurde HistonH1 (5 μg) oder verschiedene Fusionsproteine aus MBP und Cdc5 eingesetzt (1-5 μg).

Cdc5-Kinase wurde mit 9E10 aus Stämmen präzipitiert, die Wildtyp Cdc5 oder mutiertes Cdc5 mit einem Myc3-Epitop überexprimierten. Als künstliches Substrat diente Casein (5 μg). Der Assay wurde in Cdc5-Kinasepuffer (50 mM HEPES pH 7,4, 60 mM K-Acetat, 10 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂) mit 50 μM ATP und 5 μCi γ - ^{32}P -ATP pro Ansatz bei 30°C für 30 min durchgeführt.

Die Proben wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen (9-7%). Dieses wurde dann auf ein GB002 Whatman-Papier im Gelrockner aufgetrocknet (2 h, 80°C). Der Nachweis der phosphorylierten Proteine erfolgte schließlich durch Autoradiographie, wofür ein Film auf das getrocknete Gel gelegt und bei -70°C exponiert wurde.

6 Ergebnisse

6.1 Die Menge von Cdc5 ist zellzyklusabhängig reguliert

Um das Verhalten von Cdc5 im Zellteilungszyklus zu untersuchen, wurde ein Synchronexperiment durchgeführt. Hierfür wurden exponentiell wachsende Zellen eines Stammes, der eine mit dem HA3-Epitop versehene Variante von *CDC5* exprimiert, mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase des Zellteilungszyklus arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurden die Zellen synchron in den nächsten Teilungszyklus entlassen, indem sie in frisches Medium ohne α -Faktor überführt wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und für einen Western Blot aufgearbeitet (Abb. 4). Wie in der Literatur bereits beschrieben (Shirayama et al., 1998, Cheng et al., 1998), schwankt die Menge von Cdc5

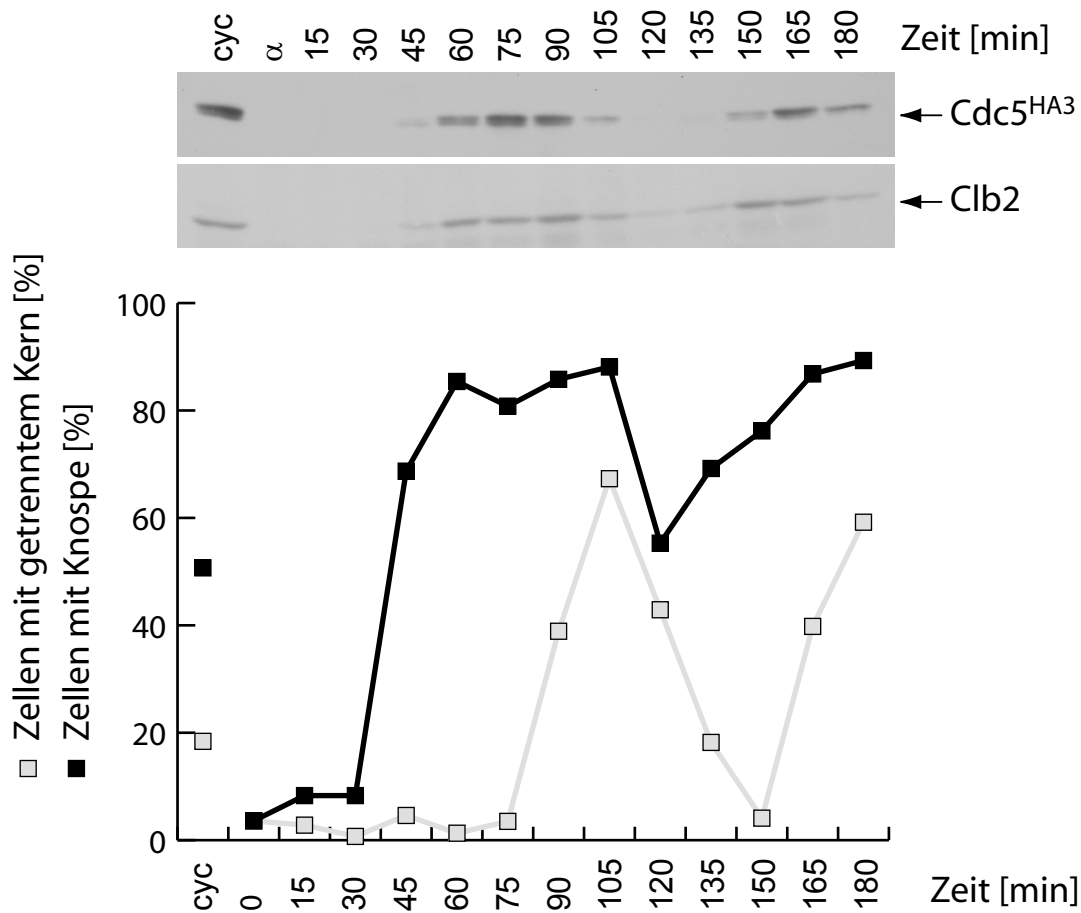


Abb. 4 Die Menge von Cdc5 variiert während des Zellteilungszyklus. Um Cdc5 im Verlauf des Zellteilungszyklus zu untersuchen, wurden wachsende Zellen des Stammes W1809 (*cdc5::CDC5^{HA3}-URA3 bar1- Δ 1::HIS3*) mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurden die Zellen in frisches Medium ohne α -Faktor entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für einen Western Blot entnommen bzw. Zellen für die morphologische Auswertung mit Ethanol fixiert. Cdc5^{HA3} wurde mit dem HA-spezifischen Antikörper 12CA5 nachgewiesen. Als Vergleich diente das Zyklin Clb2, das mit einem α -Clb2 Serum aus Kaninchen nachgewiesen wurde. Zur Bestimmung des Zellteilungsstadiums wurde der Knospungsindex der ethanolfixierten Zellen nach DAPI-Färbung bestimmt

im Zellteilungszyklus. In α -Faktor arretierten Zellen ist kein Cdc5 vorhanden. Geringe Mengen von Cdc5 sind erstmals 45 min nach Entlassen der Zellen aus dem G1-Arrest nachzuweisen. Zu diesem Zeitpunkt haben bereits über 70 % der Zellen eine Knospe gebildet. Die Menge an Cdc5 steigt weiter kontinuierlich an und erreicht nach 75-90 min ihr Maximum. Gleichzeitig haben die meisten Zellen eine Knospe gebildet und zum Teil auch schon ihre Kerne getrennt. Nach 105 min, wenn die meisten Zellen getrennte Kerne aufweisen, nimmt die Menge an Cdc5 bereits wieder ab. 120 min nach Entlassen aus dem ursprünglichen G1-Arrest beginnt der nächste Zellzyklus. Auffällig ist, dass Cdc5 im SDS-Gel ein heterogenes Laufverhalten zeigt. Dies deutet auf eine posttranslationale Modifikation hin. Das Muster des Auftretens von Cdc5 ist parallel zu dem des B-Typ Zyklins Clb2. Beide Proteine sind erst nachweisbar, wenn ein signifikanter Anteil der Zellen eine Knospe gebildet hat, akkumulieren in der Mitose und verschwinden wieder beim Austritt aus der Mitose.

Das zellzyklusabhängige Auftreten von Cdc5 wurde weiterhin durch eine indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Cdc5 ist ein Kernprotein, lokalisiert aber auch an den Spindelpolkörpern (Shirayama et al., 1998, Cheng et al., 1998). Mit einer C-terminalen GFP-Fusion konnte auch eine Lokalisierung am Übergang von Mutter- zu Tochterzelle nachgewiesen werden (Song et al., 2000). Asynchron wachsende Zellen eines Stammes, der vom endogenen Promotor ein Myc15-markierters *CDC5* exprimiert, wurden mit Formaldehyd fixiert und für eine Immunfluoreszenz aufgearbeitet (5.3.3). Mit einem α -Myc Antikörper wurde dann Cdc5 nachgewiesen. Die Zellen wurden gleichzeitig mit einem α -Tubulin Antikörper behandelt, um die Spindel sichtbar zu machen. Die Kern-DNA wurde mit DAPI gefärbt. In G1-Zellen lässt sich kein Cdc5 nachweisen (Abb. 5, 1). In Zellen mit kleiner Knospe, einem DAPI-Signal und einer kurzen Spindel ist Cdc5 zum Teil im Kern vorhanden (vgl. Abb. 5, 2a und 2b). In Zellen mit einem elongierten Kern und elongierter Spindel entspricht das Cdc5-Signal ebenfalls dem DAPI-Signal (Abb. 5, 3). Zellen mit getrennten Kernen und maximal elongierter Spindel, haben schon teilweise das Cdc5-Signal verloren (vgl. Abb. 5, 4a und 4b). Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte Cdc5 in diesem Experiment nur im Kern lokalisiert werden. Es war nicht möglich, Cdc5 an den Spindelpolkörpern oder am Mutter-Tochter-Übergang nachzuweisen. Das Muster des Auftretens von Cdc5 in der einzelnen Zelle korreliert mit dem im Western Blot beobachteten Verhalten des Proteins in einer synchronisierten Zellkultur.

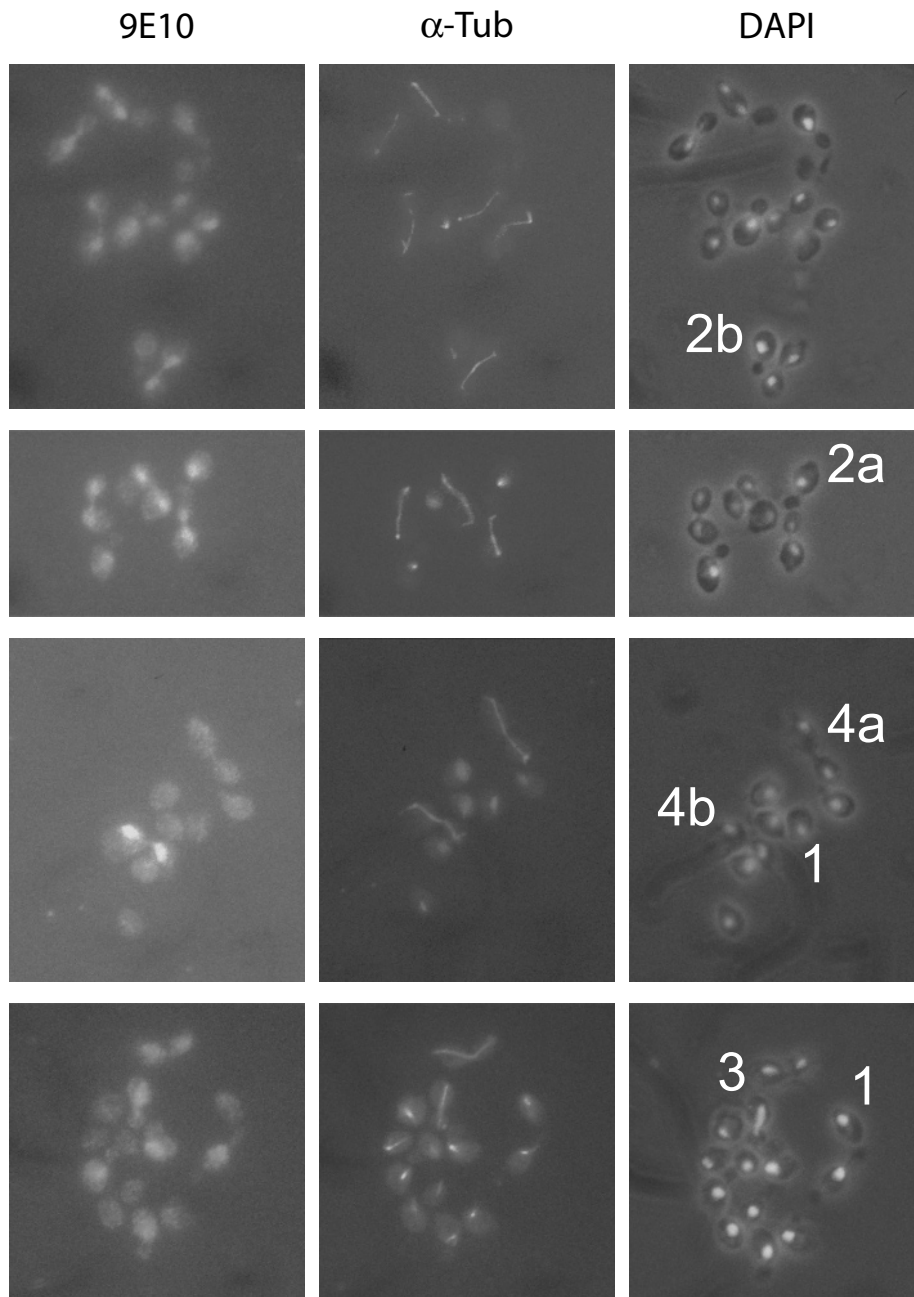


Abb. 5 Cdc5 lokalisiert im Zellkern. Die Lokalisierung von Cdc5 wurde mittels einer indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Asynchron wachsende Zellen des Stammes K6390 (*cdc5::CDC5^{Myc15}-URA3*) wurden für 10 min mit Formaldehyd fixiert und anschließend für die Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Cdc5 wurde mit 9E10, Tubulin mit dem α -Tubulin-Antikörper Yoll1/34 aus Ratte nachgewiesen. Als sekundäre Antikörper wurde für 9E10 ein α -Maus Antikörper gekoppelt mit Alexa 488 und für Yoll1/34 ein α -Ratte-Antikörper gekoppelt mit Alexa 546 verwendet. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop wurden Diapositive angefertigt.

6.2 Cdc5 wird durch Phosphorylierung reguliert

Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein weitverbreiteter Mechanismus der Regulierung ihrer biologischen Aktivität. Allgemein übertragen Kinasen den γ -Phosphatrest von ATP auf OH-Gruppen ihrer Substrate. Diese Phosphatreste können von Phosphatasen wieder entfernt werden, so dass es sich bei der Phosphorylierung von Proteinen um einen reversiblen Prozess

handelt. Es ist bekannt, dass viele Kinasen in ihrer Aktivität selbst durch Phosphorylierung reguliert sind (Johnson et al., 1996). Von Cdc5 konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität gegenüber dem künstlichen Substrat Casein abhängig ist von zuvor erfolgter Phosphorylierung von Cdc5 selbst (Cheng et al., 1998).

6.2.1 Cdc5 ist ein Phosphoprotein

Cdc5 zeigt ein heterogenes Laufverhalten in der SDS-PAGE. Um zu testen, ob dies durch eine Phosphorylierung des Proteins verursacht wird, wurde ein Phosphataseassay durchgeführt (5.6.8). Aus einer asynchronen Kulturen von Stämmen, die HA- bzw. Myc-markiertes *CDC5* exprimierten, wurden Lysate hergestellt. Mittels eines α -HA bzw. α -Myc Antikörpers und Protein A-Agarose Beads wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Das Präzipitat wurde entweder direkt mit Lämmli-Puffer versetzt und durch Kochen denaturiert oder es wurde mit Phosphatasepuffer aufgefüllt. Zu der einen Hälfte der mit Puffer versetzten Proben wurde zusätzlich die dualspezifische λ -Protein-Phosphatase zugefügt, die Phosphatreste sowohl von Serin-/Threonin- als auch von Tyrosin-Resten entfernen kann. Wie in Abb. 6 zu sehen, verschwindet die langsamer laufende Form von Cdc5 nach Behandlung mit Phosphatase. War im Reaktionsansatz allerdings keine Phosphatase, sondern nur der entsprechende Puffer, vorhanden, läuft Cdc5 weiterhin als Doppelbande wie im Präzipitat. Der Versuch zeigt also, dass das heterogene Laufverhalten von Cdc5 durch eine Phosphorylierung verursacht wird und es sich bei Cdc5 somit um ein Phosphoprotein handelt.

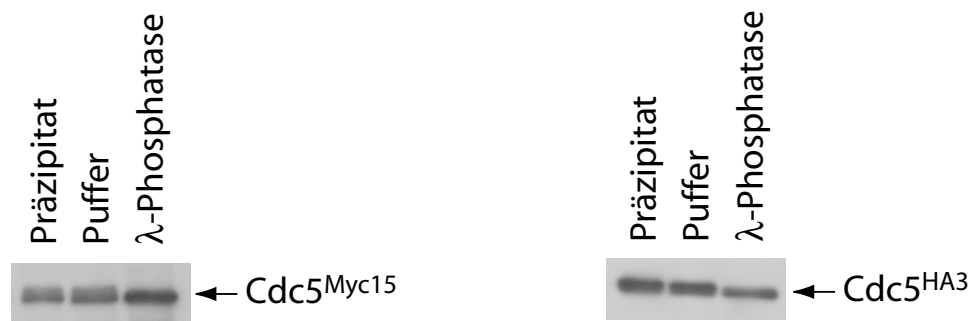


Abb. 6 Cdc5 ist ein Phosphoprotein. Um die Art der Modifikation von Cdc5 zu untersuchen, wurde Cdc5^{Myc15} aus einem Lysat des Stammes K6390 (*cdc5::CDC5^{Myc15}-URA3*) mittels 9E10-Antikörpern (oben) bzw. Cdc5^{HA3} aus einem Lysat des Stammes K6213 (*cdc5::CDC5^{HA3}-URA3*) mittels 12CA5-Antikörpern (unten) und Protein A-Agarose-Beads präzipitiert und entweder mit Phosphatasepuffer alleine oder mit Puffer und λ Protein-Phosphatase inkubiert. Das Laufverhalten von Cdc5^{Myc15} bzw. Cdc5^{HA3} nach dieser Behandlung wurde mittels Western Blot mit 9E10 bzw. 12CA5 analysiert.

6.2.2 Cdc5 ist *in vitro* ein Substrat für Cdc28-Kinase

In 6.2.1 wurde gezeigt, dass Cdc5 ein Phosphoprotein ist. Allerdings ist nicht bekannt, von welcher Kinase Cdc5 phosphoryliert wird. In der Proteinsequenz von Cdc5 finden sich fünf Konsensusstellen für eine Phosphorylierung durch zyklinabhängige Kinasen, die aus einem Serin/Prolin- bzw. einem Threonin/Prolin-Motiv bestehen. Da Cdc5 erst in der S-Phase auftritt, ist es unwahrscheinlich, dass es von dem Komplex aus den G1-spezifischen Cln-Zyklinen und

Cdc28 phosphoryliert wird. Deshalb wurde getestet, ob Cdc5 ein Substrat für die mit den B-Typ Zyklone Clb2, Clb3 und Clb5 assoziierte CDK darstellt (5.6.9). Als Substrat für einen *in vitro* Kinaseassay wurde ein in *E. coli* produziertes und gereinigtes Fusionsprotein aus dem Maltosebindeprotein mit kinaseinaktivem Cdc5 (MBP-Cdc5^{K110M}) verwendet. Zusätzlich wurde ein mutiertes Cdc5-Protein eingesetzt, bei dem die ersten beiden Cdc28-Konsensusstellen zerstört sind, so dass nur noch drei potentielle Stellen für Phosphorylierung durch Cdc28 in diesem Protein übrig sind. Die Verwendung von kinaseinaktivem Cdc5 liegt in der starken Autophosphorylierungsaktivität von Cdc5 begründet. Durch den Austausch eines Lysins an Stelle 110 gegen ein Methionin (K110M) (Lee et al., 1995) wird die Kinaseaktivität zerstört. Cdc28-Kinase wurde aus Stämmen präzipitiert, die HA-markierte Versionen der entsprechenden Zyklone vom *GALI*-Promotor überexprimierten. Die gereinigten Kinasekomplexe wurden mit Kinasepuffer alleine oder mit Puffer und MBP-Cdc5^{K110M} in Gegenwart von γ -³²P-ATP inkubiert. Abb. 7 zeigt das Autoradiogramm dieses Versuches. In den ersten vier Spuren wurden die Proben aufgetragen, die ohne MBP-Cdc5^{K110M} inkubiert wurden. In den Spuren 2-4 sieht man demnach die Autophosphorylierung der Zyklone. In den Spuren 6-8 tritt zusätzlich zu der Zyklin-Autophosphorylierung ein Signal in Höhe von MBP-Cdc5^{K110M} auf, das fehlt, wenn kein MBP-Cdc5^{K110M} im Reaktionsansatz war (Spur 5). Somit handelt es sich bei den zusätzlichen Banden in den Spuren 6-8 um MBP-Cdc5^{K110M}, das von Cdc28 phosphoryliert worden ist. In einem vorhergehenden Experiment wurde überprüft, dass MBP selbst kein Substrat für Cdc28 darstellt (Daten nicht gezeigt). Cdc5 scheint durch Clb5-Cdc28 effektiver phosphoryliert zu

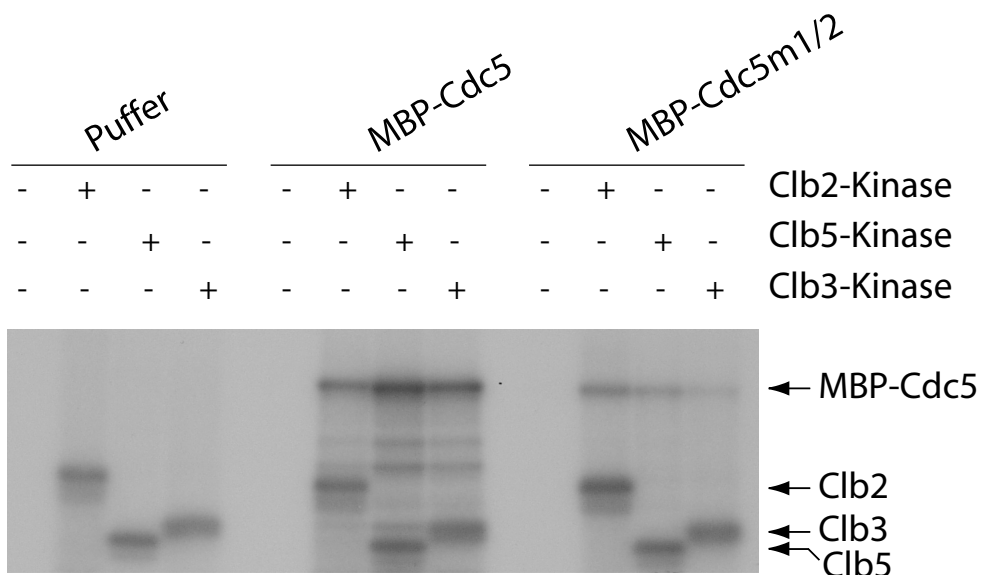


Abb. 7 Cdc5 ist *in vitro* ein Substrat für Cdc28-Kinase. Cdc5^{K110M} wurde als Fusionsprotein mit MBP (maltose binding protein) heterolog in *E. coli* produziert. Clb-Cdc28 Komplexe wurden nach Galaktoseinduktion mittels 12CA5-Antikörpern und Protein A-Agarose-Beads aus den Stämmen W413 (*ura3::GAL-CLB2^{HA3}-URA3*), W814 (*ura3::GAL1-CLB5^{HA3}-URA3*) und W1010 (*ura3::GAL1CLB3^{HA3}-URA3*) präzipitiert. Die gereinigten Kinase-Komplexe wurden mit Kinasepuffer alleine oder mit Puffer, MBP-Cdc5^{K110M} oder MBP-Cdc5m1/2^{K110M} (je ca. 1 μ g) und γ -³²P-ATP inkubiert. Der Einbau von radioaktivem Phosphat in die Proteine wurde durch Autoradiographie gemessen.

werden (Spur 7), als durch Clb2-Cdc28 oder Clb3-Cdc28. Diese Aussage kann allerdings nur bedingt aufrechterhalten werden, da nicht sichergestellt ist, dass von allen drei Zyklin-Cdc28-Komplexen exakt gleiche Mengen in den Versuch eingesetzt wurden. Das mutierte Cdc5-Protein verhält sich auffällig anders. Insgesamt wird es von allen Kinasen schwächer phosphoryliert (Spuren 10-12), obwohl die Autophosphorylierungsreaktion der Zykline in ihrer Stärke in allen Ansätzen vergleichbar ist. Besonders schlecht wird es von Clb5-Cdc28 und Clb3-Cdc28 phosphoryliert. Dies zeigt, dass Clb5-Cdk1 und Clb3-Cdk1 wohl für die Phosphorylierung der ersten zwei Konsensusstellen in Cdc5 verantwortlich sind. Außerdem stellt dieses Ergebnis einen Hinweis auf die zeitliche Regulation der Phosphorylierung von Cdc5 *in vivo* dar, da Clb5- und Clb3-Kinase ihr Aktivitätsmaximum im Zellzyklus vor Clb2-Cdc28-Kinase erreichen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Cdc5 *in vitro* durch alle untersuchten Zyklin-Cdc28-Komplexe phosphoryliert wird und dass die ersten beiden potentiellen Cdc28-Konsensusstellen dabei eine wichtige Rolle spielen.

6.2.3 Der Verlust der Konsensusstellen für Cdc28-Kinase führt zu einem Funktionsverlust von Cdc5

Die bisher gezeigten Daten belegen, dass Cdc5 ein Phosphoprotein ist und dass es *in vitro* ein Substrat für Cdc28-Kinase ist. Zur Untersuchung der biologischen Relevanz der Phosphorylierung von Cdc5 durch CDK, wurden alle fünf Cdc28-Konsensusstellen in Cdc5 durch gezielte Mutagenese zerstört (5.5.6.3). Durch entsprechend gewählte Oligonukleotide wurde das Serin bzw. das Threonin in den SP/TP-Motiven durch ein Alanin ersetzt. Die Auswirkung dieser Zerstörung der Cdc28-Konsensusstellen für die Aktivität von Cdc5 wurde in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Assays untersucht.

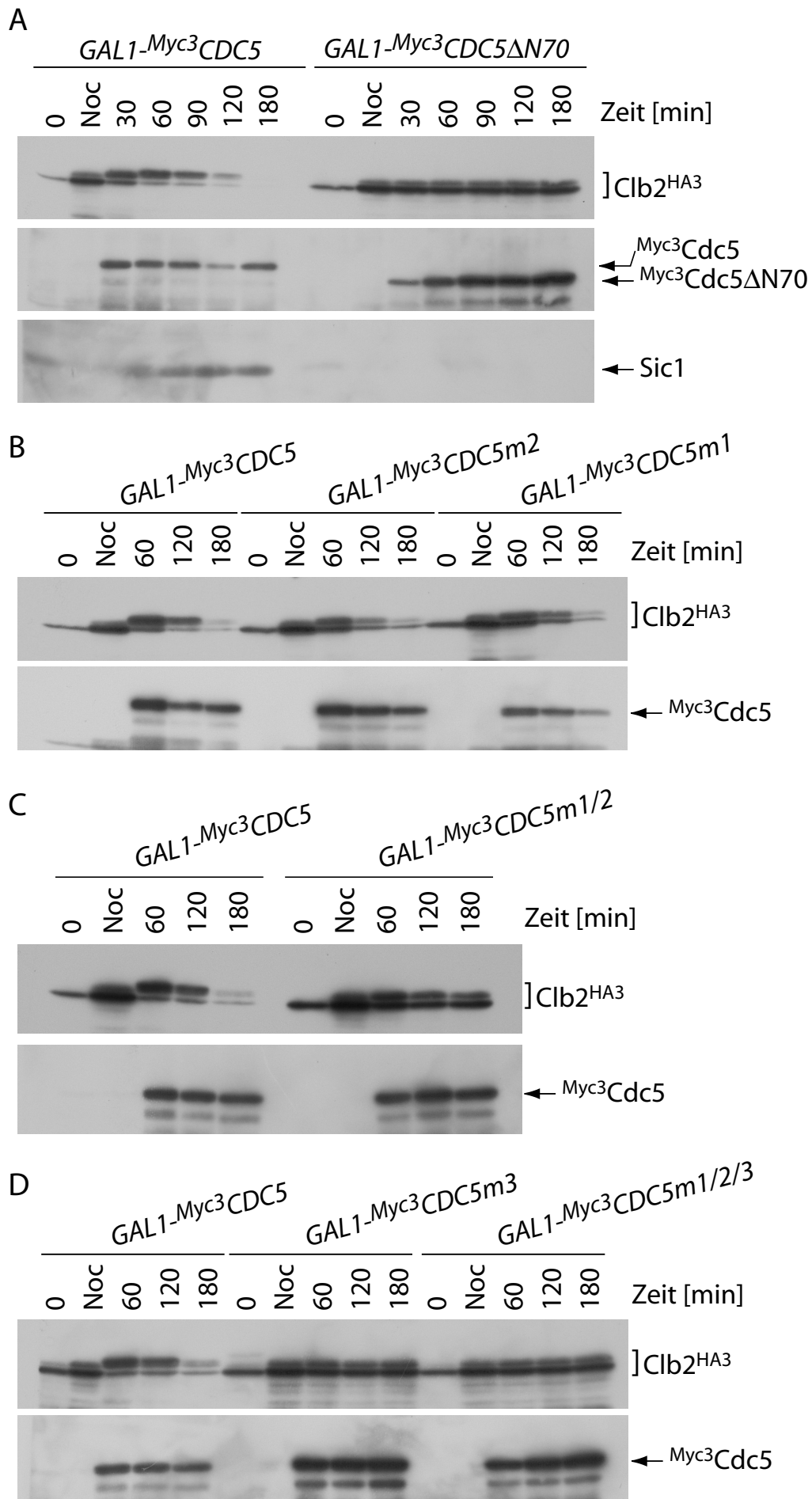
6.2.3.1 Die Mutagenese der Cdc28-Konsensusstellen in Cdc5 führt zu einem Funktionsverlust des Proteins *in vivo*

Cdc5-Mutanten arretieren in der Anaphase mit hohen Mengen des mitotischen Zyklins Clb2. Weiterhin führt die Überexpression von *CDC5* zu einer APC-abhängigen Degradation von Clb2. Diese Clb2-Degradation ist sowohl in asynchronen Zellen, als auch in Zellen, die mit Hydroxyurea in der S-Phase bzw. mit Nocodazol in der Metaphase arretiert wurden, zu beobachten (Charles et al., 1998).

Die beschriebene *CDC5*-induzierte Clb2-Degradation wurde als Test für die *in vivo* Aktivität verschiedener Cdc5-Phosphosite-Mutanten genutzt. Hierfür wurden Stämme verwendet, die die unterschiedlichen *CDC5*-Konstrukte mit einem N-terminalen Myc3-Epitop vom Galaktose-induzierbaren *GALI*-Promotor exprimierten. Die Zellen wurden zuerst mit Nocodazol arretiert, dann wurde durch Zugabe von Galaktose die Expression von *CDC5* induziert. Clb2 war in diesen Stämmen mit einem HA3-Epitop versehen und konnte so mittels eines α -HA-Antikörpers nachgewiesen werden.

Clb2 ist in asynchronen Zellen nachweisbar, seine Menge ist im Nocodazolarrest allerdings deutlich erhöht und man kann zwei unterschiedlich schnell laufende Banden voneinander

unterscheiden, die unterschiedliche Phosphorylierungsvarianten von Clb2 repräsentieren. Nach der Induktion von *CDC5* ist zu beobachten, dass sich das Laufverhalten von Clb2 in der SDS-PAGE verändert. Beide Banden von Clb2 laufen langsamer als im Nocodazolarrest und zusätzlich ist die obere Bande verstärkt. Dies deutet darauf hin, dass Clb2 von Cdc5 zusätzlich phosphoryliert wird. Zwei Stunden nach der *CDC5*-Induktion ist die Menge an Clb2 schon signifikant verringert und nach drei Stunden kann es kaum noch nachgewiesen werden. Cdc5 selbst akkumuliert mit zunehmender Induktion vom *GAL*-Promotor, nimmt dann aber nach längerer Induktion wieder ab. Fehlen die erste (Cdc5m1) oder die zweite (Cdc5m2) Cdc28-Konsensusstelle, ist Cdc5 bezüglich der Clb2-Degradation aktiv (Abb. 8). Fehlen hingegen beide CDK-Konsensusstellen in demselben Protein (Cdc5m1/2), kommt es nicht mehr zur Degradation von Clb2 nach Überexpression dieser Mutante. Außerdem wird Clb2 auch nicht mehr hyperphosphoryliert, obwohl die exprimierte Menge der Mutante mit der des Wildtypproteins vergleichbar ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die beiden ersten Cdc28-Konsensusstellen eine wichtige Rolle für die Funktion von Cdc5 haben. Diese Vermutung wird bestätigt durch die Untersuchung einer am N-Terminus um 70 Aminosäuren verkürzten Variante von Cdc5 (Cdc5 Δ N70). In Cdc5 Δ N70 fehlen nicht nur die ersten beiden Cdc28-Konsensusstellen, sondern auch ein Sequenzmotiv, das als „destruction box“ bezeichnet wird und für die APC-abhängige Degradation von Cdc5 selbst verantwortlich ist (Shirayama et al., 1998). Obwohl Cdc5 Δ N70 also stabilisiert ist und nach der Galaktosezugabe kontinuierlich akkumuliert, wird Clb2 weder phosphoryliert noch degradiert. Ein weiterer Hinweis für den weitgehenden Funktionsverlust dieses Proteins ist die Beobachtung, dass Sic1 nach *CDC5 Δ N70*-Überexpression im Nocodazolarrest nicht mehr ansteigt. Ein Fehlen der dritten Cdc28-Konsensusstelle führt ebenfalls zu einem Funktionsverlust von Cdc5 in dem hier vorliegenden Assay. Obgleich die produzierte Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp eher erhöht ist, wird Clb2 nicht degradiert und auch nicht phosphoryliert. Das Fehlen der CDK-Konsensusstellen vier (Cdc5m4) und fünf (Cdc5m5) in Cdc5 sowohl einzeln als auch in Kombination hat hingegen keine Auswirkung auf die Aktivität des Proteins. Sowohl die Clb2-Degradation als auch die Clb2-Phosphorylierung finden normal statt. Cdc5-Varianten, denen die ersten drei (Cdc5m1/2/3), die ersten vier (Cdc5m1/2/3/4) oder alle fünf (Cdc5m1/2/3/4/5) Cdc28-Phosphorylierungsstellen fehlen, verhalten sich wie die Mutante, in der nur die dritte Stelle fehlt. Die Mutante, in der alle Stellen außer der dritten mutagenisiert sind, verhält sich wieder wie das Wildtypprotein. Zusammengefasst zeigen diese Experimente mit verschiedenen Phosphosite-Mutanten, dass der dritten Cdc28-Konsensusstelle von Cdc5 eine essentielle Rolle bei der Regulation der Aktivität des Proteins zukommt. Der Versuch, die Enzymaktivität wiederherzustellen, indem das Alanin an dieser Stelle zu einem Aspartat ausgetauscht wurde, schlugen fehl. Die Aspartat-Mutante von Cdc5 war wie die Alanin-Mutante nicht in der Lage, Clb2 nach Überproduktion zu degradieren oder zu phosphorylieren.



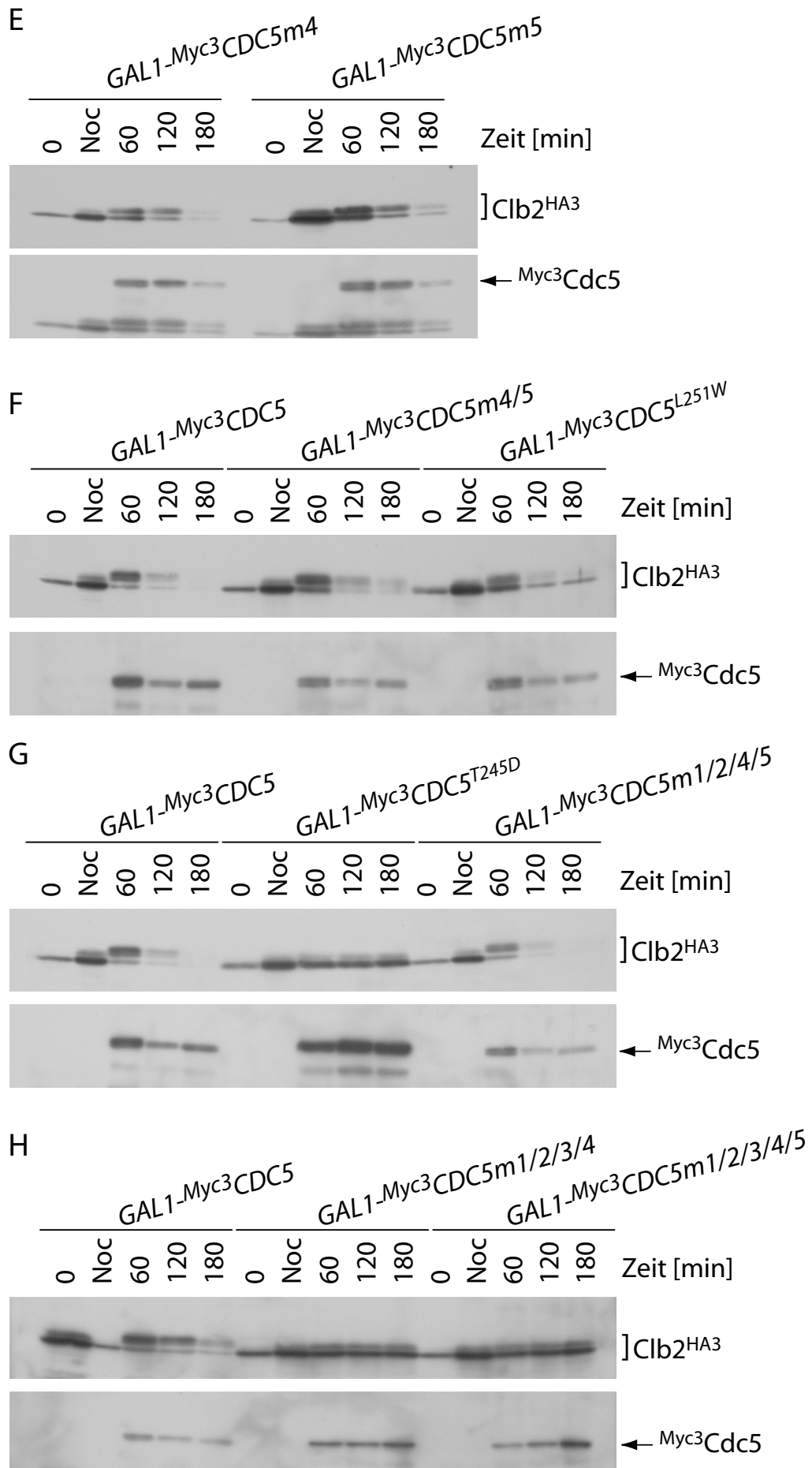


Abb. 8 Wirkung der Überexpression verschiedener *cdc5*-Mutanten auf das Zyklin Clb2. Um die Auswirkung der Überproduktion von Cdc5-Phosphosite-Mutanten auf die Modifikation und die Degradation von Clb2 zu untersuchen, wurden entsprechende Stämme mit Nocodazol behandelt. Nach Erreichen des Arrestes wurde die Expression der verschiedenen *CDC5*-Varianten mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und für einen Westen Blot aufgearbeitet. Clb2^{HA3} wurde mit 12CA5 nachgewiesen, Sic1 mit einem α -Sic1 Serum aus Kaninchen. Die Menge des überproduzierten Myc³Cdc5 wurde mit 9E10 überprüft. (A) Wirkung einer stabilisierten *cdc5*-Mutante, bei der die ersten 70 Aminosäuren deletiert wurden. W1555 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5-URA3 CLB2^{HA3}*) und W1997 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5 Δ N70-URA3 CLB2^{HA3}*). (B) Auswirkung der Einzelmutationen der ersten beiden Cdc28-Konsensusstellen. W2028 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m2-URA3 CLB3^{HA3}*) und W2029 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m1-URA3 CLB3^{HA3}*). (C) Auswirkung des Doppelaustausches der ersten beiden Cdc28-Konsensusstellen. W1555 und W2030 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m1/2-URA3 CLB3^{HA3}*). (D) Auswirkung der Einzelmutation der dritten Cdc28-Konsensusstelle und des Tripelaustausches der ersten drei Stellen. W1555, W2031 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m3-URA3 CLB3^{HA3}*) und W2032 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m1/2/3-URA3 CLB3^{HA3}*). (E) Auswirkung der Einzelmutationen der vierten und fünften Cdc28-Konsensusstelle. W2038 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m4-URA3 CLB2^{HA3}*) und W2039 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m5-URA3 CLB2^{HA3}*). (F) Wirkung der Doppelmutation der vierten und fünften Stelle sowie des Austausches eines Leucins gegen ein Tryptophan an Position 251. W1555, W2149 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m4/5 CLB2^{HA3}*) und W2153 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5^{L251W}-URA3 CLB2^{HA3}*). (G) Wirkung des Austausches des Threonin an Position 245 gegen ein Aspartat sowie Auswirkung der Mutation der ersten, zweiten, vierten und fünften Cdc28-Konsensusstelle. W1555, W2151 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5^{T245D}-URA3 CLB2^{HA3}*) und W2156 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m1/2/4/5-URA3 CLB2^{HA3}*). (H) Wirkung des Austausches der ersten vier bzw. aller fünf Cdc28-Konsensusstellen. W1555, W2219 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m1/2/3/4-URA3 CLB2^{HA3}*) und W2220 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5m1/2/3/4/5-URA3 CLB2^{HA3}*).

Die Überexpression von *CDC5* ist toxisch für Zellen. Ein weiterer Funktionalitätstest von *cdc5*-Mutanten ist es, die Letalität der Überexpression zu überprüfen. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der verschiedenen Stämme angefertigt und auf Vollmediumsplatten mit Glucose oder Galaktose als C-Quelle aufgebracht (5.2.6). Auf Platten mit Glucose ist der Galaktose-Promotor reprimiert und alle Stämme wachsen gleich gut. Auf den Galaktose-Platten hingegen sieht man deutliche Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Stämmen. Wie bereits erwähnt, ist die Überproduktion des Wildtypproteins toxisch (Abb. 9, je Reihe 2). Das Fehlen der ersten beiden potentiellen Stellen für eine Phosphorylierung durch Cdc28-Kinase (Abb. 9, oberes Bild, Reihe 6) vermindert die Letalität von Cdc5. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Überexpression aller Konstrukte, in denen die dritte Stelle mutagenisiert wurde, nicht mehr letal ist (Abb. 9, oberes und unteres Bild je Reihen 7+8). Das bedeutet, dass das Vorhandensein der dritten Stelle absolut essentiell für die Toxizität von *CDC5* ist. Übereinstimmend damit verhält sich ein Protein, bei dem nur noch die dritte Stelle vorhanden ist, wieder wie das Wildtypprotein (Abb. 9, unteres Bild, Reihe 6).

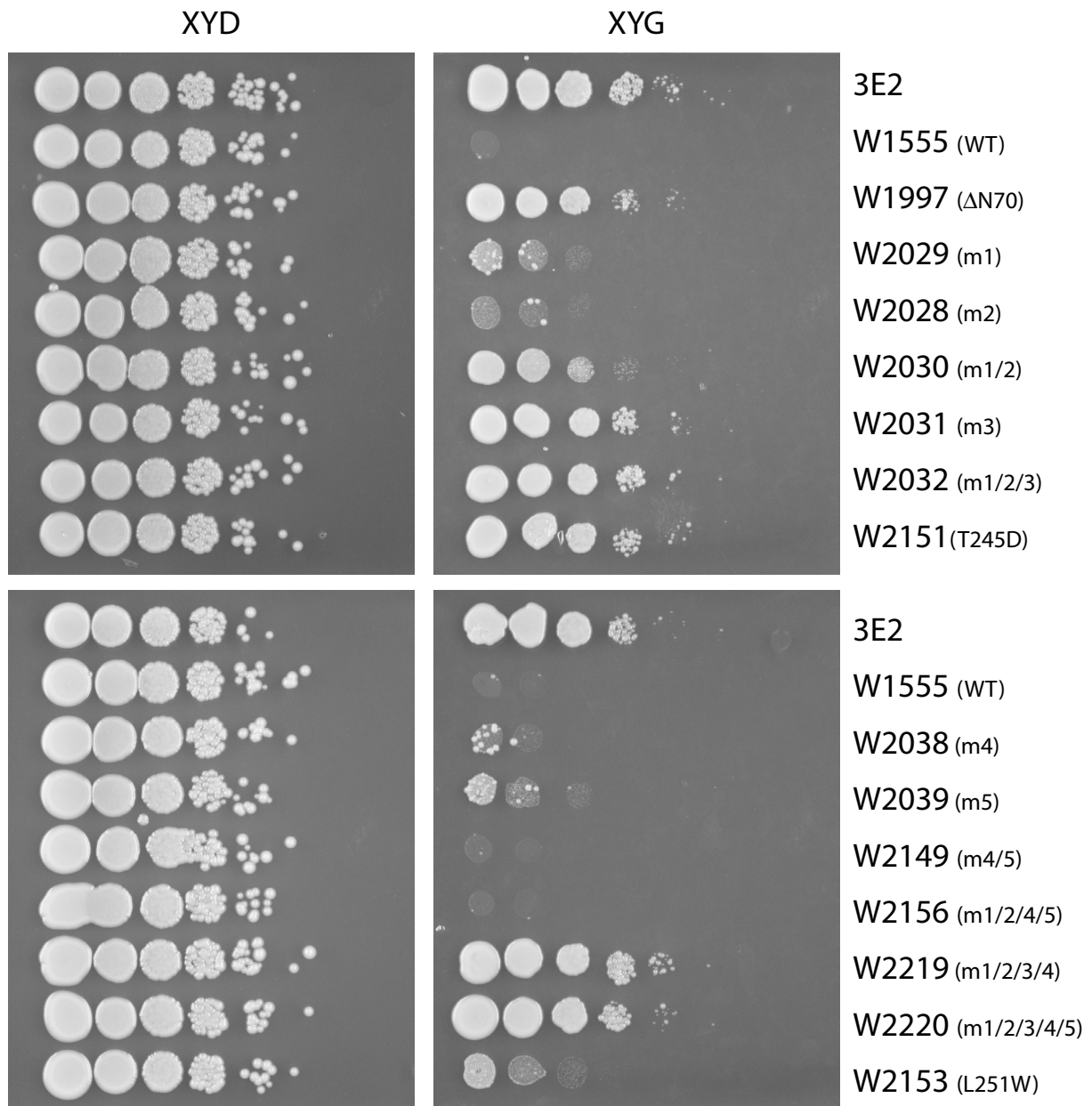


Abb. 9 Auswirkung der Überexpression verschiedener *cdc5*-Mutanten auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Um das Wachstumsverhalten der Zellen nach Überexpression verschiedener *cdc5*-Mutanten zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen in 1:10-Schritten von Stämmen mit galaktoseinduzierbarem ^{Myc3}CDC5mx auf Vollmediumsplatten mit Glucose bzw. Galaktose aufgebracht. Im ersten Spot befanden sich 125000. Die Platten wurden drei Tage bei 25°C inkubiert. Oben: 3E2 (*CLB2^{HA3}*), W1555 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3 CLB2^{HA3}*), W1997 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5ΔN70-URA3 CLB2^{HA3}*), W2029 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m1-URA3 CLB3^{HA3}*), W2028 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m2-URA3 CLB3^{HA3}*), W2030 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m1/2-URA3 CLB3^{HA3}*), W2031 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m3-URA3 CLB3^{HA3}*), W2032 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m1/2/3-URA3 CLB3^{HA3}*) und W2151 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5^{T245D}-URA3 CLB2^{HA3}*). Unten: 3E2, W1555, W2038 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m4-URA3 CLB2^{HA3}*), W2039 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m5-URA3 CLB2^{HA3}*), W2149 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m4/5-CLB2^{HA3}*), W2156 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m1/2/4/5-URA3 CLB2^{HA3}*), W2219 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m1/2/3/4-URA3 CLB2^{HA3}*), W2220 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5m1/2/3/4/5-URA3 CLB2^{HA3}*) und W2153 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5^{L251W}-URA3 CLB2^{HA3}*).

Beide vorgestellten Assays – die Wirkung der Überexpression auf die Phosphorylierung und Degradation von Clb2 und die Toxizität der einzelnen Cdc5-Varianten nach Überproduktion – belegen, dass das Zerstören bestimmter Cdc28-Konsensusstellen in Cdc5 zu einem Funktionsverlust des Proteins *in vivo* führt. Dabei bleibt anzumerken, dass die fünf potentiellen Cdc28-Konsensusstellen nicht äquivalent sind. Die Mutagenese der beiden letzten Stellen hat keinen Einfluß auf die Aktivität des Proteins. Sind die ersten beiden Stellen zusammen mutagenisiert, ist sowohl die Phosphorylierung und Degradation von Clb2 eingeschränkt als auch die Toxizität des Konstrukts bei Überexpression. Ein Konstrukt, in dem nur noch die dritte Stelle als Akzeptorstelle für eine Phosphorylierung durch CDK dienen kann, verhält sich allerdings wieder wie das Wildtypprotein, das Fehlen der ersten beiden Stellen scheint in dieser Konstellation also nicht zu schaden. Den bedeutendsten Einfluss auf die Cdc5-Aktivität hat allerdings die dritte Stelle.

In Tab. 4 sind die Ergebnisse noch einmal zusammengefasst. Außerdem sind hier noch weitere Experimente aufgeführt, die der Charakterisierung der *cdc5*-Mutanten dienen. Außer der Phosphorylierung des Zyklins Clb2 wurde auch die Phosphorylierung der Phosphatase Cdc14 als ein Maß für Cdc5-Aktivität herangezogen. Im wesentlichen verhalten sich die unterschiedlichen Konstrukte in Bezug auf die beiden Substrate gleich. Die Überexpression von *CDC5m1/2*, das in Bezug auf Clb2 und die Lebensfähigkeit der Zellen einen gewissen Funktionsverlust aufwies, phosphoryliert Cdc14 immer noch wie das Wildtyp Cdc5.

Wie oben beschrieben läuft Cdc5 im SDS-Gel als Doppelbande, wobei die obere Bande die phosphorylierte Form repräsentiert. Dieses Laufverhalten zeigt Cdc5m3 nicht. Dies deutet darauf hin, dass diese Stelle tatsächlich für Phosphorylierung *in vivo* benutzt werden könnte. Cdc5m1/2/4/5 läuft hingegen noch als Doppelbande.

Außerdem wurde versucht, eine *cdc5*-Deletionsmutante durch Expression der verschiedenen *CDC5*-Varianten zu retten, und so zu testen, ob sie in der Lage sind, die essentielle Funktion von *CDC5* zu komplementieren. Hierzu wurden die *CDC5*-Konstrukte hinter den *MET25*-Promotor kloniert, der nur in Abwesenheit von Methionin angeschaltet ist. Diese Konstrukte wurden in eine heterozygot diploide *cdc5*-Deletionsmutante transformiert. Mit den Transformanden wurden Tetradenanalysen auf Minimalplatten ohne Methionin durchgeführt. Tritt keine Rettung auf, sollten immer nur zwei Sporen anwachsen. Cdc5m1 und Cdc5m1/2 waren in der Lage, die *cdc5*-Deletionsmutante zu retten. War die dritte Stelle zu einem Alanin oder Aspartat mutagenisiert, trat keine Rettung auf. Auch dies ist ein Hinweis für den Funktionsverlust dieser Proteine.

Konstrukt	Phosphorylierung von		Clb2-Degradation	Letalität auf		Doppelbande	Sonstiges
	Cdc14	Clb2		Galaktose	Galaktose		
	WT	+	+	+	+	+	+
ΔN70	-	-	-	-	-	n.d.	rettet <i>cdc5Δ</i> vom <i>MET25</i> -Promotor
m1	+	+	+	0	+	+	
m2	+	+	+	+	+	+	
m1/2	+	0	0	-	-	n.d.	sehr langsames Wachstum auf XYGal, rettet <i>cdc5Δ</i>
m3	-	-	-	-	-	-	akkumuliert nach GAL-Induktion, rettet <i>cdc5Δ</i> nicht
m1/2/3	-	-	-	-	-	-	akkumuliert nach GAL-Induktion
m4	+	+	+	+	+	+	
m1/2/3/4	-	-	-	-	-	n.d.	
m5	+	+	+	+	+	+	
m1/2/3/4/5	n.d.	-	-	-	-	n.d.	
m4/5	+	+	+	+	+	+	
m1/2/4/5	+	+	+	+	+	+	
K110M	-	n.d.	n.d.	0	0	n.d.	akkumuliert nach GAL-Induktion, rettet <i>cdc5Δ</i> nicht
T245D	-	-	-	-	-	+	
T245E	-	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	

Tab. 4 Zusammenfassung der Cdc5-Mutagenese. In der ersten Spalte finden sich die Bezeichnungen der verschiedenen *CDC5*-Konstrukte wie sie auch im Weiteren verwendet wurden. Außerdem die schematische Darstellung des Proteins. Grau die Kinasedomäne, schwarz die beiden Polo-Boxen. Kreise repräsentieren Cdc28-Konsensusstellen. + vorhanden, - nicht vorhanden, 0 schwach, n.d. nicht bestimmt.

6.2.3.2 Durch den Austausch der Cdc28-Konsensusstellen ist Cdc5 *in vitro* kein Substrat mehr für CDK

Es wurde gezeigt, dass Cdc5 *in vitro* ein Substrat ist für B-Typ Zyklin-CDK Komplexe. Die Mutagenese der potentiellen Cdc28-Konsensusstellen hat teilweise einen starken Effekt auf die Funktionalität des Proteins *in vivo*. Die Frage ist nun, konnte die Mutagenese der Cdc28-Konsensusstellen bewirken, dass Cdc5 kein Substrat mehr für die zyklinabhängige Kinase ist. Ein erster Hinweis darauf, dass Cdc5m1/2/3/4/5 kein Substrat mehr ist für Cdc28-Kinase, ist die Tatsache, dass das entsprechende Protein im Western nicht mehr als Doppelbande läuft. Um zu untersuchen, ob das m1-5-Protein noch von Cdc28-Kinase erkannt wird, wurde es als MBP-Fusion in *E. coli* exprimiert und gereinigt und als Substrat in einen *in vitro* Kinaseassay mit Clb2-Cdc28-Kinase eingesetzt. Wie immer, wenn Cdc5 als Substrat in einem Kinaseassay diente, trug es gleichzeitig die Mutation K110M. Durch den Austausch des Lysins in der ATP-Bindestelle der Kinase gegen ein Methionen geht die Kinaseaktivität verloren, so dass auch keine Autophosphorylierung mehr auftritt. Das Wildtypprotein und das Protein ohne potentielle Cdc28-Konsensusstellen wurden in verschiedenen Konzentrationen in den Kinaseassay eingesetzt (Abb. 10). Als Positivkontrolle diente Histon H1, als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ansatz nur mit Puffer inkubiert. Hier sieht man die Autophosphorylierung von Clb2. Wurden 5 µg Protein in den Assay eingesetzt, erhält man mit Cdc5 ein sehr starkes Signal im Autoradiogramm. Auch mit dem m1-5-Protein erhält man ein Signal auf Höhe von MBP-Cdc5. Wurden allerdings nur 1 oder 0,5 µg des Fusionsproteins eingesetzt, bekommt man ein deutlich sichtbares Signal mit dem Wildtypprotein aber keines mit der Phosphosite-Mutante. Dies bedeutet, dass die Variante von Cdc5, in der alle fünf Cdc28-Konsensusstellen ausgetauscht

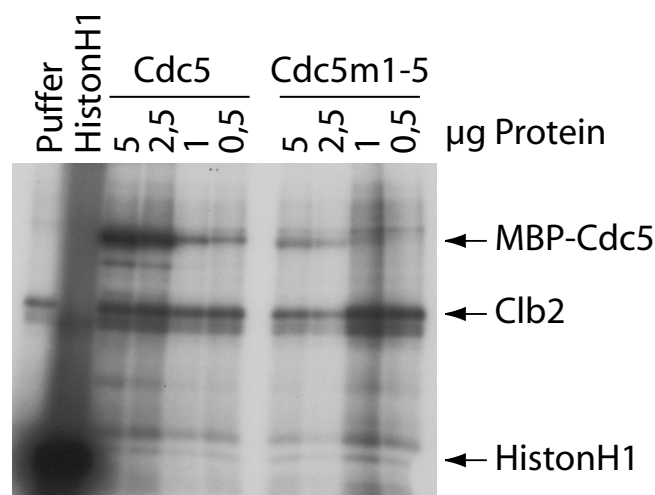


Abb. 10 Cdc5-m1/2/3/4/5 ist kein Substrat für Clb2-Kinase. Clb2-Cdc28 Komplexe wurden nach Galaktoseinduktion mittels 12CA5-Antikörpern und Protein A-Agarose-Beads aus dem Stamm W413 (*ura3::GAL-CLB2^{HA3}-URA3*) gereinigt. Die gereinigten Kinase-Komplexe wurden mit Kinasepuffer alleine oder mit Puffer und abnehmenden Mengen an MBP-Cdc5^{K110M} oder MBP-Cdc5-m1-5^{K110M} und γ -³²P-ATP inkubiert. Als Kontrolle für die Clb2-Cdc28-Kinaseaktivität diente die Inkubation mit HistonH1 als künstlichem Substrat. Der Einbau von radioaktivem Phosphat in die Proteine wurde durch Autoradiographie gemessen.

sind, kein Substrat mehr für die zyklinabhängige Kinase darstellt. Die Tatsache, dass man mit hohen Mengen an eingesetztem Substrat dennoch ein Signal detektieren kann, könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei diesen unphysiologisch hohen Konzentrationen auch andere Stellen für die Phosphorylierungsreaktion genutzt werden könnten.

6.2.3.3 Cdc5 interagiert mit Clb2

In den bereits beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Cdc5 ein Substrat für Clb2-Cdc28 Kinase ist. Außerdem wurde gezeigt, dass die Überexpression von *CDC5* seinerseits zur Degradation und Hyperphosphorylierung von Clb2 führt. Nun wurde untersucht, ob beide Proteine miteinander interagieren, und wenn ja, welche Formen beider Proteine an einer solchen Interaktion beteiligt sind. Hierfür wurde ein *cdc23-1*-Stamm verwendet, der Myc-markiertes *CDC5* vom *GALI*-Promotor überexprimiert und HA3-markiertes Clb2 vom endogenen Promotor exprimiert. Mit α -Cdc28-Antikörper, die gegen den N- bzw. C-Terminus des Proteins gerichtet sind, wurde Cdc28 vor und nach Zugabe von Galaktose präzipitiert. In allen Fällen kann im 12CA5-Western Clb2 nachgewiesen werden. Die beiden Formen von Clb2, die nach Überexpression von *CDC5* entstehen, interagieren beide gleichermaßen mit Cdc28. Die Hyperphosphorylierung von Clb2 durch Cdc5 beeinflusst somit nicht dessen Fähigkeit mit Cdc28 zu interagieren. Cdc5 wurde vor und nach Galaktoseinduktion mit 9E10 präzipitiert. Auch hier ist es so, dass beide Formen von Clb2 mit Cdc5 interagieren (Abb. 11). Diese Interaktion könnte nun einerseits die Tatsache reflektieren, dass Cdc5 von Clb2-Cdc28 phosphoryliert wird, oder umgekehrt, dass Cdc5 Clb2 phosphoryliert. Festgehalten werden kann also, dass sich mittels Immunpräzipitation eine physikalische Interaktion zwischen Cdc5 und Clb2 nachweisen lässt und dass beide Banden von Clb2 gleich stark mit Cdc5 interagieren.

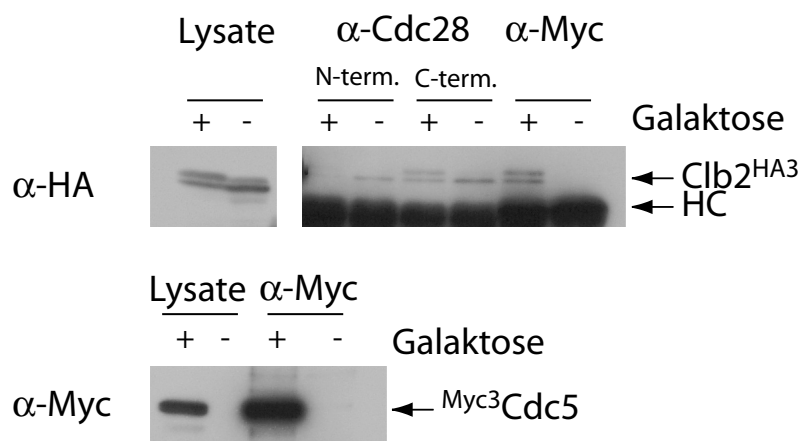
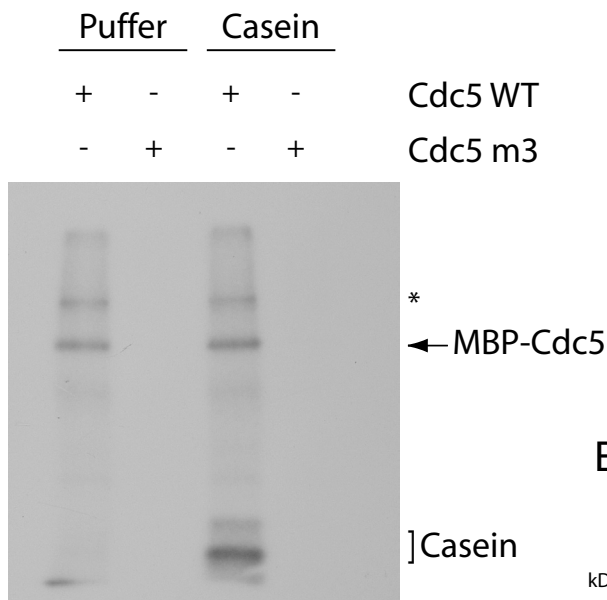


Abb. 11 Cdc5 interagiert mit Clb2. In XYRaffinose wachsende Zellen des Stammes W1559 (*cdc23-1 ura3::GALI^{-Myc3}CDC5-URA3 CLB2^{HA3}*) wurden mit Nocodazol behandelt und sofort nach Erreichen des Arrestes geerntet bzw. für 60 min mit Galaktose induziert. Aus den Proteinlysaten wurden mit α -Cdc28-Antikörpern, die gegen den N- bzw. den C-Terminus des Proteins gerichtet waren, und ProteinA-Agarose Beads Cdc28 präzipitiert. Aus dem Lysat der mit Galaktose behandelten Zellen konnte mit 9E10 ^{Myc3}Cdc5 präzipitiert werden. Gezeigt sind die Lysate vor der Präzipitation (α -HA und α -Myc) bzw. die α -Cdc28-Präzipitate und die α -Myc-Präzipitate entwickelt mit 12CA5 (α -HA). HC: schwere Antikörperkette (heavy chain).

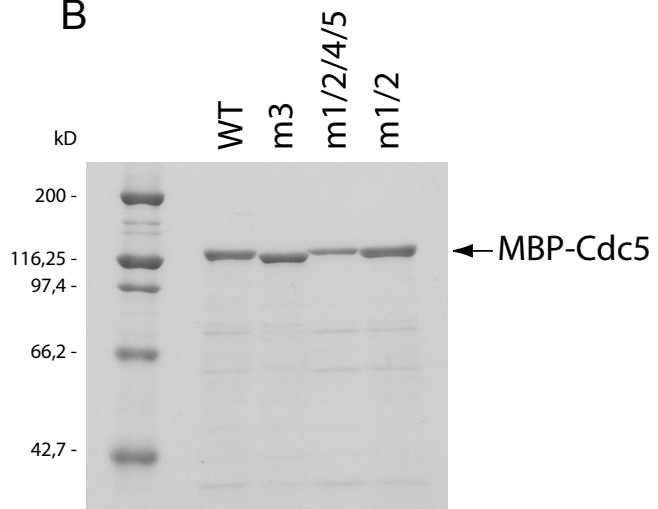
6.2.3.4 Die *in vitro* Kinaseaktivität von Cdc5 ist abhängig von der dritten Cdc28-Konsensusstelle

In vivo weist Cdc5m3 einen vollständigen Funktionsverlust in allen durchgeführten Assays auf. Die Vermutung liegt nahe, dass dieses Protein seine Kinaseaktivität verloren hat. Um diese Fragestellung anzugehen, wurde sowohl das Wildtypprotein als auch Cdc5m3 aus Hefen präzipitiert, die diese Proteine unter Kontrolle des *GALI*-Promotors mit einem N-terminalen Myc3-Epitop produzierten. Die Präzipitate wurden in einen Cdc5-Kinaseassay eingesetzt, wobei als Substrat Casein verwendet wurde (Cheng et al., 1998). In der ersten Spur sieht man die Autophosphorylierung von Cdc5, entsprechend in der dritten Spur die Cdc5-Autophosphorylierung und zusätzlich die Phosphorylierung von Casein. In den Spuren zwei und vier, in denen die Ansätze mit Cdc5-m3 aufgetragen sind, ist überhaupt kein Einbau

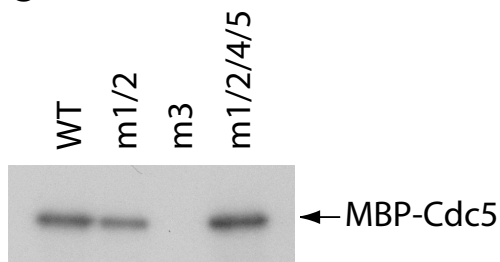
A



B



C



D

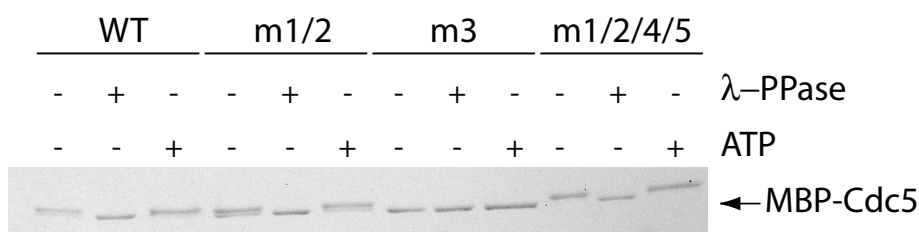


Abb. 12 Cdc5m3 besitzt keine Kinaseaktivität. (A) Um die Kinaseaktivität von Cdc5m3 zu untersuchen, wurden Cdc5 und Cdc5m3 aus den Stämmen W1555 (*ura3::GALI-Myc3CDC5-URA3 CLB2^{HA3}*) und W2031 (*ura3::GALI-Myc3CDC5m3-URA3 CLB3^{HA3}*) nach Galaktoseinduktion mittels 9E10-Antikörpern und Protein A-Agarose-Beads gereinigt. Die Präzipitate wurden entweder mit Cdc5-Kinasepuffer alleine oder mit Puffer und 2 µg Casein und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Der Einbau von radioaktivem Phosphat in die Proteine wurde durch Autoradiographie gemessen. (B) Das Laufverhalten verschiedener Cdc5-Mutanten in der SDS-PAGE. MBP-Cdc5 (Spur1), MBP-Cdc5m3 (Spur2), bei dem nur die 3. Cdc28-Konsensusstelle zu einem Alanin mutiert worden ist, MBP-Cdc5m1/2/4/5 (Spur3), bei dem nur noch die dritte Stelle dem Wildtyp entspricht und MBP-Cdc5m1/2 (Spur4), bei dem die ersten beiden Cdc28-Konsensusstellen mutiert wurden, wurden aus *E. coli* gereinigt und nach SDS-PAGE durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. (C) Autophosphorylierung von Cdc5. 1 µg des Materials aus (A) wurde für einen radioaktiven *in vitro* Kinaseassay eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und der Einbau von radioaktivem Phosphat in die Proteine wurden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. (D) Das Laufverhalten verschiedener Cdc5-Mutanten in der SDS-PAGE korreliert mit der Phosphorylierung des Proteins. MBP-Cdc5, MBP-Cdc5m1/2, MBP-Cdc5m3 und MPB-Cdc5m1/2/4/5 aus *E. coli* wurden mit λ -Proteinphosphatase oder mit ATP inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

von radioaktivem Phosphat zu messen (Abb. 12). Das bedeutet, dass dieses Protein sowohl seine Fähigkeit zur Autophosphorylierung als auch die zur Phosphorylierung von Casein verloren hat. Es handelt sich also um eine kinase-negative Mutante. Bei der mit einem Stern gekennzeichneten Bande handelt es sich um ein Protein, das mit Cdc5 kopräzipitiert und ebenfalls phosphoryliert wird.

Eine weitere Herangehensweise, um die Kinaseaktivität der verschiedenen Cdc5-Mutanten zu untersuchen, ist es, die Proteine heterolog in *E. coli* zu produzieren und mit den gereinigten Proteinen Kinaseassays durchzuführen. Cdc5 sowie die Phosphosite-Mutanten Cdc5m1/2, Cdc5m3 und Cdc5m1/2/4/5 wurden in einen Kinaseassay eingesetzt. In Abb. 12 B ist deutlich zu erkennen, dass die Proteine in der SDS-PAGE ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen. Cdc5m3 läuft deutlich schneller, scheint also nicht phosphoryliert zu sein. Da die Proteine aus *E. coli* stammen, kann eine Phosphorylierung, die ein langsames Laufverhalten bedingt, nur durch eine Autophosphorylierungsreaktion der Kinase zustande gekommen sein. Dies bestätigt der *in vitro* Kinaseassay. Cdc5m3 aus *E. coli* zeigt keine Autophosphorylierung. Um zu beweisen, dass das langsamere Laufverhalten der in *E. coli* produzierten Proteine tatsächlich auf eine Phosphorylierung zurückzuführen ist, wurden die Proteine mit λ -Protein-Phosphatase behandelt und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Behandlung mit Phosphatase laufen alle Proteine auf gleicher Höhe wie Cdc5m3. Dies bedeutet, dass die dritte Cdc28-Konsensusstelle vorhanden sein muss, damit Cdc5 sich selbst phosphorylieren kann. Dies stimmt mit den Ergebnissen, die mit aus Hefe präzipitierten Proteinen erhalten wurden, überein.

6.2.4 Die Cdc5-Autophosphorylierung ist abhängig von bestimmten Cdc28-Konsensusstellen

Cdc5m3 zeigt keine Autophosphorylierung mehr (Abb. 12). Es ist nun denkbar, dass entweder dieses Threonin direkt die Akzeptorstelle für die Autophosphorylierung darstellt, oder dass diese Position allgemein essentiell für die Cdc5-Aktivität selbst ist. Da diese Mutante auch keine Aktivität gegenüber Casein zeigt, scheint es wahrscheinlich, dass es sich um eine Kinase-Mutante handelt. Es wurde deshalb untersucht, ob eine der anderen Cdc28-Konsensusstellen einen spezifischen Einfluß auf die Autophosphorylierung von Cdc5 hat. Hierzu wurde Cdc5 aus Hefe präzipitiert und als Kinase eingesetzt, um gereinigte Cdc5-Phosphositemutanten in trans zu phosphorylieren. Um zu verhindern, dass sich die aus *E. coli* stammenden Cdc5-Derivate autophosphorylieren, wurden kinase-negative Versionen mit der K110M-Mutation eingesetzt. Abb. 13 zeigt das Autoradiogramm dieses Versuchs. In Spur 1 sieht man die Autophosphorylierung des aus Hefe präzipitierten Cdc5. Spur 2 zeigt den Einbau von radioaktivem Phosphat in Casein. In den folgenden Spuren wurden abwechselnd die Reaktionsansätze mit K699-Präzipitat und Cdc5-Präzipitat aufgetragen. Die mit einem Stern gekennzeichnete Bande stellt ein mit Cdc5 interagierendes Protein dar, das ebenfalls phosphoryliert wird. Im Fall des WT-Proteins (Spur 4) taucht eine zusätzliche Bande kurz unterhalb der mit Stern markierten Bande auf. Dabei

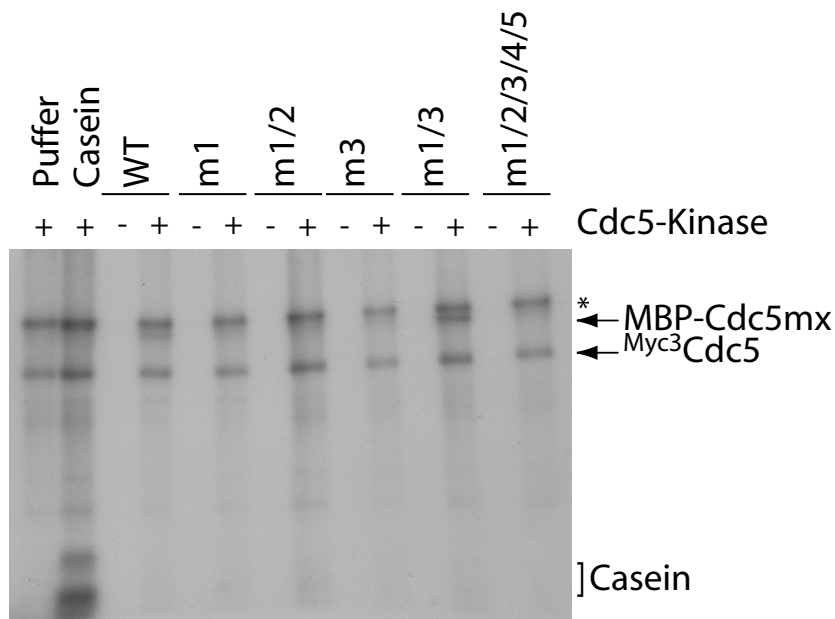


Abb. 13 Die Autophosphorylierung von Cdc5 ist abhängig von bestimmten Cdc28-Konsensusstellen. Um zu testen, ob der Austausch bestimmter Cdc28-Konsensusstellen in Cdc5 die Autophosphorylierungsreaktion beeinflusst, wurde ein *in vitro* Kinaseassay durchgeführt. Cdc5 wurde nach Galaktoseinduktion aus dem Stamm W1648 (*ura3::GALI-Myc³CDC5-URA3*) mittels 9E10 und Protein A-Agarose Beads gereinigt. Als Kontrolle diente das Präzipitat eines Wildtypstammes. Als Substrate dienten aus *E. coli* gereinigte Cdc5-Derivate (1 µg), die außerdem noch den Austausch K110M trugen. Die Präzipitate wurden mit Cdc5-Kinasepuffer und den gereinigten Substraten in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Als Positivkontrolle diente Casein (2 µg). Der Einbau von radioaktivem Phosphat in die Proteine wurde durch Autoradiographie gemessen.

handelt es sich um MBP-Cdc5 aus *E. coli*. Cdc5 aus Hefe kann MBP-Cdc5 aus *E. coli* demnach phosphorylieren. In den Spuren 6 und 8, in denen sich MBP-Cdc5m1 und m1/2 befinden, lässt sich diese Bande nicht nachweisen, obwohl die Autophosphorylierungsreaktion von Cdc5 aus Hefe vergleichbar stark bzw. noch stärker ist als in Spur 4. In Spur 12 ist eine Phosphorylierung von Cdc5m1/3 hingegen wieder deutlich nachzuweisen. Der Austausch aller fünf Stellen verhindert die Phosphorylierung durch Cdc5 vollständig. Dieses Experiment belegt, dass die Autophosphorylierung von Cdc5 in trans stattfinden kann. Das bedeutet, ein Molekül Cdc5 kann ein anderes Cdc5-Molekül phosphorylieren. Weiterhin sind sowohl die erste als auch die dritte Cdc28-Konsensusstelle nicht notwendig für diese Reaktion. Da der Austausch aller fünf Stellen aber zum Verlust der Autophosphorylierung führt, kann vermutet werden, dass die Stellen zwei, vier oder fünf dafür wichtig sind. Dafür spricht auch die Tatsache, dass das Cdc5m1/2 nicht mehr von Cdc5 phosphoryliert wird.

6.3 Cdc5 und Pds1

Das Securin Pds1 wird zu Beginn der Anaphase APC^{Cdc20}-abhängig degradiert. Dadurch wird die Separase Esp1 in die Lage versetzt, das Kohesin Scc1 zu spalten und so den Beginn der Anaphase einzuleiten (Nasmyth et al., 2000). Cdc5-Mutanten arretieren mit hohen Clb2-Mengen, wohingegen Pds1 in diesem Arrest bereits degradiert ist (Charles et al., 1998, Shirayama et al., 1998). Cdc5 scheint für die Degradation von Pds1 demnach nicht essentiell zu sein.

6.3.1 Cdc5 interagiert mit Pds1

Cdc5 und Pds1 interagieren im Two-Hybrid-System miteinander (pers. Mitteilung Christopher Hardy). Es wurde nun versucht, diese Beobachtung mit Hilfe einer Koimmunpräzipitation zu bestätigen. Hierzu wurden Stämme verwendet, die sowohl Cdc5 als auch Pds1 vom *GALI*-Promotor aus produzierten. Aus den Zellysaten wurden mittels α -Myc- bzw. α -HA-Antikörper und Protein A-Agarose Beads Cdc5 bzw. Pds1 gereinigt und im Western Blot überprüft, ob die beiden Proteine kopräzipitieren. Wie in Abb. 14 A zu sehen ist, kann im α -Myc-Präzipitat mit 12CA5 Pds1^{HA3} nachgewiesen werden (Spur 4), während in der Kontrolle (Spur 3) keine Pds1-Bande auftaucht. Diese Interaktion lässt sich allerdings unter den gewählten experimentellen Bedingungen nur sehr schwach detektieren. Deshalb wurde versucht, sie durch ein unabhängiges Experiment zu bestätigen. Hierzu wurde eine Affinitätspräzipitation mit an einer Matrix immobilisiertem MBP-Cdc5 durchgeführt (5.6.7). *E. coli* Stämme, die entweder nur MBP oder MBP-Cdc5 exprimierten, wurden angezogen, induziert, geerntet und aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit Amyloseresin inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde ein Hefelysat zu dem Amyloseresin gegeben, das Pds1^{HA3} enthielt. Abb. 14 B zeigt in der ersten Spur das in die Präzipitation eingesetzte Lysat. In den Spuren zwei und drei sieht man das Präzipitat mit MBP bzw. mit MBP-Cdc5. Die letzten beiden Spuren zeigen den Überstand nach der Präzipitation. Pds1 hat spezifisch an das mit MBP-Cdc5 beladene Amyloseresin gebunden, nicht aber an das, das nur mit MBP beladen war. Allerdings sind die Mengen des gebundenen Pds1 immer noch so

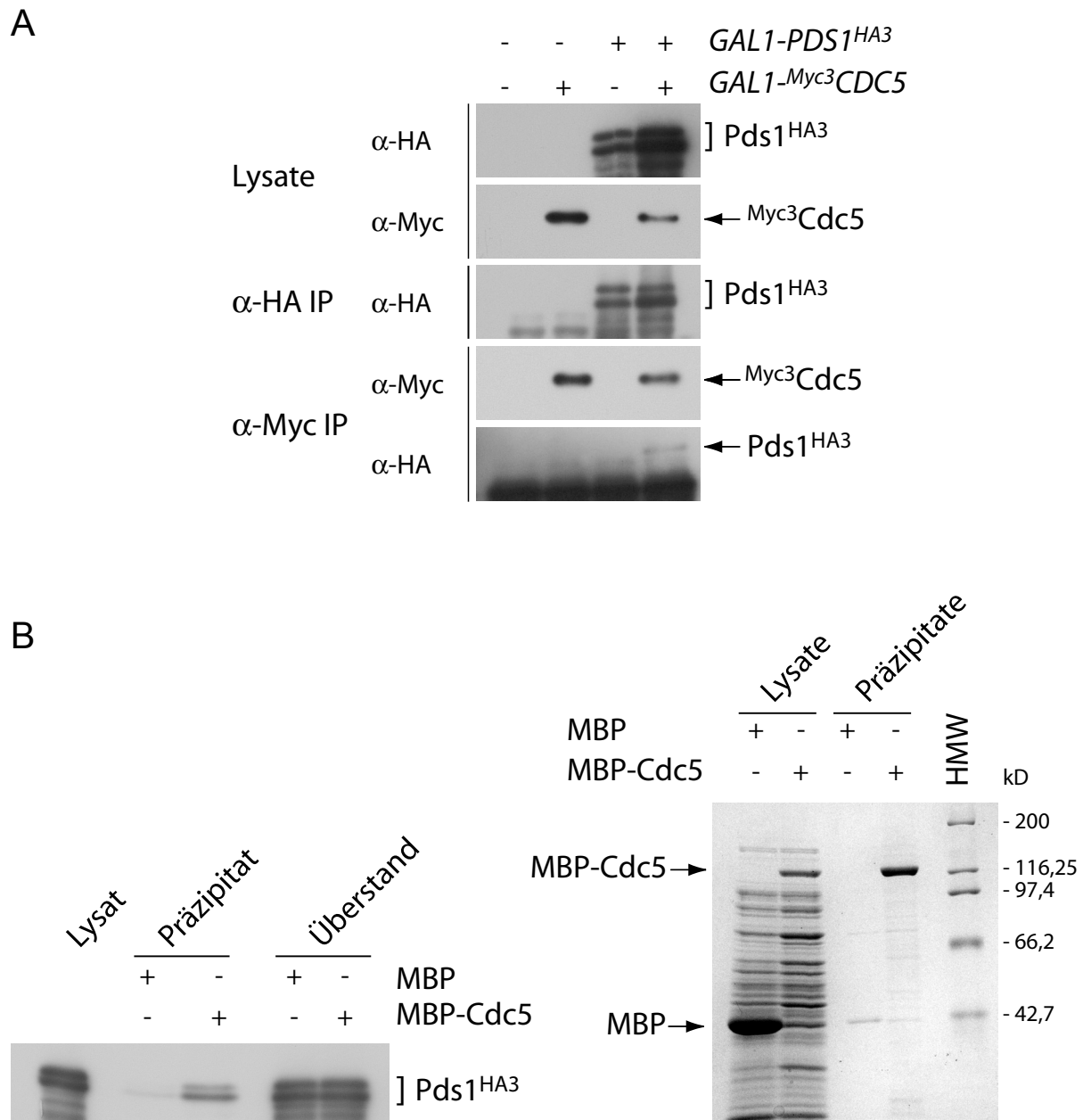


Abb. 14 Cdc5 interagiert mit Pds1. Um zu testen, ob Cdc5 mit Pds1 interagiert, wurde (A) eine Immunpräzipitation durchgeführt. In XYRaffinose wachsende Zellen der Stämme K699 (WT), W792 (*ura3::GAL1-PDS1^{HA3}-URA3*), W1660 (*cdc5::GAL1-Myc³CDC5-URA*) und W2020 (*ura3::GAL1-PDS1^{HA3}-URA3 cdc5::GAL1-MYC³CDC5-URA*) wurden für 2 h mit Galaktose induziert und anschließend geerntet. Aus den Proteinlysaten wurden mit 12CA5 (α -HA) bzw. 9E10 (α -Myc) und Protein A Agarose Pds1^{HA3} bzw. Myc³Cdc5 gereinigt. Proben der Lysate (Lysat) vor der Präzipitation und die Präzipitate (α -HA-IP oben und α -Myc-IP unten) bzw. die kopräzipitierten Proteine (α -Myc-IP α -HA) wurden mittels Western Blot untersucht. (B) eine Affinitätspräzipitation mit MBP-Cdc5 durchgeführt. Hierfür wurde MBP-Cdc5 oder MBP alleine aus entsprechenden *E. coli* Stämmen mit Hilfe von Amylose-Resin gereinigt. Das an das Amylose-Resin gebundene Cdc5 bzw. MBP wurde mit einem Lysat des Stammes W3125 (*leu2::GAL1-Pds1^{HA3}-LEU2 cdc16-1*) hergestellt aus galaktosebehandelten Zellen für 2h inkubiert, gewaschen und anschließend gekocht. Eventuell gebundenes Pds1^{HA3} wurde durch Western-Blot Analyse mit 12CA5 nachgewiesen. Das Coomassie-Gel zeigt die *E. coli* Lysate und die Mengen an eingesetztem MBP bzw. MBP-Cdc5. HMW: Größenstandard (high molecular weight).

gering, dass im Überstand keine Abnahme der Pds1-Menge festzustellen ist. Abb. 14B zeigt ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der *E. coli* Lysate bzw. des an die Matrix gebundenen Materials. Sowohl MBP als auch MBP-Cdc5 wurden exprimiert und haben auch an das Amyloseresin gebunden. MBP wird zwar in viel größeren Mengen produziert als MBP-Cdc5 trotzdem scheint weniger an die Matrix gebunden zu haben.

Sowohl die Koimmunpräzipitation als auch die Affinitätspräzipitation bestätigen, dass Cdc5 und Pds1 physikalisch miteinander interagieren.

6.3.2 Pds1 beeinflusst die Cdc5-Aktivität

Die Bedeutung der oben beschriebenen Interaktion zwischen Cdc5 und Pds1 ist unklar. Es wäre möglich, dass Pds1 die Cdc5-Aktivität beeinflusst. Ein Maß für die Cdc5-Aktivität ist die Degradation und Hyperphosphorylierung des Zyklins Clb2 nach Überexpression von *CDC5*. Weiterhin bewirkt die Überproduktion von Cdc5 in Nocodazol-arretierten Zellen einen Anstieg von Sic1. Es wurde nun getestet, ob die Überexpression von *CDC5* im *pds1Δ*-Hintergrund noch die gleichen Effekte hat wie in Wildtypzellen. In Abb. 15 ist zu erkennen, dass nach Überexpression von *CDC5* in der *pds1*-Deletionsmutante das Zyklin Clb2 in geringerem Maße hyperphosphoryliert wird. Allerdings wird es noch mit einer ähnlichen Kinetik degradiert wie im Wildtyp. Besonders auffällig ist, dass der Sic1-Anstieg sehr viel schwächer ausfällt. Das Fehlen von Pds1 scheint also zu bewirken, dass Cdc5 weniger aktiv ist. Dies ist besonders erstaunlich, da Cdc5 selbst stabilisiert ist. In Wildtypzellen induziert Cdc5 nach Überproduktion seine eigene Degradation, so dass die Proteinmenge typischerweise zuerst ansteigt, ein Maximum erreicht und dann wieder sinkt. In den *pds1Δ*-Zellen bleibt die Cdc5-Menge dagegen stabil.

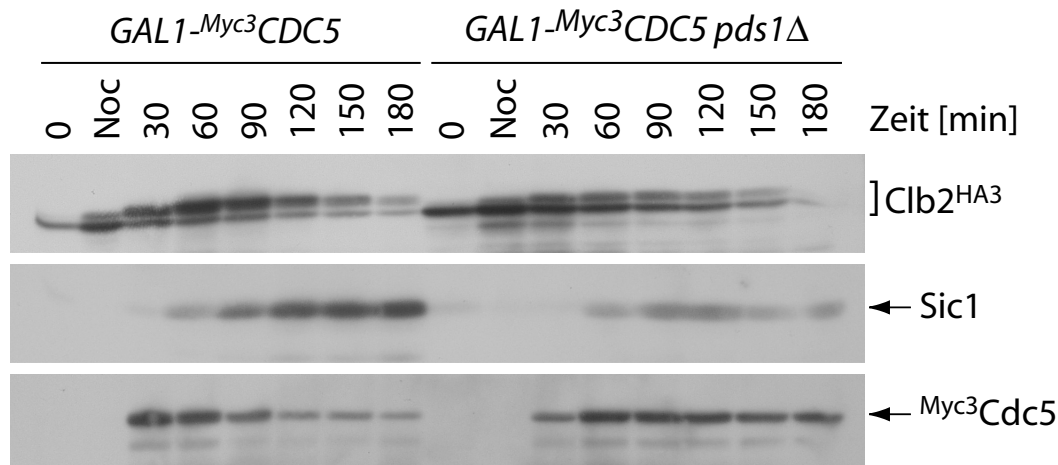


Abb. 15 Pds1 beeinflusst die Cdc5-Aktivität. Um zu testen, ob das Fehlen von Pds1 einen Einfluß auf die Cdc5-Aktivität hat, wurden in XYRaffinose-Medium wachsende Zellen der Stämme W1555 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3 CLB2^{HA3}*) und W1960 (*ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3 pds1-Δ1::HIS3 clb2::CLB2^{HA3}-TRP1*) mit Nocodazol arretiert und anschließend mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und für einen Western Blot aufgearbeitet. Clb2^{HA3} wurde mit 12CA5 nachgewiesen, Sic1 mit einem α -Sic1 Kaninchenserum. Die Menge an produziertem Cdc5 wurde durch Nachweis mit 9E10 überprüft.

6.3.3 Die Überexpression von *CDC5* bewirkt die Degradation von Pds1 in Nocodazol-arretierten Zellen

Die bisher beschriebenen Daten (Shirayama et al., 1998) deuten nicht darauf hin, dass Cdc5 an der Pds1-Degradation beteiligt ist. Bei dem Versuch, eine Koimmunpräzipitation zwischen Pds1 und Esp1 nach Überexpression von *CDC5* durchzuführen, stellte sich allerdings heraus, dass die Überexpression von *CDC5* eine Pds1-Abnahme im Lysat hervorrief (Daten nicht gezeigt). Dies war aber nur in Nocodazol-arretierten Zellen, nicht jedoch in asynchronen Zellen der Fall. Diese Beobachtung wurde in einem Experiment mit mehreren Zeitwerten genauer untersucht. Hierfür wurde ein Stamm verwendet, der vom endogenen Promotor Pds1 mit einem C-terminalen HA6-Epitop produzierte. *CDC5* wurde vom *GAL1*-Promotor exprimiert. Wachsende Zellen dieses Stammes wurden mit Nocodazol in der Metaphase arretiert und anschließend mit Galaktose induziert. Der Verlauf von Pds1^{HA6} wurde im Western Blot untersucht. Abb. 16 zeigt, dass die Menge von Pds1 ohne Überexpression von *CDC5* während des gesamten Experiments stabil bleibt. Mit Überexpression von *CDC5* hingegen nimmt die Pds1-Menge ca. 60 min nach Galaktoseinduktion ab, erreicht ihr Minimum nach 90 min und steigt dann wieder an (Abb. 16). Die Überexpression von *CDC5* in Nocodazol-arretierten Zellen bewirkt demnach eine transiente Abnahme von Pds1.

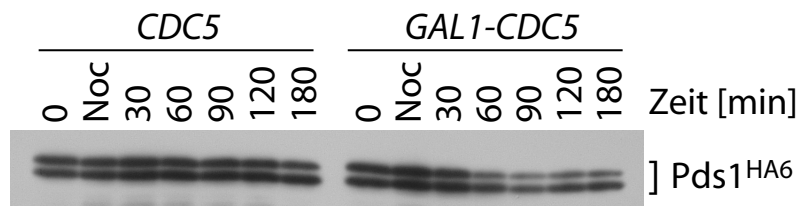


Abb. 16 Die Überexpression von *CDC5* führt zur Pds1-Degradation in Nocodazol-arretierten Zellen. Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5* auf die Stabilität von Pds1 in Nocodazol-arretierten Zellen zu testen, wurden in XYRaffinose wachsende Zellen des Stammes W3335 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3*) zuerst Nocodazol-arretiert und dann mit Galaktose behandelt. Die Behandlung des Stammes W3333 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3*) mit Galaktose diente als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot mit 12CA5 analysiert.

6.3.4 Die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation ist APC^{Cdc20}-abhängig

Die Cdc5-induzierte Clb2-Degradation ist Hct1-abhängig (Charles et al., 1998, Shirayama et al., 1998). Cdc5 wirkt über das MEN auf Cdc14 und letztendlich führt dies zu einer Aktivierung von Hct1. Pds1 wird aber bekanntermaßen schon zu Beginn der Anaphase Cdc20-abhängig degradiert. Es sollte nun getestet werden, ob die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation APC abhängig ist, und wenn ja, von welchem Spezifitätsfaktor des APC – Hct1 oder Cdc20 – sie vermittelt wird. Hierzu wurden Stämme verwendet, in denen entweder das *HCT1*-Gen deletiert war, oder die temperatursensitive Allele von *CDC20* bzw. von APC-Komponenten trugen. Die Zellen wurden vor Galaktose-Zugabe mit Nocodazol behandelt. Die temperatursensitiven Mutanten wurden außerdem vor der Galaktosezugabe für 30 min zu restriktiver Temperatur gebracht, um das *ts*-Allel zu inaktivieren. Abb. 17 zeigt den zeitlichen Verlauf der Pds1-

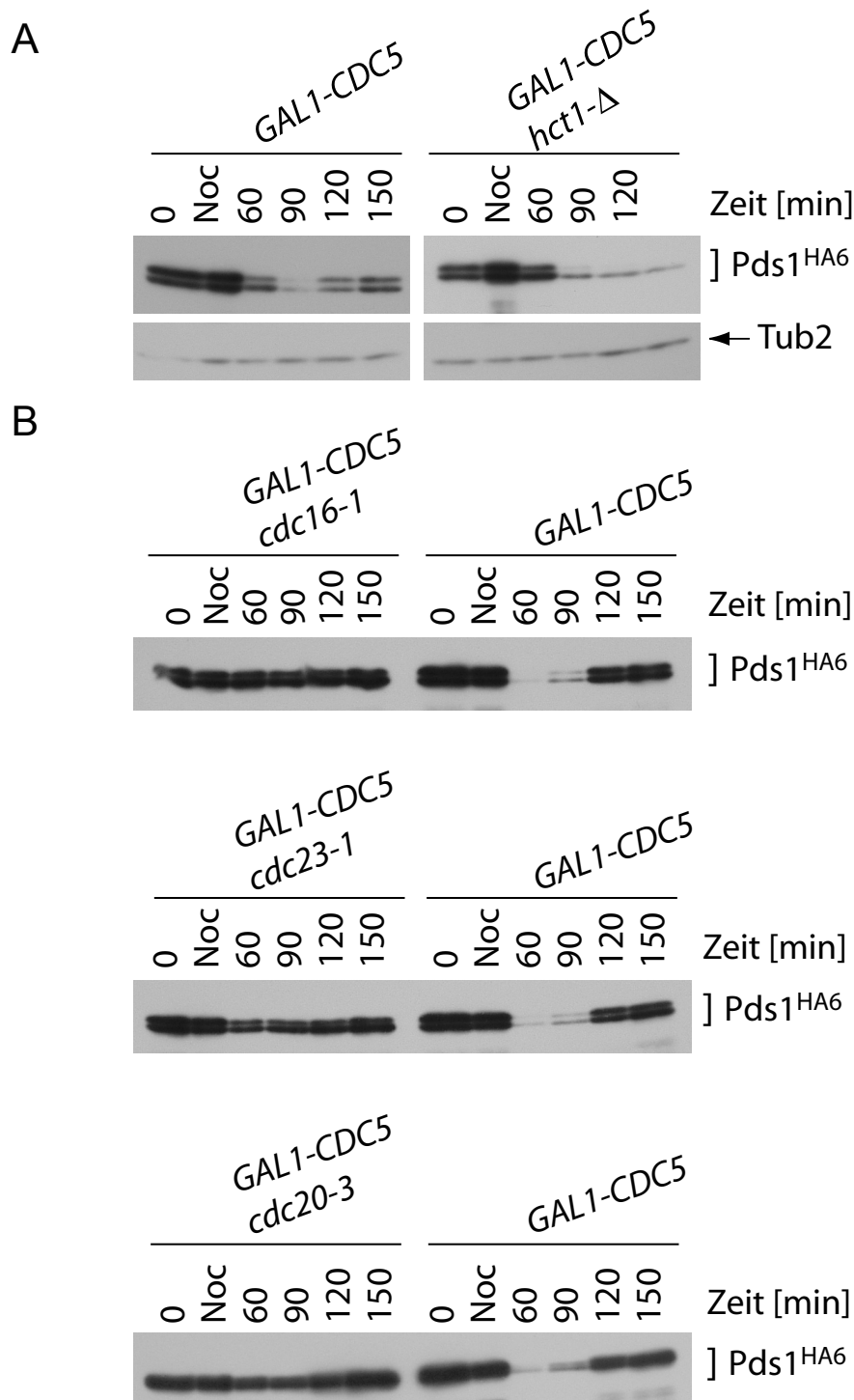


Abb. 17 Die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation ist APC^{Cdc20}-abhängig. Um die APC-Abhängigkeit der Cdc5-induzierten Pds1-Degradation zu untersuchen, wurden in XYRaffinose-Medium wachsende Zellen der Stämme (A) W3335 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3*) und W3530 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3 hct1-Δ1::LEU2*) mit Nocodazol arretiert und anschließend mit Galaktose induziert bzw. (B) der Stämme W3335, W3640 (*cdc16-1 pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3*), W3641 (*cdc23-1 pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3*) und W3642 (*cdc20-3 pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3*) für 30 min zu 37°C gebracht und dann mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und für einen Western Blot aufgearbeitet. Der Pds1-Nachweis erfolgte mit 12CA5, der Nachweis von Tubulin mit einem α-Tubulin-Antikörper aus Kaninchen.

Mengen in den verschiedenen Stämmen. In der *hct1*-Mutante folgt die Pds1-Degradation einer ähnlichen Kinetik wie im Wildtypstamm. Allerdings bleibt die Pds1-Menge bis zum Ende des Experiments niedrig und steigt nicht wieder an wie im Vergleichsstamm. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass Cdc5 in der *hct1*-Mutante selbst stabilisiert ist. Die Pds1-Degradation nach Überexpression von *CDC5* ist also nicht abhängig von Hct1. In der *cdc20-3*-Mutante kommt es hingegen zu einer deutlichen Stabilisierung von Pds1 verglichen mit der Wildtypsituation. Dies ist ebenso der Fall in der *cdc16-1*- und der *cdc23-1*-Mutante. Daß die Pds1-Degradation in der *cdc23-1* und der *cdc20-3*-Mutante nicht komplett verhindert wird, könnte daran liegen, dass die entsprechenden Allele unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht vollständig inaktiv sind. Es kann festgehalten werden, dass die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation in Nocodazol-arretierten Zellen APC^{Hct1}-unabhängig aber APC^{Cdc20}-abhängig ist.

6.3.5 Die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation ist abhängig von Cdc5-Kinaseaktivität

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *CDC5* in Nocodazol-arretierten Zellen zu einer APC^{Cdc20}-abhängigen Pds1-Degradation führt. Die Frage ist nun, ob hierfür eine aktive Cdc5-Kinase benötigt wird. Dazu wurde ein Stamm hergestellt, der eine kinase-negative Variante von *CDC5* – *CDC5^{K110M}* – unter Kontrolle des *GAL1*-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden mit Nocodazol arretiert und anschließend mit Galaktose behandelt. Die Menge von Pds1 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der *CDC5*-Induktion mittels Westernblot untersucht. In Abb. 18 kann man erkennen, dass durch die Überexpression von *CDC5^{K110M}* keine Pds1-Degradation induziert werden kann. Die Pds1-Menge ist während des gesamten Experiments stabil. Für den in Abb. 17 beschriebenen Effekt wird also aktives Cdc5 benötigt.

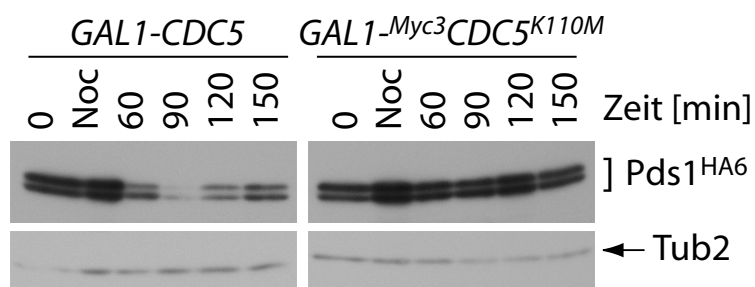
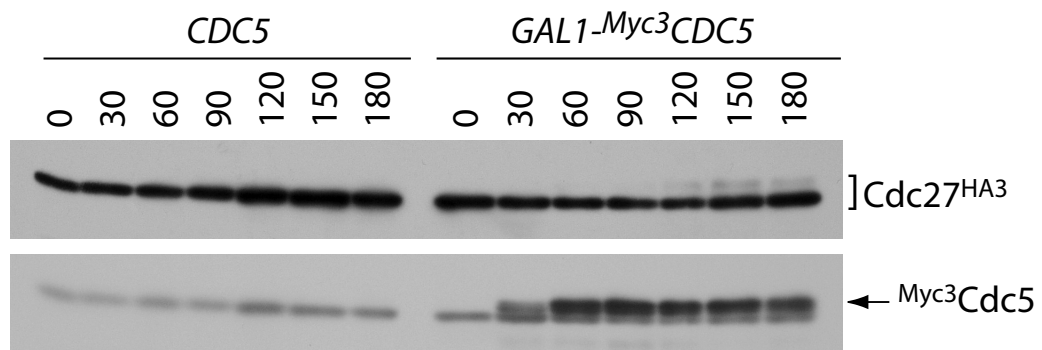


Abb. 18 Die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation ist abhängig von aktiver Cdc5-Kinase. Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5^{K110M}* auf die Stabilität von Pds1 in Nocodazol-arretierten Zellen zu überprüfen, wurden in XYRaffinose wachsende Zellen des Stammes W3532 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-Myc3CDC5^{K110M}-URA3*) zuerst Nocodazol-arretiert und dann mit Galaktose behandelt. Der Stamme W3335 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3*) diente als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot mit 12CA5 analysiert. Als Ladekontrolle wurde Tubulin mit einem α -Tubulin-Antikörper aus Kaninchen nachgewiesen.

6.3.6 Cdc5 phosphoryliert die APC-Komponente Cdc27

Plk1, das humane Ortholog von Cdc5, phosphoryliert die APC-Komponenten Cdc27, Cdc16 sowie Tsg24. Dadurch wird die *in vitro* Ubiquitinierungsaktivität des APC stark erhöht (Kotani et al., 1998). Es wurde nun untersucht, ob Cdc5 in Hefe auch Komponenten des APC phosphoryliert. Hierzu wurden Stämme verwendet, die HA3-markierte Versionen von Cdc16, Cdc23 und Cdc27 vom endogenen Promotor produzierten und zusätzlich *CDC5* vom *GAL1*-Promotor aus überexprimierten. Asynchron wachsende Zellen wurden mit Galaktose behandelt und das Laufverhalten der APC-Untereinheiten wurde im Western Blot analysiert.

A



B

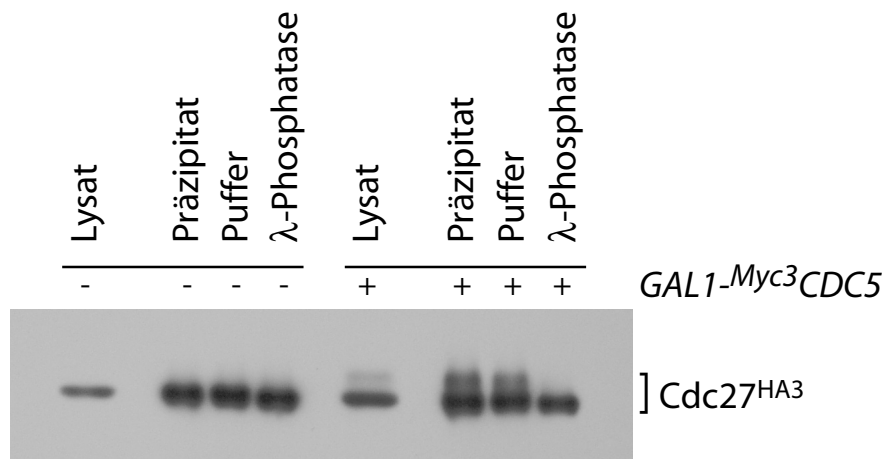


Abb. 19 Cdc5 phosphoryliert die APC-Komponente Cdc27. (A) Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5* auf Cdc27 zu testen, wurden in XYRaffinose wachsende Zellen des Stammes W2026 (*cdc27::CDC27^{HA3}-TRP1 ura3::GAL1-Myc³CDC5-URA3*) mit Galaktose behandelt. Die Behandlung des Stammes W1998 (*cdc27::CDC27^{HA3}-TRP1*) mit Galaktose diente als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot mit 12CA5 und 9E10 analysiert. (B) Um die Art der Modifikation von Cdc27 nach Überexpression von *CDC5* zu untersuchen, wurde Cdc27^{HA3} aus Lysaten von Zellen des Stammes W2026, die für 3 h mit Galaktose behandelt worden waren, mittels 12CA5-Antikörpern und Protein A-Agarose-Beads präzipitiert und entweder mit Phosphatasepuffer alleine oder mit Puffer und λ-Phosphatase inkubiert. Als Kontrolle diente der Stamm W1998. Das Laufverhalten von Cdc27^{HA3} nach dieser Behandlung wurde mittels Western Blot mit 12CA5 analysiert.

Die Überexpression von *CDC5* hatte keinen Effekt auf das Laufverhalten von Cdc16 und Cdc23 (Daten nicht gezeigt), wohingegen bei Cdc27 das Auftauchen einer zusätzlichen Bande zu beobachten ist. Diese läuft langsamer als die asynchrone Form von Cdc27 und tritt ca. 2 h nach Induktion des *GALI*-Promotors auf. Im unteren Teil der Abb. 19 sieht man die Menge an produziertem Cdc5. Um zu überprüfen, ob es sich bei der langsamer laufenden Form von Cdc27 tatsächlich um eine phosphorylierte Spezies handelt, wurde ein λ -Phosphataseassay durchgeführt. Sowohl der Stamm, der *CDC5* überexprimierte als auch der Stamm, der nur epitopmarkiertes Cdc27 produzierte wurden mit Galaktose behandelt. Das HA-markierte Cdc27 wurde mit 12CA5-Antikörper und Protein A-Agarose Beads gereinigt und anschließend mit Phosphatase oder nur mit dem entsprechenden Puffer behandelt. Wie in Abb. 19 deutlich zu erkennen ist, verschwindet die langsamer laufende Form von Cdc27, die nach *CDC5*-Überexpression auftritt, nach Behandlung mit Phosphatase, aber nicht nach Behandlung mit Puffer alleine. Es handelt sich dabei also eindeutig um eine phosphorylierte Form. Cdc5 ist demnach wie sein Ortholog Plk in der Lage, die Phosphorylierung einer APC-Komponente zu bewirken. Da die Phosphorylierung von APC durch Plk aktivierend auf die APC-Aktivität wirkt, kann spekuliert werden, dass auch Cdc5 den APC durch Phosphorylierung aktivieren kann. Eine solche direkte Aktivierung des APC könnte eine Erklärung sein für die Cdc5-induzierte Pds1-Degradation, die weiter oben beschrieben wurde.

6.4 Cdc5 und Lte1

Cdc5 und Lte1 sind beide Komponenten des Signalnetzwerkes, das am Ende der Mitose die Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase gewährleistet. Lte1 ist das vermutete GEF (guanine nucleotide exchange factor) für das G-Protein Tem1, das bedeutet, es katalysiert den Austausch von an Tem1 gebundenem GDP zu GTP und aktiviert somit das G-Protein (Shirayama et al., 1994). Lte1 lokalisiert während des größten Teils des Zellzyklus am Kortex der Knospe. Erst wenn der Kern in der Anaphase in die Tochterzelle einwandert, delokalisiert Lte1 im Zytoplasma der Knospe und trifft auf Tem1, das am Spindelpolkkörper sitzt. Auf diese Weise ist Lte1 Teil des Spindelposititonskontrollsystems (Pereira et al., 2001). Lte1 ist ein Phosphoprotein und es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass Cdc5 möglicherweise an der Phosphorylierung von Lte1 beteiligt ist (Lee et al., 2001).

6.4.1 Cdc5 interagiert mit Lte1

Cdc5 lokalisiert an den Spindelpolkörpern (Song et al., 2000) und wird dort vermutlich über Spc72 verankert (Ho et al., 2002), das sich auf der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers befindet. Es ist also durchaus denkbar, dass Cdc5 und Lte1 miteinander interagieren, wenn einer der beiden Spindelpolkörper in die Tochterzelle einwandert. Um diese Vermutung zu testen, wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurden beide Proteine vom *GALI*-Promotor aus produziert, wobei Cdc5 mit einem N-terminalen Myc3-Epitop versehen war und Lte1 mit einem N-terminalen HA3-Epitop. Abb. 20 zeigt die Lysate vor der Präzipitation und die Präzipitate mit α -Myc- bzw. α -HA-Antikörpern. Sowohl Lte1 als auch Cdc5 ließen sich

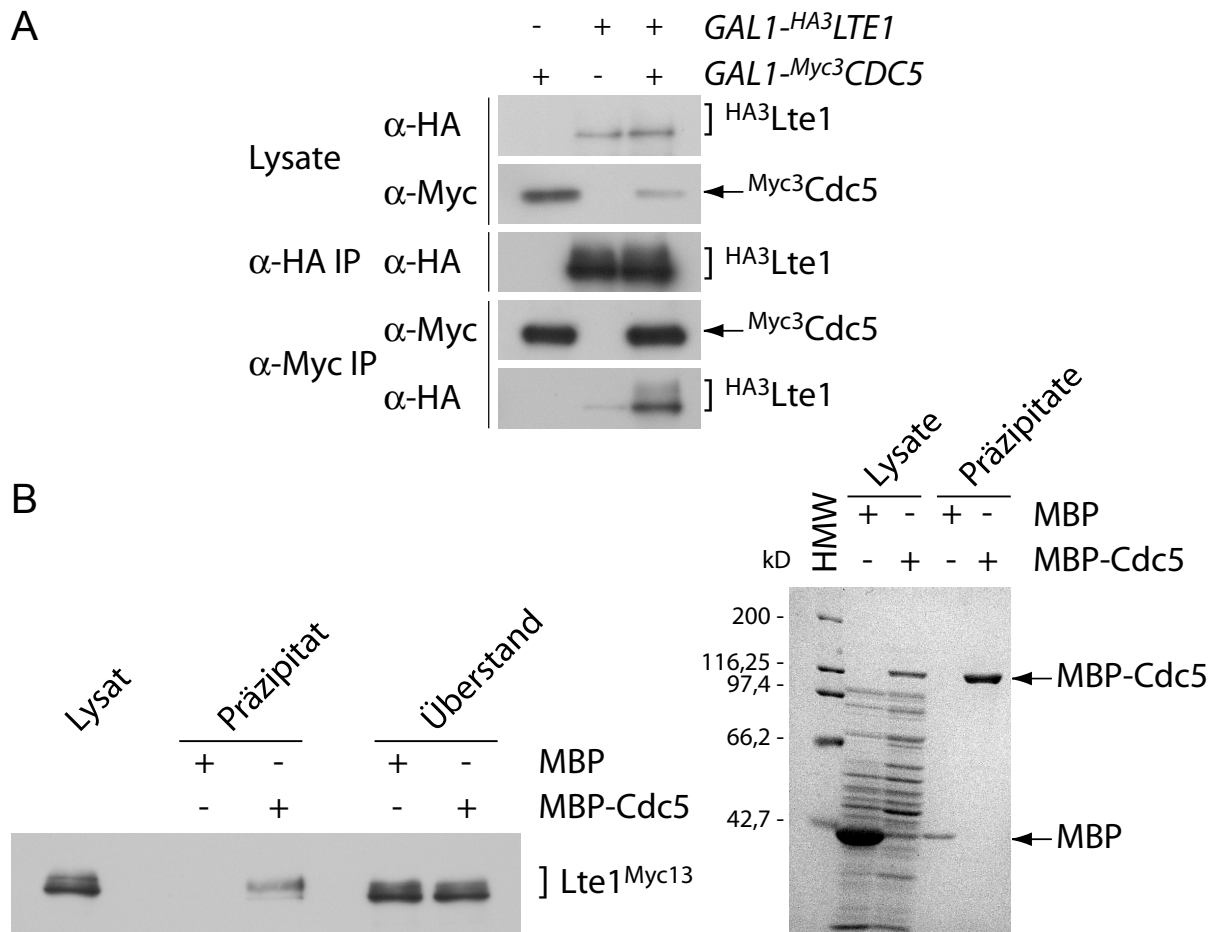


Abb. 20 Cdc5 interagiert mit Lte1. Um zu testen ob Cdc5 mit Lte1 interagiert, wurde (A) eine Immunpräzipitation durchgeführt. In XYRaffinose wachsende Zellen der Stämme W1715 (*ura3::GAL1-Myc³CDC5-URA3*), W2730 (*lte1::GAL1-HA³LTE1-HIS5s.p.*) und W3897 (*lte1::GAL1-HA³LTE1-HIS5 S.p. ura3::GAL1-Myc³CDC5-URA3*) wurden für 90 min mit Galaktose induziert und anschließend geerntet. Aus den Proteinlysaten wurden mit 12CA5 (α -HA) bzw. 9E10 (α -Myc) und Protein A Agarose HA³Lte1 bzw. Myc³Cdc5 gereinigt. Proben der Lysate (Lysat) vor der Präzipitation und die Präzipitate (α -HA-IP oben und α -Myc-IP unten) bzw. die kopräzipitierten Proteine (α -Myc-IP α -HA) wurden mittels Western Blot untersucht. (B) Affinitätspräzipitation mit MBP-Cdc5. Hierfür wurde MBP-Cdc5 oder MBP alleine aus entsprechenden *E. coli* Stämmen mit Hilfe von Amylose-Resin gereinigt. Das an das Amylose-Resin gebundene Cdc5 bzw. MBP wurde mit einem Lysat des Stammes W3139 (*lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. cdc5::CDC5^{HA3}-URA3 pep4- Δ ::URA3*) für 2h inkubiert, gewaschen und anschließend gekocht. Eventuell gebundenes Lte1^{Myc13} wurde durch Western-Blot Analyse mit 9E10 nachgewiesen. Das Coomassie-Gel zeigt die *E. coli* Lysate und die Mengen an eingesetztem MBP bzw. MBP-Cdc5. HMW: Größenstandard (high molecular weight).

präzipitieren. In dem α -Myc-Präzipitat, das mit 12CA5 entwickelt wurde, ließ sich außerdem Lte1 nachweisen (Spur 3). In dem Kontrollstamm, der nur HA-markiertes Lte1 enthielt, ist nur eine sehr schwache Bande zu erkennen (Spur 2). Lte1 kopräzipitiert unter den gewählten experimentellen Bedingungen folglich mit Cdc5. Das kopräzipitierende Lte1 zeigt wie auch im Lysat ein heterogenes Laufverhalten, was auf eine posttranslationale Modifikation schließen lässt.

Die Cdc5-Lte1-Interaktion sollte zusätzlich durch eine unabhängige Herangehensweise

überprüft werden. Hierfür wurde MBP-Cdc5 in *E. coli* produziert und an Amyloseresin immobilisiert. Diese Cdc5-Matrix wurde dann mit dem Lysat eines Hefestammes inkubiert, der Lte1 vom endogenen Promotor mit einem C-terminalen Myc13-Epitop exprimiert. Als Kontrolle wurde Amyloseresin verwendet, das nur mit MBP beladen worden ist. In Abb. 20 erkennt man, dass an das mit MBP-Cdc5 beladene Amyloseresin Lte1 gebunden hat (Spur3). Es scheint sogar so, dass hauptsächlich die modifizierte Form von Lte1 mit Cdc5 interagiert. Das Coomassiegele zeigt die *E. coli* Lysate vor und nach der Fällung mit Amyloseresin.

6.4.2 Lte1 ist ein Phosphoprotein

Bei der Affinitätspräzipitation von Lte1^{Myc13} mit MBP-Cdc5 scheint vor allem eine modifizierte Form von Lte1 mit Cdc5 zu interagieren. Im Weiteren wurde die Modifikation von Lte1 näher untersucht. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Lte1 phosphoryliert wird, allerdings wurde hier Lte1 mit einem C-terminalen HA3-Epitop verwendet (Bardin et al., 2000, Lee et al., 2001). Um die posttranslationale Modifikation von Lte1 als Phosphorylierung zu bestätigen, wurde ein λ -Phosphataseassay durchgeführt. Abb. 21 zeigt das Lysat vor der Präzipitation, das unbehandelte Präzipitat und das Präzipitat nach Behandlung mit Phosphatase. Nach Phosphatase-Behandlung läuft Lte1 in einer distinkten Bande, die langsamer laufenden Formen sind verschwunden. Bei der beobachteten Modifikation von Lte1 handelt es sich also eindeutig um Phosphorylierung.

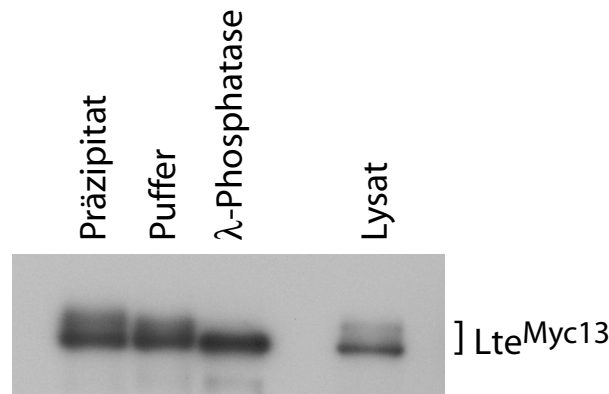


Abb. 21 Lte1 ist ein Phosphoprotein. Um die Art der Modifikation von Lte1 zu untersuchen, wurde Lte1^{Myc13} aus Lysaten von asynchron wachsenden Zellen des Stammes W3142 (*lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. bar1-Δ2::LEU2*) mittels 9E10-Antikörpern und ProteinA-Agarose-Beads präzipitiert und entweder mit Phosphatasepuffer alleine oder mit Puffer und λ -Phosphatase inkubiert. Das Laufverhalten von Lte1^{Myc13} nach dieser Behandlung wurde mittels Western Blot mit 9E10 analysiert.

6.4.3 Die Phosphorylierung von Lte1 ist zellzyklusabhängig reguliert

Cdc5 und Lte1 interagieren physikalisch miteinander. Nun sollte die Möglichkeit einer Phosphorylierung von Lte1 durch Cdc5 untersucht werden. Um diese Frage anzugehen, wurde zuerst ein Synchronexperiment mit Lte1^{Myc13} produzierenden Zellen durchgeführt. Asynchron wachsende Zellen des entsprechenden Stammes wurden mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase des Zellteilungszyklus arretiert und durch Umsetzen in Medium ohne α -Faktor

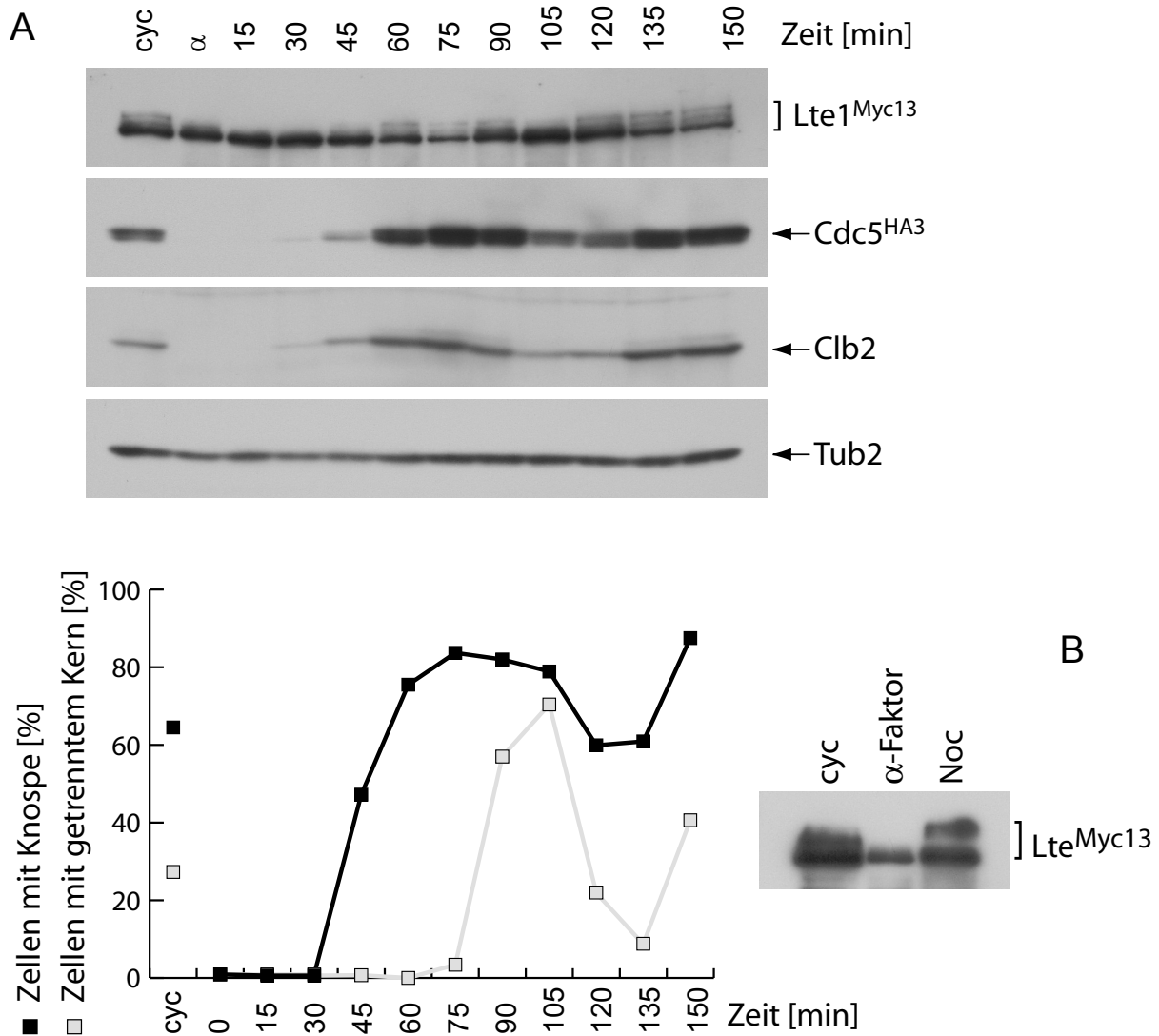


Abb. 22 Die Phosphorylierung von Lte1 ist zellzyklusabhängig. (A) Um die Phosphorylierung von Lte1 im Verlauf des Zellteilungszyklus zu untersuchen, wurde der Stamm W3144 (*lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. cdc5::CDC5^{HA3} -URA3 bar1-Δ2::LEU2 pep4-Δ::URA3*) mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurden die Zellen in frisches Medium ohne α -Faktor entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für einen Western Blot entnommen bzw. Zellen für die morphologische Auswertung mit Ethanol fixiert. Lte1^{Myc13} wurde mit dem Myc-spezifischen Antikörper 9E10 nachgewiesen. Cdc5^{HA3} wurde mit 12CA5 nachgewiesen. Als Vergleich diente das Zyklin Clb2, das mit einem α -Clb2 Serum aus Kaninchen nachgewiesen wurde. Als Ladekontrolle wurde der Blot mit einem α -Tubulin Serum aus Kaninchen entwickelt. Zur Bestimmung des Zellteilungsstadiums wurde der Knospungsindex der ethanolfixierten Zellen nach DAPI-Färbung bestimmt. (B) Phosphorylierung von Lte1 in α -Faktor- bzw. Nocodazol-arretierten Zellen. Zellen des Stammes W3142 wurden vor bzw. nach der Behandlung mit α -Faktor oder Nocodazol (Noc) geerntet. Der Phosphorylierungsgrad von Lte1^{Myc13} wurde mittels Western Blot Analyse mit 9E10 bestimmt.

synchron in den nächsten Teilungszyklus entlassen. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben genommen und im Western Blot untersucht bzw. der Knospungsindex durch mikroskopische Auswertung bestimmt. Abb. 22 zeigt in der oberen Reihe Lte1. Lte1 ist während des gesamten Zellzyklus vorhanden. In G1-Zellen ist es unmodifiziert. Erst 60 min nach dem Entlassen

der Zellen aus dem G1-Arrest tritt die zuvor bereits beschriebene Modifikation auf. Zu diesem Zeitpunkt haben fast alle Zellen eine Knospe gebildet, ihren Kern jedoch noch nicht getrennt. Die Phosphorylierung bleibt bestehen bis 90 min nach Entlassen aus dem Arrest. Dies entspricht einem Zeitpunkt, zu dem schon der Großteil der Zellen ihren Kern getrennt hat, sich also in der Anaphase befindet. Nach 105 min verschwindet die Phosphorylierung wieder. Parallel dazu erreicht die Zahl der Zellen mit getrennten Zellkernen ihr Maximum, die Zellen befinden sich am Austritt aus der Mitose. Lte1 ist also unmodifiziert in der G1-Phase, wird in der S-Phase phosphoryliert, bleibt während der G2/M-Phase phosphoryliert und wird am Ende der Mitose wieder dephosphoryliert. Das zeitliche Muster der Phosphorylierung von Lte1 korreliert mit dem Auftreten von Cdc5. Dies ist konsistent mit der Annahme, dass Lte1 ein Substrat für Cdc5 ist. Berücksichtigt man allerdings die Tatsache, dass beide Proteine in der Zelle unterschiedlich lokalisieren und dass Cdc5 wohl erst mit dem Kern bzw. dem Spindelpol in die Tochterzelle einwandert, ist die Lte1-Phosphorylierung zeitlich zu früh, um von Cdc5 verursacht zu werden.

Um dieses Muster noch einmal zu verifizieren, wurden asynchrone Zellen mit α -Faktor-arretierten und mit Nocodazol-arretierten Zellen verglichen. In G1-Zellen ist Lte1 unphosphoryliert. In Nocodazol-behandelten Zellen, die in der Metaphase arretieren, ist Lte1 hingegen hyperphosphoryliert (Abb. 22). Auch dies widerspricht einer Phosphorylierung von Lte1 durch Cdc5, da in Nocodazol-arretierten Zellen das Spindelkontrollsystem aktiv ist, die Zellen in der Metaphase arretieren und der Kern somit auch nicht in die Tochterzelle gelangt.

6.4.4 Die Phosphorylierung von Lte1 ist unabhängig von Cdc5

Eine Möglichkeit zu testen, ob Cdc5 die Kinase von Lte1 ist, besteht darin, den Phosphorylierungszustand von Lte1 in einer *cdc5*-Mutante zu untersuchen. Wildtypzellen und *cdc5-1*-Zellen, die Myc-markiertes Lte1 exprimierten, wurden zu 37°C gebracht und nach Erreichen des *cdc5*-Arrestes geerntet. Abb. 23 zeigt den Western Blot zu diesem Experiment. Sowohl im Wildtypstamm als auch in der Mutante ist in dem Lysat, das bei 37°C geerntet wurde, viel weniger Lte1 vorhanden als bei 26°C. Da dieses Phänomen in beiden Stämmen auftritt, kann es auf einen Effekt der erhöhten Temperatur auf das Zellysate zurückgeführt werden. Was das Laufverhalten von Lte1 betrifft, ist kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *cdc5*-Mutante festzustellen. In beiden Stämmen ist Lte1 noch modifiziert. Die Tatsache, dass Lte1 in der verwendeten *ts*-Mutante von *CDC5* bei restriktiver Temperatur weiterhin phosphoryliert ist, widerspricht der Annahme, dass Cdc5 die Kinase für Lte1 ist. Es könnte allerdings sein, dass das verwendete *cdc5-1*-Allel in seiner Fähigkeit, Lte1 zu phosphorylieren, nicht defekt ist, sondern nur in anderen Aspekten der Cdc5-Aktivität. Deshalb wurde ein Stamm hergestellt, in dem *CDC5* deletiert ist und der gerettet wird durch die Expression von *CDC5* vom *GALL*-Promotor. Ein solcher Stamm lebt in Medium mit Galaktose, arretiert aber in Medium mit Glucose, da hier der Promotor reprimiert ist. In Glucose-Medium kann man folglich den Phänotyp einer *cdc5*-Deletionsmutante beobachten. Die Zellen wurden in XYRaffinose/Galaktose-Medium angezogen, geerntet und dann in frisches Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle umgesetzt.

Der Arrest wurde mikroskopisch überprüft und die Zellen wiederum geerntet. Auch im Fall einer *cdc5*-Deletionsmutante ist Lte1 im Arrest weiterhin phosphoryliert (Abb. 23). Da dieser Stamm einen kompletten Funktionsverlust von *CDC5* aufweist, kann ausgeschlossen werden, dass Cdc5 die Phosphorylierung von Lte1 hervorruft, die sich im Western Blot als langsamer laufende Banden manifestiert.

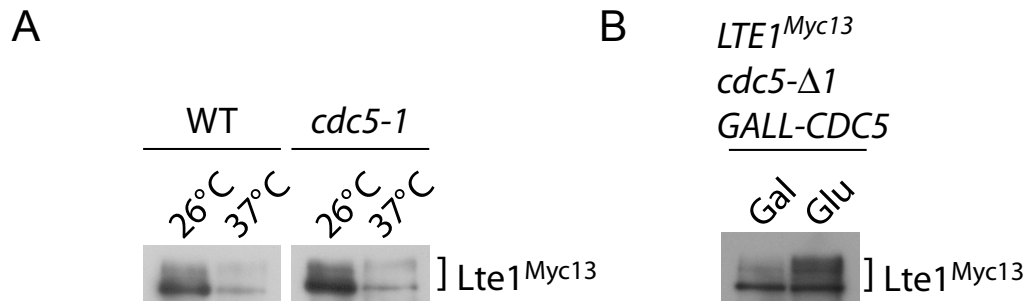


Abb. 23 Die Lte1-Phosphorylierung ist unabhängig von Cdc5. Um zu testen, ob Cdc5 die Kinase für Lte1 ist, wurden exponentiell wachsende (A) Wildtypzellen (W3142 (*lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. bar1-Δ2::LEU2*)) und *cdc5-1*-Zellen (W3193 (*lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. cdc5-1 bar1-Δ2::LEU2*)) geerntet und dann zu 37°C gebracht. Der Arrest wurde nach ca. 3 h mikroskopisch überprüft, die Zellen geerntet und für eine Western Blotanalyse aufgearbeitet. Lte1 wurde mit 9E10 nachgewiesen. (B) Der Stamm W3252 (*lte1::LTE1^{Myc13}-HIS5 S.p. cdc5-Δ1::HIS5 s.p. ura3::GALL-CDC5-URA3 bar1-Δ2::LEU2*), in dem *CDC5* deletiert und durch das *HIS5*-Gen aus *S. pombe* ersetzt ist, wurde über Nacht in Vollmedium mit je 2% Raffinose und Galaktose angezogen. Zellen wurden geerntet und der Rest der Zellen wurde abzentrifugiert und in neuem Medium mit 2% Glucose aufgenommen. Nach 3,5 h wurde der Arrest mikroskopisch überprüft und die Zellen für einen Western Blot geerntet.

6.5 Cdc5 und Hct1

Cdc5 zeigt im Verlauf des Zellteilungszyklus das gleiche Verhalten wie Clb2: in der G1-Phase ist es nicht vorhanden, es entsteht in der S-Phase und verschwindet beim Austritt aus der Mitose (Charles et al., 1998, Abb. 4). Die Degradation von Cdc5 ist wie die von Clb2 abhängig von APC^{Hct1}, wobei zwei „destruction box“ Motive im N-Terminus des Proteins benötigt werden (Charles et al., 1998, Shirayama et al., 1998).

6.5.1 Cdc5 interagiert „destruction-box“ unabhängig mit Hct1

Die Degradation von Cdc5 ist abhängig von *HCT1*. Es galt nun die Frage zu beantworten, ob dieser Sachverhalt auch in einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen reflektiert wird. Für Koimmunpräzipitationen wurden Stämme verwendet, die sowohl *HCT1* als auch *CDC5* vom galaktoseinduzierbaren *GALI*-Promotor überexprimierten. Damit die Überexpression von *HCT1* keine Cdc5-Degradation induzierte, wurden *cdc23-1*-Mutanten verwendet, die auch bei Raumtemperatur schon eine stark eingeschränkte APC-Aktivität aufweisen. In dem vorliegenden Experiment wurde die Interaktion zwischen Hct1 und Cdc5 verglichen mit der zwischen Hct1 und Cdc5ΔN70, einer verkürzten Form von Cdc5, der die N-terminalen „destruction box“ Motive fehlen. Außerdem wurde die Interaktion von Cdc5 mit Hct1+0, einer Variante von Hct1, in der alle elf Cdc28-Konsensusstellen mutiert sind, untersucht. Dieses Protein bindet dadurch konstitutiv an den APC (Zachariae et al., 1998).

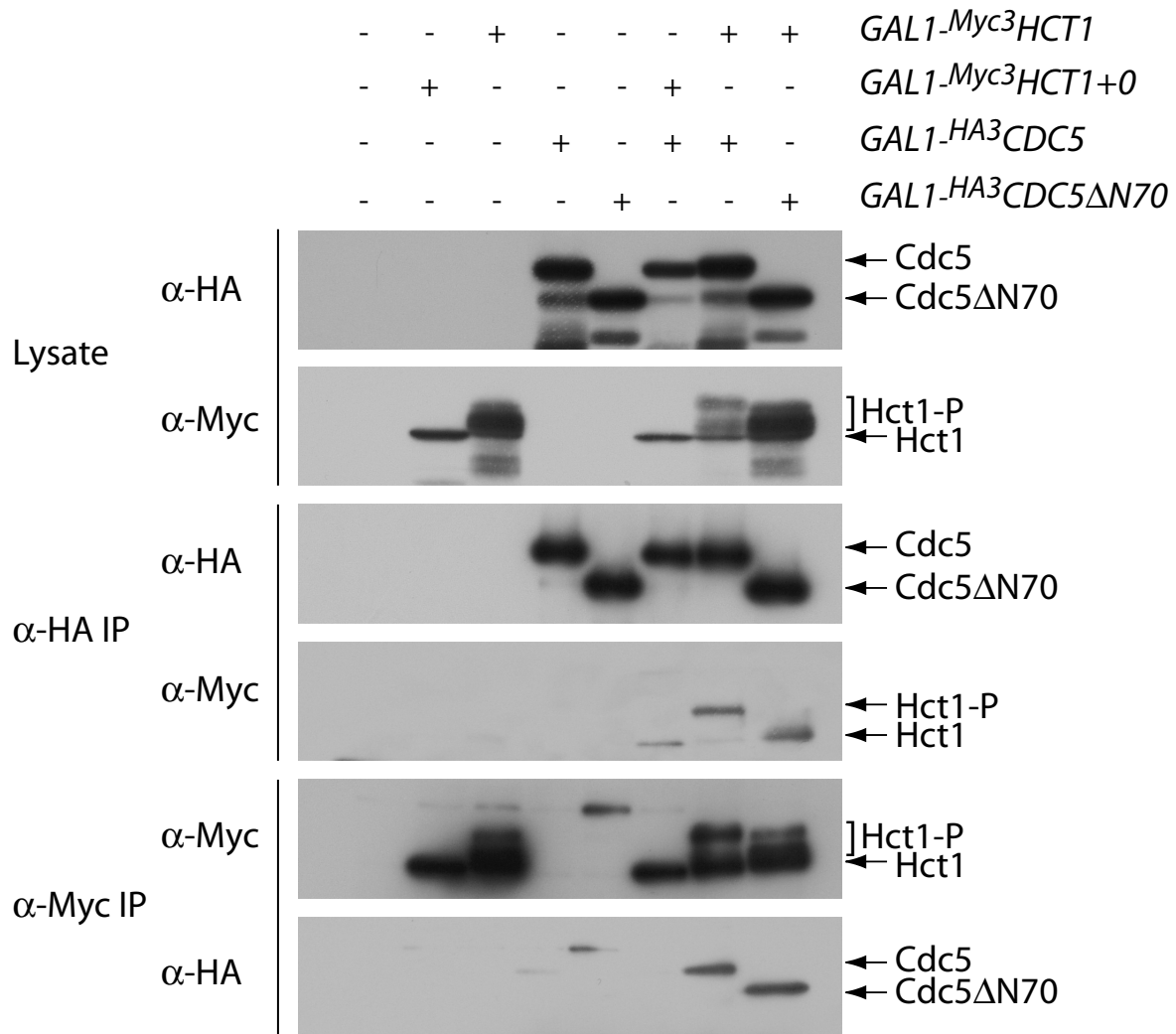


Abb. 24 Interaktionen zwischen Hct1 und Cdc5. Hct1 interagiert mit Cdc5 unabhängig von dessen „destruction-box“ Motiv und unabhängig davon, ob Hct1 selbst noch durch Cdc28-Kinase phosphoryliert werden kann. *cdc23-1* Stämme mit *GAL1-Myc³HCT1* bzw. *GAL1-Myc³HCT1+0* mit oder ohne *GAL1-HA³CDC5* bzw. *GAL1-HA³CDC5ΔN70* wurden bei 25°C in Vollmedium mit Raffinose angezogen und für 2 h mit 2% Galaktose induziert. Aus den Proteinlysaten wurden mit 12CA5 (α-HA) bzw. 9E10 (α-Myc) und Protein A Agarose ^{HA3}Cdc5 bzw. bzw. ^{HA3}Cdc5ΔN70 oder ^{Myc3}Hct1 bzw. ^{Myc3}Hct1+0 gereinigt. Proben der Lysate (Lysat) vor der Präzipitation und die Präzipitate (α-HA-IP oben und α-Myc-IP unten) bzw. die kopräzipitierten Proteine (α-HA-IP α-Myc, α-Myc-IP α-HA) wurden mittels Western Blot untersucht. Spur1: W1500 (*cdc23-1*), Spur2: W1739 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc³HCT1+0-TRP1*), Spur3: W1502 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc³HCT1-TRP1*), Spur4: W1619 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA³CDC5-URA3*), Spur5: W1930 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA³CDC5ΔN70-URA3*), Spur6: W1757 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc³HCT1+0-TRP1 ura3::GAL1-HA³CDC5-URA3*), Spur7: W1621 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc³HCT1-TRP1 ura3::GAL1-HA³CDC5-URA3*) und Spur8: W1931 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc³HCT1-TRP1 ura3::GAL1-HA³CDC5ΔN70-URA3*).

Der obere Teil der Abb. 24 zeigt Hefelysate vor der Präzipitation. Cdc5 und Cdc5ΔN70 werden in vergleichbaren Mengen produziert, Cdc5ΔN70 läuft aufgrund seiner geringeren Größe in der SDS-PAGE schneller. Die Überexpression von *HCT1* hat keinen Einfluß auf das Laufverhalten oder die Menge von Cdc5 (Abb. 24, 1. Reihe). Hct1 und Hct1+0 unterscheiden sich stark in ihrem Laufverhalten. Während das nicht mehr durch Cdc28-Kinase phosphorylierbare Hct1+0

in einer Bande läuft, zeigt Hct1 ein stark heterogenes Laufverhalten (2. Reihe, vgl. Spur 2+3). Durch die Überexpression von *CDC5*, nicht jedoch durch die von *CDC5ΔN70*, zeigt Hct1 noch eine zusätzliche Verschiebung der Banden in den höhermolekularen Bereich (2. Reihe, vgl. Spur 7+8), was auf eine zusätzliche Modifizierung von Hct1 durch Cdc5 schließen lässt. In Reihe 3 sieht man das präzipitierte Cdc5. In allen Stämmen, in denen es produziert wird, konnte es in vergleichbaren Mengen präzipitiert werden. Reihe 4 zeigt das mit Cdc5 kopräzipitierende Hct1. Sowohl Hct1+0 (Spur 6), als auch Hct1 (Spur 7) lassen sich mit Cdc5 kopräzipitieren. Auffällig ist, dass im Falle des Wildtypproteins nur die oberste Bande von Hct1 mit Cdc5 interagiert. Diese Bande tritt speziell auch nur nach Überexpression von *CDC5* auf. Obwohl die Überexpression von *CDC5ΔN70* diesen Hypershift von Hct1 nicht hervorruft, interagieren die beiden Proteine dennoch. Mit der verkürzten Form von Cdc5 interagiert allerdings hauptsächlich unphosphoryliertes Hct1 (Spur 8). In der 6. Reihe sind die Hct1-Präzipitate zu sehen. Es wird deutlich, dass sich alle Formen, die im Lysat vorhanden sind, auch präzipitieren lassen. Die 8. Reihe schließlich zeigt die Cdc5-Formen, die mit Hct1 koimmunpräzipitieren. Im Hct1-Präzipitat lassen sich mit 12CA5 sowohl Cdc5 (Spur 7) als auch Cdc5ΔN70 (Spur 8) nachweisen. Im Hct1+0-Präzipitat findet man kein Cdc5.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cdc5 sowohl mit Hct1, als auch mit Hct1+0 interagiert. Die Interaktion mit Hct1+0 ist allerdings schwächer und lässt sich in diesem Experiment nur nachweisen, wenn Cdc5 präzipitiert und Hct1 nachgewiesen wird. Weiterhin interagiert auch eine verkürzte Form von Cdc5 mit Hct1. Da dieser Variante die N-terminalen „destruction box“ Motive fehlen, bedeutet dies, dass die Interaktion von Hct1 und Cdc5 unabhängig ist von „destruction box“ Sequenzen in Cdc5. Weiterhin lässt sich festhalten, dass die Überexpression von *CDC5* zu einer Hyperphosphorylierung von Hct1 führt. Es ist also durchaus möglich, dass Hct1 von Cdc5 noch zusätzlich phosphoryliert wird.

6.5.2 Cdc5 interagiert „destruction-box“ unabhängig mit Hct1+0

Wie Abb. 24 zeigt, interagiert Cdc5 unabhängig von seiner „destruction box“ mit Hct1. Außerdem interagiert Cdc5 auch mit der Phosphositemutante von Hct1. Nicht getestet wurde allerdings, ob die N-terminal Verkürzte Version von Cdc5 noch mit dieser *hct1*-Mutante interagiert. Um dies zu untersuchen, wurden Stämme verwendet, die *HCT1+0* und *CDC5* oder *CDC5ΔN70* vom *GAL1*-Promotor überexprimierten. Wie in dem in Abb. 24 beschriebenen Experiment wurden auch für diese Präzipitation *cdc23-1*-Stämme verwendet. Die verwendeten Stämme erlauben einen Vergleich der Interaktion von Cdc5 bzw. Cdc5ΔN70 mit Hct1+0. Die oberen beiden Reihen der Abb. 25 zeigen die Lysate vor der Präzipitation. Cdc5 und Cdc5ΔN70 werden in vergleichbaren Mengen produziert. Reihe drei zeigt präzipitiertes Cdc5. Der Western in Reihe 4 zeigt das HA-Präzipitat, das mit 9E10 entwickelt wurde. Hier sollte man kopräzipitierendes Hct1 sehen. Außer der schweren Kette des Antikörpers ist allerdings kein Signal nachzuweisen. Das präzipitierte Hct1+0 ist in Reihe 5 dargestellt. Aus allen drei Stämmen, in denen Hct1+0 produziert wird, lässt sich das Protein in vergleichbaren Mengen präzipitieren. Reihe 8 schließlich zeigt die Myc-Präzipitate, die mit 12CA5 entwickelt wurden.

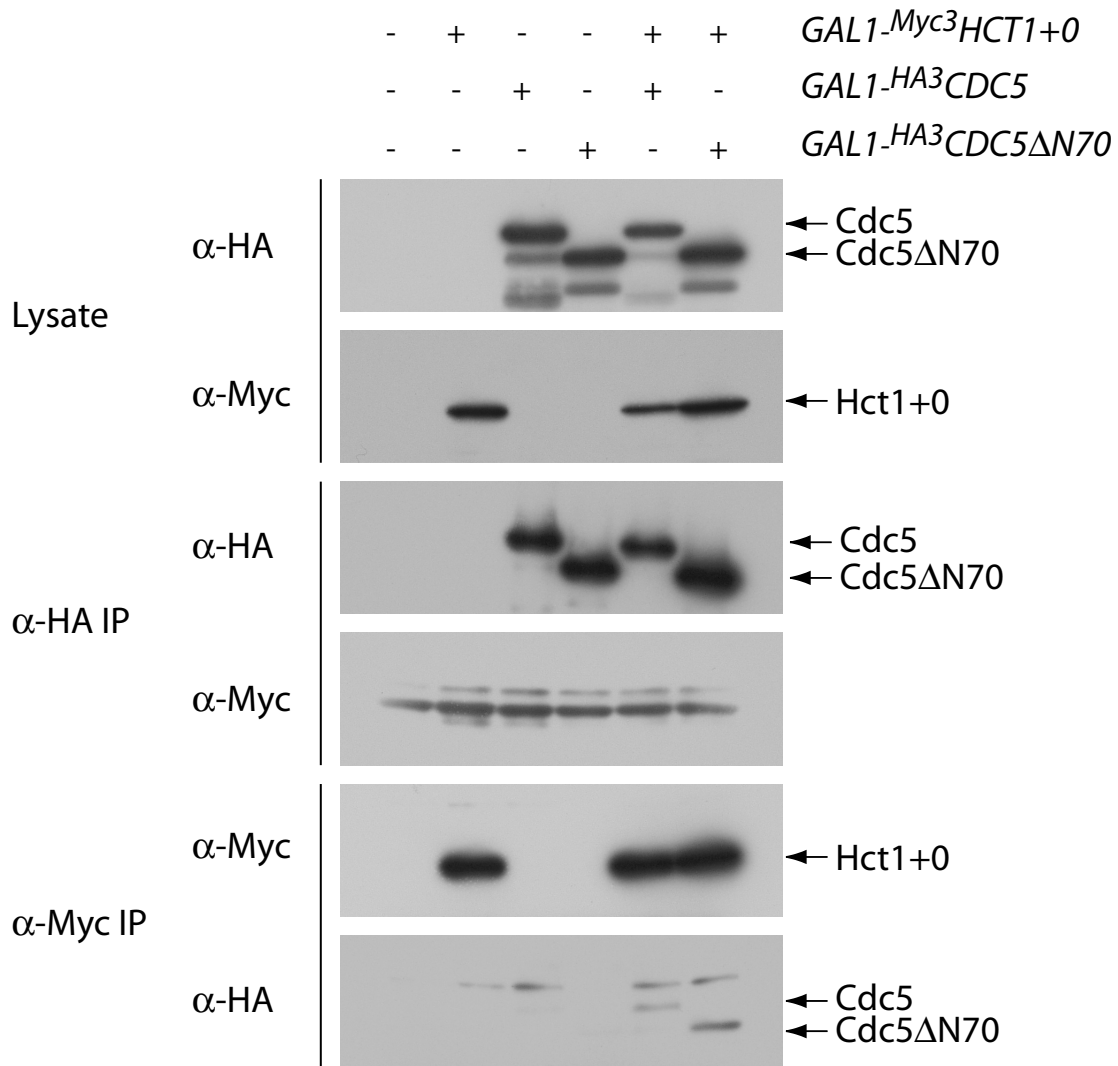


Abb. 25 Interaktion zwischen Hct1+0 und Cdc5. Hct1+0 interagiert sowohl mit WT Cdc5 als auch mit der „destruction-box“ Mutante von Cdc5. *cdc23-1* Stämme mit *GAL1-Myc³HCT1+0* und mit oder ohne *GAL1-HA³CDC5* bzw. *GAL1-HA³CDC5ΔN70* wurden bei 25°C in Vollmedium mit Raffinose angezogen und für 2 h mit 2% Galaktose induziert. Aus den Proteinlysaten wurden mit 12CA5 (α-HA) bzw. 9E10 (α-Myc) und Protein A Agarose ^{HA3}Cdc5 bzw. ^{HA3}Cdc5ΔN70 oder ^{Myc3}Hct1+0 gereinigt. Proben der Lysate (Lysat) vor der Präzipitation und die Präzipitate (α-HA-IP oben und α-Myc-IP unten) bzw. die kopräzipitierten Proteine (α-Myc-IP α-HA) wurden mittels Western Blot untersucht. Spur1: W1500 (*cdc23-1*), Spur2: W1739 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc³HCT1+0-TRP1*), Spur3: (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA³CDC5-URA3*), Spur4: W1930 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA³CDC5ΔN70-URA3*), Spur5: W1757 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc³HCT1+0-TRP1 ura3::GAL1-HA³CDC5-URA3*) und Spur6: W1955 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc³HCT1+0-TRP1 ura3::GAL1-HA³CDC5ΔN70-URA3*).

In Spur 5 sieht man kopräzipitierendes Cdc5, in Spur 6 kopräzipitierendes Cdc5ΔN70. In den Kontrollen (Spuren 3+4) gibt es kein Signal an der entsprechenden Stelle. Das bedeutet, sowohl Cdc5 als auch Cdc5ΔN70 interagieren spezifisch mit Hct1+0, wobei sich die Interaktion in dem vorliegenden Experiment nur nachweisen lässt, wenn Hct1+0 präzipitiert und Cdc5 nachgewiesen wird. Die gezeigte Interaktion ist demnach nur sehr schwach.

6.5.3 Cdc5 interagiert bevorzugt mit phosphorylierten Formen von Hct1

Die gezeigten Koimmunpräzipitationen belegen, dass Cdc5 sowohl mit Hct1 als auch mit Hct1+0 interagiert. Diese Interaktion ist unabhängig vom N-Terminus von Cdc5, in dem sich die „destruction box“ Motive befinden. Die Überexpression von *CDC5* bewirkt eine Mobilitätsveränderung von Hct1. Es entsteht eine langsamer laufende Bande, mit der Cdc5 interagiert. Um zu untersuchen, ob Cdc5 generell mit phosphorylierten Formen von Hct1 besser interagiert als mit unphosphorylierten, wurden Affinitätspräzipitationen mit MBP-Cdc5 und verschiedenen Derivaten von Hct1 durchgeführt. Abb. 26 zeigt das Ergebnis mit vier ausgewählten Hct1-Derivaten. Cdc5 interagiert mit dem Wildtypprotein, mit Hct1+1/2/3, mit Hct1+1/2/3/4 und auch mit Hct1+0, dem alle Cdc28-Konsensusstellen fehlen, was mit

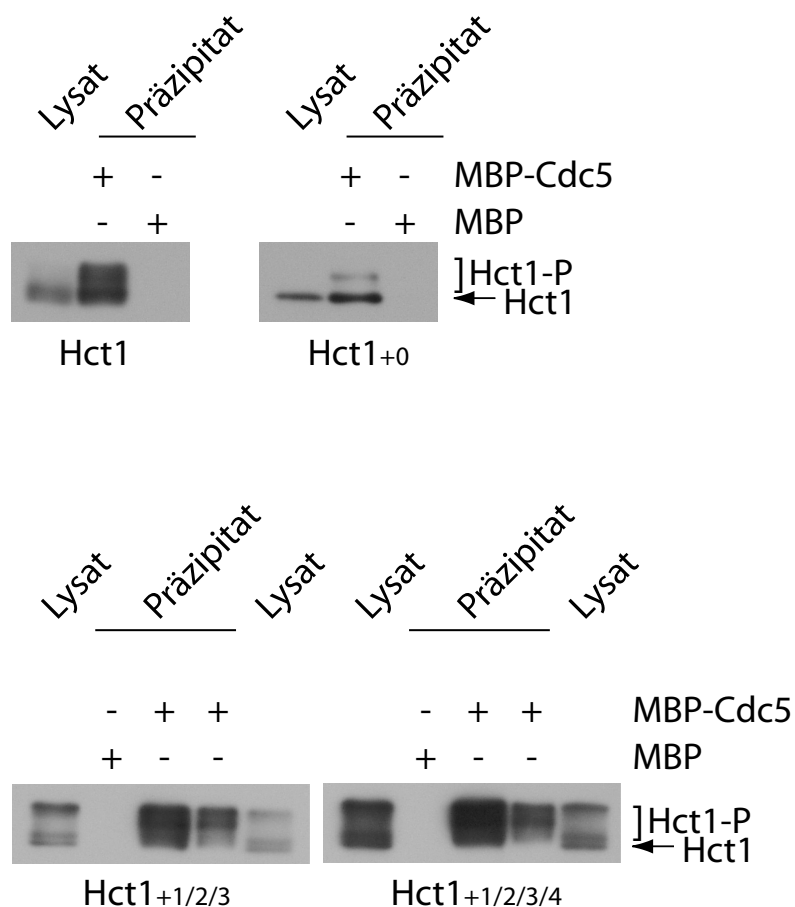


Abb. 26 Cdc5 interagiert bevorzugt mit phosphorylierten Formen von Hct1. Um die Interaktion von Cdc5 mit verschiedenen Varianten von Hct1 zu untersuchen, wurden Affinitätspräzipitationen mit MBP-Cdc5 durchgeführt. Hierfür wurde MBP-Cdc5 oder MBP alleine aus entsprechenden *E. coli* Stämmen mit Hilfe von Amylose-Resin gereinigt. Das an das Amylose-Resin gebundene Cdc5 bzw. MBP wurde mit Lysaten der Stämme W3358 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3310 (*trp::GALL^{HA3}HCT1+0-TRP1*), W3330 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/3-TRP1*) und W3610 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/3/4-TRP1*) für 2h inkubiert, gewaschen und anschließend gekocht. Die *HCT1*-Derivate wurden für 2 h durch Zugabe von Galaktose exprimiert. Gebundenes Hct1x^{HA3} wurde durch Western-Blot Analyse mit 12CA5 nachgewiesen. Der Western Blot im unteren Teil der Abbildung zeigt jeweils zwei verschiedene Mengen des Lysats bzw. des Präzipitates mit MBP-Cdc5.

den Ergebnissen der Immunpräzipitationsexperimente übereinstimmt. Im Präzipitat sind phosphorylierte Formen von Hct1 angereichert. Besonders gut ist dies im unteren Teil der Abbildung bei Hct1+1/2/3 und Hct1+1/2/3/4 zu erkennen. Die zwei am schnellsten laufenden Banden im Lysat finden sich im Präzipitat nicht wieder. Der Effekt ist beim Wildtypprotein nicht so deutlich, da keine distinkten Banden im Lysat vorhanden sind. Die zusätzliche Bande im Präzipitat von Hct1+0 ist bei längerer Exposition des Films auch im Lysat detektierbar und somit nicht spezifisch für das Präzipitat. In den MBP-Präzipitaten sind keine Signale nachweisbar. Die Hct1-Derivate interagieren somit spezifisch mit Cdc5.

6.5.4 Die Phosphorylierung von Hct1 durch Cdc5 ist abhängig von N-terminalen Cdc28-Konsensusstellen in Hct1

Wie in Abb. 24 zu sehen ist, führt die Überexpression von *CDC5* zu einer Hyperphosphorylierung von bereits phosphoryliertem Hct1. In Abb. 24 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Überexpression von *CDC5* keinen Einfluß auf das Laufverhalten von Hct1+0 hat. Es sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Cdc28-Konsensusstellen in Hct1 auf dessen Fähigkeit haben, durch Cdc5 phosphoryliert zu werden.

Um diese Frage zu klären, wurden Stämme verwendet, die *CDC5* mit einem N-terminalen HA3-Epitop vom *GAL1*-Promotor überexprimierten. Gleichzeitig produzierten die Zellen vom

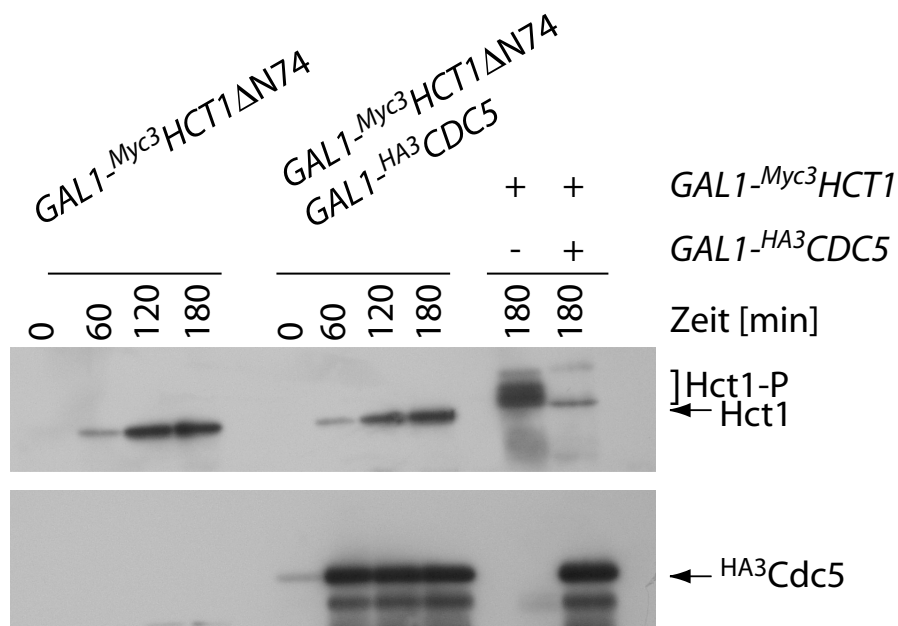
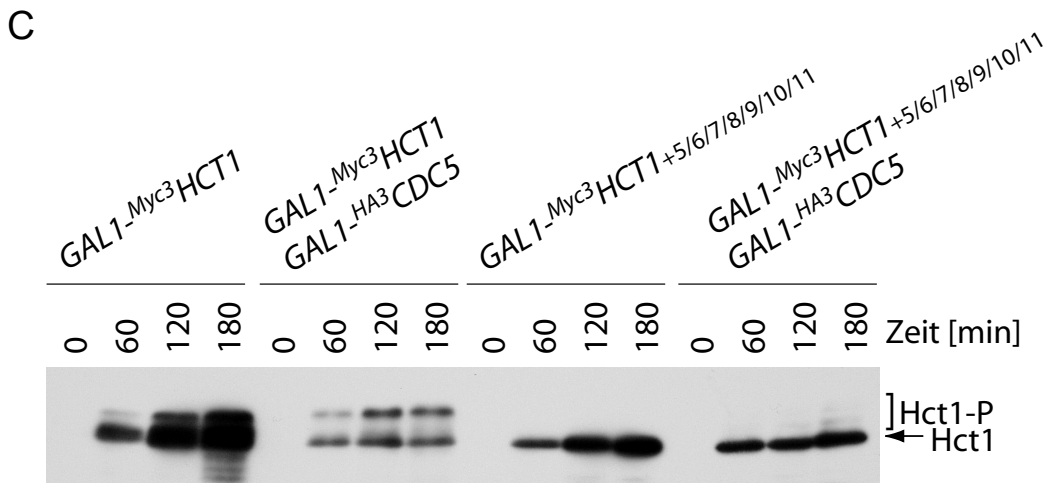
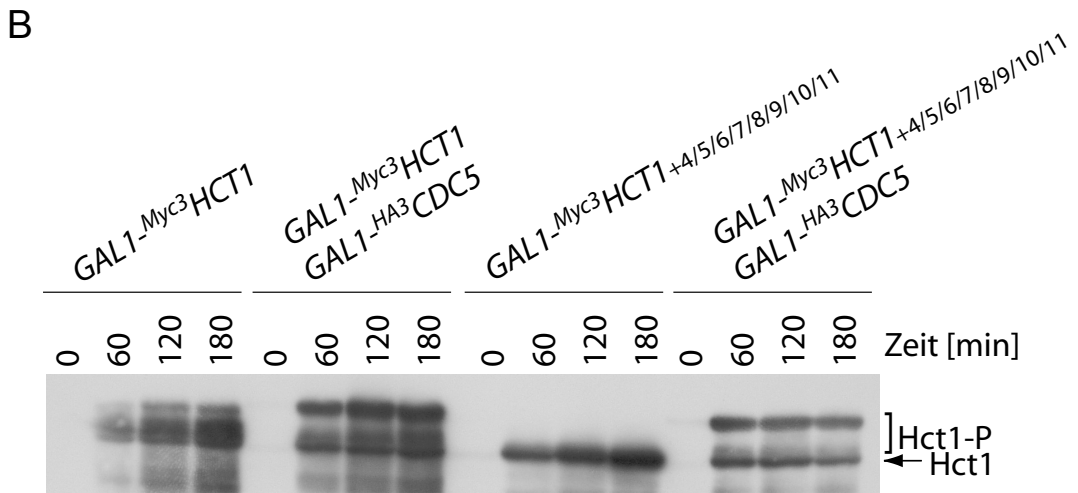
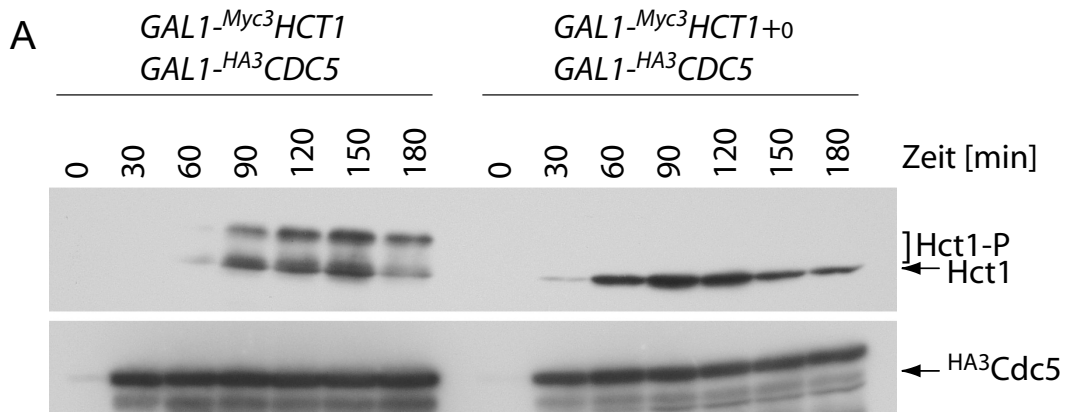


Abb. 27 Eine N-terminal verkürzte Variante von Hct1 wird nicht mehr von Cdc5 phosphoryliert. Um die Rolle der ersten Cdc28-Konsensusstellen in Hct1 für die Phosphorylierung durch Cdc5 näher zu untersuchen, wurde eine N-terminal verkürzte Version von Hct1 verwendet, der die ersten 74 Aminosäuren fehlen. Asynchron wachsende Zellen der Stämme W2798 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1Δ1-74-TRP1*), W2799 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1-Δ1-74-TRP1*), W1502 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1-TRP1*) und W1621 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1-TRP1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3*) wurden mit Galaktose behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und für einen Western Blot aufgearbeitet.

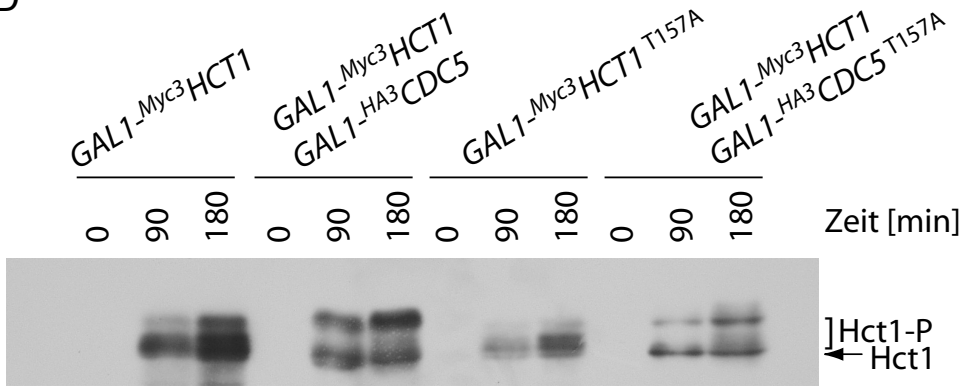
selben Promotor verschiedene Hct1-Varianten. Damit durch die Überexpression von *HCT1* keine Cdc5-Degradation induziert wurde, befanden sich alle Konstrukte in einem *cdc23-1*-Hintergrund. Durch die Zugabe von Galaktose zum Zeitpunkt 0 wurde folglich sowohl die Expression von *HCT1* als auch die von *CDC5* induziert.

In einem ersten Schritt wurde die Auswirkung der *CDC5*-Überexpression auf eine N-terminal verkürzte Variante von Hct1 untersucht. Diesem Protein fehlen die ersten 74 Aminosäuren und damit auch die ersten drei Cdc28-Konsensusstellen. Sowohl ohne als auch mit Überexpression von *CDC5* zeigt das verkürzte Hct1-Protein ein einheitliches Laufverhalten in der SDS-PAGE (Abb. 27). Als Vergleich ist auf dem Western Blot das Wildtypprotein mit und ohne Überproduktion von Cdc5 zu sehen. Es kann also geschlossen werden, dass der N-Terminus von Hct1 wichtig ist für die Phosphorylierung durch Cdc5. Im Weiteren wurde die Rolle einzelner Cdc28-Konsensusstellen für die Cdc5-Phosphorylierung von Hct1 näher untersucht.

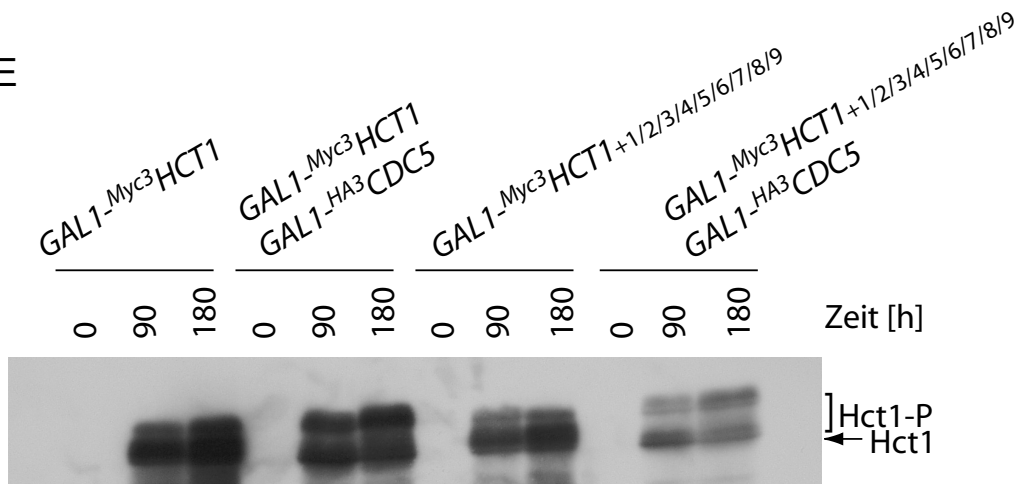
Abb. 28 A zeigt die Wirkung der Überexpression von *CDC5* auf eine *hct1*-Mutante, der alle elf Cdc28-Konsensusstellen fehlen. Wie der Western Blot in Abb. 24 bereits vermuten ließ, hat die Überexpression von *CDC5* keinen Einfluss auf das Laufverhalten von Hct1+0. Das Protein läuft im Gegensatz zum Wildtypprotein in einer distinkten Bande, was sich auch durch die Überproduktion von Cdc5 nicht ändert. Fehlen hingegen nur die ersten drei Konsensusstellen für Cdc28-Phosphorylierung (Hct1+4/5/6/7/8/9/10/11), bewirkt die Überexpression von *CDC5* weiterhin einen Hypershift von Hct1 (Abb. 28 B). Fehlt am N-Terminus aber zusätzlich eine weitere Stelle, so bewirkt eine erhöhte Menge von Cdc5 keine Mobilitätsänderung dieser Hct1-Variante (Abb. 28 C). Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass eben diese vierte Position die Akzeptorstelle für den Phosphatrest sein könnte. Deshalb wurde ein *HCT1*-Konstrukt hergestellt, in dem nur diese vierte Cdc28-Konsensusstelle zu einem Alanin mutiert ist und somit nicht mehr phosphoryliert werden kann. Abb. 28 D zeigt, dass die Überexpression von *CDC5* einen Hypershift eines solchen Hct1-Proteins hervorruft. Die vierte Stelle ist somit zwar essentiell für die beobachtete Hyperphosphorylierung, sie scheint allerdings nicht die einzige Akzeptorstelle für das Phosphat zu sein. Die letzten zwei Cdc28-Konsensusstellen, die in den WD40-Wiederholungssequenzen von Hct1 liegen, haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung durch Cdc5. Wie Abb. 28 E zeigt, führt die Überexpression von *CDC5* zu einer Mobilitätsveränderung von Hct1, in dem diese Stellen ausgetauscht sind. Sind allerdings nur noch die C-Terminalen Cdc28-Konsensusstellen vorhanden (Abb. 28 F), ist keine Hyperphosphorylierung mehr zu beobachten. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass für die Phosphorylierung von Hct1 die ersten vier Cdc28-Konsensusstellen notwendig sind. Da die vierte Stelle alleine nicht ausreicht, ist anzunehmen, dass eine Kombination aus den ersten vier Stellen benötigt wird.



D



E



F

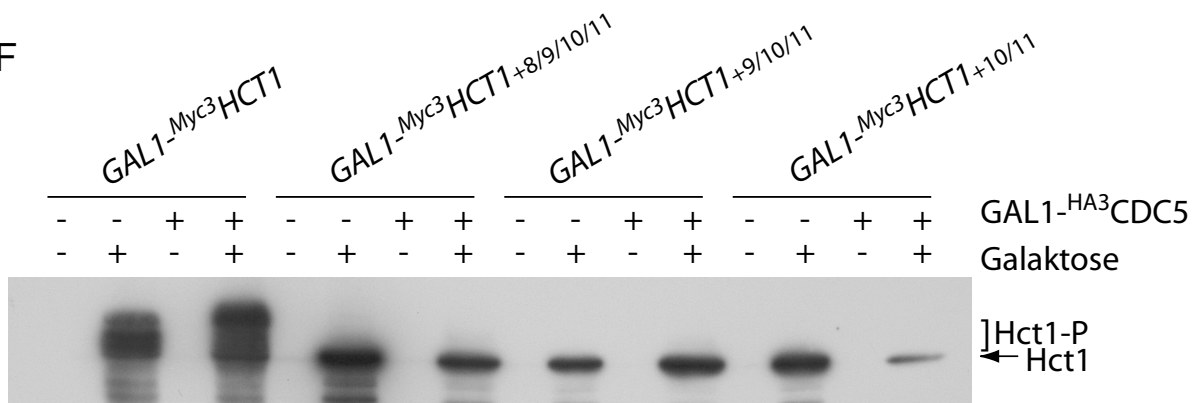
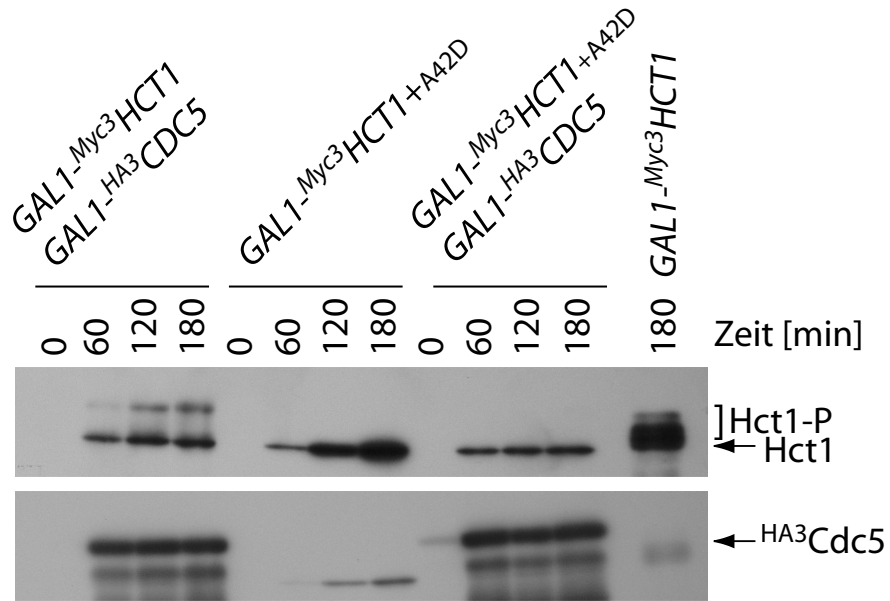


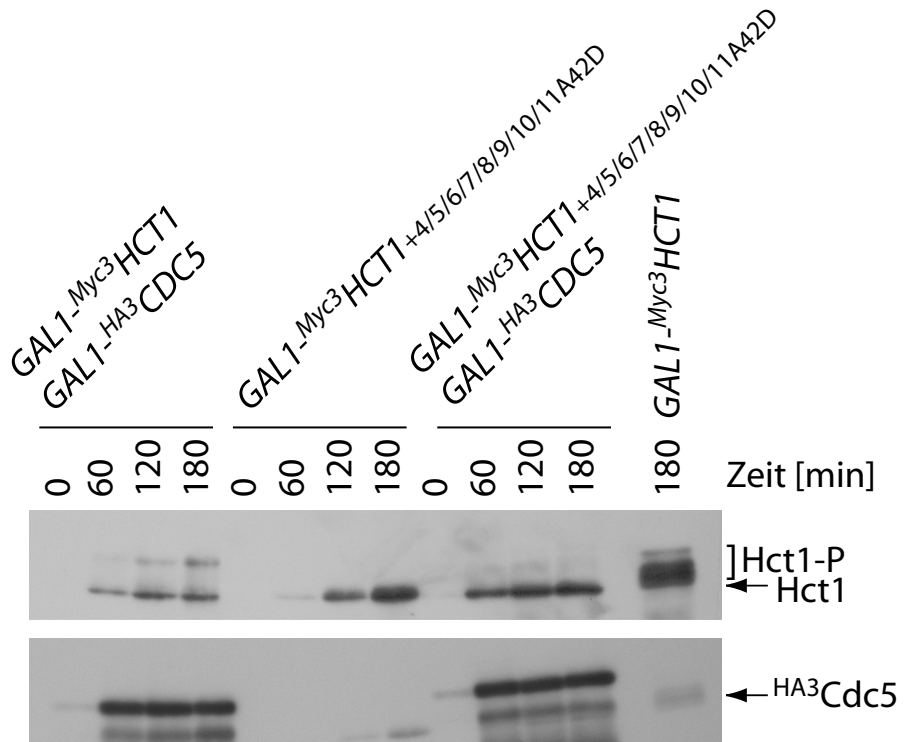
Abb. 28 Die Phosphorylierung von Hct1 durch Cdc5 ist abhängig vom Vorhandensein der ersten vier Cdc28-Konsensusstellen. Um die Auswirkung der Überproduktion von Cdc5 auf die Modifikation von Hct1 zu untersuchen, wurden entsprechende Stämme mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und für einen Westen Blot aufgearbeitet. ^{Myc3}Hct1 wurde mit 9E10 nachgewiesen, die Menge des überproduzierten ^{HA3}Cdc5 wurde mit 12CA5 überprüft. (A) Wirkung der Überexpression von CDC5 auf Hct1 und Hct1+0. Asynchron wachsende Zellen der Stämme W1621 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1-TRP1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3*) und W1757 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+0-TRP1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3*) wurden mit Galaktose behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen. (B) Wirkung der Überproduktion von Cdc5 auf Hct1+4/5/6/7/8/9/10/11. Zellen der Stämme W1502 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1-TRP1*), W1621, W1792 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*) und W1791 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*) wurden zum Zeitpunkt 0 mit Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben genommen. (C) Wirkung der Überproduktion von Cdc5 auf Hct1+5/6/7/8/9/10/11. Wie oben. Stämme W1502, W1621, W1800 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1*) und W1799 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1*). (D) Wirkung der Überexpression von CDC5 auf eine Hct1-Mutante, der nur die vierte Cdc28-Konsensusstelle fehlt. Wie oben. Stämme W1502, W1621, W1875 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1^{T157A}-TRP1*) und W1874 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1^{T157A}-TRP1*). (E) Wie oben. Stämme W1502, W1621, W1854 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9*) und W1855 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3*). (F) Asynchron wachsende Zellen der Stämme W1502, W1621, W1802 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+8/9/10/11-TRP1*), W1801 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+8/9/10/11-TRP1*), W1804 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+9/10/11-TRP1*), W1803 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+9/10/11-TRP1*), W1806 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+10/11-TRP1*) und W1805 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+10/11-TRP1*) wurden vor Behandlung mit Galaktose und nach dreistündiger Galaktoseinduktion geerntet.

Da die ersten vier Cdc28-Konsensusstellen bei der Phosphorylierung von Hct1 durch Cdc5 eine besondere Rolle einnehmen, wurde versucht, den Beitrag einzelner Stellen genauer zu charakterisieren. Hierzu wurden Konstrukte exprimiert, in denen die dritte oder die vierte Cdc28-Konsensusstelle zu einem Aspartat mutagenisiert worden waren. Das Aspartat sollte dabei mit seiner Carboxyl-Gruppe ein Phospho-Serin (Position 3) bzw. ein Phospho-Threonin (Position 4) imitieren. In Abb. 29 A bzw. C sieht man Proteinlysate von Stämmen, die ein Hct1-Protein produzieren, in dem nur die dritte bzw. vierte Stelle durch ein Aspartat ersetzt ist. Die anderen zehn Konsensusstellen für Phosphorylierung durch Cdc28-Kinase sind durch ein Alanin ersetzt. Wie man erkennen kann, ist ein Aspartat an einer der beiden Stellen nicht ausreichend, damit Hct1 von Cdc5 phosphoryliert wird, zumindest tritt nach Überexpression von CDC5 kein Hypershift von Hct1 auf. Sind nur die ersten Stellen zu einem Alanin ausgetauscht und folgen auf das Aspartat intakte Cdc28-Konsensusstellen, reicht auch dies nicht zu einer Phosphorylierung durch Cdc5 (Abb. 29 D). In Abb. 29 B erkennt man nach der Expression von CDC5 sehr schwach langsamer laufende Formen von Hct1. Allerdings ist diese Phosphorylierung sehr viel schwächer im Vergleich zu einem Stamm, der an dieser Stelle eine phosphorylierbare Aminosäure exprimiert (vgl. Abb. 28 B). Das Aspartat an Stelle drei scheint also kein ausreichender Ersatz für eine Phospho-Aminosäure zu sein.

A



B



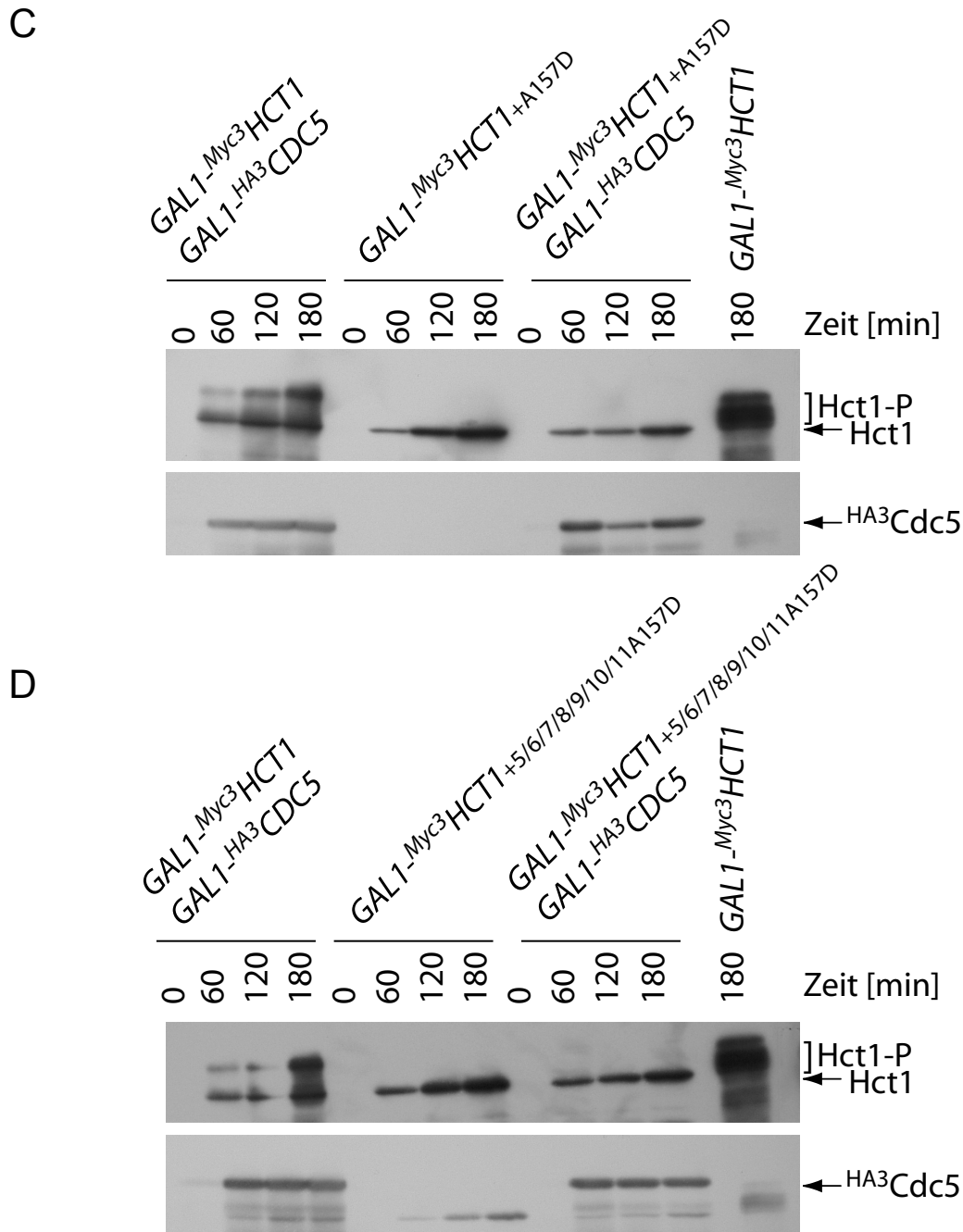




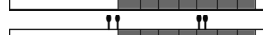











Abb. 29 Ein Aspartat an Position drei oder vier in Hct1 kann die Phosphorylierung durch Cdc5 nicht wiederherstellen. Um zu testen, ob ein Aspartat statt eines Phospho-Threonin an Position drei oder vier die Phosphorylierung durch Cdc5-Kinase wiederherstellen kann, wurden die Stämme (A) W1621 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1-TRP1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3*), W2971 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+0 A42D-TRP1*) und W2975 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+0A42D-TRP1*), bzw. (B) W1621, W2972 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11A42D-TRP1*) und W2976 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11A42D-TRP1*), bzw. (C) W1621, W2973 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+0A157D-TRP1*) und W3024 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+0A157D-TRP1*), bzw. (D) W1621, W2974 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1+5/6/7/8/9/10/11A157D-TRP1*), und W3025 (*cdc23-1 ura3::GAL1-HA3CDC5-URA3 trp1::GAL1-Myc3HCT1+5/6/7/8/9/10/11A157D-TRP1*) mit Galaktose behandelt. Als Kontrolle diente der Stamm W1502 (*cdc23-1 trp1::GAL1-Myc3HCT1-TRP1*) nach 3 h Galaktoseinduktion. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und für einen Western Blot aufgearbeitet. ^{Myc3}Hct1 wurde mittels 9E10 nachgewiesen. Die Menge an überproduziertem ^{HA3}Cdc5 wurde mit 12CA5 überprüft.

Tab. 5 zeigt eine Zusammenfassung der oben beschriebenen Ergebnisse.

Konstrukt	Hypershift nach Überexpression von <i>CDC5</i>
 HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11	ja
 HCT1+0	nein
 HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11	ja
 HCT1+5/6/7/8/9/10/11	nein
 HCT1+1/2/3/5/6/7/8/9/10/11	ja
 HCT1+8/9/10/11	nein
 HCT1+9/10/11	nein
 HCT1+10/11	nein
 HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/11	ja
 HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9	ja
 HCT1+4Asp	nein
 HCT1+4Asp/5/6/7/8/9/10/11	nein
 HCT1+3Asp	nein
 HCT1+3Asp/4/5/6/7/8/9/10/11	ja (schwach)

Tab. 5 Zusammenfassung der Phosphorylierung verschiedener Hct1-Phosphositemutanten durch Cdc5. In der ersten Spalte finden sich schematische Darstellungen der Proteine. Die sieben WD40-repeats im C-Terminus des Proteins sind grau dargestellt. In der zweiten Spalte finden sich die Bezeichnungen der verschiedenen *HCT1*-Konstrukte wie sie auch im Weiteren verwendet wurden. Kreise repräsentieren Cdc28-Konsensusstellen. Rauten repräsentieren ein Asparat an der entsprechenden Position.

6.5.5 Cdc5 phosphoryliert Hct1 *in vitro*

In vivo bewirkt die Überexpression von *CDC5* eine Hyperphosphorylierung von bereits phosphoryliertem Hct1 (Abb. 24). Um zu testen, ob Cdc5 Hct1 direkt phosphorylieren kann, wurde ein *in vitro* Kinaseassay durchgeführt. Als Substrat wurde ein Fusionsprotein aus dem Maltosebindeprotein (MBP) und Hct1 verwendet, das in *E. coli* produziert wurde (zur Verfügung gestellt von Michael Schwab). Da das aus *E. coli* stammende Protein unphosphoryliert ist, wurde es, um die physiologische Situation zu imitieren, in einem ersten Schritt mit Clb5-Cdc28-Kinase und nichtradioaktivem ATP phosphoryliert. Als Kontrolle wurde MBP-Hct1 mit einem Hefepräzipitat ohne gereinigte Cdc28-Kinase inkubiert. Beide Ansätze wurden anschließend einem radioaktiven Cdc5-Kinaseassay unterworfen. Abb. 30 zeigt das Autoradiogramm dieses Versuches. Unphosphoryliertes MBP-Hct1 (Spur 3) ist ein sehr schlechtes Substrat für Cdc5 (auf längeren Expositionen kann ein Signal detektiert werden). Wurde MBP-Hct1 aber mit Clb5-Kinase phosphoryliert bevor es in den Cdc5-Kinaseassay eingesetzt wurde, kann es von Cdc5 phosphoryliert werden (Spur 2). In der Kontrolle (Spur 1) ist kein Signal detektierbar, das bedeutet es wurde keine Clb5-Aktivität in den radioaktiven Assay verschleppt und das Signal, das man in Spur 2 sieht ist spezifisch auf eine Phosphorylierung von Hct1 durch Cdc5 zurückzuführen. Hct1 ist *in vitro* folglich ein Substrat für Cdc5, wobei es weitaus effizienter phosphoryliert wird, wenn es zuvor von zyklinabhängiger Kinase phosphoryliert wurde. Völlig unphosphoryliertes Hct1 ist ein sehr schlechtes Substrat für Cdc5.

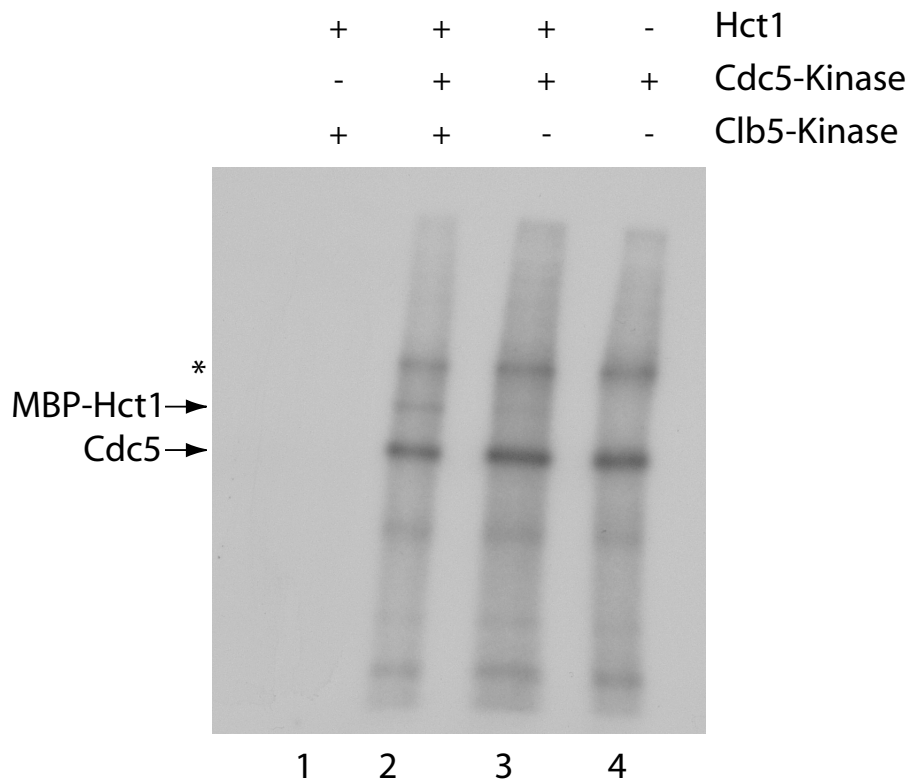


Abb. 30 Cdc5 phosphoryliert Hct1 *in vitro*. Um zu testen, ob Cdc5 Hct1 direkt phosphorylieren kann, wurde ein *in vitro* Kinaseassay mit aus Hefe präzipitierter Cdc5-Kinase und MBP-Hct1 aus *E. coli* als Substrat durchgeführt. Cdc5 wurde aus dem Stamm W1555 (*ura3::GAL1-Myc3 CDC5-URA3 CLB2^{HA3}*) mit Hilfe von 9E10 und Protein A-Agarose Beads gereinigt. Als Kontrolle diente ein 9E10-Präzipitat eines Wildtypstammes. Die Präzipitate wurden mit MBP-Hct1 in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. MBP-Hct1 war zuvor mit einem 12CA5-Präzipitat aus K699 bzw. W814 (*ura3::GAL1-CLB5^{HA3}-URA3*) und 10 μM kaltem ATP vorinkubiert worden. Die aus W814 gereinigte Clb5-Kinase sollte MBP-Hct1 vorphosphorylieren. Der Einbau von radioaktivem Phosphat in MBP-Hct1 wurde mittels Autoradiographie gemessen. Spur 1: K699-Präzipitat mit MBP-Hct1 vorinkubiert mit Clb5-Kinase; Spur 2: Cdc5-Präzipitat mit MBP-Hct1 vorinkubiert mit Clb5-Kinase; Spur 3: Cdc5-Präzipitat mit MBP-Hct1 vorinkubiert mit K699-Präzipitat; Spur 4: nur Cdc5-Präzipitat.

6.6 „Multisite“-Phosphorylierung von Hct1

Die Aktivität von Hct1 wird durch Phosphorylierung durch zyklinabhängige Kinasen negativ reguliert. Phosphoryliertes Hct1 kann nicht an den APC binden und somit auch nicht die Degradation von Clb2 vermitteln. Je mehr Cdc28-Konsensusstellen in Hct1 fehlen, desto aktiver ist es im Hinblick auf die Degradation von Clb2 (Zachariae et al., 1998). Hct1 besitzt elf potentielle Cdc28-Konsensusstellen, die aus einem Serin/Prolin- bzw. Threonin/Prolin-Motiv besetzen. Diese elf Stellen sind über das ganze Protein verteilt. Es stellt sich nun die Frage, ob alle dieser elf Stellen für die Inaktivierung von Hct1 eine Rolle spielen, oder ob nur einzelne dieser elf Stellen *in vivo* von CDK phosphoryliert werden. Um diese Frage zu klären, wurden durch ortsspezifische Mutagenese verschiedene *HCT1*-Konstrukte hergestellt, in denen immer nur bestimmte Cdc28-Konsensusstellen in phosphorylierbarer Form vorhanden waren. Die Aktivität dieser Konstrukte wurde *in vivo* durch Überexpression vom schwachen, galaktoseinduzierbaren *GALL*-Promotor getestet. Untersucht wurde die Lebensfähigkeit der

Zellen nach Überexpression dieser *HCT1*-Derivate, deren Fähigkeit, Clb2-Degradation zu induzieren, und das Laufverhalten der entsprechenden Hct1-Varianten im Western Blot. Je mehr Cdc28-Konsensusstellen eine Hct1-Variante besitzt, umso ähnlicher sollte es in seinem Verhalten dem Wildtyp Hct1 sein. Durch Vergleich der unterschiedlichen *HCT1*-Derivate in Bezug auf ihre biologische Aktivität sollte es möglich sein, den Beitrag der einzelnen Cdc28-Konsensusstellen zur Inaktivierung von Hct1 zu bestimmen.

6.6.1 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate auf die Lebensfähigkeit der Zellen

Die Überexpression von *HCT1* ist schädlich für die Zellen. Je nach Stärke des Promotors, von dem das Gen exprimiert wird, ist sie sogar letal. Die Überexpression von *HCT1* vom relativ schwachen *GALL*-Promotor ist bei 25°C leicht toxisch für die Zellen, bei 30°C hingegen ist keine Wachstumsbeeinträchtigung im Vergleich zu einem Stamm, der kein *HCT1* exprimiert, zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dies liegt vermutlich daran, dass der *GAL*-Promotor bei erhöhter Temperatur nur eine schwächere Genexpression verursacht und geringe Mengen an phosphorylierbarem Hct1 von der Zelle toleriert werden. Die Überexpression von *HCT1*+0, einem Konstrukt, dem alle elf Cdc28-Konsensusstellen fehlen, ist auch bei 30°C letal für die Zellen, da es von CDK nicht mehr inaktiviert werden kann. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die nachfolgenden Wachstumstest bei 30°C durchgeführt. Um eine noch schwächere Expression der *HCT1*-Konstrukte zu erzielen, wurden das Wachstum der Zellen zusätzlich bei 37°C getestet. Da die Menge des produzierten Proteins auch von der Zahl der ins Genom integrierten *HCT1*-Konstrukte abhängt, wurde die Integrationszahl aller verwendeten Stämme mittels quantitativer PCR überprüft (5.5.6.1). Die Stämme, die im Folgenden verglichen werden, weisen alle eine Integration des entsprechenden *HCT1*-Konstrukts auf. Hat ein Stamm mehrere Integrationen, so ist dies in Tab. 1 vermerkt.

Abb. 31 zeigt den Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate, die nur eine Stelle für die Phosphorylierung durch Cdc28-Kinase besitzen, auf das Wachstum der Zellen. Auf Platten mit Glucose als C-Quelle – hier ist der *GAL*-Promotor reprimiert – wachsen alle Stämme vergleichbar. Dies gilt auch für alle nachfolgend gezeigten Wachstumstestes. Wie oben erwähnt, wächst der Stamm, der die voll phosphorylierbare Wildtypform von *HCT1* exprimiert, sowohl bei 30°C als auch bei 37°C wie der Kontrollstamm, der kein zusätzliches *HCT1* exprimiert. Bei 30°C verhalten sich auf Galaktose-Platten alle getesteten Stämme wie derjenige, der gänzlich unphosphorylierbares Hct1 exprimiert: sie sind nämlich tot. Der Stamm, der *HCT1*+4 exprimiert, besaß mehr als eine Integration des Konstruktes im Genom. Der Stamm wurde deshalb neu hergestellt und ist in Abb. 32 aufgeführt. Bei Inkubation der Platten bei 37°C fällt auf, dass ein Stamm ein schwaches Wachstum zeigt. Dieser Stamm exprimiert ein *HCT1*-Derivat, das an der dritten Stelle wie das Wildtypgen wieder für ein Serin kodiert. Das entsprechende Protein ist an dieser Stelle also wieder phosphorylierbar. Es kann festgehalten werden, dass das Vorhandensein einer einzigen Cdc28-Konsensusstelle bei schwacher Expression des Gens das Wachstum der Zellen nicht vollständig verhindert.

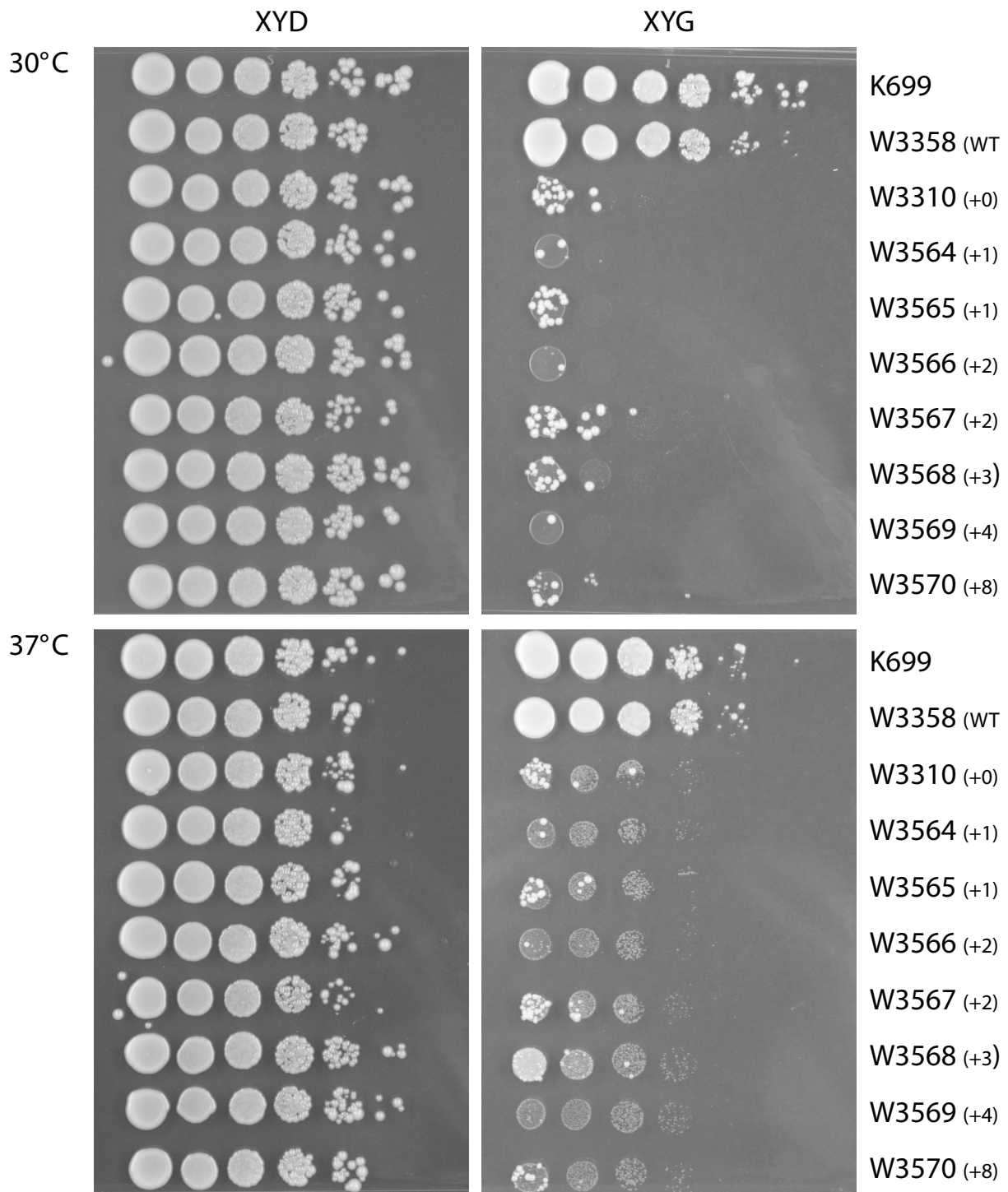


Abb. 31 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Um das Wachstumsverhalten der Zellen nach Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen von Stämmen mit galaktoseinduzierbarem *HA3HCT1x* auf Vollmediumsplatten mit Glucose bzw. Galaktose aufgetropft. Dabei wurden im ersten Spot 125000 Zellen aufgebracht und in 1:10-Schritten verdünnt. Die Platten wurden zwei Tage bei 30°C (oben) bzw. 37°C (unten) inkubiert. Stämme: K699 (WT), W3358 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1-TRP1*), W3310 (*trp1::GALL-HA3HCT1+0-TRP1*), W3564 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1-TRP1*), W3565 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1-TRP1*), W3566 (*trp1::GALL-HA3HCT1+2-TRP1*), W3567 (*trp1::GALL-HA3HCT1+2-TRP1*), W3568 (*trp1::GALL-HA3HCT1+3-TRP1*), W3569 (*trp1::GALL-HA3HCT1+4-TRP1*) und W3570 (*trp1::GALL-HA3HCT1+8-TRP1*).

Abb. 32 zeigt weitere Stämme im Wachstumstest. Als Vergleich wurde der Stamm, der *HCT1+3* exprimiert, verwendet. Bei 30°C kann keiner der Stämme auf Galaktose-Platten wachsen. Bei 37°C bestätigt sich, dass die Expression von *HCT1+3* ein schwaches Wachstum des Stammes auf Platten mit Galaktose ermöglicht. Zudem wächst der Stamm, der *HCT1+5/6/7/8* exprimiert, schwach bei 37°C. Obwohl in *Hct1+5/6/7/8* vier potentielle Cdc28-Konsensusstellen vorhanden sind, wächst der Stamm, der dieses Protein produziert, nicht besser als der, der *Hct1+3* produziert, in dem nur eine Stelle vorhanden ist. Die Ergebnisse aus Abb. 31 und Abb. 32 zusammen ergeben, dass die dritte Cdc28-Konsensusstelle als einzige in der Lage ist, *Hct1* soweit zu inaktivieren, dass Wachstum möglich ist.

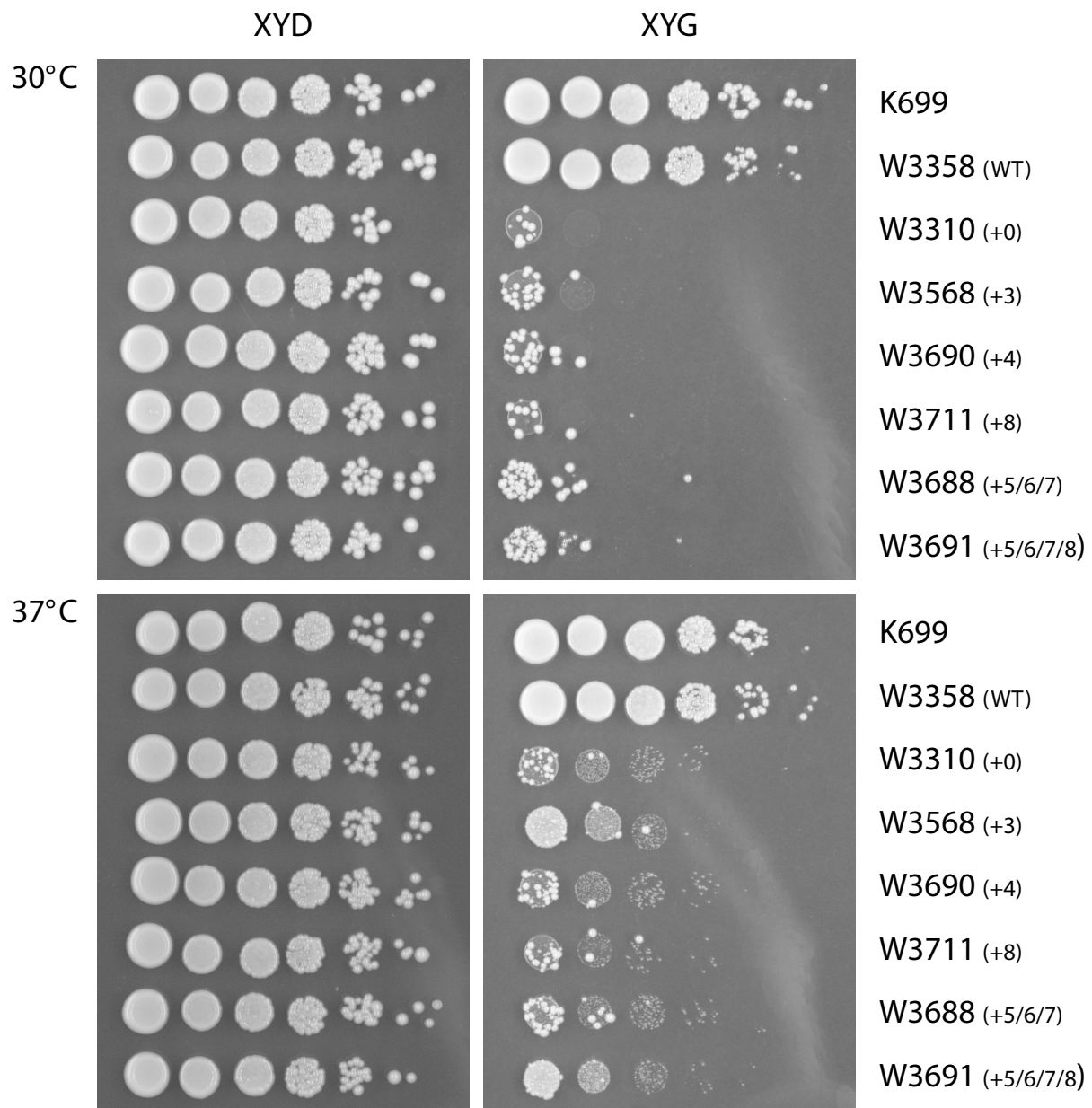


Abb. 32 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Wie Abb. 31. Stämme: K699, W3358, W3310, W3568, W3690 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+4-TRP1*), W3711 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+8-TRP1*), W3688 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+5/6/7-TRP1*) und W3691 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+5/6/7/8-TRP1*).

Die Stämme, die in Abb. 33 dargestellt sind, sollen die Bedeutung der ersten vier Cdc28-Konsensusstellen für die Regulation von Hct1 näher beleuchten. Es fällt auf, dass der *HCT1+1/2/3/4* exprimierende Stamm bei 30°C wachsen kann. Von allen bisher untersuchten Konstrukten ist dies das erste, das das Wachstum der Zellen bei dieser Temperatur erlaubt. Bei 37°C wächst der entsprechende Stamm sogar gleich gut wie derjenige, der Wildtyp Hct1 produziert. Die schwache Expression dieses Konstruktes wird von den Zellen also vollkommen toleriert. Stämme, die Hct1-Derivate produzieren, in denen Kombinationen der ersten vier Cdc28-Konsensusstellen vorhanden sind, zeigen ebenfalls ein gewisses Wachstum bei 37°C vergleichbar dem Stamm, der Hct1+3 produziert.

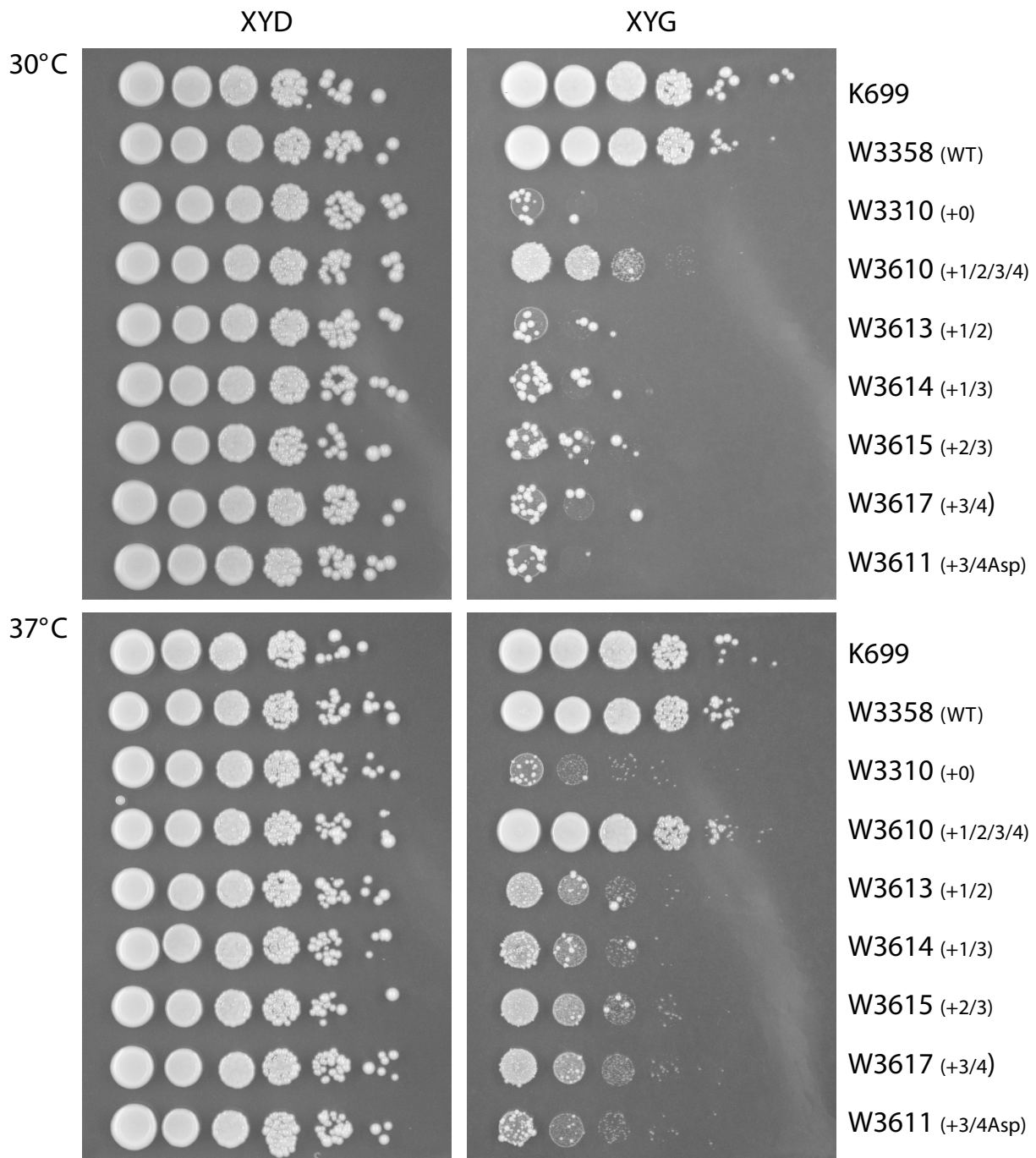


Abb. 33 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Wie Abb. 31. Stämme: K699, W3358, W3310, W3610 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/3/4-TRP1*), W3613 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2-TRP1*), W3614 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/3-TRP1*), W3615 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+2/3-TRP1*), W3617 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+3/4-TRP1*) und W3611 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+3Asp/4Asp-TRP1*).

In Abb. 34 sind Stämme dargestellt, die Hct1-Derivate produzieren, denen am N-Terminus unterschiedlich viele Cdc28-Konsensusstellen fehlen. Sind die letzten neun Stellen im produzierten Hct1-Protein vorhanden, wächst der Stamm schon bei 30°C sehr gut und ist bei 37°C nicht mehr von einem Wildtypstamm zu unterscheiden. Sind nur noch die letzten acht Stellen vorhanden, wächst der entsprechende Stamm bei beiden Temperaturen etwas schlechter. Noch schlechter wächst er, wenn nur noch die Stellen fünf bis elf vorhanden sind. Für diese beiden Konstrukte existieren ebenfalls Stämme, die mehr als eine Integration im Genom aufweisen. In beiden Fällen trifft zu, dass die Stämme mit mehr als einer Integration schlechter wachsen als vergleichbare Stämme mit nur einer Integration. Dies zeigt noch einmal deutlich die Dosisabhängigkeit der Überexpression von *HCT1*. Stehen im produzierten Hct1 nur noch

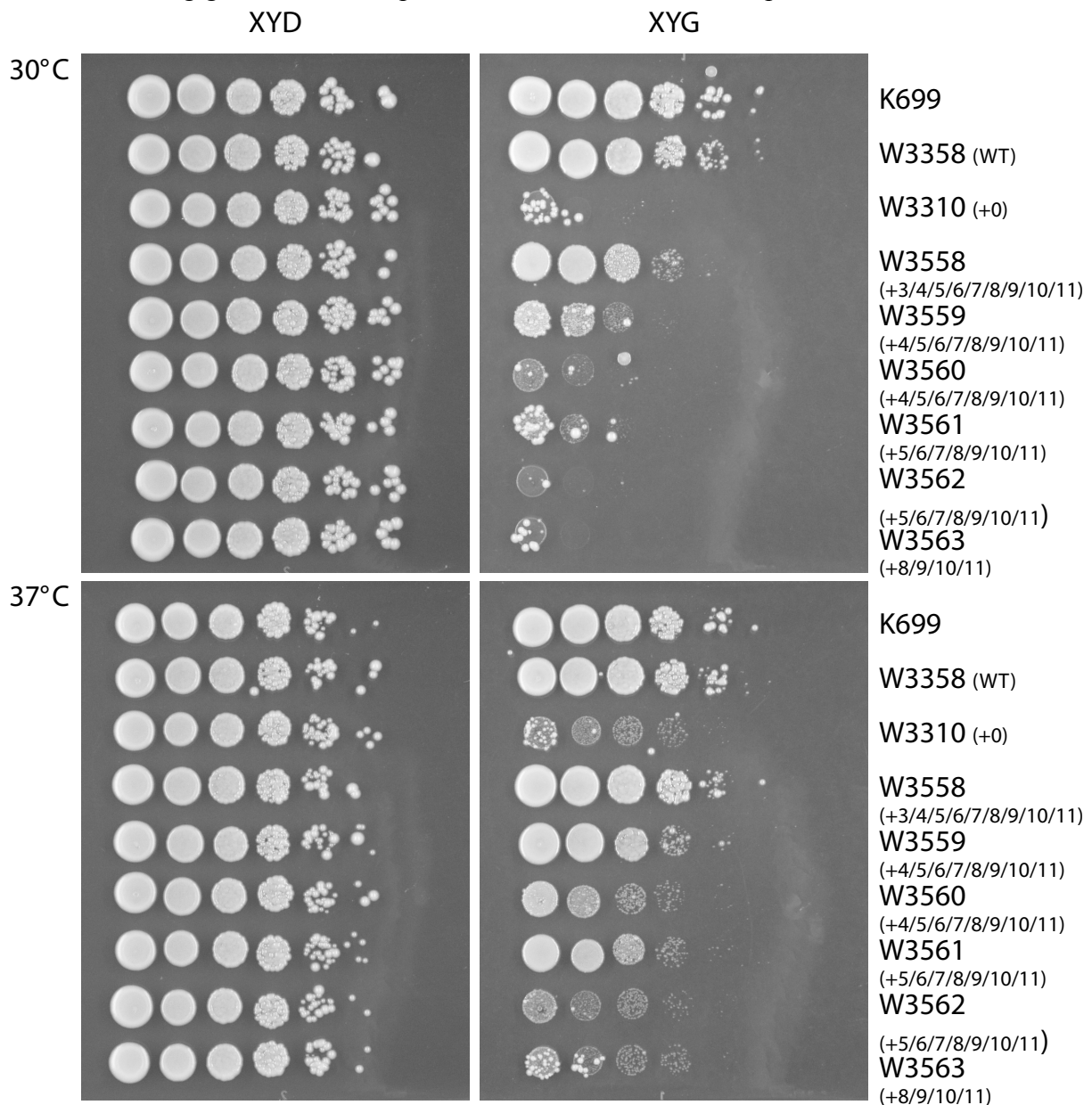


Abb. 34 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Wie Abb. 31. Stämme: K699, W3358, W3310, W3558 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3559 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3560 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3561 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3562 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1*) und W3563 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+8/9/10/11-TRP1*).

die letzten vier Positionen für Phosphorylierung zur Verfügung, ist die Überexpression des entsprechenden Konstruktes bei beiden getesteten Temperaturen letal. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Überexpression von *HCT1*-Konstrukten umso weniger schädlich für die Zellen ist, je mehr Cdc28-Konsensusstellen am C-Terminus des Proteins vorhanden sind. Auffallend ist auch, dass die Überexpression von *HCT1*+1/2/3/4 ein vergleichbar gutes Wachstum der Zellen ermöglicht wie die von *HCT1*+4/5/6/7/8/9/10/11, obwohl nur halb so viele potentielle Cdc28-Konsensusstellen für eine Phosphorylierung zur Verfügung stehen (vgl. Abb. 33 Reihe4 mit Abb. 34 Reihe 5).

Abb. 35 zeigt zwei Stämme, die Hct1-Varianten produzieren, die nur noch zwei bzw. drei Phosphorylierungsstellen am C-Terminus zur Verfügung stellen. Diese reichen nicht aus, um den Zellen bei Überexpression der entsprechenden Konstrukte bei 30°C oder bei 37°C

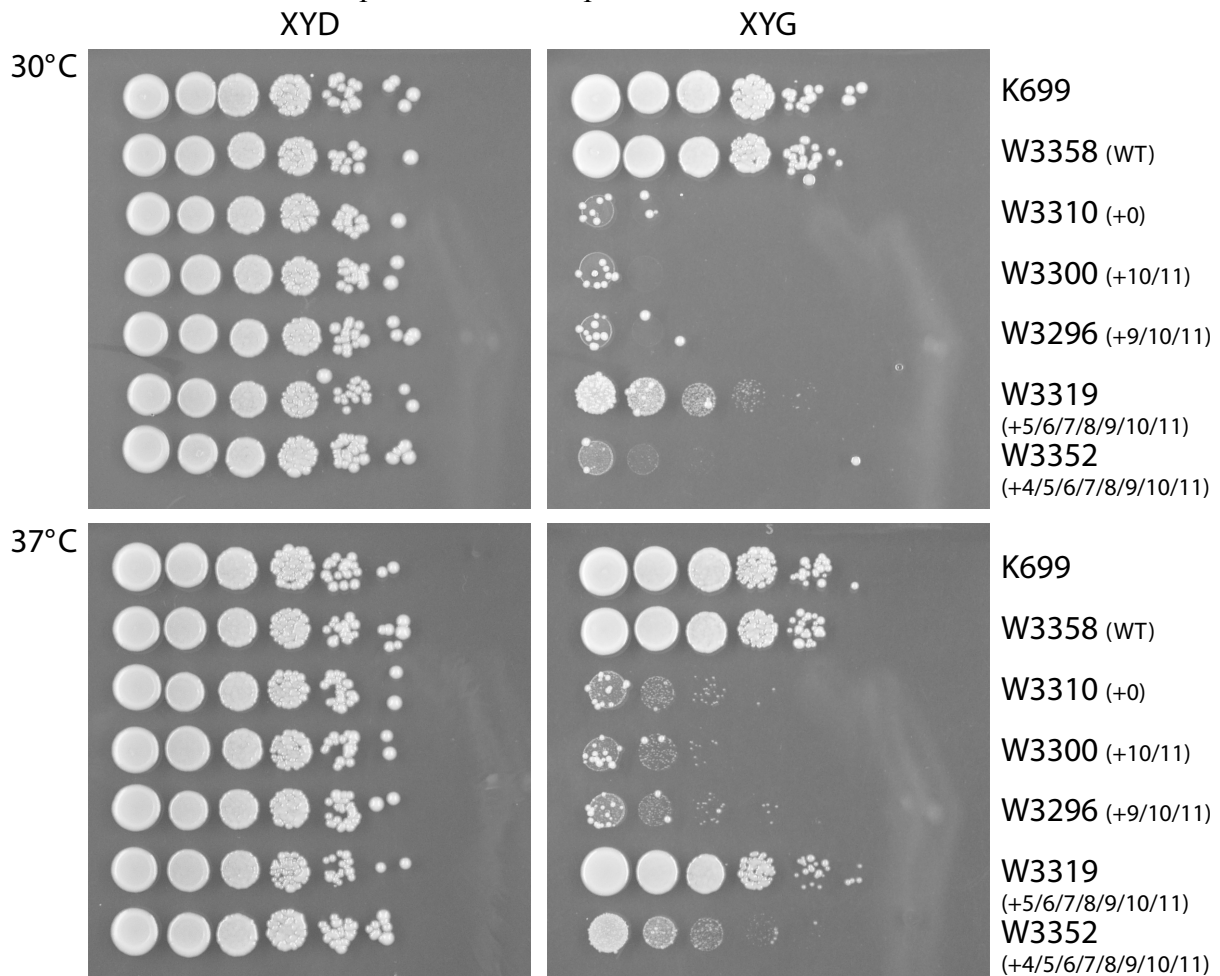


Abb. 35 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Wie Abb. 31. Stämme: K699, W3358, W3310, W3300 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+10/11-TRP1*), W3296 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+9/10/11-TRP1*), W3319 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1*) und W3352 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*).

Wachstum zu erlauben. Zusammen mit dem Ergebnis aus Abb. 34 Reihe 9 deutet dies darauf hin, dass die letzten vier Cdc28-Konsensusstellen alleine bei der Inaktivierung von Hct1 keine Rolle spielen.

In Abb. 36 schließlich sind Stämme zu sehen, die *HCT1*-Konstrukte mit verschiedenen Kombinationen an Cdc28-Phosphorylierungsstellen exprimieren. Der Stamm W3325 produziert ein Hct1 mit neun potentiellen Phosphorylierungsstellen, nur die beiden letzten Stellen, die in den WD40-Wiederholungseinheiten des Proteins angesiedelt sind, fehlen. Die Überproduktion dieses Proteins führt zu keiner Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen. Schon bei 30°C wächst der Stamm wie ein Wildtypstamm bzw. wie einer, der voll phosphorylierbares Hct1 produziert. Wenn diese neun Stellen vorhanden sind, scheint Hct1 in seiner Aktivität korrekt reguliert zu sein, zumindest was die Toxizität der Überexpression betrifft. Vergleicht man diesen Stamm mit Stamm W3558 (Abb. 34), der ebenfalls ein Konstrukt exprimiert, in

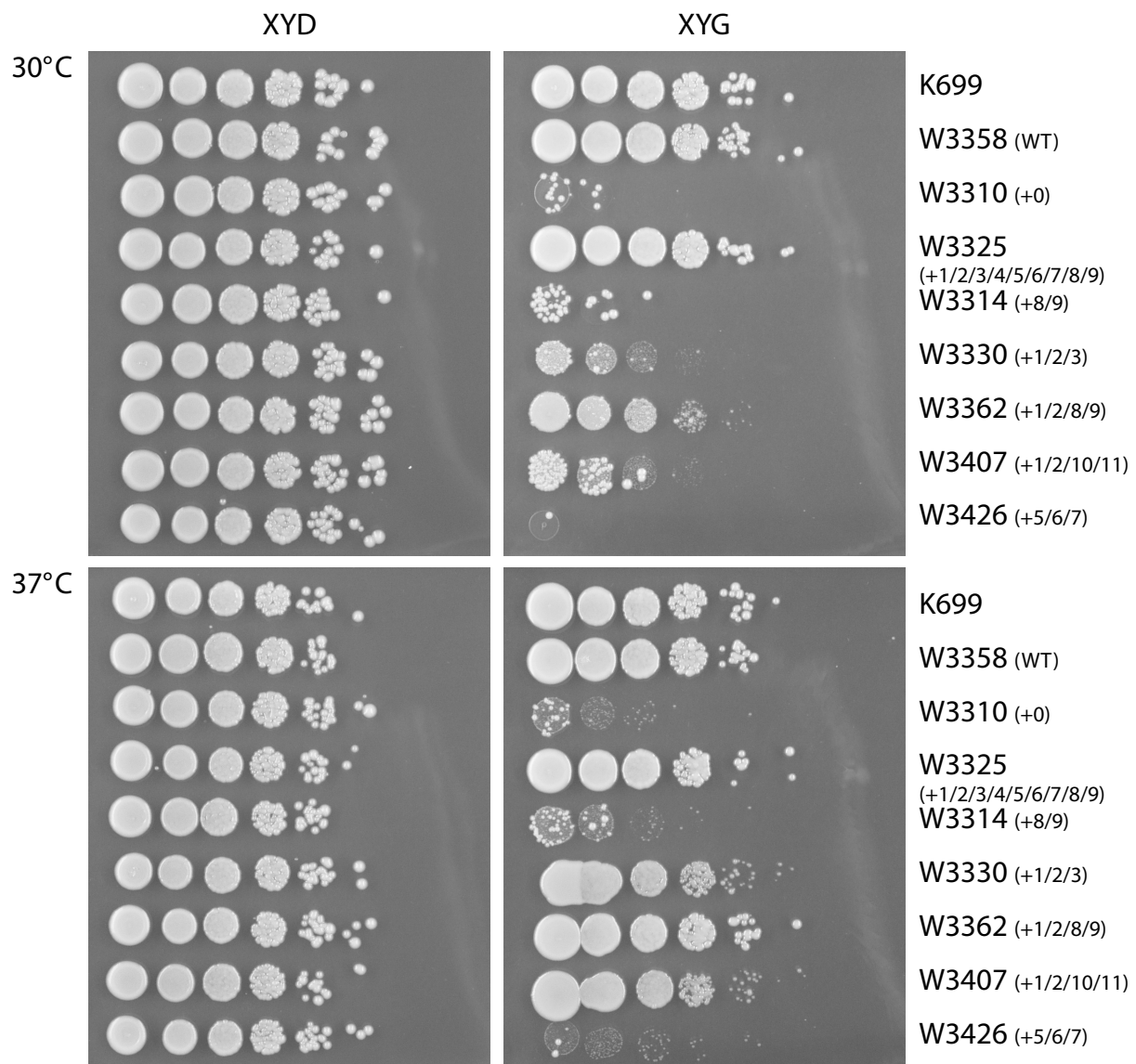



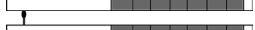
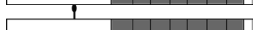



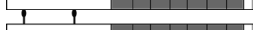








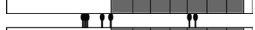
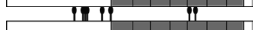








Abb. 36 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Wie Abb. 31. Stämme: K699, W3358, W3310, W3325 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9-TRP1*), W3314 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+8/9-TRP1*), W3330 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/3-TRP1*), W3362 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/8/9-TRP1*), W3407 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/10/11-TRP1*) und W3426 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+5/6/7-TRP1*).

dem noch neun potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden sind, so fällt auf, dass der Stamm, der das Protein mit den hinteren neun Stellen produziert (W3558) schlechter wächst, als der, der das Protein mit den vorderen neun Stellen produziert (W3325). Diese neun Stellen sind also nicht gleichwertig in ihrer Fähigkeit, Hct1 zu inhibieren. Das Vorhandensein der ersten drei Stellen ermöglicht den Zellen ein schwaches Wachstum bei 30°C und ein gutes Wachstum bei 37°C. Sind allerdings drei Stellen aus der Mitte des Proteins vorhanden, sind die Zellen tot (vgl. auch Abb. 32). Ein gutes bis sehr gutes Wachstum ermöglicht das Vorhandensein der ersten beiden Stellen in Kombination mit der zehnten und elften bzw. der achten und neunten Stelle. Wird *HCT1+1/2/8/9* überexprimiert, wächst der Stamm bei 37°C vergleichbar mit dem Stamm, der *HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9* überexprimiert und vergleichbar mit Wildtyp, obwohl nur vier potentielle Cdc28-Konsensusstellen vorhanden sind. Obwohl die Stellen acht/neun bzw. zehn/elf in Kombination mit den Stellen eins/zwei einen starken Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben, ist die Überexpression eines Konstruktes mit eben den letzten vier Stellen acht bis elf für die Zellen immer noch letal (vgl. Abb. 34, letzte Reihe).

Tab. 6 fasst die Ergebnisse der Wachstumstests zusammen. Zur Bewertung wurde eine Skala von 0 bis 5 verwendet. Als Bezugspunkt dienten der Stamm, der Hct1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11 produzierte und dessen Wachstum mit der Note fünf für sehr gutes Wachstum benotet wurde, und der Stamm, der Hct1+0 produzierte und der die Note null erhielt.

Konstrukt	Wachstum bei 30°C	Wachstum bei 37°C
 HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11	5	5
 HCT1+0	0	0
 HCT1+1	0	0
 HCT1+2	0	0
 HCT1+3	0	1
 HCT1+4	0	0
 HCT1+8	0	0
 HCT1+1/2	0	1-2
 HCT1+1/3	0	1-2
 HCT1+2/3	0	2-3
 HCT1+3/4	0	2-3
 HCT1+8/9	0	0
 HCT1+10/11	0	0
 HCT1+1/2/3	2	4
 HCT1+5/6/7	0	0
 HCT1+9/10/11	0	0
 HCT1+1/2/3/4	3	5
 HCT1+1/2/8/9	4	5
 HCT1+1/2/10/11	2	4
 HCT1+5/6/7/8	0	1
 HCT1+8/9/10/11	0	0
 HCT1+5/6/7/8/9/10/11	1-2	4
 HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11	2-3	3-4
 HCT1+3/4/5/6/7/8/9/10/11	3-4	5
 HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9	5	5

Tab. 6 Zusammenfassung der Lebensfähigkeit der Zellen nach Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate. In der ersten Spalte findet sich die schematische Darstellung des Proteins. Die sieben WD40-repeats im C-Terminus des Proteins sind grau dargestellt. In der zweiten Spalte finden sich die Bezeichnungen der verschiedenen *HCT1*-Konstrukte. Kreise repräsentieren Cdc28-Konsensusstellen, die im Protein vorhanden sind. In der dritten Spalte sind die Namen aller verwendeten Stämme aufgeführt. Das Wachstum der Zellen nach Überexpression der unterschiedlichen Konstrukte wurde mit Noten zwischen 0 und 5 bewertet. Dabei bedeutet 5 sehr gutes Wachstum und 0 überhaupt kein Wachstum.

6.6.2 Mobilität verschiedener Hct1-Varianten in der SDS-PAGE

Wildtyp-Hct1 läuft im SDS-Gel sehr heterogen. Die langsamer laufenden Spezies verschwinden nach Behandlung mit Phosphatase (Zachariae et al., 1998). Dies bestätigt, dass Hct1 ein Phosphoprotein ist. Das Hct1+0-Protein zeigt eine völlig veränderte Mobilität in der SDS-PAGE. Der Großteil des Proteins befindet sich in der untersten Bande. Über dieser erkennt man allerdings noch eine zweite Bande. Da in diesem Protein keine potentiellen Cdc28-Konsensusstellen mehr vorhanden sind, handelt es sich vermutlich um eine Phosphorylierung durch eine andere Kinase. Im Folgenden wurde nun untersucht, welchen Einfluss das sukzessive Hinzufügen einzelner Stellen zu Hct1+0 auf die Mobilität des Proteins hat. Abb. 37 zeigt Western Blots der Stämme, die auch auf ihre Lebensfähigkeit nach Überexpression der entsprechenden *HCT1*-Konstrukte getestet worden sind. Teilabbildung A zeigt Lysate von Stämmen, die Hct1-Varianten produzieren, die jeweils nur eine Cdc28-Phosphorylierungsstelle besitzen. Ist die erste, zweite, dritte oder vierte Stelle vorhanden, tritt die Bande, die bei dem vollständig mutierten Protein langsamer läuft, in verstärkter Intensität auf. Zusätzlich sieht man darüber noch sehr schwach eine zusätzliche Bande. Der Stamm, der Hct1+4 produziert, hat allerdings mehr als eine Integration des Konstruktes im Genom, so dass die Verstärkung der oberen Bande auch auf die insgesamt stärkere Expression zurückgeführt werden kann. Ist nur die achte Stelle vorhanden, sieht das Protein im Western Blot aus wie das Hct1+0-Protein. Man kann also vermuten, dass zumindest die ersten drei der vier N-terminalen Konsensusstellen von Hct1 für die Phosphorylierung durch Cdc28-Kinase benützt werden und dass sich diese Phosphorylierung in einer Mobilitätsveränderung des Proteins manifestiert. Für die achte Stelle kann nicht entschieden werden, ob sie nicht benützt wird, oder ob die Phosphorylierung an dieser Stelle nur keine Mobilitätsveränderung hervorruft. Abb. 37 B zeigt Lysate von Stämmen, die Konstrukte exprimieren, die verschiedene Kombinationen der ersten vier Stellen aufweisen. Sind alle vier Stellen im gleichen Protein vorhanden, bewirkt dies eine deutliche Mobilitätsveränderung im Vergleich zu Hct1+0. Fast genauso sieht das Protein aus, wenn nur die ersten beiden Stellen vorhanden sind. Stehen die Stellen zwei und drei für eine Phosphorylierung zur Verfügung, treten ebenfalls langsamer laufende Spezies auf, allerdings unterscheidet sich deren Muster von dem von Hct1+1/2. Sind die Stellen drei und vier vorhanden, sieht das Muster aus wie in Hct1+0, allerdings ist die obere Bande verstärkt. Der Austausch der dritten und vierten Stelle zu einem Aspartat hat keine Auswirkung auf die Morphologie des Proteins in der SDS-PAGE. Da die Kombination der ersten vier Stellen zu Mobilitätsveränderungen des Proteins führt, kann geschlossen werden, dass diese vier Stellen

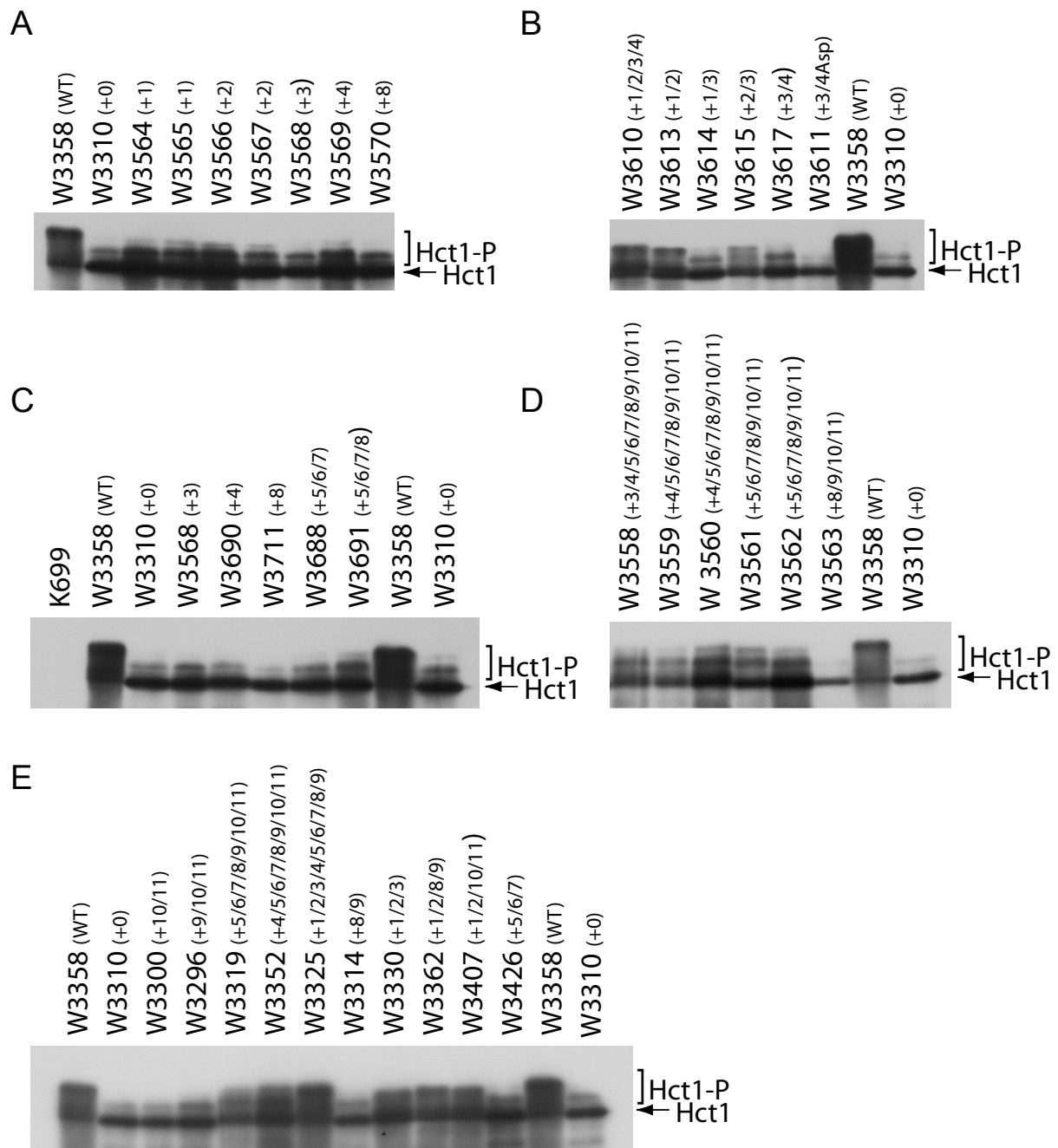


Abb. 37 Laufverhalten verschiedener Hct1-Varianten in der SDS-PAGE. Um zu untersuchen, wie sich das Vorhandensein einzelner Cdc28-Konsensusstellen auf das Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE auswirkt, wurden Zellen, die die entsprechenden Konstrukte vom *GALL*-Promotor überexprimierten, aus einer Übernachtskultur auf 0,3 OD₆₀₀/ml in XYRaffinose-Medium verdünnt und nach ca. 4 h bei 26°C mit 2% Galaktose behandelt, um den Promotor anzuschalten. Nach 2 h wurden die Zellen geerntet und für einen Western Blot aufgearbeitet. Der Nachweis von ^{HA3}Hct1x erfolgte mit 12CA5. (A) Stämme: W3358 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3310 (*trp1::GALL-HA3HCT1+0-TRP1*), W3564 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1-TRP1*), W3565 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1-TRP1*), W3566 (*trp1::GALL-HA3HCT1+2-TRP1*), W3567 (*trp1::GALL-HA3HCT1+2-TRP1*), W3568 (*trp1::GALL-HA3HCT1+3-TRP1*), W3569 (*trp1::GALL-HA3HCT1+4-TRP1*), W3570 (*trp1::GALL-HA3HCT1+8-TRP1*). (B) wie oben, Stämme: W3610 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1/2/3/4-TRP1*), W3613 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1/2-TRP1*), W3614 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1/3-TRP1*), W3615 (*trp1::GALL-HA3HCT1+2/3-TRP1*), W3617 (*trp1::GALL-HA3HCT1+3/4-TRP1*), W3611 (*trp1::GALL-HA3HCT1+3Asp/4Asp-TRP1*), W3358 und W3310. (C) wie oben, Stämme: W3358, W3310,

W3568, W3690 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+4-TRP1*), W3711 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+8-TRP1*), W3688 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7-TRP1*) und W3691 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7/8-TRP1*). (D) wie oben, Stämme: W3358, W3310, W3558 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3559 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3560 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3561 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3562 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1*) und W3563 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+8/9/10/11-TRP1*). (E) wie oben, Stämme: W3358, W3310, W3300 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+10/11-TRP1*), W3296 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+9/10/11-TRP1*), W3319 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1*) und W3352 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1*), W3325 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9-TRP1*), W3314 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+8/9-TRP1*), W3330 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+1/2/3-TRP1*), W3362 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+1/2/8/9-TRP1*), W3407 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+1/2/10/11-TRP1*) und W3426 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1+5/6/7-TRP1*).

in vivo auch tatsächlich für Phosphorylierung genutzt werden und somit relevant sind für die Regulation von Hct1. In Teilabbildung C sieht man verschiedene Stämme, die alle eine Integration des *GALL-HCT1*-Konstruktes im Genom integriert haben. Ist die dritte Cdc28-Konsensusstelle vorhanden, scheint die oberste Bande in dem entsprechenden Protein im Vergleich zu Hct1+0 verstärkt zu sein. Eine deutliche Mobilitätsveränderung mit Banden im höhermolekularen Bereich tritt aber erst auf, wenn die Stellen fünf bis acht vorhanden sind. Die Überexpression dieses Konstruktes erlaubt den Zellen auch ein gewisses Wachstum bei 37°C. Abb. 37 D zeigt Proteine, in denen unterschiedlich viele Phosphorylierungsstellen am C-Terminus des Proteins noch vorhanden sind. Sind die letzten sieben, acht oder neun Cdc28-Konsensusstellen vorhanden, treten Banden im höhermolekularen Bereich auf. Das Muster der Phosphorylierung unterscheidet sich aber von dem des Wildtypproteins insofern, als dass die oberste Bande fehlt und das Muster der Banden anders ist. Sind allerdings nur die letzten vier Stellen in phosphorylierbarer Form vorhanden, so sieht das Protein aus wie Hct1+0. Die letzten vier Stellen scheinen also entweder nicht phosphoryliert zu werden, oder ihre Phosphorylierung bewirkt keine Mobilitätsveränderung des Proteins. Diese Annahme wird in Teilabbildung E bestätigt, da Hct1 auch keine Mobilitätsveränderung zeigt, wenn die letzten zwei oder drei Stellen vorhanden sind, ebenso wenig wenn die Stellen acht und neun zur Verfügung stehen. Im Gegensatz dazu tritt eine starke Veränderung des Laufverhaltens des Proteins auf, wenn die Stellen acht und neun bzw. zehn und elf kombiniert sind mit den ersten beiden Stellen. Das Muster dieser Proteine im Western Blot entspricht dem des Wildtypproteins mit der Ausnahme, dass die Banden in einem etwas niedermolekularen Bereich angesiedelt sind. Das gleiche gilt, wenn die ersten drei Cdc28-Konsensusstellen für eine Phosphorylierung zur Verfügung stehen. Insgesamt kann gesagt werden, dass das Auftreten von höhermolekularen Formen von Hct1 und damit von Phosphorylierung mit der Wachstumsfähigkeit der Zellen nach Überexpression der entsprechende Konstrukte korreliert.

6.6.3 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Konstrukte auf die Stabilität des Zyklins Clb2

Die Degradation von Clb2 nach Überexpression von *HCT1* ist ein guter Test für die Aktivität von Hct1. Je mehr Cdc28-Konsensusstellen in Hct1 zu einem Alanin mutiert sind, desto aktiver ist das Protein in Bezug auf die Degradation von Clb2 (Zachariae et al., 1998). Die moderate Überexpression von *HCT1* vom *GALL*-Promotor bei 30°C tolerieren die Zellen, wohingegen die Überexpression von *HCT1+0* auch unter diesen Bedingungen letal ist für die Zellen (Abb. 31). Es sollte nun überprüft werden, ob die Letalität der Überexpression von *HCT1+0* auf eine

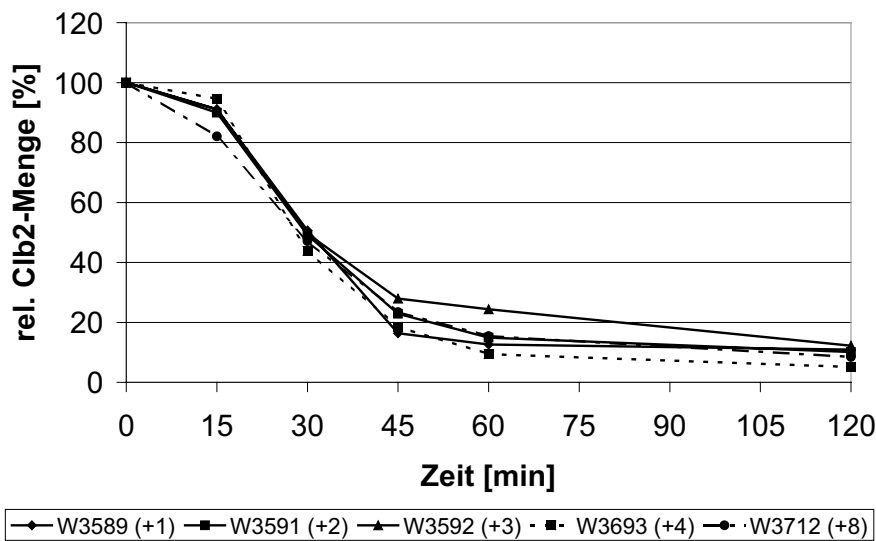
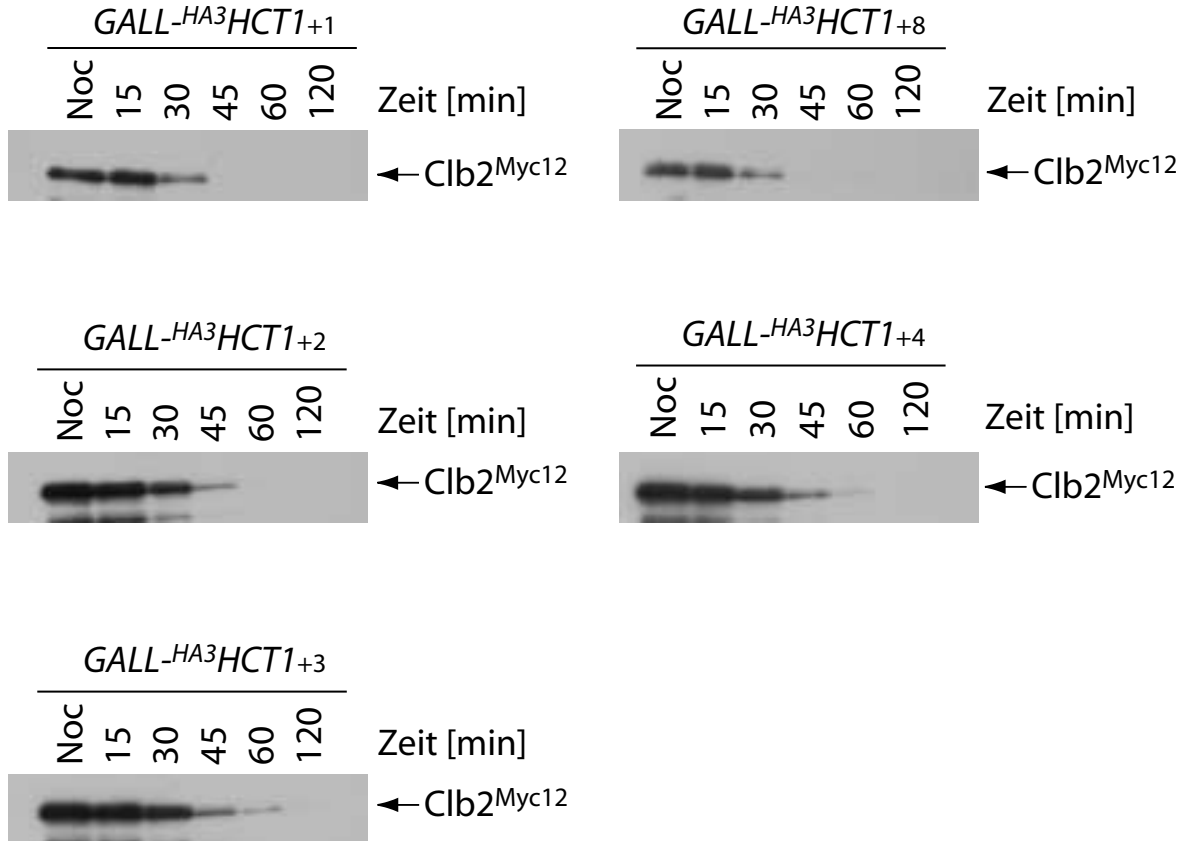


Abb. 38 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate mit einer Cdc28-Konsensusstelle auf die Degradation von Clb2. In XYRaffinose wachsende Zellen der entsprechenden Stämme wurden bei 30°C mit Nocodazol behandelt. Nach Erreichen des Arrestes wurde der *GALL*-Promotor durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und für eine Western Blot Analyse aufgearbeitet. Clb2^{Myc12} wurde mit 9E10 detektiert. Für die quantitative Analyse der Clb2-Mengen wurden die Proteinproben auf 0,5 OD₅₉₅/5µl in 1x Lämmli-Probenpuffer verdünnt. 5 µl dieser Proben wurden auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Dabei wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Der Nachweis von Clb2^{Myc12} erfolgte mit 9E10. Als sekundärer Antikörper wurde ein α-Maus Antikörper gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase verwendet. Die mit dem ECF-Substrat entstehende Fluoreszenz wurde mit dem Phosphoimager gemessen. Für die Auswertung mit Microsoft Excel wurde die Menge an Clb2 im Nocodazolarrest auf 100% gesetzt. Stämme: W3589 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3591 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+2-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3592 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+3-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3693 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+4-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*) und W3712 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+8-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*).

vermehrte Clb2-Degradation zurückgeführt werden kann. Hierfür wurden die Zellen bei 30°C mit Nocodazol arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurde die Expression der verschiedenen *HCT1*-Konstrukte vom *GALL*-Promotor durch Zugabe von Galaktose induziert. In kurzen Intervallen wurden Proben genommen, die auf das Vorhandensein von Clb2 im Western Blot untersucht wurden. Die Western Blot Analyse ergibt allerdings nur einen qualitativen Eindruck beim Vergleich der verschiedenen Derivate, da aus technischen Gründen die einzelnen Blots nicht direkt vergleichbar sind. Deshalb wurde die Clb2-Menge in den einzelnen Experimenten mit einer unabhängigen Methode quantifiziert (5,6,5). Dabei diente die Menge von Clb2 im Nocodazolarrest als Bezugspunkt für die quantitative Auswertung, da im Arrest die Clb2-Menge maximal sein sollte. Die Quantifizierung von Clb2^{Myc12} erfolgte durch Aufbringen der Proteinproben auf eine PVDF-Membran, Inkubation der Membran mit 9E10 und einem α-Maus Antikörper, der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt war. Die Menge des durch die alkalische Phosphatase umgesetzten ECF-Substrates wurde mittels Laserscanner quantifiziert. Abb. 38 zeigt die Wirkung der Überexpression von *HCT1*-Konstrukten, in denen immer nur eine Cdc28-Konsensusstelle vorhanden ist. Die Überexpression all dieser Konstrukte bewirkt eine komplette Degradation von Clb2, wobei sich die Menge des Zyklins zwischen 60 min und 120 min Galaktose-Induktion nicht mehr wesentlich verändert. Nach 120 min Galaktose-Induktion weisen in der quantitativen Auswertung alle Stämme zwischen 5 und 10% der Clb2-Menge im Nocodazolarrest auf. Im Western Blot lässt sich diese geringe Menge überhaupt nicht mehr nachweisen. Von den hier gezeigten *HCT1*-Derivaten erlaubt nur dasjenige mit der dritten Stelle ein schwaches Wachstum der Zellen bei 37°C. Offensichtlich ist dieses Wachstum bei erhöhter Temperatur nicht verbunden mit einer Stabilisierung von Clb2 bei 30°C.

In Abb. 39 sind Stämme zusammengefasst, die Hct1-Derivate produzieren, die über zwei Cdc28-Konsensusstellen verfügen. Alle diese Proteine sind bei Überproduktion noch in der Lage, die Clb2-Degradation bei 30°C zu induzieren. Hct1-Varianten, die Kombinationen der ersten vier Cdc28-Konsensusstellen tragen, werden phosphoryliert (Abb. 37 B) und ermöglichen bei moderater Überproduktion das Wachstum der Zellen (Abb. 33 37°C). Die Phosphorylierung

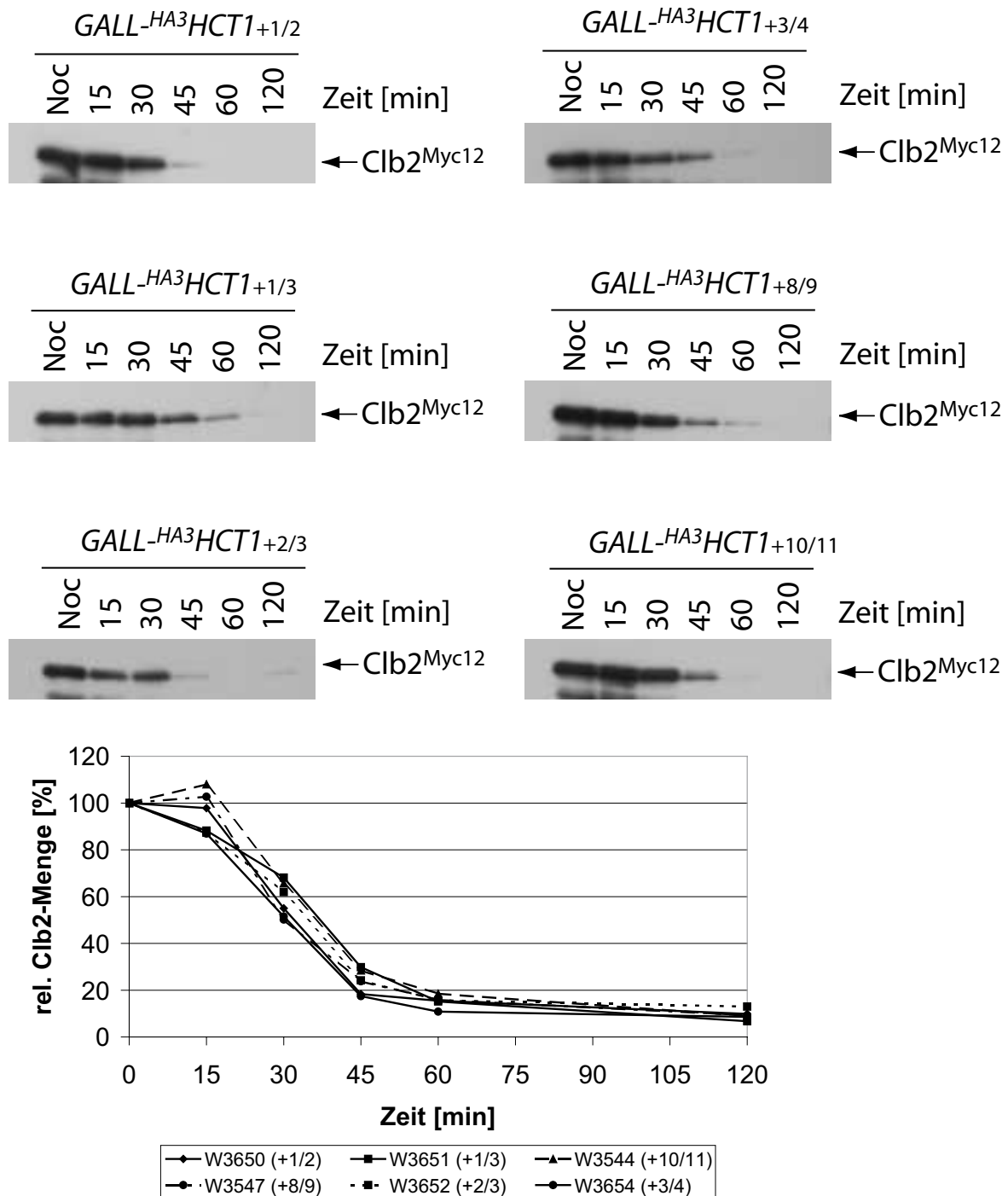


Abb. 39 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate mit zwei Cdc28-Konsensusstelle auf die Degradation von Clb2. wie Abb. 38, Stämme: W3650 (*trp1::GALL-HA3HCT1*_{+1/2} *clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3651 (*trp1::GALL-HA3HCT1*_{+1/3} *clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3544 (*trp1::GALL-HA3HCT1*_{+10/11}-*TRP1* *clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3547 (*trp1::GALL-HA3HCT1*_{+8/9}-*TRP1* *clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3652 (*trp1::GALL-HA3HCT1*_{+2/3}-*TRP1* *clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*) und W3654 (*trp1::GALL-HA3HCT1*_{+3/4}-*TRP1* *clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*).

an diesen Stellen inaktiviert Hct1 aber nicht ausreichend, um bei stärkerer Überproduktion das Zyklin Clb2 zu stabilisieren.

In Abb. 40 ist die Wirkung der Überexpression von *HCT1*-Konstrukten gezeigt, die über drei

Cdc28-Konsensusstellen verfügen. Als Vergleich dient der Stamm, der Hct1+0 produziert, der maximal aktiv ist. Die Überexpression von *HCT1+1/2/3* führt nicht mehr zu einer kompletten Degradation von Clb2 im beobachteten Zeitraum. Im Western Blot sind nach 120 min noch substantielle Mengen an Clb2 nachweisbar. In der quantitativen Analyse entspricht dies einer Clb2-Menge von 24% des Ausgangswertes. Dieser Befund korreliert mit der Tatsache, dass die Überexpression von *HCT1+1/2/3* bei 30°C nicht mehr letal ist für die Zellen (Abb. 36). Die Hct1-Variante, in der die neunte bis elfte Phosphorylierungsstelle vorhanden ist, scheint die gleiche Aktivität zu besitzen wie Hct1+0.

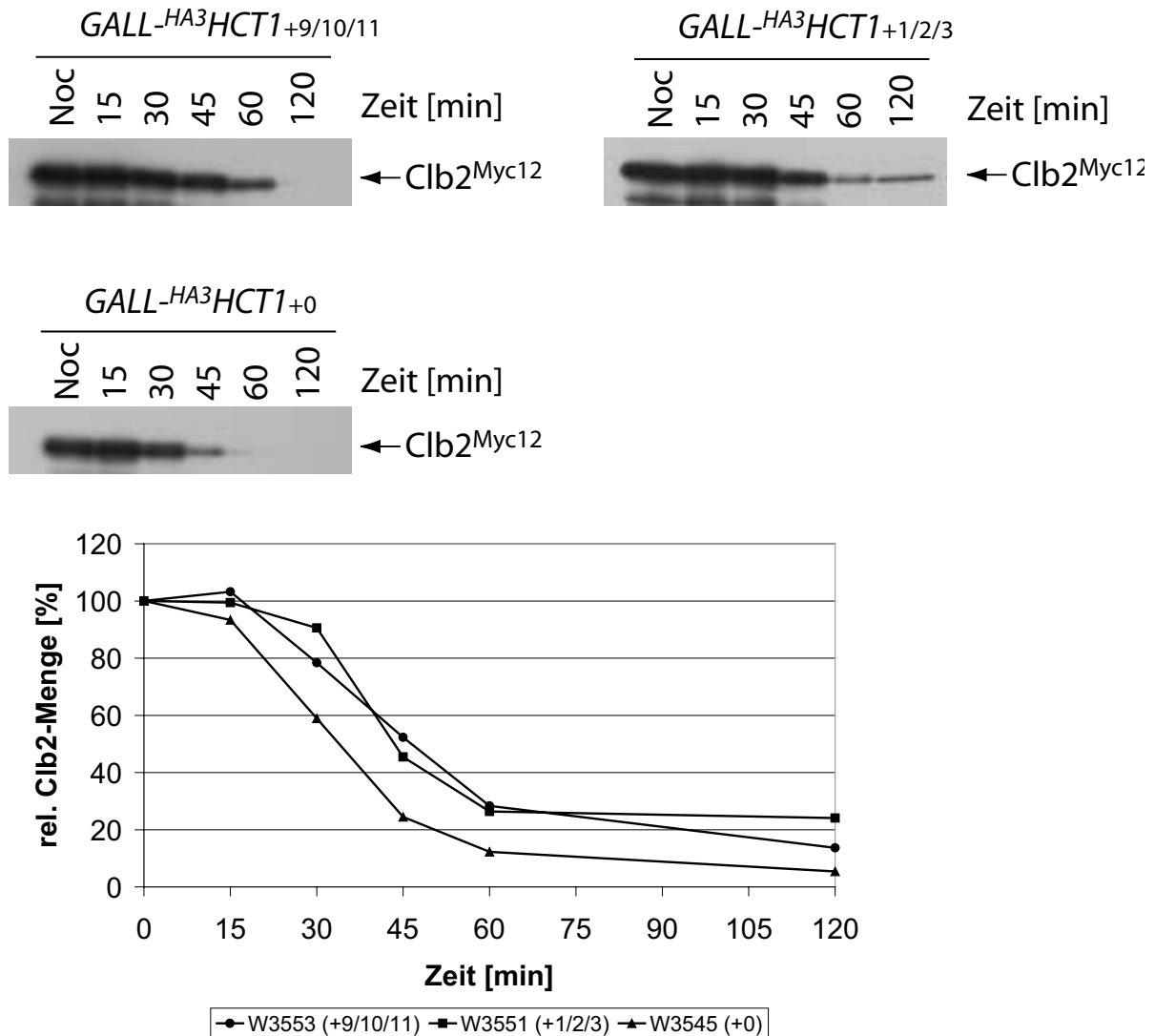


Abb. 40 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate mit drei Cdc28-Konsensusstelle auf die Degradation von Clb2. wie Abb. 38, Stämme: W3553 (*trp1::GALL-HA3HCT1+9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3551 (*trp1::GALL-HA3HCT1+1/2/3-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*) und W3545 (*trp::GALL-HA3HCT1+0-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*).

Abb. 41 fasst Stämme zusammen, die Hct1-Derivate mit vier Cdc28-Konsensusstellen exprimieren. Als Vergleich dient wiederum der Stamm mit Hct1+0. Sowohl das Vorhandensein der Stellen fünf bis acht als auch der Stellen acht bis elf hat keinen Einfluss auf die Degradation

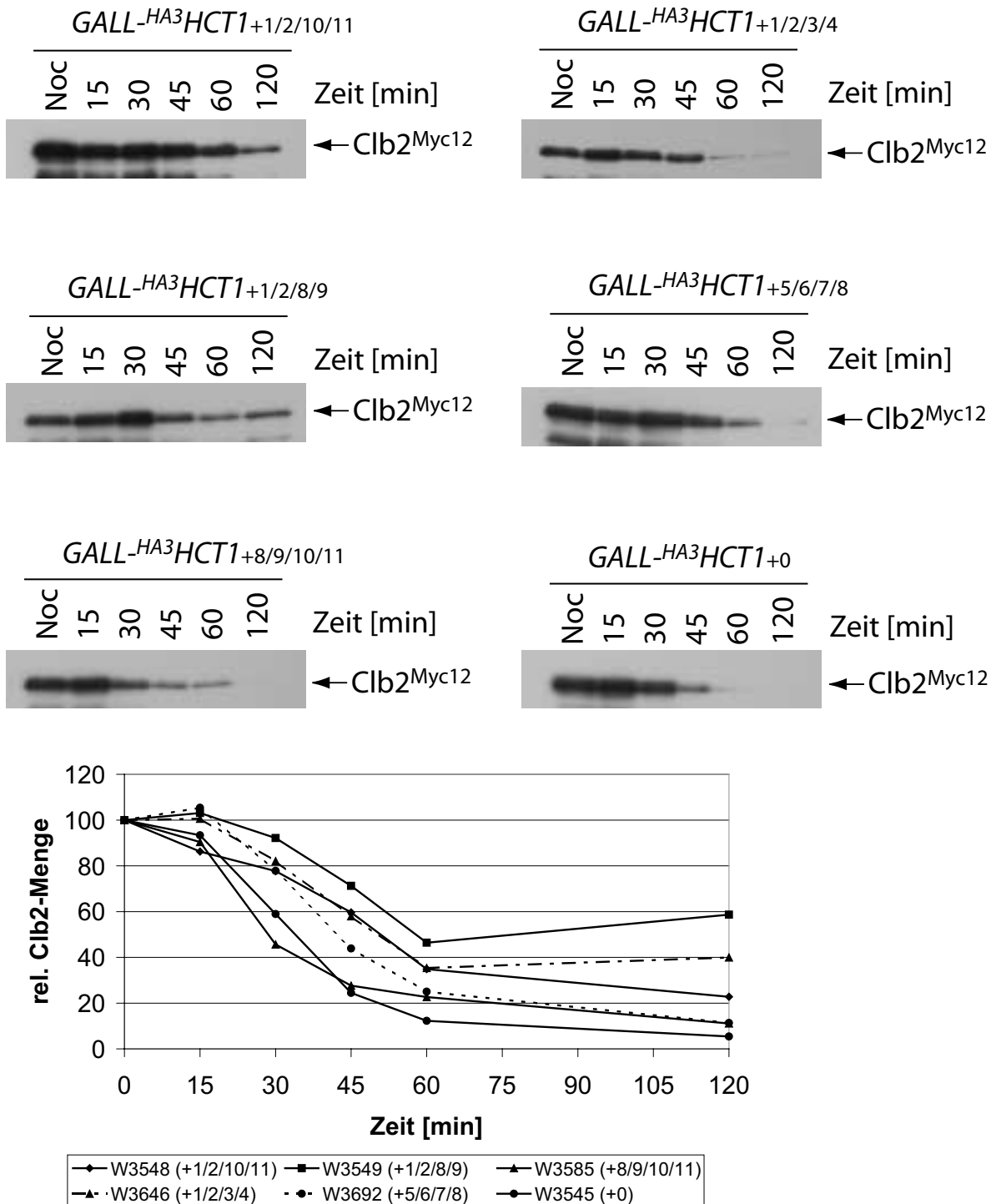


Abb. 41 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate mit vier Cdc28-Konsensusstelle auf die Degradation von Clb2. wie Abb. 38, Stämme: W3548 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1_{+1/2/10/11}-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3549 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1_{+1/2/8/9}-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3585 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1_{+8/9/10/11}-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3646 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1_{+1/2/3/4} clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3692 (*trp1::GALL^{-HA3}HCT1_{+5/6/7/8}-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*) und W3545 (*trp::GALL^{-HA3}HCT1₊₀-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*).

von Clb2. Die entsprechenden Stämme zeigen bei 30°C auf Galaktose-Platten auch kein Wachstum. Sind hingegen die Stellen eins und zwei in Kombination mit den Stellen acht und neun bzw. zehn und elf noch im Protein vorhanden, führt dies zu einer deutlichen Stabilisierung von Clb2 nach Überexpression der entsprechenden Konstrukte. Am wenigsten aktiv ist Hct1+1/2/8/9. Bei Überproduktion dieses Proteins fällt die Clb2-Menge nur auf 58% des Ausgangswertes. Bei Hct1+1/2/3/4 sind es 40% und bei Hct1+1/2/10/11 nur noch rund 23%. Die beste Inhibierung von Hct1 wird also erreicht, wenn die Stellen eins, zwei, acht und neun noch für eine Phosphorylierung zur Verfügung stehen. Die Stabilisierung von Clb2 korreliert mit der Lebensfähigkeit der Zellen bei 30°C nach Überexpression der verschiedenen Konstrukte. Eine

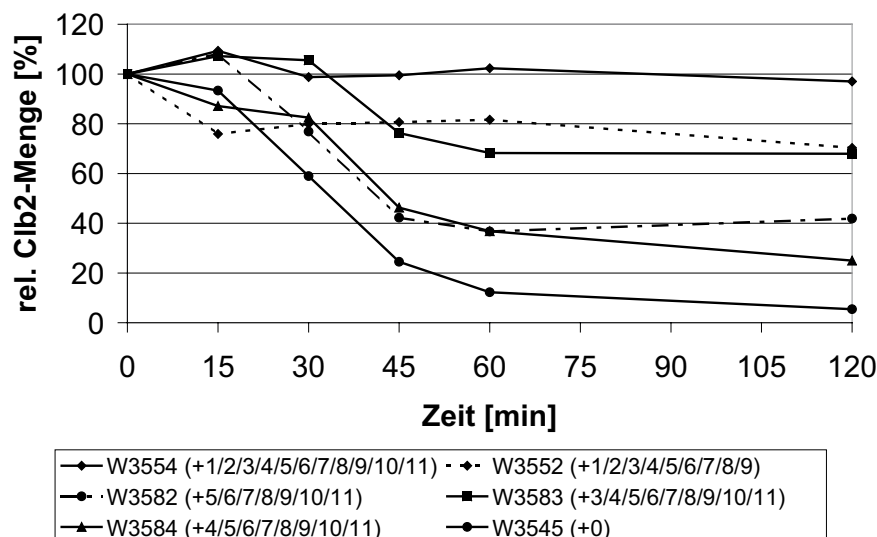
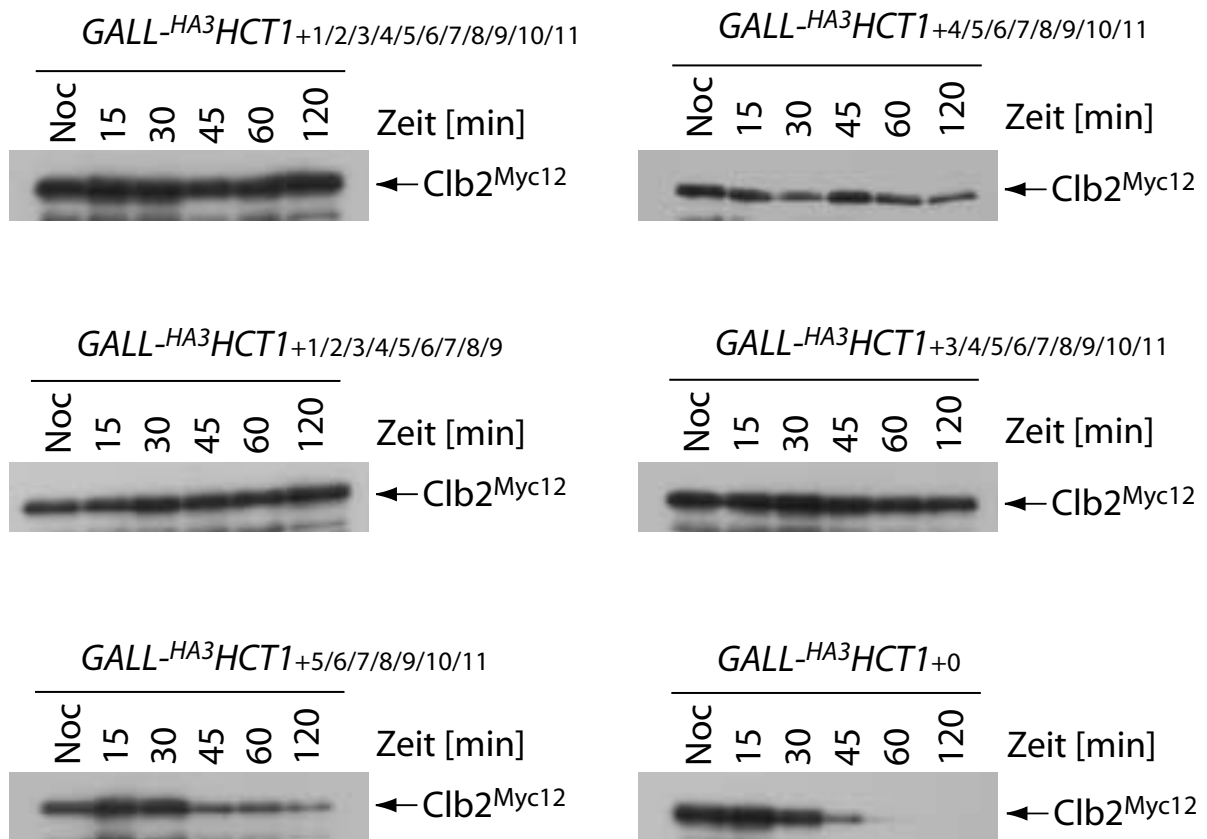


Abb. 42 Einfluss der Überexpression verschiedener *HCT1*-Derivate mit mehr als vier *Cdc28*-Konsensusstelle auf die Degradation von *Clb2*. wie Abb. 38, Stämme: W3554 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3552 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+1/2/3/4/5/6/7/8/9-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3582 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+5/6/7/8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3583 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+3/4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*), W3584 (*trp1::GALL^{HA3}HCT1+4/5/6/7/8/9/10/11-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*) und W3545 (*trp::GALL^{HA3}HCT1+0-TRP1 clb2::CLB2^{MYC12}-URA3*).

geringere Degradation von *Clb2* geht einher mit besserem Wachstum der Zellen.

Abb. 42 zeigt die Ergebnisse mit den Stämmen, die mehr als vier potentielle Phosphorylierungsstellen in *Hct1* aufweisen. Als Vergleich dient der Stamm, der das Wildtypprotein mit allen elf *Cdc28*-Konsensusstellen produziert, bzw. der Stamm, der *Hct1+0* produziert. Die Überexpression von *HCT1* bei 30°C hat keinen Einfluss auf die Menge von *Clb2*. Die *Clb2*-Menge bleibt auf dem Niveau des Nocodazolarrestes. Eine ähnlich gute Stabilisierung von *Clb2* ist zu beobachten, wenn noch neun potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden sind, dabei ist es gleichgültig, ob es die ersten oder die letzten neun Positionen sind. Sind die letzten sieben oder acht Stellen vorhanden, werden immer noch ca. 60% des im Nocodazolarrestes vorhandenen *Clb2* degradiert. Dies ist vergleichbar mit der Situation, wenn nur die ersten vier Stellen zur Verfügung stehen. Eine bessere Stabilisierung von *Clb2* erreicht man allerdings, wenn *Hct1+1/2/8/9* überproduziert wird. Das Vorhandensein dieser vier Positionen verhindert die Degradation von *Clb2* ähnlich wirksam wie neun *Cdk1*-Konsensusstellen am N- bzw. C-Terminus des überproduzierten *Hct1*. Damit stimmt überein, dass die Überexpression dieses Konstruktes bei 30°C den Zellen am wenigsten schadet.

6.7 *Cdc5* und das DNA-Schadenskontrollsystem

In Antwort auf einen DNA-Schaden arretieren Zellen in der G2/M-Phase des Zellteilungszyklus. Die Verzögerung des Teilungszyklus soll der Zelle die Möglichkeit geben, den Schaden zu reparieren bevor sie ihre DNA in der Anaphase auf Mutter- und Tochterzelle verteilt. An diesem „Checkpoint“ sind verschiedene Genprodukte beteiligt, unter anderem Rad9, Rad17, Rad24 und Rad53. Der G2/M-Arrest, der durch einen DNA-Schaden induziert wird, ist durch hohe Mengen an stabilem, hyperphosphoryliertem Pds1 gekennzeichnet. Für die Phosphorylierung von Pds1 wird die Kinase Chk1 benötigt (Wang et al., 2001). Gelingt es der Zelle nicht, den DNA-Schaden zu beheben, schreitet sie nach ca. 24 h trotzdem im Zellzyklus fort. Dieser Prozess ist als Adaptation bekannt. Die Literatur (Toczyski et al., 1997) beschreibt eine Mutante von *Cdc5*, die an einen DNA-Schaden nicht mehr adaptieren kann. Sie verbleibt nach einem DNA-Schaden permanent in G2/M arretiert. Die dazugehörige Mutation wurde als Austausch eines Leucins an Position 251 gegen ein Tryptophan (L251W) identifiziert. Wird *cdc5^{L251W}* auf einem Plasmid zur Verfügung gestellt, rettet es die *cdc5-1*-Mutation. Dies bedeutet, dass der Funktionsverlust der Adaptationsmutante von *CDC5* nicht essentiell sein kann. *Cdc5* selbst wird in Antwort auf einen DNA-Schaden modifiziert (Cheng et al., 1998). Es werden zwei Modelle für die Funktion von *Cdc5* im DNA-Schadenskontrollsystem vorgeschlagen. Entweder ist *Cdc5* ein Ziel des „Checkpoints“ oder es kann den Arrest normalerweise inaktivieren oder

umgehen. Weil Cdc5 eine Kinase ist, liegt im zweiten Fall die Vermutung nahe, dass die Adaptationsmutante bestimmte Substrate nicht mehr phosphorylieren kann. Da der Arrest gekennzeichnet ist durch einen ungeteilten Kern am Übergang von der Mutter- zur Tochterzelle, muss die Phosphorylierung dieses potentiellen Substrates vor der Anaphase stattfinden.

Im folgenden Teil der Arbeit wurde versucht, die Rolle von Cdc5 im DNA-Schadenskontrollsystem näher zu charakterisieren.

6.7.1 Die Überexpression von *CDC5* überschreibt den *cdc13-1*-Arrest

Cdc13 ist ein Telomer-bindendes Protein. Das Produkt des *ts*-Allels *cdc13-1* kann nicht mehr an die Telomere binden. Dadurch tritt an den Telomeren freie Einzelstrang-DNA auf, was zum Auslösen des DNA-Schadenskontrollsystems führt (Garvik et al., 1995, Pang et al., 2003). Die Zellen arretieren *RAD9*-abhängig in der G2/M-Phase mit einem Kernsignal am Übergang von der Mutter- zur Tochterzelle. Die *cdc5^{L251W}*-Mutante kann sich auch an diesen Arrest nicht mehr adaptieren. Es wurde nun untersucht, ob die Überexpression von *CDC5* im *cdc13-1*-Arrest einen Effekt auf die Morphologie der Zellen hat. Hierzu wurden *cdc13-1*-Mutanten durch Inkubation bei erhöhter Temperatur arretiert. Die Expression von *CDC5* wurde dann durch Zugabe von Galaktose induziert. Im *cdc13-1*-Arrest und nach 2 h Galaktoseinduktion wurden Proben entnommen und für eine Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Untersucht wurde die Kernmorphologie sowie die Morphologie der Spindel. Im *cdc13-1*-Arrest befindet sich das

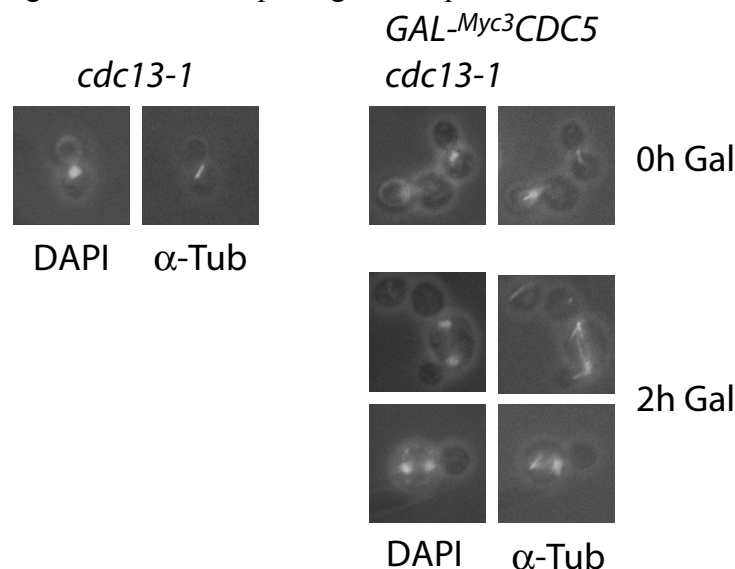


Abb. 43 Die Überexpression von *CDC5* im *cdc13-1*-Arrest führt zur Kerntrennung. Um den Effekt der Überexpression von *CDC5* im *cdc13-1*-Arrest auf die Zellmorphologie zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Zellen der Stämme W3085 (*cdc13-1*) und W3086 (*cdc13-1 ura3::GAL1^{-MYC3}CDC5-URA3*), die in XYRaffinose gewachsen waren, wurden bei einer OD_{600} von 0,3 zu 32°C gebracht, um das *cdc13*-Allel zu inaktivieren. Nach Erreichen des Arrestes wurde die Expression von *CDC5* durch Zugabe von Galaktose induziert. Nach 2 h wurden die Zellen geerntet und für 45 min mit Formaldehyd fixiert und anschließend für die Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Die Spindeln wurden mit dem α -Tubulin-Antikörper Yol1/34 aus Ratte nachgewiesen. Als sekundäre Antikörper wurde ein α -Ratte-Antikörper gekoppelt mit Alexa 488 verwendet. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop wurden Diapositive angefertigt.

Kernsignal am Übergang von der Mutter- zur Tochterzelle. Die kurze Spindel befindet sich an der Position des Kerns. Nach Überexpression von *CDC5* treten Zellen mit einer veränderten Morphologie auf. Ein Teil der Zellen weist zwei DAPI-Signale in der Mutterzelle auf. In diesen Zellen ist das Tubulinsignal diffus um das Kernsignal angeordnet, man findet kaum Mikrotubuli zwischen den beiden Kernsignalen. Vielmehr sieht es so aus, als ob hauptsächlich astrale Mikrotubuli vorhanden sind (Abb. 43). Die Überexpression von *CDC5* im *cdc13-1*-Arrest führt also in einem Teil der Zellen zu einer verfrühten Kerntrennung. Der Arrest ist in diesen Zellen somit überwunden.

6.7.2 Die Überexpression von *CDC5* im *cdc13*-Arrest führt zur Degradation von Pds1

Die in Abb. 43 beobachtete Zellmorphologie legt die Vermutung nahe, dass eine vermehrte Cdc5-Aktivität zu einer Aufhebung des „Checkpoint“-Arrestes führen kann. Damit Zellen ihre Kerne trennen können, muss die Kohesion zwischen den Schwesterchromatiden aufgehoben werden. Der Verlust der Kohesion wird durch die Spaltung der Kohesin-Untereinheit Scc1 durch die Separase Esp1 hervorgerufen. Esp1 wird vor Beginn der Anaphase von Pds1 inhibiert. Erst wenn Pds1 am Metaphase/Anaphase-Übergang APC^{Cdc20}-abhängig degradiert wird, wird Esp1 aktiv. Ein Charakteristikum des DNA-Schadenskontrollsystems ist die Tatsache, dass Pds1 in Antwort auf einen DNA-Schaden hyperphosphoryliert und dadurch stabilisiert wird (Wang et al., 2001). Die Zellen arretierten also mit hohen Mengen an Pds1. Es stellt sich nun die Frage, ob eine erhöhte Cdc5-Aktivität zu einer verfrühten Degradation von Pds1 führt, oder ob Cdc5 auf eine andere Weise die Trennung der Kerne induziert.

Cdc13-1-Stämme mit Pds1^{HA6} wurden durch die Erhöhung der Temperatur auf 32°C arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurde Galaktose zugegeben und der Verlauf von Pds1 über die Zeit beobachtet. Im Kontrollstamm ohne *CDC5*-Überexpression, bleibt die Pds1-Menge während des ganzen Versuchs konstant. Im *cdc13*-Arrest ist allerdings die obere Bande von Pds1 etwas stärker als in asynchronen Zellen. Durch die Überexpression von *CDC5* nimmt die Menge an

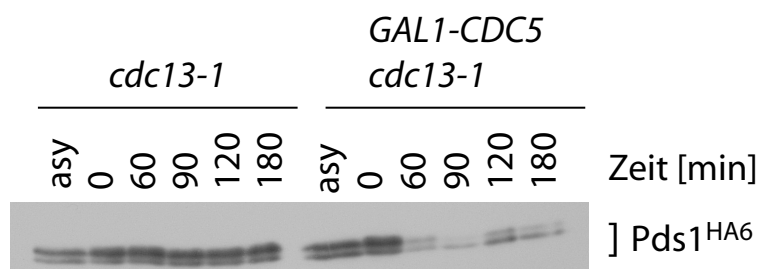
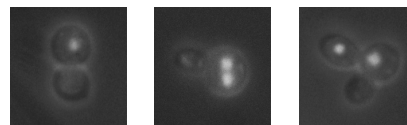


Abb. 44 Die Überexpression von *CDC5* im *cdc13-1*-Arrest führt zur Degradation von Pds1. Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5* auf die Stabilität von Pds1 im *cdc13-1*-Arrest zu testen, wurden in XYRaffinose wachsende Zellen des Stammes W3700 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3 cdc13-1*) zuerst durch Shift zu 32°C arretiert und dann mit Galaktose behandelt (Zeitpunkt 0 min). Die Behandlung des Stammes W3701 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 cdc13-1*) mit Galaktose diente als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot mit 12CA5 analysiert.

Pds1 stark ab. Schon 60 min nach Galaktosezugabe kann Pds1 kaum noch detektiert werden. Dies bleibt bis zum Ende des Versuchs 180 min nach Galaktoseinduktion so (Abb. 44). Durch erhöhte Cdc5-Aktivität kann im *cdc13-1*-Arrest demnach die Degradation von Pds1 ausgelöst werden. Dieser Befund erklärt die in Abb. 43 beobachteten getrennten DAPI-Signale.

6.7.3 Vergleich der Überexpression von *CDC5* und *CDC5^{L251W}*

Wie oben gezeigt wurde, bewirkt die Überexpression von *CDC5* die Degradation von Pds1 im *cdc13-1*-Arrest. Zudem tritt in einer signifikanten Zahl der Zellen eine Trennung des DAPI-Signals auf und die Spindel scheint aufgelöst zu sein. Interessant ist nun die Frage, ob die Adaptations-Mutante von *CDC5* bei Überexpression die gleichen Effekte hervorrufen kann. Um diese Frage zu beantworten, wurden *cdc13-1*-Zellen, die *CDC5* bzw. *CDC5^{L251W}* unter Kontrolle des *GAL1*-Promotor überexprimierten, bei 32°C arretiert und anschließend mit Galaktose behandelt. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet und für eine mikroskopische Untersuchung mit Ethanol fixiert. Am Fluoreszenzmikroskop wurde die Morphologie der Zellen und der Kerne untersucht (Abb. 45). Zellen, die kein *CDC5* überexprimierten, blieben auch bei Behandlung mit Galaktose im *cdc13*-Arrest, das heißt sie erschienen mit einer großer Knospe und einem DAPI-Signal am Übergang von der Mutter- zur Tochterzelle. Anders hingegen sah das Bild nach Überexpression von *CDC5* aus. Wie bereits in der Immunfluoreszenz (Abb. 43) beobachtet, haben einige Zellen zwei DAPI-Signale in der Mutterzelle. In zwei unabhängigen



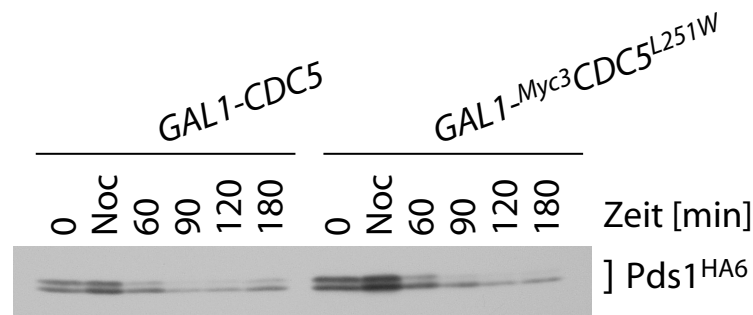
W3085	99,4 %	0 %	0 %
W3086	62,1 %	26,2 %	6,7 %
	73,7 %	12,6 %	10,4 %
W3138	87,2 %	0,4 %	8,3 %
	83,9 %	0,2 %	10,5 %

Abb. 45 Die Überexpression von *CDC5* nicht jedoch die von *CDC5^{L251W}* induziert Kerntrennung im *cdc13-1*-Arrest. Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5* mit der von *CDC5^{L251W}* auf die Morphologie der Zellen im *cdc13-1*-Arrest zu vergleichen, wurden in XYRaffinose bei 26°C wachsende Zellen der Stämme W3085 (*cdc13-1*), W3086 (*cdc13-1 ura3::GAL1^{MYC3}CDC5-URA3*) und W3138 (*ura3::GAL1^{MYC3}CDC5^{L251W}-URA3 cdc13-1*) durch Erhöhung der Temperatur auf 32°C arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurde die Expression von *CDC5* durch Zugabe von Galaktose induziert. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet und mit Ethanol fixiert. Mit diesen fixierten Zellen wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt, um die DNA sichtbar zu machen. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Zahlen unter den Bildern beziehen sich auf zwei unabhängige Experimente.

Experimenten schwankte der prozentuale Anteil dieser Zellen zwischen 12 und 26%. Um 10% der Zellen haben eine zusätzliche Knospe entwickelt und ihren Kern getrennt. Bei Überexpression von *CDC5^{L251W}* ist der Anteil dieser Zellen in der Population vergleichbar groß. Allerdings treten fast keine Zellen auf, die eine Kernteilung in der Mutterzelle vorgenommen haben und weiterhin aus zwei Zellkörpern bestehen. Die Adaptationsmutante von Cdc5 unterscheidet sich vom Wildtypprotein also deutlich in ihrer Fähigkeit, den *cdc13*-Arrest zu überwinden.

Es stellt sich nun die Frage, ob die fehlende Induktion der Kernteilung im *cdc13*-Arrest nach Überexpression von *CDC5^{L251W}* verbunden ist mit einer Stabilisierung von Pds1. *Cdc13-1*-Stämme mit HA-markiertem Pds1, die entweder *CDC5* oder *CDC5^{L251W}* überexprimierten wurden durch Temperaturerhöhung zu 32°C arretiert, anschließend wurde die *CDC5*-Expression durch Zugabe von Galaktose induziert. Bereits 60 min nach Galaktosezugabe ist die Menge an Pds1 in dem Stamm, der das Wildtyp Cdc5 überproduziert, stark vermindert. Die Überproduktion von Cdc5^{L251} bewirkt hingegen nur eine leichte Abnahme von Pds1. Die Pds1-Menge bleibt in diesem Stamm bis zum Ende des Experimentes 120 min nach

A



B

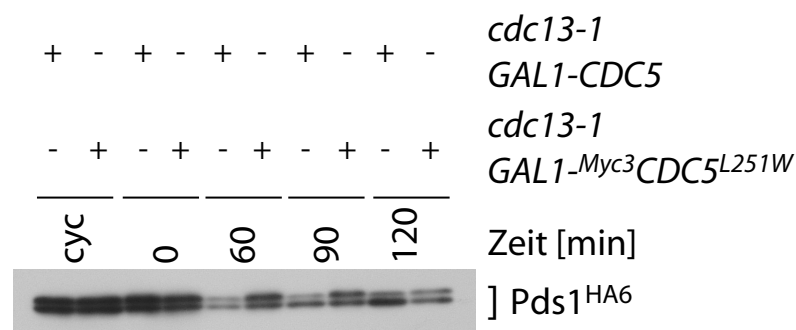


Abb. 46 Vergleich der Überexpression von *CDC5* und *CDC5^{L251W}* im Nocodazolarrest und im *cdc13-1*-Arrest. Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5* mit der von *CDC5^{L251W}* auf die Stabilität von Pds1 zu vergleichen, wurden (A) in XYRaffinose wachsende Zellen des Stammes W3699 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 GAL1-Myc3CDC5^{L251W}*) zuerst mit Nocodazol arretiert und dann mit Galaktose behandelt. Der Stamm W3335 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3*) diene als Kontrolle (B) in XYRaffinose wachsende Zellen des Stammes W3830 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 cdc13-1 ura3::GAL1-MYC3CDC5^{L251W}-URA3*) durch Temperaturerhöhung auf 32°C arretiert und anschließend mit Galaktose behandelt. Der Stamm W3700 (*pds1::PDS1^{HA6}-HIS3 ura3::GAL1-CDC5-URA3 cdc13-1*) dient als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot mit 12CA5 analysiert.

Galaktosezugabe dann gleich. Bei der Überexpression von *CDC5* scheint die obere Bande von Pds1 stärker abzunehmen als die untere, nicht phosphorylierte Bande (Abb. 46 B).

Die Überexpression von *CDC5* und *CDC5*^{L251W} im Nocodazol-Arrest hat hingegen einen sehr ähnlichen Einfluss auf die Stabilität von Pds1. *Cdc5*^{L251W} ist ebenso wie das Wildtypprotein in der Lage, die Pds1-Degradation in diesem Arrest hervorzurufen (Abb. 46A).

6.7.4 Cdc5 und Scc1

Cdc5 phosphoryliert die Kohesin-Untereinheit Scc1. Dies erleichtert die Spaltung von Scc1 durch die Separase Esp1 und die Dissoziation von Scc1 vom Chromatin am Metaphase/Anaphase-Übergang (Alexandru et al., 2001).

6.7.4.1 Cdc5 interagiert mit Scc1

Cdc5 kann Scc1 phosphorylieren (Alexandru et al., 2001). Es sollte nun getestet werden, ob dies auch in einer physikalischen Interaktion zwischen den beiden Proteinen reflektiert wird. Hierzu wurden Stämme hergestellt, die Scc1 vom endogenen Promotor mit einem Myc13- oder HA14-Epitop am C-Terminus produzierten. Von asynchron gewachsenen Zellen wurden Lysate hergestellt und für eine Koimmunpräzipitation eingesetzt. Abb. 47 A zeigt das Ergebnis der Präzipitation mit Myc13-markiertem Scc1 und HA3-markiertem Cdc5. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Lysate vor der Präzipitation. In der dritten Reihe ist das präzipitierte Cdc5 zu sehen. Die Menge an präzipitiertem Cdc5 ist in beiden Stämmen, in denen es vorhanden ist, vergleichbar. In der vierten Reihe sind die α -HA-Präzipitate dargestellt, die mit dem α -Myc Antikörper entwickelt wurden. In der dritten Spur kann Scc1 detektiert werden. Scc1 kopräzipitiert somit mit Cdc5. Auch im Präzipitat von Scc1 läßt sich Cdc5 nachweisen (Reihe 5, Spur3). Um die Interaktion von Cdc5 mit Scc1 zu bestätigen, wurden Stämme verwendet, die HA14-makiertes Scc1 und Myc15-markiertes Cdc5 produzierten. Auch in diesem Fall kann man im α -HA-Präzipitat mit α -Myc Antikörper ein Signal nachweisen. Im Scc1-Präzipitat befindet sich also Cdc5. Im Myc-Präzipitat findet man mit α -HA Antikörper auch in der Kontrolle (Spur 2) ein Signal. Die lange HA-Markierung an Scc1 führt folglich zu einem starken Anstieg des Hintergrundes. Nichtsdestotrotz konnte die Interaktion zwischen Cdc5 und Scc1 auch mit den reziproken Epitopmarkierungen bestätigt werden. Die beiden Proteine gehen demnach eine stabile physikalische Wechselwirkung ein.

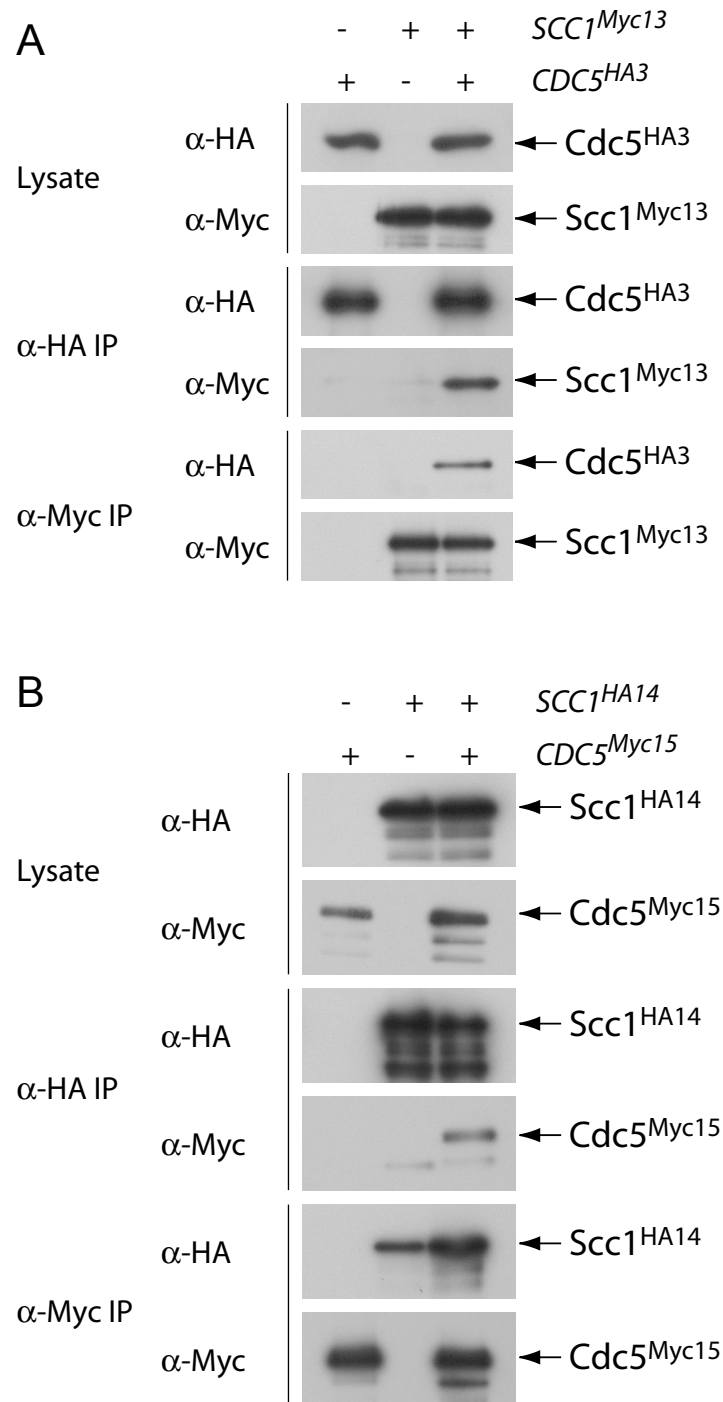


Abb. 47 Cdc5 interagiert mit Scc1. Zum Nachweis einer Interaktion von Cdc5 mit Scc1 wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. (A) In XYGlucose wachsende Zellen der Stämme K6213 (*cdc5::CDC5^{HA3}-URA3*), W2988 (*scc1::SCC1^{Myc13}-HIS5 S.p.*) und W3019 (*cdc5::CDC5^{HA3}-URA3 scc1::SCC1^{Myc13}-HIS5 S.p.*) wurden geerntet und aufgeschlossen. Aus den Proteinlysaten wurden mit 12CA5 (α -HA) bzw. 9E10 (α -Myc) und Protein A Agarose Cdc5^{HA3} bzw. Scc1^{Myc13} gereinigt. Proben der Lysate (Lysat) vor der Präzipitation und die Präzipitate (α -HA-IP oben und α -Myc-IP unten) bzw. die kopräzipitierten Proteine (α -HA-IP α -Myc, α -Myc-IP α -HA) wurden mittels Western Blot untersucht. (B) wie in (A) mit den Stämmen K6390 (*cdc5::CDC5^{Myc15}-URA3*), W2987 (*scc1::SCC1^{HA14}-HIS5 S.p.*) und W3020 (*cdc5::CDC5^{Myc15}-URA3 scc1::SCC1^{HA14}-HIS5 S.p.*).

6.7.4.2 Die Überexpression von *CDC5* beeinflusst die Modifikation von *Sccl*

Wie aus der Literatur bereits bekannt, phosphoryliert Cdc5 *Sccl*. Es sollte nun getestet werden, ob die Adaptationsmutante von Cdc5 *Sccl* noch als Substrat erkennt. Hierzu wurden Stämme hergestellt, die *SCC1* mit einem C-terminalen HA3-Epitop vom endogenen Promotor exprimierten. Außerdem überexprimierten sie *CDC5* bzw. *CDC5^{L251W}* vom *GAL1*-Promotor. Asynchron wachsende Zellen wurden mit Galaktose behandelt, um die Expression vom *GAL*-Promotor zu induzieren. Das Laufverhalten von *Sccl* wurde im Western Blot analysiert (Abb. 48). *Sccl* läuft in der SDS-PAGE als Doppelbande. Die Überexpression von *CDC5* bewirkt schon nach 30 min eine Veränderung des Laufverhaltens. 90 min nach Galaktoseinduktion treten zusätzlich noch diffuse Signale im höhermolekularen Bereich auf. Die Überexpression von *CDC5^{L251W}* hat zunächst den gleichen Effekt auf das Laufverhalten von *Sccl*. Die Banden im höhermolekularen Bereich, die auch hier 90 min nach Anschalten des *GAL*-Promotors auftreten, sind aber weniger diffus als bei der Expression von *CDC5*. Vielmehr kann man eine zusätzliche dritte Bande ausmachen. Die gebildeten Mengen an Cdc5 und Cdc5^{L251W} waren vergleichbar. Cdc5^{L251W} kann *Sccl* also immer noch phosphorylieren, allerdings scheint die Qualität dieser Phosphorylierung verändert zu sein.

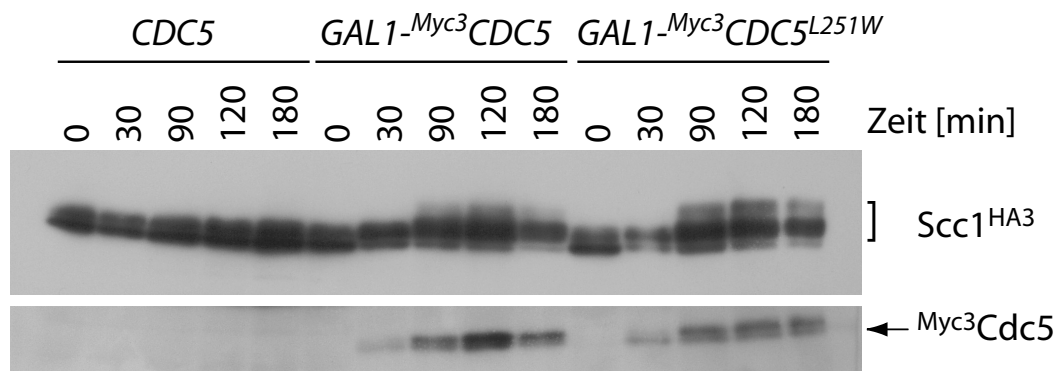


Abb. 48 Sowohl Cdc5 als auch Cdc5^{L251W} beeinflussen die Modifikation von *Sccl*. Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5* und *CDC5^{L251W}* auf die Modifikation von *Sccl* zu untersuchen, wurden in XYRaffinose wachsende Zellen der Stämme W3078 (*scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p. ura3::GAL1-Myc3CDC5-URA3*) und W3079 (*scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p. ura3::GAL1-Myc3CDC5^{L251W}-URA3*) mit Galaktose behandelt. Die Behandlung des Stammes W2985 (*scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p.*) mit Galaktose diente als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot mit 12CA5 analysiert. Die Menge des produzierten Cdc5 wurde mit 9E10 überprüft.

6.7.4.3 Die Degradation von *Sccl* ist unbeeinflusst von *cdc5^{L251W}*

Die Überexpression von *CDC5^{L251W}* führt genau wie die von *CDC5* zu einer Hyperphosphorylierung von *Sccl*, wenn auch qualitative Unterschiede bestehen. Es ist aber durchaus denkbar, dass durch die starke Überexpression vom *GAL1*-Promotor eventuelle weitere Unterschiede nicht augenfällig werden. Deshalb wurden Stämme hergestellt, die als einzige funktionelle Kopie *cdc5^{L251}* unter Kontrolle des endogenen Promotor exprimieren. Dies ist möglich, da die Mutation nicht letal ist. Zusätzlich produzieren die Zellen *Sccl* mit

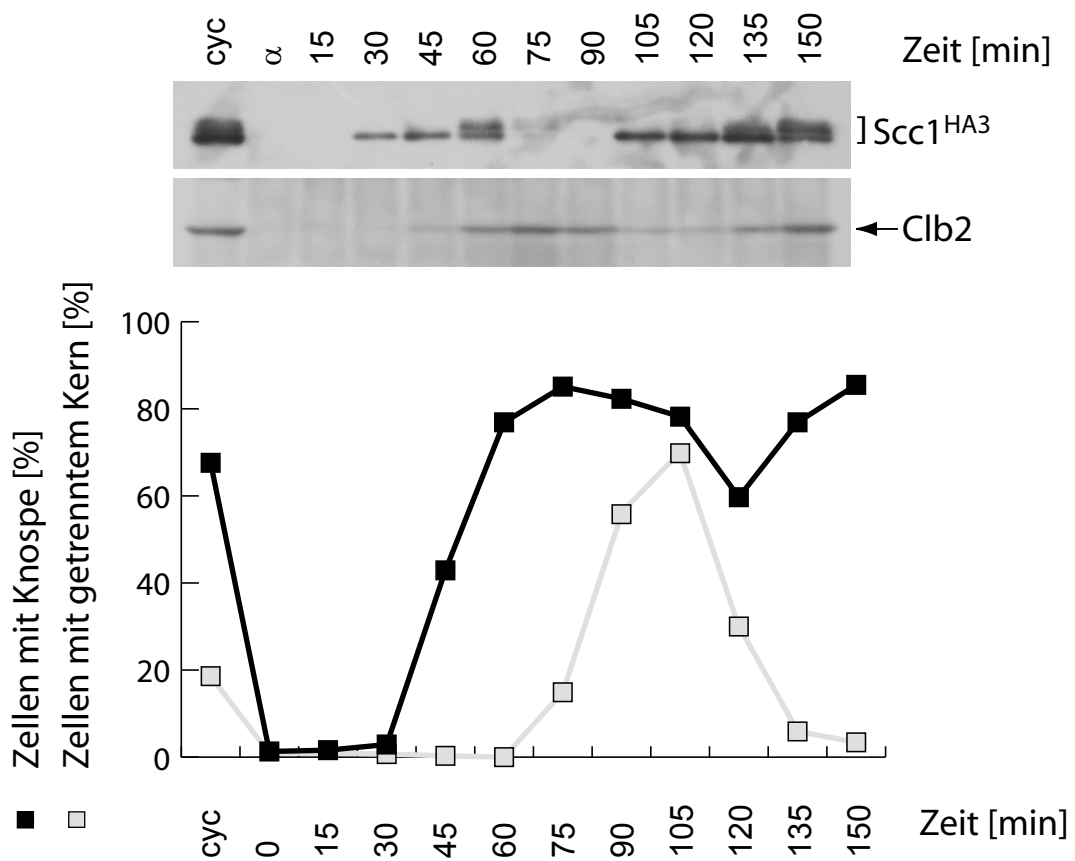
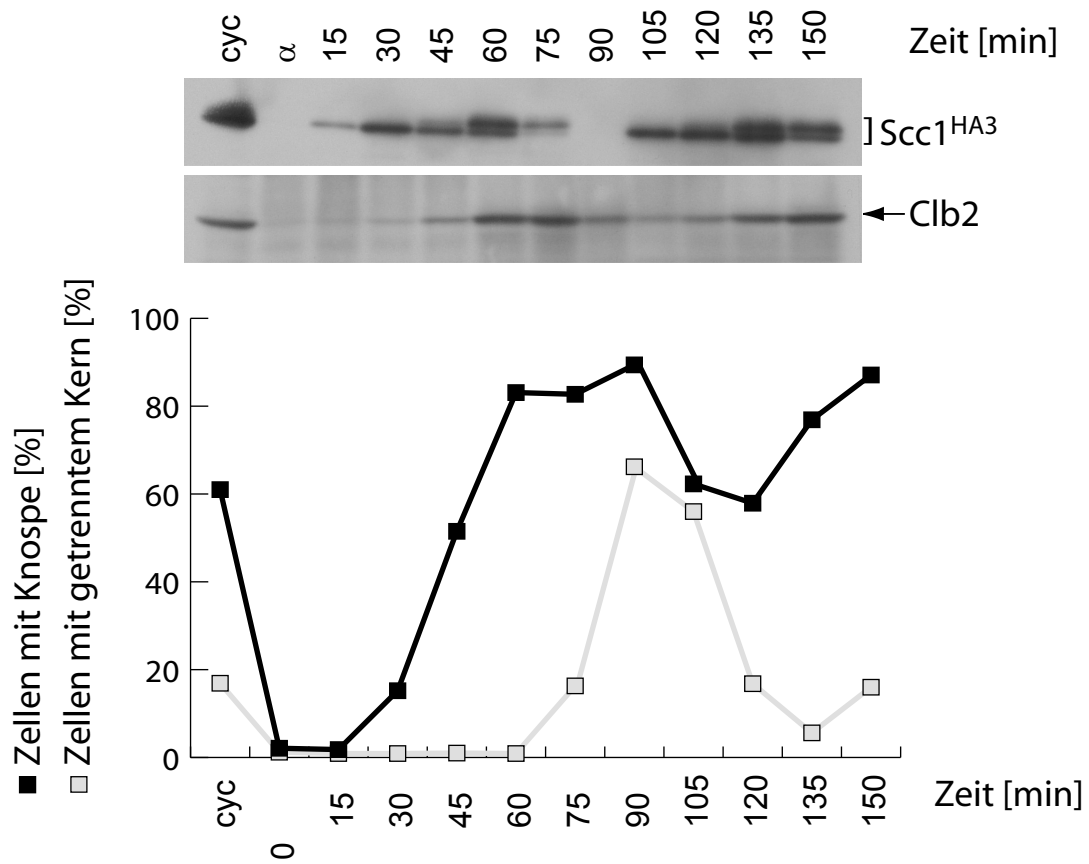


Abb. 49 In einem ungestörten Zellzyklus ist die Scc1-Phosphorylierung unabhängig vom Vorhandensein der Cdc5^{L251W}-Mutation. Um zu untersuchen ob die Cdc5^{L251W}-Mutation eine Auswirkung auf die Scc1-Phosphorylierung hat, wurden die Stämme W3017 (*scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p. bar1-Δ2::LEU2*) (oben) und W3089 (*scc1::SCC1^{HA3}-HIS5 S.p. cdc5::cdc5L251W-LEU2 bar1-Δ1::HIS3*) (unten) mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurden die Zellen in frisches Medium ohne α -Faktor entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für einen Western Blot entnommen bzw. Zellen für die morphologische Auswertung mit Ethanol fixiert. Scc1^{HA3} wurde mit dem HA-spezifischen Antikörper 12CA5 nachgewiesen. Als Vergleich diente das Zyklin Clb2, das mit einem α -Clb2 Serum aus Kaninchen nachgewiesen wurde. Zur Bestimmung des Zellteilungsstadiums wurde der Knospungsindex der ethanolfixierten Zellen nach DAPI-Färbung bestimmt.

einer C-terminalen HA3-Markierung. Es sollte untersucht werden, ob die L251W-Mutation in einem normalen, ungestörten Zellzyklus einen Einfluss hat auf das Laufverhalten von Scc1 in der SDS-PAGE oder auf die Kinetik der Degradation von Scc1. Wildtypzellen und Zellen mit Cdc5^{L251W} wurden mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurden die Zellen durch Umsetzen in Medium ohne α -Faktor synchron in den nächsten Teilungszyklus entlassen. Es wurden in kurzen Abständen Proben entnommen und für eine Western Blot Analyse und für die Bestimmung des Knospungsindex der Zellen aufgearbeitet. Abb. 49 zeigt im oberen Teil den Western Blot und die Auswertung des Knospungsindex des Wildtypstammes. In G1-Zellen kann kein Scc1 nachgewiesen werden. Aber schon 15 min nach Entlassen aus dem α -Faktor-Arrest treten geringe Mengen an Scc1 auf. Zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen noch keine Knospe gebildet. Parallel mit der Bildung von Knospen steigt die Scc1-Menge weiter an. Ab 45 min nach dem G1-Arrest kann man auch eine zweite Bande, die oberhalb der ersten läuft, erkennen. Diese obere Bande nimmt in ihrer Intensität bis 60 min weiter zu. Zu diesem Zeitpunkt hat der Großteil der Zellen bereits eine Knospe gebildet, ihre DNA aber noch nicht getrennt. Die Zellen befinden sich also vor der Anaphase. Bereits nach 75 min nimmt die Menge an Scc1 wieder ab. Zu diesem Zeitpunkt trennen die ersten Zellen ihre Kerne, befinden sich also in der Anaphase. Gleichzeitig hat das Zyklin Clb2 sein Maximum erreicht. Nach 90 min, wenn das Maximum der Zellen getrennte Kerne aufweist, kann kein Scc1 mehr nachgewiesen werden. Das beobachtete Muster des Auftretens von Scc1 entspricht dem in der Literatur beschriebenen Verhalten von Kohesinen (Alexandru et al., 2001). Kohesine binden bereits während der DNA-Replikation an das Chromatin und verbleiben dort bis zum Beginn der Anaphase. Am Metaphase/Anaphase-Übergang muss der Kohesin-Komplex von der DNA dissoziieren, damit die Trennung der Schwesterchromatiden stattfinden kann. In dem Stamm, der nur *cdc5^{L251W}* exprimiert, zeigt Scc1 prinzipiell das gleiche Muster. Der Stamm bildete in dem vorliegenden Experiment etwas verzögert die ersten Knospen. Deshalb kann man Scc1 auch erst 30 min nach Entlassen aus dem Arrest zum ersten Mal nachweisen. Die Scc1-Menge steigt dann an und die obere Bande taucht auf. Mit dem Auftreten getrennter Kerne beginnt die Menge an Scc1 wieder abzunehmen. Im zweiten Zellzyklus taucht Scc1 wie auch im Wildtypstamm sehr schnell wieder auf. In einem normalen Zellzyklus hat die Adaptationsmutante von Cdc5 also weder einen Einfluss auf das Auftreten von Scc1 noch auf dessen Phosphorylierungsmuster.

6.7.5 Cdc5 und Rad9

Rad9 ist ein 148 kD großes Protein, das im DNA-Schadenskontrollsystem die Funktion eines Sensors für DNA-Schäden erfüllt. Diese Funktion wird außerdem noch von den Proteinen der Rad24-Gruppe erfüllt, die aus Rad24, Rad17, Mec3 und Ddc1 besteht (Zhou et Elledge, 2000). Rad9 wird in Antwort auf einen DNA-Schaden hyperphosphoryliert. Dieses hyperphosphorylierte Rad9 interagiert mit Rad53, einer Effektor-Kinase des Kontrollsystems (Sun et al., 1998). Es sollte nun untersucht werden, ob Cdc5 einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Rad9 hat.

6.7.5.1 Rad9 ist ein Phosphoprotein

Es ist aus der Literatur bereits bekannt, dass Rad9 in Antwort auf einen DNA-Schaden phosphoryliert wird. Rad9 aus asynchron wachsenden Zellen weist aber ebenfalls ein heterogenes Laufverhalten in der SDS-PAGE auf. Es sollte getestet werden, ob es sich bei dieser Modifikation ebenfalls um eine Phosphorylierung handelt. Hierzu wurde ein λ -Phosphataseassay durchgeführt. Da Rad9 ein sehr großes Protein ist, das in Lysaten instabil ist, wurde ein Stamm verwendet, in dem das Gen für die Protease Pep4 deletiert ist. Pep4 ist eine Protease der Vakuole und wichtig für die Reifung der vakuolären Proteasen. Durch Deletion dieses Gens kann in vielen Fällen eine Stabilisierung von proteasesensitiven Proteinen erreicht werden. Rad9^{Myc13} wurde aus asynchron wachsenden Zellen mittels α -Myc Antikörper und Protein A-Agarose Beads gereinigt. Das Präzipitat wurde nur mit Puffer oder mit Puffer und Phosphatase behandelt. Abb. 50 zeigt in Spur1 das Lysat vor der Präzipitation. Man erkennt deutlich, dass Rad9 nicht in einer einzigen distinkten Bande auftritt. Das Präzipitat und das mit Puffer behandelte Präzipitat zeigen das gleiche Laufverhalten wie das Lysat. Nach der Behandlung mit λ -Phosphatase kollabiert das gesamte Material in eine Bande, die zusätzlich schneller läuft als die unterste Bande im Lysat. Bei der in asynchronen Zellen beobachteten Modifikation von Rad9 handelt es sich folglich um eine Phosphorylierung. Diese Phosphorylierung tritt unabhängig von einem DNA-Schaden auf.

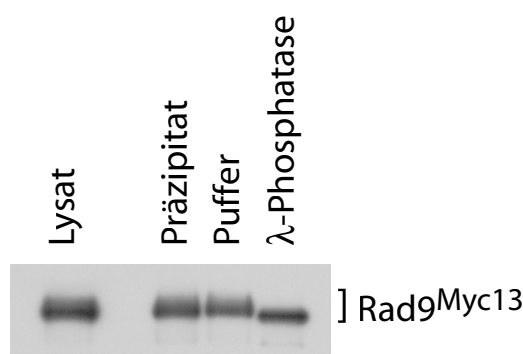


Abb. 50 Rad9 ist ein Phosphoprotein. Um die Art der Modifikation von Rad9 zu untersuchen, wurde Rad9^{Myc13} aus Lysaten von asynchron wachsenden Zellen des Stammes W3014 (*rad9::RAD9^{Myc13}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3*) mittels 9E10-Antikörpern und Protein A-Agarose Beads präzipitiert und entweder mit Phosphatasepuffer alleine oder mit Puffer und λ -Phosphatase inkubiert. Das Laufverhalten von Rad9^{Myc13} nach dieser Behandlung wurde mittels Western Blot mit 9E10 analysiert.

6.7.5.2 Die Phosphorylierung von Rad9 ist zellzyklusabhängig reguliert

Da Rad9 auch unabhängig vom Auslösen des DNA-Schadenskontrollsystems eine Phosphorylierung zeigt, sollte untersucht werden, ob diese Modifikation sich im Zellzyklus verändert. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Experiment mit synchronen Zellen durchgeführt. Zellen des Paarungstyps *MATa* wurden durch Behandlung mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurden die Zellen durch Umsetzen in Medium ohne α -Faktor synchron in den nächsten Zellzyklus entlassen. Das Verhalten von Rad9 wurde im Western Blot untersucht. Als Vergleich diente das mitotische Zyklin Clb2. Außerdem wurde der Knospungsindex der Zellen bestimmt. Abb. 51 A zeigt den Western Blot dieses Experiments sowie die Auswertung des Knospungsindex der Zellen. Nach ca. 45 min nach Entlassen aus dem G1-Arrest, kann man eine Modifikation von Rad9 erkennen. Zu diesem Zeitpunkt hat ungefähr die Hälfte der Zellen eine Knospe gebildet. Die Modifikation bleibt bis 75 nach Entlassen aus dem Arrest bestehen. Zu diesem Zeitpunkt haben zwar die meisten Zellen eine Knospe, die DAPI-Signale sind aber noch nicht getrennt, das bedeutet die Zellen befinden sich vor der Anaphase. Mit Beginn der Anaphase verschwindet die Rad9-Phosphorylierung wieder, um dann im nächsten Zellzyklus (120 min) wieder aufzutauchen. Um das zeitliche Muster der Rad9-Phosphorylierung genauer zu charakterisieren, wurden Stämme hergestellt, die neben Epitop-markiertem Rad9 verschiedene *ts*-Allele trugen. Durch Inkubation bei 37°C wurden diese Allele inaktiviert und die Zellen am entsprechenden Punkt arretiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit α -Faktor in der G1-Phase, mit Hydroxyharnstoff in der S-Phase und mit Nocodazol in der Metaphase arretiert. Für diesen Versuch wurde HA-markierte Rad9 verwendet, da mit diesem Epitop die posttranslationale Modifikation besser zu sehen ist.

In Abb. 51 B sind die Lysate bei 26°C und bei 37°C bzw. vor und nach Zugabe der beschriebenen Chemikalien dargestellt. In α -Faktor arretierten Zellen ist Rad9 deutlich weniger modifiziert als in asynchronen Zellen. Rad9 läuft aber auch hier nicht als eine distinkte Bande wie nach Behandlung mit Phosphatase, was darauf hindeutet, dass eine Restphosphorylierung vorhanden ist. Werden die Zellen durch Zugabe von Hydroxyharnstoff (HU) in der S-Phase arretiert, ist die Rad9 Phosphorylierung stärker als in asynchronen Zellen. Noch stärker fällt sie allerdings aus, wenn die Zellen mit Nocodazol in der Metaphase arretiert werden. Durch die Behandlung mit Nocodazol wird aber auch das Spindelkontrollsystem aktiviert. In *cdc28-4*-Zellen, die bei restriktiver Temperatur in der G1-Phase arretieren, ist Rad9 am schwächsten modifiziert. Dies stimmt weitgehend überein mit dem Erscheinungsbild von Rad9 in α -Faktor arretierten Zellen. Cdc4 ist ein F-box Protein und verantwortlich für die SCF-abhängige Degradation von Phospho-Sic1. Die Zellen arretieren bei restriktiver Temperatur also vor der S-Phase. In *cdc4-1*-Zellen ist Rad9 ebenfalls weniger modifiziert als in asynchronen Zellen. In Zellen, in denen durch die *cdc13-1*-Mutation das DNA-Schadenskontrollsystem ausgelöst wurde, ist Rad9 auch weniger modifiziert als in asynchronen Zellen, aber eventuell etwas mehr als in G1-Zellen. Das gleiche gilt für Zellen, die durch die *cdc5-1*- oder die *cdc14-3*-Mutation am Ende der Mitose

arretiert wurden. Rad9 zeigt in diesem Experiment die stärkste Phosphorylierung nach Auslösen des Spindelkontrollsystems mit Nocodazol. Auch nach Auslösen des DNA-Replikationskontrollsystems mit HU ist Rad9 stark modifiziert. Erstaunlicherweise zeigt es nur eine vergleichsweise schwache Phosphorylierung nach Auslösen des DNA-Schadenskontrollsystems durch die *cdc13-1*-Mutation. Eventuell stellt der *cdc13*-Arrest einen Spezialfall für das DNA-Schadenskontrollsystem dar. Es ergibt sich aber insgesamt das Bild, dass Rad9 in der G1-Phase schwächer phosphoryliert ist als in späteren Stadien des Zellzyklus. Die Phosphorylierung von Rad9 im *cdc5*-Arrest gibt keinen Hinweis darauf, dass Rad9 ein Cdc5-Substrat ist.

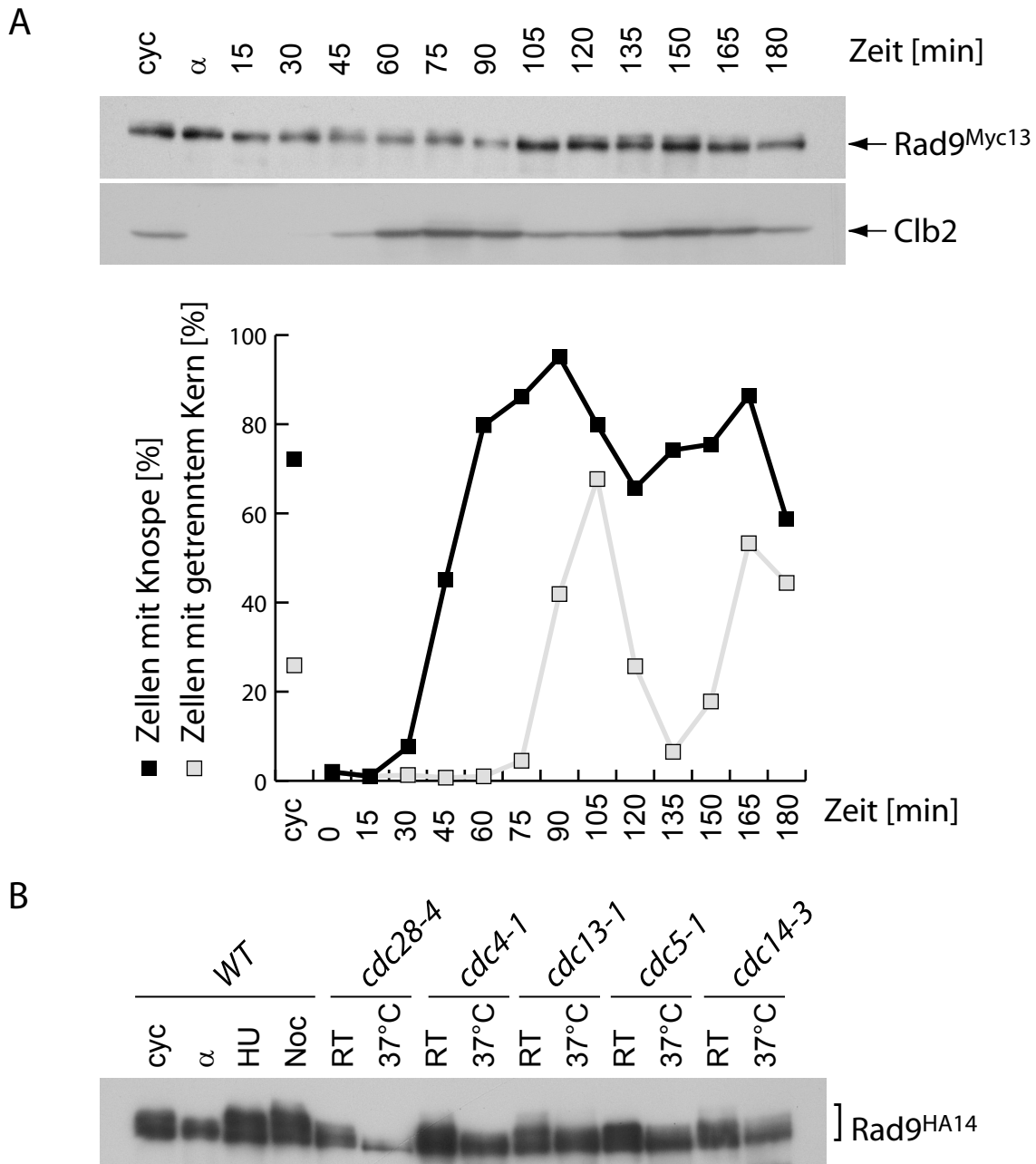


Abb. 51 Die Phosphorylierung von Rad9 ist zellzyklusabhängig. (A) Um die Phosphorylierung von Rad9 im Verlauf des Zellteilungszyklus zu untersuchen, wurde der Stamm W3016 (*rad9::RAD9^{Myc13}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3 bar1-Δ2::LEU2*) mit dem Paarungspheromon α-Faktor in der G1-Phase arretiert. Nach Erreichen des Arrestes wurden die Zellen in frisches Medium ohne α-Faktor entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für einen Western

Blot entnommen bzw. Zellen für die morphologische Auswertung mit Ethanol fixiert. Rad9^{Myc13} wurde mit dem Myc-spezifischen Antikörper 9E10 nachgewiesen. Als Vergleich diente das Zyklin Clb2, das mit einem α -Clb2 Serum aus Kaninchen nachgewiesen wurde. Zur Bestimmung des Zellteilungsstadiums wurde der Knospungsindex der ethanolfixierten Zellen nach DAPI-Färbung bestimmt. (B) Phosphorylierung von Rad9 in verschiedenen Zellzyklusarresten. Zellen des Stammes W3080 (*rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3 bar1-Δ2::LEU2*) wurden vor bzw. nach der Behandlung mit α -Faktor, Hydroxyharnstoff (HU) oder Nocodazol (Noc) geerntet. Zellen der Stämme W3091 (*cdc4-3 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3*), W3093 (*cdc13-1 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3*), W3094 (*cdc14-3 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3*), W3095 (*cdc5-1 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3*) und W3096 (*cdc28-4 rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3*) wurden vor oder nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C geerntet. Der Phosphorylierungsgrad von Rad9^{HA14} wurde mittels Western Blot Analyse mit 12CA5 bestimmt.

6.7.5.3 Die Überexpression von CDC5 beeinflusst die Modifikation von Rad9

Die Überexpression von *CDC5* führt im *cdc13*-Arrest zur Trennung der Kerne (vgl.6.7.1). Cdc5-Aktivität ist also ein limitierender Faktor bei der Überwindung des Arrestes, der durch einen DNA-Schaden ausgelöst wird. Da Cdc5 eine Kinase ist und Rad9 ein Phosphoprotein, wurde untersucht, ob die Überexpression von *CDC5* einen Einfluss auf die Modifikation von Rad9 hat. In Zellen, die Rad9^{Myc13} vom endogenen Promotor produzierten wurde *CDC5* vom *GAL1*-Promotor überexprimiert. Das Laufverhalten von Rad9 wurde im Western Blot analysiert (Abb. 52). 60 min nach Galaktose-Zugabe tauchen langsam laufende Banden von Rad9 auf, die in der Kontrolle ohne das *GAL1-CDC5* Konstrukt fehlen. Diese Banden bleiben bis zum Ende des Versuchs 180 min nach Galaktoseinduktion bestehen. Diese sehr langsam laufenden und über einen weiten Molekulargewichtsbereich verteilten Banden von Rad9 scheinen das Erscheinungsbild der langsamer laufenden Formen nicht zu verändern, sondern vielmehr zusätzlich aufzutreten. Die Überexpression von *CDC5* bewirkt also eine Modifikationsänderung von Rad9, die aller Wahrscheinlichkeit auf eine Phosphorylierung zurückgeführt werden kann. Im unteren Teil der Abbildung sieht man das gebildete Cdc5. Da

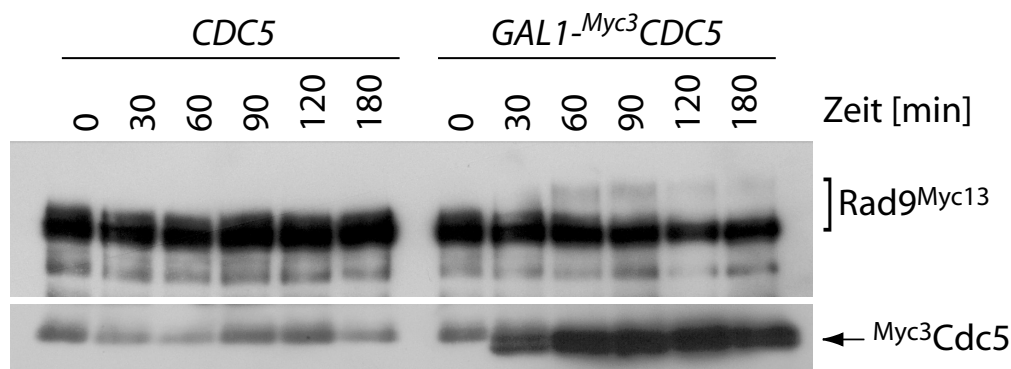


Abb. 52 Cdc5 beeinflusst die Modifikation von Rad9. Um die Wirkung der Überexpression von *CDC5* auf die Modifikation von Rad9 zu testen, wurden in XYRaffinose wachsende Zellen des Stammes W3087 (*rad9::RAD9^{Myc13}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3 ura3::GAL1-Myc3 CDC5-URA3*) mit Galaktose behandelt. Die Behandlung des Stammes W3014 (*rad9::RAD9^{Myc13}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3*) mit Galaktose diente als Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot mit 9E10 analysiert.

sowohl Cdc5 als auch Rad9 mit einem Myc-Epitop versehen waren, sieht man zusätzlich zu Cdc5 ein Degradationsprodukt von Rad9. Ob Cdc5 Rad9 direkt phosphoryliert oder eine andere Kinase aktiviert, die dann ihrerseits Rad9 phosphoryliert, kann mit diesem Experiment nicht beantwortet werden.

6.7.5.4 Cdc5 interagiert mit Rad9

Sowohl Rad9 als auch Cdc5 sind am DNA-Schadenskontrollsystem beteiligt. Die Überproduktion der Kinase Cdc5 beeinflusst das Modifikationsmuster von Rad9. Da die beiden Proteine offensichtlich in einer Beziehung zueinander stehen, lag die Frage nahe, ob sie auch physikalisch miteinander interagieren. Dazu wurde eine Affinitätspräzipitation durchgeführt. Es wurde versucht mit immobilisiertem MBP-Cdc5 Rad9^{HA14} aus einem Hefelysate zu reinigen. MBP-Cdc5 als auch MBP alleine wurden in *E. coli* exprimiert. Die *E. coli* Lysate wurden anschließend mit Amyloresin inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen des Materials wurde Hefelysate eines Stammes zugegeben, der vom endogenen Promotor Rad9^{HA14} produziert. Nach zweistündiger Inkubation des Hefelysates mit dem immobilisiertem MBP-Cdc5 bzw. MBP wurden die Ansätze wiederum gewaschen und dann mit Probenpuffer aufgekocht. Eventuell gebundenes Rad9 wurde in einem Western Blot mit 12CA5 nachgewiesen. Abb. 53 zeigt in der ersten Spur das Hefelysate vor der Präzipitation. In Spur 2 sieht man das Material, das an MBP gebunden hat. In dieser Spur ist kein Signal detektierbar. Anders in Spur 3. Hier sieht man auf Höhe des Rad9-Signals des Lysats eine deutliche Bande. Rad9 hat also die mit MBP-Cdc5 nicht aber an die mit MBP-Matrix gebunden. Cdc5 und Rad9 können also physikalisch miteinander interagieren.

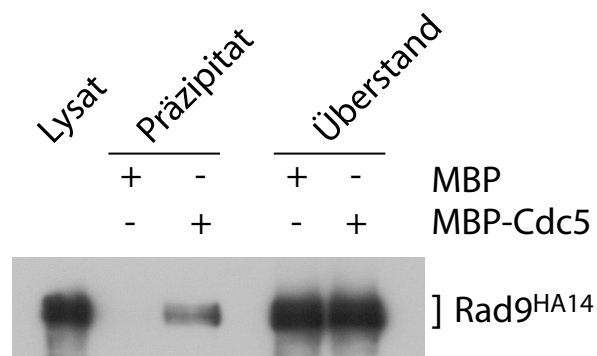


Abb. 53 Cdc5 interagiert mit Rad9. Mittels Affinitätspräzipitation wurde eine mögliche Interaktion zwischen Cdc5 und Rad9 untersucht. Hierfür wurde MBP-Cdc5 oder MBP alleine aus entsprechenden *E. coli* Stämmen mit Hilfe von Amylose-Resin gereinigt. Das an das Amylose-Resin gebundene Cdc5 bzw. MBP wurde mit einem Lysat des Stammes W3080 (*rad9::RAD9^{HA14}-HIS5 S.p. pep4-Δ::URA3 bar1-Δ2::LEU2*) für 2h inkubiert, gewaschen und anschließend gekocht. Eventuell gebundenes Rad9^{HA14} wurde durch Western-Blot Analyse mit 12CA5 nachgewiesen. Das Coomassie-Gel zeigt die *E. coli* Lysate und die Mengen an eingesetztem MBP bzw. MBP-Cdc5.

7 Diskussion

Cdc5 ist eine Kinase mit vielfältigen Funktionen während des Zellzyklus. Am Metaphase/Anaphase-Übergang phosphoryliert es das Kohesin Scc1 und erleichtert somit dessen Spaltung durch die Separase Esp1 (Alexandru et al., 2001). In der frühen Anaphase ist es als Teil des FEAR-Signalweges essentiell für die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus (Stegmeier et al., 2002). Als ein Teil des MEN phosphoryliert Cdc5 Bfa1. Dadurch wird die GAP-Aktivität von Bub2/Bfa1 gegenüber Tem1 inhibiert. Dies führt folglich zu einer Aktivierung von Tem1 und somit des „mitotic exit networks“. Cdc5 hat weiterhin auch einen direkten Einfluss auf die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus (Shou et al., 2002). Durch Phosphorylierung von Net1 schwächt es den Net1-Cdc14-Komplex, was die Aktivierung von Cdc14 fördert. Cdc5 ist zudem beteiligt am DNA-Schadenskontrollsystem, ein „Checkpoint“, der Zellen in Antwort auf DNA-Schäden in der Metaphase arretiert.

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Rolle von Cdc5 näher zu charakterisieren. Da Cdc5 so vielfältige Funktionen in der Mitose erfüllt und seine Aktivität limitierend für die Freisetzung von Cdc14 ist, sollte die Cdc5-Aktivität selbst strikt reguliert sein. Ein besonderer Augenmerk dieser Arbeit lag deshalb auf der Regulation von Cdc5. Zudem wurde Hct1 untersucht. Hct1 wird von zyklinabhängiger Kinase negativ reguliert. Phosphoryliertes Hct1 kann nicht an den APC binden und ist daher inaktiv (Zachariae et al., 1998). Da das Protein über elf potentielle Cdc28-Konsensusstellen verfügt, sollte der Beitrag der einzelnen Stellen zur Inaktivierung von Hct1 untersucht werden. Hct1 ist aber nicht nur ein Substrat für CDK, sondern auch für Cdc5. Außerdem wird Cdc5 Hct1-abhängig degradiert. Beide Proteine verbindet also eine komplexe Beziehung. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, diese genauer zu charakterisieren.

7.1 Die Polo-Kinase Cdc5

Cdc5 ist die einzige Kinase aus der Polokinasefamilie in der Bäckerhefe (Nigg et al., 1998, Glover et al., 1998). Das Protein ist 705 Aminosäuren lang und verfügt am N-Terminus über zwei „destruction-box“ Motive. Die hochkonservierte Kinasedomäne befindet sich ebenfalls am N-Terminus. Die beiden namensgebenden Polo-box Motive sind im C-Terminus des Proteins lokalisiert. Cdc5 besitzt zudem fünf Konsensusstellen für eine Phosphorylierung durch zyklinabhängige Kinasen, die über die gesamte Länge des Proteins verteilt sind (Abb. 54).

MSLGPLKAIN DKQLNTRSKL **VHTPI**KGNTA DLVGKENHFK QTKRLDPNND HHHQPAQKKK
 REKLSALCK**T** **PPSLIK**TRGK DYHRGHFLGE GGFARCFQIK DDSGEIFAAK TVAKASIKSE
 KTRKKLLSEI QIHKSMSHPN IVQFIDCFED DSNVYILLEI CPNGSLMELL KRRKVLTEPE
 VRFFTTQICG AIKYMHSRRV IHRDLKLGNI FFDSNYNLKI GDFGLAAVLA NESERKYTIC
GTPNYIAPEV LMGKHS~~GH~~SF EVDIWSLGVM LYALLIGKPP FQARDVNTIY ERIKCRDFSE
 PRDKPISDEG KILIRDILSL DPIERPSLTE IMDYVWFRGT FPPSIPSTVM SEAPNFEDIP
 EEQSLVNFKD CMEKSLLES MSSDKIQRQK RDYISSIKSS IDKLEEYHQN RPFLPHSL**SP**
 GGTKQKYKEV VDIEAQRRNL DLAREARIRR AQQAVLRKEL IATSTNVIKS EISLRILASE
 CHLTLNGIVE AEAQYKMGGL PKSRLPKIKH PMIVTKWVDY SNKHGFSYQL STEDIGVLFN
 NGTTVLRLAD AEEFWYISYD DREGWASHY LLSEKPRELS RHLEVVDFFA KYMKANLSRV
 STFGREEYHK DDVFLRRYTR YKPFVMFELS DGTFQFNFKD HHKMAISDGG KLVTYI**SP**SH

ESTTYPLVEV LKYGEIPGYP ESNFREKLTL IKEGLKQKST IVTVD

Abb. 54 Proteinsequenz von Cdc5. Primärsequenz von Cdc5 im Einbuchstaben-Standardcode. Cdc5 besitzt fünf potentielle Stellen für Phosphorylierung durch Cdc28-Kinase. Diese sind fett dargestellt. Die Kinasedomäne ist einfach unterstrichen, die beiden Polo-box Motive sind doppelt unterstrichen.

Cdc5 ist ein essentielles Gen. Mutanten arretieren in der Telophase mit replizierter DNA, getrenntem Kern und elongierter Spindel, was darauf hindeutet, dass Cdc5 eine wichtige Rolle beim Austritt aus der Mitose spielt. In der Tat ist es Teil des „mitotic exit networks“ (MEN), das die Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose herbeiführt. Cdc5 ist ein instabiles Protein, das am Ende der Mitose APC-abhängig degradiert wird (Shirayama et al., 1998). Allgemein verhalten sich die Cdc5-Mengen im Zellzyklus parallel zu denen des Zyklins Clb2. Beide Proteine werden in der S-Phase gebildet, erreichen ein Maximum vor der Anaphase und werden dann wieder degradiert (Abb. 22). Ebenso schwankt die Cdc5-assoziierte Kinaseaktivität während des Zellteilungszyklus. Cdc5-Kinaseaktivität kann von der Meta- bis zur Anaphase nachgewiesen werden, sowie in Zellen, die aufgrund eines DNA- oder Spindelschadens in der Metaphase arretiert sind (Cheng et al., 1998). Die Überexpression von *CDC5* führt zur APC-abhängigen Degradation von Clb2 (Charles et al., 1998), zudem bewirkt Cdc5 eine Mobilitätsveränderung von Clb2, was darauf hindeutet, dass Clb2 von Cdc5 phosphoryliert wird (Abb. 8). Diese Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf die Interaktion von Clb2 mit Cdc28. Cdc5 und Clb2 interagieren zudem physikalisch miteinander, und zwar unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von Clb2 (Abb. 11). Diese Interaktion könnte eine Enzym-Substrat-Wechselwirkung zwischen Cdc5 und Clb2 widerspiegeln. Cdc5 selbst ist ein Phosphoprotein und seine Kinaseaktivität ist abhängig von einer Phosphorylierung des Proteins (Cheng et al., 1998). In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Natur der Cdc5-Phosphorylierung genauer zu untersuchen.

Da Cdc5 mehrer Konsensusstellen für Cdc28-Kinase aufweist, wurde untersucht, ob Cdc5 ein Substrat für Cdk1 ist. *In vitro* ist Cdc5 in der Tat ein Substrat für B-Typ Zyklin-Cdc28-Komplexe. Die ersten zwei Stellen scheinen für die zeitliche Regulation der Phosphorylierung wichtig zu sein. Das Fehlen dieser Stellen bewirkt, dass das resultierende Protein von Clb3- und Clb5-Cdc28 sehr schlecht erkannt wird, wohingegen das Wildtypprotein ein sehr gutes Substrat für diese Zyklin-Cdc28-Komplexe darstellt. Clb2-Kinase scheint eine unverändert, wenn auch relativ niedrige Aktivität gegenüber beiden Formen von Cdc5 zu besitzen (Abb. 7). In Synchronexperimenten ist es nicht möglich, unphosphoryliertes Cdc5 nachzuweisen. Schon mit dem ersten Auftreten des Proteins in der S-Phase erkennt man in der SDS-PAGE zwei Banden. Man kann nun vermuten, dass Cdc5 *in vivo* hauptsächlich von Komplexen aus Cdc28 mit den frühen Zyklinen Clb5- und Clb3 phosphoryliert wird, und dass für diese Phosphorylierung die ersten beiden Cdc28-Konsensusstellen die Hauptakzeptorstellen sind. Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der ersten beiden Phosphorylierungsstellen ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Überexpression von *CDC5m1/2* im Gegensatz zum Wildtypprotein die Degradation von Clb2 nicht mehr induzieren kann. Weiterhin ist eine N-terminale Deletionsmutante (Cdc5 Δ N70), in der ebenfalls die ersten beiden Stellen fehlen, ebenfalls nicht mehr in der Lage, die Clb2-Degradation zu induzieren, obwohl das Protein selbst aufgrund des Fehlens seiner „destruction box“ Motive stabilisiert ist. Zudem kann auch kein Sic1-Anstieg beobachtet werden (Abb. 8 A). Beide Stellen sind demnach wichtig für die *in vivo* Aktivität von Cdc5. Auch Clb2-Cdc28-Komplexe können Cdc5 phosphorylieren. Man kann spekulieren, dass Cdc5 dadurch im Verlauf des Teilungszyklus in einem phosphorylierten Zustand gehalten wird. Der Vergleich mit anderen Mitgliedern der Polokinasefamilie zeigt, daß die erste Cdc28-Konsensusstelle auf Cdc5 beschränkt ist, da sie sich in der N-terminalen Verlängerung von Cdc5 befindet über die die anderen Polo-Kinasen nicht verfügen. Die zweite Stelle ist in *S. pombe* konserviert. In den Polo-Kinasen aus *Drosophila*, *Xenopus* und in Plk1 des Menschen befindet sich an der entsprechenden Position eine saure Aminosäure, die mit ihrer negativen Ladung einem Phosphatrest ähnelt (Abb. 3). Sind alle fünf Cdc28-Konsensusstellen in Cdc5 ausgetauscht, ist das resultierende Protein kein Substrat mehr für zyklinabhängige Kinasen (Abb. 10).

Cdc5 ist aber nicht nur ein Substrat für CDK. In *in vitro* Kinaseassays weist Cdc5 eine starke Autophosphorylierung auf. Aus Hefe gereinigtes Cdc5 kann aus *E. coli* gereinigtes MBP-Cdc5 phosphorylieren. Das bedeutet, dass es sich bei der beobachteten Autophosphorylierungsreaktion von Cdc5 um eine intermolekulare Reaktion handelt. Diese findet ebenfalls nicht mehr statt, wenn die ersten beiden Cdc28-Konsensusstellen fehlen (Cdc5m1/2) (Abb. 13).

Daten in der Literatur deuten darauf hin, dass Cdk1 Polo-Kinase aktivieren kann (Kotani et al., 1998). Der Verlust der Fähigkeit von Cdc5m1/2 zur Induktion der Clb2-Degradation deutet an, dass Cdc5 durch Phosphorylierung durch Cdc28 positiv reguliert wird. Sind alle fünf Stellen oder auch nur die dritte Stelle in Cdc5 nicht mehr phosphorylierbar, führt dies zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins in allen durchgeführten Assays. Die resultierenden Cdc5-Derivate besitzen keine Autophosphorylierungsaktivität mehr. Parallel geht auch die

Kinaseaktivität gegenüber dem künstlichen Substrat Casein verloren. Die dritte Stelle (T242) befindet sich innerhalb des Aktivierungsloops der Kinasedomäne und ist in der Bäckerhefe, der Spaltheefe, *Drosophila*, *Xenopus* und dem Menschen konserviert. Vier Positionen davor befindet sich ein Threonin (T238), von dem gezeigt worden ist, dass seine Phosphorylierung in Plk1 (T210) essentiell ist für die Aktivität des Proteins (Lee und Erikson, 1997). Mit den vorliegenden experimentellen Daten kann nicht entschieden werden, ob die dritte Stelle in Cdc5 tatsächlich phosphoryliert wird, oder ob das Threonin an dieser Position für die Funktion des Proteins essentiell ist. Es wäre durchaus möglich, dass durch die Mutation der dritten Cdc28-Konsensusstelle die Zugänglichkeit des Threonins 238 für eine Phosphorylierung verschlechtert wird und es sich bei dem Funktionsverlust von Cdc5m3 daher nur um einen indirekten Effekt handelt. Denkbar wäre außerdem, dass das Threonin an Position 238 für die dreidimensionale Struktur des Proteins wichtig ist. Um diese Frage endgültig zu klären, müsste eine Phosphopeptidanalyse des Proteins durchgeführt werden, um zu bestimmen, welche Positionen tatsächlich phosphoryliert sind. Dies wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Meyer an der Universität Bochum angegangen. Die Experimente führten jedoch zu keinem Ergebnis.

7.2 Der APC-Spezifitätsfaktor Hct1

Die Bindung von Hct1 an den APC wird über die Phosphorylierung von Hct1 durch CDK negativ reguliert. Nur unphosphoryliertes Hct1 interagiert mit dem APC und ist damit in der Lage, die Degradation seiner Substrate zu vermitteln. Mit Auftreten von Cln-Cdc28-Kinaseaktivität in der späten G1-Phase liegt Hct1 als Phosphoprotein vor. Im Verlauf des Zellzyklus wird Hct1 von verschiedenen Zyklin-Cdk1 Komplexen in einem phosphorylierten Zustand gehalten. Erst am Ende der Mitose, wenn durch die Aktivität des „mitotic exit networks“ Cdc14 aktiviert wurde, wird Hct1 dephosphoryliert und somit aktiv. Die Hct1-Aktivität wird bis zur späten G1-Phase aufrechterhalten und sorgt dafür, dass die CDK-Aktivität in diesem Zeitraum niedrig bleibt. Hct1 weist elf Konsensusstellen für eine Phosphorylierung durch zyklinabhängige Kinase auf, die aus einem SP/TP-Motiv bestehen. Sieben davon entsprechen außerdem dem erweiterten Konsensus SP/TP X K/R. Ein Derivat, in dem keine der elf Stellen phosphorylierbar ist, ist hyperaktiv (Zachariae et al., 1998). Die Degradation von Clb2 setzt verfrüht ein und ist schließlich letal für die Zellen. Der Phosphorylierungsstatus von Hct1 ist somit wichtig für den korrekten zeitlichen Ablauf der Ereignisse am Ende der Mitose. Es ist nicht bekannt, ob alle elf Stellen für die Inaktivierung von Hct1 durch CDK benutzt werden. Ebenfalls ist nicht geklärt, ob die Phosphorylierung an allen Stellen die gleiche Auswirkung auf die Hct1-Aktivität besitzt. Abb. 55 zeigt die Aminosäuresequenz von Hct1, die Cdc28-Konsensusstellen sind durch fette Schreibweise hervorgehoben.

MSTNLNPFMN **NT**PS**SP**LKLG SESKRVSKRP ISSSSASLL SSPSRRSRPS TVYGDRYIPS
 RTDIDFNSIV SISSMASVPA LNPSTEDQV EYQKERQAHE TYNTLLKNEF FGEMLSKDTV
 GSESSIDRIK NTRPSTRGNV HAENTTRHGY ELERVSTPPP EAAGLEEF**SP** H**ST**PV**TP**RRRL
 FTSQQDEITR PSSNSVRGAS LLTYQQRKGR RLSAASLLQS QFFDSM**SP**VR PDSKQLLL**SP**
 GKQFRQIAKV PYRVLDAPSL ADDFYYSLLID WSSTDVLAVA LGKSIFLTDN NTGDVVHLCD
 TENEYTSLSW IGAGSHLAVG QANGLVEIYD VMKRKCIRTL SGHIDRVACL SWNNHVLTSG
 SRDHRILHRD VRMPDPFFET IESHTQEVCG LKWNVADNKL ASGGNDNVVH VYEGTSK**SP**I
 LTFDEHKAHV KAMAW**SP**HKR GVLATGGGTA DRRLKIWNVN TSIKMSDIDS GSQICNMVWS
 KNTNELVTSH GYSKYNLTLW DCNSMDPIAI LKGHSFRVLH LTLSNDGTTV VSGAGDETLR
 YWKLFDKPKA KVQPNSLIFD AFNQIR

Abb. 55 Proteinsequenz von Hct1. Primärsequenz von Hct1 im Einbuchstaben-Standardcode. Hct1 besitzt elf potentielle Stellen für Phosphorylierung durch Cdc28-Kinase. Diese sind fett dargestellt. Unterstrichen sind potentielle Bindestellen für die Polo-Box.

Durch Herstellung verschiedener Derivate von Hct1 und der Untersuchung ihrer *in vivo* Aktivität sollte der Beitrag einzelner Cdc28-Konsensusstellen zur Regulierung von Hct1 aufgeklärt werden. Untersucht wurde die Lebensfähigkeit der Zellen nach schwacher Überexpression verschiedener *HCT1*-Konstrukte, die *HCT1*-induzierte Degradation des B-Typ-Zyklins Clb2 und das Laufverhalten der Hct1-Derivate im Western Blot. Die Untersuchung der Lebensfähigkeit der Zellen zeigt deutlich, dass verschiedene Phosphostellen in Hct1 einen unterschiedlichen Beitrag zur Inaktivierung des Proteins leisten. Die experimentellen Bedingungen wurden so gewählt, dass die Überproduktion des Wildtypproteins das Wachstum der Zellen nicht beeinträchtigt und die von Hct1+0 letal ist. Stehen noch die ersten neun Stellen für die Phosphorylierung durch Cdc28-Kinase zur Verfügung, sind die Zellen in ihrer Lebensfähigkeit nicht beeinträchtigt. Sind es hingegen die letzten neuen Stellen, bewirkt dies bei etwas stärkerer Expression bereits eine geringe Beeinträchtigung des Wachstums. Für die Inaktivierung von Hct1 ist also nicht nur die reine Zahl der zur Verfügung stehenden Phosphorylierungsstellen wichtig, denn offenbar unterscheiden sich diese Stellen in ihrer Qualität. Diese Aussage kann auch für andere Zusammenstellungen von Cdc28-Konsensusstellen aufrechterhalten werden. Untersucht man verschiedene Kombinationen von vier Stellen, erhält man folgendes Bild. Sind die Stellen 8/9/10/11 vorhanden, ist die Überproduktion des entsprechenden Derivates letal. Bei den Stellen 5/6/7/8 wachsen die Zellen bei sehr schwacher Überexpression des Konstruktes sehr schlecht. Besser geht es den Zellen, wenn die Stellen 1/2/10/11 vorhanden sind. Zellen, die *HCT1*+1/2/3/4 und *HCT1*+1/2/8/9 schwach überexprimieren, wachsen hingegen wie ein Wildtypstamm. Das bedeutet, diese vier Stellen reichen aus, um Hct1 bei schwacher Überproduktion zu inaktivieren. Bei der Untersuchung von Kombinationen von drei Stellen, sieht man ebenfalls deutliche qualitative Unterschiede der einzelnen Stellen. Es ist also nicht die reine Zahl der zur Verfügung stehenden Stellen, die die Lebensfähigkeit der Zellen bei Überexpression der entsprechenden Konstrukte wieder gewährleistet. Eine besondere Bedeutung scheint den ersten vier Cdc28-Konsensusstellen zuzukommen. Zweierkombinationen dieser ersten vier Stellen erlauben den Zellen ein gewisses Wachstum bei einem niedrigen

Produktionsniveau des Proteins. Damit scheinen die ersten vier Stellen für die Inaktivierung von Hct1 wichtiger zu sein als beispielsweise manche Dreier- oder Viererkombinationen der im C-Terminus angesiedelten Stellen. Die Überexpression von *HCT1+3* ist bei sehr schwacher Expression nicht mehr vollkommen letal für die Zellen. Damit ist die dritte Stelle die einzige, die alleine eine gewisse Inaktivierung von Hct1 bewirken kann. Aufgrund dieser Ergebnisse und des Laufverhaltens der entsprechenden Proteine in der SDS-PAGE kann gefolgert werden, dass die ersten vier Cdc28-Konsensusstellen in Hct1 auch tatsächlich phosphoryliert werden und damit zur Inaktivierung von Hct1 beitragen. Es gibt Stellen wie z. B. die achte und die neunte bzw. die zehnte und die elfte Stelle, die zusammen kein Zellwachstum ermöglichen, die aber in Kombination mit den ersten beiden Stellen eine sehr gute Inaktivierung von Hct1 bewirken. Man könnte daraus den Schluss ziehen, dass diese Positionen zwar tatsächlich phosphoryliert werden können, dies aber so ineffizient geschieht, dass sie nur gemeinsam mit anderen Stellen zu einer Inaktivierung von Hct1 beitragen können. Das gleiche gilt vermutlich auch für andere Stellen. Dies wird auch deutlich, wenn man das Laufverhalten verschiedener Hct1-Derivate in der SDS-PAGE analysiert. Sind nur einzelne Stellen in Hct1 vorhanden, bewirkt das keine Mobilitätsveränderung im Vergleich zu Hct1+0. Stehen hingegen zwei der ersten vier Stellen für eine Phosphorylierung zur Verfügung, manifestiert sich dies im Auftreten von deutlich langsamer laufenden Spezies von Hct1. Die Stellen 5/6/7 und 8/9/10/11 bewirken ebenfalls keine Mobilitätsveränderung von Hct1, sind die sieben Stellen aber kombiniert, treten langsamer laufende Bande im Western Blot auf. Auch dies spricht dafür, dass manche Stellen so ineffizient phosphoryliert werden, dass sie erst ab einer gewissen Menge eine sichtbare Phosphorylierung und Inaktivierung von Hct1 bewirken. Dies steht nicht in Zusammenhang mit der erweiterten Konsensussequenz für zyklinabhängige Kinasen. Die achte, neunte und zehnte Position entsprechen zwar diesem Konsensus, bewirken aber dennoch alleine keine Inaktivierung von Hct1.

Die Lebensfähigkeit der Zellen nach Überexpression verschiedener *HCT1*-Konstrukte korreliert mit der Fähigkeit dieser Konstrukte, Clb2-Degradation zu induzieren (Abb. 38-Abb. 42). Die beobachtete Letalität beruht somit unter anderem auf der vorzeitigen Degradation von Clb2.

Die beschriebenen Daten belegen, dass sich die elf Cdc28-Konsensusstellen in Hct1 in ihrer Fähigkeit, Hct1 zu inaktivieren, stark unterscheiden. Aber warum besitzt Hct1 elf potentielle Stellen für die Phosphorylierung durch Cdc28, wenn vier Stellen für die Inaktivierung des Proteins bereits ausreichen? *In vivo* existieren viele verschiedene Formen von Hct1 gleichzeitig nebeneinander, was aus dem sehr heterologen Laufverhalten des Proteins im Western Blot abzuleiten ist. Eine interessante Hypothese ist folgende. Die Phosphorylierung einzelner Stellen wie beispielsweise der dritten oder Kombinationen der ersten vier Stellen sind ausreichend für eine Inaktivierung von Hct1. Das führt zu einer schnellen Inaktivierung von Hct1 sobald ab START Cdc28-Kinaseaktivität in der Zelle vorliegt. Mit zunehmender Kinaseaktivität und dem Wechsel von G1-Zyklinen zu B-Typ Zyklinen werden nach und nach immer mehr Stellen in Hct1 phosphoryliert, so dass in der Population von Hct1-Molekülen vermutlich auch solche entstehen, in denen alle elf Stellen phosphoryliert sind. Kommt es nun zu einer zufälligen

Dephosphorylierung einzelner Positionen, hat dies keine Auswirkung auf die Aktivität von Hct1. Erst wenn am Ende der Mitose Cdc14 aus dem Nucleolus freigesetzt wird und die Dephosphorylierung von Hct1 einleitet, kommt es zu dessen Aktivierung. Gleichzeitig trägt Cdc14 durch die Stabilisierung von Sic1 zur Inaktivierung von Cdk1 bei, so dass Hct1 nicht mehr von neuem phosphoryliert wird. Die elf Cdc28-Konsensusstellen in Hct1 könnten somit einen Pool repräsentieren, der verhindert, dass geringe Cdc14-Aktivität oder eine zufällige Dephosphorylierung von Hct1 durch eine unspezifische Reaktion schon zu dessen Aktivierung führt, da nur gänzlich unphosphoryliertes Hct1 an den APC bindet. Die Inaktivierung von Hct1 würde aber schon bei niedriger CDK-Aktivität stattfinden. Der Austritt aus der Mitose wäre dann begleitet von einem scharfen Übergang von inaktivem zu aktivem Hct1.

7.2.1 Cdc5 und Hct1

Cdc5 wird wie Clb2 APC^{Hct1}-abhängig degradiert. Es konnte gezeigt werden, dass Cdc5 ebenso wie Clb2 unabhängig von seinen N-terminalen „destruction box“ Motiven mit Hct1 interagieren kann (Abb. 24). Dies gilt auch für die Interaktion von Cdc5 mit Hct1+0 (Abb. 25) (Schwab et al., 2001). Die „destruction box“ ist für Hct1 folglich nicht essentiell, um seine Substrate zu binden. Für die Erkennung von Substraten durch Hct1 wurde ein zusätzliches Sequenzmotiv, die sogenannte KEN Box (KENXXXN/D), beschrieben (Pfleger et al., 2000). In der Sequenz von Cdc5 findet man die Aminosäureabfolge KENXXXQ. Diese Sequenz ist zusammen mit den „destruction box“ Motiven in der N-terminal verkürzten Variante allerdings ebenfalls deletiert und kann somit nicht für die Interaktion zwischen Hct1 und Cdc5 Δ N70 verantwortlich sein. Es gibt nun zwei Erklärungsmöglichkeiten für diesen Befund. Die erste ist die Existenz eines weiteren Sequenzmotives in Cdc5 und vielleicht auch in anderen Hct1-Substraten, das die Erkennung durch und die Bindung an Hct1 vermittelt. Die zweite Möglichkeit ist die, dass die Bindung, die durch die Immunpräzipitationen nachgewiesen werden kann, eine Substrat-Enzym-Wechselwirkung zwischen Hct1 und Cdc5 widerspiegelt. Hct1 ist *in vitro* ein Substrat für Cdc5 (Abb. 30) und die Überexpression von *CDC5* bewirkt eine Mobilitätsveränderung von Hct1 *in vivo*. Wichtig dafür sind die ersten vier Cdc28-Konsensusstellen in Hct1. Sind die ersten drei davon zu einem Alanin ausgetauscht, führt die vermehrte Produktion von Cdc5 weiterhin zu einer Hyperphosphorylierung von Hct1. Fehlen hingegen die ersten vier Stellen, tritt diese Hyperphosphorylierung nicht mehr auf (Abb. 28). Dies lässt vermuten, dass die vierte Stelle direkt als Akzeptorstelle für das Phosphat dient oder indirekt für die Phosphorylierung von Hct1 durch Cdc5 verantwortlich ist. Diese Vermutung wurde durch den Austausch des entsprechenden Threonins gegen ein Alanin überprüft. Entgegen der Erwartung wird dieses Protein von Cdc5 immer noch phosphoryliert. Der Austausch des Serins an Position drei bzw. des Threonins an Position vier zu der sauren Aminosäure Aspartat, was die Phosphorylierung imitieren soll, führt ebenfalls nicht zu einer Hyperphosphorylierung des resultierenden Proteins nach Überexpression von *CDC5* (Abb. 29).

Eine interessante Hypothese, die die beobachteten Ergebnisse erklären könnte, ergibt sich aus einer kürzlich veröffentlichten Arbeit (Elia et al., 2003). Hier wurde die Polo-box Domäne von

humanem Plk1 als ein Phospho-Serin- bzw. Phospho-Threonin-Bindemotiv identifiziert. Ziel der Autoren war es, neue Domänen zu finden, die Motive erkennen, die von Prolin-gerichteten Kinasen wie der zyklinabhängigen Kinase erzeugt werden. Die optimale Sequenzumgebung für die Bindung von Plk1, die sie mittels Peptiden bestimmt haben, besteht aus einem Serin gefolgt von einem Phospho-Threonin oder einem Phospho-Serin. Folgt danach ein Prolin, verbessert dies die Bindung zwar, das Prolin ist aber nicht essentiell für die Bindung von Plk1 an dieses Motiv. Ein Phospho-Threonin vermittelt eine siebenfach effizientere Bindung der Polo-Box als ein Phospho-Serin. Die Polo-box Domäne von Plk1 interagiert sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit der hyperphosphorylierten Form von Cdc25C. Diese Bindung wird aufgehoben, wenn in der Erkennungssequenz der Polo-box das Serin bzw. Threonin (S129, T130) gegen Alanin bzw. Valin ausgetauscht werden. Gleichzeitig wird diese Variante von Cdc25C in mitotischen Zellen nicht mehr komplett phosphoryliert, was darauf hindeutet, dass die Bindung an Plk1 für die mitotische Phosphorylierung und Aktivierung von Cdc25C essentiell ist.

Vier der ersten sechs Cdc28-Konsensusstellen im N-Terminus von Hct1 entsprechen einer Erkennungssequenz für die Polo-Box und sind in Abb. 55 durch Untersteichung hervorgehoben. Es ist denkbar, dass Cdc5 Hct1 auf eine vergleichbare Weise bindet wie sein humanes Ortholog Plk1 Cdc25C. Dadurch könnte die Notwendigkeit der ersten vier Konsensusstellen in Hct1 für die Phosphorylierung durch Cdc5 erklärt werden. In Hct1+4/5/6/7/8/9/10/11 wären noch zwei optimale Bindestellen für die Polo-box vorhanden. In Hct1+5/6/7/8/9/10/11 hingegen nur noch eine. Ist nur die vierte Stelle zu einem Alanin ausgetauscht, stünden insgesamt wieder drei Bindestellen für die Polo-Box zur Verfügung, was zur Bindung und damit zu einer Phosphorylierung von Hct1 führen würde. Wenn die Bindung zwischen Cdc5 und Hct1 durch die Polo-box vermittelt würde, könnte das auch erklären, weshalb der Austausch der phosphorylierbaren Aminosäuren Serin bzw. Threonin an den Positionen drei und vier zu einem Aspartat die Phosphorylierbarkeit von Hct1 durch Cdc5 nicht wiederherstellt. Die Polo-box Domäne von Plk1 diskriminiert stark gegen nicht phosphoryliertes Serin bzw. Threonin (Elia et al., 2003). Eine saure Aminosäure an der entsprechenden Stelle der Erkennungssequenz kann vermutlich den Phosphatrest nicht ersetzen. In der Literatur sind sowohl Fälle beschrieben, in denen eine saure Aminosäure eine Phosphoaminosäure ersetzen kann als auch Fälle, in denen dies nicht funktioniert (Johnson et al., 1996). Experimentell ist diese Hypothese schwer zu überprüfen, da Hct1+0 nicht gänzlich unphosphoryliert ist. Es scheint neben Cdk1 eine weitere Kinase zu existieren, die Hct1 phosphorylieren kann, da auch bei Hct1+0 langsamer laufende Formen im Western Blot nachzuweisen sind. Dementsprechend interagiert Cdc5 in der Immunpräzipitation auch mit Hct1+0, auch wenn diese Interaktion vergleichsweise schwächer ausfällt als mit dem Wildtypprotein (Abb. 24 und Abb. 25). Durch Affinitätspräzipitationen konnte gezeigt werden, dass Cdc5 präferentiell mit phosphoryliertem Hct1 interagiert (Abb. 26). Ein weiteres Indiz stützt die phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen Cdc5 und Hct1. Hct1 aus *E. coli*, das gänzlich unphosphoryliert ist, ist ein sehr schlechtes *in vitro* Substrat für Cdc5. Die Vorphosphorylierung von Hct1 durch Clb5-Cdc28-Kinase verbessert die Phosphorylierbarkeit von Hct1 durch Cdc5 wesentlich. Dies könnte auf die Generierung von

optimalen Bindestellen für die Polo-Box durch CDK zurückzuführen sein. Cdc5 interagiert wie Plk1 mit Cdc25C mit hyperphosphoryliertem Hct1 (Abb. 24), die Hyperphosphorylierung von Hct1 ist aber nicht essentiell für die Interaktion mit Cdc5 (Abb. 24 und Abb. 25). Die komplexe Beziehung zwischen Cdc5 und Hct1 bedarf weiterer Untersuchungen. Beispielsweise kann getestet werden, ob die Polo-Box Domäne von Cdc5 für eine Interaktion mit Hct1 ausreichend ist und ob die Interaktion durch Zugabe eines Peptidliganden für die Polo-Box aufgehoben werden kann. Die Interaktion zwischen Cdc5 und Hct1 beruht zum einen auf der Hct1-vermittelten Degradation von Cdc5 und zum anderen auf der Cdc5-abhängigen Phosphorylierung von Hct1. Diese beiden Sachverhalte müssen experimentell getrennt werden, um Aussagen über die Interaktion beider Proteine machen zu können.

7.3 Cdc5 und Lte1

Sowohl Cdc5 als auch Lte1 sind Komponenten des „mitotic exit networks“. Beide Proteine haben einen aktivierenden Einfluss auf das MEN. Lte1 ist am Kortex der Knospe lokalisiert, verteilt sich in der Anaphase aber im gesamten Zytoplasma der Knospe. Cdc5 ist ein Kernprotein, kann aber auch an den Spindelpolen und an der Übergangsstelle von der Mutter- zur Tochterzelle nachgewiesen werden. *LTE1* ist im Gegensatz zu *CDC5* kein essentielles Gen, Mutanten zeigen aber einen kältesensitiven Phänotyp. In der Literatur existieren Hinweise, dass Cdc5 an der Phosphorylierung von Lte1 beteiligt sein könnte (Lee et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das Verhältnis von Cdc5 und Lte1 näher zu charakterisieren. Durch Präzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass Cdc5 und Lte1 in einem Komplex vorliegen. In diesem Komplex ist Lte1 phosphoryliert (Abb. 20). Ob er noch andere Komponenten aufweist und ob seine Existenz zellzyklusabhängig reguliert ist, bleibt noch zu klären. Die unterschiedliche Lokalisation von Cdc5 und Lte1 in der Zelle legt allerdings die Vermutung nahe, dass die Interaktion beider Proteine auf einen kurzen Zeitraum im Teilungszyklus beschränkt sein könnte. Nach Einwandern einer der Spindelpole in die Knospe während der Anaphase könnte spindelpolgebundenes Cdc5 auf Lte1 treffen. Es könnte aber auch ein freier Pool an Cdc5 existieren, der mit Lte1 interagiert und der weder mittels indirekter Immunfluoreszenz noch mit GFP-Fusionen nachweisbar ist.

Das Phosphorylierungsmuster von Lte1 verändert sich während des Zellteilungszyklus (Abb. 22). Besonders stark phosphoryliert ist Lte1 in mitotischen und in Nocodazol-arretierten Zellen. Die durchgeführten Experimente konnten die Abhängigkeit der Lte1-Phosphorylierung von der Aktivität von Cdc5, die in der Literatur beschrieben ist (Lee et al., 2001), allerdings nicht bestätigen. Neuere Ergebnisse in der Literatur bekräftigen diese Beobachtung (Höfken und Schiebel, 2002). Für die Phosphorylierung von Lte1 wird nicht wie beschrieben Cdc5 sondern die PAK-Kinase (p21-activated kinase) Cla4 benötigt. Cla4 ist weiterhin essentiell für die korrekte Lokalisation von Lte1 am Kortex der Knospe. Die GTPase Cdc42 und deren GEF Cdc24 wirken oberhalb von Cla4 und sind somit ebenfalls notwendig für die Lokalisation von Lte1 (Höfken und Schiebel, 2002, Sesham et al., 2002). Die beobachtete Interaktion zwischen Cdc5 und Lte1 spiegelt demnach keine Enzym-Substrat Wechselwirkung wider. Es

kann postuliert werden, dass Cdc5 und Lte1 nach der Phosphorylierung von Lte1 durch Cla4 miteinander interagieren.

7.4 Cdc5 und Pds1

Das Securin Pds1 wird am Metaphase/Anaphase-Übergang APC^{Cdc20}-abhängig degradiert. Vor der Anaphase bindet und inhibiert Pds1 die Separase Esp1. Esp1 ist eine Protease, die am Beginn der Anaphase die Kohesinuntereinheit Scc1 spaltet und so die Trennung der Schwesterchromatiden ermöglicht (Murray, 1999). Pds1 inhibiert Esp1 aber nicht nur, sondern ist auch nötig für dessen Aktivierung, indem es seine Kernlokalisierung unterstützt (Jensen et al., 2001). Um Esp1 effizient zu binden und so seine Kernlokalisierung zu bewirken, muss Pds1 von Zyklin-Cdc28-Komplexen phosphoryliert werden (Agarwal und Cohen-Fix, 2002). Esp1 leitet durch Auflösung des Kohesin-Komplexes aber nicht nur den Beginn der Anaphase ein, sondern hat auch einen Einfluss auf den Beginn der Zyklin-Degradation am Ende der Mitose. *Esp1-1*-Mutanten zeigen eine verlangsamte Abnahme der B-Typ-Zykline, die Überexpression von *ESP1* bewirkt hingegen eine verfrühte Degradation von Clb2 sowohl in der Meta- als auch in der Anaphase (Tinker-Kulberg und Morgan, 1999). Esp1 ist Teil des FEAR-Weges, der in der frühen Anaphase zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus führt. Ebenfalls ein Bestandteil dieses Weges ist Cdc5. Die Cdc5-Aktivität scheint von Pds1 positiv beeinflusst zu werden. In *pds1*-Deletionsmutanten ist die Zunahme von Sic1 nach Überexpression von *CDC5* deutlich schwächer als in einem Wildtypstamm. Außerdem wird das B-Typ Zyklin Clb2 viel schwächer phosphoryliert, obwohl es mit einer ähnlichen Kinetik wie im Wildtyp degradiert wird (Abb. 15). Cdc5 selbst ist hingegen stabilisiert. Es kann spekuliert werden, dass Esp1 aufgrund des Fehlens von Pds1 nicht korrekt lokalisiert werden kann und so die Aktivierung von APC^{Hct1} nicht effizient stattfindet, was zu einer Stabilisierung von Cdc5 führen würde. Für die Cdc5-vermittelte Phosphorylierung von Clb2 und den Anstieg von Sic1 scheint Pds1 somit wichtig zu sein. Wie Pds1 dies bewerkstelligt, bleibt unklar. Es konnte aber gezeigt werden, dass Cdc5 und Pds1 physikalisch miteinander interagieren (Abb. 14). Ob diese Interaktion für die beobachteten Effekte allerdings wichtig ist, muss noch untersucht werden.

Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Daten (Charles et al., 1998), bewirkt die Überexpression von *CDC5* eine transiente Abnahme der Pds1-Menge in Nocodazol-arretierten Zellen (Abb. 16). Diese transiente Pds1-Abnahme könnte Charles und Kollegen entgangen sein, da diese die Pds1-Menge lediglich nach dreistündiger Induktion von *CDC5* vom *GAL*-Promotor analysiert haben. Zu diesem Zeitpunkt ist die Pds1-Menge aber bereits wieder auf das Ausgangsniveau angestiegen. Die *CDC5*-induzierte Pds1-Degradation ist abhängig von APC^{Cdc20} und Cdc5-Kinaseaktivität (Abb. 17 und Abb. 18). Dies erscheint plausibel, da in der Literatur bereits beschrieben ist, dass die Cdc5-vermittelte APC-Aktivierung nicht nur in *hct1*-, sondern auch in *cdc20-1*-Mutanten vermindert ist (Charles et al., 1998). Eine attraktive Hypothese ist, dass Cdc5 die APC^{Cdc20}-abhängige Degradation von Pds1 durch direkte Aktivierung des APC bewirkt. Einen Hinweis darauf liefert die beobachtete Phosphorylierung der APC-Untereinheit Cdc27 durch Cdc5 (Abb. 19). Weiterhin ist beschrieben, dass Plk1 die

in vitro Ubiquitinierungsaktivität des APC erhöhen kann (Kotani et al., 1998). Cdc5 kann allerdings nicht essentiell für die Degradation von Pds1 sein, da *cdc5*-Mutanten mit niedrigen Mengen an Pds1 arretieren (Shirayama et al., 1998). Es ist aber durchaus denkbar, dass Cdc5 unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. nach Auslösen des Spindelkontrollsystems durch Nocodazol, limitierend ist für die Degradation von Pds1.

7.5 Cdc5 und das DNA-Schadenskontrollsystem

Eine Schädigung der DNA kann für eine Zelle verheerende Folgen haben. Zellen besitzen ein Kontrollsystem, das DNA-Schäden erkennt und deren Reparatur induziert. Um die Weitergabe des defekten genetischen Materials an die Nachkommen zu verhindern wird der Zellzyklus vor dem Beginn der Anaphase arretiert (Zhou und Elledge, 2000). Nach einem sehr langen Metaphasearrest können Hefezellen aber trotz fehlgeschlagener Reparatur des DNA-Schadens im Zellzyklus fortschreiten. Dieser Prozess wird als Adaptation bezeichnet. Eine bestimmte Mutation in Cdc5, Cdc5^{L251W} (*cdc5-ad*), verhindert den Prozess der Adaptation. Als Beispiel dient der durch das *cdc13-1* Allel ausgelöste Metaphasearrest (Garvik et al., 1995). Das *cdc5-ad* Allel rettet aber noch den letalen Phänotyp der *cdc5-1*-Mutante (Toczyski et al., 1997). In der Literatur existiert die Hypothese, dass diese besondere Mutante von Cdc5 in ihrer Aktivität gegenüber einem bestimmten Substrat inhibiert ist. Ein solcher nicht essentieller Schritt sollte vor Beginn der Anaphase stattfinden, da *cdc13-1*-Zellen in der Metaphase arretieren. Tatsächlich ist die Fähigkeit der *cdc5-ad*-Mutante zur Aktivierung des APC sowohl im Nocodazol- als auch im *cdc13-1*-Arrest vermindert (Charles et al., 1998). Cdc5^{L251W} verhält sich in Bezug auf die Phosphorylierung von Cdc14, Clb2 und Hct1 aber wie das Wildtypprotein. Weiterhin induziert seine Überexpression die Degradation von Clb2 und ist nach wie vor toxisch für die Zellen (Daten nicht gezeigt). Im Unterschied zu *CDC5* induziert die Überexpression von *CDC5*^{L251W} im *cdc13-1*-Arrest aber keine Kerntrennung (Abb. 45). Dieses Phänomen wurde genauer untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Überproduktion von Cdc5 im *cdc13-1*-Arrest Zellen mit getrennten Kernen in der Mutterzelle hervorruft. In solchen Zellen muss das Spindelpositionierungskontrollsystem und das DNA-Schadenskontrollsystem inaktiv sein. Neben getrennten Kernen besitzen diese Zellen keine Spindel mehr (Abb. 43). Sanchez et al. beschreibt unter diesen Umständen das Auftreten von Zellen mit elongierter Spindel. Erhöhte Cdc5-Aktivität kann den durch einen DNA-Schaden induzierten Metaphasearrest also überwinden. Dafür spricht ebenfalls, dass die Überexpression von *CDC5* im *cdc13*-Arrest die Degradation von Pds1 bewirkt. Da der durch einen DNA-Schaden induzierte Metaphasearrest gekennzeichnet ist durch phosphoryliertes und dadurch stabilisiertes Pds1, zeigt dies, dass durch erhöhte Cdc5-Aktivität das DNA-Schadenskontrollsystem überwunden werden kann. Die phosphorylierte und die unphosphorylierte Formen von Pds1 scheinen durch die Überexpression von *CDC5* und *CDC5*^{L251W} unterschiedlich beeinflusst zu werden. Eventuell könnte dies ein Grund sein für die beobachteten Unterschiede in Bezug auf die *CDC5*-induzierte Kerntrennung im *cdc13*-Arrest.

Es ist gezeigt, dass Cdc5 die Kohesinuntereinheit Scc1 phosphoryliert und sie dadurch anfälliger macht für die Spaltung durch die Separase Esp1, was für den Beginn der Anaphase essentiell ist (Alexandru et al., 2001). In dieser Arbeit konnte nun eine stabile physikalische Interaktion zwischen Cdc5 und Scc1 nachgewiesen werden (Abb. 47), was mittlerweile durch eine genomweite Untersuchung von Protein-Komplexen in Hefe bestätigt wurde (Ho et al., 2002). Die Überexpression von *CDC5* und *CDC5*^{L251W} wurde auch auf ihre Wirkung auf Scc1 verglichen. Die Überproduktion beider Formen von Cdc5 führt zum Auftreten von langsamer laufenden Formen von Scc1. Allerdings scheinen sie unterschiedlicher Natur zu sein. Bei der Überproduktion von *Cdc5*^{L251W} entsteht eine zusätzliche distinkte Bande, die in dieser Form bei der Überproduktion von Wildtyp Cdc5 nicht zu beobachten ist (Abb. 48). In Scc1 gibt es insgesamt neun Stellen, die von Cdc5 phosphoryliert werden (Alexandru et al., 2001). Es ist also denkbar, dass sich die Präferenz beider Cdc5-Formen für bestimmte Phosphorylierungsstellen unterscheidet. Ob dies *in vivo* relevant ist bleibt unklar. Ein Stamm, der endogen die L251W-Mutation trägt, zeigt in einer synchronisierten Zellkultur das gleiche Muster des Auftretens und der Phosphorylierung von Scc1 wie ein Wildtypstamm (Abb. 49). Es wäre aber durchaus denkbar, dass sich Unterschiede nur nach Aktivierung des DNA-Schadenskontrollsystems manifestieren würden. Mögliche Ziele für die Cdc5-vermittelte Adaptation wären demnach das Kohesin Scc1 und das Securin Pds1.

Cdc5 selbst wird nach Auslösen des DNA-Schadenskontrollsystems phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist abhängig von den „Checkpoint“-Komponenten Rad53, Mec1 und Rad9 (Cheng et al., 1998). Es konnte nun gezeigt werden, dass Cdc5 physikalisch mit Rad9 interagiert (Abb. 53). Außerdem induziert die Überexpression von *CDC5* eine Mobilitätsänderung von Rad9, die auf eine Phosphorylierung hindeutet (Abb. 52). Bisher ist bekannt, dass Rad9 in Antwort auf einen DNA-Schaden phosphoryliert wird und dass es phosphorylierungsabhängig an Rad53 bindet (Sun et al., 1998). Rad9 ist aber auch ohne Aktivierung des DNA-Schadenskontrollsystems ein Phosphoprotein (Abb. 50) und die Phosphorylierung von Rad9 schwankt im Zellteilungszyklus. Welche biologische Relevanz dieser Phosphorylierung zukommt und welche Bedeutung die Rad9-Cdc5-Interaktion hat, bleibt Gegenstand weiterer Forschungen. Eine Rolle von Cdc5 bei der Regulation des DNA-Schadenskontrollsystems durch Rad9 scheint aber möglich. Die gezeigten Daten legen nahe, dass Cdc5 in vielfältiger Weise in die Regulation des DNA-Schadenskontrollsystems eingreift.

8 Literaturverzeichnis

- Agarwal R. und Cohen-Fix O.** Phosphorylation of the mitotic regulator Pds1/securin by Cdc28 is required for efficient nuclear localization of Esp1/separase. *Genes Dev.* 16:1371-1382 (2002)
- Akada R., Murakane T. und Nishizawa Y.** DNA extraction method for screening yeast clones by PCR. *Biotechniques* 28:668-670 (2000)
- Alexandru G., Uhlmann F., Mechtler K., Poupart M.-A. und Nasmyth K.** Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* 105:459-472 (2001)
- Alexandru G., Zachariae W., Schleiffer W. und Nasmyth K.** Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J.* 18:2707-2721 (1999)
- Amon A., Irniger S. und Nasmyth K.** Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of the G1 cyclins in the next cycle. *Cell* 77:1037-1050 (1994)
- Andrews B. und Measday V.** The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* 14:66-72 (1998)
- Avides M., Tavares A. und Glover D.M.** Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nat. Cell. Biol.* 3:421-424 (2001)
- Bardin A.J. und Amon A.** MEN and SIN: what's the difference? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:815-826 (2001)
- Bardin A.J., Visintin R. und Amon A.** A Mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* 102:21-31 (2000)
- Berghammer H. und Auer B.** Fast and easy plasmid minipräparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* 14:528-529 (1993)
- Booher R.N., Deshaies R.J. und Kirschner M.W.** Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.* 12:3417-3426 (1993)
- Calzada A., Sacristan M, Sanchez E. und Bueno A.** Cdc6 cooperates with Sic1 and Hct1 to inactivate mitotic cyclin-dependent kinases. *Nature* 412:355-358 (2001)
- Calzada, A., Sanchez, M., Sanchez, E. und Bueno, A.** The stability of the Cdc6 protein is regulated by CDK/cyclin B complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 9734-9741 (2000).
- Carroll C.W. und Morgan D.O.** The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat. Cell. Biol.* 4:880-887 (2002)
- Charles J.F., Jaspersen S.L., Tinker-Kulberg R.L., Hwang L., Szidon A. und Morgan D.O.** The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* 8:497-507 (1998)
- Cheng L., Hunke L. und Hardy C.F.J.** Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Polo-like kinase Cdc5p. *Mol. Cell. Biol.* 18:7360-7370 (1998)
- Clarke D.J. und Giménez-Abián** Checkpoints controlling mitosis. *BioEssays* 22:351-363 (2000)
- Cohen-Fix O. und Koshland D.** Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes Dev.* 13:1950-1959 (1999)

- Cooper K.F., Mallory M.J., Egeland D.B., Jarnik M. und Strich R.** Ama1p is a meiosis-specific regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97: 14548–14553 (2000)
- Dai W., Wang Q. und Traganos F.** Polo-like kinases and centrosome regulation. *Oncogene* 21:6195-6200 (2002)
- Donaldson M.M., Tavares A.A.M., Hagan I.M., Nigg E.A. und Glover D.M.** The mitotic roles of Polo-like kinase. *J. Cell Sci.* 114:2357-2358 (2001)
- Donovan J.D., Toyn J.H., Johnson A.L. und Johnston L.H.** p40^{SDB25}, a putative CDK inhibitor, has a role in the M/G1 transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 8:1640-1653 (1994)
- Elia A.E.H., Cantley L. und Yaffe M.B.** Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299:1228-1231 (2003)
- Ellinger-Ziegelbauer H., Karasuyama H., Yamada E., Tsujikawa K., Todokoro K. und Nishida E.** Ste20-like kinase (SLK), a regulatory kinase for polo-like kinase (Plk) during the G2/M transition in somatic cells. *Genes Cells* 5:491-498 (2000)
- Elsasser, S., Lou, F., Wang, B., Campbell, J. L. und Jong, A.** Interaction between yeast Cdc6 protein and B-type cyclin/Cdc28 kinases. *Mol. Biol. Cell* 7, 1723-1735 (1996).
- Eppstein C.B. und Cross F.R.** CLB5 a novel B cyclin form budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.* 6:1695-1706 (1992)
- Evan G., Lewis G., Ramsey G. und Bishop J:M.** Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc protooncogen. *Mol. Cell. Biol.* 5:3610-3616 (1985)
- Feng Y., Hodge D.R., Palmieri G., Chase D.L., Longo D.L. und Ferris D.** Association of polo-like kinase with α -, β - and γ -tubulins in a stabel complex. *Biochem. J.* 339:435-442 (1999)
- Feng Y., Longo D.L. und Ferris D.K.** Polo-like kinase interacts with proteasoms and regulates their activity. *Cell Growth Differ.* 12:29-37 (2001)
- Field J., Nikawa J., Broek D., McDonald B., Rodgers L., Wilson I., Lerner R.A. und Wigler M.** Purification of a RAS-responsive adenyl cylase complex form *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitop addition method. *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165 (1988)
- Fraschini R., Beretta A., Sironi L., Musacchio A., Lucchini G. und Piatti S.** Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *EMBO J.* 20:6648-6659 (2001)
- Fraschini R., Formenti E., Lucchini G. und Piatti S.** Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J. Cell Biol.* 145:979-991 (1999)
- Frenz L.M., Lee 1 S.E., Fesquet D.und Johnston L.H.** The budding yeast Dbf2 protein kinase localises to the centrosome and moves to the bud neck in late mitosis. *J. Cell Sci.* 113:3399-3408 (2000)
- Fujimura H. und Sakuma Y.** Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeast. *Biotechniques* 14: 38-539 (1993)
- Furge K.A., Wong K., Armstrong J., Balasubramanian M. und Albright C.F.** Byr4 and Cdc16 form a two-component GTPase-activating protein for the Spg1 GTPase that controls septation in fission yeast. *Curr. Biol.* 8:947-954 (1998)
- Garvik B., Carson M. und Hartwell L.** Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* 15:6128-6138 (1995)

- Geymonat M., Spanos A., Walker P.A., Johnston L.H. und Sedgwick S.G.** Cdc5 phosphorylation reduced Bfa1/Bub2 GAP activity. *J. Biol. Chem.*, in press (2003)
- Giaever G., Chu A.M., Ni L., Connelly C., Riles L., Veronneau S., Dow S., Luca-Danila A., Anderson K., Andre B., Arkin A.P., Astromoff A., El-Bakkoury M., Bangham R., Benito R., Brachat S., Campanaro S., Curtiss M., Davis K., Deutschbauer A., Entian K.D., Flaherty P., Foury F., Garfinkel D.J., Gerstein M., Gotte D., Guldener U., Hegemann J.H., Hempel S., Herman Z. Jaramillo D.F., Kelly D.E., Kelly S.L., Kotter P., LaBonte D., Lamb D.C., Lan N., Liang H., Liao H., Liu L., Luo C., Lussier M., Mao R., Menard P., Ooi S.L., Revuelta J.L., Roberts C.J., Rose M., Ross-Macdonald P., Scherens B., Schimmack G., Shafer B., Shoemaker D.D., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Strathern J.N., Valle G., Voet M., Volckaert G., Wang C.Y., Ward T.R., Wilhelmy J., Winzeler E.A., Yang Y., Yen G., Youngman E., Yu K., Bussey H., Boeke J.D., Snyder M., Philippsen P., Davis R.W., Johnston M.** Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418:387-391 (2002)
- Gietz D., St-Jean A., Woods R.A., Schiestl R.H.** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20:1425 (1992)
- Glotzer M., Murray A.W. und Kirschner M.W.** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 394:132-138 (1991)
- Glover D.M., Hagan I.M. und Tavares A.A.M.** Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* 12:3777-3787 (1998)
- Gould K.L., Moreno S., Owen D.J., Sazer L. und Nurse P.** Phosphorylation at Thr161 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *EMBO J.* 10:3297-3309 (1991)
- Gruneberg U., Campbell K., Simpson C., Grindlay J. und Schiebel E.** Nud1 links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *EMBO J.* 19:6475-6488 (2000)
- Hardwick K.G., Weiss E., Luca F.C., Winey M. und Murray A.W.** Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science* 273, 953-956 (1996)
- Hartwell L.H. und Weinert T.A.** Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634 (1989)
- Hartwell L.H., Culotti J., Pringle J.R. und Reid B.J.** Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46-51 (1974)
- Ho Y., Gruhler A., Heilbut A., Bader G.D., Moore L., Adams S.-L., Millar A., Taylor P., Bennett K., Boutilier K., Yang L., Wolting C., Donaldson I., Schandorff S., Shewnarane J., Vo M., Taggart J., Goudreault M., Muskat B., Alfarano C., Dewar D., Lin Z., Michalickova K., Willems A.R., Sassi H., Nielsen P.A., Rasmussen K.J., Andersen J.R., Johansen L.E., Hansen L.H., Jespersen H., Podtelejnikov A., Nielsen E., Crawford J., Poulsen V., Sørensen B.D., Matthiesen J., Hendrickson R.C., Gleeson F., Pawson T., Moran M.F., Durocher D., Mann M., Hogue C.W.V., Figeys D. und Tyers M.** Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415:180-183 (2002)
- Hochstrasser M.** Ubiquitin, proteasomes and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:215-223 (1995)
- Höfken T. und Schiebel E.** A role for cell polarity proteins in mitotic exit. *EMBO J.* 21:4851-4862 (2002)
- Hoyt M.A.** Exit from mitosis: spindle pole power. *Cell* 102:267-270 (2000)

- Hoyt M.A., Totis L. und Roberts B.T.** *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule funktion. *Cell* 66:507-517 (1991)
- Hu F., Wang Y., Liu D., Li Y., Qin J. und Elledge S.J.** Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell* 107:655-665 (2001)
- Iouk T., Kerscher O., Scott R.J., Basrai M.A. and Wozniak R.W.** The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* 159:807-819 (2002)
- Jang Y.-J., Lin C.-Y., Ma S. und Erikson R.L.** Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99:1984-1989 (2002)
- Jaquenoud M., van Drogen F. und Peter M.** Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/CCdh1. *EMBO J.* 21:6515-6526 (2002)
- Jaspersen S.L., Charles J.F. und Morgan D.O.** Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr. Biol.* 9: 227-236 (1999)
- Jaspersen S.L., Charles J.F., Tinker-Kulberg R.L. und Morgan D.O.** A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9:2803-2817 (1998)
- Jensen S., Segal M., Clarke D.J. und Reed S.I.** A novel role of budding yeast separin Esp1 in anaphase spindle elongation: Evidence that proper spindle association of Esp1 is regulated by Pds1. *J. Cell Biol.* 152:27-40 (2001)
- Johnson L.N., Noble M.E.M. und Owen D.J.** Active and inactive protein kinases: structural basis for Regulation. *Cell* 85: 149-158 (1996)
- Johnston L.H., Eberly S.L., Chapmann J.W., Araki H. und Sugino A.** The product of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle gene *DBF2* has homology with protein kinases and is periodically expressed in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 10:1358-1366 (1991)
- King R.W., Deshaies R.J., Peters J.-M. und Kirschner M.W.** How proteolysis dirves the cell cycle. *Science* 274:1652-1658 (1996)
- Kitada K., Johnson A.L., Johnston L.H. und Sugino A.** A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as *CDC5*. *Mol. Cell. Biol.* 13:4445-4457 (1993)
- Koch C. und Nasmyth K.** Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr. Biol.* 6:451-459 (1994)
- Kotani S., Tanaka H., Yasuda H. und Todokoro K.** Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors. *J. Cell Biol.* 146:791-800 (1999)
- Kotani S., Tugendreich S., Fujii M., Jorgensen P.-M., Watanabe N., Hoog C., Hieter P. und Todokore K.** PKA and MPF-activated Polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol. Cell* 1:371-380 (1998)
- Lamb J.R., Michaud W.A., Sikorski R.S. und Hieter P.A.** Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO J.* 13:4321-4328 (1994)
- Lee D.S., Yuan Y.O., Kuriyama R. und Erikson R.L.** Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol. Cell. Biol.* 15: 7143-7151 (1995)
- Lee K.S. und Erikson R.L.** Plk is a functional homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5, and elevated Plk activity induces multiple septation structures. *Mol. Cell. Biol.* 17:3408-3417 (1997)

- Lee K.S., Grenfell T.Z., Yarm F.R. und Erikson R.L.** Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95:9301-9306 (1998)
- Lee S.E., Jensen S., Frenz L.M., Johnson A.L., Fesquet D. und Johnston L.H.** The Bub2-dependent mitotic pathway in yeast acts every cell cycle and regulates cytokinesis. *J. Cell Sci.* 114, 2345-2354 (2001)
- Leung G.C., Hudson J.W., Kozarova A., Davidson A., Dennis J.W. und Sicheri F.** The Sak polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. *Nat. Struct. Biol.* 9:719-724 (2002)
- Lew D.J. und Reed S.I.** A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J. Cell Biol.* 129:739-749 (1995)
- Lew D.J., Weinert T. und Pringle J.R.** Cell cycle control in *S. cerevisiae*. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* 3: 607-695 (1997)
- Li R.** Bifurcation of the mitotic checkpoint pathway in budding yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:4989-4994 (1999)
- Li R. und Murray A.W.** Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66:519-531 (1991)
- Logarinho E. und Sunkel C.E.** The *Drosophila* POLO kinase localises to multiple compartments of the mitotic apparatus and is required for the phosphorylation of MPM2 reactive epitopes. *J. Cell Sci.* 111:2897-2909 (1998)
- Longtine M.S., McKenzie A., Demarini D.J., Shah N.G., Wach A., Brachat A., Philippsen P. und Pringle J.R.** Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:953-961 (1998)
- Luca F.C. und Winey M.** *MOB1*, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. *Mol. Biol. Cell* 9:29-46 (1998)
- McCollum D. und Gould K.L.** Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends Cell Biol.* 11:89-94 (2001)
- Mendenhall M.D.** An inhibitor of p34^{Cdc28} kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 259:216-219 (1993)
- Menssen R., Neutzner A. und Seuffer W.** Asymmetric spindle pole localization of yeast Cdc15 kinase links mitotic exit and cytokinesis. *Curr. Biol.* 11: 345-350 (2001)
- Morgan D.O.** Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:261-291 (1997)
- Murray A.** A snip separates sisters. *Nature* 400:19-21 (1999)
- Murray A.** Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 81:149-152 (1995)
- Nash P., Tang X., Orlicky S., Chen Q., Gertler F.B., Mendenhall M.D., Sicheri F., Pawson T. und Tyers M.** Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* 414:514-521 (2001)
- Nasmyth K.** At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* 12:405-412 (1996)
- Nasmyth K., Peters J.-M. und Uhlmann F.** Splitting the chromosome: Cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* 288: 1379-1384 (2000)
- Nigg E.A.** Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:21-32 (2001)
- Nigg E.A.** Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:776-783 (1998)

- Pang T.L., Wang C.Y., Hsu C.L., Chen M.Y. und Lin J.J.** Exposure of single-stranded telomeric DNA causes G2/M cell cycle arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 14:9318-9321 (2003)
- Papworth L.C., Bauer J.C. und Braman J.** Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Stratagies* 9:3-5 (1996)
- Pereira G. und Schiebel E.** The role of the yeast spindle pole body and the mammalian centrosome in regulating late mitotic events. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 762-769 (2001)
- Pereira G., Manson C., Grindlay J. und Schiebel E.** Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *J. Cell Biol.* 157:367-379 (2002)
- Pereira G., Höfken T, Grindlay J, Manson C. und Schiebel E.** The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol. Cell* 6:1-10 (2000)
- Peter M. und Herskowitz I.** Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265:1228-1231 (1994)
- Pfleger C.M. und Kirschner M.W.** The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14:655-665 (2000)
- Poon R.Y. und Hunter T.** Cell regulation. Innocent bystanders or chosen collaborators? *Curr. Biol.* 5:1243-1247 (1995)
- Qian Y.-W., Erikson E. und Maller J.L.** Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the Polo-like kinase Plx1. *Science* 282:1701-1704 (1998)
- Qian Y.-W., Erikson E., Taieb F.E. und Maller J.L.** The Polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and Cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* Oocytes. *Mol. Biol. Cell* 12:1791-1799 (2001)
- Richardson H.E., Lew D.J., Henze M., Cross F. und Reed S.I.** An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* 59:1127-1133 (1989)
- Roberts R.T., Farr K.A. und Hoyt M.A.** The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene *BUB1* encodes a novel protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14:8282-8291 (1994)
- Sanchez Y., Bachant J., Wang H., Hu F., Liu D., Tetzlaff M. und Elledge S.J.** Control of the DNA damage checkpoint by Chk1 and Rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286:1166-1171 (1999)
- Schwab M., Neutzner M., Möcker D. und Seufert W.** Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *EMBO J.* 20:5165-5157 (2001)
- Schwab M., Schulze Lutum A. und Seufert W.** Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 90:683-693 (1997)
- Schweizer B. und Philippsen P.** *CDC15*, an essential cell cycle gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a protein kinase domain. *Yeast* 7:265-273 (1991)
- Schwob E., Böhm T., Mendenhall M.D. und Nasmyth K.** The B-type cyclin kinase inhibitor p40^{Sic1} controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79:239-244 (1994)
- Seshan A., Bardin A.J. und Amon A.** Control of Lte1 localization by cell polarity determinants and Cdc14. *Curr. Biol.* 12:2098-2110 (2002)
- Shah J.V. und Cleveland D.W.** Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 103:997-1000 (2000)
- Shirayama M., Matsui Y. und Toh-E A.** The yeast *TEM1* gene, which encodes a GTP-binding protein, is involved in termination of M phase. *Mol. Cell. Biol.* 14:7476-7482 (1994b)

- Shirayama M., Matsui Y., Tanaka K. und Toh-e A.** Isolation of a CDC25 family gene, MSI2/LTE1, as a multicopy suppressor of *ira1*. *Yeast* 10: 451-461 (1994a)
- Shirayama M., Toth A., Galova M. und Nasmyth K.** APC^{Cdc20} promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* 402:203-207 (1999)
- Shirayama M., Zachariae W., Ciosk R. und Nasmyth K.** The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 1336-1349 (1998)
- Shou W. und Deshaies R.J.** Multiple telophase arrest bypasses (tab) mutants alleviate the essential requirement for Cdc15 in exit from mitosis in *S. cerevisiae*. *BMC Genet.* 3:4 (2002)
- Shou W., Azzam R., Chen S.L., Huddleston M.J., Baskerville C., Charbonneau H., Annan R.S., Carr S.A. und Deshaies R.J.** Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex. *BMC Mol Biol.* 3:3 (2002)
- Shou W., Seol J.H., Shevchenko A., Baskerville C., Moazed D., Chen Z.W.S., Jang J., Shevchenko A., Charbonneau H. und Deshaies R.J.** Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97:233-244 (1999)
- Silljé H.H.W. und Nigg E.A.** Capturing polo kinases. *Science* 299:1190-1191 (2003)
- Smits V.A.J., Klompaker R., Arnaud L., Rijksen G., Nigg E.A. und Medema R.H.** Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 2:672-676 (2000)
- Song S. und Lee K.** A novel function of *Saccharomyces cerevisiae* CDC5 in cytokinesis. *J. Cell Biol.* 152:451-469 (2001)
- Song S., Grenfell T.Z., Garfield S., Erikson R.L. und Lee K.S.** Essential function of the Polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures. *Mol. Cell. Biol.* 20: 286-298 (2000)
- Stegmeier F., Visintin R. und Amon A.** Separase, Polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* 108:207-220 (2002)
- Sun Z., Hsiao J., Fay D.S. und Stern D.F.** Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science* 281:272-274 (1998)
- Surana U., Amon A., Dowzer C., McGrew J., Byers B. und Nasmyth K.** Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase-to-anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* 12:1969-1978 (1993)
- Tinker-Kulberg R.L. und Morgan D.O.** Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes Dev.* 13:1936-1949 (1999)
- Toczyski D.P., Galgoczy D.J. und Hartwell L.H.** CDC5 und CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* 90:1097-1106 . (1997)
- Toyn J.H., Johnson A.L., Donovan J.D., Toone W.M. und Johnston L.H.** The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. *Genetics* 145:85-96 (1997)
- Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Shinya N., Iwamatsu A. und Nishida E.** Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 410:215-220 (2001)
- Tyers M. und Jorgensen P.** Proteolysis in the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 10:54-64 (2000)

- Uhlmann F., Wernic D., Poupart M.-A., Koonin E.V. und Nasmyth K.** Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103:375-386 (2000)
- Van Vugt M.A.T.M., Smits V.A.J., Klompaker R. und Medema R.H.** Inhibition of Polo-like Kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. *J. Biol. Chem.* 276:41656-41660 (2001)
- Verma R., Annan R.S., Huddelston M.J., Carr S.A., Reynard G. und Deshaies R.J.** Phosphorylation of Sic1p by G1 CDK is required for its degradation and entry into S phase. *Science* 278:455-460 (1997)
- Visintin R., Craig K., Hwang E.S., Prinz S., Tyers M. und Amon A.** The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol. Cell* 2:709-718 (1998)
- Wan J., Xu H.-P. und Grunstein M.** CDC14 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 267:11274-11280 (1992)
- Wang H., Liu D., Wang Y., Qin J. und Elledge S.J.** Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev.* 15:1361-1372 (2001)
- Wang Y., Shirogane T., Liu D., Harper W. und Elledge S.J.** Exit from G1: Resetting the cell cycle through Amn1 inhibition of G protein signaling. *Cell* 112:697-709 (2003)
- Wassmann K. und Benezra R.** Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 11:83-90 (2001)
- Weiss E. und Winey M.** The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene *MPS1* is part of a mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.* 132:111-123 (1996)
- Weissmann A.M.** Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:169-178 (2001)
- Xu S., Huang H.-K., Kaiser P., Latterich M. und Hunter T.** Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in budding yeast. *Curr. Biol.* 10:329-332 (1999)
- Zachariae W. und Nasmyth K.** Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 13:2039-2058 (1999)
- Zachariae W., Schwab M., Nasmyth K. und Seufert W.** Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282: 1721-1724 (1998)
- Zachariae W., Shevchenko A., Andrews P.D., Ciosk R., Galova M., Stark M.J., Mann M. und Nasmyth K.** Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: Identification of a subunit related to cullins. *Science* 279:1216-1219 (1998)
- Zachariae W., Shin T.H. Galova M., Obermaier B. und Nasmyth K.** Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 274: 1201-1204 (1996)
- Zhou B.-B.S. und Elledge S.J.** The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-439 (2000)

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Neutzner (geb. Schäfer), Melanie
Anschrift: Bromberger Straße 20
70374 Stuttgart
e-mail: mneutzner@web.de
Geburtsdatum, -ort: 20. November 1973, Aalen (Württemberg)

Ausbildung:

1980-1984 Grund- und Hauptschule Westhausen

1984-1993 Ostalb-Gymnasium Bopfingen

10/1993-03/1999 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart

04/1998-03/1999 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Seufert am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart.
Thema: Untersuchungen zur Rolle von *BUB2* bei der Regulation der Mitose in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

04/1999-05/2003 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Seufert am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart. Thema: Regulatoren des Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: die Polo-Kinase Cdc5 und der Ubiquitinierungsfaktor Hct1

10 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APC	anaphase promoting complex
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CDC	cell division cycle
CDK	cyclin dependent kinase
CKI	cyclin dependent kinase inhibitor
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FEAR	Cdc14 early anaphase release
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
h	Stunde
HA	Hämagglutinin-Epitop
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galaktosid
l	Liter
LB	Luria Broth
MBP	Maltosebindeprotein
MEN	mitotic exit network
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Myc	c-myc-Epitop
OD _x	optische Dichte bei x nm
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
RENT	regulator of nucleolar silencing and telophase
RT	Raumtemperatur
<i>S.p.</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAE	Tris/Acet/EDTA Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
upm	Umdrehungen pro Minute

11 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Prof. Wolfgang Seufert für die Betreuung während meiner Promotion und die Schaffung eines angenehmen Arbeitsumfeldes.

Bedanken möchte ich mich auch herzlich bei Prof. Peter Scheurich für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Ralf Mattes.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen ehemaligen Kollegen bedanken, die mich während der letzten fünf Jahre an diesem Institut begleitet haben. Besonders Ruth hatte immer ein offenes Ohr für meine kleineren und größeren Probleme.

Natürlich gilt mein Dank auch allen meinen derzeitigen Kollegen, besonders der allmorgendlichen Kaffeerunde.

Vielen Dank an meine Familie, besonders an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Mein Mann Albert hat mir sowohl als Lebens- als auch als Laborpartner immer den Rücken gestärkt. Deshalb gilt ihm mein letzter und besonderer Dank.