

# **Regulation der Hefezelle durch lichtvermittelte Kontrolle des mitotischen Zellzyklusprogramms**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von Dipl.-Biol. Andrea Merbitz  
geboren in Dresden

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf  
Mitberichter: Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Hilt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2011  
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Stephan Nußberger

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart

2011

---

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbst verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den 30.06.2011

Andrea Merbitz

---

## Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Hilt danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft sowie seine konstruktive Kritik bei der Erstellung des Manuskripts.

Prof. Dr. Dieter H. Wolf danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut durchzuführen und die Unterstützung, die ich durch seine Mitarbeiter erfuhr. Ihnen danke ich ebenso. Besonders hervorheben möchte ich dabei Stefanie Besser, Dr. Jeannette Juretschke, Dr. Ruth Menßen-Franz und Dr. Antje Schäfer. Ihre Anregungen zur Umsetzung dieses völlig neuen Projektes sowie ihre Diskussionsbereitschaft waren sehr hilfreich für mich.

Prof. em. Dr.-Ing. Dr. h.c. mult. Ernst Dieter Gilles danke ich sehr herzlich für seinen unerschütterlichen Glauben an die Funktionalität des Systems. Seine ständige Motivation war unglaublich hilfreich.

Frau Dr. Katja Bettenbrock und Andrea Focke vom Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg danke ich für die Zusammenarbeit und die DAPI-Messungen zur Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen.

Den Mitarbeitern der Werkstatt des Instituts für Organische Chemie, insbesondere Herrn Götz Schneider, danke ich für die praktische Umsetzung der *Blackbox* inklusive Beleuchtung.

Mein innigster Dank gilt meinem Mann Daniel, meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets unterstützen, mir den nötigen Rückhalt geben und immer Verständnis für meine Arbeit haben.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Erklärung</b>	<b>2</b>
<b>Danksagung</b>	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>10</b>
<b>2 Summary</b>	<b>12</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>14</b>
3.1 Der Zellzyklus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.1.1 Allgemeines	14
3.1.2 Die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28 und ihre Cycline	15
3.1.3 Transkriptionsfaktoren	17
3.1.4 Proteolyse im Rahmen des Zellzyklus	21
3.1.4.1 Der „ <i>Skp1-Cdc53/cullin-F-box protein complex</i> “	21
3.1.4.2 Der „ <i>anaphase promoting complex</i> “	23
3.1.5 Regulation der Initiation der DNA-Replikation	25
3.1.6 Checkpoints und der Abschluss der Mitose	28
3.2 Transkriptionssteuerung in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.2.1 Allgemeine Einführung	31
3.2.2 Künstliche Expressionssteuerung durch gezielte Transkriptionskontrolle	32
3.3 Künstliche Zellzyklussteuerung	36
3.4 Zielsetzung	38
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>39</b>
4.1 Geräte	39
4.2 Verbrauchsmaterial	40
4.3 Software	42
4.4 Oligonukleotide	42
4.5 Plasmide	43
4.6 Mikroorganismen	45
4.6.1 <i>Escherichia coli</i>	45
4.6.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
4.7 Zellkultivierung	46
4.7.1 Allgemeines	46
4.7.2 Medien	47

---

4.7.2.1	Medien für <i>Escherichia coli</i>	47
4.7.2.2	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
4.8	Zellbiologische Methoden	49
4.8.1	Zellzahl	49
4.8.2	Dauerkulturen	49
4.8.3	Wachstumstest von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
4.8.4	Kreuzung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
4.8.5	Tetradenanalyse bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
4.8.6	Durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in <i>S. cerevisiae</i>	51
4.9	Molekularbiologische Methoden	51
4.9.1	Auftrennung und Isolation von DNA-Fragmenten	51
4.9.2	Polymerasekettenreaktion	52
4.9.3	Fällung von PCR-Produkten	52
4.9.4	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	53
4.9.5	Ligation	53
4.9.6	Subklonierung von PCR-Produkten	54
4.9.7	Erzeugung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	54
4.9.8	Hitzeschock-Transformation von <i>Escherichia coli</i>	55
4.9.9	Plasmidisolation aus <i>Escherichia coli</i>	55
4.9.10	Isolation genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
4.9.11	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
4.10	Proteinbiochemische Methoden	57
4.10.1	Gesamtproteinextraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
4.10.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
4.10.3	Western Blot	58
4.10.4	Herstellung eines Heferohextraktes	59
4.10.5	Proteinbestimmung nach BRADFORD	60
4.10.6	$\beta$ -Galactosidase-Aktivitätstest	60
4.10.7	Präparation von Phycocyanobilin aus <i>Spirulina ssp.</i> durch Methanolyse	61
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>62</b>
5.1	Herstellung eines temperatursensitiven Hefestammes mit der Fähigkeit zur lichtabhängigen Cdc20-Expression	63
5.1.1	Herstellung einer für die Arbeit mit dem Yeast-Two-Hybrid-System geeigneten temperatursensitiven <i>cdc20</i> -Mutante	63
5.1.2	Herstellung eines Plasmids zur Expression von <i>4myc::CDC20</i> unter Kontrolle des <i>GALI</i> -Promotors	64
5.1.3	Herstellung eines temperatursensitiven Hefestammes mit der Fähigkeit zur lichtabhängigen Cdc20-Expression	66

---

---

5.2	Versuche zur lichtabhängigen <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven <i>cdc20</i> -Mutante bei permissiver Temperatur	67
5.2.1	Lichtabhängige <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven <i>cdc20</i> -Mutante	68
5.2.2	Aufhebung der lichtabhängigen <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven <i>cdc20</i> -Mutante	69
5.2.3	Zyklische lichtgesteuerte <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven <i>cdc20</i> -Mutante bei permissiver Temperatur	71
5.3	Anwendbarkeit der zyklischen lichtgesteuerten <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven <i>cdc20</i> -Mutante	73
5.3.1	Verteilung der Population über die Zellzyklusphasen bei permissiver Temperatur	73
5.3.2	Verhalten der temperatursensitiven <i>cdc20</i> -Mutante mit der Fähigkeit zur lichtabhängigen <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression bei restriktiver Temperatur	75
5.4	Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des lichtschtbaren <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Systems	77
5.4.1	Temperaturabhängigkeit der lichtgesteuerten <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression	77
5.4.2	Temperaturabhängigkeit der lichtgesteuerten $\beta$ -Galactosidase-Expression	78
5.5	Anwendung der lichtgesteuerten <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression bei 25 °C	82
5.5.1	Herstellung einer <i>cdc20</i> -Mutante mit Methionin-regulierbarem Promotor und der Fähigkeit zur lichtabhängigen <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression	83
5.5.2	Lichtabhängige <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in einer <i>cdc20</i> -Mutante mit Methionin-regulierbarem Promotor	86
5.5.3	Lichtabhängiges Wachstum einer <i>cdc20</i> -Stoffwechselmutante mit Methionin-regulierbarem Promotor	87
5.5.4	Anwendung einer <i>cdc20</i> -Mutante mit Methionin-regulierbarem Promotor für eine externe lichtschtbare Zellzyklussteuerung	89
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>105</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

3.1	Der Zellzyklus von <i>S. cerevisiae</i> im Überblick	16
3.2	Regulations- und Rückkopplungsschleifen der Transkriptionskontrolle des Zellzyklus	20
3.3	Der SCF-Komplex und der APC sind große E3-Proteinkomplexe	23
3.4	Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt exakt einmal pro Zellzyklus	27
3.5	Der SAC steuert die Aktivität von APC <sup>Cdc20</sup>	30
3.6	Das lichtschtbare Promotor-System	35
4.1	Blackbox	40
4.2	Plasmidkarten	44
5.1	Die Expression von <sup>4myc</sup> Cdc20 komplementiert den <i>cdc20-1</i> -Phänotyp	66
5.2	<sup>4myc</sup> Cdc20 wird in YAS51 bei permissiver Temperatur lichtabhängig exprimiert	69
5.3	Infrarot-Beleuchtung führt zur Aufhebung der <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in YAS51	70
5.4	<sup>4myc</sup> Cdc20 wird in YAS51 bei permissiver Temperatur lichtabhängig zyklisch exprimiert	72
5.5	Die zyklische lichtgesteuerte <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in YAS51 führt bei permissiver Temperatur nicht zu einer Synchronisierung der Zellkultur	74
5.6	YAS50 und YAS51 wachsen nicht bei restriktiver Temperatur	76
5.7	Eine wiederholte lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup> Cdc20 in YAS51 ist bei 37 °C nicht möglich	78
5.8	Bei 37 °C fällt die Aktivität der lichtabhängig exprimierten $\beta$ -Galactosidase geringer aus als bei 25 °C	80
5.9	Bei 37 °C wird die $\beta$ -Galactosidase Gal4-abhängig stärker exprimiert als bei 25 °C	82
5.10	Konstrukt für den Promotoraustausch im Genom	85
5.11	<sup>4myc</sup> Cdc20 wird in einer <i>cdc20</i> -Stoffwechselmutante lichtabhängig exprimiert	87
5.12	YAS157 wächst bei Chromophorzugabe und Beleuchtung unter restriktiven Bedingungen	88
5.13	Die zyklische lichtgesteuerte <sup>4myc</sup> Cdc20-Expression in YAS157 beeinflusst die Verteilung der Population über die Zellzyklusphasen	90

---

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti (bei Antikörpern)
A <sub>x</sub>	Absorption bei $\lambda = x$ nm
aa	Aminosäure(n)
ade	Adenin
Amp	Ampicillin
APC	<i>anaphase promoting complex</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
cdc	<i>cell division cycle</i>
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Deoxyribonukleotide
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein Ligase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. und andere)
EtOH	Ethanol
FEAR	<i>(cdc)14 early anaphase release</i>
fw	<i>forward</i> (5'-Oligonukleotid)
Gal	Galactose
gDNA	genomische DNA
Glc	Glucose
HOAc	Essigsäure
his	Histidin
kDa	Kilodalton
ko	<i>knockout</i>
<i>lacZ</i>	$\beta$ -Galactosidase-Gen aus <i>E. coli</i>
LB	Luria-Bertani-Medium
leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
MEN	<i>mitotic exit network</i>
MeOH	Methanol
met	Methionin
MPI	Max-Planck-Institut
NT	N-Terminus
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
ORC	<i>origin recognition complex</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
PCB	Phycocyanobilin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol



---

PGK	3-Phosphoglyceratkinase
PhyB	Phytochrom B
PIF	Phytochrominteraktionsfaktor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rev	<i>reverse</i> (3'-Oligonukleotid)
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAC	<i>spindle assembly checkpoint</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPC	<i>spindle position checkpoint</i>
ss	einzelsträngig
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet	Tetracyclin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4- (1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl]-ether
trp	Tryptophan
ts	temperatursensitiv
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Units
ÜN	über Nacht
ura	Uracil
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/o	ohne
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galactopyranosid
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> (Glucose-Vollmedium)

## 1 Zusammenfassung

Die mitotische Zellteilung ist die Basis der vegetativen Vermehrung von Zellen bzw. im Fall von Einzellern wie dem Pilz *Saccharomyces cerevisiae* ganzer Organismen. Die einfache Kultivierbarkeit im Labor macht *S. cerevisiae* zu einem idealen Forschungsobjekt. Dies gilt auch für das Studium der Mitose, da dieser Zellzyklusprozess ein hoch konservierter Vorgang ist und sich viele an der Hefe gewonnenen Erkenntnisse auf höhere Eukaryoten übertragen lassen. Das Verständnis der molekularen Grundlagen der Mitose ist essentiell für die Erforschung von Störungen des Zellzyklus, einschließlich solcher, die zu Krankheiten wie beispielsweise Krebs führen. Viele bereits gewonnene Erkenntnisse zur Zellteilung beruhen auf der Arbeit mit synchronen Zellkulturen, da diese im Gegensatz zu Mischpopulationen Einblicke in definierte Abschnitte des Zellzyklus ermöglichen. Im Laufe der vergangenen drei Jahrzehnte wurden verschiedene Methoden zur Erzeugung synchron wachsender Populationen von *S. cerevisiae* entwickelt und standardisiert. Dazu gehören die Arbeit mit konditionellen Mutanten, *metabolic shifts* oder *block-and-release*-Verfahren (Walker, 1999). Ihnen allen gemein ist die Beschränkung auf nur einen einzigen synchronen Zellzyklusdurchlauf. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsraten von Mutter- und Tochterzellen wird schon im nachfolgenden Teilungszyklus eine Desynchronisierung beobachtet. Ein weiteres Problem ist, dass der zur Synchronisierung notwendige Zellzyklusarrest bei den etablierten Methoden nur durch umfangreiche Änderungen der Umgebungsbedingungen (z. B. die Änderung des Kultivierungsmediums, die Anwendung von Stressbedingungen wie erhöhter Temperatur) möglich ist. Entsprechend sind die Zellen im Verlauf der Synchronisation beträchtlichen Änderungen ihrer Physiologie ausgesetzt.

Für Studien über mehrere Zellzyklen hinweg ist die Entwicklung einer neuen Methode nötig, die eine wiederholte externe Steuerung der Zellproliferation mit möglichst minimal-invasiven Techniken ermöglicht. Die Vermeidung eines ständigen Wechsels des Nährstoffangebots oder der Inkubationstemperatur ist daher wünschenswert. Das lichtschtbare Promotorsystem (Shimizu-Sato *et al.*, 2002) bietet hierfür eine gute Basis. Es ermöglicht die Expression eines unter der Kontrolle eines *GALI*-Promotors stehenden Gens in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichts, mit dem die Kultur bestrahlt wird. Als Zielgen, dessen Expression zur externen Ansteuerung der Mitose reguliert werden soll, wurde *CDC20* gewählt. Cdc20 ist ein essentielles Protein und kontrolliert als Aktivator des APC (engl. *anaphase promoting complex*) die Trennung der Schwesterchromatiden in der Mitose und damit den Eintritt der Zellen in die Anaphase. Zur

einfachen Handhabung und Vermehrung der Zellen sollte eine konditionelle *cdc20-1*-Mutante eingesetzt werden, die die Proliferation bei permissiven Bedingungen ohne die eventuelle Expression einer lichtgesteuerten *CDC20*-Kopie erlaubt. Ist die lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 in diesem Stamm erfolgreich, so kann dies daran überprüft werden, dass sie den Phänotyp der konditionellen Mutante unter restriktiven Bedingungen komplementieren kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine temperatursensitive *cdc20-1*-Mutante mit der Fähigkeit zur zyklischen lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression bei permissiver Temperatur hergestellt werden. Die Induktion der <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression durch Licht einer Wellenlänge von 660 nm sowie deren Reprimierung durch eine Bestrahlung mit 750 nm ist in dieser Mutante bei permissiver Temperatur wiederholt möglich. Erwartungsgemäß geht dies nicht mit der Erzeugung einer synchron wachsenden Population einher, da unter diesen Bedingungen das Cdc20<sup>ts</sup>-Protein eine von der lichtabhängig exprimierten <sup>4myc</sup>Cdc20-Kopie unabhängige Zellproliferation vermittelt. Für die Arbeit bei restriktiver Temperatur stellte sich dieser Stamm jedoch als ungeeignet heraus. Es konnte mit Hilfe von  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätstests gezeigt werden, dass die Ursache dafür der Verlust von ca. 80 % der Funktionalität des lichtregulierbaren Promotorsystems bei höherer Temperatur ist. Als Alternative wurde deshalb eine konditionelle methioninabhängige Stoffwechselmutante hergestellt. Diese ist bei 25 °C auch unter restriktiven Bedingungen zur lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression fähig und in der Lage, das Wachstumsdefizit der Mutante zu komplementieren. Nähere Untersuchungen zur Verteilung der Kultur über die Zellzyklusphasen zeigen, dass sich zyklisch beleuchtete Kulturen hinsichtlich des DNA-Gehalts und der Expression des mitotischen Cyclins Clb2 signifikant von unbeleuchteten Kulturen unterscheiden. Somit wurden die Voraussetzungen für die Anwendung der lichtvermittelten Kontrolle des mitotischen Zellzyklusprogramms als neuer Technik zur Erzeugung synchroner Hefepopulationen erfolgreich geschaffen.

## 2 Summary

Mitotic cell division is a central step of vegetative cell proliferation and, in case of unicellular organisms as the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, reproduction of whole organisms. Handling and cultivating *S. cerevisiae* in laboratories is very easy. Moreover, *S. cerevisiae* is amenable to classical and molecular genetics. For these reasons budding yeast has become one of the main model organisms used for studies on mitosis as this process is highly conserved and lots of principles known from this fungal organism hold true for higher eukaryotes, too. Understanding the molecular basics of mitosis is essential for research on dysfunctions of proliferation, which is a major cause for several diseases as for example cancer. Today's knowledge about cell division has essentially required working with synchronous cell cultures. In contrast to mixed populations synchronized cells allow insights into selected phases of the cell cycle. During the past 30 years several methods which allow the generation of synchronously proliferating populations were developed and established. They include working with conditional mutants, metabolic shifts and block and release methods (Walker, 1999). All these methods have in common the limitation to only a single synchronous passage through the cell cycle. Due to differences in the rate of proliferation between yeast mother and daughter cells the population runs into dyssynchrony already during the next division cycle. An additional crucial problem of the established methods is the need for extensive alteration of the growth conditions (e.g. changing the medium or the temperature), inducing significant changes of cell physiology as well.

To study yeast cell proliferation through multiple repeated cycles without changing the growth conditions it is necessary to design a new method that allows periodic external supervision of cell proliferation using a minimal invasive technique. The light-switchable promoter system (Shimizu-Sato *et al.*, 2002) appeared to be an excellent tool for the required system qualities. It enables the cells to express a gene under control of the *GALI*-promoter in a light dependent manner. To trigger mitosis externally *CDC20* was chosen as promising target gene. Cdc20 is an essential protein, which is acting as an activator of the anaphase promoting complex, licences cells to separate sister chromatids during mitosis. Thus, Cdc20 acts as an initiator of anaphase. A conditional temperature sensitive *cdc20-1*-mutant that allows proliferation independent from the optionally expression of light-triggered <sup>4myc</sup>Cdc20 was expected to provide easy handling of the strain. Assuming that it is possible to express <sup>4myc</sup>Cdc20 light dependent, the functionality of this system could be proved by checking whether the cells are able to complement the phenotype of the

conditional mutant under restrictive conditions.

During this work it was possible to construct a temperature sensitive *cdc20-1* derived mutant strain, which was able to cyclically express <sup>4myc</sup>Cdc20 at permissive temperature (25 °C). As expected this didn't lead to synchronous yeast populations because the cells expressed functional Cdc20<sup>ts</sup> protein independent from light-triggered <sup>4myc</sup>Cdc20 under these permissive conditions. Unexpectedly, repeated induction of <sup>4myc</sup>Cdc20 expression through exposure to light of 660 nm wavelength and repression by light of 750 nm did not occur at restrictive temperature (37 °C). Thus, usage of this strain for repeated synchronization of a yeast population was impossible. Based on  $\beta$ -galactosidase assays it could be shown that higher temperature leads to loss of about 80 % of the functionality of the light-switchable promoter system. To overcome this problem a conditional methionine dependent metabolic mutant was constructed. Light-triggered expression of <sup>4myc</sup>Cdc20 in this strain at 25 °C was successful even under restrictive conditions. Moreover, the growth defect of the mutant was fully complemented. Regarding DNA content and the distribution of the mitotic cyclin Clb2 analysis of the cell cycle distribution of the culture uncovered a significant difference between populations that were cultivated enlightened and in the dark. With these results light could be successfully established as an inductor to control cell proliferation, which is the crucial step for permanent light-triggered synchronization of yeast populations.

## 3 Einleitung

### 3.1 Der Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.1.1 Allgemeines

Bei *S. cerevisiae* handelt es sich um einen einzelligen Pilz, der sowohl im haploiden (16 Chromosomen) als auch im diploiden (32 Chromosomen) Zustand zum vegetativen Wachstum fähig ist. Dieses zeichnet sich durch eine Vermehrung durch Knospung aus, wobei neben einem vollständigen Chromosomensatz auch Organellen aus der Mutterzelle in die Tochterzelle übertragen werden. Nach erfolgreicher mitotischer Trennung der Chromosomen erfolgt die Abschnürung der Tochterzelle, die nun wiederum vegetativ wachsen kann und selbst zur Mutterzelle wird. Eine Mutterzelle bringt im Durchschnitt 20 bis 40 Tochterzellen hervor, bevor sie die Knospung einstellt.

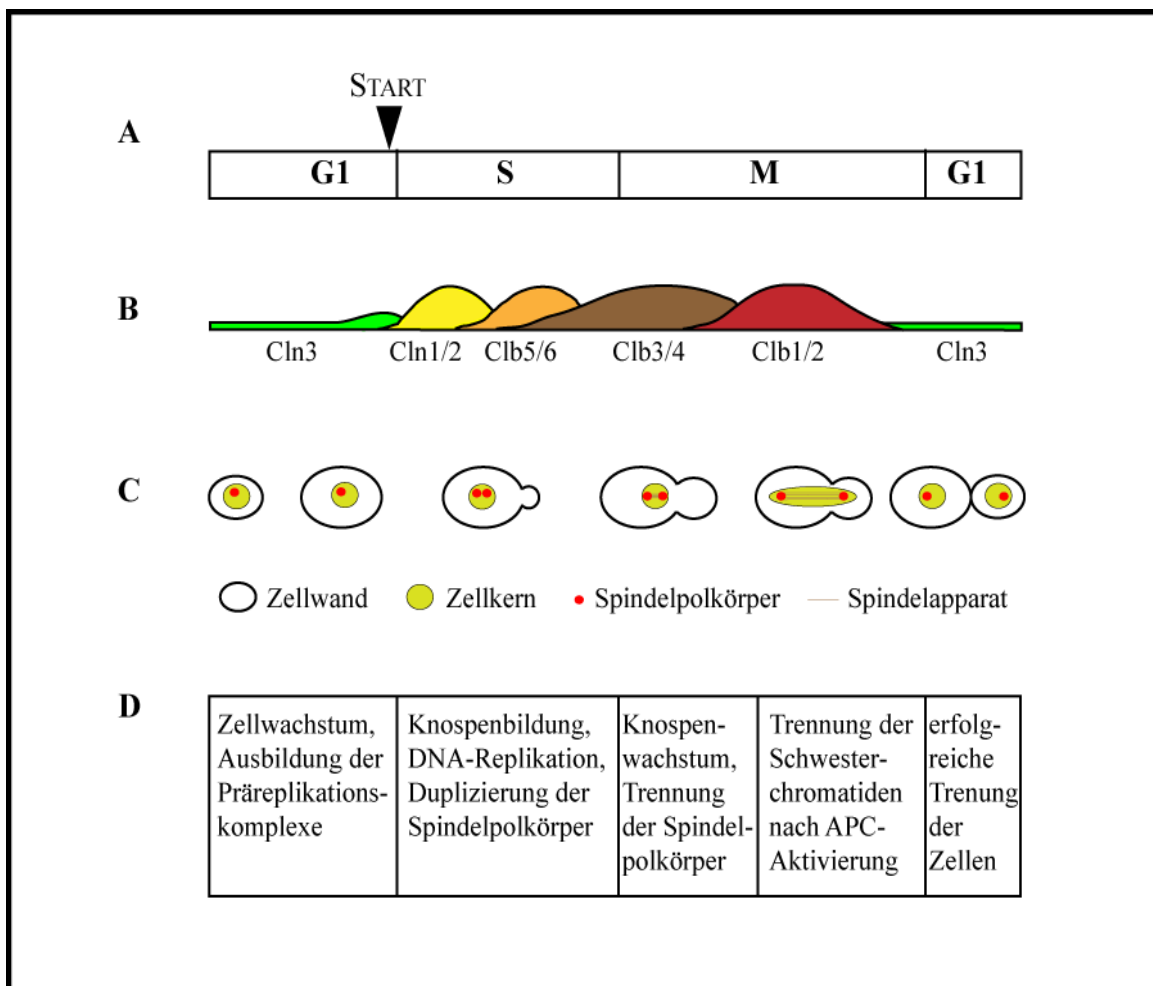
Eine wichtige Rolle bei der Koordination von Wachstum und Teilung spielt der in der G1-Phase gelegene *START*. Solange die für eine Teilung erforderliche Zellgröße nicht erreicht ist, wird der *START*-Punkt nicht durchlaufen. Vor dem Erreichen von *START* können die Zellen auf Umwelteinflüsse wie z. B. das Nährstoffangebot oder von Zellen des entgegengesetzten Paarungstypes abgesonderte Pheromone reagieren. Sobald *START* überschritten wurde, sind die Zellen darauf festgelegt, den kompletten Zellzyklus unabhängig vom Nährstoff- oder Pheromonangebot zu absolvieren. Dabei zeichnet sich *S. cerevisiae* durch eine geschlossene Mitose aus, d.h. die Kernhülle bricht während der Mitose nicht zusammen und die Spindelpolkörper befinden sich in der Kernmembran. Außerdem beginnen die Ausbildung der mitotischen Spindel sowie der Knospe bereits während der DNA-Replikation (S-Phase). Somit fehlen wichtige physiologische Marker für die klare Definition einer G2-Phase, weshalb im Zellzyklus von *S. cerevisiae* in der Regel nur von den Phasen G1, S und M gesprochen wird. Kontrovers diskutiert wird dabei die gelegentliche Zusammenfassung der beiden letzteren als S/M-Phase (Alberts *et al.*, 2002; Humphrey und Pearce, 2005; Lew *et al.*, 1997; Morgan, 2007).

Viele Erkenntnisse im Rahmen der Erforschung der Zellteilung beruhen auf Arbeiten mit konditionalen Mutanten, unter denen die mit einer Temperatursensitivität den größten Anteil stellen. Bereits in den 1960er Jahren begannen Hartwell *et al.* mit der Isolation verschiedener

temperatursensitiver Mutanten, die sie aufgrund der Erkenntnis, dass ihre Funktion für das erfolgreiche Durchlaufen des Zellzyklus essentiell ist, *cdc*-Mutanten nannten (engl. *cell division cycle*, Hartwell *et al.*, 1970). Leland H. Hartwell, Timothy Hunt und Paul Nurse erhielten 2001 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie für ihre Entdeckungen zur Regulation des Zellzyklus.

### 3.1.2 Die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28 und ihre Cycline

In allen Eukaryoten spielen cyclin-abhängige Kinasen eine zentrale Rolle bei der Koordination des Zellzyklus. In *S. cerevisiae* ist Cdc28 die cyclin-abhängige Kinase (CDK, engl. *cyclin-dependent kinase*), die sowohl den G1/S- als auch den S/M-Übergang kontrolliert. Ihre Aktivität und Substratspezifität wird durch Cycline vermittelt, die zu definierten Phasen im Zellzyklus akkumulieren. Zu ihnen gehören die G1-Cycline Cln1, Cln2 und Cln3, die S-Phasen-Cycline Clb5 und Clb6 sowie die M-Phasen-Cycline Clb1, Clb2, Clb3 und Clb4 (Futcher, 1996). Allen Cyclinen gemein ist eine Domäne, die als Cyclin-Box bezeichnet wird und welche für die Bindung sowie die Aktivierung der CDK notwendig ist (Morgan, 1995). Die Aktivität der CDK/Cyclin-Komplexe wird durch eine Reihe posttranslatiionaler Modifikationen wie Phosphorylierung, Inhibierung durch Cyclinabhängige-Kinase-Inhibitoren (CKI) sowie Abbau der Cycline und CKI exakt reguliert, so dass der Zellzyklus hochgeordnet unidirektional abläuft. Unterstützt wird die Unidirektionalität durch Rückkopplungsmechanismen innerhalb des Zellzyklus: Nachdem die G1-Cycline die Aktivierung der Clb-Cycline stimuliert haben, initiieren diese wiederum die Inaktivierung der G1-Cycline. Analog fördern die mitotischen Cycline die Ausbildung des Spindelapparats und aktivieren den *anaphase-promoting complex* (APC), welcher anschließend die für den ersten Schritt benötigten mitotischen Cycline abbaut (Humphrey und Pearce, 2005). Die Abbildung 3.1 zeigt die Expressionsprofile der Cycline und die Schlüsselschritte des Zellzyklus in Zusammenhang mit der schematischen Darstellung der Zellteilung.



**Abbildung 3.1: Der Zellzyklus von *S. cerevisiae* im Überblick.** A. Im Zellzyklus von *S. cerevisiae* sind die Phasen G1 (engl. *gap*), S (Synthese/Replikation der DNA) und M (Mitose) voneinander zu unterscheiden. Eine beobachtbare G2-Phase tritt nicht auf. Wird in der G1-Phase START überschritten, so wird der Zellzyklus komplett durchlaufen. B. Die zyklische Expression der Cycline Cln1-3 und Clb1-6, welche mit der cyclin-abhängige Kinase Cdc28 interagieren, ist die Grundvoraussetzung für den zyklischen Ablauf der Zellteilung (Einzelheiten siehe Text). C,D. Schematische Darstellung des Zellzyklus und die zugehörigen Schlüsselschritte (APC: engl. *anaphase promoting complex*; Einzelheiten siehe Text) (nach Humphrey und Pearce, 2005).

Während ein hohes CDK-Aktivitätsniveau die DNA-Replikation und den Eintritt in die Mitose fördert, ist für den Abschluss der Mitose sowie die Initiation der Replikation am Ende der G1-Phase eine geringe CDK-Aktivität Voraussetzung (Piatti *et al.*, 1996; Tyers und Jorgensen, 2000). Neben der Bindung der Cycline ist für die Aktivierung von Cdc28 auch eine Phosphorylierung am Threonin169 notwendig (Lew *et al.*, 1997, Lim *et al.*, 1996), diese wird durch die CDK-aktivierende Kinase Cak1 vermittelt (Espinoza *et al.*, 1996). Ihr gegenüber steht die Inaktivierung von Cdc28-Clb2 durch eine Phosphorylierung am Tyrosin19 beim Eintritt in die Mitose, wofür die Proteinkinase Swe1 (*alias* Wee1) verantwortlich ist (Booher *et al.*, 1993). Diese Phosphorylierung



spielt eine Rolle beim Morphogenese-Checkpoint (siehe Kapitel 3.1.6) und kann durch die Phosphatase Mih1 wieder aufgehoben werden (Lew *et al.*, 1997). Inhibiert wird die Aktivität des Cdc28-Cyclin-Komplexes auch durch die Bindung der CDK-Inhibitoren Far1, Sic1 und Cdc6. Far1 inhibiert spezifisch Cdc28-Cln-Komplexe, wenn es selbst im Rahmen einer Pheromon-aktivierten Signalkaskade in G1 phosphoryliert wurde und verhindert somit den Fortschritt des vegetativen Zellzyklus, wenn ein Paarungspartner für einen sexuellen Zyklus vorhanden ist (Chang und Herskowitz, 1990; Peter und Herskowitz, 1994). Sic1 inhibiert Cdc28-Clb-Komplexe und koordiniert sowohl den G1/S- als auch den M/G1-Übergang (Mendenhall, 1993; Schwob *et al.*, 1994; Zachariae und Nasmyth, 1999). Der Abbau von Sic1 wird durch seine Phosphorylierung durch Cdc28-Cln eingeleitet (Schneider *et al.*, 1996), wodurch es als Substrat für den Skp1-Cdc53/cullin-F-Box-Protein-Komplex (SCF, siehe Kapitel 3.1.4) markiert wird (Schwob *et al.*, 1994). Am Ende der Mitose wird die Phosphorylierung von Sic1 durch die Phosphatase Cdc14 aufgehoben, wodurch Sic1 als Inhibitor von Cdc28-Clb2 wieder hergestellt ist. Cdc6 trägt ebenso zur Inaktivierung von Cdc28-Clb2 am Ende der Mitose bei, wenn auch nicht so effizient wie Sic1 (Calzada *et al.*, 2001). Eine entscheidende Rolle kommt Cdc6 bei der Regulation der Initiation der DNA-Replikation zu (siehe Kapitel 3.1.5).

### 3.1.3 Transkriptionsfaktoren

Wie bereits erwähnt, akkumulieren die die Substratspezifität der CDK vermittelnden verschiedenen Cycline zu definierten Zeitpunkten im Zellzyklus (siehe Abbildung 3.1). Wie bei jedem anderen Protein auch unterliegt ihre Transkription ebenfalls der Regulation durch Transkriptionsfaktoren. Die Hauptkontrollpunkte sind dabei der G1/S-Übergang bzw. das Durchlaufen von  $\text{START}$ , der Eintritt in die Mitose sowie der Abschluss der Mitose, wobei die Expression beteiligter Proteine durch vorangegangene Ereignisse im Zellzyklus kontrolliert wird (Morgan, 2007). Die Abbildung 3.2 zeigt die im Folgenden näher erläuterten Regulations- und Rückkopplungsschleifen der Transkriptionskontrolle des Zellzyklus im Überblick.

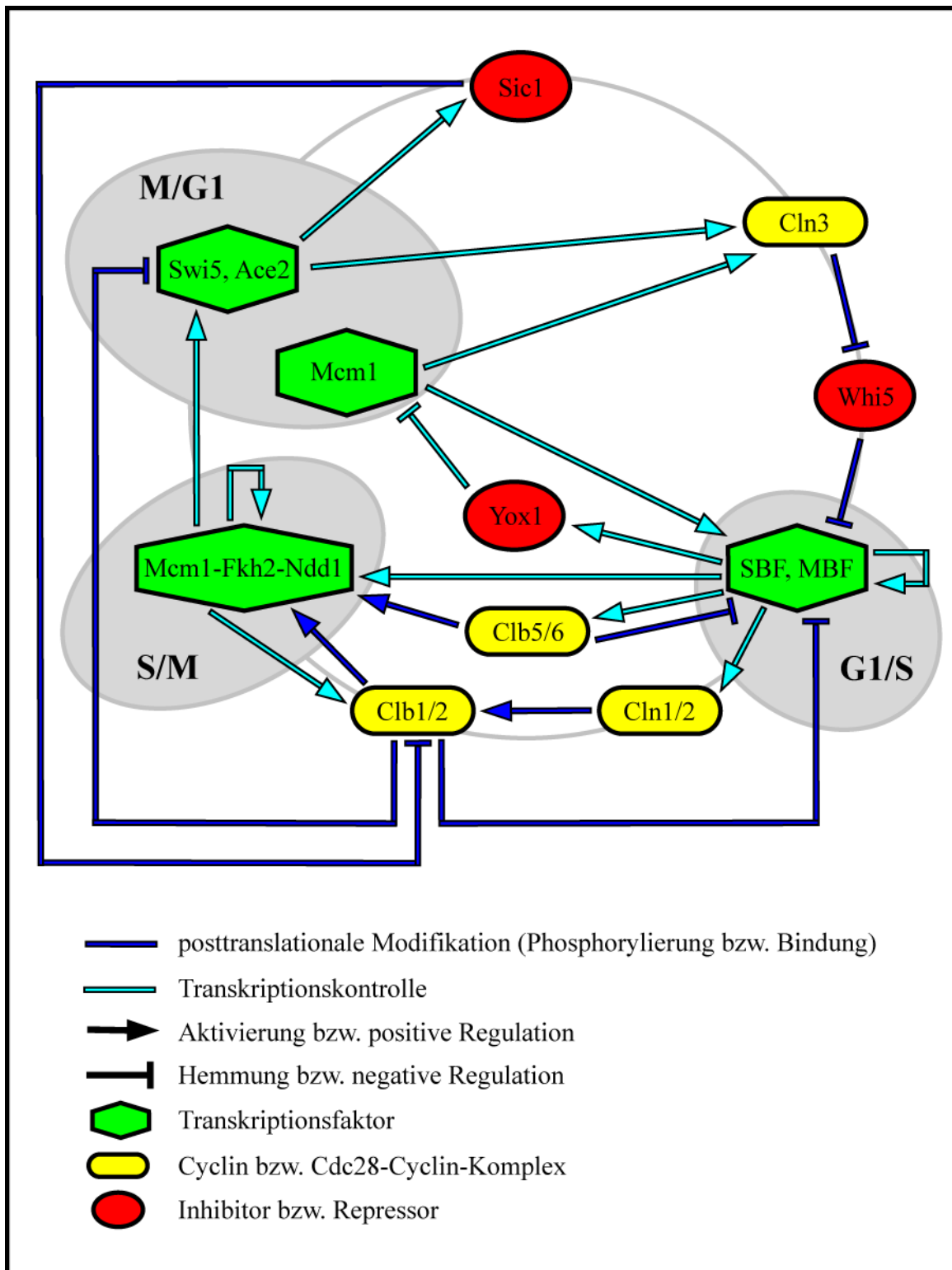
Zwei Transkriptionsfaktoren, SBF und MBF, spielen eine entscheidende Rollen nach dem Durchlaufen von  $\text{START}$ . Neben *CLN1* und *CLN2* regulieren sie auch die Transkription von Genen für die Zellwandbiosynthese sowie die DNA-Synthese (Breedon, 1996). SBF (engl. *SCB binding factor*) besteht aus Swi4 als DNA-Binde-Protein und Swi6 als regulatorischer Einheit und erkennt

SCB-Elemente (engl. *Swi4/Swi6 cell cycle box*). MBF (engl. *MCB binding factor*) besteht aus Mbp1 für die DNA-Bindung und Swi6 und bindet an MCB-Sequenzen (engl. *MluI-cell cycle box*) (Koch und Nasmyth, 1994; Bloom und Cross, 2007). Beide Transkriptionsfaktoren binden bereits in der frühen G1-Phase an die Promotoren ihrer Zielgene (Bähler, 2005). Sie werden jedoch zunächst durch ihren Inhibitor Whi5 inaktiv gehalten, bis dieser durch Cdc28-Cln3 phosphoryliert wird (De Bruin *et al.*, 2004). Dies führt zum Export von Whi5 aus dem Zellkern und somit zu dessen Neutralisierung (Bloom und Cross, 2007). Die Expression von Cln1/2 erreicht ihren Höchststand in der späten G1-Phase. Sie ist Voraussetzung für das Durchlaufen von START (Wittenberg *et al.*, 1990) und u.a. für die Aktinpolarisierung sowie die Ausbildung der Knospe erforderlich (Dirick *et al.*, 1995; Stuart und Wittenberg, 1995). Cln3 tritt während des gesamten Zellzyklus auf, wird selbst proteolytisch reguliert (Tyers *et al.*, 1992) und koppelt START mit dem Zellwachstum (Polymenis und Schmidt, 1997). Die der Cln1/2-Expressionsphase nachfolgende Aktivierung der S-Phasen-Cycline Clb5/6 in der späten G1-Phase ist MBF-abhängig und wird von Cdc28-Cln3 positiv reguliert (Lew *et al.*, 1997). Die gebildeten Cdc28-Clb-Komplexe werden jedoch zunächst durch den Inhibitor Sic1 inaktiv gehalten. Dessen Cdc28-Cln-vermittelte Phosphorylierung und der anschließende proteolytische Abbau durch den SCF-Komplex (siehe Kapitel 3.1.4) führen zur Aktivierung des Cdc28-Clb-Komplexes. Aktives Cdc28-Clb2 inhibiert den Transkriptionsfaktor SBF, so dass keine erneute Aktivierung von G1-Phasen-Komponenten erfolgen kann (Futcher, 1996).

Beim Eintritt in die M-Phase stimuliert ein weiterer Transkriptionsfaktor, der Mcm1-Fkh1/2-Ndd1-Komplex, die Expression von etwa 120 Genen, von denen allein 35 regulatorische Funktionen in der Mitose haben. Dazu gehören neben Cdc20 und Clb2 auch die Transkriptionsfaktoren Swi5 und Ace2 (Bähler, 2005; Morgan, 2007; McNerny, 2011). Während Mcm1 und Fkh2 dauerhaft an die entsprechenden Promotorsequenzen der DNA gebunden sind, wird Ndd1 erst am Ende der S-Phase exprimiert (McInerny, 2011). Für seine Bindung an den Promotor und die daraus resultierende Aktivierung der Expression ist die Phosphorylierung von Fkh2 durch Cdc28-Clb5 Voraussetzung. Die Bindung von Fkh2 an den Promotor wird durch die anschließende Cdc28-Clb2-abhängige Phosphorylierung von Ndd1 verstärkt (Pic-Taylor *et al.*, 2004).

In der späten Mitose führt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Swi5 und Ace2 zur Expression von ca. 30 M/G1-Genen, die für verschiedene Komponenten des Abschluss der Mitose

und der Stabilisierung der nachfolgenden G1-Phase codieren (Morgan, 2007). Als Vertreter dieser Gruppe seien an dieser Stelle Sic1, Cdc6 und der Transkriptionsfaktor Ash1 genannt. Die Sic1-Expression schafft zusammen mit der sinkenden Clb2-Transkriptionsaktivität die Voraussetzungen für den Abschluss der Mitose (siehe Kapitel 3.1.6), während die Expression von Cdc6 für die Ausbildung neuer Präreplikationskomplexe nötig ist (siehe Kapitel 3.1.5). Ace2 und Ash1 akkumulieren ausschließlich in der neu gebildeten Tochterzelle und kontrollieren dort die Expression von Tochterzell-spezifischen Genen sowie die dort beobachtbare G1-Verzögerung (Bähler, 2005). Der Transkriptionsfaktor Mcm1 spielt nicht nur beim Eintritt in die Mitose eine Rolle, sondern auch bei deren Abschluss (Morgan, 2007). Er bindet konstitutiv an ECB-Promotorelemente (engl. *early cell-cycle box*) und aktiviert z. B. die Transkription von *SWI4* und *CLN3*, wird jedoch bis zum M/G1-Übergang durch Yox1 und Yhp1 reprimiert (McInerny, 2011). Die Transkription von *YOX1* unterliegt wiederum der Regulation durch den SBF, so dass Mcm1 letztendlich im Rahmen einer negativen Rückkopplung seine eigene Inaktivierung initiiert (Bähler, 2005).



**Abbildung 3.2: Regulations- und Rückkopplungsschleifen der Transkriptionskontrolle des Zellzyklus.** Verschiedene Transkriptionsfaktoren akkumulieren zu definierten Zeiten und steuern somit das unidirektionale Durchlaufen des Zellzyklus. Hauptkontrollpunkte sind dabei der G1/S-, der S/M- und der M/G1-Übergang (Einzelheiten siehe Text). Zur Vereinfachung der Darstellung wurde nicht zwischen Genen und den von ihnen codierten Proteinen unterschieden. Ebenso phosphorylieren die Cycline nicht selbst ihre Substrate, sondern durch die Bildung aktiver Cdc28-Cyclin-Komplexe (nach Bähler, 2005; McInerny, 2011).

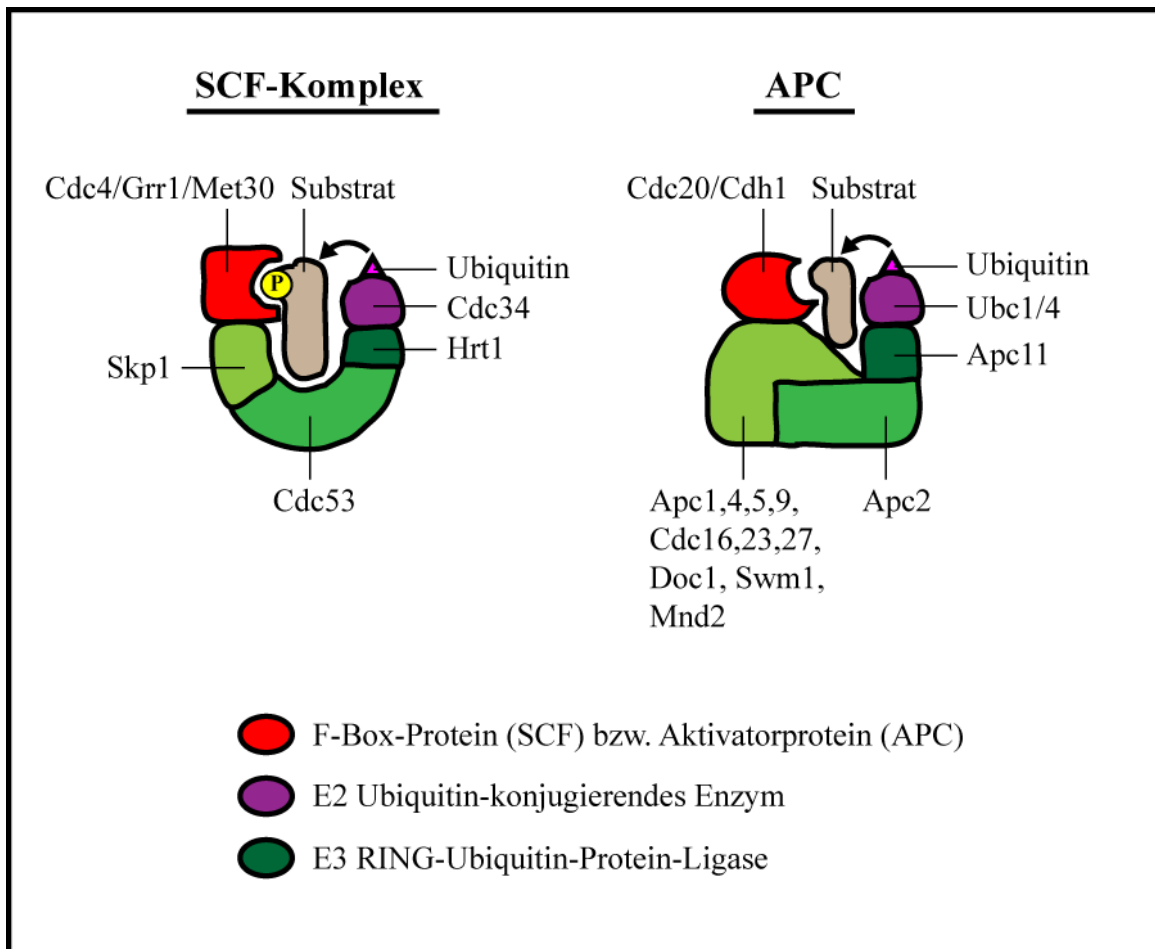
### 3.1.4 Proteolyse im Rahmen des Zellzyklus

Der Zellzyklus ist charakterisiert durch den regelmäßigen Wechsel von Phasen hoher bzw. geringer Cdc28-Aktivität. Proteolytische Regulationsschritte greifen dabei in beiden Richtungen kontrollierend ein. Der Übergang von geringer zu hoher Aktivität wird durch den Abbau des CDK-Inhibitors Sic1 vermittelt, während der Zustand niedriger Aktivität durch den Abbau der M/S-Cycline wieder hergestellt wird (Deshaies, 1997). Dabei ist die Implementation irreversibler Schritte eine Grundvoraussetzung für den unidirektionalen Ablauf des Zellzyklus. Ein wichtiges Prinzip ist hierbei, dass Proteine nach der Erfüllung ihrer Funktion im Zellzyklus proteolytisch degradiert werden. Die abzubauenen Proteine werden dazu mit Ubiquitin, einem aus 76 Aminosäuren bestehendem Protein, markiert und dem Proteasom zugeführt. Für die erfolgreiche Ubiquitinierung eines Substrates sind drei aufeinander folgende Schritte nötig, die jeweils von Enzymen der folgenden drei Klassen katalysiert werden: ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1), ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3). Die Verknüpfung erfolgt über Lysin-Seitenketten der Zielproteine, wobei ein mehrfaches Durchlaufen des Ubiquitinierungsprozesses zur Ausbildung von Polyubiquitinketten am abzubauenen Protein führt. Derart markierte Proteine werden dem 26S-Proteasom zugeführt und dort in Peptide gespalten (Hershko und Ciechanover, 1998). Zwei große E3-Komplexe sind an der Regulation des Zellzyklus in *S. cerevisiae* beteiligt – der SCF-Komplex (engl. *Skp1-Cdc53/cullin-F-box protein complex*) und der APC (engl. *anaphase promoting complex*) (Peters, 1998; Tyers und Jorgensen, 2000; DeSalle und Pagano, 2001; Peters, 2002).

#### 3.1.4.1 Der „*Skp1-Cdc53/cullin-F-box protein complex*“

Der SCF-Komplex (Abbildung 3.3) katalysiert die Ubiquitinierung einer Reihe zellzyklusrelevanter Proteine. Dazu gehören die G1-Cycline Cln1 und Cln2, das Cyclin Clb6 sowie die Cdk-Inhibitoren Sic1, Far1 und Cdc6 (Tyers und Jorgensen, 2000; Bloom und Cross, 2007). Es handelt sich um einen Multi-Protein-Komplex, der folgende Kernkomponenten enthält: Cdc53 als Gerüstprotein, Cdc34 als ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2), Hrt1 als RING-E3-Ligase und Skp1, das die Bindung des Komplexes an das F-Box-Protein vermittelt (Willems *et al.*, 1996; Skowyra *et al.*, 1997; Humphrey und Pearce, 2005). Das zu ubiquitinierende Proteine wird wiederum durch das F-Box-Protein gebunden, welches die Substratspezifität des SCF vermittelt. In *S. cerevisiae* vermittelt die Bindung des F-Box-Proteins Cdc4 an den SCF-Komplex die Ubiquitinierung von Sic1

(Schwob *et al.*, 1994), Far1 (Henchoz *et al.*, 1997), Cdc6 (Perkins *et al.*, 2001) und Clb6 (Bloom und Cross, 2007), während das F-Box-Protein Grr1 den Abbau der G1-Cycline Cln1 und Cln2 auslöst (Deshaies *et al.*, 1995, Barral *et al.*, 1995). Das F-Box-Protein Met30 kontrolliert die Initiation der DNA-Replikation und den Fortschritt durch die Mitose (Su *et al.*, 2005) durch den Abbau der auf Cdc28 inhibierend wirkenden Proteinkinase Swe1 (DeSalle und Pagano, 2001). Der SCF-Komplex ist stets zur Ubiquitinierung seiner Substrate fähig, jedoch wird die Ubiquitinierungsrate entscheidend durch die Affinität des Substrates zum F-Box-Protein reguliert: eine Bindung ist nur möglich, wenn das Substratprotein durch die Aktivität einer cyclin-abhängigen Kinase phosphoryliert wurde. Auf diese Weise werden die Ubiquitinierung sowie der daraus resultierende Abbau eines Proteins fest mit spezifischen Zellzyklusereignissen verknüpft. Als Beispiel sei hier die Ubiquitinierung des CDK-Inhibitors Sic-1 genannt – erst, wenn Sic1 am Ende der G1-Phase durch Cdc28-Cln1/2 phosphoryliert wird, ist seine Ubiquitinierung durch SCF<sup>Cdc4</sup> möglich. Der anschließende Abbau von Sic1 ermöglicht der Zelle den Eintritt in die S-Phase (Morgan, 2007).



**Abbildung 3.3: Der SCF-Komplex und der APC sind große E3-Proteinkomplexe, die aus vielen Untereinheiten bestehen.** Der SCF-Komplex steuert den G1/S-Übergang, während der APC in der Mitose an der Überleitung von der Metaphase in die Anaphase maßgeblich beteiligt ist. Neben einer E3-Ligase und ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) enthalten beide Gerüstproteine, wobei der APC deutlich komplexer aufgebaut ist. Die Bindung des Substrates erfolgt beim SCF-Komplex über das F-Box-Protein, beim APC über ein beteiligtes Aktivatorprotein. Beim SCF-Komplex ermöglicht die Phosphorylierung des Substrates seine Bindung an das F-Box-Protein, welches permanent an den SCF-Komplex gebunden ist. Beim APC werden die APC-Aktivatorproteine erst zum entsprechenden Zeitpunkt rekrutiert (Einzelheiten siehe Text; nach Morgan, 2007).

### 3.1.4.2 Der „anaphase promoting complex“

Beim APC (Abbildung 3.3) handelt es sich um einen Multi-Protein-Komplex aus mehreren Untereinheiten, der in der Mitose den Übergang von der Metaphase in die Anaphase steuert (King *et al.*, 1995). Er ubiquitiniert u.a. die Cycline Clb1-5 (Bloom und Cross, 2007). Wie der SCF-Komplex enthält auch der APC als Kernkomponenten ein Gerüstprotein (Apc2), ein ubiquitin-konjugierendes Enzym (Ubc4 für die Mono-Ubiquitinierung an Lysin-Resten des Substrates, Ubc1

für den Aufbau von Polyubiquitinketten durch Verknüpfung von Ubiquitineinheiten über Lysin48) und eine RING-E3-Ligase (Apc11) (Morgan, 2007; Rodrigo-Brenni und Morgan, 2007). Im Gegensatz zum SCF-Komplex ist der APC nur ab der M- bis zur folgenden G1-Phase aktiv, und zwar dann, wenn ein Aktivator-Protein an ihn gebunden ist (Amon *et al.*, 1994; Humphrey und Pearce, 2005). Dieses zeichnet neben der Aktivität auch für die Substratspezifität des APC verantwortlich. Die Aktivierung des APC durch die Bindung von Cdc20 am Übergang von der Metaphase zur Anaphase ist ein zentrales Regulationsereignis zur Initiierung der Chromatidsegregation. APC<sup>Cdc20</sup> stimuliert außerdem in der späten Anaphase den Austritt aus der Mitose durch die Einleitung des Abbaus der mitotischen Cycline (siehe Kapitel 3.1.6). Am Ende der Mitose vermittelt Cdh1 als Aktivatorprotein den vollständigen proteolytischen Abbau der mitotischen Cycline und stimuliert so den M/G1-Übergang. In der nachfolgenden G1-Phase unterbindet APC<sup>Cdh1</sup> die Akkumulation der S- und M-Cycline und unterstützt die Aufrechterhaltung des G1-Stadiums (Visintin *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 2001; Wäsch und Cross, 2002). Außerdem verhindert APC<sup>Cdh1</sup> eine vorzeitige Cdc20-Expression (Huang *et al.*, 2001).

Mit Beginn der Metaphase werden Cdc20 und einige APC-Untereinheiten durch Cdc28-Clb phosphoryliert, wodurch die Bindung von Cdc20 an den APC gefördert und damit die Aktivität von APC<sup>Cdc20</sup> gesteigert wird (Rudner und Murray, 2000). Gleichzeitig verhindert die Phosphorylierung von Cdh1 dessen Bindung an den APC vor Abschluss der Anaphase (Jaspersen *et al.*, 1999). Der durch APC<sup>Cdc20</sup> eingeleitete Abbau der M-Cycline hat eine Abnahme der Cdc28-Clb-Aktivität zur Folge. Die daraus resultierende geringere Phosphorylierungsrate von Cdc20 und APC<sup>Cdc20</sup> führt letztendlich zur Dissoziation und somit zur Inaktivierung des APC<sup>Cdc20</sup>-Komplexes. Durch diesen Rückkopplungsmechanismus löst APC<sup>Cdc20</sup> seine eigene Inaktivierung aus. Dies hat zur Folge, dass APC<sup>Cdc20</sup> nur den Abbau von ca. 50 % der ursprünglich vorhandenen Clb2-Menge bewirken kann (Irniger, 2002; Morgan, 2007). Im Gegensatz zu Cdc20 bindet Cdh1 im unphosphorylierten Zustand an den APC. In Folge des durch APC<sup>Cdc20</sup>-vermittelten Abbaus von Clb5 wird die Neuphosphorylierung von Cdh1 unterdrückt (Morgan, 2007). Dies führt in Kombination mit der gezielten Desphosphorylierung von Cdh1 durch die Phosphatase Cdc14 (Visintin *et al.*, 1998) zur Ausbildung eines stabilen APC<sup>Cdh1</sup>-Komplexes (Cerutti und Simanis, 2000). Dieser bleibt bis weit in die G1-Phase hinein aktiv – solange, bis Cdh1 durch die zunehmende Cdc28-Cln-Aktivität phosphoryliert wird und der APC<sup>Cdh1</sup>-Komplex zerfällt (Morgan, 2007).

Die Substrate des APC zeichnen sich durch das Vorhandensein von mindestens einer der folgenden zwei Erkennungssequenzen aus: Der D-Box (engl. *destruction box*; RXXLXXXXN; R: Arginin,



L: Leucin, X: beliebige Aminosäure, N: Asparagin) und der KEN-Box (benannt nach der Erkennungssequenz KENXXXN; K: Lysin, E: Glutaminsäure). Mutationen in diesen Bereichen führen in der Regel zu einer Stabilisierung der Substratproteine *in vivo* (Humphrey und Pearce, 2005; Morgan, 2007).

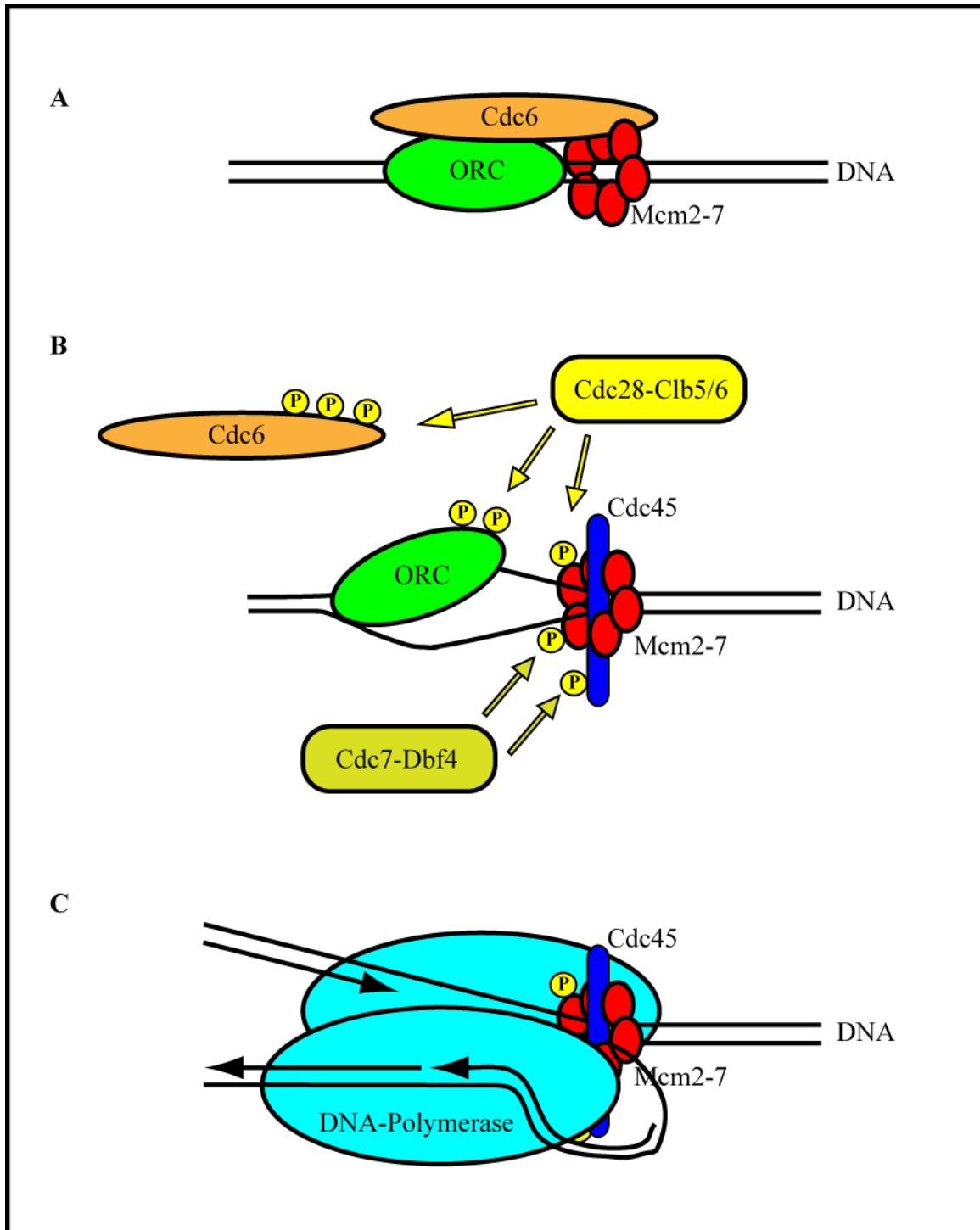
### 3.1.5 Regulation der Initiation der DNA-Replikation

Viele Ereignisse dürfen während eines einzelnen Durchlaufs des Zellzyklus nur exakt einmal auftreten. Dazu gehören die DNA-Replikation, die Ausbildung der Knospe sowie die Duplizierung der Spindelpolkörper. Aktive Cdc28-Cyclin-Komplexe sind zum einen daran beteiligt, diese Ereignisse einzuleiten, verhindern zum anderen aber auch ein wiederholtes Auftreten während eines einzelnen Zellzyklusdurchlaufs (Lew *et al.*, 1997). Darauf soll im Folgenden am Beispiel der Regulation der Initiation der DNA-Replikation eingegangen werden.

Die exakte, einmalige Replikation der DNA ist eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Proliferation einer Zelle. In *S. cerevisiae* sind die ORCs (engl. *origin recognition complexes*) während des gesamten Zellzyklus an die DNA gebunden (Humphrey und Pearce, 2005). An die ORCs binden in der G1-Phase weitere Proteine, Cdc6 (Liang *et al.*, 1995) und Tah11 (*alias* Cdt1). Der entstehende Protein-DNA-Komplex wird als Präreplikationskomplex bezeichnet und vermittelt die Bindung des MCM-Komplexes (engl. *minichromosome maintenance complex*) (Donovan *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997; Diffley und Labib, 2002). Der MCM-Komplex besteht aus den 6 Proteinen Mcm2-7 und fungiert während der Replikation als DNA-Helicase (Labib und Diffley, 2001). Dabei ist die Rekrutierung von Cdc45 an den Komplex sowohl für den Abschluss der Initiation als auch den Fortgang der Replikation essentiell (Tercero *et al.*, 2000). Die Aktivierung der Helicase-Funktion des Komplexes erfolgt durch die Phosphorylierung von Mcm2-4, Mcm6 und Cdc45 durch die Kinase Cdc7. Sie bildet zusammen mit ihrer regulatorischen Untereinheit Dbf4 die funktionelle Kinase DDK (engl. *Dbf4-dependent kinase*). Diese erreicht, aktiviert durch Cdc28-Clb5/6, ihre maximale Aktivität am Übergang von der G1- in die S-Phase und wird in der M-Phase für den Abbau durch den APC markiert (Humphrey und Pearce, 2005). Die anschließende Bindung der DNA-Polymerase schließt den in der Abbildung 3.4 zusammengefassten Prozess der Replikationsinitiierung ab (Leatherwood, 1998). Die steigende CDK-Aktivität führt zur Phosphorylierung der ORCs, wodurch eine erneute Initiation der Replikation unterbunden wird

(Nguyen *et al.*, 2001). Zusätzlich führt die Phosphorylierung von Cdc6 zu dessen Abbau durch SCF<sup>Cdc4</sup> (Diffley, 2004; Morgan, 2007). Unterstützt wird die Inhibierung der Re-Replikation durch den Ausschluss der Mcm-Proteine und Tah11 sowie des die Cdc6-Expression steuernden Transkriptionsfaktors Swi5 aus dem Zellkern während der M-Phase (Nguyen *et al.*, 2000; Tanaka und Diffley, 2002; Moll *et al.*, 1991).

Die erneute Ausbildung der Präreplikationskomplexe an den *origins of replication* in der G1-Phase kann nur bei geringer CDK-Aktivität stattfinden und ist somit von der APC<sup>Cdc20</sup>-abhängigen Inaktivierung von Cdc28-Clb im vorangegangenen Zellzyklus abhängig (Diffley, 2004). Für die anschließende DNA-Replikation ist wieder eine gesteigerte CDK-Aktivität nötig und die nunmehr aktiven Cdc28-Clb-Komplexe verhindern erneut die Re-Initiation der DNA-Replikation. Somit wird sichergestellt, dass die DNA-Synthese exakt einmal pro Zellzyklus initiiert wird (Peters, 2006).



**Abbildung 3.4: Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt exakt einmal pro Zellzyklus.** **A.** Die Rekrutierung von Mcm2-7 durch Cdc6 und den ORC (*origin replication complex*) führt zur Ausbildung eines Präreplikationskomplexes. Dieser Schritt kann nur bei geringer Cdc28-Aktivität erfolgen (frühe G1-Phase). **B.** Die G1/S-Cycline Clb5 und Clb6 aktivieren Cdc28 und initiieren dadurch die Phosphorylierung von Cdc6, einigen MCM-Untereinheiten sowie des ORC. Dies gilt als Schlüsselschritt bei der Initiierung der Replikation. An der Phosphorylierung ist auch die Dbf4-abhängige Kinase Cdc7 beteiligt. Der Zerfall des Präreplikationskomplexes führt zur Aktivierung der Helicase-Funktion des MCM-Komplexes. **C.** Nach erfolgreicher Initiation der Replikation wird diese durch die DNA-Polymerase fortgesetzt (nach Leatherwood, 1998).

### 3.1.6 Checkpoints und der Abschluss der Mitose

Neben der bereits erwähnten zyklischen Expression der Cycline und Transkriptionsfaktoren gibt es ein weiteres wichtiges Prinzip zur Koordination der Zellteilung: die Abhängigkeit bestimmter Abläufe im Zellzyklus vom erfolgreichen und vollständigen Abschluss vorausgehender Schritte. Diese kann *per definitionem* durch Mutationen oder bestimmte Chemikalien aufgehoben werden (Lew *et al.* 1997; Humphrey und Pearce, 2005). Die daran beteiligten intrazellulären Regulationsprozesse werden als Zellzyklus-Checkpoints bezeichnet (Hartwell und Weinert, 1989). Sie weisen üblicherweise folgende Elemente auf: einen Sensor, der den Fortschritt des überwachten Zellzyklus-Ereignisses erfasst, einen Signalgeber (oder auch eine Signalkaskade), der das Signal an einen Empfänger weiterleitet und einen Empfänger in Form eines Regulators, der die Initiierung mindestens eines nachfolgenden Ereignisses verzögern bzw. blockieren kann (Lew *et al.*, 1997). Bekannte Checkpoints im Zellzyklus von *S. cerevisiae* sind:

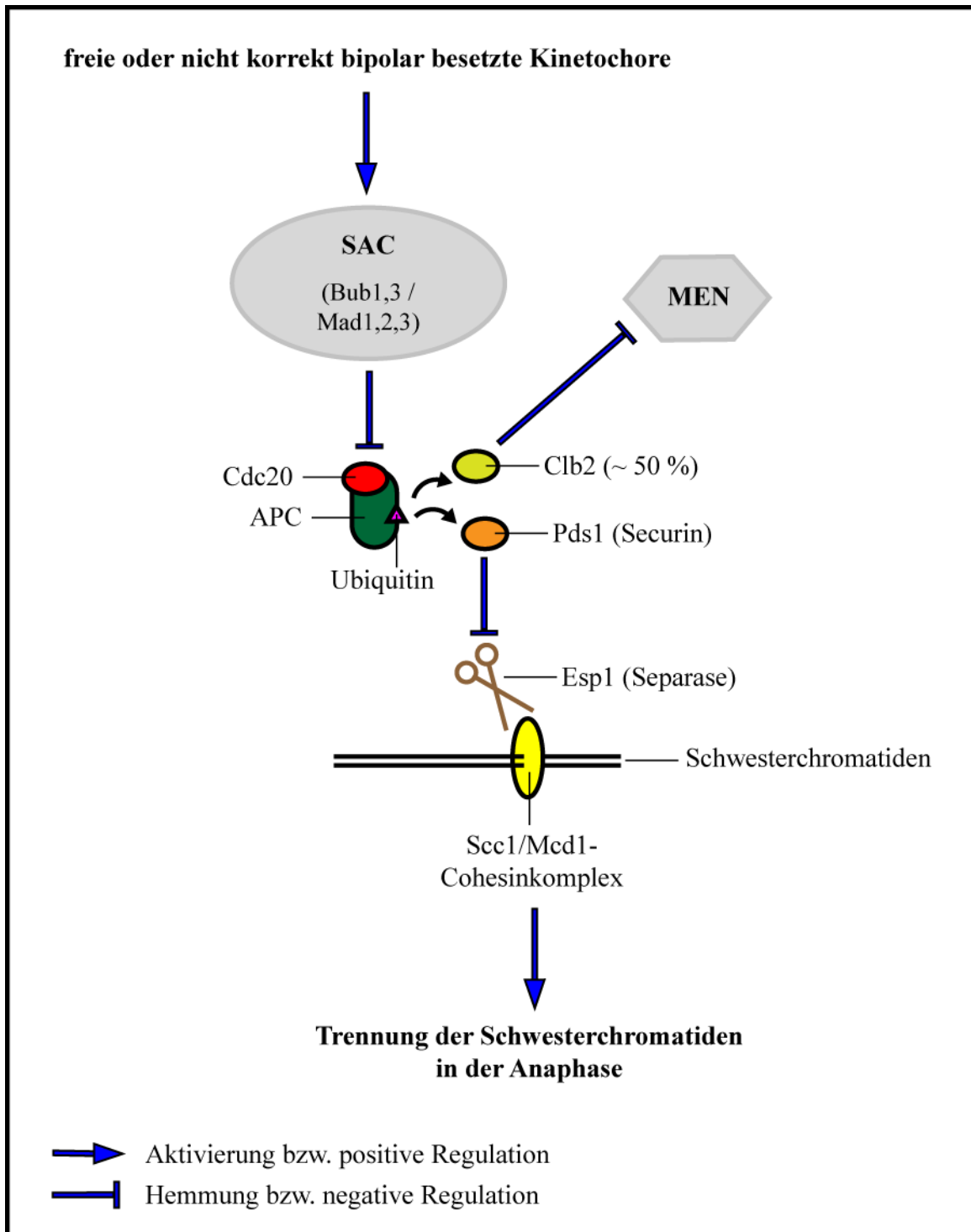
- der Morphogenese-Checkpoint, bei dem es beim Ausbleiben der Knospenbildung bedingt durch die Swe1-abhängige Phosphorylierung von Cdc28 und/oder die Bindung von Swe1 an Cdc28 zu einer Verzögerung der Einleitung der Anaphase kommt (Bloom und Cross, 2007),
- der DNA-Checkpoint, bei dem das Auftreten von DNA-Schäden oder Replikationsfehlern signalisiert durch die Proteinkinase Rad53 die gesteigerte Expression von DNA-Reparaturenzymen und Histonen, Repression der Expression der Cycline und Stabilisierung der Replikationsgabel zur Folge hat (Lew *et al.*, 1997) und
- das Spindel-Checkpoint-System (Morgan, 2007), das im Folgenden näher beschrieben wird.

Der Spindel-Checkpoint ist *das* große Kontrollelement in der Mitose und reguliert den Übertritt in die Anaphase, den Ausgang aus der Mitose sowie die Cytokinese. Er besteht aus dem SAC (engl. *spindle assembly checkpoint*), der die korrekte, biorientierte Anheftung der mitotischen Spindeln gegenüberliegender Spindelpolkörper an die Schwesterchromatiden überprüft (Cerutti und Simanis, 2000) und dem SPC (engl. *spindle position checkpoint*), der die Trennung der Schwesterchromatiden verhindert, solange nicht einer der beiden Spindelpolkörper in der Knospe lokalisiert ist (Hoyt, 2000; Lew und Burke, 2003).

Solange nicht alle Kinetochore korrekt mit Spindelfasern besetzt sind, d.h. die Kinetochorenpaare von Schwesterchromatiden nicht jeweils mit von gegenüberliegenden Spindelpolen ausgehenden

Mikrotubuli besetzt sind, ist die SAC-Kaskade aktiv: Bub1,3 und Mad1,2,3 gelten als die essentiellen Komponenten des SAC und arretieren die Zellen vor der Anaphase durch eine Mad2-vermittelte Blockade der APC<sup>Cdc20</sup>-Aktivität. Nach erfolgreicher Spindelassemblierung dissoziiert Mad2 von APC<sup>Cdc20</sup>, so dass dessen Substrate nun ubiquitiniert und der proteasomalen Proteolyse zugeführt werden können (Humphrey und Pearce, 2005). Die Trennung der Schwesterchromatiden am Übergang von der Metaphase in die Anaphase erfordert den Abbau der sie zusammenhaltenden Cohesinkomplexe. Diese bestehen aus den Untereinheiten Mcd1 (*alias* Scc1), Smc1,3 und Irr1, wobei die Spaltung des Mcd1 notwendig und hinreichend ist, um die Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase zu erlauben (Hilt, 2004). Die Spaltung wird durch die Separase Esp1 katalysiert – einer Protease, die wiederum durch das Securin Pds1 inhibiert wird (Ciosk *et al.*, 1998). Ist die mitotische Spindel korrekt aufgebaut, wird Pds1 APC<sup>Cdc20</sup>-vermittelt abgebaut, die Schwesterchromatidenkohesion aufgehoben und somit die Trennung der Schwesterchromatiden und der Eintritt in die Anaphase erlaubt (Humphrey und Pearce, 2005). Die Abbildung 3.5 zeigt die Kaskade, die zur Trennung der Schwesterchromatiden führt.

Neben Pds1 sind die Cycline Clb2, Clb3 und Clb5 Substrate des APC<sup>Cdc20</sup> (Alexandru *et al.*, 1999; Hilt, 2004). Ihr Abbau ist Voraussetzung für die Inaktivierung des APC<sup>Cdc20</sup> und die Aktivierung des APC<sup>Cdh1</sup> (siehe Kapitel 3.1.4.2).



**Abbildung 3.5: Der SAC steuert die Aktivität von APC<sup>Cdc20</sup>.** Solange der mitotische Spindelapparat nicht korrekt ausgebildet und nicht alle Kinetochore bipolar besetzt sind, verhindert der *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) die Aktivierung des APC<sup>Cdc20</sup>. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei Mad2. Sind alle Kinetochore korrekt besetzt, erfolgt der Übergang von der Meta- in die Anaphase. Hierfür ist der Abbau von Scc1 erforderlich, der Inhibitor Pds1 der dafür benötigten Protease Esp1 wird durch APC<sup>Cdc20</sup> ubiquitiniert und für den proteasomalen Abbau markiert. Der ebenfalls durch APC<sup>Cdc20</sup> eingeleitete Abbau der mitotischen Cycline führt zu einer geringeren Cdc28-Aktivität. Die daraus resultierende Einleitung des *Mitotic Exit Network* (MEN) schafft die Voraussetzung für den Abschluss der Mitose (nach Hoyt, 2000; Hilt, 2004; Morgan, 2007).

Der SPC verhindert, vermittelt durch Bub2/Bfa1, eine vorzeitige Cytokinese vor dem Abschluss der Chromosomentrennung (Bloom und Cross, 2007). Liegt einer der Spindelpolkörper in der Knospe und sind alle Spindeln korrekt angeheftet, wird im Rahmen der SPC-Kaskade Tem1 durch Lte1, dessen Vorkommen auf die Knospe beschränkt ist, aktiviert und kann seinerseits das MEN (engl. *mitotic exit network*) aktivieren. Eine Schlüsselrolle beim Abschluss der Mitose spielen die MEN-vermittelte Inhibierung des Cdc14-Inhibitors Net1 sowie die Freisetzung der Phosphatase Cdc14 aus dem Nucleolus. Cdc14 dephosphoryliert sowohl Cdh1 als auch Sic1 und senkt somit die Cdc28-Clb-Aktivität (Hoyt, 2000; Hilt, 2004). Parallel dephosphoryliert Cdc14 den Transkriptionsfaktor Swi5. Dephosphoryliertes Swi5 kann in den Kern transportiert werden und steigert dort die Expression von Sic1 (Hoyt, 2000). Der rasante Verlust der Cdc28-Aktivität ist Voraussetzung für den erfolgreichen Abschluss der Mitose, den Beginn einer neuen G1-Phase sowie die Ausbildung neuer Präreplikationskomplexe für die nächste S-Phase (Cerutti und Simanis, 2000). Neben dem proteolytischen Abbau der M-Cycline durch den aktiven APC (Wäsch und Cross, 2002) ist daran auch der wieder zunehmende Gehalt an aktivem Sic1 beteiligt (Humphrey und Pearce, 2005). Neben MEN reguliert ein weiteres Netzwerk, FEAR (engl. *14 early anaphase release*) die Cdc14-Loslösung von seinem Inhibitor Net1 bereits in der frühen Anaphase (Humphrey und Pearce, 2005). Die durch FEAR freigesetzte Cdc14-Menge ist allein nicht in der Lage, Cdh1 und Sic1 vollständig zu aktivieren, ist jedoch im Rahmen einer Rückkopplungsschleife Voraussetzung für die Initiierung des MEN (Morgan, 2007).

## **3.2 Transkriptionssteuerung in *Saccharomyces cerevisiae***

### **3.2.1 Allgemeine Einführung**

Eine wichtige die Aktivität eines Proteins bestimmende Größe ist dessen Konzentration. An der Veränderung der Konzentration sind zwei prinzipielle Mechanismen beteiligt: die Regulation der Transkriptions- und Translationsaktivität und der Abbau der Proteine durch gezielte Proteolyse. Dieser zweite Prozess erfolgt in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle über das Ubiquitin-Proteasom-System. Da auch die an der Expression eines Proteins beteiligten Transkriptionsfaktoren wiederum selbst der Regulation ihrer Aktivität unterliegen, liegt in jeder Zelle ein sehr komplexes Regulationsnetzwerk vor (Alberts *et al.*, 2002; Hilt, 2004).

Für die Transkription proteincodierender Gene ist in allen Eukaryoten die RNA-Polymerase II verantwortlich, wobei sogenannte „allgemeine Transkriptionsfaktoren“ als Helferproteine benötigt werden. Diese unterstützen die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor des zu transkribierenden Gens und drücken die beiden DNA-Stränge auseinander, um die Transkription zu ermöglichen. Sobald die Transkription begonnen hat, unterstützen sie die Freisetzung der RNA-Polymerase vom Promotor und ihren Übergang in den Elongationsmodus, bevor sie sich von der DNA lösen und für eine neue Transkriptionsinitiation zur Verfügung stehen. Neben den allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die an alle Promotoren binden, gibt es Genregulatorproteine, sogenannte „Transkriptionsaktivatoren“ und „Transkriptionsrepressoren“, die nur an bestimmte Sequenzen der DNA binden (engl. *Enhancer*) und helfen, die RNA-Polymerase zum Transkriptionsstartpunkt zu führen bzw. dieses verhindern. Diese DNA-Abschnitte können tausende Basenpaare vom Promotor entfernt liegen. Für die erfolgreiche Transkription *in vivo* sind außerdem ein als „Mediator“ bezeichneter Proteinkomplex sowie chromatin-modifizierende Enzyme wie z. B. Histonacetylasen nötig. Während der Mediator die Kommunikation zwischen RNA-Polymerase, allgemeinen Transkriptionsfaktoren und den Aktivatorproteinen herstellt, sind die chromatin-modifizierenden Enzyme nötig, um der Transkriptionsmaschinerie den Zugang zur DNA zu erleichtern (Alberts *et al.*, 2002).

Die meisten Transkriptionsaktivatoren haben einen modularen Aufbau und bestehen aus mindestens zwei unterschiedlichen Domänen – eine enthält Struktur motive, die eine spezifische DNA-Kontrollsequenz erkennen und dort binden („Bindedomäne“), während die andere („Aktivierungsdomäne“) den Kontakt zur Transkriptionsmaschinerie herstellt und die Transkriptionsinitiation beschleunigt. Dieser modulare Aufbau der Transkriptionsaktivatoren wird in der Forschung beispielsweise im Rahmen des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems ausgenutzt (Alberts *et al.*, 2002; siehe auch Kapitel 3.2.2).

### **3.2.2 Künstliche Expressionssteuerung durch gezielte Transkriptionskontrolle**

*S. cerevisiae* ist ein Modellorganismus, der heute eine breite Anwendung in der Grundlagenforschung und Biotechnologie findet. Die Grundlage dafür bildet die einfache Zugänglichkeit von *S. cerevisiae* für genetische und biochemische Manipulationen, die u.a. eine gezielte Expression ausgewählter Gene ermöglichen. Von besonderem Nutzen sind dabei regulierbare Promotorsysteme. Diese bieten neben der zeitlichen Kontrolle der Genexpression auch



die Möglichkeit der Steuerung der Menge des gebildeten Genprodukts. Die für diese Zwecke verwendeten Promotoren lassen sich entsprechend ihrer Herkunft in zwei Gruppen einteilen: bei den endogenen Systemen kommen Hefe-eigene Promotoren zum Einsatz, bei den heterologen Systemen werden Transkriptionselemente verwendet, die aus dem Reich der Bakterien stammen.

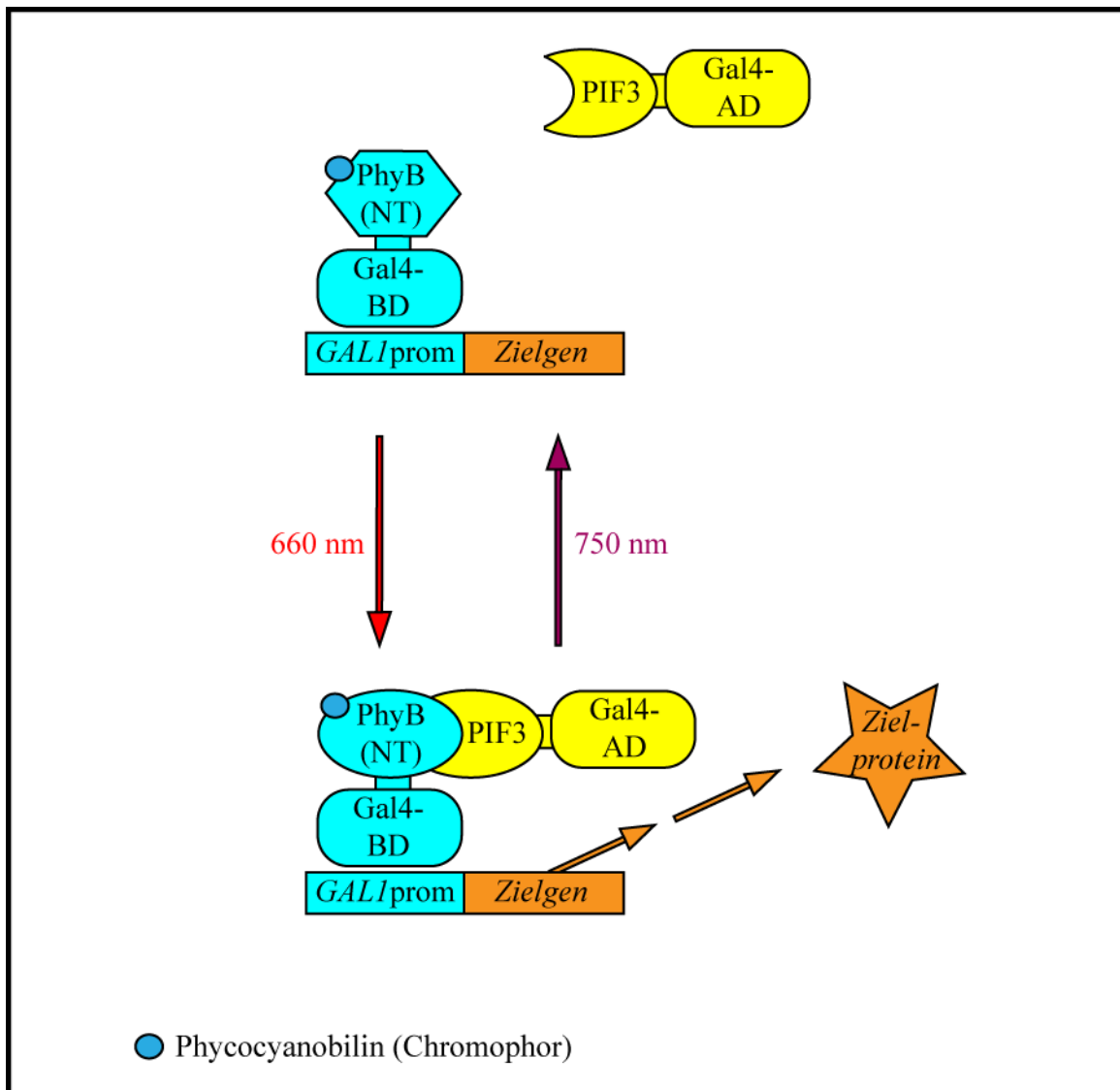
Aus der Klasse der endogenen Promotoren steht eine Vielzahl von Systemen zur gezielten Transkriptionskontrolle in *S. cerevisiae* zur Verfügung. Die geläufigsten unter ihnen sind der *MET3*-Promotor, der durch Methionin negativ reguliert wird, der *PHO5*-Promotor, der durch anorganisches Phosphat negativ reguliert wird, der *CUP1*-Promotor, der durch  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen positiv reguliert wird und der *GAL1*-, *GAL7*- und *GAL10*-Promotor, die durch Galactose aktiviert und durch Glucose reprimiert werden. Neben diesen direkt durch den Gehalt an entsprechendem Regulator steuerbaren Promotoren kommen je nach Frage- bzw. Zielstellung auch durch allgemeinere Bedingungen kontrollierte endogene Promotoren für die gezielte Transkriptionssteuerung in Frage. Als Beispiele seien hier der *ADH2*-Promotor, dessen Aktivität steigt, sobald die Glucose im Medium verbraucht ist und der *SP11*-Promotor, dessen Expression erst in der stationären Phase des Zellwachstums induziert wird, genannt.

Das wohl bekannteste heterologe System basiert auf dem bakteriellen *tet*-Operator, der bei Anwesenheit von Tetrazyklin durch ein Tetrazyklin-bindendes Protein reprimiert wird. Für den Einsatz in *S. cerevisiae*, wobei in der Regel mit dem Tetrazyklin-Analogen Doxyzyklin gearbeitet wird, wurde ein umfangreiches *tet*-System entwickelt – durch die Kombination aus tetrazyklinabhängigen Transkriptionsrepressoren und -aktivatoren kann Doxyzyklin auch als Induktor verwendet werden. Die Expressionsstärke kann dabei über die eingesetzte Doxyzyklin-Menge reguliert werden (Maya *et al.*, 2008).

Ein neues und bisher nicht standardmäßig in der experimentellen Forschung verwendetes System zur künstlichen Expressionssteuerung durch gezielte Transkriptionskontrolle bietet das lichtregulierbare Promotorsystem, das auf der Grundlage des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems entwickelt wurde (Shimizu-Sato *et al.*, 2002). Das *Yeast-Two-Hybrid*-System dient der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen und basiert auf einem Transkriptionsaktivator, der künstlich in seine DNA-Bindedomäne und seine transkriptionsaktivierende Domäne zerlegt wird. Durch Fusion dieser Domänen an zwei zu untersuchende Proteine werden zwei Hybridproteine erzeugt. Interagieren diese beiden Fusionsproteine miteinander, führt dies zur Rekonstitution eines Dimers mit den funktionellen Qualitäten eines Transkriptionsaktivators, der die Transkription eines an den

entsprechenden Promotor fusionierten Gens induziert. Häufig werden hierfür der *GALI*-Promotor sowie Binde- und Aktivierungsdomäne des an ihn bindenden Transkriptionsaktivators Gal4 verwendet (Phizicky und Fields, 1995).

Das lichtregulierbare Promotorsystem setzt nun als interaktionsvermittelnde Proteinkomponenten das Phytochrom B (PhyB) und den Phytochrominteraktionsfaktor 3 (PIF3) ein. Deren Interaktion kann lichtwellenabhängig an- und ausgeschaltet werden. Rotlicht mit einer Wellenlänge von 660 nm führt zu einer Interaktion der beiden Proteine, längerwelliges Rotlicht von 750 nm Wellenlänge hebt diese Interaktion wieder auf. Damit ermöglicht die Fusion dieser beiden Komponenten an die DNA-Bindedomäne bzw. die transkriptionsaktivierende Domäne von Gal4 die lichtsteuerbare Expression eines unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors stehenden Gens. Phytochrom B benötigt für die Lichtperzeption das Chromophor Phycocyanobilin als prosthetische Gruppe. Da *S. cerevisiae* Phycocyanobilin nicht selbst synthetisiert, muss dieses für einen erfolgreichen Einbau in das Phytochrom über das Kulturmedium zugesetzt werden. In einem bestimmten Bereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der verwendeten Lichtintensität und der Expressionsstärke des kontrollierten Gens, somit besteht in diesem Bereich die Möglichkeit der Regulierbarkeit der Expressionsstärke über die verwendete Lichtmenge. Das große Potential des lichtschtbaren Promotorsystems für eine Anwendung in der experimentellen Forschung liegt in der „minimal-invasiven“ Steuerbarkeit der Transkriptionsaktivität des gewünschten Gens über die verwendete Lichtintensität (Shimizu-Sato *et al.*, 2002). Die Abbildung 3.6 zeigt schematisch die Funktionsweise des lichtschtbaren *Yeast-Two-Hybrid*-Systems.



**Abbildung 3.6: Das lichtsichtbare Promotor-System.** Dieses Verfahren zur künstlichen Expressionssteuerung in *S. cerevisiae* basiert auf dem *Yeast-Two-Hybrid*-System. Das Fusionsprotein PhyB(NT)-Gal4BD (bestehend aus dem N-Terminus des Phytochrom B mit gebundenem Phycocyanobilin und der DNA-Bindedomäne von Gal4) wird im Dunkeln in der inaktiven Form synthetisiert. Die Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm führt zu einer Konformationsänderung, die die Bindung des PIF3 (Phytochrominteraktionsfaktor 3) ermöglicht und somit die daran fusionierte Gal4AD (transkriptionsaktivierende Domäne von Gal4) rekrutiert. Dies führt zur Initiierung der Transkription des nachgeschalteten Gens. Die anschließende Beleuchtung mit Licht einer Wellenlänge von 750 nm induziert die Konformationsänderung des PhyB(NT) zurück zu seiner inaktiven Form, dadurch wird die Transkription wieder gestoppt (nach Shimizu-Sato *et al.*, 2002).

### 3.3 Künstliche Zellzyklussteuerung

Eine wichtige Schlüsseltechnologie für Studien zum Zellzyklus ist die Untersuchung synchroner Zellkulturen (Day *et al.*, 2004). In den letzten drei Jahrzehnten wurden verschiedene Systeme etabliert, die dies in *S. cerevisiae* ermöglichen (nach Futcher, 1999; Walker, 1999; Day *et al.*, 2004):

- „Füttern und Verhungern“ (engl. *feeding and starving*): Diese Methode nutzt die Arretierung der Zellen in der G1-Phase bei Nährstoffmangel. Zellen werden hierbei bis zur stationären Phase angezogen, kurzen Perioden von Nahrungsangebot und -mangel unterworfen und nach einem Arrest bei 4 °C in frisches Medium angeimpft, um ein synchrones Anwachsen zu induzieren.
- Wiederholte Hitzeschocks: Die Zellen werden regelmäßig einem Hitzeschock (41 °C) ausgesetzt, wobei der Abstand der Hitzeschocks der Generationsdauer entspricht.
- „Blockade und Freisetzung“ (engl. *block and release*): mit Hilfe chemischer Agenzien, die den Zellzyklus unterbrechen, wird dieser je nach gewählter Chemikalie an einer bestimmten Stelle gestoppt. Die anschließende Entfernung des Zellzyklusinhibitors ermöglicht das synchrone Fortschreiten des Zellzyklus in allen Zellen. Standardmäßig im Labor verwendete Agenzien sind Hydroxyharnstoff (S-Arrest durch Inhibierung der Ribonukleotidreduktase) und Nocodazol (G2/M-Arrest durch Inhibierung der Polymerisation der Mikrotubuli, was zu einer Schädigung des Spindelapparats führt). Eine Sonderform des *block and release* ist der Pheromon-Arrest. Dieser nutzt den im natürlichen Lebenszyklus von *S. cerevisiae* durch  $\alpha$ - oder  $\alpha$ -Faktor induzierten G1-Arrest und stellt somit keinen artifiziellen Arrest dar. Beispielsweise arretieren Zellen des Paarungstyps MAT $\alpha$  in der G1-Phase, wenn sie dem Pheromon  $\alpha$ -Faktor ausgesetzt werden. Die anschließende Entfernung des  $\alpha$ -Faktors führt zu einem synchronen Eintritt aller Zellen in die S-Phase.
- *cdc*-Mutanten: Temperatursensitive *cdc*-Mutanten arretieren bei restriktiver Temperatur an der Stelle im Zellzyklus, an der das intakte Protein für das Fortschreiten des Zellzyklus benötigt wird. Wird die Kultur auf permissive Temperatur zurückgesetzt, induziert dies einen synchronen Fortgang.
- Metabolische Schaltung (engl. *metabolic shift*): Hierbei werden essentielle Gene unter die Kontrolle eines metabolisch steuerbaren Promotors gestellt, um den Zellzyklusfortschritt über das Nährstoffangebot im Medium steuern zu können. Beispiele hierfür sind die Steuerung über die Kohlenstoffquelle, wie sie beim *GALI*-Promotor erfolgt (Pan und Chen,

2004) oder die Verwendung eines Promotors (z. B. des *MET3*-Promotors) aus dem anabolen Stoffwechsel, dessen Aktivität im Rahmen einer negativen Rückkopplung durch die Anwesenheit des Endprodukts (in diesem Fall Methionin) gehemmt wird (Charvin *et al.*, 2008).

- Zentrifugal-Elutriation: Bei dieser Methode werden die Zellen entsprechend ihrer Größe getrennt. Da bei *S. cerevisiae* die Größe einer Zelle sehr gut mit der Phase des Zellzyklus, in der sie sich befindet, korreliert, führt dies zum Gewinn einer synchronen Kultur.

Jede der genannten Methoden hat ihre Vor- und Nachteile. Die für die Wechsel erforderlichen Maßnahmen wie Zentrifugations-, Elutriations- und Waschschrte fügen künstliche Zeitfenster ein und stellen eine Stressbelastung für die Zellkultur dar. Dies kann letztendlich, ebenso wie der Wechsel der Inkubationstemperatur oder der metabolischen Voraussetzungen, zu einer Beeinflussung der Messergebnisse führen. Einen ersten Schritt in Richtung einer Minimierung der Zeit-Nebeneffekte gingen Charvin *et al.* 2008 mit der Entwicklung einer Mikroströmungskammer. In dieser werden einzelne Zellen zwischen einer Polydimethylsiloxan-Schicht und einer 30 µm dicken Cellulose-Membran fixiert. Über der Cellulose-Membran befindet sich eine Strömungskammer, die einen raschen Austausch des Mediums ermöglicht. Charvin *et al.* konnten zeigen, dass das System bis zu 12 Stunden stabil ist und sich die Zellen dabei synchron teilen. Hierfür verwendeten sie einen Stamm, dessen mitotischer Arrest über die verwendete Kohlenstoffquelle steuerbar ist (*cdc20 GAL1prom-CDC20*) sowie einen Stamm, dessen G1/S-Übergang methioninabhängig steuerbar ist (*cln1 cln 2 cln3 MET3prom-CLN2*). Der Nachteil dieser Mikroströmungskammer liegt in der eingeschränkten Nutzungsdauer, der Beschränkung auf die Einzelzellbeobachtung sowie im Fall von Cdc20 der Nichtberücksichtigung der durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle entstehenden Effekte. All diesen Methoden ist gemein, dass aufgrund des Wachstums durch Knospung und die damit einhergehenden unterschiedlichen Wachstumsraten von Mutter- und Tochterzellen die Synchronizität nur über einen, maximal zwei Zyklen aufrecht erhalten werden kann.

### 3.4 Zielsetzung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Konstruktion eines *S. cerevisiae*-Stammes für die erstmalige zyklische und praktische Anwendung des durch Licht schaltbaren Promotorsystems (Shimizu-Sato *et al.*, 2002) am Beispiel der Zellzyklussteuerung in *Saccharomyces cerevisiae*. Hierzu muss ein Hefestamm konstruiert werden, der die Arbeit mit vom *Yeast-Two-Hybrid*-System abgeleiteten Komponenten erlaubt. Idealerweise sollte der Stamm folgende wichtige Eigenschaften besitzen:

1. Er ist unter bestimmten Bedingungen für sein Wachstum ausschließlich auf die lichtgesteuerte Expression des Zielproteins angewiesen.
2. Nach Abschaltung der Gentranskription wird die angesteuerte Zielkomponente auch auf Proteinebene vollständig proteolytisch entfernt, nachdem sie ihre Funktion im Zellzyklus erfüllt hat.

Das essentielle, in der Mitose aktive Protein Cdc20 ist ein Kandidat, der diese Voraussetzungen erfüllt. Einerseits gibt es temperatursensitive *cdc20*-Mutanten, die unter restriktiven Bedingungen in der Mitose arretieren und somit geeignet erscheinen, in diesem Fall über die lichtgesteuert exprimierte Cdc20-Version den weiteren Durchlauf der Mitose zu vermitteln. Andererseits wird Cdc20 nach Erfüllung seiner Aufgabe proteolytisch abgebaut. Seine erneute lichtinduzierte Expression in der darauffolgenden M-Phase ist somit Voraussetzung für das Durchlaufen eines weiteren Zellzyklus bei restriktiver Temperatur. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Konstruktion eines temperatursensitiven *cdc20 S. cerevisiae*-Stammes, der zur lichtregulierten Expression von Cdc20 fähig ist. Sollte sich dieser temperatursensitive Stamm als nicht für die praktische Anwendung als Angriffspunkt einer externen, lichtabhängigen Zellzyklussteuerung geeignet erweisen, so müsste über Alternativen nachgedacht werden, bei denen ein Stamm durch die Wahl anderer, dennoch möglichst einfacher Randbedingungen für sein Wachstum ausschließlich auf die lichtgesteuert exprimierte Cdc20-Variante angewiesen ist.

## 4 Material und Methoden

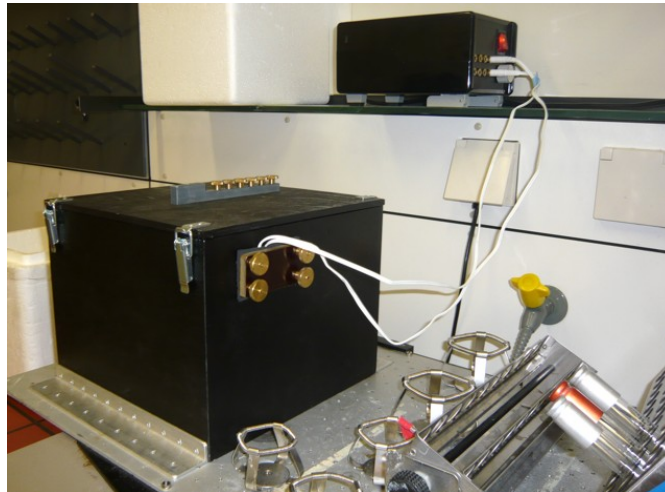
### 4.1 Geräte

Eine nach Herstellern geordnete Übersicht der verwendeten Geräte bietet die Tabelle 4.1.

Hersteller	Gerät(e)
Abimed, Langenfeld, Deutschland	Pipetten
Bio-Rad, Hercules, USA	DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen, Mini-Protean <sup>®</sup> -Tetra Cell, Mini Trans-Blot Cell, Protein-Gelelektrophorese-Apparaturen Protean II und IV, Netzgeräte Power-Pac <sup>™</sup> Basic/200/300
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Thermomixer 5437, Tischzentrifuge 5415 C, Tischzentrifugen 5804R und Hermle Z 320K
Gilson, Limburg, Deutschland	Pipetten
Grant Instruments, Shepreth, UK	Plattformschüttler VSR23
Grässlin GmbH, St. Georgen, Deutschland	Zeitschaltuhr Talento 471 Plus
Heraeus, Hanau, Deutschland	Biofuge fresco, Biofuge pico
ITF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland	Semidry-Blot-Apparatur
Liebisch, Bielefeld, Deutschland	Heizblock
Medisana, Düsseldorf, Deutschland	Medinose 660 nm Applikator
Mettler Toledo, Giessen, Schweiz	Feinanalysenwaage AE 163, Analysenwaage PM 460
Millipore, Eschborn, Deutschland	Ionenaustauscher Milli-Q Plus
MWG Biotech, München, Deutschland	Drucker für Agarosegele
Nikon, Tokyo, Japan	Mikromanipulator
Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden	Spektralphotometer Novaspec II
Protec Medizintechnik, Oberstenfeld, Deutschland	Entwicklermaschine Optimax
Schott, Hofheim, Deutschland	PH-Meter CG 820
Scientific Industries, New York, USA	Disruptor Genie, Roto-Shake Genie, Vortex-Genie 2
Snijders Scientific, Tilburg, Niederlande	Überkopfschüttler 34528
Tech-LED (Marubeni Europe), Düsseldorf, Deutschland	LEDs 750 nm
Thermo Scientific, München, Deutschland	Sorvall RC5B, Sorvall RC6+
Vacuubrand, Wertheim, Deutschland	Membran-Vakuumpumpe MD4C
VWR International, Darmstadt, Deutschland	Kühlzentrifuge himac CT15RE, Zentrifuge Galaxy 14D

Tabelle 4.1: Geräte

Für die lichtgeschützte Inkubation von Kulturen wurde von der Werkstatt eine auf einen Horizontalschüttler schraubbare *Blackbox* gebaut (Abbildung 4.1). Diese ermöglicht die Arbeit mit Licht einer definierten Wellenlänge, wobei die Kulturen lediglich beim Versuchsaufbau kurzfristig weißem Licht ausgesetzt sind.



**Abbildung 4.1: *Blackbox*.** Eine lichtdichte Box ermöglicht die Anzucht der Kulturen unter definierten Beleuchtungsbedingungen.

## 4.2 Verbrauchsmaterial

Die Bezugsquellen für die verwendeten Materialien sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Hersteller	Artikel
Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK	Hybond™ -Nitrocellulose-Membran, Hyperfilm ECL™
Biomers, Ulm, Deutschland	Oligonukleotide
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Ammoniumacetat, Ammoniumperoxodisulfat, Bromphenolblau, DNA-Marker 1kb Leiter, EDTA, D-Glucose, Glycerin, L-Glycin, Harnstoff, IPTG, Kaliumdihydrogenphosphat, <i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, <i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Phenol (TE-gesättigt ( <i>Roti</i> ®-Phenol)), PMSF, D-Saccharose, Tris, Triton-X-100, Tween 20, X-Gal
Concept Vitalprodukte, Schwerte, Deutschland	CALIFORNIA Spirulina premium 400 g reines Pulver
Difco, Detroit, USA	Bacto™ Agar, Bacto™ Pepton, Bacto™ Trypton, Bacto™ Yeast Extract, Yeast Nitrogene Base (YNB) w/o amino acids
Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland	Oligonukleotide



## Material und Methoden

<b>Hersteller</b>	<b>Artikel</b>
Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	Gene Jet™ Plasmid Miniprep Kit, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, Restriktionsendonukleasen, T4 DNA Ligase
Finzymes, Espoo, Finnland	Phusion™ DNA Polymerase
Fisher Scientific, Loughborough, UK	Aceton, Chloroform
Genaxxon Bioscience GmbH, Stafflangen, Deutschland	dNTPs, GenAgarose LE, Geneticin, Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1, Taq-Polymerase
Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	Petrischalen
Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	NucleoSpin® Extract II PCR clean-up Gel extraction kit
Merck, Darmstadt, Deutschland	DMSO, Kaliumacetat, β-Mercaptoethanol, TEMED
Millipore, Billerica, USA	MF™-Membran Filter
New England Biolabs, Ipswich, USA	1 kb DNA Ladder, Restriktionsendonukleasen
PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	PeqGOLD Gel Extraction Kit
Quiagen, Venlo, Niederlande	QIAprep® Gel Extraction Kit , QIAquick® PCR Purification Kit
Roche, Basel, Schweiz	Ampicillin, Hering-Sperma-DNA, rAPid Alkaline Phosphatase, Restriktionsendonukleasen, Shrimp Alkaline Phosphatase, T4 DNA Ligase
Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland	Pipettenspitzen
Sartorius, Göttingen, Deutschland	Glasperlen
Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland	Blotting Papier GB 002, GB 003
Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland	Adenin, L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Cystein, EDTA, Ethidiumbromid, D-Galactose, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, Lithiumacetat, L-Lysin, Lyticase, L-Methionin, PEG 3350, L-Phenylalanin, Ponceau S, L-Prolin, Proteinase K, Rinderserumalbumin (BSA), SDS, L-Serin, D-Sorbit, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, Uracil, L-Valin
Thermo Scientific, Rockford, USA	Pierce® ECL Western Blotting Substrate
Toronto Research Chemicals, Kanada	5-FOA
VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	Essigsäure, Ethanol, Isopropanol, Methanol

*Tabelle 4.2: Verbrauchsmaterial*

### 4.3 Software

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Programme sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

Zweck	Programm(e)
Bearbeitung von DNA-Sequenzen	DNA Strider 1.3, A plasmid Editor v1.17
Berechnungen, Erstellung von Diagrammen	Microsoft Office Excel 2003
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS3 10.0, Adobe Illustrator CS3 13.0.0
Textverarbeitung	OpenOffice.org 3.2.1

Tabelle 4.3: Software

### 4.4 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.4 in ihrer 5'→3'-Orientierung aufgeführt, wobei relevante Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in Großbuchstaben hervorgehoben sind. Bereiche, die homolog zu Sequenzen der genomischen DNA von *S. cerevisiae* sind, sind *kursiv* gekennzeichnet. Die Oligonukleotide wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und dabei auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt.

Name	fw/ rev	5'→3'-Sequenz	Schnitt- stelle	Beschreibung
as1	fw	<i>acgccatcattttaagagaggacagagaagcaagcctcctgaaagcag</i> <i>ctgaagcttctgtacgc</i>		Deletion von <i>GAL4</i> nach Güldener <i>et al.</i> (2002)
as2	rev	<i>cagttgaagtgaacttgcggggttttcagtatctacgattcattgcataggc</i> <i>cactagtggatctg</i>		
as3	fw	<i>gtatacaatctcगतatgttggttcccgttcttccactcccgtccagctgaag</i> <i>cttctgtacgc</i>		Deletion von <i>GAL80</i> nach Güldener <i>et al.</i> (2002)
as4	rev	<i>tataacgttcgctgcactggggccaagcacagggcaagatgcttgc</i> <i>aggccactagtggatctg</i>		
as6	fw	<i>cttcattaccggcgactc</i>		bindet 182 bp vor <i>GAL80</i>
as7	rev	<i>gaggcataaattccgtcagcc</i>		bindet in der <i>kanMX</i> -Kassette und dient der Überprüfung von Deletionen nach Güldener <i>et al.</i> (2002)
as8	rev	<i>gtgtcagtgcaccttctctcac</i>		bindet 227 bp hinter <i>GAL80</i>
as25	rev	<i>gcttctgaataagccctcg</i>		bindet 242 bp hinter <i>GAL4</i>
as26	fw	<i>ccttgaggaccctgacg</i>		bindet 506 bp vor <i>GAL4</i>
as27	rev	<i>cgcgtctgtgaggggagcg</i>		bindet im TEF-Promotor und dient der Überprüfung von Deletionen nach Güldener <i>et al.</i> (2002)
as28	fw	<i>cgccctgacatcatctgccc</i>		bindet im TEF-Terminator und dient der Überprüfung von Deletionen nach Güldener <i>et al.</i> (2002)

Name	fw/ rev	5'→3'-Sequenz	Schnitt- stelle	Beschreibung
as31	fw	atatCTGCAGggatggacgcaaagaag	PstI	bindet 632 bp vor <i>GALI</i>
as32	rev	atatGCATGCtatagtttttctccttgacg	SphI	bindet 1 bp vor <i>GALI</i>
as37	fw	gcaatgttttgctctcgtgc		bindet 621 bp vor <i>GAL4</i>
as38	rev	atatGCGGCCGCcaccttcgtgaactcagagg	NotI	bindet 420 bp hinter <i>GAL4</i>
as65	rev	atatatAGGCCTgcatagggcactagtgatctg	StuI	dient der Amplifikation der Guldener- <i>knockout</i> -Kassetten
as66	fw	ccaacgcttacacagagtacc		bindet 681 bp vor <i>CDC20</i>
as67	rev	ggagtcccataatggcgc		bindet 601 bp hinter <i>CDC20</i>
as76	fw	atatatGCATGCcagaaagetctagag	SphI	bindet ab Start von <i>CDC20</i>
as77	fw	atGGGCCCgacattcataatattgtaaaaagtaccctacatactac atatttcagctgaagcttctgacgc	ApaI	dient der Amplifikation der Guldener- <i>knockout</i> -Kassetten unter Anfügung einer Sequenz homolog zu einem Bereich 500 bp vor <i>CDC20</i>
as106	rev	atatatGCATGCggcatgttaattatactttattcttg	SphI	bindet 1 bp vor <i>MET3</i>
as107	fw	atatatCTGCAGgggtccacagataaacatcg	PstI	bindet 519 bp vor <i>MET3</i>
as109	rev	gcattccacagataaatgcag		Bindet 863 bp nach Start von <i>CDC20</i>

Tabelle 4.4: Oligonukleotide

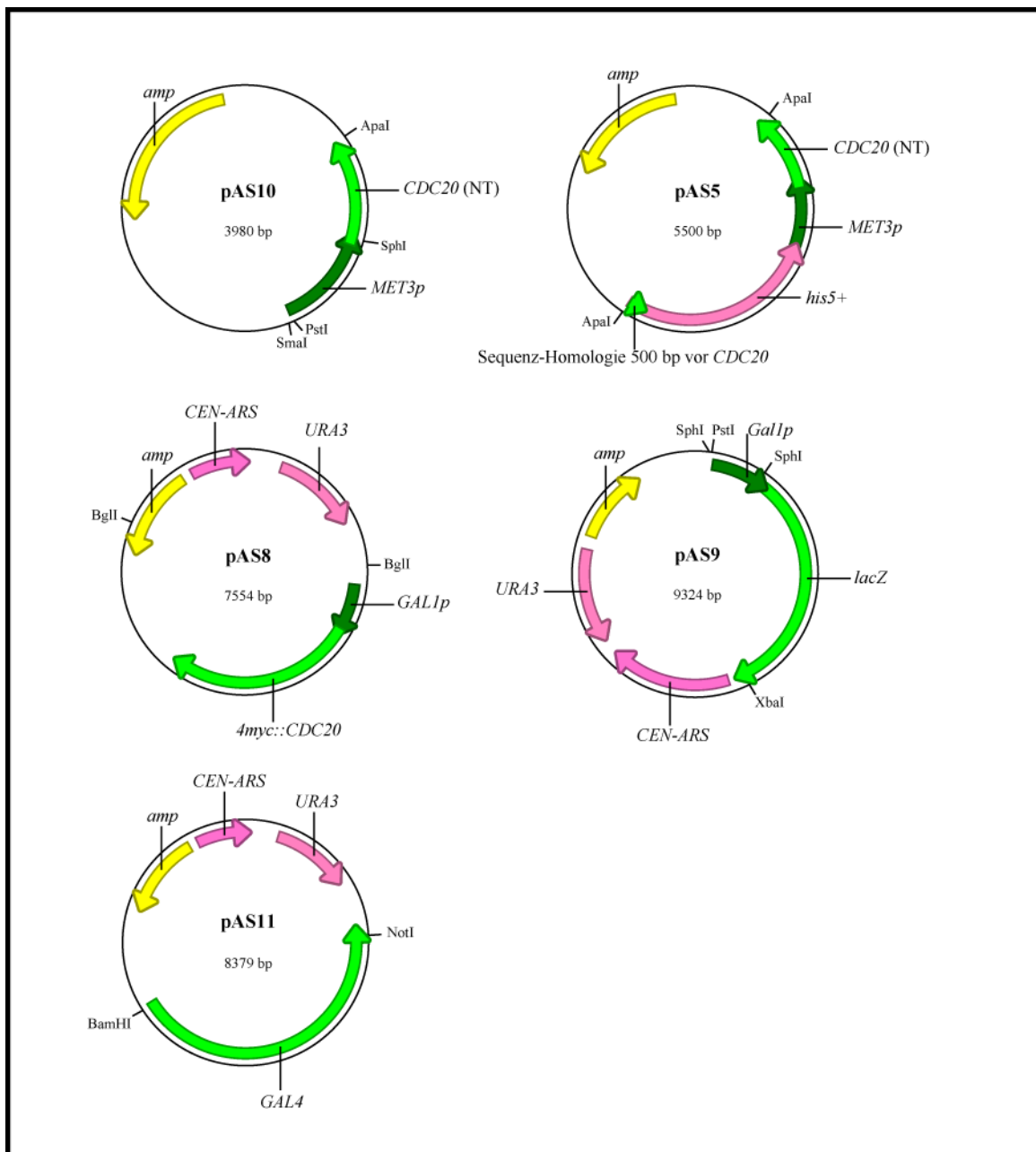
## 4.5 Plasmide

In Tabelle 4.5 sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide zusammengestellt. Die Abbildung 4.2 enthält die der Veranschaulichung dienenden Plasmidkarten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu klonierten Plasmide.

Name	Beschreibung	Referenz
pAS5	<i>his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20(NT), Amp<sup>R</sup></i>	diese Arbeit, s. Kapitel 5.5.1
pAS8	<i>URA3, CEN, GAL1p::4myc::CDC20, Amp<sup>R</sup></i>	diese Arbeit, s. Kapitel 5.1.2
pAS9	<i>URA3, CEN, GAL1p::lacZ, Amp<sup>R</sup></i>	diese Arbeit, s. Kapitel 5.4.2
pAS10	<i>MET3p::CDC20(NT), Amp<sup>R</sup></i>	diese Arbeit, s. Kapitel 5.5.1
pAS11	<i>URA3, CEN, GAL4, Amp<sup>R</sup></i>	diese Arbeit, s. Kapitel 5.5.1
pBSIISK(-)	<i>ori, Amp<sup>R</sup>, lacZ</i>	Alting-Mees und Short, 1989
PhyB(NT)-GBD	2 $\mu$ , <i>TRP1, Amp<sup>R</sup></i> , Teil des lichtschtbaren <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Systems	Shimizu-Sato <i>et al.</i> , 2002
PIF3-GAD	2 $\mu$ , <i>LEU2, Amp<sup>R</sup></i> , Teil des lichtschtbaren <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Systems	Shimizu-Sato <i>et al.</i> , 2002
pRS306P <sub>GAL</sub> -4mycCDC20	<i>URA3, integrativ, GAL1p::4myc::CDC20, Amp<sup>R</sup></i>	Pan und Chen, 2004
pRS316	<i>URA3, CEN, Amp<sup>R</sup></i>	Sikorski und Hieter, 1989

Name	Beschreibung	Referenz
pSH62	<i>GAL1p::Cre, Amp<sup>R</sup></i>	Güldener <i>et al.</i> , 2002
pUG6	<i>loxP-kanMX-loxP, Amp<sup>R</sup></i>	Güldener <i>et al.</i> , 2002
pUG27	<i>loxP-his5<sup>+</sup>-loxP, Amp<sup>R</sup></i>	Güldener <i>et al.</i> , 2002
YCplac33-MCH5p::lacZ	<i>URA3, CEN, MCH5p::lacZ, Amp<sup>R</sup></i>	Reihl und Stolz, 2005

Tabelle 4.5: Plasmide



**Abbildung 4.2: Plasmidkarten.** Die Abbildung zeigt die im Rahmen der vorliegenden Arbeit klonierten Plasmide in schematischer Darstellung. Einzelheiten zur Klonierung finden sich in den in Tabelle 4.5 genannten Kapiteln.

## 4.6 Mikroorganismen

### 4.6.1 *Escherichia coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> K12, F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene
XL10-gold	Tet <sup>R</sup> $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> Hte [F' <i>proAB lacIqZ</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene

Tabelle 4.6: *E. coli*-Stämme

### 4.6.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* stammen bis auf W267, der einen K699-Hintergrund hat, aus dem W303-Hintergrund und sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Name	Genotyp	ggf. enthaltene Plasmide	Referenz
W267	MAT $\alpha$ <i>cdc20-1 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 can1-100</i>		Schwab <i>et al.</i> , 1997
W303-1A	MAT $\alpha$ <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trpl-1 ura3-1 can1-100</i>		Thomas und Rothstein, 1989
W303-1B	MAT $\alpha$ <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trpl-1 ura3-1 can1-100</i>		Thomas und Rothstein, 1989
YAS6	MAT $\alpha$ <i>cdc20-1 gal80<math>\Delta</math>kanMX ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 can1-100</i>		diese Arbeit, s. Kapitel 5.1.1
YAS29	MAT $\alpha$ <i>cdc20-1 gal80<math>\Delta</math>kanMX ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trpl-1 ura3-1 can1-100</i>		diese Arbeit, s. Kapitel 5.1.1
YAS37	MAT $\alpha$ <i>cdc20-1 gal80<math>\Delta</math>loxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trpl-1 ura3-1 can1-100</i>		diese Arbeit, s. Kapitel 5.1.1
YAS45	MAT $\alpha$ <i>cdc20-1 gal4<math>\Delta</math>kanMX gal80<math>\Delta</math>loxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trpl-1 ura3-1 can1-100</i>		diese Arbeit, s. Kapitel 5.1.1

Name	Genotyp	ggf. enthaltene Plasmide	Referenz
YAS46	<i>Mata gal4ΔkanMX gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>		diese Arbeit, s. Kapitel 5.4.2
YAS48	<i>MATx gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>		diese Arbeit, s. Kapitel 5.4.2
YAS50	<i>MATα cdc20-1 gal4ΔkanMX gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pRS316	diese Arbeit, s. Kapitel 5.1.3
YAS51	<i>MATα cdc20-1 gal4ΔkanMX gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS8	diese Arbeit, s. Kapitel 5.1.3
YAS69	<i>Mata gal4ΔkanMX gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS9	diese Arbeit, s. Kapitel 5.4.2
YAS122	<i>Mata gal4ΔloxP gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>		diese Arbeit, s. Kapitel 5.5.1
YAS156	<i>Mata gal4ΔloxP gal80ΔloxP cdc20::his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>		diese Arbeit, s. Kapitel 5.5.1
YAS157	<i>Mata gal4ΔloxP gal80ΔloxP cdc20::his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS8	diese Arbeit, s. Kapitel 5.5.1
YAS158	<i>Mata gal4ΔloxP gal80ΔloxP cdc20::his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pRS316	diese Arbeit, s. Kapitel 5.5.1

Tabelle 4.7: *S. cerevisiae*-Stämme

## 4.7 Zellkultivierung

### 4.7.1 Allgemeines

Die Anzucht der Mikroorganismen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Hierfür wurden alle nötigen Medien und Puffer je nach Hitzestabilität sterilfiltriert oder 20 min bei 120 °C autoklaviert, Materialien wurden autoklaviert bzw. abgeflammt.

Die Wahl und Zusammensetzung des Mediums (Standardmedien nach Sambrook und Russel, 2001; Guthrie und Fink, 1991; Ausubel *et al.*, 1992) zur Zellanzucht wurde den experimentellen Zielen

sowie den Auxotrophiemarkern der verwendeten Stämme angepasst. Flüssigkulturen von *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden unter Schütteln inkubiert, um ein Sedimentieren der Zellen zu verhindern. Das Animpfen in Flüssigmedium auf eine definierte OD<sub>600</sub> erfolgte stets aus einer flüssigen Vorkultur. *E. coli* wurde bei 37 °C angezogen, *S. cerevisiae* je nach Stammhintergrund und experimentellem Ziel bei 25, 30 oder 37 °C.

## 4.7.2 Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurde H<sub>2</sub>O als Lösungsmittel verwendet. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde den Medien 2 % Agar zugesetzt.

### 4.7.2.1 Medien für *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 4.8 aufgeführten Medien.

Medium	Zusammensetzung
LB	1 % Bacto™ Trypton 0,5 % Bacto™ Yeast Extract 0,5 % NaCl pH 7,5
SOB w/o SOC	2 % Bacto™ Trypton 0,5 % Bacto™ Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl
50x SOC	1 M Glucose 0,5 M MgCl <sub>2</sub> 0,5 M MgSO <sub>4</sub>

Tabelle 4.8: Medien zur Kultivierung von *E. coli*

SOB wurde nach dem Autoklavieren von SOB w/o SOC durch die Zugabe von sterilfiltriertem 50x SOC hergestellt.

Für die Anzucht plasmidtragender Stämme wurden den Medien die nötigen sterilfiltrierten Antibiotika aus den in Tabelle 4.9 aufgeführten Stammlösungen auf eine Endkonzentration von 1x zugegeben.

Stammlösung	Konzentration der Stammlösung
1000x Ampicillin	100 mg/ml
1000x Chloramphenicol	34 mg/ml in 70 % EtOH
1000x Tetrazyklin	12,5 mg/ml in 50 % EtOH

Tabelle 4.9: Antibiotika-Stammlösungen

Transformationsansätze von Klonierungen, die ein Blau/Weiß-Screening ermöglichen, wurden auf LB<sub>AXI</sub> ausplattiert (Tabelle 4.10).

B/W-Screening	Zusammensetzung
LB <sub>AXI</sub>	LB <sub>Ampicillin</sub> 0,004 % X-Gal 0,04 mM IPTG

Tabelle 4.10: Medium für Blau/Weiß-Screening

#### 4.7.2.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde in den in Tabelle 4.11 angegebenen Medien kultiviert (nach Guthrie und Fink, 1991). Für die Herstellung des *dropout mix* wurden je 2 g L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Cystein, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Glycin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin, L-Valin und myo-Inosit mit 0,2 g p-Aminobenzoesäure vermengt.

Art	Medium	Zusammensetzung
Vollmedium	YPD	1 % Bacto™ Yeast Extract 2 % Bacto™ Pepton 2 % D-Glucose pH 5,5
Synthetische Medien	SD	0,67 % YNB w/o amino acids 2 % D-Glucose pH 5,5
	SC	0,67 % YNB w/o amino acids 2 % D-Glucose 0,2 % dropout mix pH 5,6
Sporulationsmedium	SM	1 % KAc

Tabelle 4.11: Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*



Entsprechend der Auxotrophiemarker der verwendeten Stämme sowie des erwünschten Selektionsdruckes wurden den synthetischen Medien Aminosäuren, Basen oder 5-FOA sowie dem Vollmedium Geneticin zugesetzt. Eine Zusammenfassung dieser Supplemente enthält Tabelle 4.12.

Supplement	Arbeitskonzentration
Adenin	0,3 mM
L-Histidin	0,3 mM
L-Leucin	1,6 mM
L-Methionin	0,134 mM
L-Tryptophan	0,4 mM
Uracil	0,2 mM
Geneticin	300 mg/l
5-FOA	1 g/l

Tabelle 4.12: Supplemente für die Anzucht von *S. cerevisiae*

## 4.8 Zellbiologische Methoden

### 4.8.1 Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension erfolgte durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ). Die in einer Küvette enthaltenen Zellen streuen das einfallende Licht bis zu einer  $OD_{600} \approx 0,5$  proportional zur enthaltenen Zellmenge, so dass der Lichtintensitätsverlust als Maß für die Zellzahl dienen kann. Um eine Messung im linearen Bereich zu ermöglichen, wurden die Zellkulturen ggf. mit Medium verdünnt. Eine Hefesuspension mit einer  $OD_{600} = 1$  enthält ca.  $10^7$  Zellen. Die Menge Zellen, die in 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600} = 1$  enthalten ist, wird als 1 OD Zellen (1 ODZ) bezeichnet.

### 4.8.2 Dauerkulturen

Dauerkulturen von Mikroorganismen wurden als Glycerinkulturen angelegt. Frisch ausgestrichene Hefekulturen wurden nach zwei- bis dreitägiger Inkubation mit Hilfe einer Impföse in 1 ml 15 %-iger Glycerinlösung resuspendiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dauerkulturen von *E. coli* wurden aus flüssigen Kulturen angelegt, indem 500  $\mu\text{l}$  Kultur mit 500  $\mu\text{l}$  60 %-iger Glycerinlösung versetzt wurden. Sie wurden ebenfalls bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für eine erneute Verwendung der Stämme wurden die Mikroorganismen mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers zunächst auf feste Nährböden ausgebracht und bei der für sie optimalen Temperatur inkubiert.

### 4.8.3 Wachstumstest von *Saccharomyces cerevisiae*

Eine kleine Zellmenge des zu untersuchenden Stammes wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O in einer Mikrotiterplatte resuspendiert. Ausgehend von dieser Zellsuspension wurden weitere Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) erstellt. Mit Hilfe eines 48-zähligen Metallstempels wurde eine kleine Menge jeder Zellsuspension auf die Platten übertragen, auf denen das Wachstum untersucht werden sollte. Sie wurden anschließend so lange bei der gewünschten Temperatur inkubiert, bis eine Auswertung des Wachstums möglich war.

Alternativ wurde eine definierte Zellmenge des zu untersuchenden Stammes auf Platten ausgestrichen und diese anschließend inkubiert.

### 4.8.4 Kreuzung von *Saccharomyces cerevisiae*

Zwei haploide Stämme unterschiedlichen Paarungstypes (Mata oder Mat $\alpha$ ) können miteinander gekreuzt werden, um einen diploiden Stamm zu erhalten. Hierzu wurde frisches Zellmaterial der beiden zu kreuzenden Stämme auf YPD übereinander ausgebracht und die Platte ein bis zwei Tage bei der für beide Ausgangsstämme optimalen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde auf Einzelkolonien ausgestrichen und diese phänotypisch charakterisiert. Idealerweise brachten dabei beide Ausgangsstämme individuelle Marker mit, die eine einfache Selektion auf Diploidie ermöglichten.

### 4.8.5 Tetradenanalyse bei *Saccharomyces cerevisiae*

Ein diploider Stamm kann eine meiotische Teilung unterlaufen, wobei haploide Stämme unterschiedlichen Paarungstypes entstehen. Dafür wurde Zellmaterial eines frisch auf Vollmedium angewachsenen diploiden Stammes auf festes Sporulationsmedium übertragen und für 5 bis 8 Tage bei 25 °C inkubiert. Ab dem 4. Tag wurde der Ansatz regelmäßig durch Mikroskopie auf das Vorhandensein von Tetraden überprüft. Sobald genügend Tetraden auftraten, wurde wenig Zellmaterial in 200 µl Sorbitolpuffer resuspendiert und nach Zugabe von 3 µl Lyticase-Lösung für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml H<sub>2</sub>O zugegeben und der Ansatz 2 bis 3 h auf Eis gehalten, bevor 12 µl auf eine YPD-Platte ausgebracht wurden. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die Tetraden getrennt. Abschließend wurde die Platte 3 bis 8 Tage bei der für alle entstehenden Stämme permissiven Temperatur inkubiert, um die Zellen zu Kolonien zu vermehren. Die durch die Tetradisdissektion neu entstandenen Stämme wurden durch Wachstumstests phänotypisch charakterisiert, ihr Paarungstyp wurde im Rahmen einer Komplementationsanalyse durch Kreuzung mit *his1*-Mutanten bekannten Paarungstyps (YR312 und YR320 (Hans Rudolph)) bestimmt.

Sorbitolpuffer	1,2 M Sorbitol 50 mM Tris/HCl pH 7,5
Lyticase-Lösung	2500 U/ml

#### 4.8.6 Durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in *S. cerevisiae*

Die Verteilung des DNA-Gehalts in einer Population von *S. cerevisiae* erfolgte nach DAPI-Färbung der DNA mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Hierzu wurden ca. 500 µl Kultur entnommen, mit 1 ml PBS gewaschen und das Zellpellet in 150 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Durch Zugabe von 350 µl 100 % EtOH wurden die Zellen Ethanol-fixiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte im Rahmen einer Kooperationsarbeit durch Andrea Focke (Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg). Es wurden 150 µl der Zellsuspension zweimal mit je 1 ml 50 mM Na-Citrat-Puffer (pH 7,0) gewaschen und das Zellpellet anschließend in 500 µl 50 mM Na-Citrat-Puffer (pH 7,0) aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µg RNase A wurde 2 h bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde 1 µg DAPI zugegeben, die Zellen 45-60 sec im Ultraschallbad separiert und der DNA-Gehalt am Durchflusszytometer der Firma Partec bestimmt (nach Davies und Allen, 2007). Für die Auswertung wurden die Zellen in der S/M-Phase denen in der G1-Phase gegenübergestellt, dabei wurde die Gesamtzellzahl in beiden Gruppen als 100 % definiert.

#### 4.9 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Standardmethoden in Anlehnung an Sambrook und Russel (2001) durchgeführt.

##### 4.9.1 Auftrennung und Isolation von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierfür wurden 0,8 % (w/v) Agarose in 50 ml TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 60 °C abgekühlt und nach Zusatz von 50 µg Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml) in Flachbett-elektrophoresekammern gegossen. Die DNA-Proben sowie der Größenstandard (*1 kbp DNA-Leiter* der Firma Roth) wurden mit DNA-Beladungspuffer versetzt, die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 120 V. Anschließend wurden die Gele mit einer Geldokumentationsanlage fotografiert, wobei DNA-Fragmente, die weiterverarbeitet werden sollten, nur mit einer Handlampe geringerer Intensität belichtet wurden. In diesen Fällen wurde der die DNA enthaltende Gelabschnitt mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten und die DNA nach Anweisung des Herstellers aus dem Gel extrahiert.

TAE-Puffer	40 mM Tris/HOAc pH 8,0 1 mM EDTA
DNA-Beladungspuffer	50 % Glycerin in TAE 0,4 % Bromphenolblau

### 4.9.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) im Thermocycler wurde je nach Bedarf die Taq-Polymerase (ohne Korrekturlesemechanismus) oder die Phusion-Polymerase (mit Korrekturlesemechanismus) verwendet. Ein Standard-PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

<u>Taq-Ansatz</u>	<u>Phusion-Ansatz</u>
1 µl DNA	1 µl DNA
5 µl 10x Taq-Polymerasepuffer	10 µl 5x HF-Puffer
1 µl <i>fw primer</i>	1 µl 1:10 <i>fw primer</i>
1 µl <i>rev primer</i>	1 µl 1:10 <i>rev primer</i>
1 µl 10 mM dNTPs	1 µl 10 mM dNTPs
0,2 µl Taq-Polymerase	0,2 µl Phusion-Polymerase
40,8 µl H <sub>2</sub> O	35,8 µl H <sub>2</sub> O

Für die Überprüfung von Ligationsansätzen mittels Kolonie-PCR bei *E. coli* und von Deletionen bei genomischer DNA von *S. cerevisiae*-Transformanten wurde der Taq-Ansatz auf 10 µl Reaktionsvolumen minimiert. Die Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA ( $T_{an}$ ) wurde den verwendeten Oligonukleotiden angepasst, sie lag 2 °C unter der Schmelztemperatur des Oligonukleotids mit der niedrigeren Schmelztemperatur (Berechnung der Schmelztemperatur: <http://www.cnr.berkeley.edu/~zimmer/oligoTMcalc.html>). Für die Extension wurde eine durchschnittliche Verlängerungsgeschwindigkeit von 1 kb/min bei der Taq-Polymerase sowie 2 kb/min bei der Phusion-Polymerase angenommen. Die Extensionszeit ( $t_{ex}$ ) wurde der Größe des zu amplifizierenden Stückes angepasst. Der Thermocycler wurde auf die benötigte Starttemperatur vorgeheizt, ein PCR-Zyklus hatte folgenden Ablauf:

<u>Taq-Programm</u>	<u>Phusion-Programm</u>
94 °C 5 min	98 °C 2 min
94 °C 40 s	98 °C 10 s
$T_{an}$ 1 min	$T_{an}$ 30 s
72 °C $t_{ex}$	72 °C $t_{ex}$
72 °C 10 min	72 °C 10 min
4 °C -Pause-	4 °C -Pause-

} 20-30 Zyklen                      } 30 Zyklen

### 4.9.3 Fällung von PCR-Produkten

Sollte ein PCR-Produkt anschließend direkt in eine Hefetransformation eingesetzt werden, so wurde es dafür durch Fällung aufkonzentriert. Für eine Deletion nach Güldener *et al.* fand die PCR in der Regel im 200 µl-Maßstab statt. Für die Fällung wurden nach Ablauf der PCR 22 µl 3 M NaAc pH 5,3 sowie 555 µl 100 % EtOH (-20 °C) zugegeben und die DNA für mindestens 30 min bei -80 °C gefällt. Anschließend wurde die DNA pelletiert (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 4 °C, 15 min), der Überstand verworfen und die DNA mit 900 µl 70 % EtOH (-20 °C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 4 °C, 10 min) wurde die

DNA 20 min bei 37 °C getrocknet und abschließend in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 4.9.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen fand in dem vom Hersteller angegebenen zugehörigen Puffer bei der für das Enzym optimalen Temperatur statt. Bei der Spaltung mit zwei Enzymen (Doppelverdau) wurde der von den Herstellern für einen Doppelverdau empfohlene Puffer gewählt. War kein Doppelverdau möglich, so wurde sequenziell verdaut, indem die DNA nach dem ersten Verdau über ein Säulchen gereinigt wurde, in H<sub>2</sub>O eluiert wurde und dem Eluat der Puffer und das Enzym für den zweiten Verdau zugegeben wurden. Analytische Ansätze wurden 1 h, präparative Verdaue mindestens 4 h inkubiert. Ein Standard-Verdau im 10 µl-Maßstab enthielt folgende Komponenten:

##### 10 µl Verdau

1 µl Plasmid-DNA  
1 µl 10x Puffer  
0,3 µl Restriktionsenzym  
7,7 µl H<sub>2</sub>O

Bei Doppelverdaus wurden 0,3 µl des zweiten Restriktionsenzym hinzugefügt und entsprechend weniger Wasser verwendet. Präparative Verdaus wurden im 30 µl Maßstab angesetzt, wobei sich die eingesetzte DNA-Menge nach der Reinheit und Konzentration der verwendeten Präparation richtete.

#### 4.9.5 Ligation

Zur Konstruktion von Plasmiden wurden die einzelnen DNA-Fragmente (in der Regel Vektor und maximal 2 Inserts) durch Aktivität der T4-DNA-Ligase ligiert. Ein Standardansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

##### Ligation

1 µl Vektor  
2 µl Insert  
1 µl 10x Ligasepuffer  
1 µl T4-DNA-Ligase  
5 µl H<sub>2</sub>O

Bei Klonierungen mit 2 Inserts wurde entsprechend weniger Wasser verwendet. Die Ligation erfolgte mindestens 2 h bei Raumtemperatur, anschließend wurden die Ansätze in *E. coli* transformiert.

Wurden für eine Klonierung Schnittstellen verwendet, deren überhängende Enden kompatibel waren, so wurden die 5'-Phosphatreste am Vektor durch Behandlung mit *rAPid* oder der *Shrimps Alkaline Phosphatase* entsprechend der Vorschrift des Herstellers entfernt, um ein Religieren des Plasmids zu verhindern.

#### 4.9.6 Subklonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte mit glatten Enden, wie sie bei der Amplifikation von DNA-Sequenzen mit der Phusion-Polymerase entstehen, können direkt in *blunt end*-Schnittstellen von Vektoren kloniert werden. Hierfür wurden die EcoRI-Schnittstelle von pBS II SK(-) oder die SmaI-Schnittstellen von pUC19 bzw. pAS1 verwendet.

##### Subklonierung

- 0,1 µl Plasmid
- 2 µl PCR-Produkt
- 1 µl 10x Ligasepuffer
- 0,5 µl Restriktionsenzym
- 1,5 µl T4-DNA-Ligase
- 2,9 µl H<sub>2</sub>O

Bei der Verwendung von EcoRI wurde dem Ansatz NaCl auf eine Endkonzentration von 100 mM zugeben und entsprechend weniger Wasser verwendet. Die Subklonierung erfolgte durch 5 h schneiden und ligieren bei 22 °C. Nach Hitzeinaktivierung (10 min bei 65 °C) wurde verbliebener ungeschnittener Vektor durch die erneute Zugabe von 0,5 µl Restriktionsenzym und Inkubation bei 37 bzw. 30 °C für 30 min linearisiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in kompetente *E. coli* transformiert, aus den entstehenden Kolonien wurden die Plasmide isoliert und auf das enthaltene PCR-Produkt hin untersucht.

#### 4.9.7 Erzeugung kompetenter *Escherichia coli*

Der für die Erzeugung hitzeschock-kompetenter *E. coli* benötigte TB-Puffer wurde bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Eine Einzelkolonie von *E. coli* wurde ÜN in LB-Medium angezogen (XL1-blue in LB<sub>Tetracyclin</sub>), in 250 ml SOB auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft und bei 18 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,6 angezogen. Durch zehnmütiges Schütteln im Eiswasserbad wurden die Zellen abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (Sorvall, 4 °C, 6000 rpm, 10 min). Nachfolgend wurden sie in 30 ml TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (Sorvall, 4 °C, 6000 rpm, 10 min) wurden die Zellen in 20 ml TB-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von DMSO auf eine Endkonzentration von 7 % (v/v) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung der Kompetenz wurden 100 µl kompetenter Zellen mit 1 ng pUC19 transformiert, die Effizienz sollte bei mindestens 10<sup>4</sup> Transformanten pro ng Plasmid liegen (nach Inoue *et al.*, 1990).

TB-Puffer	10 mM PIPES 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl 55 mM MnCl <sub>2</sub> pH 6,7
-----------	---

#### 4.9.8 Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation von Plasmiden oder Ligationsansätzen in *E. coli* wurden 100 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen zu jedem Ansatz gegeben und dieser dann 10 bis 30 min auf Eis inkubiert, bevor er einem 45-sekündigem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt wurde. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 30 bis 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in der Tischzentrifuge pelletiert (13.000 rpm, 1 min), der Überstand abgekippt und das Pellet im verbliebenen Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf Selektionsplatten ausgespatelt und bei 37 °C inkubiert (nach Inoue *et al.*, 1990).

#### 4.9.9 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte über Säulchen entsprechend der Anweisungen des Herstellers oder als STET-Präparation.

Für die STET-Präparation wurden 1,5 ml ÜNK in der Tischzentrifuge pelletiert (13.000 rpm, 1 min) und die Zellen in 500 µl STET-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl frisch hergestellter Lysozym-Lösung (10 mg/ml in STET-Puffer) und Mischen durch Vortexen wurde der Ansatz 2 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde in der Tischzentrifuge pelletiert (13.000 rpm, 5 min) und das Pellet mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Durch Zugabe von 400 µl Isopropanol und Mischen durch Invertieren wurde die DNA gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 5 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und ca. 20 min bei 65 °C getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl TE<sub>10/1</sub> mit 100 µg/ml RNase A aufgenommen, durch Vortexen resuspendiert und 3 min bei 65 °C inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (13.000 rpm, 3 min) befanden sich die Plasmide im Überstand (nach Holmes und Quigley, 1981).

STET-Puffer	8 % Saccharose 5 % Triton X-100 50 mM Tris/HCl pH 8,0 50 mM EDTA
TE <sub>10/1</sub>	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA

#### 4.9.10 Isolation genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Isolation der gDNA wurden 6 ml einer in Vollmedium bis zur Sättigung gewachsenen Kultur geerntet (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 15 s) und mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Aufbruchspuffer, 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und 300 µl Glasperlen (0,25-0,5 mm) wurde viermal 1 min gevortext und 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 200 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 10 min) 300 µl des wässrigen Überstandes zu 1 ml 100 % EtOH (-20 °C) gegeben. Durch Invertieren wurde gemischt und anschließend die DNA 1 h bei -80 °C gefällt. Danach wurde die DNA pelletiert (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 4 °C, 15 min), der Überstand verworfen und die DNA dann in 400 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Zugabe von 30 µg RNase A (Stammlösung: 10 mg/ml) wurde 5 min bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 10 µl 5 M NH<sub>4</sub>Ac und 1 ml EtOH (-20 °C) erneut bei -80 °C für 30 min gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 4 °C, 2 min) wurde

die DNA mit 70 % EtOH (-20 °C) gewaschen und anschließend bei 65 °C für 20 min getrocknet. Abschließend wurde sie in 50 µl TE<sub>10/1</sub> resuspendiert.

Aufbruchspuffer	2 % Triton X-100 1 % SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
TE <sub>10/1</sub>	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA

#### 4.9.11 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Gietz und Woods, 2002). Der zu transformierende Stamm wurde i.d.R. aus einer flüssigen Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> = 0,2 in 50 ml Vollmedium angeimpft und bei einer für den Stamm optimalen Temperatur bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 vermehrt. Durch Zentrifugation (5804R, 4000 rpm, 2 min) wurden die Zellen pelletiert, mit 25 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 1 ml 100 mM LiOAc aufgenommen, um sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zu überführen. Die Zellen wurden erneut pelletiert (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 15 s), der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl 100 mM LiOAc resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 60 µl dieser Zellsuspension in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 15 s) der Überstand verworfen. Ein Standardansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Transformationsansatz für *S. cerevisiae*:

Zellpellet

240 µl 50 % PEG 3350

36 µl 1 M LiOAc

50 µl denaturierte Heringssperma-DNA (4 mg/ml)

(34-x) µl H<sub>2</sub>O

x µl DNA

Die eingesetzte DNA-Menge richtete sich nach der Anwendung – bei Deletions- oder Integrationskassetten wurden 2 bis 10 µg DNA verwendet, bei Plasmiden 0,2 bis 2 µg. Die Ansätze wurden gut gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach einem Hitzeschritt, bei dem 20 min bei 42 °C inkubiert wurde, wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt, kurz pelletiert (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 5 s) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 150 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit Hilfe von Glasperlen (2,8-3,3 mm) auf Selektivplatten ausgebracht. Bei Transformationen mit kanMX4 als Selektionsmarker wurden die Zellen statt in H<sub>2</sub>O in 3 ml YPD resuspendiert und 3 bis 4 h bei 30 °C inkubiert, bevor sie auf die Selektionsplatten ausgebracht wurden. Bei allen Transformationen wurden parallel Negativkontrollen mit H<sub>2</sub>O statt DNA durchgeführt, die auf dieselben Selektionsplatten wie der Transformationsansatz ausplattiert wurden. Nach 3- bis 7-tägiger Inkubation bei der für den Stamm optimalen Temperatur wurden einzelne Transformanten



auf Einzelkolonien ausgestrichen, um untransformierte Zellen abzureichern. Die erhaltenen Transformanten wurden durch Kontroll-PCRs auf ihre Richtigkeit überprüft. Sollte die Transformation zu einem veränderten Phänotyp führen, so wurde auch dieser analysiert.

## 4.10 Proteinbiochemische Methoden

### 4.10.1 Gesamtproteinextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Gesamtproteinextraktion aus *S. cerevisiae* erfolgte mit Hilfe eines Glasperlenaufschlusses unter denaturierenden Bedingungen, wobei ca. 5 ODZ verwendet wurden. Die Zellen wurden pelletiert (5804R, 5000 rpm, 4 °C, 3 min), in 1 ml TE<sub>25/5</sub> aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Pelletieren (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 30 s) und Verwerfen des Überstandes wurden ein Mikrolöffel Glasperlen (Durchmesser 0,25 bis 0,5 mm), 100 µl SDS-Probenpuffer sowie 1 µl 1 M PMSF-Lösung zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4 °C durch zehnmütiges vortexen. Nach erneuter Zugabe von 1 µl 1 M PMSF-Lösung wurde der Ansatz 5 min bei 95 °C inkubiert, anschließend kurz auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 4 °C, 1 min). Für die Analyse im Western Blot-Verfahren wurden pro Spur 5 bis 20 µl Extrakt auf ein 10 %-iges SDS-Gel geladen. Dies entspricht einer Proteinmenge aus 0,25 bis 1 ODZ (nach Spitzner *et al.*, 2008).

TE <sub>25/5</sub>	25 mM Tris/HCl pH 8,0 5 mM EDTA
SDS-Probenpuffer	2 % SDS 5 % Glycerin 5 % β-Mercaptoethanol 0,4 % Bromphenolblau 250 mM Tris/HCl pH 6,8
1 M PMSF-Lösung	1 M PMSF in DMSO

### 4.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen unter Verwendung des Bio-Rad Mini-Protean 3-Systems mit 10 %-igen Trenngelen. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen, wobei das Einsetzen eines 10- bis 15-zähligen Kammes die Beladungstaschen für die Proteinproben erzeugte.

<u>10 % Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
4,02 ml H <sub>2</sub> O	6,1 ml H <sub>2</sub> O
2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
100 µl 10 % SDS	100 µl 10 % SDS
3,33 ml 30 % Acrylamid / 0,8 % Methylen-Bis-Acrylamid	1,3 ml 30 % Acrylamid / 0,8 % Methylen-Bis-Acrylamid
50 µl 10 % APS	50 µl 10 % APS
10 µl TEMED	20 µl TEMED

Der Gellauf erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 120 bis 150 V bis die Farbstoffbande (Bromphenolblau) am Gelende auslief (nach Laemmli, 1970). Als Größenstandard diente der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* der Firma Fermentas.

SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 1 % SDS
----------------	--

### 4.10.3 Western Blot

Um Proteine durch die Dekoration mit Antikörpern sichtbar zu machen, wurden sie mittels Western Blot im *wet-blot*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach dem SDS-Gellauf wurde die Membran auf das SDS-Gel gelegt und beidseitig wurden je zwei Whatman-Papiere sowie eine Filterwatte aufgelegt. Der Blot wurde in Transferpuffer luftblasenfrei zusammengebaut und der Transfer der Proteine erfolgte in Transferpuffer bei 360 mA für 30 bis 60 min in einer Bio-Rad-Apparatur.

Transferpuffer	25 mM Tris 150 mM Glycin 20 % MeOH 0,2 % SDS
----------------	---

Alternativ erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran im *semidry-blot*-Verfahren. Im Wesentlichen entsprach der Aufbau dem des *wet-blot*-Verfahrens, allerdings erfolgte der Transfer bei 70 mA für 90 bis 120 min in einer Semidry-Blot-Apparatur unter Verwendung des *semidry*-Transferpuffers.

<i>semidry</i> -Transferpuffer	11 mM Tris 192 mM Glycin 16 % MeOH
--------------------------------	--

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in H<sub>2</sub>O geschwenkt, um SDS-Reste zu entfernen.

Durch eine dreiminütige Inkubation mit Ponceau S-Lösung wurde überprüft, ob die Proteine transferiert waren. Anschließend wurde die Membran für 1 h in einer Lösung aus 2 % Milchpulver in TBST geschwenkt, um verbliebene Bindeplätze für Proteine abzusättigen. Die Lösung wurde währenddessen mindestens dreimal gewechselt.

Ponceau S-Lösung	0,15 % Ponceau S 5 % HOAc
TBST	20 mM Tris/HCl pH 7,6 137 mM NaCl 0,1 % Tween 20

Die Inkubation mit dem in 2 % Milchpulver in TBST verdünnten primären Antikörper erfolgte ÜN bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur (Tabelle 4.13), nach dreimaligem zehninütigen Waschen mit TBST wurde der in 2 % Milchpulver in TBST verdünnte sekundäre Antikörper (Tabelle 4.14) auf die Membran gegeben und diese 1 bis 4 Stunden mit ihm bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut dreimal 10 min mit TBST gewaschen, bevor die Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL-Systems nach Anweisung des Herstellers durch Auflegen eines Films detektiert wurde (nach Towbin *et al.*, 1979).

Anschließend wurden die an die Membran gebundenen Antikörper ggf. durch zehninütige Inkubation mit 10 % HOAc entfernt, um nach erneutem Blockieren der freien Bindeplätze die Detektion mit einem weiteren Antikörper nach o.g. Protokoll zu ermöglichen.

Antikörper	Hersteller- bezeichnung	Verdünnung	Inkubations- dauer
mouse $\alpha$ -myc	c-Myc (9E10), sc-40	1:5000	ÜN
rabbit $\alpha$ -Clb2	Clb2 (y-180), sc-9071	1:500	ÜN
mouse $\alpha$ -Pgk1	Clone/PAD: 22C5D8	1:10.000	1 h

Tabelle 4.13: primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
goat $\alpha$ -mouse~HRPO	Dianova, Hamburg	1:10.000
goat $\alpha$ -rabbit~HRPO	Invitrogen	1:10.000

Tabelle 4.14: sekundäre Antikörper

#### 4.10.4 Herstellung eines Heferohextraktes

Für die Herstellung eines Hefe-Rohextraktes wurden in SC-Medium angezogene Kulturen von *S. cerevisiae* in der *mid-log*-Phase verwendet ( $OD_{600} = 0,6...0,8$ ). 10 bis 15 ml Kultur wurden geerntet (5804R, 4 °C, 5000 rpm, 2 min) und mit 1 ml  $KP_i$ -Puffer (50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7,0) gewaschen. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Präparation des Rohextraktes wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und in 250  $\mu$ l  $KP_1$ -Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l 1M PMSF-Lösung (1M PMSF in DMSO) und 300  $\mu$ l Glasperlen (Durchmesser 0,25 bis 0,5 mm) erfolgte der Zellaufschluss durch zehnminütiges vortexen bei 4 °C. Anschließend wurden 250  $\mu$ l  $KP_1$ -Puffer zugegeben und durch erneutes kurzes vortexen gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 4 °C, 5 min) wurden 250  $\mu$ l des Überstandes in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut 1  $\mu$ l 1 M PMSF-Lösung zugegeben. Anschließend wurde ausgefallenes DMSO abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 4 °C, 1 min) (nach Pirner und Stolz, 2006).

#### 4.10.5 Proteinbestimmung nach BRADFORD

In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurde jeweils 1 ml BRADFORD-Reagenz vorgelegt, 10  $\mu$ l Proteinlösung (BSA-Standards definierter Konzentration oder frisch hergestellter Heferohextrakt) zugegeben und durch Vortexen gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Nullwert diente dabei eine Probe, die Wasser statt Proteinlösung enthielt. Für die Quantifizierung der Proteinkonzentration in den Heferohextrakten wurde eine Referenzgerade mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration erstellt (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/ml). Gegebenenfalls wurden die Heferohextrakte mit  $KP_1$ -Puffer (50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7,0) verdünnt, um eine Messung im durch die Referenzgerade abgedeckten Absorptionsbereich zu gewährleisten (nach Bradford, 1976).

BRADFORD-Reagenz	4,8 % EtOH
	42,5 % $H_3PO_4$
	0,01 % Coomassie Brilliant Blue G-250

#### 4.10.6 $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätstest

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität erfolgte in frisch hergestellten Heferohextrakten. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden 800  $\mu$ l Z-Puffer, 200  $\mu$ l ONPG-Lösung (4 mg/ml ONPG in Z-Puffer) sowie (100-x)  $\mu$ l  $KP_1$ -Puffer (50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7,0) vorgelegt und 5 min bei 37 °C vorgewärmt. Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von x  $\mu$ l Heferohextrakt. Nach kurzem Mischen durch Vortexen wurde der Ansatz bei 37 °C inkubiert. Sobald eine Gelbfärbung einsetzte, wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 400  $\mu$ l 1 M  $Na_2CO_3$  gestoppt und die Inkubationszeit ( $\Delta t$ ) notiert. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm wurde bestimmt ( $A_{420}$ ), wobei als Nullwert eine analog behandelte Probe diente, die statt Proteinextrakt x  $\mu$ l  $KP_1$ -Puffer enthielt. Mit Hilfe der  $A_{420}$  wurde die umgesetzte ONPG-Menge in  $\mu$ mol bestimmt (Gleichung (1)) und mit dieser die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase in  $\mu$ mol Substratumsatz pro mg Proteinextrakt und min berechnet (Gleichung (2)) (nach Pirner und Stolz, 2006).

Z-Puffer	40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM KCl 1 mM MgSO <sub>4</sub> 0,27 % β-Mercaptoethanol pH 7,0
----------	---

$$n_{\text{ONPG}} = \frac{A_{420} * V}{\epsilon * d} \quad (1)$$

$n_{\text{ONPG}}$ : Stoffmenge ONPG, [ $n_{\text{ONPG}}$ ] =  $\mu\text{mol}$

$A_{420}$ : Absorption bei  $\lambda = 420 \text{ nm}$

$V$ : Endvolumen des Reaktionsansatzes,  $V = 1500 \mu\text{l}$

$\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient,  $\epsilon = 4500 \mu\text{l} \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$d$ : Schichtdicke der verwendeten Küvette,  $d = 1 \text{ cm}$

$$\text{Akt.} = \frac{n_{\text{ONPG}}}{c * x * \Delta t} \quad (2)$$

Akt.: β-Galactosidase-Aktivität, [Akt.] =  $U = \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$

$c$ : Proteinkonzentration des Rohextraktes, [ $c$ ] =  $\text{mg ml}^{-1}$

$x$ : eingesetztes Volumen Rohextrakt, [ $x$ ] =  $\text{ml}$

$\Delta t$ : Inkubationszeit, [ $\Delta t$ ] =  $\text{min}$

#### 4.10.7 Präparation von Phycocyanobilin aus *Spirulina* ssp. durch Methanolyse

Die Isolation von Phycocyanobilin aus *Spirulina* ssp. erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Jim Tepperman ([http://openwetware.org/images/2/27/Y2H\\_documentation.pdf](http://openwetware.org/images/2/27/Y2H_documentation.pdf), elektronische Publikation).

50 g *Spirulina*-Pulver wurden in 1,5 l H<sub>2</sub>O durch Rühren gelöst und anschließend abzentrifugiert (GS3, 1 h, 8000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde mit 1 % (w/v) TCA versetzt und 1 h bei 4 °C lichtgeschützt gerührt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (GS3, 10 min, 8000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Pellets auf Eis mit MeOH vier- bis fünfmal gewaschen, bis sich die Farbe des Überstandes nicht mehr änderte und die vorher grünen Pellets blau waren. Die Pellets wurden ÜN lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Pellets vereinigt, in 500 ml MeOH resuspendiert und unter Rückflusskühlung lichtgeschützt im 70 °C warmen Wasserbad ausgekocht. Anschließend wurde auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert (GS3, 20 min, 8000 rpm, 4 °C) und der Überstand durch einen Miracloth-Filter abfiltriert. Das Filtrat sowie die Pellets der Zentrifugation wurden ÜN lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt. Am dritten Tag wurden die Pellets des Vortags einer zweiten Methanolyse unterzogen und der nach dem abschließenden Zentrifugieren verbliebene Überstand wieder durch einen Miracloth-Filter abfiltriert. Das Filtrat wurde ÜN bei -20 °C aufbewahrt, am nächsten Tag wurden die Filtrate der beiden Vortage vereinigt. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wurde das MeOH lichtgeschützt auf ein Volumen von ca. 50 ml eingengt und anschließend in einen Scheidetrichter überführt, wo es mit 100 ml H<sub>2</sub>O verdünnt wurde. Aus der entstandenen Lösung wurde das Phycocyanobilin drei- bis viermal mit jeweils 50 ml CHCl<sub>3</sub> ausgeschüttelt und die CHCl<sub>3</sub>-Phasen vereinigt. Das Chloroform wurde anschließend mit Hilfe eines Rotationsverdampfers komplett abgezogen und die getrocknete PCB-Präparation mit N<sub>2</sub> überblasen, um eventuelle CHCl<sub>3</sub>-Reste zu entfernen. Abschließend wurde das getrocknete PCB in ca 7 ml DMSO aufgenommen, die entstandene PCB-Lösung wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

## 5 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Konstruktion eines *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes, der in der Lage ist, auf Basis eines durch Licht schaltbaren Promotorsystems (Shimizu-Sato *et al.*, 2002) die Expression des essentiellen, in der Mitose aktiven Proteins Cdc20 zu steuern. Für die potentielle Anwendung dieses Promotorsystems als Angriffspunkt für eine gezielte externe Zellzyklussteuerung müssen dabei folgende Randbedingungen beachtet werden: einerseits ist für eine einfache Handhabung und genetische Manipulation des Stammes das Vorhandensein einer lichtunabhängig exprimierten Cdc20-Variante, die ein generelles Wachstum des Stammes ermöglicht, nötig, andererseits ist für eine gezielte lichtgesteuerten Zellzykluskontrolle ein Abschalten der lichtunabhängigen Cdc20-Version unverzichtbar. Eine in der Zellbiologie oft verwendete Methode zur Umsetzung dieser scheinbar konträren Bedingungen ist die Arbeit mit konditionellen Mutanten. Es gibt temperatursensitive *cdc20*-Mutanten (*cdc20-1*, Schwab *et al.*, 1997), die bei permissiver Temperatur (25 °C) wachsen können, bei restriktiver Temperatur (37 °C) jedoch aufgrund der fehlenden Cdc20-Aktivität in der Mitose arretieren. Diese scheinen eine geeignete Grundlage für die Herstellung des gewünschten Stammes zu sein. Zur Etablierung des lichtabhängigen Expressionssystems müssen in diesen Mutanten allerdings zunächst die Gene *GAL4* und *GAL80* deletiert werden. Zusätzlich müssen die Auxotrophiemarker so angepasst werden, dass die für die Arbeit mit dem lichtschtbaren System notwendigen, plasmidcodierten Komponenten eingeschleust werden können. Dazu zählen die *Yeast-Two-Hybrid*-basierten Konstrukte zur Expression des lichtkontrollierbaren Transkriptionssystems sowie eine unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors stehende Wildtyp-Version von *CDC20*. Vorzugsweise ist diese mit einem Epitop versehen, das eine gezielte Detektion des lichtabhängig exprimierten Cdc20 ermöglicht. Abschließend sollten mit dem so konstruierten *S. cerevisiae*-Stamm Versuche zur externen, lichtabhängigen Zellzyklussteuerung durchgeführt werden.

Um bei Experimenten zur lichtabhängigen Expression die Kulturen gezielt bestimmten Wellenlängen aussetzen zu können, müssen die dafür nötigen Inkubationsschritte lichtgeschützt durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde eine lichtundurchlässige *Blackbox* entwickelt, die eine Anzucht der Kulturen auf dem Schüttler ohne störenden Lichteinfall von außen ermöglicht (siehe Abbildung 4.1, Seite 40).

## 5.1 Herstellung eines temperatursensitiven Hefestammes mit der Fähigkeit zur lichtabhängigen *Cdc20*-Expression

### 5.1.1 Herstellung einer für die Arbeit mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System geeigneten temperatursensitiven *cdc20*-Mutante

Das 2002 von Shimizu-Sato *et al.* publizierte System zur lichtgesteuerten Genexpression basiert auf dem *Yeast-Two-Hybrid*-System. Hierbei wird das lichtabhängig zu exprimierende Gen unter die Kontrolle eines *GAL1*-Promotors gestellt. Seine Transkription wird über die lichtabhängig induzierte Interaktion der *Yeast-Two-Hybrid*-Komponenten PhyB(NT)-GBD und PIF3-GAD reguliert, welche zur Herstellung eines Komplexes mit Gal4-Transkriptionsaktivatorfunktion führt. Die Arbeit mit diesem System ist nur in einem *S. cerevisiae*-Stamm möglich, bei dem das für den gemeinen Transkriptionsaktivator codierende *GAL4* sowie das *GAL1*-Repressorgen *GAL80* deletiert sind, um eine Beeinflussung der Transkription durch die natürlichen Transkriptionsfaktoren Gal4 und Gal80 zu unterbinden. Aus diesem Grund sollten in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante *GAL4* und *GAL80* mit Hilfe der Methode von Güldener *et al.* (2002) deletiert werden.

Zunächst wurde im Stamm W267 (Mata, *cdc20-1, ade2-1, can1-100, his3-11, leu2-3,112, ura3-1*; Schwab *et al.*, 1997) der offene Leserahmen von *GAL80* durch eine *loxP-kanMX-loxP*-Kassette ersetzt, die mit Hilfe der Oligonukleotide as3 und as4 und pUG6 (Güldener *et al.*, 2002) als Matrize PCR-basiert hergestellt worden war. Die korrekte Integration des Konstrukts ins Genom wurde durch Kontroll-PCRs mit genomischer DNA als Vorlage und den Oligonukleotiden as6 und as7 bzw. as6 und as8 überprüft. Der so entstandene Stamm wird als YAS6 bezeichnet.

Stamm	Genotyp
YAS6	Mata <i>cdc20-1 gal80ΔkanMX ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 can1-100</i>

Für die Arbeit mit den *Yeast-Two-Hybrid*-basierten Plasmiden (Shimizu-Sato *et al.*, 2002) wird zur Kontrolle der Transformation mit dem Plasmid PhyB(NT)-GBD *TRP1* als Auxotrophiemarker benötigt. YAS6 ist prototroph bezüglich Tryptophan und wurde deshalb mit dem Wildtyp-Stamm W303-1B (MAT $\alpha$  *ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*) gekreuzt, um das Allel *trp1-1* einzuführen. Der entstandene diploide Stamm wurde anschließend sporuliert, die Tetraden

vereinzelt und die neu entstandenen haploiden Stämme phänotypisch charakterisiert. Der als YAS29 bezeichnete Stamm hat den gewünschten Genotyp.

Stamm	Genotyp
YAS29	Mat $\alpha$ <i>cdc20-1 gal80<math>\Delta</math>kanMX ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>

In YAS29 wurde anschließend mit Hilfe der Cre-Rekombinase unter Verwendung von pSH62 (Güldener *et al.*, 2002) die *kanMX*-Kassette entfernt. Dies wurde sowohl durch eine Kontroll-PCR mit den Oligonukleotiden as6 und as8 als auch phänotypisch durch den Verlust der Geneticin-Resistenz bestätigt. Der nach mitotischem Verlust des Cre-Rekombinase-Plasmids pSH62 entstandene Stamm wird als YAS37 bezeichnet.

Stamm	Genotyp
YAS37	Mat $\alpha$ <i>cdc20-1 gal80<math>\Delta</math>loxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>

Zuletzt wurde in YAS37 der offene Leserahmen von *GAL4* durch eine *loxP-kanMX-loxP*-Kassette ersetzt, die mit Hilfe der Oligonukleotide as1 und as2 und pUG6 (Güldener *et al.*, 2002) als Matrize PCR-basiert hergestellt wurde. Die korrekte Integration des Deletionsfragments ins Genom wurde durch Kontroll-PCRs mit genomischer DNA als Vorlage und den Oligonukleotiden as26 und as27 bzw. as25 und as28 überprüft. Der so entstandene Stamm wird als YAS45 bezeichnet.

Stamm	Genotyp
YAS45	Mat $\alpha$ <i>cdc20-1 gal4<math>\Delta</math>kanMX gal80<math>\Delta</math>loxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>

Mit YAS45 war es gelungen, eine temperatursensitive *cdc20*-Mutante herzustellen, welche die für die Arbeit mit dem lichtinduzierten Transkriptionssystem gestellten Anforderungen erfüllt.

### 5.1.2 Herstellung eines Plasmids zur Expression von *4myc::CDC20* unter Kontrolle des *GALI*-Promotors

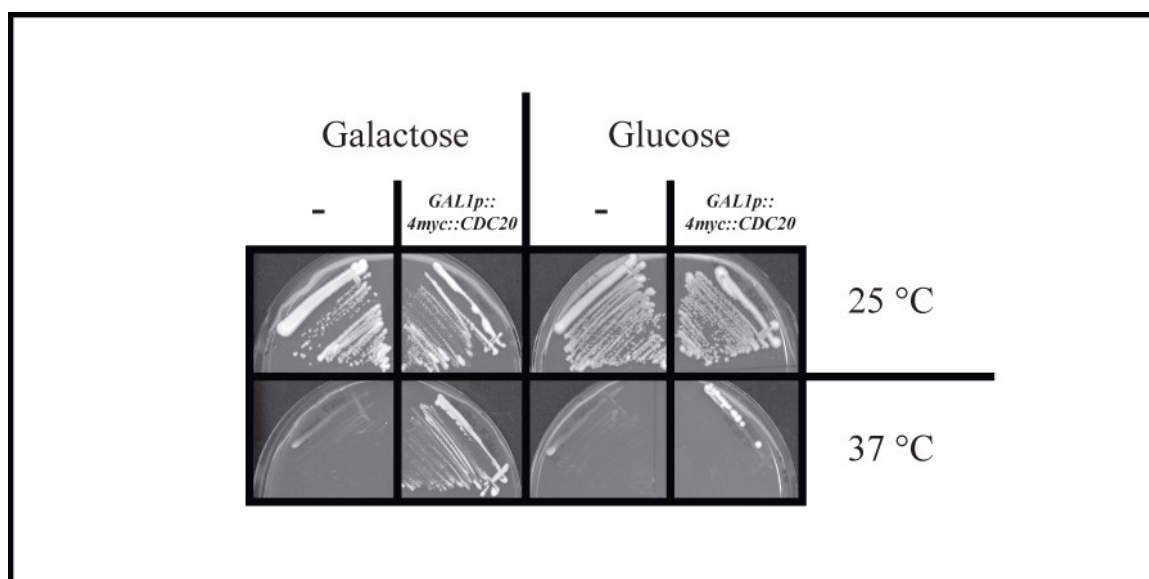
Die 2002 von Shimizu-Sato *et al.* publizierte Methode zur lichtschtbaren Expression eines Zielgens beruht auf einem *Yeast-Two-Hybrid*-System. Durch Lichteinwirkung kommt es zur Ausbildung eines Transkriptionsaktivatorkomplexes, der die Transkription unter der Kontrolle des



*GALI*-Promotors stehender Gene steuert. Um dieses System zur lichtgesteuerten Expression von *CDC20* anwenden zu können, muss das *CDC20*-Gen unter die Kontrolle des *GALI*-Promotors gestellt werden. Da *CDC20* ein essentielles Gen ist, ist ein simpler Promotoraustausch im Genom nicht möglich. Um die Zellen auch ohne Lichtsteuerung kultivieren zu können, war die Anwesenheit einer konditionellen Mutantenversion des *CDC20*-Gens erforderlich. Zum Einsatz kam das temperatursensitive *cdc20-1*-Allel, das am gemeinen *CDC20*-Ort lokalisiert war und damit unter der Kontrolle des nativen *CDC20*-Promotors stand. Zusätzlich dazu sollte plasmidcodiert ein unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors stehendes *CDC20*-Wildtypallel eingeschleust werden, das später nach Umschalten auf restriktive Bedingungen die Proliferation der Zellen in Abhängigkeit von lichtgesteuert exprimiertem Cdc20 erlaubt. Das unter dem *GALI*-Promotor stehende *CDC20*-Allel sollte zur immunhistochemischen Verfolgung zusätzlich mit einem 4myc-Immunoepitop markiert sein. Als Träger für dieses Konstrukt wurde ein *CEN*-Plasmid gewählt, da diese im Zuge der Zellteilung wie ein Chromosom repliziert und auf die Tochterzellen verteilt werden. Hierzu wurden das leere *CEN*-Plasmid pRS316 (Sikorski und Hieter, 1989) sowie das integrative Plasmid *pRS306P<sub>GAL</sub>-4mycCDC20* (Pan und Chen, 2004) mit BglII geschnitten, die gewünschten Fragmente ligiert und das entstandene, neu klonierte Plasmid pAS8 genannt (Abbildung 4.2, Seite 44).

Plasmid	Relevante Sequenzen
pAS8	<i>URA3, CEN, GAL1p::4myc::CDC20, Amp<sup>R</sup></i>

Um zu überprüfen, ob das Konstrukt bei seiner Expression in der Lage ist, den temperatursensitiven *cdc20*-Phänotyp des Stammes W267 bei 37 °C zu komplementieren, wurde W267 mit pAS8 transformiert und das Wachstum des resultierenden Stammes in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle sowie der Temperatur untersucht. In Anwesenheit von Glucose ist die Transkription eines unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors stehenden Gens reprimiert, während sie in Abwesenheit von Glucose stattfindet. Die parallele Durchführung des Versuchs mit dem leeren Plasmid pRS316 diente dabei als Kontrolle (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1: Die Expression von  $4^{myc}$ Cdc20 komplementiert den *cdc20-1*-Phänotyp.** Der Stamm W267 (*cdc20-1*) wurde mit pAS8 (*GAL1p::4myc::CDC20*) oder pRS316 (-) transformiert und anschließend das Wachstum in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle (Galactose bzw. Glucose) sowie der Inkubationstemperatur (25 bzw. 37 °C) untersucht.

Bei permissiver Temperatur war generell ein Wachstum zu verzeichnen, da die unter diesen Bedingungen exprimierte Variante des *cdc20-1*-Allels den kompletten Vollzug der Mitose gestattet. Bei restriktiver Temperatur kommt es in W267 bedingt durch das *cdc20-1*-Allel zu einem mitotischen Arrest. Steht dem Stamm codiert durch pAS8 eine unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors stehende Wildtyp-Variante von *CDC20* zur Verfügung, so kann W267 bei restriktiver Temperatur wachsen, wenn diese exprimiert wird. Dies ist der Fall, wenn die Zellen in Abwesenheit von Glucose inkubiert werden und somit der *GAL1*-Promotor transkriptionsaktiv ist. Das Experiment zeigt, dass pAS8 in der Lage ist, den temperatursensitiven *cdc20*-Phänotyp von W267 zu komplementieren. Verantwortlich hierfür ist die durch den *GAL1*-Promotor gesteuerte Expression von *4myc::CDC20*. Mit der erfolgreichen Klonierung von pAS8 wurde ein wichtiger Schritt für die lichtabhängige Expression von Cdc20 vollzogen.

### 5.1.3 Herstellung eines temperatursensitiven Hefestammes mit der Fähigkeit zur lichtabhängigen Cdc20-Expression

Die für eine erfolgreiche Nutzung des lichtschaltbaren Promotorsystems (Shimizu-Sato *et al.*, 2002) für die Zellzyklussteuerung in *S. cerevisiae* notwendigen Voraussetzungen waren im Rahmen der oben genannten Stamm- und Plasmidkonstruktionen geschaffen worden. Abschließend musste ein

Hefestamm hergestellt werden, der alle für die lichtgesteuerte Cdc20-Expression notwendigen Komponenten in sich vereint. Dazu wurde die für *Yeast-Two-Hybrid*-Anwendungen geeignete, temperatursensitive *cdc20*-Mutante YAS45 mit den für die lichtabhängige Genexpression benötigten Plasmiden PhyB(NT)-GBD ( $2\mu$ , *TRP1*) und PIF3-GAD ( $2\mu$ , *LEU2*; beide Shimizu-Sato *et al.*, 2002) nach der Methode von Gietz und Woods (2002) transformiert. Parallel wurde das für die lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 benötigte Plasmid pAS8 mit eingeschleust. Der so entstandene Hefestamm wird als YAS51 bezeichnet. In einem zweiten, als Negativkontrolle dienenden Ansatz wurde zusätzlich zu den *Two-Hybrid*-Plasmiden das leere Plasmid pRS316 (*URA3*, *CEN*; Sikorski und Hieter, 1989) transformiert. Bei dem so entstandenen Stamm handelt es sich um YAS50.

In beiden Fällen dienten die Auxotrophiemarker *TRP1*, *LEU2* und *URA3* für die Selektion der korrekten Transformanten. Diese wurden aufgrund des *cdc20-1*-Allels in YAS45 bei permissiver Temperatur (25 °C) angezogen.

Stamm	Relevanter Genotyp	Plasmide
YAS50	<i>cdc20-1 gal4ΔkanMX gal80ΔloxP</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pRS316
YAS51	<i>cdc20-1 gal4ΔkanMX gal80ΔloxP</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS8

Damit war es gelungen, den für die lichtabhängige Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante benötigten *S. cerevisiae*-Stamm (YAS51) sowie einen entsprechenden Kontrollstamm (YAS50) herzustellen. Als Ergebnis dieser Vorarbeiten lag somit ein *S. cerevisiae*-Stamm vor, der theoretisch die Voraussetzungen für eine erste praktische Anwendung im Rahmen der Zellzyklussteuerung des bereits 2002 von Shimizu-Sato *et al.* publizierten lichtschtbaren Promotorsystems erfüllt.

## 5.2 *Versuche zur lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven cdc20-Mutante bei permissiver Temperatur*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die im vorangegangenen Kapitel ausführlich erläuterten temperatursensitiven *cdc20*-Mutanten YAS50 und YAS51 hergestellt. Während YAS50 als Negativkontrolle dient, sollte YAS51 in der Lage sein, unter bestimmten Voraussetzungen <sup>4myc</sup>Cdc20 zu exprimieren. Um die Transkription unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors stehender Gene und

damit *4myc::CDC20* zu induzieren, ist eine Interaktion der N-terminalen Domäne des Phytochrom B (PhyB(NT)) mit dem Phytochrominteraktionsfaktor 3 (PIF3) Bedingung. Sie werden durch die Plasmide PhyB(NT)-GBD und PIF3-GAD codiert und, wie es beim *Yeast-Two-Hybrid*-System üblich ist, als Hybridproteine mit der Binde- (GBD) bzw. der Aktivierungsdomäne (GAD) des Transkriptionsfaktors Gal4 synthetisiert. Zur Ausbildung einer aktiven, lichtinduziert die Interaktion mit PIF3 ermöglichenden N-Terminalen Domäne von PhyB wird das Chromophor Phycocyanobilin (PCB) für die Lichtabsorption benötigt. Da *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist, dieses endogen zu synthetisieren, muss es aus *Spirulina ssp.* isoliert und dem Anzuchtmedium zugesetzt werden.

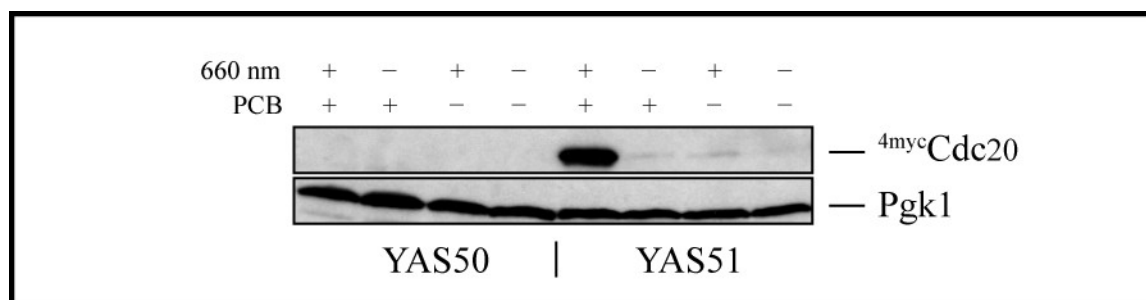
Nun sollte zunächst überprüft werden, ob eine lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 in temperatursensitiven *cdc20*-Mutanten möglich ist. Diese Versuche mussten bei permissiver Temperatur durchgeführt werden, um auch den Zellen ein Wachstum zu ermöglichen, die nicht in der Lage sind, <sup>4myc</sup>CDC20 lichtabhängig zu exprimieren.

### **5.2.1 Lichtabhängige <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante**

Als erstes sollte überprüft werden, ob der hergestellte Stamm YAS51 lichtabhängig <sup>4myc</sup>Cdc20 exprimiert. Für die Induktion der Expression des *GAL1*-Promotor-kontrollierten <sup>4myc</sup>Cdc20-Proteins ist die Interaktion von PhyB(NT) mit PIF3 nötig. Diese kann allerdings nur eingegangen werden, wenn das Chromophor PCB in das PhyB-Fragment eingebaut wird und PhyB(NT) infolge der Bestrahlung mit rotem Licht (660 nm) eine Konformationsänderung erfährt, die die Bindung von PIF3 ermöglicht. Sind beide Bedingungen in YAS51 erfüllt, sollte die lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 erfolgen. YAS50, der anstelle des *GAL1p::4myc::CDC20*-Vektors nur das leere Plasmid pRS316 trägt, diente dabei als Negativkontrolle. Bei einer erfolgreichen lichtabhängigen Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 sollte dieses in einem Western Blot durch die Detektion des 4myc-Epitops nachgewiesen werden können.

Kulturen beider Stämme wurden bei permissiver Temperatur auf eine Zelldichte von  $OD_{600} = 0,2$  in 20 ml SC-Medium angeimpft, die Kultur mit 60 µl PCB-Lösung versetzt und mit Licht von 660 nm Wellenlänge beleuchtet. Zur Kontrolle wurden jeweils Zellen untersucht, denen kein PCB zugesetzt worden war oder die nicht mit Rotlicht bestrahlt wurden. Nach 5 h Inkubation wurden 5 ODZ geerntet und durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für die

Detektion mittels Western Blot aufbereitet. Die Verwendung eines gegen das 4myc-Epitop gerichteten Antikörpers stellte dabei sicher, dass nur die lichtabhängig exprimierte Cdc20-Version detektiert wird. Pgk1, ein Haushaltsprotein aus dem Glucosestoffwechsel von *S. cerevisiae*, diente als Ladekontrolle (Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.2:** <sup>4myc</sup>Cdc20 wird in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante bei permissiver Temperatur lichtabhängig exprimiert. Flüssigkulturen von YAS50 (*cdc20-1*; PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pRS316) bzw. YAS51 (*cdc20-1*; PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS8 [*GAL1p::4myc::CDC20*]) wurden mit (+) oder ohne (-) Zugabe von Chromophor (PCB) bei 25 °C inkubiert und dabei mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet (+) oder im Dunkeln gelassen (-). In der logarithmischen Wachstumsphase wurde von jedem Ansatz eine identische Zellmenge (5 ODZ) durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot aufbereitet. Die Verwendung eines 1:5000 verdünnten, gegen das 4myc-Epitop gerichteten Antikörpers stellte dabei sicher, dass nur die lichtabhängig exprimierte Cdc20-Version detektiert wird. Als Ladekontrolle wurde ein 1:10000 verdünnter, gegen Pgk1 gerichteter Antikörper verwendet.

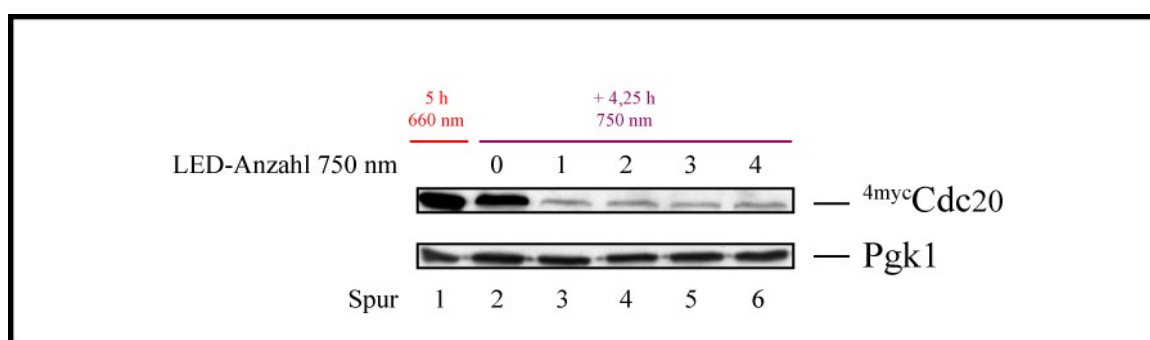
Bei Zusatz von PCB und zusätzlicher Bestrahlung mit Rotlicht trat im Teststamm YAS51 erwartungsgemäß eine klare Expression des <sup>4myc</sup>Cdc20-Proteins auf. Unter allen anderen Bedingungen (keine PCB-Zugabe, keine Bestrahlung, Verwendung des Kontrollstamms YAS50 ohne *4myc::CDC20*-Allel) konnte kein <sup>4myc</sup>Cdc20-Signal nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Cdc20 in YAS51-Zellen PCB- und lichtabhängig exprimiert wird und somit das lichtgesteuerte Cdc20-Expressionssystem prinzipiell funktioniert.

### 5.2.2 Aufhebung der lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante

Nachdem <sup>4myc</sup>Cdc20 in YAS51 erfolgreich lichtabhängig exprimiert werden kann, sollte untersucht werden, ob diese Expression anschließend lichtstimuliert wieder aufgehoben werden kann. Durch Bestrahlung mit Infrarotlicht (750 nm) wird im PhyB-Fragment eine Konformationsänderung

ausgelöst und damit die Bindung an PIF3 aufgehoben. Somit zerfällt der Transkriptionsaktivator-Komplex und die *GALI*-Promotor-kontrollierte Transkription kommt zum Erliegen. Da Cdc20 im Laufe des Zellzyklus proteolytisch abgebaut wird, sollte der durch eine Infrarot-Bestrahlung induzierte Transkriptionsstop dazu führen, dass <sup>4myc</sup>Cdc20 nicht länger auf Proteinebene nachweisbar ist.

Eine YAS51-Kultur wurde bei permissiver Temperatur (25 °C) auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,2 in 60 ml SC-Medium angeimpft, mit 150 µl PCB-Lösung versetzt und mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet. Nach 5 h Inkubation wurde die Kultur geteilt: 10 ml wurden entnommen und jeweils 10 ml wurden mit 0 bis 4 LEDs einer Wellenlänge von 750 nm für 4,25 h beleuchtet, um in den Zellen die lichtgesteuerte Transkription zu stoppen und bisher gebildetes <sup>4myc</sup>Cdc20 proteolytisch abzubauen. Abschließend wurden alle Proben durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen zur Analyse mittels Western Blot aufbereitet (Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3: Infrarot-Beleuchtung führt zur Aufhebung der <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in YAS51.** Eine Flüssigkultur von YAS51 wurde unter Zugabe von PCB bei permissiver Temperatur (25 °C) 5 h mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet, um <sup>4myc</sup>Cdc20 zu exprimieren (Spur 1). Anschließend wurde die Kultur geteilt und mit 0, 1, 2, 3 oder 4 Infrarot-LEDs für weitere 4,25 h beleuchtet (Spur 2-6). Aus allen Ansätzen wurden identische Zellmengen (5 ODZ / 100 µl SDS-Probenpuffer) entnommen und durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot aufbereitet (verwendete Antikörper siehe Abb. 5.2).

Bei Beleuchtung mit Infrarotlicht (750 nm) kommt es zu einer deutlichen Repression der <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in YAS51. Somit reagiert das System bezüglich der Abschaltbarkeit der Expression wie erwartet. Dabei spielt die verwendete Lichtmenge keine Rolle – in allen beleuchteten Proben wird ein schwaches Restsignal gefunden, dessen Intensität nicht durch die Verwendung mehrerer LEDs abgeschwächt werden kann.

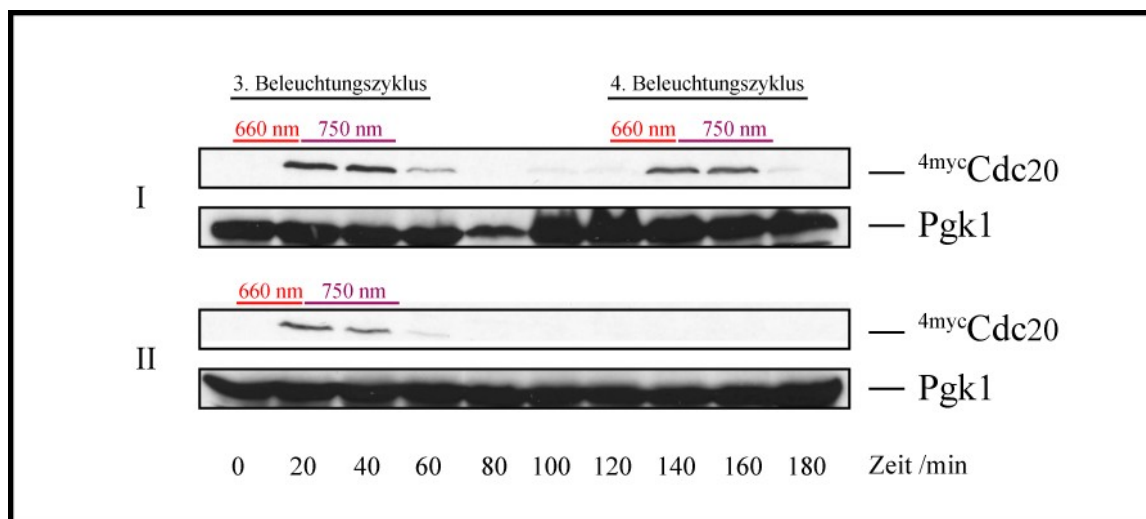
### 5.2.3 Zyklische lichtgesteuerte <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in einer temperatur-sensitiven *cdc20*-Mutante bei permissiver Temperatur

Die angestrebte Anwendung der lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression ist die externe lichtabhängige Steuerung des Zellzyklus zur Synchronisierung einer *S. cerevisiae*-Kultur. Wie bereits erwähnt, soll dabei die Verwendung einer konditionellen Mutante die Kultivierung der Zellen unabhängig von der Lichtregulation ermöglichen und gleichzeitig die Perspektive bieten, das lichtabhängige Expressionssystem unter restriktiven Bedingungen zu nutzen. Eine Grundvoraussetzung dafür ist die Möglichkeit, die lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 wiederholt simultan zum Zellzyklus induzieren zu können. *CDC20* ist ein essentielles Gen – wird es nicht exprimiert, so durchlaufen die Zellen den Zellzyklus nicht vollständig und arretieren in der Mitose. Wird <sup>4myc</sup>Cdc20 in den arretierten Zellen zum richtigen Zeitpunkt lichtinduziert exprimiert, ist zu erwarten, dass die Zellen die Proliferation wieder aufnehmen und den Zellzyklus synchron fortsetzen. Zunächst sollte bei permissiver Temperatur, d.h. wenn die Proliferation nicht von der lichtgesteuerten <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression abhängt, überprüft werden, ob die wiederholte lichtabhängige <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in einer YAS51-Kultur überhaupt möglich ist.

Hierfür wurden 2 Kulturen von YAS51 bei permissiver Temperatur (25 °C) auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,4 in 43 ml SC-Medium angeimpft und mit 65 µl PCB-Lösung versetzt. Nach einer initialen Inkubation im Dunkeln für 140 Minuten wurde einer der Kolben (Ansatz I) viermal dem folgenden Beleuchtungsrhythmus unterzogen, um die Transkription von *GAL1p::4myc::CDC20* zyklisch zu aktivieren und zu stoppen:

1. 20 min 660 nm
2. 30 min 750 nm
3. 70 min dunkel

Der zweite Kolben (Ansatz II) wurde nur einmal, und zwar während des 3. Zyklus, beleuchtet. Mit Beginn des 3. Zyklus wurden alle 20 min jeweils 4 ml entnommen und 3 ml davon durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen mit 70 µl SDS-Probenpuffer für die Analyse mittels Western Blot aufbereitet, um die Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 über die Zeit verfolgen zu können (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4:**  $4^{\text{myc}}$ Cdc20 wird in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante bei permissiver Temperatur lichtabhängig zyklisch exprimiert. Flüssigkulturen von YAS51 wurden unter Zusatz von PCB bei 25 °C inkubiert und 4x (Ansatz I) oder 1x (Ansatz II, als Kontrolle, nur während des 3. Beleuchtungszyklus) alternierend mit Licht einer Wellenlänge von 660 oder 750 nm beleuchtet. Ab Beginn des 3. Beleuchtungszyklus wurden aus allen Ansätzen identische Zellmengen entnommen und durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot aufbereitet (verwendete Antikörper siehe Abb. 5.2).

In beiden Ansätzen ist  $4^{\text{myc}}$ Cdc20 nach Beleuchtung der YAS51-Kulturen mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm detektierbar. Wenn die Kulturen im weiteren Zeitverlauf einer Beleuchtungsserie Licht einer Wellenlänge von 750 nm ausgesetzt wurden, wurde das  $4^{\text{myc}}$ Cdc20-Signal vollständig neutralisiert. Im Ansatz I ist nach der 3. Beleuchtungsserie durch Lichtinduktion ein klarer 4. Expressionszyklus durchführbar. Zwischen den Zyklen ist kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten erkennbar. Die Expressionsmuster im 3. Beleuchtungszyklus (3. Beleuchtung bei Ansatz I gegenüber 1. Beleuchtung bei Ansatz II) zeigen keine bedeutsame Differenz. Das Durchlaufen zweier vorgelagerter Zyklen in Ansatz I hat offensichtlich keinen Einfluss auf den Ablauf der Expression im 3. Beleuchtungszyklus. Im 4. Zyklus wird wie erwartet  $4^{\text{myc}}$ Cdc20 nur exprimiert, wenn die Zellen Licht einer Wellenlänge von 660 nm ausgesetzt waren. Das Experiment zeigt klar, dass  $4^{\text{myc}}$ Cdc20 in YAS51-Zellen wiederholt zyklisch lichtabhängig exprimiert werden kann. Damit sind die Grundvoraussetzungen für die Anwendung von YAS51 als Stamm, dessen Zellzyklusprogression extern über Licht gesteuert werden kann, geschaffen.



### **5.3 Anwendbarkeit der zyklischen lichtgesteuerten <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante**

Auf längere Sicht könnte die Etablierung der lichtgesteuerten Cdc20-Expression zu einem innovativen minimal-invasiven Werkzeug zur Synchronisation wachsender Populationen von *S. cerevisiae* werden. Unter natürlichen Bedingungen wachsen Populationen von *S. cerevisiae* asynchron, da sich dieser Organismus durch Knospung vegetativ vermehrt und die neuen Tochterzellen zunächst auf die Größe von Mutterzellen heranwachsen müssen, bevor sie selbst durch Knospung die nächste Generation Tochterzellen hervorbringen können. Der damit verbundene Zeitaufwand führt dazu, dass sich die Zellen einer Population nicht zeitgleich teilen. Die Arbeit mit einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante sollte es theoretisch ermöglichen, dass alle Zellen einer Population bei restriktiver Temperatur in der Mitose arretieren und synchron nach Induktion der lichtgesteuerten Cdc20-Variante die Mitose beenden.

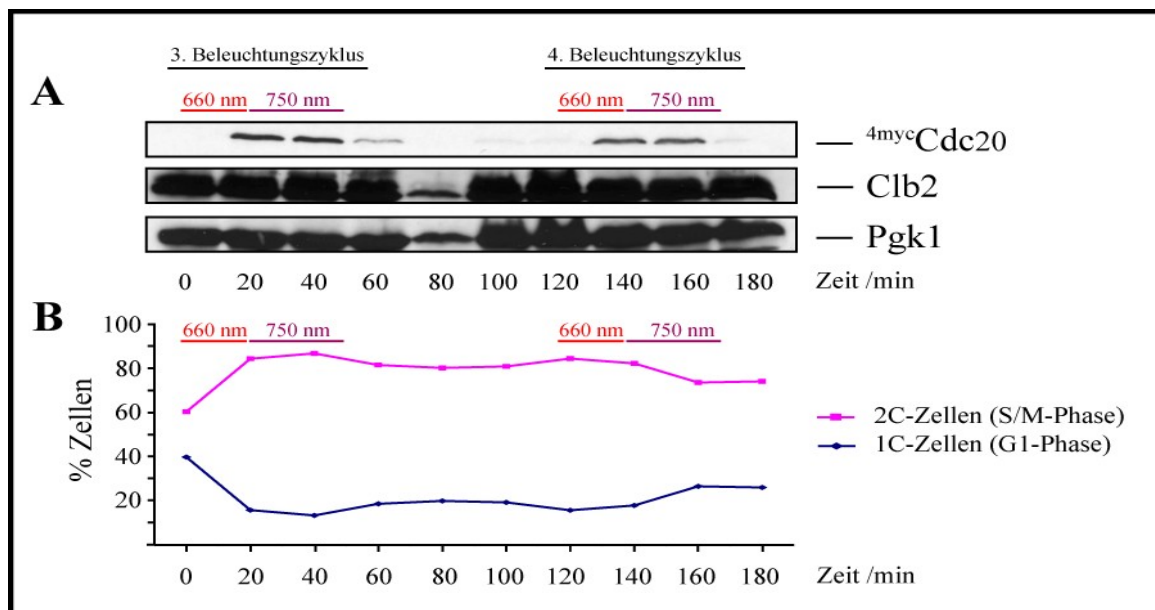
#### **5.3.1 Verteilung der Population über die Zellzyklusphasen bei permissiver Temperatur**

Wie bereits erwähnt, müssten die Zellen theoretisch für eine erfolgreiche Synchronisierung der Population ausschließlich auf die lichtabhängig exprimierte Cdc20-Variante angewiesen sein, um zeitgleich in allen Zellen die Beendigung der Mitose lichtgesteuert induzieren zu können. Um diese Annahme in der Praxis zu analysieren sollte zunächst überprüft werden, ob die im vorangegangenen Kapitel (siehe Kapitel 5.2.3) gezeigte zyklische Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 bei permissiver Temperatur wie erwartet nicht mit einer Synchronisierung der Zellkultur einhergeht. Hierfür sollten neben dem lichtabhängig exprimierten <sup>4myc</sup>Cdc20 auch die Expression von Clb2, einem G2/M-Cyclin, im Zeitverlauf im Western Blot verfolgt und der DNA-Gehalt der Proben durchflusszytometrisch mittels DAPI-Färbung bestimmt werden.

Eine Kultur von YAS51 wurde bei permissiver Temperatur (25 °C) auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,4 in 43 ml SC-Medium angeimpft und mit 65 µl PCB-Lösung versetzt. Nach einer initialen Inkubation im Dunkeln für 140 Minuten wurde der Kolben viermal dem folgenden Beleuchtungsrhythmus unterzogen, um die Transkription von *GAL1p::4myc::CDC20* zyklisch zu aktivieren und zu stoppen:

1. 20 min 660 nm
2. 30 min 750 nm
3. 70 min dunkel

Mit Beginn des 3. Zyklus wurden alle 20 min jeweils identische Zellmengen (ca. 4 ODZ) entnommen und 75 % davon durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen mit 70 µl SDS-Probenpuffer für die Analyse mittels Western Blot aufbereitet, um die Expression von <sup>4</sup>mycCdc20 und Clb2 über die Zeit verfolgen zu können. Clb2 wurde mit Hilfe eines gegen seinen N-Terminus gerichteten Antikörpers detektiert (Abbildung 5.5, A). Die verbliebenen Zellen (25 %) wurden Ethanol-fixiert und ihr DNA-Gehalt mittels DAPI-Färbung durchflusszytometrisch im Rahmen einer Kooperationsarbeit von Andrea Focke am MPI Magdeburg bestimmt (Abbildung 5.5, B).



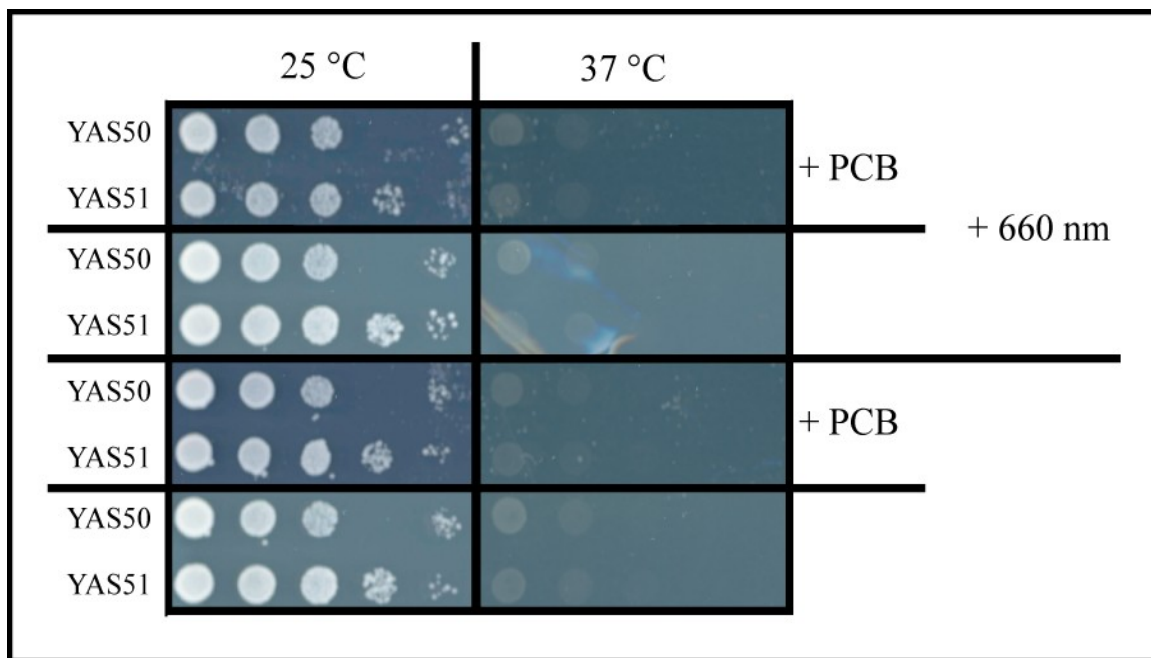
**Abbildung 5.5:** Die zyklische lichtgesteuerte <sup>4</sup>mycCdc20-Expression in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante führt bei permissiver Temperatur nicht zu einer Synchronisierung der Zellkultur. **A.** Flüssigkulturen von YAS51 wurden unter Zusatz von PCB bei 25 °C inkubiert und 4x alternierend mit Licht einer Wellenlänge von 660 bzw. 750 nm beleuchtet. Ab Beginn des 3. Beleuchtungszyklus wurden alle 20 Minuten aus allen Ansätzen identische Zellmengen entnommen und durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot aufbereitet. Clb2 wurde durch einen 1:500 verdünnten, gegen den N-Terminus von Clb2 gerichteten Antikörper detektiert (sonstige verwendete Antikörper siehe Abb. 5.2). **B.** Parallel entnommene Proben zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurden Ethanol-fixiert und mit 1 µg DAPI gefärbt, um die Verteilung der Kultur über die Zellzyklusphasen (G1 bzw. S/M) zu bestimmen (Daten: Andrea Focke, MPI Magdeburg).

Während <sup>4myc</sup>Cdc20 in diesem Versuch zyklisch in Abhängigkeit von der Beleuchtung detektiert werden kann, ist Clb2 über alle Proben gleich verteilt. Die Bestimmung der Verteilung der Population über die Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalts lässt keine signifikanten lichtabhängigen Schwankungen erkennen. Somit ist eine zyklische Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 bei permissiver Temperatur erwartungsgemäß nicht ausreichend, um eine Synchronisation der Zellkulturen auszulösen.

### **5.3.2 Verhalten der temperatursensitiven *cdc20*-Mutante mit der Fähigkeit zur lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression bei restriktiver Temperatur**

Zukünftig könnte die Expression der lichtabhängig induzierten Cdc20-Version eine externe Zellzyklussteuerung ermöglichen. Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die zyklische lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 bei permissiver Temperatur nicht ausreicht, um die Vollendung der Mitose zeitgleich in allen Zellen einer Population zu induzieren. Die Aktivität des bei permissiver Temperatur im normalen Rhythmus exprimierten gemeinen Cdc20<sup>ts</sup>-Proteins, welches durch das *cdc20-1*-Allel codiert wird, ermöglicht den Zellen in diesem Fall lichtunabhängig die Mitose komplett zu durchlaufen. Bei restriktiver Temperatur sollte es nicht aktiv sein und der Stamm somit die Mitose nur durchlaufen können, wenn das lichtgesteuerte <sup>4myc</sup>Cdc20 seine Funktion übernimmt. Um erste Hinweise über die Funktionalität des lichtinduzierten <sup>4myc</sup>Cdc20-Proteins bei restriktiver Temperatur zu erhalten, sollte zunächst der bei permissiver Temperatur erfolgreiche Versuch zur zyklischen lichtgesteuerten <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression bei restriktiver Temperatur (37 °C) durchgeführt werden. Dabei zeigte sich, dass YAS51-Zellen bei restriktiver Temperatur trotz einer zyklischen Beleuchtung mit 660 nm wie der *cdc20-1*-Ausgangsstamm YAS45 in der Mitose arretieren und somit bei 37 °C nicht über einen längeren Zeitraum kultivierbar sind (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen eines Wachstumstests auf festem Nährboden sollte diese Beobachtung bestätigt werden. Hierzu wurden Verdünnungsreihen von YAS50 und YAS51 auf SD-Platten ausgebracht, denen 0 bzw. 35 µl PCB-Lösung zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte für 4 Tage bei permissiver (25 °C) oder restriktiver (37 °C) Temperatur, wobei die Platten entweder dunkel gelagert wurden oder alle 3,5 h für 30 min mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet wurden (Abb. 5.6).



**Abbildung 5.6: YAS50 und YAS51 wachsen trotz Beleuchtung mit 660 nm und Chromophorzugabe nicht bei restriktiver Temperatur.** Verdünnungsreihen mit jeweils identischen Zellkonzentrationen von YAS50 sowie YAS51 wurden auf feste SD-Nährböden ausgebracht, denen gegebenenfalls 35 µl PCB-Lösung zugesetzt wurde (+ PCB). Die Inkubation erfolgte 4 Tage bei permissiver (25 °C) bzw. restriktiver (37 °C) Temperatur im Dunkeln oder unter Beleuchtung mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm alle 3,5 h für 30 min (+ 660 nm).

Beide Stämme können unabhängig von weiteren Randbedingungen bei permissiver Temperatur stets wachsen. Bei restriktiver Temperatur kann kein Wachstum verzeichnet werden, selbst wenn YAS51 unter Zugabe des Chromophors PCB inkubiert und dabei regelmäßig mit der das lichtsteuerbare Promotorsystem aktivierenden Wellenlänge von 660 nm beleuchtet wird.

## **5.4 Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des lichtschtbaren Yeast-Two-Hybrid-Systems**

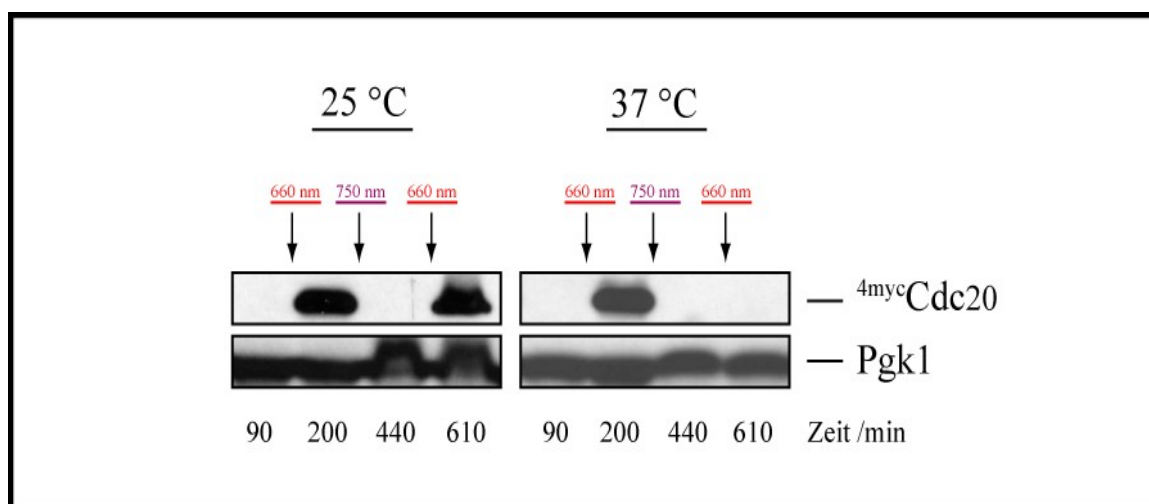
Bei den Versuchen zur Anwendbarkeit der lichtschtbaren Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven *cdc20*-Mutante zeichnete sich ein in diesem Umfang im Vorfeld nicht erwarteter Einfluss der Inkubationstemperatur ab. Dieser sollte nun näher untersucht werden.

### **5.4.1 Temperaturabhängigkeit der lichtgesteuerten <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression**

Zur abschließenden Klärung, warum die zyklische lichtgesteuerte Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 den Wachstumsdefekt der temperatursensitiven Variante *cdc20-1* nicht komplementieren kann, sollte zunächst überprüft werden, ob die bisherigen Ergebnisse zur Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 in YAS51, insbesondere die Wiederholbarkeit der Induktion der Expression, bei restriktiver Temperatur reproduzierbar sind. Hierfür wurde eine bei permissiver Temperatur angezogenen Vorkultur von YAS51 in 40 ml SC-Medium (im Fall der Durchführung bei restriktiver Temperatur auf 37 °C vorgewärmt) auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,3 angeimpft und mit 60 µl PCB-Lösung versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 25 bzw. 37 °C bei einer zyklischen Beleuchtung mit Licht einer Wellenlänge von 660 bzw. 750 nm nach folgendem Schema, um die Expression des lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20 zu induzieren bzw. zu stoppen:

1. 90 min dunkel, anschließend Entnahme von Probe „90 min“
2. 20 min 660 nm
3. 90 min dunkel, anschließend Entnahme von Probe „200 min“
4. 60 min 750 nm
5. 180 min dunkel, anschließend Entnahme von Probe „440 min“
6. 60 min dunkel, nachdem jedem Kolben 30 µl PCB-Präparation frisch zugesetzt wurden
7. 20 min 660 nm
8. 90 min dunkel, anschließend Entnahme von Probe „610 min“

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme einem Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen unterzogen und anschließend mittels Western Blot analysiert (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7: Eine wiederholte lichtabhängige Expression von  $4^{\text{myc}}\text{Cdc20}$  in YAS51 ist bei 37 °C nicht möglich.** Flüssigkulturen von YAS51 wurden unter Zusatz von PCB bei 25 bzw. 37 °C inkubiert und alternierend mit Licht einer Wellenlänge von 660 bzw. 750 nm bestrahlt, um die  $4^{\text{myc}}\text{Cdc20}$ -Expression zu induzieren bzw. zu stoppen. Aus beiden Ansätzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten identische Zellmengen entnommen und durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot aufbereitet (verwendete Antikörper siehe Abb. 5.2).

Unabhängig von der Inkubationstemperatur erfolgt in beiden Fällen die initiale Expression von  $4^{\text{myc}}\text{Cdc20}$  nach Beleuchtung mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm. Diese lässt sich durch eine anschließende Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 750 nm reprimieren. Eine anschließende erneute Beleuchtung mit Licht der transkriptionsaktivierenden Wellenlänge von 660 nm führt bei 25 °C in Übereinstimmung mit den bisherigen Daten zu einer erneuten  $4^{\text{myc}}\text{Cdc20}$ -Expression, während sie bei 37 °C ausbleibt.

#### 5.4.2 Temperaturabhängigkeit der lichtgesteuerten $\beta$ -Galactosidase-Expression

Die erarbeiteten Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass das lichtschtbare Expressionssystem in YAS51 im Vergleich zu permissiven Bedingungen (25 °C) bei 37 °C keine volle Funktionsfähigkeit besitzt und nur mit eingeschränkter Aktivität funktioniert. Um auszuschließen, dass dieser Verdacht auf den temperatursensitiven Phänotyp und die damit verbundenen mitotischen Defekte von YAS51 zurückzuführen sind, sollte die Temperaturabhängigkeit des Expressionssystems durch Aktivitätstests mit  $\beta$ -Galactosidase als Reporter in einem für *Yeast-Two-Hybrid*-Untersuchungen geeigneten Wildtypstamm näher untersucht werden. Um diesen herzustellen, wurde YAS45 mit dem Wildtyp-Stamm W303-1A (*MAT $\alpha$  ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*) gekreuzt. Der entstandene diploide Stamm wurde sporuliert, die Tetraden

vereinzelt und die neu entstandenen Klone phänotypisch charakterisiert. Der als YAS46 bezeichnete Stamm enthält die gewünschte Kombination. Der dabei ebenfalls erhaltene Stamm, der ein intaktes *GAL4*-Gen enthält, wird als YAS48 bezeichnet und kann als Positivkontrolle benutzt werden.

Stamm	Genotyp
YAS46	<i>Mata gal4ΔkanMX gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>
YAS48	<i>MATx gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>

Für die lichtabhängige Expression der  $\beta$ -Galactosidase wird ein Konstrukt benötigt, bei dem das für die  $\beta$ -Galactosidase codierende Gen *lacZ* durch einen vorangestellten *GALI*-Promotor kontrolliert wird. Dazu wurden mit Hilfe der Oligonukleotide as31 und as32 und genomischer DNA als Matrize 630 bp des *GALI*-Promotors amplifiziert und als PstI/SphI-Fragment in den Vektor YCplac33-*MCH5p::lacZ* (Reihl und Stolz, 2005) anstelle des ursprünglich enthaltenen *MCH5*-Promotors inseriert. Das entstandene Plasmid wird als pAS9 bezeichnet (Abbildung 4.2, Seite 44).

Plasmid	Relevante Sequenzen
pAS9	<i>URA3, CEN, GAL1p::lacZ, Amp<sup>R</sup></i>

Abschließend wurde ein Hefestamm hergestellt, der die lichtabhängige Expression der  $\beta$ -Galactosidase ermöglicht. Dazu wurde der für *Yeast-Two-Hybrid*-Anwendungen geeignete Stamm YAS46 mit den für die lichtabhängige Genexpression benötigten *Yeast-Two-Hybrid*-Plasmiden PhyB(NT)-GBD ( $2\mu$ , *TRP1*) und PIF3-GAD ( $2\mu$ , *LEU2*; beide Shimizu-Sato *et al.*, 2002) nach der Methode von Gietz und Woods (2002) transformiert. Parallel dazu wurde das für die lichtabhängige Expression der  $\beta$ -Galactosidase benötigte Plasmid pAS9 eingeschleust. Die Auxotrophiemarker *TRP1*, *LEU2* und *URA3* dienen dabei zur Selektion der korrekten Transformanten. Der so entstandene Hefestamm wird als YAS69 bezeichnet.

Stamm	Relevanter Genotyp	Plasmide
YAS69	<i>gal4ΔkanMX gal80ΔloxP</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS9

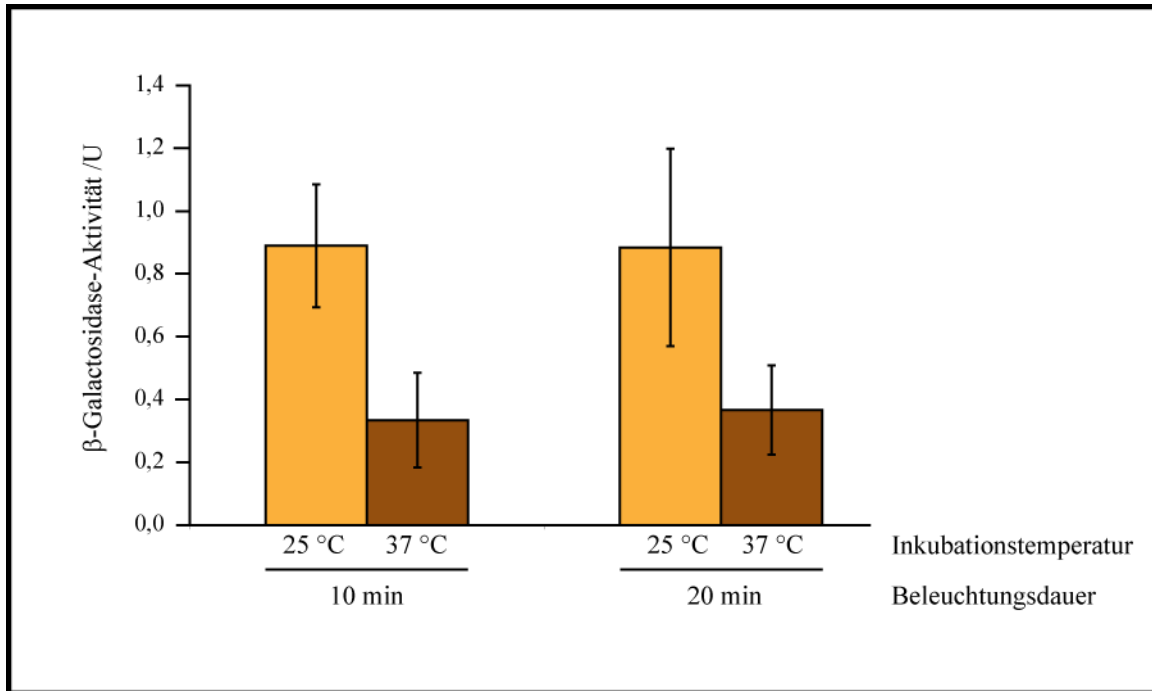
Der Einfluss der Temperatur auf die lichtabhängige Expression der  $\beta$ -Galactosidase sollte nun in YAS69 analysiert werden. Hierfür wurde eine in 20 ml SC unter Zusatz von 30  $\mu$ l PCB-Lösung bei 25 °C angezogene Vorkultur von YAS69 in 60 ml SC mit 90  $\mu$ l PCB-Lösung auf eine Zelldichte von

OD<sub>600</sub> = 0,25 angeimpft und auf 4 Kolben à 15 ml aufgeteilt. Nach dreistündiger Inkubation bei 25 bzw. 37 °C wurden die Kolben für 10 bzw. 20 min mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet, um die Transkription des *lacZ*-Gens zu induzieren. Anschließend wurden die Kulturen noch 1 h im Dunkeln inkubiert, um eine nachweisbare Menge Reporterprotein zu exprimieren. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität erfolgte in durch Glasperlenaufschluss erstellten Heferohextrakten (Tabelle 5.1, Abbildung 5.8).

<b>Beleuchtungsdauer</b>	<b>Inkubationstemperatur</b>	<b><math>\beta</math>-Galactosidase-Aktivität /U</b>
10 min	25 °C	0,890 $\pm$ 0,195
	37 °C	0,335 $\pm$ 0,151
20 min	25 °C	0,884 $\pm$ 0,315
	37 °C	0,367 $\pm$ 0,142

*Tabelle 5.1:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in YAS69 in Abhängigkeit von der Dauer der Beleuchtung mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm sowie der Inkubationstemperatur.*





**Abbildung 5.8:** Bei 37 °C fällt die Aktivität des lichtabhängig exprimierten Reporterproteins  $\beta$ -Galactosidase geringer aus als bei 25 °C. Flüssigkulturen von YAS69 (*gal4 $\Delta$ kanMX*, *gal80 $\Delta$ loxP*, PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS9 [*GAL1p::lacZ*]) wurden unter Zusatz von PCB bei 25 bzw. 37 °C inkubiert und 10 oder 20 min mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm bestrahlt, um die Expression der  $\beta$ -Galactosidase zu induzieren. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase erfolgte in Heferohextrakten. Angegeben sind die Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Messungen, als Fehlerindikator wird die Standardabweichung genutzt.

Die Aktivität des lichtabhängig exprimierten Reporterproteins  $\beta$ -Galactosidase zeigt eine deutliche Temperaturabhängigkeit. Unabhängig von der Dauer der Beleuchtung mit der das lichtschtbare Promotorsystem aktivierenden Wellenlänge von 660 nm ist bei 25 °C eine im Vergleich zur Versuchsdurchführung bei 37 °C mehr als doppelt so hohe Aktivität zu verzeichnen.

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Temperatureffekt auf eine verminderte Aktivität des lichtschtbaren Promotorsystems zurückzuführen ist, sollte die Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bei 25 und 37 °C zusätzlich bei normalvermittelter, lichtunabhängiger Expression erfolgen. Hierfür wurde der den natürlichen Transkriptionsaktivator enthaltene Stamm YAS48 (*GAL4*, *gal80 $\Delta$ loxP*) nach der Methode von Gietz und Woods (2002) mit pAS9 transformiert, wobei der Auxotrophiemarker *URA3* als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Einschleusung des Reporterplasmids diente. Aus Vorkulturen der Transformanten in SC-Medium wurden 15 ml Hauptkultur in SC-Medium auf eine Zelldichte von  $OD_{600} = 0,2$  angeimpft, bei 25 bzw. 37 °C für

6 h inkubiert und die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in mittels Glasperlenaufschluss erstellten Heferohextrakten bestimmt (Tabelle 5.2, Abbildung 5.9).

Inkubationstemperatur	$\beta$ -Galactosidase-Aktivität
25 °C	0,915 $\pm$ 0,102
37 °C	1,760 $\pm$ 0,433

Tabelle 5.2:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in vier YAS48-Transformanten in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.

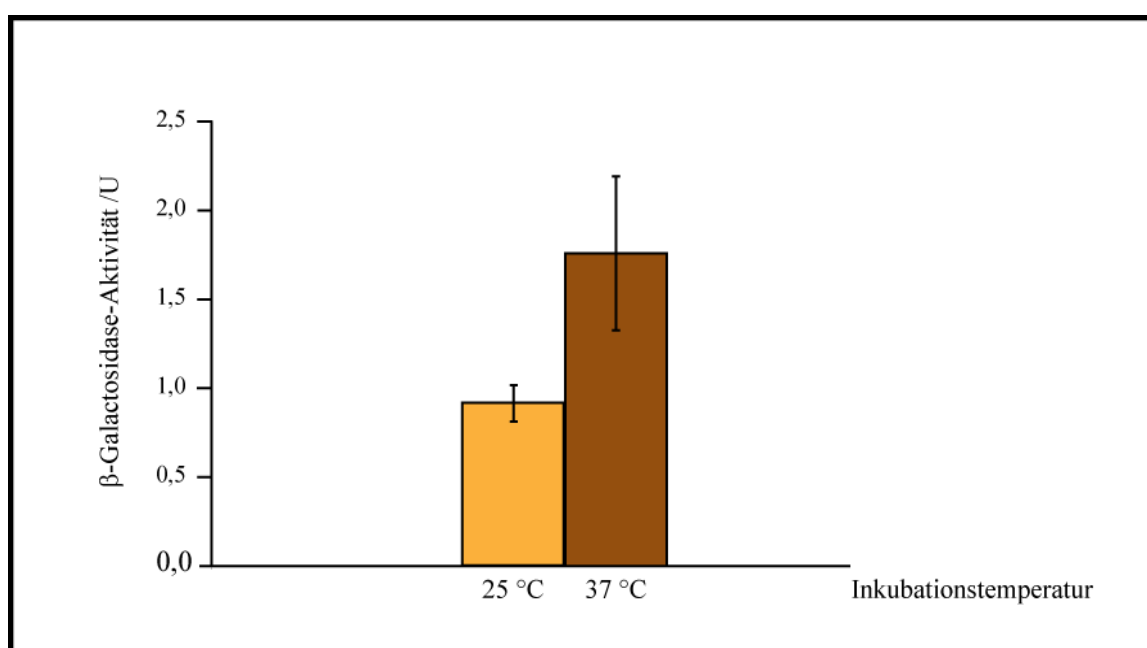


Abbildung 5.9: Bei 37 °C wird das Gal4-abhängig exprimierte Reporterprotein  $\beta$ -Galactosidase stärker exprimiert als bei 25 °C. Flüssigkulturen von YAS48-Transformanten (*GAL4*, *gal80 $\Delta$ loxP*, pAS9) wurden 6 h bei 25 bzw. 37 °C inkubiert, um die  $\beta$ -Galactosidase Gal4-induziert zu exprimieren. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte doppelt in den Heferohextrakten von 4 voneinander unabhängigen Transformanten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte, als Fehlerindikator wird die Standardabweichung genutzt.

Das Kontrollexperiment zeigt, dass – wenn für die Steuerung der Transkription der natürliche Transkriptionsfaktor Gal4 genutzt wird – die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bei 37 °C deutlich stärker ausfällt als bei 25 °C. Somit scheint die beobachtete verminderte Aktivität bei 37 °C bei Verwendung des lichtschtbaren Promotorsystems klar auf eine Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit dieses Systems bei höheren Temperaturen hinzudeuten.

## 5.5 Anwendung der lichtgesteuerten <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression bei 25 °C

Die vorliegenden Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die ursprünglich geplante Verwendung einer temperatursensitiven Mutante zur gezielten Zellzykluskontrolle ungünstig, wenn nicht unmöglich ist und nach einer anderen Alternative gesucht werden muss. Auffällig war im Rahmen der durchgeführten Experimente, dass eine permanente lichtabhängige – und damit von der normalen Zellzyklusregulation entkoppelte – Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 die Lebensfähigkeit der Zellen nicht nachhaltig zu beeinträchtigen schien. Dieses Verhalten ist Grundvoraussetzung für die alternativ zur Arbeit mit einer temperatursensitiven *cdc20-1*-Mutante in Frage kommende Verwendung eines Stammes, bei dem *CDC20* unter der Kontrolle eines stoffwechselregulierten Promotors steht. Die unter den entsprechenden Stoffwechselbedingungen erfolgende konstitutive basale Expression von Cdc20 ermöglicht in Abwesenheit eines lichtgesteuert exprimierten <sup>4myc</sup>Cdc20 die Kultivierung des Stammes. Unter Repressionsbedingungen kommt diese Expression zum Erliegen und die Zellen sind für ihr Wachstum ausschließlich auf lichtinduziert exprimiertes <sup>4myc</sup>Cdc20 angewiesen. Ein Kandidat mit passenden Eigenschaften ist der *MET3*-Promotor. Dieser Promotor steuert in Wildtyp-Zellen die Transkription des *MET3*-Gens, welches für die ATP-Sulfurylase codiert. Die Aktivität des *MET3*-Promotors wird u.a. durch den Methionin-Gehalt im Medium im Rahmen einer negativen Rückkopplungsschleife reguliert. Seine Eignung zur externen Zellzyklussteuerung in *S. cerevisiae* durch wechselndes Methionangebot im Kultivierungsmedium war bereits für Cln2 gezeigt worden (Charvin *et al.*, 2008).

### 5.5.1 Herstellung einer *cdc20*-Mutante mit Methionin-regulierbarem Promotor und der Fähigkeit zur lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression

Aufgrund dieser Überlegungen sollte nun ein *S. cerevisiae* Stamm hergestellt werden, bei dem der native *CDC20*-Promotor durch den *MET3*-Promotor ersetzt ist.

Um für zukünftige Projekte ausreichend Markergene für weitere Transformationen zur Verfügung zu haben, sollte zunächst im Stamm YAS46 die *kanMX*-Kassette entfernt werden. Die dafür notwendige Expression der durch das Plasmid pSH62 codierten Cre-Rekombinase erfolgt unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors (Güldener *et al.*, 2002) und benötigt also den Transkriptionsfaktor Gal4. Da *GAL4* in YAS46 deletiert wurde, um die Arbeit mit einem *Yeast-Two-Hybrid*-System zu

ermöglichen, muss *GAL4* nun temporär wieder eingeführt werden. Hierfür eignet sich besonders ein *CEN*-Plasmid mit *URA3* als Selektionsmarker, da dessen mitotischer Verlust nach erfolgter Cre-Rekombinase-Aktivität leicht über eine 5-FOA-Selektion verfolgt werden kann. *GAL4* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide as37 und as38 aus genomischer DNA amplifiziert, das PCR-Produkt mit BamHI und NotI geschnitten und in das ebenfalls mit BamHI und NotI geschnittene *CEN*-Plasmid pRS316 (Sikorski und Hieter, 1989) ligiert. Das entstandene Plasmid wird als pAS11 bezeichnet (Abbildung 4.2, Seite 44).

Plasmid	Relevante Sequenzen
pAS11	<i>URA3, CEN, GAL4, Amp<sup>R</sup></i>

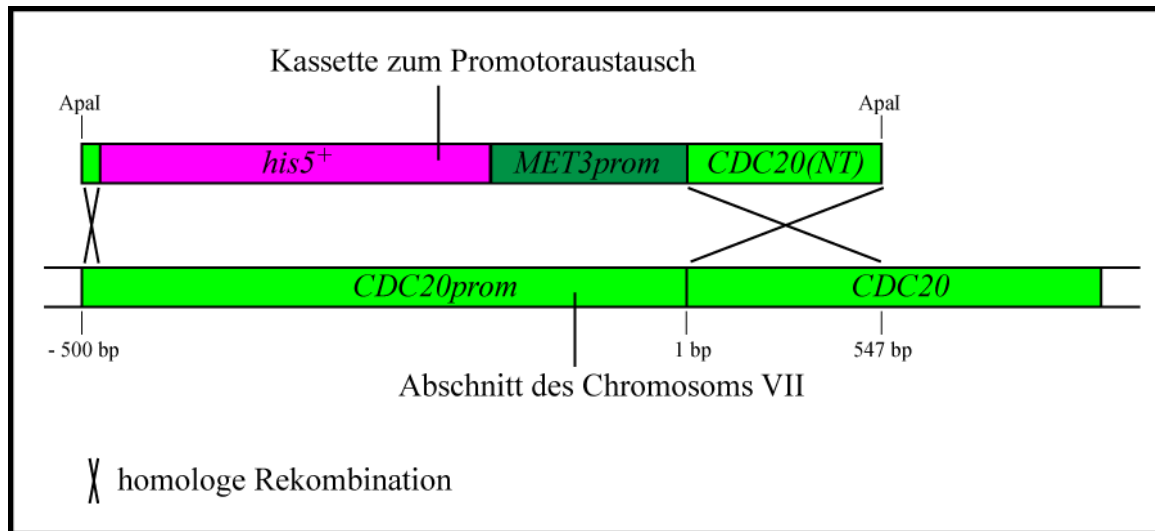
YAS46 wurde mit pSH62 (Güldener *et al.*, 2002) und pAS11 transformiert und die *kanMX*-Kassette entfernt. Dies wurde sowohl durch eine Kontroll-PCR (Oligonukleotide as5 und as25) als auch phänotypisch durch den Verlust der Geneticin-Resistenz bestätigt. Der nach abschließendem mitotischem Verlust von pSH62 und pAS11 entstandene Stamm wird als YAS122 bezeichnet.

Stamm	Genotyp
YAS122	<i>Mata gal4ΔloxP gal80ΔloxP ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>

Für den Austausch des *CDC20*- gegen den *MET3*-Promotor im Genom wurden zunächst der *MET3*-Promotor mit Hilfe der Oligonukleotide as107 und as106 sowie *CDC20* mit Hilfe der Oligonukleotide as76 und as67 aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt as107/as106 wurde mit PstI und SphI geschnitten, das Produkt as76/as67 mit SphI und ApaI. Beide Fragmente wurden im Rahmen einer 3-Wege-Ligation in einen mit PstI und ApaI linearisierten pBSIISK(-)-Vektor eingeführt und das resultierende Konstrukt als pAS10 bezeichnet (Abbildung 4.2, Seite 44). Anschließend wurde mit Hilfe der Oligonukleotide as77 und as65 das Markergen *his5<sup>+</sup>* aus pUG27 amplifiziert und in die SmaI-Schnittstelle von pAS10 kloniert. Über as77 wurde dabei neben einer ApaI-Schnittstelle auch eine zur genomischen DNA homologe Sequenz angefügt, die bei einer Transformation eine homologe Rekombination ca. 500 bp vor dem *CDC20-ORF* ermöglicht. Aus dem so entstandenen Vektor pAS5 (Abbildung 4.2, Seite 44) kann das für den Promotoraustausch im Genom (Abbildung 5.10) erforderliche lineare Konstrukt *his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20(NT)* jederzeit durch einen Verdau mit ApaI gewonnen werden. Neben der über as77 künstlich eingefügten ApaI-Schnittstelle dient dabei die natürlich

vorkommende interne ApaI-Schnittstelle 541 bp nach Beginn des *CDC20*-ORFs zur Gewinnung der Kassette zum Promotoraustausch.

Vektor	Relevante Sequenzen
pAS10	<i>MET3p::CDC20(NT), Amp<sup>R</sup></i>
pAS5	<i>his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20(NT), Amp<sup>R</sup></i>



**Abbildung 5.10: Konstrukt für den Promotoraustausch im Genom.** Die aus dem Verdau von pAS5 gewonnene Kassette ermöglicht im Genom den Austausch des *CDC20*-Promotors gegen den *MET3*-Promotor durch homologe Rekombination, *his5<sup>+</sup>* dient dabei als Marker für die Selektion der Transformanten.

Nach Transformation von YAS122 mit der aus dem Verdau von pAS5 mit ApaI gewonnenen Kassette *his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20(NT)* konnte nun der *CDC20*-Promotor ersetzt werden. Dabei diente der *his5<sup>+</sup>*-Marker als Auxotrophiemarker für die Selektion von Transformanten, die das Konstrukt durch homologe Rekombination integriert hatten. Die korrekte Integration der Kassette ins Genom konnte sowohl durch Kontroll-PCRs mit genomischer DNA als Vorlage und den Oligonukleotiden as66 und as27 bzw. as76 und as109 als auch phänotypisch über den bei Methioninzugabe auftretenden Wachstumsdefekt erfolgreich überprüft werden. Der so entstandene Stamm wird als YAS156 bezeichnet.

Stamm	Genotyp
YAS156	<i>Mata gal4ΔloxP gal80ΔloxP cdc20::his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>

Für die Anwendung des lichtschaltbaren Expressionssystems bei 25 °C wurde der *MET3*-Promotor-abhängig Cdc20 exprimierende Stamm YAS156 mit den für die lichtabhängige Genexpression benötigten *Yeast-Two-Hybrid*-Plasmiden PhyB(NT)-GBD ( $2\mu$ , *TRP1*) und PIF3-GAD ( $2\mu$ , *LEU2*; beide Shimizu-Sato *et al.*, 2002) transformiert. Parallel wurde das für die lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 benötigte Plasmid pAS8 mit eingeschleust. Der so entstandene Hefestamm wird als YAS157 bezeichnet. In einem zweiten, als Negativkontrolle dienenden Ansatz wurde zusätzlich zu den *Two-Hybrid*-Plasmiden das leere Plasmid pRS316 (*URA3*, *CEN*; Sikorski und Hieter, 1989) transformiert, bei dem so entstandenen Stamm handelt es sich um YAS158.

In beiden Fällen dienten die Auxotrophiemarker *TRP1*, *LEU2* und *URA3* für die Selektion der Transformanten. Diese erfolgte auf SD-Platten ohne Methionin, um ein lichtunabhängiges Wachstum der Transformanten zu ermöglichen.

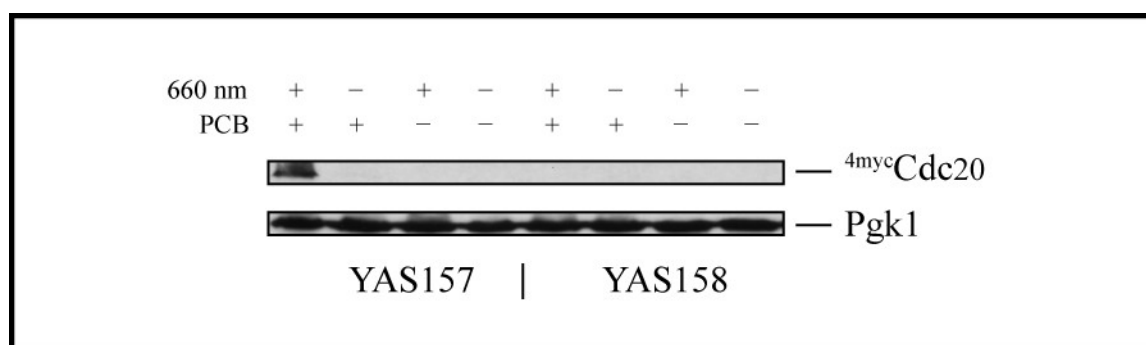
Stamm	Relevanter Genotyp	Plasmide
YAS157	<i>gal4ΔloxP gal80ΔloxP</i> <i>cdc20::his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS8
YAS158	<i>gal4ΔloxP gal80ΔloxP</i> <i>cdc20::his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20</i>	PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pRS316

Der für die lichtabhängige Cdc20-Expression in einer *cdc20*-Stoffwechselmutante benötigte *S. cerevisiae*-Stamm YAS157 konnte ebenso wie der Kontrollstamm YAS158 erfolgreich hergestellt werden. Somit standen nun Stämme zur Verfügung, die Vorversuche zur Zellzyklussteuerung mit Hilfe des lichtschaltbaren Promotorsystems ohne Temperaturstress bei 25 °C ermöglichen.

### 5.5.2 Lichtabhängige <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in einer *cdc20*-Mutante mit Methionin-regulierbarem Promotor

Zur Überprüfung der lichtabhängigen <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression wurden Flüssigkulturen von YAS157 und YAS158 bei 25 °C auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,2 in 20 ml SD-Medium angeimpft, die Hälfte der Proben mit 30 µl PCB-Präparation versetzt und 5 h inkubiert. Die Zellen wurden nach 2 h für 2,3 h mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet. Die Aufbereitung der Proben für die Detektion mittels Western Blot erfolgte durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen. Die Verwendung eines gegen das 4myc-Epitop gerichteten Antikörpers stellte dabei sicher, dass nur die lichtabhängig exprimierte Cdc20-Version detektiert werden kann. Als

Ladekontrolle diente das in konstanten Mengen exprimierte Protein Pgk1 (Abbildung 5.11).

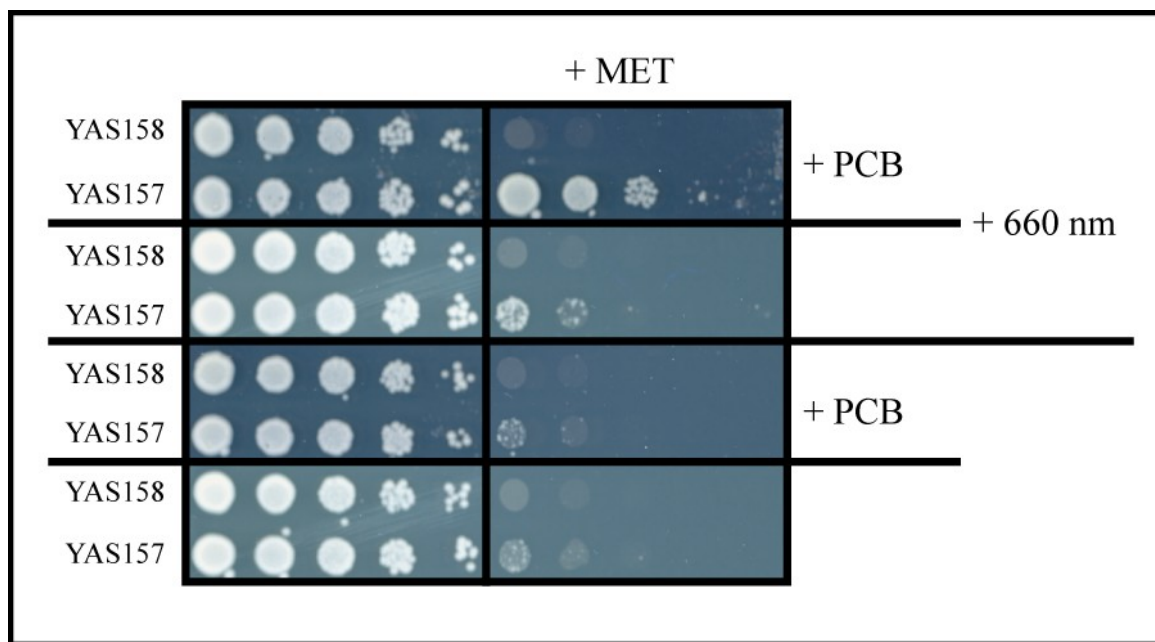


**Abbildung 5.11:** <sup>4myc</sup>Cdc20 wird in einer *cdc20*-Stoffwechselmutante lichtabhängig exprimiert. Flüssigkulturen von YAS157 (*cdc20::his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20*; PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pAS8 [*GAL1p::4myc::CDC20*]) bzw. der Negativkontrolle YAS158 (*cdc20::his5<sup>+</sup>::MET3p::CDC20*; PhyB(NT)-GBD, PIF3-GAD, pRS316) wurden mit (+) oder ohne (-) Zugabe von Chromophor (PCB) bei 25 °C inkubiert und dabei mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet (+) oder im Dunkeln gelassen (-). In der logarithmischen Wachstumsphase wurde von jedem Ansatz eine identische Zellmenge durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot aufbereitet (verwendete Antikörper siehe Abb. 5.2).

Das <sup>4myc</sup>Cdc20-Protein kann in YAS157 nur nachgewiesen werden, wenn der Kultur PCB zugesetzt wird und sie mit der das lichtsichtbare Promotorsystem aktivierenden Wellenlänge von 660 nm beleuchtet wird. In YAS158, welcher statt pAS8 (*GAL1p::4myc::CDC20*) nur ein leeres Plasmid trägt und als Negativkontrolle dient, kann <sup>4myc</sup>Cdc20 erwartungsgemäß nie nachgewiesen werden. Somit funktioniert das lichtgesteuerte Cdc20-Expressionssystem prinzipiell auch in der *cdc20*-Stoffwechselmutante.

### 5.5.3 Lichtabhängiges Wachstum einer *cdc20*-Stoffwechselmutante mit Methionin-regulierbarem Promotor

Für die potentielle Anwendung von YAS157 als Stamm, dessen Zellzyklusprogression lichtabhängig gesteuert werden kann, wurde analysiert, ob sein Kolonienwachstum lichtabhängig erfolgt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von YAS157 und YAS158 auf SD-Platten ausgebracht, denen 0 oder 35 µl PCB-Präparation sowie 0 oder 40 mg/l Methionin zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte für 4 Tage bei 25°C, wobei die Platten entweder dunkel gelagert wurden oder alle 3,5 h für 30 min mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet wurden (Abbildung 5.12).



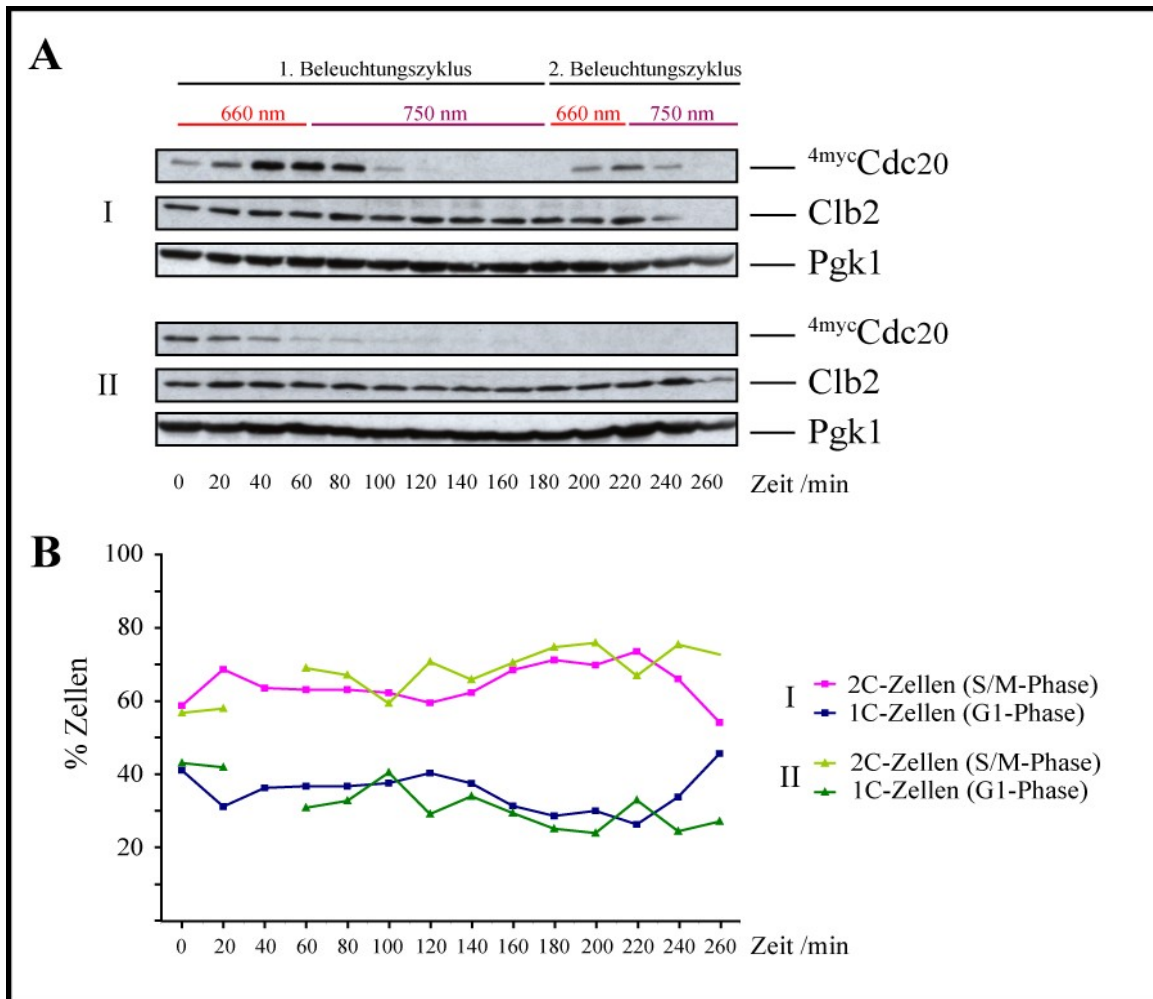
**Abbildung 5.12: YAS157 wächst bei Chromophorzugabe und Beleuchtung mit 660 nm unter restriktiven Bedingungen.** Verdünnungsreihen mit jeweils identischen Zellkonzentrationen von YAS157 sowie YAS158 wurden auf feste SD-Nährböden ausgebracht, denen gegebenenfalls Methionin (+MET) bzw. 35  $\mu$ l PCB-Lösung (+ PCB) zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte 4 Tage bei 25 °C im Dunkeln oder unter Beleuchtung mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm alle 3,5 h für 30 min (+ 660 nm).

Der Wachstumstest zeigte eine klare Abhängigkeit des Wachstums von YAS157 und YAS158 vom Methioningehalt der Platten. Unter permissiven Bedingungen, wenn kein Methionin im Medium ist und chromosomal codiertes *CDC20* also exprimiert wird, können beide Stämme unabhängig von einer PCB-Zugabe oder Beleuchtung wachsen. Unter restriktiven Bedingungen, wenn die Zugabe von Methionin eine Expression des chromosomal codierten Cdc20 unterbindet, ist nur dann ein deutliches Wachstum zu verzeichnen, wenn die Kombination aus Chromophor, regelmäßiger Beleuchtung mit 660 nm und lichtabhängig exprimierbarem <sup>4myc</sup>Cdc20 gegeben ist. Die Proliferation und damit das Kolonienwachstum von YAS157-Zellen ist somit klar durch Lichtinduktion steuerbar.



#### **5.5.4 Anwendung einer *cdc20*-Mutante mit Methionin-regulierbarem Promotor für eine externe lichtsichtbare Zellzyklussteuerung**

Mit YAS157 wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm hergestellt, der offensichtlich in der Lage ist, lichtabhängig zu wachsen. Er könnte somit für Experimente zur Synchronisierung von Populationen mittels gezielter lichtgesteuerter Regulation der Expression des essentiellen Gens *CDC20* in *S. cerevisiae* dienen. Im Rahmen eines Vorversuchs zur Klärung der dazu benötigten Bedingungen sollte analog zum Experiment mit der temperatursensitiven Mutante YAS51 (siehe Kapitel 5.3.1) untersucht werden, ob die zyklische lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 die Verteilung der Population über die Zellzyklusphasen beeinflusst. Als Messgrößen zur Bestimmung der Zellzyklusphasen sollten hierbei wieder Clb2 und der DNA-Gehalt dienen. Eine Vorkultur von YAS157 wurde über Nacht in 25 ml SD-Medium unter Zugabe von 30 µl PCB-Präparation bei 25 °C angezogen und daraus am Morgen zwei Hauptkulturen in 45 ml SD-Medium unter Zugabe von je 90 µl PCB-Lösung und 40 mg/l Methionin auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,4 angeimpft. Nach einer initialen fünfständigen Inkubation im Dunkeln, die der Induktion des methioninbedingten mitotischen Arrests diene, wurden einer der Kolben (Ansatz I) nacheinander für 1 h mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm beleuchtet, 2 h mit 750 nm, 40 min mit 660 nm und abschließend bis zum Versuchsende wieder mit 750 nm. Der andere Kolben (Ansatz II) wurde nicht gezielt beleuchtet. Ab Beginn der Beleuchtung wurden alle 20 min aus jedem Kolben identische Zellmengen (ca. 3 ODZ) entnommen. 90 % des Probenvolumens wurden mittels Glasperlensaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für eine Analyse im Western Blot aufbereitet (Abbildung 5.13, A). Die verbliebenen Zellen (10 %) wurden Ethanol-fixiert und ihr DNA-Gehalt mittels DAPI-Färbung durchflusszytometrisch im Rahmen einer Kooperationsarbeit von Andrea Focke am MPI Magdeburg bestimmt (Abbildung 5.13, B).



**Abbildung 5.13: Die zyklische lichtgesteuerte  $4^{\text{myc}}\text{Cdc20}$ -Expression in YAS157 beeinflusst die Verteilung der Population über die Zellzyklusphasen.** **A.** Flüssigkulturen von YAS157 wurden unter Zusatz von PCB und Methionin bei 25 °C zunächst im Dunkeln inkubiert. Eine der Kulturen (Ansatz I) wurde anschließend alternierend mit Licht einer Wellenlänge von 660 oder 750 nm beleuchtet. Ab Beginn der Beleuchtung wurden alle 20 min identische Zellmengen entnommen und durch einen Glasperlenaufschluss unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot aufbereitet (verwendete Antikörper siehe Abb. 5.5). **B.** Parallel entnommene Proben zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurden Ethanol-fixiert und mit 1 µg DAPI gefärbt, um die Verteilung der Kultur über die Zellzyklusphasen (G1 bzw. S/M) zu bestimmen (Daten: Andrea Focke, MPI Magdeburg; Probe des Ansatz II zum Zeitpunkt 40 min nicht vorhanden).

Dieses Experiment zeigt, dass die zyklische lichtgesteuerte Expression von  $4^{\text{myc}}\text{Cdc20}$  in YAS157 bei 25 °C prinzipiell möglich ist. Bei den ersten Zeitproben der Kultur II, die nicht gezielt mit Licht einer definierten Wellenlänge beleuchtet wurde, ist ein im Zeitverlauf immer schwächer werdendes  $4^{\text{myc}}\text{Cdc20}$ -Signal zu beobachten. Dies ist ein Indiz für die Sensitivität des lichtschaltbaren *Yeast-Two-Hybrid*-Systems, da diese Kultur lediglich während des Aufbaus der Beleuchtung für den Ansatz I einer geringen Dosis weißen Lichts ausgesetzt war. Zum Ende des zweiten

Beleuchtungszyklus nimmt der Clb2-Gehalt im Ansatz I ab und der Anteil an 1C-Zellen an der Gesamtpopulation von vorher 29 % (Durchschnittswert der Proben zu den Zeitpunkten 160 bis 220 Minuten) auf 46 % (Zeitpunkt 260 Minuten) zu, während dieses Verhalten im unbeleuchteten Kolben II nicht zu beobachten ist. In ihm blieb der Anteil an 1C-Zellen konstant bei 28 bis 29 %. Dieses Ergebnis des Vorversuchs schafft zusammen mit dem beobachteten lichtabhängigen Wachstum der *cdc20*-Stoffwechselmutante YAS157 die Basis für die Ermittlung geeigneter Bedingungen und die Optimierung des Stammes für dessen Anwendung zur Synchronisierung einer ganzen Population durch die externe, lichtregulierte Steuerung der Expression des essentiellen Gens *CDC20*.

## 6 Diskussion

Für viele Fragestellungen der aktuellen Forschung zum Zellzyklus von *S. cerevisiae* ist die Arbeit mit synchronen Zellkulturen unerlässlich. Im Laufe der vergangenen drei Jahrzehnte entwickelte Methoden wie die Arbeit mit konditionellen Mutanten, *metabolic shifts* oder *block-and-release*-Verfahren gehören heute zu Standardtechniken bei der künstlichen Erzeugung synchroner Zellkulturen (Walker, 1999). Ihnen allen gemein ist die Arretierung aller Zellen einer Population an einem definierten Punkt im Zellzyklus und die anschließende synchrone Proliferation aller Zellen. Aufgrund des Wachstums durch Knospung divergieren die Zellen einer Hefekultur bezüglich ihrer Zellzyklusphasen bereits im nächsten Zellzyklus wieder, wenn die Kultur nicht erneut den Arrest-induzierenden Bedingungen ausgesetzt wird. Durch die damit verbundenen steten Wechsel der Kulturbedingungen wie z. B. der Inkubationstemperatur oder der Nährstoffsituation sowie die erforderlichen Wasch- und Separationsschritte werden die Zellen künstlich Stresssituationen und veränderten Stoffwechsellagen ausgesetzt. Deren Einfluss auf die Messergebnisse ist schwierig fassbar und möglicherweise nicht unerheblich.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Eignung des lichtschtbaren Promotorsystems (Shimizu-Sato *et al.*, 2002) als Basis einer neuen, nicht-invasiven Methode zur künstlichen externen Steuerung des Zellzyklusprogramms mit Hilfe von Licht. Die lichtinduzierte Expression des essentiellen, in der Mitose aktiven Proteins Cdc20 als Ziel für die Regulation des Zellzyklus von außen stand dabei im Fokus des Interesses. Cdc20 ist auf Grund seiner Funktionsweise ein idealer Kandidat für die definierte externe Steuerung des Zellzyklusprogramms. Die Expression von Cdc20 ist zwar notwendig, aber nicht hinreichend, um den Zellen den Eintritt in die Anaphase zu ermöglichen. Die Fähigkeit der Zellen zur Durchführung des Spindelcheckpoints – Überprüfung des korrekten und vollständigen Aufbaus der Spindel – wird durch eine künstliche Regulation der Cdc20-Expression nicht gestört. Solange nicht alle Kinetochore korrekt bipolar mit Spindelfasern besetzt sind, vermittelt Mad2 im Rahmen des *Spindle Assembly Checkpoints* auch bei verfrühter Cdc20-Expression die Blockade der APC<sup>Cdc20</sup>-Aktivität. Nach erfolgreicher Spindelassemblierung dissoziiert Mad2 von APC<sup>Cdc20</sup>, so dass dessen Substrate nun ubiquitiniert und der proteasomalen Proteolyse zugeführt werden können (Humphrey und Pearce, 2005). Cdc20 wird am Ende der Mitose – wahrscheinlich autoinduziert – durch Proteolyse abgebaut. Dies ermöglicht die effektive und zeitnahe Neutralisierung von Cdc20 auf Proteinebene und schafft die

Voraussetzung dafür, dass unabhängig von der künstlichen Cdc20-Expression der nächste Zellzyklus mit neutralisierter Cdc20-Aktivität beginnt und den Zellen der Eintritt in die Anaphase bis zur erneuten lichtgesteuerten Expression von Cdc20 verwehrt bleibt.

Für eine einfache Handhabung und genetische Manipulation des verwendeten *S. cerevisiae*-Stammes wurde als Strategie die Konstruktion einer konditionellen Mutante gewählt, die einerseits bei permissiven Bedingungen lichtunabhängig wachsen kann, andererseits aber unter restriktiven Bedingungen ausschließlich in Abhängigkeit von einer lichtinduziert exprimierten Cdc20-Version proliferiert. Mit solch einem Stamm sind nach dem Wechsel zu restriktiven Bedingungen und damit der gesamten Phase lichtgesteuerter Zellzyklusdurchläufe keine weiteren Veränderungen der äußeren Umstände notwendig. Die Beeinflussung der Messergebnisse aufgrund veränderter Randbedingungen ist damit ausgeschlossen. Als konditionelle Mutante erster Wahl bot sich die temperatursensitive *cdc20-1*-Mutante an. Gegenüber anderen konditionellen Mutanten bietet sie den Vorteil, dass ihre Inkubation bei restriktiver Temperatur zu einem sehr verlässlichen Phänotyp führt. Eine Reversion zum Wildtyp ist statistisch betrachtet deutlich unwahrscheinlicher als eine nicht auf ein Nukleotid beschränkte Spontanmutation im Promotorbereich einer konditionellen Stoffwechselmutante (bei der ein Wildtyp-Allel unter der Kontrolle eines stoffwechselregulierten Promotors steht), die zu einer Entkopplung führt und das Wachstum der Mutante auch unter scheinbar restriktiven Bedingungen zulässt.

Die für diesen Ansatz benötigte, auf dem Stamm W267 basierende temperatursensitive *cdc20-1*-Mutante YAS51 mit der Fähigkeit zur lichtgesteuerten Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 bei permissiver Temperatur konnte erfolgreich hergestellt werden. Wie erwartet erfolgt die Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 in YAS51 nur, wenn der Zellkultur das Chromophor Phycocyanobilin zugesetzt wird und die Zellen mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm bestrahlt werden, um die Interaktion der am lichtschtbaren Expressionssystem beteiligten Komponenten PhyB(NT)-GBD und PIF3-GAD zu induzieren (Abbildung 5.2, Seite 69). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei permissiver Temperatur die durch eine Bestrahlung mit Rotlicht (660 nm) induzierte Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 in YAS51 durch eine anschließende Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 750 nm deutlich reprimierbar ist (Abbildung 5.3, Seite 70). Der Wechsel von Induktion und Repression war unter permissiven Bedingungen zyklisch wiederholt durchführbar (Abbildung 5.4, Seite 72). Erwartungsgemäß kann dabei die Synchronisation der Zellkultur durch die zyklische lichtinduzierte

Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 bei 25 °C nicht erreicht werden (Abbildung 5.5, Seite 74). Der als Vorbedingung zur Synchronisation notwendige frühmitotische Arrest findet in diesem Fall nicht statt, da die unter diesen Bedingungen aktive *cdc20-1*-Variante den Zellen den Eintritt in die Anaphase und somit den Abschluss der Mitose ermöglicht. Der Einsatz der lichtinduzierten <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression zur externen Steuerung des Zellzyklus muss in diesem System bei der für das *cdc20-1*-Allel restriktiven Inkubationstemperatur von 37 °C erfolgen. Im Rahmen der zu diesem Zweck durchgeführten Experimente zeigte sich jedoch ein in diesem Umfang vorher nicht erwarteter negativer Einfluss der erhöhten Inkubationstemperatur auf das Verhalten des lichtabhängigen Promotorsystems. Wachstumstests bei 37 °C (Abbildung 5.6, Seite 76) machten deutlich, dass bei restriktiver Temperatur der Zusatz von Phycocyanoblin und die regelmäßige Beleuchtung mit Rotlicht (660 nm) nicht ausreichen, um den auf dem *cdc20-1*-Allel beruhenden Wachstumsdefekt von YAS51 zu komplementieren. Ein Fehler im Konstrukt pAS8 (*GAL1p::4myc::CDC20*) kann hierbei als Ursache ausgeschlossen werden, da das durch das Plasmid pAS8 codierte <sup>4myc</sup>Cdc20 in der Lage ist, den Wachstumsdefekt einer *cdc20-1*-Mutante (W267) bei 37 °C zu komplementieren, wenn es nicht lichtinduziert, sondern Gal4-vermittelt exprimiert wird (siehe Abbildung 5.1, Seite 66). Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der lichtgesteuerten Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 zeigte, dass dessen induzierbare wiederholte Expression bei 25 °C problemlos funktioniert, bei 37 °C aber deutlich verringert ist (Abbildung 5.7, Seite 78).

Die enzymatische Aktivität eines Reporterproteins ist ein Maß für die Transkriptionsaktivität des Promotors, unter dessen Kontrolle das zugehörige Reportergen steht (Alberts *et al.*, 2002). Zur Kontrolle des Einflusses der Inkubationstemperatur auf die Expressionsstärke des *GAL1*-Promotorvermittelten Lichtinduktionssystems wurde als Reporterprotein die aus *E. coli* stammende  $\beta$ -Galactosidase untersucht. Dabei ergab sich bei erhöhter Temperatur ein deutlich negativer Effekt. Wurde die  $\beta$ -Galactosidase in *S. cerevisiae* lichtabhängig exprimiert, so war bei 37 °C eine um mehr als den Faktor 2 geringere enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase zu beobachten als in Zellen, die bei 25 °C kultiviert wurden (Abbildung 5.8, Seite 81). Dabei hatte die Dauer der Beleuchtung mit der das System induzierenden Wellenlänge (660 nm) keinen signifikanten Einfluss. Wird die Expression der  $\beta$ -Galactosidase hingegen durch den nativen Transkriptionsaktivator Gal4 reguliert, so fällt die Enzymaktivität bei Kulturen, die bei 37 °C angezogen wurden, fast doppelt so hoch aus wie bei Vergleichskulturen, die bei 25 °C inkubiert wurden (Abbildung 5.9, Seite 82). Der Vergleich der Messwerte (Tabelle 5.1, Seite 80 und

Tabelle 5.2, Seite 82) zeigt, dass die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase bei 25 °C in beiden Fällen, der lichtvermittelten und GAL4-abhängigen Expression, gleich groß ist (ca. 0,9 U). Die Funktionalität des aus den Komponenten PhyB(NT)-GBD und PIF3-GAD bestehenden lichtschtbaren Promotorsystems erreicht somit bei 25 °C den vollen Umfang des nativen Transkriptionsfaktors Gal4. Bei 37 °C hingegen beträgt die Aktivität des lichtabhängig induzierten Systems nur noch ca. 20 % der Aktivität des natürlichen Gal4 (0,3-0,4 U statt 1,8 U). Vermutlich ist der Verlust von 80 % der Expressionsaktivität des lichtschtbaren Promotorsystems bei 37 °C ursächlich dafür, dass sich eine wiederholte, zyklische Anwendung dieses Systems für die lichtvermittelte Kontrolle des Zellzyklusprogramms durch gezielte <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression in einer temperatursensitiven *cdc20-1*-Mutante bei restriktiver Temperatur als nicht funktionierend erweist.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zur Temperaturabhängigkeit des lichtschtbaren Expressionssystems war die Entwicklung einer alternativen Strategie notwendig, um die lichtabhängige Zellzyklussteuerung bei 25 °C durchführen zu können. Ein Stamm mit den benötigten Eigenschaften (YAS156) konnte erfolgreich hergestellt werden. In seinem Genom wurde am genuinen *CDC20*-Locus der native *CDC20*-Promotor durch den *MET3*-Promotor ersetzt. Dadurch kann im Stamm YAS156 die chromosomale Expression von *CDC20* durch den Methioningehalt im Medium gesteuert werden. In methioninfreiem Medium wird die Transkription der chromosomalen *CDC20*-Kopie nicht reprimiert. Cdc20 wird somit permanent exprimiert und erlaubt die proliferative Vermehrung der Zellen. Bei Zusatz von Methionin wird *MET3p::CDC20* reprimiert und aufgrund der unter diesen Bedingungen fehlenden Transkriptionsaktivität ein mitotischer Arrest induziert. Ausgehend von YAS156 konnte ein zur lichtgesteuerten Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 fähiger Stamm (YAS157) ebenso hergestellt werden wie ein negativer Kontrollstamm (YAS158), der kein *GALI*-Promotor-kontrolliertes *4myc::CDC20* enthält. Wie erwartet erfolgte die Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 in YAS157 unter permissiven Bedingungen (ohne Methioninzusatz) nur, wenn der Zellkultur das Chromophor Phycocyanobilin zugesetzt und sie mit Licht einer Wellenlänge von 660 nm bestrahlt wurde, um die Interaktion der am lichtschtbaren Expressionssystem beteiligten Komponenten PhyB(NT)-GBD und PIF3-GAD zu induzieren (Abbildung 5.11, Seite 87). Im Gegensatz zur temperatursensitiven Mutante YAS51 ist YAS157 in der Lage, unter restriktiven Bedingungen zu wachsen, wenn den Kulturen PCB zugesetzt wird und sie regelmäßig zyklisch mit Rotlicht (660 nm) beleuchtet werden (Abbildung 5.12, Seite 88). Auffällig war dabei, dass auch ohne PCB und/oder Rotlicht einige Spontanmutanten in YAS157

auftraten, die unter restriktiven Bedingungen zum Wachstum fähig sind. Eine Mutation im *MET3*-Promotor, die ein vom Methioningehalt des Mediums unabhängiges Wachstum der Zellen ermöglicht, scheint dafür nicht ursächlich zu sein, da beim Kontrollstamm YAS158 keine Spontanmutanten auftreten. Vermutlich sind diese Mutanten in der Lage, das auf dem Plasmid pAS8 (*GAL1p::4myc::CDC20*) codierte *4myc::CDC20* lichtunabhängig zu transkribieren und somit ihren Wachstumsdefekt zu komplementieren. Ob dies tatsächlich die Ursache ist und wodurch diese Expression ausgelöst wird, blieb im Rahmen dieser Arbeit ungeklärt. Die Frequenz des Erscheinens der Spontanmutanten blieb jedoch um den Faktor  $10^2$  bis  $10^3$  hinter der Frequenz der Kolonienbildungsrate der lichtabhängig wachsenden Zellen zurück, so dass ein signifikanter Einfluss dieser Spontanmutanten auf spätere Messungen zum Verhalten lichtvermittelt erzeugter synchroner Kulturen nicht zu erwarten ist.

In einer durch Methioninzugabe in der Mitose arretierten Flüssigkultur von YAS157 kann die Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 zyklisch lichtabhängig induziert (660 nm) bzw. reprimiert (750 nm) werden (Abbildung 5.13, Seite 90). Bereits nach dem zweiten Beleuchtungszyklus ist dabei ersichtlich, dass nach der Beleuchtung mit Rotlicht (660 nm) der Gehalt an Clb2, einem mitotischen Cyclin, in der Gesamtpopulation abnimmt. Parallel zum Absinken des Clb2-Gehalts nimmt der Anteil an 1C-Zellen an der Gesamtpopulation auf das 1,5-fache zu. Beim unbeleuchteten Kontrollansatz ist keine signifikante Abnahme des Clb2-Gehalts zu verzeichnen, der Anteil an 1C-Zellen bleibt in diesem Fall ebenso konstant. Durch die lichtabhängige Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 kann also der Abschluss der Mitose und somit der Eintritt in die nächste G1-Phase lichtgesteuert induziert werden. Damit konnte die gewünschte Ansteuerung des mitotischen Programms durch lichtinduzierte <sup>4myc</sup>Cdc20-Expression klar erreicht werden. Für eine vollständige Synchronisierung einer YAS157-Kultur über mehrere Zellzyklen hinweg müssen aber die Kultivierungsbedingungen noch optimiert werden. Dabei kann auf verschiedene Größen Einfluss genommen werden. Die Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des lichtschtbaren Promotorsystems zeigen, wie die Verwendung verschiedener Inkubationstemperaturen die Möglichkeit bietet, die Expressionsstärke von <sup>4myc</sup>Cdc20 zu variieren. Auch über die Dauer und Intensität der Beleuchtung sowie die Dauer des mitotischen Arrests könnte die lichtgesteuerte Expression von <sup>4myc</sup>Cdc20 noch besser dem natürlichen Cdc20-Expressionsprofil angepasst werden. Weitere Einflussgrößen sind die Verwendung verschiedener Medien (synthetisches Vollmedium oder Mangelmedium) oder Kohlenstoffquellen und die Variation der dabei verwendeten Nährstoffkonzentrationen, um den zeitlichen Ablauf der Proliferation nach erfolgter <sup>4myc</sup>Cdc20-



Expression zu beeinflussen. Die Durchführung in kontinuierlicher Kultur statt in der Schüttlerkultur, bei der die Nährstoffsituation sehr schwankt, könnte ebenfalls die Synchronizität der Kultur positiv beeinflussen. Ein weiterer Punkt ist die endogene Synthese des Chromophors Phycocyanobilin in *S. cerevisiae*, die dessen Zusatz zum Medium unnötig machen könnte. Die intrinsische Synthese dieses notwendigen Cofaktors wurde bisher nur für *E.coli*-Zellen realisiert (Levskaya *et al.*, 2005).

YAS157 ist ein neu hergestellter *S. cerevisiae*-Stamm, dessen Zellzyklusprogramm künstlich lichtabhängig gesteuert werden kann. Als Eingriffsstelle dient dabei die Kontrolle der Expression des mitotischen Proteins Cdc20. Es stellte sich als nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch hervorragend für diese Anwendung geeignetes Zielprotein heraus. Mit der vorliegenden Arbeit konnte somit der Grundstein für eine völlig neue Art der externen Steuerung des Zellzyklusprogramms gelegt werden, die viele Perspektiven bietet. Denkbar wäre beispielsweise die Verwendung anderer essentieller, an der Zellzyklusprogression beteiligter Proteine als Angriffspunkt genauso wie die Entwicklung weiterer Systeme, die eine lichtgesteuerte gezielte Expression ermöglichen. Der Einsatz anderer Lichtperzeptionssysteme, beispielsweise Blaulichtrezeptoren, könnte den potentiellen Arbeitsrahmen deutlich erweitern, wenn verschiedene zelluläre Prozesse voneinander unabhängig durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge individuell reguliert werden könnten.

Im Vergleich zu allen anderen bisher bei der experimentellen Forschung standardmäßig verwendeten Techniken zur Erzeugung synchroner Populationen von *S. cerevisiae* bietet die Anwendung des lichtschtbaren Expressionssystems von Shimizu-Sato *et al.* (2002) den entscheidenden Vorteil, dass ein regelmäßiger Wechsel der Randbedingungen nur hinsichtlich der Wellenlänge des Lichts nötig ist, der die Kultur ausgesetzt ist. Dies kann ohne in den Stoffwechsel einzugreifen oder die Inkubationstemperatur zu ändern realisiert werden, so dass mit der Anwendung dieses Systems erstmals die Möglichkeit der minimal-invasiven künstlichen Zellzyklussteuerung über mehrere Generationen besteht. Die Realisierung der Anwendung dieser Methode zur externen Steuerung des mitotischen Zellzyklusprogramms gelang im Rahmen dieser Arbeit. Es handelt sich dabei um eine erste konkrete praktische Anwendung des bisher nur anhand der Reporterproteine  $\beta$ -Galactosidase (Shimizu-Sato *et al.*, 2002) und Luciferase (Sorokina *et al.*, 2009) auf seine prinzipielle Funktionalität hin getesteten lichtschtbaren Promotorsystems.

## 7 Literaturverzeichnis

Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Walter, P (2002). Molekularbiologie der Zelle. *WILEY-VCH-Verlag*, 4. Auflage

Alexandru, G, Zachariae W, Schleiffer, A, Nasmyth, K (1999). Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *The EMBO Journal* 18: 2707–2721

Alting-Mees, MA, Short, MA (1989). pBluescriptII: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Research* 17: 9494

Amon, A, Irniger, S, Nasmyth, K (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* 90: 683-693

Ausubel, FM, Kingston, RE, Seidman, FG, Struhl, K, Moore, DD, Brent, R, Smith, FA (1992). Current Protocols in Molecular Biology. *Greene: New York*

Bähler, J (2005). Cell-Cycle Control of Gene Expression in Budding and Fission Yeast. *Annual review of genetics* 39: 69-94

Barral, Y, Jentsch, S, Mann, C (1995). G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Genes & Development* 9: 399-409

Bloom, J, Cross, FR (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8: 149-160

Booher, RN, Deshaies, RJ, Kirschner, MW (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *The EMBO Journal* 12(9): 3417–3426

Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254

Breeden, L (1996). Start-specific transcription in yeast. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 208: 95-127

Calzada, A, Sacristan, M, Sanchez, E, Bueno, A (2001). Cdc6 cooperates with Sic1 and Hct1 to inactivate mitotic cyclin-dependent kinases. *Nature* 412: 355-358

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

Chang, F, Herskowitz, I (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell* 63: 999-1011

- Charvin, G, Cross, FR, Siggia, ED (2008). A Microfluidic Device for Temporally Controlled Gene Expression and Long-Term Fluorescent Imaging in Unperturbed Dividing Yeast Cells. *PloS One* 3(1): e1468.
- Ciosk, R, Zachariae, W, Michaelis, C, Shevchenko, A, Mann, M, Nasmyth, K (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93: 1067-1076
- Davies, D, Allen, P (2007). DNA Analysis by Flow Cytometry. *Flow Cytometry – Principles and Applications, Humana Press Totowa, New Jersey* 165-179
- Day, A, Schneider, C, Schneider, BL (2004). Yeast Cell Synchronization. *Methods in Molecular Biology* 241: 55-76
- De Bruin, RA, McDonald, WH, Kalashnikova, TI, Yates, J III, Wittenberg, C (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* 117: 887-898
- DeSalle, LM, Pagano, M (2001). Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Letters* 490: 179-189
- Deshai, RJ (1995). Phosphorylation and proteolysis: partners in the regulation of cell division in budding yeast. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 7-16
- Deshai, RJ, Chau, V, Kirschner, M (1995). Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. *The EMBO Journal* 14: 303-312
- Diffley, JF, Labib, K (2002). The chromosome replication cycle. *Journal of cell science* 115: 869-872
- Diffley, JF (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Current Biology* 14: R778-R786
- Dirick, L, Boh, T, Nasmyth, K (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 14: 4803-4813
- Donovan, S, Harwood, J, Drury, LS, Diffley, JF (1997). Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 5611-5616
- Espinoza, FH, Farrell, A, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Morgan, DO (1996). A Cyclin-Dependent Kinase-Activating Kinase (CAK) in Budding Yeast Unrelated to Vertebrate CAK. *Science* 273: 1714-1717
- Futcher, B (1996). Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. *Yeast* 12: 1635-1646
- Futcher, B (1999). Cell cycle synchronization. *Methods in Cell Science* 21: 79-86

- Gietz, RD, Woods, RA (2002). Transformation of yeast by the Liac/ss carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350: 87-86
- Güldener, U, Heinisch, J, Köhler, GJ, Voss, D, Hegemann, JH (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 30(6): e23
- Guthrie, C, Fink, GR (1991): Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *San Diego*
- Hanahan, D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580
- Hartwell, LH, Culotti, J, Reid, B (1970). Genetic Control of the Cell-Division Cycle in Yeast. I. Detection of Mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 66: 352-359
- Hartwell, LH, Weinert, TA (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634
- Henchoz, S, Chi, Y, Catarin, B, Herskowitz, I, Deshaies, RJ, Peter, M (1997). Phosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes & Development* 11: 3046-3060
- Hershko, A, Ciechanover, A (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67: 425-479
- Hilt, W (2004). Targets of programmed destruction: a primer to regulatory proteolysis in yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 1615-1632
- Holmes, DS, Quigley, M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114: 193-197
- Hoyt, MA (2000). Exit from Mitosis: Spindle Pole Power. *Cell* 102: 267-270
- Huang, JN, Park, I, Ellingson, E, Littlepage, LE, Pellmann, D (2001). Activity of the APC(Cdh1) form of the anaphase-promoting complex persists until S phase and prevents the premature expression of Cdc20p. *The Journal of Cell Biology* 154: 85-94
- Humphrey, T, Pearce, A (2005). Cell Cycle Molecules and Mechanisms of the Budding and Fission Yeasts. *Methods in Molecular Biology* 296: 3-29
- Inoue, H, Nojima, H, Okayama, H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- Irniger, S (2002). Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Letters* 532: 7-11

- Jaspersen, SL, Charles, JF, Morgan, DO (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Current Biology* 9: 227-236
- King, RW, Peters, JM, Tugendreich, S, Rolfe, M, Hieter, P, Kirschner, MW (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81: 279-288
- Koch, C, Nasmyth, K (1994). Cell cycle regulated transcription in yeast. *Current Opinion in Cell Biology* 6: 451-459
- Labib, K, Diffley, JF (2001). Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Current Opinion in Genetics & Development* 11: 64-70
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Leatherwood, J (1998). Emerging mechanisms of eukaryotic DNA replication initiation. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 742-748
- Levskaya, A, Chevalier, AA, Tabor, JJ, Simpson, ZB, Lavery, LA, Levy, M, Davidson, EA, Scouras, A, Ellington, AD, Marcotte, EM, Voigt, CA (2005). Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature* 438: 441-442
- Lew, DJ, Burke, DJ (2003). The Spindle Assembly and Spindle Position Checkpoints. *Annual review of genetics* 37: 251-282
- Lew, DJ, Weinert, T, Pringle, JR (1997). Cell Cycle Control in *Saccharomyces cerevisiae*. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces – Cell Cycle and Cell Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 607-695
- Liang, C, Weinreich, M, Stillman, B (1995). ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell* 81: 667-676
- Lim, HH, Loy, CJ, Zaman, S, Surana, U (1996). Dephosphorylation of threonine 169 of Cdc28 is not required for exit from mitosis but may be necessary for Start in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 16: 4573-4583
- Maya, D, Quintero, MJ, Munoz-Centeno, MdC, Chávez, S (2008). Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 30: 979-987
- McInerny, CJ (2001). Cell Cycle Regulated Gene Expression in Yeasts. *Advances in Genetics* 73: 51-85
- Mendenhall, MD (1993). An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 259: 216-219
- Moll, T, Tebb, G, Surana, U, Robitsch, H, Nasmyth, K (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66: 743-758

- Morgan, DO (1997). Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131
- Morgan, DO (2007). The Cell Cycle – Principles of Control. *Primers in Biology, Oxford University Press*
- Nguyen, VQ, Co, C, Irie, K, Li, JJ (2000). Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Current Biology* 10: 195-205
- Nguyen, VQ, Co, C, Li, JJ (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* 411: 1068-1073
- Pan, J, Chen, RH (2004). Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* 18: 1439-1451
- Perkins, G, Drury, LS, Diffley, JFX (2001). Separate SCF<sup>CDC4</sup> recognition elements target Cdc6 for proteolysis in S phase and mitosis. *The EMBO Journal* 20: 4836–4845
- Peter, M, Herskowitz, I (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265: 1228-1231
- Peters, JM (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 759-768
- Peters, JM (2002). The Anaphase-Promoting Complex: Proteolysis in Mitosis and Beyond. *Molecular Cell* 9: 931–943
- Peters, JM (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7: 644-656
- Phizicky, EM, Fields, S (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews* 59: 94-123
- Pic-Taylor, A, Darieva, Z, Morgan, BA, Sharrocks, AD (2004). Regulation of cell cyclespecific gene expression through cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation of the forkhead transcription factor Fkh2p. *Molecular and cellular biology* 24: 10036-10046
- Pirner, HM, Stolz, J (2006). Biotin sensing in *S. cerevisiae* is Mediated by a Conserved DNA Element and Requires the Activity of Biotin-Protein Ligase. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 12381-12389
- Piatti, S, Böm, T, Cocker JH, Diffley, JF, Nasmyth, K. Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes & Development* 10: 1516-1531.
- Polymenis, M, Schmidt, EV (1997). Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes & Development* 11: 2522-2531

- Reihl, P, Stolz, J (2005). The Monocarboxylate Transporter Homolog Mch5p Catalyzes Riboflavin (Vitamin B2) Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 39809-39817
- Rodrigo-Brenni, MC, Morgan, DO (2007). Sequential E2s Drive Polyubiquitin Chain Assembly on APC Targets. *Cell* 130: 127-139
- Rudner, AD, Murray, AW (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase promoting complex. *The Journal of Cell Biology* 149: 1377-1390
- Sambrook, J, Russel, DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, 3rd edition
- Schneider, BL, Yang, QH, Futcher, AB (1996). Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* 272: 560-562
- Schwab, M, Neutzner, M, Mocker, D, Seufert, W (2001). Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *The EMBO Journal* 20: 5165-5175
- Schwab, M, Schulze Lutum, A, Seufert, W (1997). Yeast Hct1 Is a Regulator of Clb2 Cyclin Proteolysis. *Cell* 90: 683-693
- Schwob, E, Bohm, T, Mendenhall, MD, Nasmyth, K (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79: 233-244
- Shimizu-Sato, S, Huq, E, Tepperman, JM, Quail, PH (2002): A Light-switchable Gene Promoter System. *Nature Biotechnology* 20(10): 1041-1044
- Sikorski, RS, Hieter, P (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27
- Skowyra, D, Craig, KL, Tyers, M, Elledge, SJ, Harper, JW (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91: 202-219
- Sorokina, O, Kapus, A, Terecskei, K, Dixon, LE, Kozma-Bognar, L, Nagy, F, Millar, AJ (2009). A switchable light-input, light-output system modelled and constructed in yeast. *Journal of Biological Engineering* 3: 15
- Spitzner, A, Perzmaier, AF, Geillinger, KE, Reihl, P, Stolz, J (2008): The Proline-Dependent Transcription Factor Put3 Regulates the Expression of the Riboflavin Transporter MCH5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180(4): 2007-2017
- Stuart, D, Wittenberg, C (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes & Development* 9: 2780-2794
- Su, NY, Flick, K, Kaiser, P (2005). The F-Box Protein Met30 Is Required for Multiple Steps in the Budding Yeast Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology* 25: 3875-3885

- Tanaka, S, Diffley, JF (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nature Cell Biology* 4: 198-207
- Tanaka, T, Knapp, D, Nasmyth, K (1997). Loading of an MCM protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell* 90: 649-660
- Tercero, JA, Labib, K, Diffley, JF (2000). DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *The EMBO Journal* 19: 2082-2093
- Thomas, BJ, Rothstein, R (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*: 56: 619-630
- Towbin, H, Staehelin, T, Gordon, J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76: 4350-4354
- Tyers, M, Jorgensen, P (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics & Development* 10: 54-64
- Tyers, M, Tokiwa, G, Nash, R, Futcher, B (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *The EMBO Journal* 11: 1773-1784
- Visintin, R, Craig, K, Hwang, ES, Prinz, S, Tyers, M, Amon, A (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular Cell* 2: 709-718
- Visintin, R, Prinz, S, Amon, A (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278: 460-463
- Walker, GM (1999). Synchronization of yeast cell populations. *Methods in Cell Science* 21: 87-93
- Wäsch, R, Cross, FR (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418: 556-562
- Willems, AR, Lanker, S, Patton, EE, Craig, KL, Nason TF, Mathias, N, Kobayashi, R, Wittenberg, C, Tyers, M (1996). Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 86: 453-463
- Wittenberg, C, Sugimoto, K, Reed, I (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell* 62: 225-237
- Zachariae, W, Nasmyth, K (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase promoting complex. *Genes & Development* 13: 2039-2058



---

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name Andrea Merbitz geb. Spitzner  
Geburtsdaten 08.12.1978 in Dresden  
Kontaktinformation E-Mail: [ibc08205@ibc.uni-stuttgart.de](mailto:ibc08205@ibc.uni-stuttgart.de)  
Familienstand verheiratet

### wissenschaftlicher Werdegang

seit 01/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut Magdeburg (50 %)  
02/2008 - 09/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Stuttgart (50 %)  
09/2006 - 01/2008 Doktorandin am Max-Planck-Institut Magdeburg

### Studium

10/2006 - 09/2011 Promotionsstudium an der Universität Stuttgart  
10/2001 - 07/2006 Studium der Biologie an der Universität Regensburg  
Diplomarbeit: „Untersuchungen zum Stoffwechsel von Riboflavin in *Saccharomyces cerevisiae*“  
Abschluss: Dipl.-Biologe  
10/1997 - 09/2001 Studium der Humanmedizin an der TU Dresden

### Schulbildung

08/1991 - 07/1997 Gymnasium Dresden-Blasewitz mit vertieft mathematisch-naturwissenschaftlichem Profil, Abschluss: Abitur  
09/1987 - 07/1991 45. EOS Dresden mit erweitertem Fremdsprachenunterricht  
09/1985 - 08/1987 120. POS Dresden

### Sprachkenntnisse

Englisch – fließend in Wort und Schrift  
Russisch – Grundkenntnisse  
Spanisch – Grundkenntnisse

### Publikation

Spitzner, A, Perzlmaier, AF, Geillinger, KE, Reihl, P, Stolz, J (2008): The Proline-Dependent Transcription Factor Put3 Regulates the Expression of the Riboflavin Transporter *MCH5* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180(4): 2007-2017