

**Analyse der F-box-Funktion von Rca1
in *Drosophila melanogaster***



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

**vorgelegt von
Martina Frank
aus Aschaffenburg**

im Jahr 2013

Promotionsgesuch eingereicht am: 26.11.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Frank Sprenger

Für meine Eltern und meinen Opa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung	1
1.1 Der Zellzyklus.....	1
1.2 Der Zellzyklus in der Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.3 Das Zellzyklus-Kontrollsystem	5
1.3.1 Initiierung und Ablauf der Mitose	6
1.3.2 Der Anaphase Promoting Complex (APC/C).....	8
1.3.3 Einleitung und Aufrechterhaltung der G1-Phase	10
1.3.4 Die Regulation des G1-S-Übergangs.....	10
1.3.5 Proteinabbau durch SCF-Komplexe.....	11
1.3.6 Initiierung und Regulation der DNA-Replikation.....	13
1.4 Der Zellzyklusregulator Rca1	14
1.4.1 Die Rca1/Emi1 – Familie	14
1.4.2 F-box-abhängige Funktion von Rca1 am G1-S-Übergang.....	16
1.4.3 Die Funktion von Rca1 in postmitotischen Zellen	17
2 Zielsetzung	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Analyse der F-box-Funktion in <i>Drosophila</i> -Embryonen	19
3.1.1 Analyse der <i>rca1</i> -Allelen.....	19
3.1.2 Analyse transgener Fliegen, die Rca1 unter dem endogenen Promoter exprimieren..	22
3.1.3 Analyse von HA-Rca1ΔF-box unter Kontrolle der genomischen Region im Embryo.....	26
3.1.4 Dacapo als mögliches Substrat eines SCF ^{Rca1} -Komplexes.....	27
3.2 Analyse von Rca1 in S2R+-Zellen.....	33
3.2.1 Die Überexpression von Rca1 führt zu einer Verkürzung der G1-Phase.....	33
3.2.2 Die Rolle von F-box und Zinkbinderegion auf den G1-S-Übergang in S2R+-Zellen	40
3.2.3 Analyse von Mutationen innerhalb des F-box-Motivs	46
3.3 Interaktion von Rca1 mit SkpA	49
3.3.1 Interaktionsstudien mittels Yeast 2 Hybrid	49
3.3.2 Biochemische Interaktion von SkpA und Rca1	51
3.4 Die Rolle der KEN-box am G1-S-Übergang	53
3.5 Die APC/C-Inhibitionsfähigkeit von verschiedenen Rca1-Konstrukten.....	55
3.6 Identifikation von Substraten des SCF ^{Rca1} -Komplexes.....	60
3.6.1 Die Überexpression von 10xHA-Rca1 bewirkt eine Abnahme von GFP-Dacapo.....	60

3.6.2	Die Überexpression von 10xHA-Rca1 kann den Zellzyklusarrest in G1 aufheben	63
3.6.3	In Abwesenheit von Rca1 findet eine Stabilisierung von Dacapo statt.....	65
3.6.4	Identifikation von Cdk-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Dacapo.....	67
3.7	Nickel NTA Präzipitation für <i>in vivo</i> Ubiquitinylierungsassay.....	71
4	Diskussion	75
4.1	APC/C-Inhibition benötigt die F-box-Funktion im 16. Zellzyklus in der Embryogenese.....	75
4.2	Allelspezifische genetische Interaktion von Rca1 und Dacapo	77
4.3	Ektopische S-Phaseninduktion durch Rca1-Überexpression benötigt die F-box und APC/C- Interaktionsmotive	79
4.4	F-box-abhängiger Abbau des Zellzyklusregulators Dacapo durch SCF ^{Rca1}	80
4.5	Die APC/C ^{Fzr} Inhibition benötigt ebenfalls die F-box-Funktion am G2-M-Übergang in S2R+- Zellen	82
5	Materialien.....	85
5.1	Chemikalien	85
5.2	Enzyme und Proteine	87
5.3	Antikörper	88
5.3.1	Primäre Antikörper.....	88
5.3.2	Sekundäre Antikörper	88
5.4	Verbrauchsmaterialien.....	88
5.5	Puffer, Lösungen und Medien	90
5.5.1	Medien und Agarplatten	90
5.5.2	Puffer und Lösungen	93
5.6	Oligonukleotide	95
5.7	Plasmide	97
5.8	Hefestämme	99
5.9	Fliegenstämme	100
5.10	Geräte und Software	101
5.10.1	Geräte.....	101
5.10.2	Software	102
6	Methoden.....	103
6.1	Molekularbiologische Methoden	103
6.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	103
6.1.2	Restriktionshydrolyse von DNA.....	103
6.1.3	Dephosphorylierung.....	104
6.1.4	Erstellung von glatten DNA-Enden.....	104
6.1.5	Gelelektrophorese von DNA.....	104
6.1.6	Aufreinigung von DNA.....	105
6.1.7	Ligation	105
6.1.8	Herstellung kompetenter Zellen	105

6.1.9	Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation	106
6.1.10	Plasmidschnellisolierung	106
6.1.11	Plasmid Midi-Präparation.....	106
6.1.12	Ortsspezifische Mutagenese-PCR.....	107
6.1.13	Bestimmung der Konzentration einer DNA-Lösung mittels Photometer.....	108
6.1.14	Bestimmung der Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	108
6.1.15	<i>in vitro</i> Transkription für RNAi.....	108
6.1.16	Sequenzierung.....	109
6.2	Methoden in der Zellkultur	109
6.2.1	Kultivierung von <i>Drosophila</i> Schneiderzellen.....	109
6.2.2	Splitten von Zellen.....	109
6.2.3	Zellzahlbestimmung	110
6.2.4	Aussäen und Transfektion von Schneiderzellen.....	110
6.2.5	Einfrieren von Zellen	111
6.3	Mikroskopie.....	111
6.3.1	Mikroskopsystem	112
6.3.2	Vorbereitung der Zellen	112
6.3.3	Bedingungen am Mikroskop.....	112
6.3.4	Prozessierung der Daten	113
6.4	Proteinanalytische Methoden.....	113
6.4.1	Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	113
6.4.2	Präzipitation mithilfe von Nickel-NTA-Agarose.....	114
6.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) , Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	114
6.5	Yeast-2-Hybrid.....	115
6.5.1	Hefetransformation.....	116
6.5.2	X-Gal-Farbassay	116
6.5.3	Wachstumstest.....	117
6.6	Durchflusszytometrie	117
6.7	<i>Drosophila</i> -Methoden	118
6.7.1	Fliegenhaltung und Zucht.....	118
6.7.2	Sammeln und Dechorionisierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen.....	118
6.7.3	Vorbereitung der DNA für die DNA-Mikroinjektion	119
6.7.4	Herstellung transgener Fliegen	119
6.7.5	Herstellung von rekombinanten Fliegen	120
6.7.6	Fixierung von <i>Drosophila</i> Embryonen	120
6.7.7	Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> Embryonen	121
7	Literatur	122

8	Abstract	137
9	Anhang	139
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	139
9.2	Einbuchstabencode der Aminosäuren.....	141
9.3	Makros für <i>live cell imaging</i>	141
10	Danksagung	147
11	Eidesstattliche Erklärung	149
12	Lebenslauf	150

Zusammenfassung

Rca1 ist ein wichtiger Inhibitor für die Ubiquitin-E3-Ligase APC/C mit dem Aktivatorproteine Fzr (*Fizzy-related*, ortholog zu Cdh1), vor allem in der G2-Phase des Zellzyklus, und ermöglicht die Akkumulation von Cyclinen für die darauffolgende Mitose. Embryonen, die die *rca1*-Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474} tragen, arretieren deshalb im Zellzyklus 16 und können nicht in die Mitose 16 eintreten. Durch Überexpression von Rca1 und Rca1 mit deletierter F-box (Rca1ΔF-box) konnte dieser Phänotyp komplementiert werden. In dieser Arbeit wurde die genomische Region von *rca1* kloniert, um die Analyse mit endogenen Mengen von Rca1 und Rca1 ohne F-box weiterzuführen. Die Expression von Rca1ΔF-box unter Kontrolle dieser Region konnte den Phänotyp jedoch im Vergleich zu der Überexpression nicht komplementieren. Rca1 interagiert mit SkpA und ist deshalb vermutlich Teil eines SCF-Komplexes. Ein mögliches Substrat ist Dacapo, ein Cyclin E/Cdk2 Inhibitor. Aus diesem Grund wurden rekombinante Fliegenstämme hergestellt, die neben den *rca1*-Allelen das *dap*⁶-Allel auf dem zweiten Chromosom tragen. Dabei zeigen sich unterschiedliche Phänotypen für die beiden *rca1*-Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474}. Die kodierende Region von *rca1*² enthält einen Austausch der Aminosäure A344T unmittelbar vor der Zinkbinderegion, die für die APC/C-Inhibition notwendig ist. *rca1*² *dap*⁶ Embryonen durchlaufen wie *dap*⁶ mutante Embryonen einen zusätzlichen 17. Zellzyklus. In der kodierenden Region von *rca1*^{C1474} ist ein Aminosäureaustausch innerhalb des F-box-Motivs vorhanden. *rca1*^{C1474} *dap*⁶ mutante Embryonen zeigen den *rca1*-mutanten Phänotyp und arretieren in der G2-Phase im 16. Zellzyklus. Die F-box-Funktion ist also bei endogenen Rca1-Mengen am G2-M-Übergang des 16. Zellzyklus notwendig.

Die Überexpression von Rca1 während der Augenentwicklung führt zu ektoptischen S-Phasen und einem rauen Augenphänotyp. Dieser Phänotyp zeigt einen ebenfalls F-box-abhängigen Effekt am G1-S-Übergang. Durch die Lebendzellbeobachtung von S2R+-Zellen, die 4xFLAG-Rca1 überexprimieren, konnte gezeigt werden, dass diese Zellen vorzeitig in die G1-Phase eintreten. Da Rca1 vermutlich einen SCF^{Rca1}-Komplex ist und den Abbau eines negativen Regulators des G1-S-Übergangs vermitteln könnte, wurden durch Überexpression verschiedener 4xFLAG-Epitop-markierter Rca1-Derivate und einem *in vivo* APC/C-Inhibitionsassay, der Einfluss verschiedener funktioneller Domänen auf den G1-S-Übergang überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion von Rca1 am G1-S-Übergang sowohl durch die Funktion von Rca1 in einem SCF^{Rca1}-Komplex als auch durch die APC/C^{Fzr}-Inhibition zustande kommen könnte.

Es wurde außerdem durch die Überexpression verschiedener 4xFLAG-Rca1-Derivate der Einfluss auf die Stabilität von GFP-markiertem Dacapo untersucht, um festzustellen, ob Dacapo ein Substrat des SCF^{Rca1}-Komplexes sein könnte. Es konnte eine F-box-abhängige Verringerung von GFP-Dacapo um ca.

50 % im Durchflusszytometer beobachtet werden. Außerdem konnte der durch Überexpression von GFP-Dacapo induzierte G1-Arrest F-box-abhängig durch die Überexpression von 10xHA-Rca1 aufgehoben werden. Bei der Abreicherung von Rca1 durch RNAi konnte außerdem eine Stabilisierung von GFP-Dacapo erzielt werden.

Dacapo kommt demnach als Substrat eines SCF^{Rca1}-Komplexes in Frage. Dieser Komplex könnte sowohl in die Regulation des APC/C am G2-M-Übergang involviert sein, indem er die Aktivität von Cyclin E/Cdk2 als Regulator des APC/C neben Cyclin A/Cdk1 und Rca1 beeinflusst, als auch am G1-S-Übergang, wo er den Abbau von Dacapo als negativen Regulator des G1-S-Übergangs vermitteln könnte.

1 Einleitung

1.1 Der Zellzyklus

Die Vermehrung von Zellen ist ein fundamentaler Prozess für alle Lebewesen. Es ist ein Zusammenspiel aus Zellwachstum und Zellteilung. Bestehende Zellen teilen sich und geben die gleiche genetische Information an ihre Tochterzellen weiter. Diese Weitergabe der Erbinformation ist eine grundlegende Voraussetzung für den Fortbestand des Lebens.

In einzelligen Organismen führt die Zellteilung zu der Entstehung eines neuen Organismus. In mehrzelligen Organismen dagegen entsteht ein neuer Organismus aus einer befruchteten Eizelle, die sich unzählige Male teilt und somit Gewebe und Organe bildet. Die Zellteilung ist in mehrzelligen Organismen nicht nur während der Entwicklung wichtig, sondern auch für die Erneuerung von einzelnen Zellen, wie z.B. bei der Hämatopoese, aber auch bei Geweben, wie dem Haut- oder Darmepithel.

Die Duplikation der DNA und die eigentliche Zellteilung können nicht gleichzeitig ablaufen. Es ist daher besonders wichtig, dass diese beiden Prozess regulativ aufeinander abgestimmt sind. Die einzelnen aufeinander folgenden Ereignisse müssen in der richtigen Reihenfolge ablaufen, um die genetische Stabilität über Generationen zu gewährleisten und sind deshalb sehr streng reguliert. Diese Abfolge von DNA-Duplikation und eigentlicher Zellteilung wird Zellzyklus genannt.

Das Zellzykluskontrollsystem ist dabei ein komplexes Netzwerk, das auf extrinsische und intrinsische Faktoren reagiert und die Abläufe während des Zellzyklus reguliert. Der Ernährungszustand eines Organismus, Wachstumsfaktoren, Zelldichte und Entwicklungsstand fördern oder hemmen die Zellteilung, den Austritt aus dem Zellzyklus oder die Apoptose. Störungen in diesem komplexen System können zu unkontrolliertem Zellwachstum oder Zellproliferation führen und die genetische Stabilität gefährden. Eine Konsequenz daraus kann das Entstehen oder das Wachstum von Tumoren sein.

Der Zellzyklus unterteilt sich in verschiedene Phasen. Grob unterteilt sich der Zellzyklus in 2 Phasen: die Interphase und die Mitose. In der Interphase findet Zellwachstum statt und das Erbgut wird dupliziert, welches dann anschließend in der Mitose auf die sich neu bildenden Tochterzellen verteilt wird.

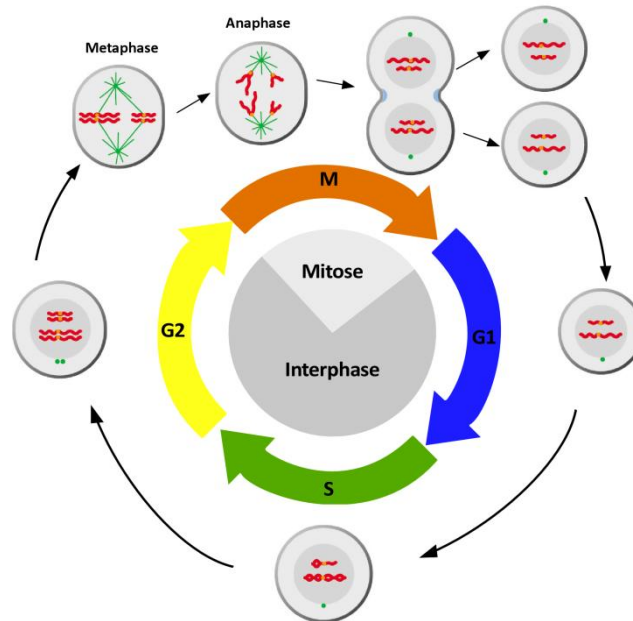


Abbildung 1.1: Der Standard-Zellzyklus

Der Standard-Zellzyklus besteht aus 4 Phasen. In der G1-Phase bereitet sich die Zelle auf die DNA-Synthese in der S-Phase vor. In der G2-Phase werden dagegen Vorkehrungen für die nachfolgende Mitose getroffen. Die Chromosomen lagern sich in der Metaphaseplatte an (Metaphase) und die Schwesterchromatiden werden dann auf die neu gebildeten Tochterzellen verteilt (Anaphase). Anschließend findet die Zytokinese statt.
 verändert nach Morgan, 2006

Die Interphase lässt sich in einem Standard-Zellzyklus in weitere distinkte Phasen unterteilen: G1- (*Gap1*), S- (Synthese) und G2- (*Gap2*) Phase. Auf die G2-Phase folgt dann die M- (Mitose) Phase (Abbildung 1.1).

Die eigentliche Zellteilung findet in der M-Phase statt. Diese besteht aus der Mitose und der Zytokinese. In der G1-Phase bereitet sich die Zelle auf die Synthesephase vor und gewinnt an Masse. Sie ist zu diesem Zeitpunkt hochmetabolisch aktiv, d.h. sie dupliziert Zellorganellen und stellt Proteine her, die für die DNA-Synthese gebraucht werden. Die G1-Phase wird von der S-Phase gefolgt, in der die Replikation der DNA stattfindet. Hierbei werden alle Chromosomen dupliziert. Während der G2-Phase gewinnt die Zelle erneut an Größe und die für die Zellteilung wichtigen Proteine werden synthetisiert.

In der Mitose findet dann die eigentliche Teilung der Chromosomen, des Zellkerns und der Zelle selbst statt. Sie kann aufgrund von morphologischen Kriterien weiter unterteilt werden. Zu Beginn findet eine Kondensation des Chromatins statt und die hochgeordneten und hochkondensierten Chromosomen werden gebildet. Dieser Abschnitt wird als Prophase bezeichnet. In der anschließenden Prometaphase wird der Zusammenbruch der Kernmembran eingeleitet.

Während der Metaphase liegen die Chromosomen in ihrer höchsten Kondensation vor und werden mithilfe der mitotischen Spindel in der Äquatorialebene ausgerichtet. In der Anaphase löst sich die Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden und sie werden in Richtung der Spindelpole gezogen. In der nachfolgenden Telophase findet die Dekondensation der Chromatiden statt, die auch

während der Interphase noch andauert. Abgesehen davon kommt es zur Bildung einer neuen Kernhülle. Im Anschluss erfolgt die Zytokinese, in der die eigentliche Trennung in zwei Tochterzellen stattfindet, die dann das komplett duplizierte adulte Genom beinhalten (Abbildung 1.1).

1.2 Der Zellzyklus in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* treten während der Entwicklung verschiedenste Zellzyklen auf. Allein während der Embryogenese können drei unterschiedliche Zellzyklen beobachtet werden. Zu Beginn der Embryogenese finden ausschließlich Kernteilungen in der Mitte des Embryos statt. S-Phase und Mitose wechseln sich nacheinander ab, sodass innerhalb von kurzer Zeit 13 Kernteilungen in einem gemeinsamen Zytoplasma erfolgen (Zalokar, 1976; Foe und Alberts, 1983; Rabinowitz, 1942). Die Proteine, die für diese Phasen benötigt werden, stammen aus der maternalen Kontribution in Form von mRNA oder Proteinen, die im Ei deponiert wurden, und sind unabhängig von der zygotischen Transkription. Die Interphase verlängert sich schrittweise mit den späten synzytialen Teilungen und eine erste G2-Phase folgt nach der S-Phase in Zellzyklus 14 (Lee und Orr-Weaver, 2003; Edgar und O'Farrell, 1989; Edgar und O'Farrell, 1990). Außerdem wandern drei Viertel der Zellkerne an die Peripherie (Foe und Alberts, 1983) und es findet die Zellularisierung statt. Dieses Stadium wird zelluläre Blastula genannt. Die restlichen Zellkerne entwickeln sich zu Dotternuclei und treten nach der 10. Teilung aus dem Zellzyklus aus. Diese Zellen initiieren Endoreplikation oder Endozyklen, eine Abfolge aus S- und G-Phase (ohne Mitose), bei der der DNA-Gehalt stark ansteigt (Edgar und Orr-Weaver, 2001; Lilly und Duronio, 2005). Während der blastodermalen Teilungen (Zellzyklus 14-16) ist der Zeitraum der G2-Phase in verschiedenen Geweben unterschiedlich lang, je nach dem Entwicklungsprogramm einzelner Zellgruppen findet eine Unterteilung in 25 mitotische Domänen statt (Foe, 1989). In diesem Zeitraum findet auch die erste zygotische Transkription statt (Merrill *et al.*, 1988; Wieschaus und Sweeton, 1988). Nach der Mitose im 16. Zellzyklus wird die erste G1-Phase ausgebildet (Edgar und O'Farrell, 1990). Die meisten Zellen verlassen dann den Zellzyklus und arretieren in dieser G1-Phase (Edgar und O'Farrell, 1990) (Abbildung 1.2). Die Zellen des Nervensystems teilen sich jedoch im Rhythmus S-, G2- und M-Phase weiter (Lee und Orr-Weaver, 2003).

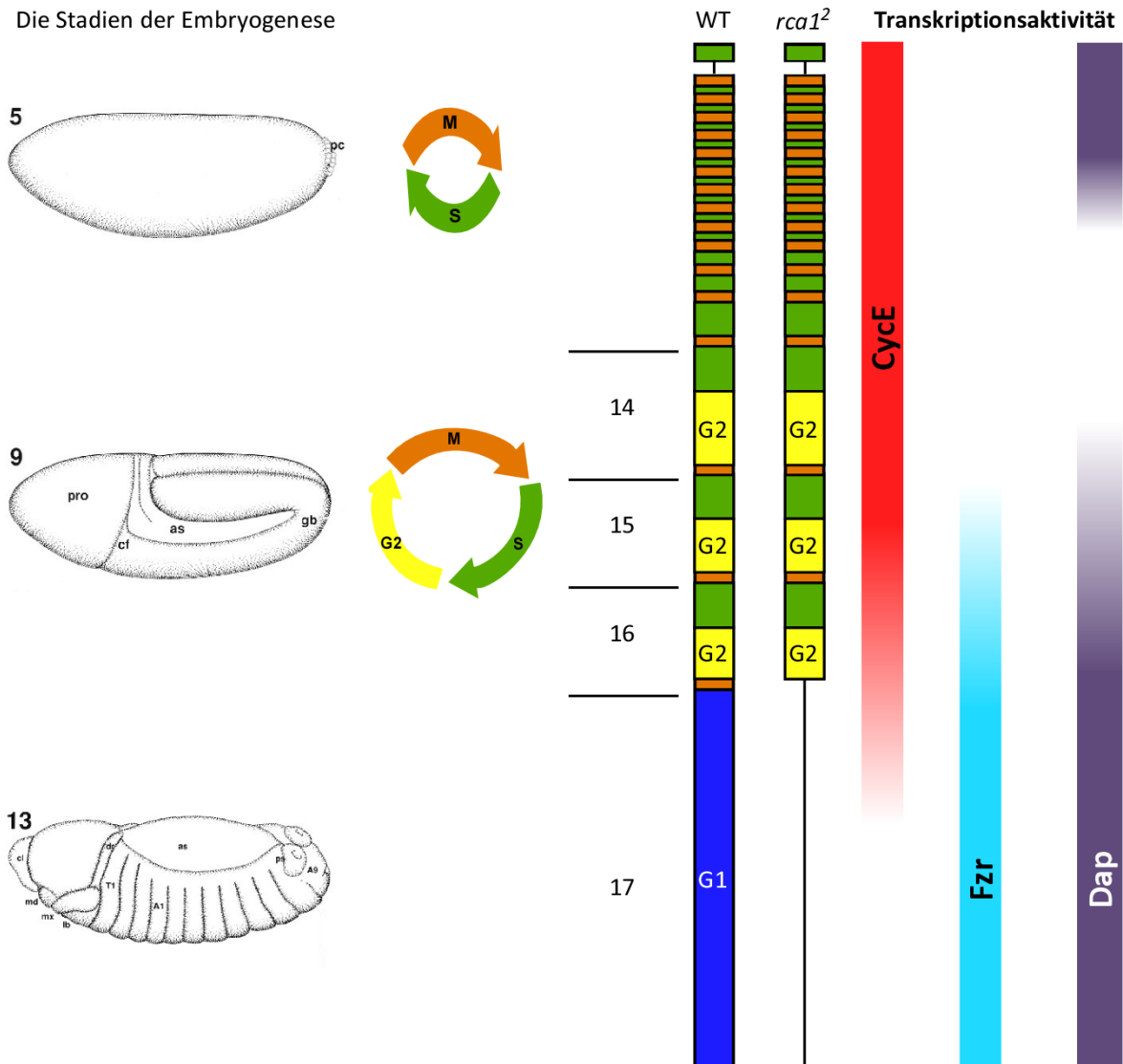


Abbildung 1.2: Übersicht über die Zellzyklen während der Embryogenese und die Expression verschiedener Proteine.

Bis einschließlich Zellzyklus 13 finden Kernteilungen statt, bei denen sich S- und M-Phase abwechseln. Während der Zellzyklen 14-16 gehen die Zellen nach der Mitose durch die G2-Phase. Nach Zellzyklus 16 verlassen die meisten Zellen den Zellzyklus und arretieren in der G1-Phase. Nur wenige Zellen teilen sich danach weiter.

Zu Beginn ist die Transkriptionsaktivität von *cyclin E* sehr hoch (Tomancak *et al.*, 2002; Tomancak *et al.*, 2007), das durch die maternale Kontribution bereit gestellt wird. Auch *dacapo* mRNA ist vorhanden (Tomancak *et al.*, 2002; Tomancak *et al.*, 2007). Die Transkriptionsaktivität von *cyclin E* verringert sich im Laufe der Embryogenese. Die Transkription von *fzr* und *dacapo* beginnt während der blastodermalen Teilungen.

Abbildung verändert nach Campos Ortega und Hartenstein, 1993

Eine Gruppe von Zellen differenziert zu larvalen Geweben und teilt sich ebenfalls weiter. In diesen Zellzyklen wechseln sich S- und G-Phasen ab. Dadurch werden diese Zellen polyloid und es findet ein enormes Wachstum dieser Zellen und der gesamten Larve statt.

Die Zellen, die später zu adultem Gewebe differenzieren, werden bereits während der Embryogenese festgelegt. Dabei handelt es sich um Imaginalscheiben und abdominale Histoblasten. Die Imaginalscheibenzellen teilen sich in einem Zellzyklus mit G1-, S-, G2- und M-Phase (

Abbildung 1.2) und differenzieren später zu adulten Strukturen aus. Die Histoblasten dagegen arretieren in G2. Einige wenige adulte Zellgruppen teilen sich später endozyklisch und bilden Speicheldrüsen, Darm und Fettkörper (Smith und Orr-Weaver, 1991; Lee und Orr-Weaver, 2003).

1.3 Das Zellzyklus-Kontrollsystem

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch transkriptionale Kontrollen und unterschiedliche posttranslationale Modifikationen, die eine schnelle Abfolge verschiedener Zellzyklusphasen erlaubt. Bei posttranslationalen Modifikationen findet z.B. ein Wechselspiel aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung, Polyubiquitylierung und Deubiquitylierung statt, die den Abbau von Regulatoren vermitteln. Nach dem Abbau können diese Regulatoren nach Bedarf neu synthetisiert werden. Durch diese Prozesse kommt eine Oszillation von Zellzyklus-Regulatoren zustande und der Zellzyklus bekommt eine unidirektionale und irreversible Richtung. Außerdem wird gewährleistet, dass das Genom nur einmal und vollständig repliziert wird.

Es gibt dafür 3 wichtige Kontrollpunkte oder regulatorische Übergänge im Zellzyklus, an denen der Fortgang angehalten werden kann, um auf fehlerhafte Abläufe zu reagieren. Wenn die Wachstumsbedingungen ideal sind, tritt die Zelle in den Zellzyklus ein, durchläuft den Startpunkt und der G1-S-Kontrollpunkt wird passiert. Der Eintritt in die Mitose wird am G2-M-Übergang kontrolliert. Der letzte Kontrollpunkt ist innerhalb der Mitose am Metaphase-Anaphase-Übergang.

Das Kernstück in der Regulation findet über die oszillierende Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, Cdks) statt. Durch die Enzymaktivität dieser Kinasen kann der Phosphorylierungszustand von Proteinen sehr schnell verändert und somit ihre Aktivität beeinflusst werden. Die Menge der Cdks in den Zellen bleibt dabei während des gesamten Zellzyklus konstant. Die Regulation findet über die regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, statt. Die Oszillation der Cycline stimuliert die katalytische Aktivität der Cdks.

Die Cdks werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Es werden G1-, G1-S- und S-Phase-Cdks, sowie mitotische Cdks unterschieden. In *Drosophila* bilden D-Typ Cycline mit Cdk4 einen Komplex und regulieren das Fortschreiten durch die G1-Phase. Der Cyclin E/Cdk2-Komplex ist wichtig am G1-S-Übergang und für die Initiation der S-Phase. Cyclin A/Cdk2 reguliert das Fortschreiten durch die S-Phase und Cyclin A, B und B3 zusammen mit Cdk1 den Eintritt in die Mitose (Edgar und Lehner, 1996; Sherr *et al.*, 1999; Morgan, 2006)

Die Cyclin/Cdk-Komplexe werden wiederum über aktivierende oder inhibitorische Phosphorylierung oder Dephosphorylierung reguliert oder es findet eine Regulation über Cdk-Inhibitor-Proteine statt.

1.3.1 Initiierung und Ablauf der Mitose

Für den G2-M-Übertritt wird eine hohe Cdk1-Aktivität benötigt. Diese Aktivität kommt durch Cyclin A/Cdk1 und Cyclin B/Cdk1 zustande. Für die vollständige Aktivierung benötigt der Cyclin/Cdk1-Komplex eine aktivierende Phosphorylierung in der Nähe des aktiven Zentrums. Diese Phosphorylierung wird durch sogenannte *Cdk-activating kinases* (CAKs) ausgeführt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Bindung der Cycline an Cdk1, denn dieser Komplex wird dann von CAKs erkannt und phosphoryliert. Die Menge der CAKs während des Zellzyklus bleibt konstant (Morgan, 2006).

Cdks können zusätzlich über die streng regulierten Kinasen Wee1 und Myt1 negativ reguliert werden. Dies erfolgt über inhibitorische Phosphorylierungen (Morgan, 1995), die durch die Phosphatase Cdc25 entfernt werden können (Russell und Nurse, 1986). In *Drosophila* gibt es 2 homologe Cdc25 Proteine, String und Twine, wobei ersteres in der Mitose und letzteres in der Meiose eine Rolle spielt (Edgar *et al.*, 1994; Edgar und O'Farrell, 1990; Edgar und Datar, 1996). Der Komplex aus M-Phase Cyclin und Cdk-Aktiviert dabei den eigenen Aktivator Cdc25 und inhibiert den eigenen Inhibitor Wee1. Dabei wird ein „Feedback Loop“ generiert, der zu einer schalterartigen Aktivierung der Cdks am Beginn der Mitose führt.

Während der Mitose ist eine Abnahme der Cdk1-Aktivität erforderlich, damit die Zellen aus der Mitose austreten können und eine stabile Interphase aufgebaut werden kann. Cycline, Cdk-Inhibitoren und andere Zellzyklusregulatoren werden dabei für den Abbau im 26S-Proteasom markiert. Diese Markierung erfolgt durch die multiple kovalente Anheftung von Ubiquitin an diese Proteine (Glotzer *et al.*, 1991; Hershko *et al.*, 1991). Es werden dabei die Cycline abgebaut, wobei die Cdk-Untereinheit intakt bleibt.

Die Markierung für den Ubiquitin-vermittelten Abbau erfolgt über eine Enzymkaskade: das universelle Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) bindet Ubiquitin über eine kovalente Thioester-Bindung. Ubiquitin wird dann auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. Die Ubiquitin-E3-Ligase wiederum überträgt Ubiquitin vom E2-Enzym auf ein Lysin des Substratproteins (Hershko, 1997). Es können hier vier verschiedene E3-Ligase-Typen voneinander unterschieden werden: der HECT-, RING-Finger-, U-box- oder PHD-Finger-Typ (Review von Nakayama und Nakayama, 2006). Die RING-Finger E3-Ligasen bilden die größte Familie und werden in Subfamilien unterteilt. Die Cullin-basierenden E3-Enzyme enthalten die Skp1-Cul1-F-box-Protein-Komplexe (Review von Nakayama und Nakayama, 2005) und den APC/C *anaphase-promoting complex* oder Cyclosom (King *et al.* 1995; Harper *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2005).

Die Entdeckung des APC/C erfolgte u.a. in *Saccharomyces cerevisiae* durch die Isolierung von mutanten Hefen, die Defekte im Abbau von mitotischen Cyclinen zeigten (Irniger *et al.* 1995). Der APC/C ist

ein hochmolekularer Proteinkomplex mit mindestens 11 Untereinheiten und einer Größe von ca. 1 MDa. Dieser Komplex ist in der Mitose, sowie in der G1-Phase aktiv (Review von Peters, 2006; Thornton und Toczyski, 2006; van Leuken et al, 2008; Matyskiela *et al.*, 2009). Er wird durch die Aktivatorproteine Cdc20 oder Cdh1/Hct1 Zellzyklus-abhängig aktiviert. Außerdem ist die Aktivität des APC/C von seinem Phosphorylierungszustand abhängig (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997). Cdc20 kann nur an den APC/C binden, wenn mehrere Untereinheiten phosphoryliert sind (Kramer *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 1998). In Vertebraten wird die Phosphorylierung des APC/C durch mitotische Kinasen wie Cyclin/Cdk1 und die Plk1 (*polo like kinase 1*) erreicht (Descombes und Nigg, 1998; Patra und Dunphy, 1998). Dadurch ist die Aktivität von APC/C^{Cdc20} auf die frühe Mitose beschränkt, wenn eine hohe Cdk-Aktivität vorhanden ist. Die Aktivierung von APC/C^{Cdh1} dagegen ist nur bei niedriger Cdk-Aktivität möglich (Kramer *et al.*, 2000; Zachariae *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von Cdh1 durch Cdk1 und Cdk2 verhindert eine Aktivierung des APC/C und beschränkt somit die APC/C^{Cdh1}-Aktivität auf die späte Mitose und die G1-Phase (Kramer *et al.*, 2000; Sorensen *et al.*, 2000; Zachariae *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000; Jaspersen *et al.*, 1999; Listovsky *et al.*, 2000; Lukas *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2000)

Die orthologen Proteine zu Cdc20 und Cdh1 werden in *Drosophila* Fzy (*fizzy*) und Fzr (*fizzy-related*) genannt. *fizzy*-Mutante Zellen scheitern am Abbau von mitotischen Cyclinen und arretieren in der Metaphase (Dawson et al. 1993; Sigrist et al 1995). *Drosophila* Fzr wird in der späten Mitose und der G1-Phase gebraucht, um die Menge an mitotischen Cyclinen gering zu halten (Sigrist und Lehner, 1997). In der Abwesenheit von *fzr* können epidermale Zellen im Embryo keine terminale G1-Phase etablieren und durchlaufen eine weitere 17. Mitose (Sigrist und Lehner, 1997).

Der APC/C^{Cdc20} begünstigt den Metaphase-Anaphase-Übergang durch die Ubiquitylierung von Securin. Securin ist der Inhibitor der Separase, die für die Spaltung von chromosomalem Cohäsin verantwortlich ist. Dadurch wird die Trennung der Schwesterchromatiden initiiert (Cohen-Fix *et al.*, 1996; Funabiki *et al.*, 1996). Außerdem findet der Abbau von Cyclin A (Geley *et al.*, 2001) und Cyclin B statt (Holloway *et al.*, 1993; Gorr *et al.*, 2005).

In *Drosophila* werden die Cycline sequenziell degradiert. Der Abbau von Cyclin A wird in der Metaphase initiiert, noch bevor die Chromosomentrennung stattfindet. Cyclin B wird während der frühen Anaphase abgebaut. Cyclin B3 wird in der späten Anaphase degradiert, wenn die Chromosomen segregiert sind (Sigrist *et al.*, 1995).

Nach dem Beginn der Anaphase wird Cdc20 von APC/C^{Cdh1} ubiquityliert (Visintin et al., 1997; Fang et al., 1998; Prinz *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998). Es werden außerdem Cyclin B und weitere Substrate, wie Geminin, die Kinasen Aurora A und B, für den Abbau markiert und dadurch der Austritt aus der Mitose gefördert (Fang *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 1998; Zachariae *et al.*, 1998; Fang *et*

al., 1999; Blanco *et al.*, 2000; Listovsky *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2002; Littlepage und Ruderman, 2002). Der APC/C^{Cdh1} bleibt dann während der gesamten G1-Phase aktiv.

Cdc20 wird bereits während der G2-Phase exprimiert. Es kommt zu der Vermittlung des Abbaus von frühen Substraten, wie Cyclin A. Der Abbau von Securin und Cyclin B durch den APC/C^{Cdc20} wird so lange unterdrückt, bis sich während der Mitose der Spindelapparat bipolar an die Kinetochore der Schwesterchromatiden anlagert. Dieses Kontrollsystem wird Spindelkontrollpunkt (*spindle assembly checkpoint*, SAC) genannt (Review von Malmanche und Sunkel, 2006; Chen, 2007; Ciliberto und Shah, 2009; Musacchio und Salmon, 2007). Somit wird die vorzeitige Segregation der Chromosomen verhindert, was zu einer abnormalen Zahl von Chromosomen (Aneuploidie) und somit genetischer Instabilität führen würde.

Der SAC besteht aus den Proteinen Mad2, BubR1/Mad3 und Bub3, die an Cdc20 binden und den mitotischen Kontrollpunktkomplex (*mitotic checkpoint complex*, MCC) bilden (Hardwick *et al.*, 2000; Fraschini *et al.*, 2001; Sudakin *et al.*, 2001), wenn noch unbesetzte Kinetochore vorhanden sind. Das Fortschreiten in der Mitose wird dadurch verhindert.

1.3.2 Der Anaphase Promoting Complex (APC/C)

Der APC/C besteht aus mindestens 11 Untereinheiten. Die Untereinheiten lassen sich in drei Subdomänen einteilen: die katalytische, die TPR-Domäne (*tetratricopeptide repeat*) und die Gerüstsubdomäne. Die Interaktion vom E2-Enzym mit dem APC/C findet über die Untereinheit APC11 statt. Die Substrate werden über die Aktivatorproteine Cdc20 und Cdh1 rekrutiert, die im C-Terminus eine WD40 Propeller-Domäne enthalten. Cdh1 bindet dabei über die Untereinheit Cdc27 und APC2 an den APC/C (Review von Thornton, 2006).

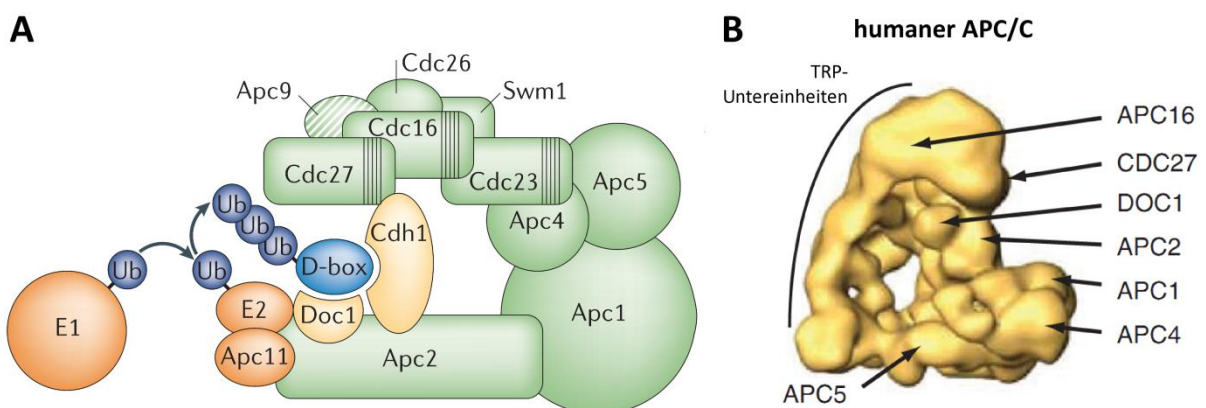


Abbildung 1.3: Die Architektur des APC/C.

A: Schematische Darstellung des APC/C. Die Proteine der TPR-Subdomäne sind mit vertikalen Streifen dargestellt. Die Proteine der Plattform sind in grün dargestellt. Alle Proteine, die an der Katalyse der Ubiquitylierungsreaktion beteiligt sind, sind in orange dargestellt. In gelb sind die Proteine dargestellt, die an der Substraterkennung beteiligt sind.
 B: Frontansicht des humanen APC/C mithilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen in einer Auflösung von ca. 25 Å. Verändert nach Peters, 2006 und Buschhorn *et al.*, 2006.

Das TPR-Motiv ist ein Strukturmotiv bestehend aus 34 Aminosäuren, das in Tandemwiederholungen auftritt und im Falle des APC/C-Proteins der TPR-Subdomäne oder Bogenlampe kennzeichnen (Blatch und Lässle, 1999). Diese besteht aus den größeren Untereinheiten APC7, APC3, APC6 und APC8 und den kleineren Untereinheiten APC16, APC13 und APC26. Das Gerüst oder die Plattform setzen sich aus den folgenden Untereinheiten zusammen: APC1, APC4, APC5 und APC15. Der katalytische Kern setzt sich aus dem APC2-APC11-Cullin-Ring-Komplex und dem Co-Rezeptor APC10 zusammen.

Die APC/C-Untereinheiten bilden einen zentralen Hohlraum mit der Substratbindestelle und dem katalytischen Zentrum aus (Gieffers *et al.*, 2001). Der APC/C erkennt Sequenzelemente, wie die D-box (*destruction box*) mit dem Sequenzmotiv R-X-X-L-X-X-N oder die KEN-box mit der Konsensussequenz K-E-N-X-X-X-N (Glutzer *et al.*, 1991; Pflieger und Kirschner, 2000).

1.3.2.1 Nicht-mitotische Funktionen des APC/C

Neben der Funktion vom APC/C in mitotischen und endoreplizierenden Zellen wurden weitere Funktionen in postmitotischen Zellen gefunden. Diese betreffen z.B. Neuronen und Muskelzellen. Es gibt somit eine Funktion vom APC/C außerhalb des Zellzyklus in zellulärer Differenzierung und neuronaler Physiologie und Morphologie. Die Expression von Cdc20 ist dabei restriktiver als die Expression von Cdh1. Cdh1 wird stark in terminal differenzierten Zellen exprimiert, wie z.B. in Neuronen, Muskelzellen, in der Placenta und im hämatopoetischen System. Der APC/C^{Cdh1} hält in diesen Zellen die Menge an Cyclin B niedrig, um einen abbaubaren Eintritt in den Zellzyklus zu verhindern, der in diesen Zellen zur Apoptose führen würde. Der APC/C^{Cdh1} trägt somit zum Überleben dieser Zellen bei (Almeida *et al.*, 2005). Außerdem beeinflusst der APC/C^{Cdh1} den bioenergetischen und antioxidativen Status von Neuronen durch den kontinuierlichen Abbau des glykolytischen Enzyms 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fruuctose-2,6-Bisphosphatase-3 (Pfkfb3) (Herrero-Mendez *et al.*, 2009)

Es gibt außerdem Hinweise auf eine APC/C^{Cdc20}-abhängige Funktion wodurch die Morphologie von Dendriten in postmitotischen Neuronen reguliert wird. Die Depletion von Cdc20 verhindert das Wachstum und die Verästelung der Dendriten in granulären Neuronen im Kleinhirn, ohne dabei das Wachstum der Axonen zu beeinflussen. (Kim *et al.*, 2009). In *Drosophila* findet außerdem ein Cdh1-abhängiger Abbau von Liprin- α statt, was die präsynaptische Organisation und die synaptische Größe beeinflusst (van Roessel *et al.*, 2004).

1.3.3 Einleitung und Aufrechterhaltung der G1-Phase

Während der Embryogenese findet die erste G1-Phase nach der Mitose 16 statt. In der G1-Phase wird die Reaktivierung der Cyclin/Cdk-Komplexe unterdrückt, um einen kontrollierten Eintritt in den nächsten Zellzyklus zu gewährleisten, wenn gute Wachstumsbedingungen gegeben sind und die Zelle ausreichend gewachsen ist. Dafür wird zum einen die Expression von mitotischen Cyclinen verringert und zum anderen verbleibende Cyclin/Cdk-Komplexe durch den APC/C^{Fzr} abgebaut.

Außerdem wird die Cdk-Aktivität durch Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (CKI) niedrig gehalten, die an Cyclin/Cdk-Komplexe binden und diese inhibieren (Peter und Herskowitz, 1994; Sherr und Roberts, 1999). In *Drosophila* inhibiert Dacapo (Dap) Cyclin E/Cdk2 und stabilisiert somit die G1-Phase (de Nooij *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1996). Roughex (Rux) dagegen ist der spezifische Inhibitor von Cyclin A/Cdk1, der auch am Austritt aus der Mitose involviert ist (Foley *et al.*, 1999; Foley und Sprenger, 2001; Thomas *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997). *rux*-Mutanten bewirken einen verfrühten Eintritt in die S-Phase (Thomas *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997) und einen rauen Augenphänotyp im adulten Auge.

1.3.4 Die Regulation des G1-S-Übergangs

In Säugetieren ist der G1-S-Übergang abhängig von Cyclin D/Cdk4, Cyclin D/Cdk6 und Cyclin E/Cdk2 (Matsushime *et al.* 1994; Sherr, 1993). D-Typ Cycline inaktivieren das Retinoblastoma Protein (pRb) durch Phosphorylierung (Sherr, 1996; Wong und Weber, 2007), damit ein Fortschreiten im Zellzyklus möglich ist (Lundberg und Weinberg, 1998). Rb ist ein Transkriptionsrepressor von Genen, die für den G1-S-Übergang gebraucht werden. Es verhindert somit einen vorzeitigen Eintritt in die S-Phase, indem es die Zellen in der G1-Phase hält (Weinberg 1995; Giacinti und Giordano, 2006). Rb interagiert mit Proteinen aus der Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren, bildet mit ihnen Heterodimere und inhibiert sie (Hamel *et al.* 1992; Weintraub *et al.* 1995). E2F-Transkriptionsfaktoren selbst bestehen aus 2 Untereinheiten, der E2F-Untereinheit und der Dp-Untereinheit. Sie regulieren Gene der DNA Replikation und Zellzyklusregulatoren der Mitose, Apoptose, DNA Reparatur und Zelldifferenzierung (Burkhardt und Sage, 2008; van den Heuvel und Dyson, 2008). Darunter sind z.B. Replikationsproteine wie die DNA-Polymerase α , aber auch Enzyme der Nukleotidbiosynthese oder Initiationsfaktoren, die den präreplikativen Komplex bilden (Leone *et al.*, 1998). Durch die Phosphorylierung von Rb kommt es zur Freisetzung von E2F (Attwooll *et al.*, 2004; Blais und Dynlacht, 2004; Kato *et al.*, 1993) und zur transkriptionellen Aktivierung der Zielgene. In *Drosophila* ist E2F1 ein starker positiver Aktivator des G1-S-Übergangs und der Apoptose und reguliert spezifisch die Transkription von *cyclin A*, *cyclin E*, *rnrS*, *pcna*, und *dna polymerase α* (DeGregori *et al.*, 1995; Pagano *et al.*, 1992; Dimova *et al.*, 2003; Duronio *et al.*, 1995; Royzman *et al.*, 1997). Cyclin E/Cdk2 verstärkt seine eigene Aktivität durch die

Phosphorylierung von Rb und die Aktivierung der Transkription von *cyclin E*. In *Drosophila* ist Cyclin E der wichtigste Regulator des G1-S-Übergangs (Knoblich *et al.*, 1994; Richardson *et al.*, 1995).

Während der späten G1-Phase wird außerdem der APC/C^{Cdh1} von Emi1 in Vertebraten inhibiert (Hsu *et al.*, 2002) und ermöglicht somit eine Akkumulation von Cyclin A. Zudem werden die CKIs p27 und p21 durch SCF (Skp-Cullin-F-box Protein) Komplexe degradiert (Reviews von Cardozo und Pagano, 2004; Nakayama und Nakayama, 2006, Carrano *et al.*, 1999; Sutterluty *et al.*, 1999; Tsvetkov *et al.*, 1999). Die Cyclin/Cdk-Aktivität wird auf diesem Wege erhöht und fördert den G1-S-Übergang (Peters, 2006).

1.3.5 Proteinabbau durch SCF-Komplexe

SCF-Komplexe (Skp-Cullin-F-box Protein) sind Cullin-abhängige Ubiquitin-E3-Ligasen, die zur Superfamilie der RING-Finger-Ligasen mit mehreren Untereinheiten gehören. Die Cullin Untereinheit bildet dabei ein Gerüst, das sowohl mit der Adapteruntereinheit Skp1 am N-Terminus als auch mit dem RING-Finger Protein Rbx1 (Roc1 oder Hrt1) am C-Terminus interagiert (Cardozo und Pagano, 2004; Skowyra, *et al.*, 1999; Ohta, *et al.*, 1999; Seol *et al.*, 1999). Skp1 dagegen bindet ein F-box Protein, das wiederum die Substratspezifität vermittelt (Skowyra *et al.*, 1997; Petroski *et al.*, 2005). Die F-box bildet dabei die Interaktionsdomäne mit Skp1 und wurde zuerst in humanem Cyclin F identifiziert (Bai *et al.*, 1996). Die Cullin-Untereinheit stellt die Verbindung zwischen einem spezifischen E2-Enzym und dem durch das F-box-Protein erkannte Substrat her. Die Substrate werden in den meisten Fällen phosphoryliert und können anschließend vom SCF-Komplex erkannt und ubiquitinyliert werden (Deshaies *et al.*, 1999). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass dies nicht der einzige Mechanismus der Substraterkennung ist. Auch andere Modifikationen, wie Glykosylierung, mehrstufige Phosphorylierungen oder Adaptorproteine für die Substraterkennung sind möglich (Skaar *et al.*, 2013).

Die F-box-Proteine enthalten ebenfalls Protein-Protein-Interaktionsdomänen und werden in 3 Klassen eingeteilt: FBWs enthalten neben der F-box eine Domäne mit WD-40 Wiederholungen, FBLs weisen neben der F-box auch Leucin-reiche Wiederholungen auf (Kipreos und Pagano, 2000; Skowyra *et al.*, 1997). FBXs beinhalten keine der bereits genannten Struktur motive und bilden eine heterogene Klasse, in der entweder ein weiteres Strukturmotiv für Protein-Protein-Interaktion vorhanden sein kann, aber nicht unbedingt vorhanden sein muss. Die Anzahl an F-box Proteinen ist innerhalb verschiedener Spezies sehr variabel. So wurden z. B. in *Arabidopsis thaliana* ca. 600 F-box Gene entdeckt. Im humanen System konnten mehr als 70 F-box Proteine identifiziert werden, jedoch sind nur bei ca. 20 % der F-box Proteine die Substrate bekannt (Frescas und Pagano, 2008). So konnte beispielsweise für das humane Protein Skp2 das CKI p27 als Substrat identifiziert werden (Carrano *et al.*, 1999; Sutterluty *et al.*, 1999; Tsvetkov *et al.*, 1999). Bevor p27 für den Abbau erkannt und markiert werden kann, ist eine Phosphorylierung an T187 nötig (Vlach *et al.*, 1997).

In *Drosophila* gibt es mindestens 30 F-box Proteine (Ho *et al.*, 2008). Das Protein Slimb (*supernumerary limbs*, homolog von β -TrCP) wurde als negativer Regulator des Hedgehog (Hh) und Wnt/Wingless (Wg) Signalweges entdeckt. Es beeinflusst zum einen den Hh-Signalweg, durch die Vermittlung des Abbaus des Transkriptionsfaktors Cubitus interruptus (Ci), zum anderen den Wg-Signalweg durch den Abbau des β -Catenin homologen Proteins Armadillo (Jiang und Struhl, 1998). Außerdem konnte das F-box-Protein Fbw7 oder Archipelago (Ago) identifiziert werden, welches den Abbau vom orthologen Protein c-myc, dmyc, vermittelt (Moberg *et al.*, 2004). Nicht alle SCF-Komplexe ubiquitinylieren ihre Substrate, um sie für den Abbau zu markieren. Im Falle des Transkriptionsfaktors Met4 aus *Saccharomyces cerevisiae* bewirkt der SCF^{Met30}-Komplex durch die Ubiquitinylierung, dass Met4 die Transkription der Gene, die für Methioninbiosynthese benötigt werden, nicht mehr aktivieren kann (Kaiser *et al.*, 2000). Stattdessen werden Gene der S-Adenosylmethioninbiosynthese aktiviert. Es findet somit kein Abbau des Transkriptionsfaktors, sondern eine Umprogrammierung statt (Kuras *et al.*, 2002).

1.3.6 Initiierung und Regulation der DNA-Replikation

Die komplette und korrekte Replikation des Genoms ist eine Voraussetzung für die genetische Stabilität. Die DNA-Replikation wird nach dem G1-S-Übergang durch eine erhöhte S-Cdk-Aktivität initiiert (Bell und Dutta, 2002). Die Initiation der Replikation findet an spezifischen chromosomalen Elementen statt, die als Replikationsursprung bezeichnet werden. An den Replikationsursprüngen findet eine Anlagerung von Proteinkomplexen statt, die wiederum die Anlagerung einer bidirektionalen DNA-Replikationsgabel ermöglichen. Des Weiteren ist eine Regulation der Bildung des präreplikativen Komplexes wichtig, um DNA-Replikation und Zellzyklus zu koordinieren.

Bereits in der G1-Phase findet die Rekrutierung des präreplikativen Komplexes an die Replikationsursprünge statt. Bei der Bildung der präreplikativen Komplexe findet eine Anlagerung von Replikationsfaktoren statt. Darunter sind z.B. *origin recognition complex* (ORC), Cdc6, Cdt1 und die Mcm (*minichromosome maintenance*) Proteine 2-7. Die Mcm-Proteine bilden dabei eine ringförmige Struktur um die DNA und dienen als Helicase.

Nach der Aktivierung der präreplikativen Komplexe in Präinitiationskomplexe in der frühen S-Phase wird die DNA an den Replikationsursprüngen entwunden und die DNA-Replikationsmaschinerie kann binden. Der präreplikative Komplex löst sich von den Replikationsursprüngen und zerfällt. Die erneute Zusammenlagerung wird bis zur nächsten G1-Phase verhindert.

Die Replikation wird bereits am Ende der Mitose bzw. in der frühen G1-Phase vorbereitet. Der präreplikative Komplex bindet dann an die Replikationsursprünge und bereitet die Aufwindung der DNA vor. Der *origin of recognition complex* (ORC) bildet die Plattform für die Bindung des präreplikativen Komplexes. Obwohl die ORCs während des gesamten Zellzyklus an den Replikationsursprüngen verbleiben, sind sie nur in der späten Mitose und der frühen G1-Phase aktiv und katalysieren die Bindung des präreplikativen Komplexes. Die Proteine Cdc6 und *cdc10-dependant transcript 1* (Cdt1) assoziieren als Teil des präreplikativen Komplexes mit den ORCs (Nishitani *et al.*, 2000; Maiorano *et al.*, 2000). Es erfolgt die Assoziation der Mcm-Proteine 2-7. Der Mcm-Komplex ist die Helicase, die ATP-abhängig die DNA entwindet (Pacek und Walter, 2004) und wandert mit den Replikationsgabeln entlang der DNA. Der präreplikative Komplex zerfällt dann in seine einzelnen Unterheiten, die entweder abgebaut oder inhibiert werden. Er kann erst wieder in der nächsten Mitose gebildet werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie Rereplikation, also dass die Replikation nur einmal pro Zellzyklus stattfindet, verhindert wird. Die Bildung der präreplikativen Komplexe und der Initiationskomplexe wird zeitlich voneinander getrennt (G1-Phase und S-Phase). In G1 ist die Cdk-Aktivität niedrig und somit können die Mcm-Proteine nicht aktiviert werden. Geminin verhindert außerdem die Rereplikation unabhängig von ORC und Cdc6 (McGarry und Kirschner, 1998), indem es an Cdt1

inhibitorisch bindet (Yanagi *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2004; De Marco *et al.*, 2009) und die Degradation von Cdt1 verhindert. In *Xenopus* und im humanen System ist der Abbau von Cdt1 über das PIP-box-Motiv durch CRL4^{Cdt2} vom *proliferatin cell nuclear antigen* (PCNA), einem Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerasen abhängig (Arias und Walter, 2005; Nishitani *et al.*, 2006) Der Abbau von Cdt1 erfolgt in *C.elegans*, Vertebraten und *S. pombe*, wenn Zellen in die S-Phase eintreten (Review von Kim und Kipreos, 2007). Der Abbau in *Drosophila* erfolgt ebenfalls PIP-box-abhängig und wird durch die E3-Ligase CRL4^{Cdt2} vermittelt (Lee *et al.*, 2010). Zellzyklus-unabhängig z.B. bei DNA-Schäden wird durch S-Phasen-Cycline phosphoryliertes Cdt1 durch CRL1/SCF^{Skp2} für den Abbau markiert (Nishitani *et al.*, 2001, Nishitani *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004).

1.4 Der Zellzyklusregulator Rca1

1.4.1 Die Rca1/Emi1 – Familie

Die Aktivität von der Ubiquitin-E3-Ligase APC/C wird durch unterschiedliche Mechanismen inhibiert. Emi1 in Vertebraten und dessen Ortholog Rca1 in *Drosophila* werden für die Inhibition des APC/C^{Cdh1/Fzr} während der S-Phase und der G2-Phase gebraucht. Sie regulieren unter anderem die Stabilität von Geminin (Di Fiore und Pines, 2007; Machida *et al.*, 2007).

Im C-Terminus von Emi1 befinden sich einige wichtige Strukturmerkmale, wie eine D-box, eine Linker-Region, eine Zinkbinderegion (ZBR) und einen RL-Tail (siehe Abbildung 1.4). Es wird vermutet, dass Emi1 den APC/C kompetitiv als Pseudosubstrat inhibiert, weil Emi1 eine D-box und damit eine Erkennungssequenz für den APC/C aufweist, und diese die Substratbindestelle blockieren könnte (Miller *et al.*, 2006). Es gab jedoch in der Meiose Hinweise, dass Emi2 (*Emi1-related Protein 2*, Erp1) durch die ZBR und den RL-Tail den Transfer von Ubiquitin von einem Ubiquitin konjugierenden Enzym (E2) auf das APC/C Substrat verhindert (Ohe *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010). Dies wurde vor kurzem auch an humanem Emi1 untersucht. Es zeigte sich, dass die Inhibition des APC/C durch multiple Mechanismen stattfindet. Zum einen blockiert Emi1 die Elongation der Ubiquitin-Ketten durch das E2-Enzym UBE2S (Wang und Kirschner, 2013). Im humanen System gibt es verschiedene E2-Enzyme, zum einen UBCH10 oder UBCH5, zum anderen UBE2S. UBCH10 oder UBCH5 katalysieren die Monoubiquitylierung von Substraten, UBE2S die Elongation der Ubiquitin-Ketten, die dann wiederum für die Erkennung durch das 26S-Proteasom dienen (Williamson *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010.; Garnett *et al.*, 2009; Dimova *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein Emi1-Konstrukt, das den C-terminalen Bereich mit D-box, Linker-Region, ZBR und RL-Tail enthält, auch die Substratbinde-

stelle blockieren kann, indem es den zentralen Hohlraum im APC/C blockiert. Die D-box bindet dabei an die WD40-Domäne von Cdh1, während die ZBR und der RL-Tail mit der katalytischen Kern interagieren (Frye *et al.*, 2013).

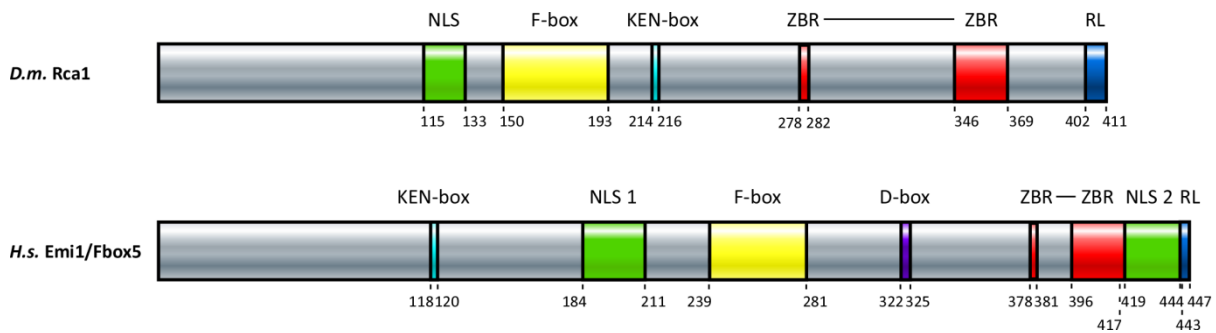


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau von Rca1 und humanem Emi1.

Die beiden Inhibitoren des APC/C, Rca1 aus *Drosophila* und humanem Emi1 weisen eine ähnliche Anordnung der konservierten Strukturdomänen auf.

NLS: nuclear localization sequence, F-box: Protein-Protein-Interaktionsmotiv, KEN-box/D-box: APC/C-Degron, ZBR: Zinkbinderegion, RL: RL-Tail

Die Mutation der ZBR führt dazu, dass aus dem APC/C^{Cdh1} Inhibitor Emi1 ein Substrat dieses Komplexes wird (Miller *et al.*, 2006). Der reguläre Abbau von Emi1 erfolgt durch den SCF^{β-TrCP}-Komplex nach der Phosphorylierung des Degrons D-S-G-X-X-S durch die Kinase Plk1 (Hansen *et al.*, 2004; Guardavaccaro *et al.*, 2003; Margottin-Goguet *et al.*, 2003).

Bei dem in der Meiose wichtigen Protein Emi2 werden mehrfache Phosphorylierungen verwendet, um die Aktivität und Stabilität des Proteins zu regulieren. Multiple Phosphorylierungen im N-Terminus von Emi2 aus *Xenopus* durch Cdk1 bilden eine Bindestelle für Plk1 und CK1δ/ε. Durch diese Kinasen wird das Degron von SCF^{β-TrCP} phosphoryliert sowie Phosphorylierungsstellen im C-Terminus im Bereich der D-box, der ZBR und des RL-Tails, die die Interaktion mit dem APC/C beeinträchtigt. Über den MAPK-Signalweg können durch die Phosphorylierung der Kinase Rsk durch Mos Phosphorylierungsstellen in der zentralen Region von Emi2 phosphoryliert werden und dadurch wiederum PP2A-B56β/ε rekrutiert werden. Diese Phosphatase ist der Antagonist zu den Kinasen und kann durch Dephosphorylierung Emi2 stabilisieren. Somit kann der Arrest in der Metaphase der Meiose II durch Mos und Emi2 wieder aufgehoben werden (Isoda *et al.*, 2011).

Das zu Emi1 orthologe Protein Rca1 weist nur limitierte Homologie zu Emi1 und Emi2 auf. Jedoch sind die Größe und der funktionelle Aufbau sehr ähnlich. Im Vergleich zu Emi1 aus *Xenopus* besteht eine Ähnlichkeit von 25 %, wobei 16 % identisch sind (Reimann *et al.*, 2001). Rca1 wurde in einem Screen für Enhancer und Suppressoren des *roughex* (rux) Augenphänotyps gefunden und zunächst als Regulator von Cyclin A identifiziert (Dong *et al.*, 1997). Das CKI Rux inhibiert spezifisch Cyclin A/Cdk1 und ist nötig, um eine stabile G1-Phase aufzubauen. In Abwesenheit von Rux kommt es zu einem verfrühten Eintritt in die S-Phase, aufgrund von ektopischer Cyclin A/Cdk1-Aktivität (Thomas *et al.*, 1994.).

In *rca1*-mutanten Embryonen zeigt sich der gleiche Phänotyp wie in der Abwesenheit von Cyclin A (Lehner und O'Farrell, 1989). Die Embryonen zeigen einen Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus 16 epidermaler Zellen, aufgrund eines vorzeitigen Abbaus von Cyclin A und können nicht in die nachfolgende Mitose eintreten (Dong *et al.*, 1997, Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). Der Zusammenhang zwischen Rca1 und Cyclin A führten zu der Namensgebung von Rca1 (*regulator of cyclin A 1*). *rca1*-mutante Embryonen zeigen den gleichen Phänotyp wie bei der Überexpression von Cdh1/Fzr. Es kommt zu einem Arrest embryonaler Zellen in der G2-Phase des 16. Zellzyklus. Jedoch zeigen Embryonen, die *rca1* und *fzr* mutant sind, keinen vorzeitigen Abbau von Cyclin A. Des Weiteren führt die gleichzeitige Überexpression von Fzr und Rca1 zu keinen Auffälligkeiten hinsichtlich der Akkumulation von Cyclinen und dem Durchschreiten der Mitose 16 (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002).

Rca1 wird während der G1-Phase abgebaut (Radermacher, 2007; Morgenthaler, persönliche Kommunikation). Dadurch können Cycline APC/C^{Fzr}-abhängig abgebaut werden und eine stabile G1-Phase kann etabliert werden (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002; Jacobs *et al.*, 2002; Pimentel und Venkatesh, 2005). Die dafür benötigte Abbausequenz konnte auf einen Bereich von 14 Aminosäuren eingegrenzt werden, von Aminosäure 220 bis 234 (Radermacher, 2007).

Der Abbau ist dabei unabhängig von der Phosphorylierung des D-S-G-X-X-S Degrons und der Cdk1 Phosphorylierungsstellen (Zielke *et al.*, 2006). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Rca1 von einem Inhibitor des APC/C^{Fzr} zu einem Substrat wird und somit abgebaut wird, weil dies im gleichen zeitlichen Rahmen geschieht, wie das APC/C^{Fzr} Substrat Geminin (Morgenthaler, persönliche Kommunikation). Es ist jedoch noch unklar, welche Modifikationen bzw. welche Enzyme an diesen Modifikationen beteiligt sind.

1.4.2 F-box-abhängige Funktion von Rca1 am G1-S-Übergang

Rca1 greift an zwei wichtigen Punkten in die Regulation des Zellzyklus ein. Zum einen in der G2-Phase durch die Inhibition von APC/C^{Fzr}, was die Inhibition des APC/C durch Cyclin A/Cdk1 und Cyclin E/Cdk2 unterstützt (Sigrist und Lehner 1997, Grosskortenhaus und Sprenger, 2002; Dienemann und Sprenger, 2004; Reber *et al.*, 2006). Diese Inhibition ist während der Embryogenese sehr wichtig. Die Inhibition durch Rca1 dagegen ist zu diesem Zeitpunkt weniger bedeutend und wird erst benötigt, wenn die Fzr-Expression stattfindet, also im blastodermalen Stadium. Aus diesem Grund können *rca1*-mutante Embryonen sich bis Zellzyklus 16 entwickeln, bevor ein Phänotyp auftritt. Zu diesem Zeitpunkt wird außerdem die Transkription von Cyclin E verringert und die Inhibition des APC/C durch Cyclin E/Cdk2 nimmt ab. Cyclin A/Cdk1 liegt dann in der Abwesenheit von Rca1 inhibitorisch phosphoryliert durch Cdc25/String vor, da der APC/C übermäßig aktiv ist.

Neben der Rolle in der G2-Phase könnte Rca1 eine weitere Funktion am G1-S-Übergang haben. Die Überexpression von Rca1 während der Augenentwicklung von *Drosophila* führt F-box-abhängig zu

ektopische S-Phasen und somit zu einem rauen Augenphänotyp. Die Überexpression von Rca1 in Flügelimaginalscheiben führt außerdem dazu, dass die Zellen schneller die G1-Phase durchlaufen und somit den G1-S-Übergang beschleunigen (Zielke *et al.*, 2006). Es konnte zudem gezeigt werden, dass bei der Immunpräzipitation von FLAG-Rca1 Epitop-markierte SCF-Komponenten wie HA-SkpA und myc-Cul1 F-box-abhängig copräzipitiert werden können. Dies spricht für eine Beteiligung von Rca1 in einem SCF^{Rca1}-Komplex. Es wäre somit denkbar, dass dieser SCF^{Rca1}-Komplex einen negativen Regulator des G1-S-Übergangs für den Abbau markieren könnte (Zielke *et al.*, 2006).

1.4.3 Die Funktion von Rca1 in postmitotischen Zellen

Wie bereits in Abschnitt 1.3.2.1 erwähnt, gibt es postmitotische Funktionen des APC/C in neuronalen Zellen. Rca1 konnte ebenfalls bei einem RNAi-Screen gefunden werden, als ein Gen, welches Schlafmuster und -menge beeinflusst. Die RNAi vermittelte Herabregulation von Rca1 mithilfe des pan-neuronalen elavGAL4-Treibers, verringerte die Menge des totalen, täglichen Schlafs von *Drosophila* (Rogulja and Young, 2012). In diesem Zusammenhang zeigte auch die Abreicherung von Cyclin A eine Reduktion des täglichen Schlafs in der Fliege. Zudem wurde beobachtet, dass die Zeitspanne, die die Fliegen brauchten, um einzuschlafen signifikant erhöht war und die Lebenszeit sich ebenfalls verringerte hat, wenn die Menge an Cyclin A in den postmitotischen Neuronen reduziert ist.

2 Zielsetzung

Die etablierte Funktion von Rca1 als Inhibitor des APC/C wurde vor allem durch Überexpression von Rca1-Derivaten während der Embryogenese ermittelt. Für die konservierte F-box in Rca1 konnte in diesen Analysen keine Funktion festgestellt werden. Ziel dieser Arbeit ist es, die F-box-Funktion von Rca1 näher zu untersuchen. Dabei soll mit den zwei unterschiedlichen *rca1*-Allelen, *rca1*² und *rca1*^{C1474}, gearbeitet und Rca1 mit deletierter F-box auf endogenen Level exprimiert werden.

Die Überexpression von Rca1 induziert ektopische S-Phasen in der Augenentwicklung von *Drosophila* (Zielke *et al.*, 2006). Um dies näher zu untersuchen, soll ein Zellkultursystem verwendet werden, um die Überexpression von Rca1 vor allem am G1-S-Übergang zu untersuchen. Ein Fokus soll dabei auf Rca1-Derivaten liegen, bei denen die F-box deletiert oder mutiert ist, oder Mutationen in der Zinkbinderegion oder ihr angrenzend vorhanden sind. Außerdem soll die APC/C-Inhibitionsfähigkeit dieser Rca1-Derivate untersucht werden.

Eine mögliche F-box-Funktion von Rca1 kommt durch die Interaktion mit der SCF-Komponente SkpA zustande. Durch genetische Interaktion soll untersucht werden, ob der Cdk-Inhibitor von Cyclin E/Cdk2, Dacapo, ein mögliches Substrat dieses SCF^{Rca1}-Komplexes sein könnte und somit in der Abwesenheit von Dacapo, wenn die F-box-abhängige Funktion nicht gebraucht werden sollte, der Zellzyklusarrest in der G2-Phase des 16. Zellzyklus aufgehoben werden kann. Ob Dacapo ein Substrat des SCF^{Rca1}-Komplexes sein könnte, soll auch in Zellkultur mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Dabei soll auch die Stabilität von Dacapo in der Abwesenheit von Rca1 überprüft werden.

SCF-Substrate werden in den meisten Fällen, bevor sie durch die Ubiquitin-E3-Ligase erkannt werden, phosphoryliert. Bei den zu Dacapo homologen Proteinen p21 und p27 erfolgt die Phosphorylierung am C-Terminus. Aus diesem Grund sollen potentielle Cdk-Phosphorylierungsstellen am C-Terminus von Dacapo mutiert werden und diese Proteine auf ihre Stabilität untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der F-box-Funktion in *Drosophila*-Embryonen

Rca1 ist ein Inhibitor des APC/C^{Fzr} und wird während der G2-Phase benötigt, um einen vorzeitigen Abbau von APC/C-Substraten, wie Cyclinen, zu verhindern. Diese werden für den Eintritt in die Mitose benötigt (Grosskortenhaus und Sprenger 2002). Aus diesem Grund kommt es in der Abwesenheit von Rca1 im Embryo zu einem Arrest im Zellzyklus 16. Die Überexpression von HA-Rca1 kann diesen Phänotyp aufheben. Bei der Überexpression von HA-Rca1 mit deletierter F-box-Domäne konnte dieser Arrest ebenfalls aufgehoben werden (Zielke et al, 2006), was auf eine F-box-unabhängige Funktion von Rca1 in der Embryogenese hindeutet.

3.1.1 Analyse der *rca1*-Allelen

Die erste Möglichkeit, die Bedeutung der F-Box-Funktion zu untersuchen, ergab sich aufgrund der Sequenzanalyse von *rca1*-Allelen. So konnten in zwei EMS-induzierten Allelen Punktmutationen in der kodierenden Region detektiert werden, die bei einem Allel am Rande der Zinkbinderegion und bei dem anderen Allel in der F-box-Domäne liegen. Die kodierenden Regionen der beiden *rca1*-Allele wurden in Vektoren kloniert und sequenziert (Kies, 2011). Das Allel *rca1*² beinhaltet eine Punktmutation, die dazu führt, dass die Aminosäure Alanin an Position 344 zu einem Threonin ausgetauscht ist (Abbildung 3.1). Dieser Aminosäureaustausch liegt unmittelbar vor dem zweiten Teil der Zinkbinderegion (Aminosäuren 346-369). Das Allel *rca1*^{C1474} dagegen trägt eine Punktmutation an Position 182, die zum Austausch von Methionin zu Threonin an dieser Position führt. Dieser Aminosäureaustausch liegt innerhalb der F-box-Domäne. Ein weiteres Allel, *rca1*^{C0440}, zeigte dagegen eine sinnentstellende Mutation, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt. Dadurch bricht die resultierende Proteinsequenz schon nach 163 Aminosäuren ab (Sprenger, persönliche Mitteilung). Eine schematische Darstellung von Rca1 und den jeweiligen Aminosäureaustauschen der Allele ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

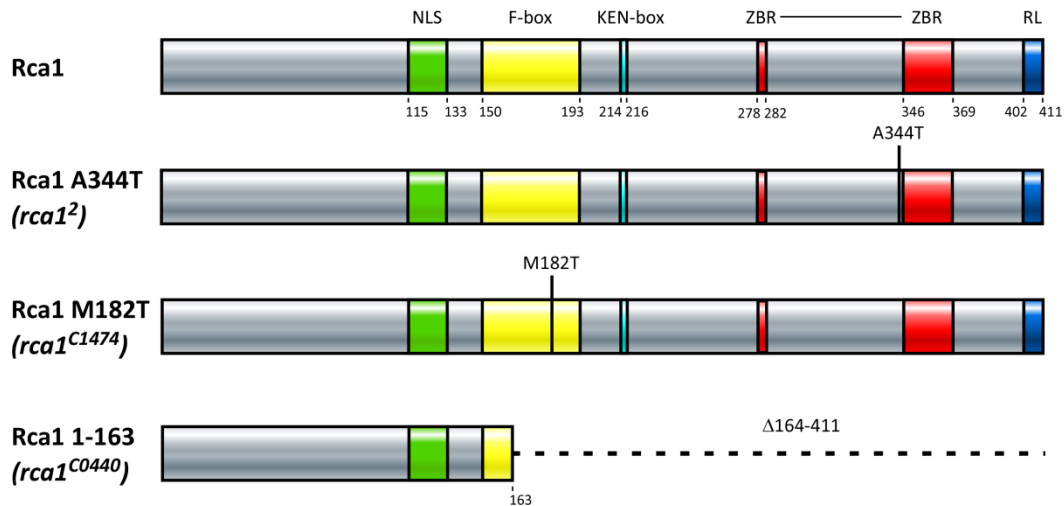


Abbildung 3.1: Übersicht über die verschiedenen *rca1*-Allele

Schematische Darstellung von Rca1 und die Position der Austausch von Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz der Allele. Im Vergleich zum wildtypischen Rca1 trägt das Allel *rca1*² den Aminosäureaustausch A344T, *rca1*^{C1474} M182T und bei *rca1*^{C0440} kommt es zu einem frühzeitigen Stop-Codon und der C-Terminus ist dadurch deletiert (164-411).

Die Abkürzungslegenden der einzelnen Rca1- Domänen sind in Abbildung 1.4 erklärt.

Bei dem Allel *rca1*^{C1474} liegt ein Allel vor, bei dem die F-box-Domäne eine Mutation trägt, während die C-terminale Hälfte intakt ist. Um zu überprüfen, wie sich der Phänotyp dieser beiden Allele ausprägt, wurden homozygote Embryonen identifiziert (Fehlen des LacZ-Markers, der auf dem Balancer-Chromosomen liegt, Abbildung 3.2, B) und die Zellzahl im Stadium 13 bestimmt. Dazu wurden Embryonen gesammelt, fixiert und mit LacZ-Antikörpern gefärbt, um homozygote und heterozygote Embryonen für die *rca1*-Allele zu identifizieren. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Propidiumiodid angefärbt. Diese gefärbten Zellkerne wurden dann innerhalb eines definierten Bereichs, innerhalb eines halben Segments, ausgezählt (Abbildung 3.2).

Im Stadium 13 haben Embryonen mit *rca1*-Wildtypfunktion auf dem Balancer-Chromosom die 16. Mitose vollständig durchlaufen (Abbildung 3.2, A), während Embryonen, die homozygot für ein *rca1*-Allel sind, eine verminderte Zellzahlen aufweisen, da diese die 16. Mitose nicht durchlaufen können (Abbildung 3.2, B).

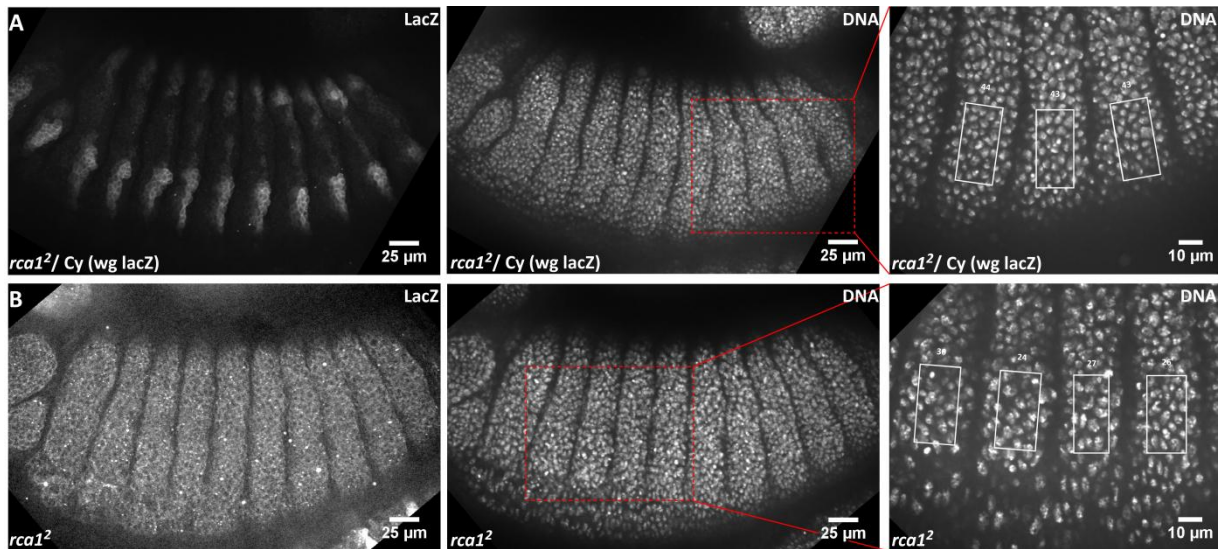


Abbildung 3.2: Zellzahlbestimmung von *rca1*-mutanten Embryonen

Aufnahmen von epidermalen Zellen von fixierten Embryonen im Stadium 13, die mit LacZ-Antikörpern gefärbt wurden, um heterozygote (A) und homozygote (B) Embryonen für das Allel *rca1*² zu unterscheiden. Durch die Antikörperfärbung entsteht in heterozygoten Embryonen ein Streifenmuster, das durch das Gen *lacZ* unter der Kontrolle des *wingless*-Promoters auf dem Balancer-Chromosom zustande kommt. Die Zellkerne wurden durch die Färbung mit Propidiumiodid sichtbar gemacht und innerhalb eines halben Segmentes ausgezählt.

Die jeweiligen Genotypen sind am unteren Bildrand angegeben. Die Anzahl der Zellen innerhalb der ausgewählten Region ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Beim Phänotyp der beiden Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474} ist kein Unterschied zu beobachten. Die Anzahl der Zellkerne pro halbem Segment sind nahezu identisch. Homozygote Embryonen für die *rca1*-Allele arretieren in der G2-Phase in der Mitose des 16. Zellzyklus (

Abbildung 1.2). Durch diesen Arrest ist eine reduzierte Anzahl von Zellen zu beobachten (Abbildung 3.2, B; Abbildung 3.2). Der Phänotyp ist bei allen *rca1*-Allelen identisch, auch von *rca1*^{C0440} (Kies, 2011). Die beiden Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474} können sich außerdem nicht transheterozygot komplementieren (Abbildung 3.2).

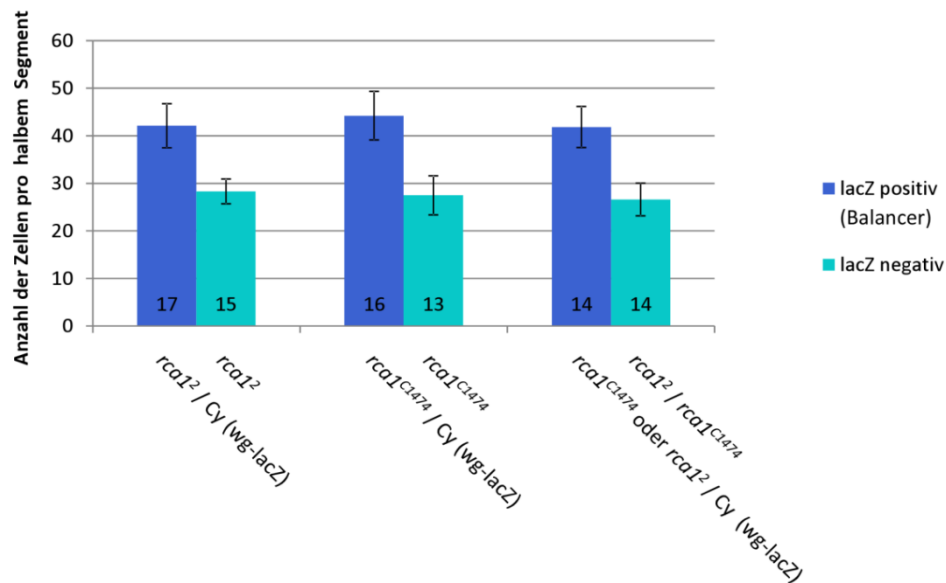


Abbildung 3.2: *rca1*-Mutanten haben eine reduzierte Zellzahl

Darstellung der Auszählung von Zellkernen innerhalb eines halben Segments für heterozygote und homozygote Embryonen für die *rca1*-Allele $rca1^2$ und $rca1^{C1474}$, wie in Abbildung 3.2 dargestellt.

Die Zahl in der Basis der Säulen des Diagramms zeigt die Anzahl der ausgewerteten Embryonen auf.

Der embryonale Phänotyp des Alleles $rca1^{C1474}$ mit einer Punktmutation in der F-box-Domäne ist somit identisch mit anderen *rca1*-Allelen und deutet darauf hin, dass die F-box-Domäne *in vivo* für die APC/C-Inhibition benötigt wird.

3.1.2 Analyse transgener Fliegen, die Rca1 unter dem endogenen Promoter exprimieren

Die Sequenz von $rca1^{C1474}$ wurde nur für die transkribierte Region des Gens bestimmt. Zusätzliche Mutationen im Promoter/Enhancerbereich könnten jedoch auch die Expressionsstärke des Gens beeinträchtigen. Um zu bestätigen, dass der Verlust der F-box-Domäne zu einem starken *rca1*-Phänotyp führt, wurden transgene Fliegen erstellt, die Rca1 und Rca1 ohne F-box unter der Kontrolle des endogenen Promoters exprimieren.

Es wurde bereits von der Arbeitsgruppe von Zipursky beschrieben, dass ein von *Xba*I-Restriktionsstellen flankiertes 10 kb großes Fragment aus der genomischen *rca1*-Region ausreicht, um den *rca1*-mutanten Phänotyp zu komplementieren (Abbildung 3.3, schwarzer Pfeil; Dong *et al.*, 1997). Sowohl die zu Grunde liegenden Vektoren als auch die hergestellten Fliegenstämme standen jedoch nicht mehr zu Verfügung. Die genomische Region musste deshalb erneut kloniert werden, wobei ein etwas kleineres Fragment von 7,5 kb ausgewählt wurde. Das genomische Fragment wurde mithilfe von Adelheid Weissgerber durch mehrere PCR-Reaktionen amplifiziert und in den Vektor pCasper kloniert. Über P-Element vermittelte Keimbahntransformation wurden von diesem Plasmid transgene Fliegen hergestellt.

Durch *in vitro* Mutagenese wurden anschließend in die genomischen DNA-Sequenz Restriktionschnittstellen am Beginn und Ende der kodierenden Sequenz eingefügt. Dadurch konnten modifizierte Rca1-Gene in den genomischen Kontext eingebracht und von diesen dann wieder transgene Fliegen hergestellt werden. Auf diese Weise entstanden transgene Fliegen, die ein Rca1 mit N-terminalen HA-Epitop tragen und zusätzlich ein HA-Rca1-Gen, in dem die Sequenz für die F-box-Domäne deletiert ist (Abbildung 3.4).

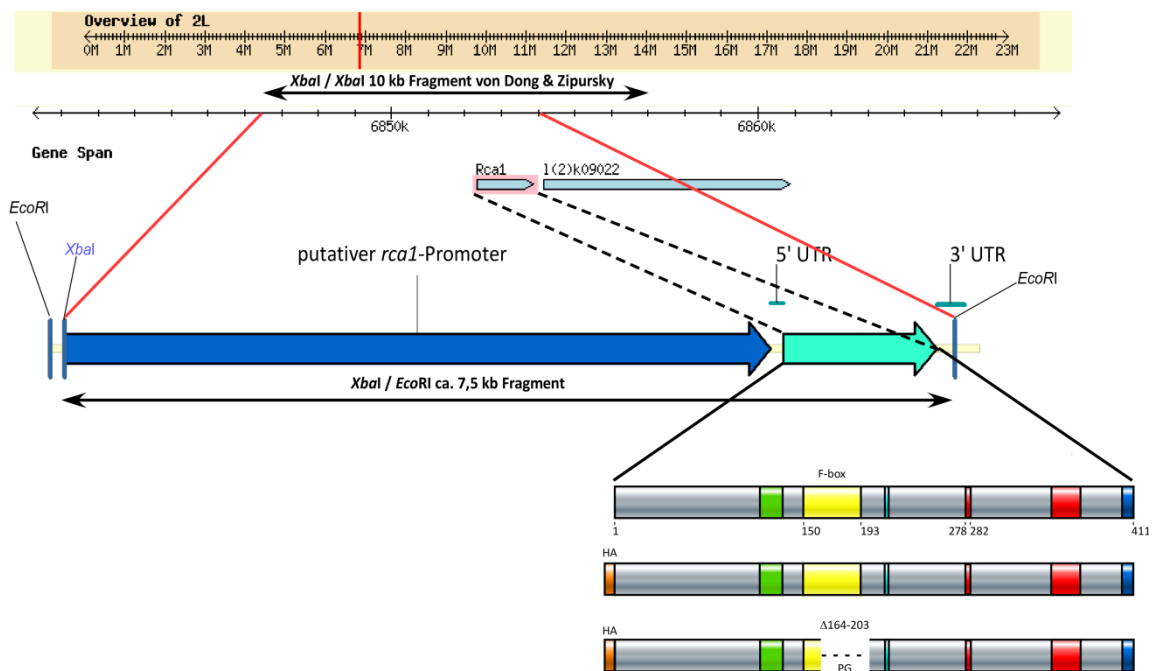


Abbildung 3.3: Übersicht über die klonierten Konstrukte, die die putative Promoter Sequenz von *rca1* und die kodierende Region von Rca1, HA-Rca1 oder HA-Rca1ΔF-box enthielten

Es wurde ein ca. 7,5 kb großes Fragment kloniert (roter Pfeil). Nach Dong & Zipursky (1997) reicht ein 10 kb großes Fragment (schwarzer Pfeil) aus, um den *rca1*-mutanten Phänotyp zu retten.

In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht über die Anzahl der erhaltenen transgenen Fliegenstämme zusammengestellt.

Tabelle 3.1: Anzahl und Insertionsort der erhaltenen transgenen Fliegenstämme.

Transgen-Insertion	Chromosom 2	Chromosom 3
P{w+, rca1_E(-5664)->rca1}	1	1
P{w+, rca1_E(-5664)->HA-rca1}	6	5
P{w+, rca1_E(-5664)->HA-rca1-Del(164-203_F-box)}	3	3

Es wurde zunächst überprüft, ob der klonierte genomische Bereich für eine Komplementation des *rca1*-mutanten Phänotyps und der Letalität von *rca1* komplett ausreicht und ob das HA-Epitop die Funktion von Rca1 beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurden Fliegenstämme etabliert, die transheterozygot für die beiden *rca1*-Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474} sind. Dabei wurden andere Letalitäten auf

den einzelnen *rca1*-mutanten Chromosomen vermieden. Die beiden *rca1*-Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474} können sich, genauso wie alle anderen Kombinationen, von *rca1*-Allelen miteinander nicht transheterozygot komplementieren (Sprenger, persönliche Mitteilungen). Jedoch in der Gegenwart der genomischen Region, die die kodierende Region von Rca1 und die putativen regulatorischen Regionen enthält, konnte der *rca1*-mutante Phänotyp komplementiert werden. Dabei wurden Fliegen erhalten, die auf den homologen Chromosomen *rca1*² und *rca1*^{C1474} tragen. Diese Fliegen besitzen kein CyO-Balancer-Chromosom mehr und haben deshalb gerade Flügel. Im Gegensatz dazu wurden Fliegen mit gebogenen Flügeln erhalten, wenn *rca1*² oder *rca1*^{C1474} heterozygot über CyO balanciert vorkamen. Es konnten dabei keine Fliegen mit geraden Flügeln erhalten werden, die transheterozygot für die Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474} auf Chromosom 2 waren und auf dem dritten Chromosom homozygot oder heterozygot für HA-Rca1ΔF-box unter der Kontrolle der putativen regulatorischen Region von *rca1* stehen.

Die Ergebnisse dieser Kreuzungen und die jeweiligen Genotypen der transheterozygoten Fliegen sind in der Abbildung 3.4 zusammengefasst.

Kreuzungen		gerade Flügel (- CyO)
♀ SP-0489: $\frac{w}{w}; \frac{rca1^{C1474}}{CyO(x-lacZ)}; \frac{prd-Gal4}{MKRS}$		$\frac{w}{w}; \frac{rca1^2}{rca1^{C1474}}; \frac{P\{w+, rca1_E(-5664)\rightarrow rca1\}}{prd-Gal4 / MKRS}$
♂ SP-0500: $\frac{w}{w}; \frac{rca1^2}{CyO(x-lacZ)}; \frac{P\{w+, rca1_E(-5664)\rightarrow rca1\}}{P\{w+, rca1_E(-5664)\rightarrow rca1\}}$		
♀ SP-0478: $\frac{w}{w}; \frac{rca1^{C1474}}{CyO(x-lacZ)}$		$\frac{w}{w}; \frac{rca1^2}{rca1^{C1474}}; \frac{P\{w+, rca1_E(-5664)\rightarrow HA-rca1\}}{+}$
♂ SP-0466: $\frac{w}{w}; \frac{rca1^2}{CyO(x-lacZ)}; \frac{P\{w+, rca1_E(-5664)\rightarrow HA-rca1\}}{P\{w+, rca1_E(-5664)\rightarrow HA-rca1\}}$		
♀ SP-0478: $\frac{w}{w}; \frac{rca1^{C1474}}{CyO(x-lacZ)}$		—
♂ SP-0469: $\frac{w}{w}; \frac{rca1^2}{CyO(x-lacZ)}; \frac{P\{w+, rca1_E(-5664)\rightarrow rca1\Delta F-box\}}{P\{w+, rca1_E(-5664)\rightarrow rca1\Delta F-box\}}$		

Abbildung 3.4: Die genomische Region, die die putativen regulatorischen Elemente und die kodierende Region von *rca1* enthalten, können den *rca1*-mutanten Phänotyp komplementieren

Im transheterozygoten Zustand kann die genomische Region den Arrest im Zellzyklus 16 aufheben und es können adulte Fliegen mit geraden Flügeln (-CyO) erhalten werden. Bei der Expression von HA-Rca1ΔF-box wurden nur heterozygote Fliegen erhalten. Die jeweiligen Genotypen der Fliegen, die für die Kreuzung verwendet wurden, sind dargestellt.

Es wurden im Folgenden Embryonen von Fliegenstämmen analysiert, die auf dem zweiten Chromosom heterozygot für *rca1*² oder *rca1*^{C1474} waren und auf dem dritten Chromosom homozygot die genomische Region von *rca1* enthielten. Die Unterscheidung dieser Embryonen erfolgte durch die LacZ-Antikörperfärbung, die bei heterozygoten Embryonen zu einem Streifenmuster führte (Abbildung 3.2). Das Kreuzungsschema zur Entstehung der Fliegenstämmen ist in Abbildung 3.5 exemplarisch dargestellt.

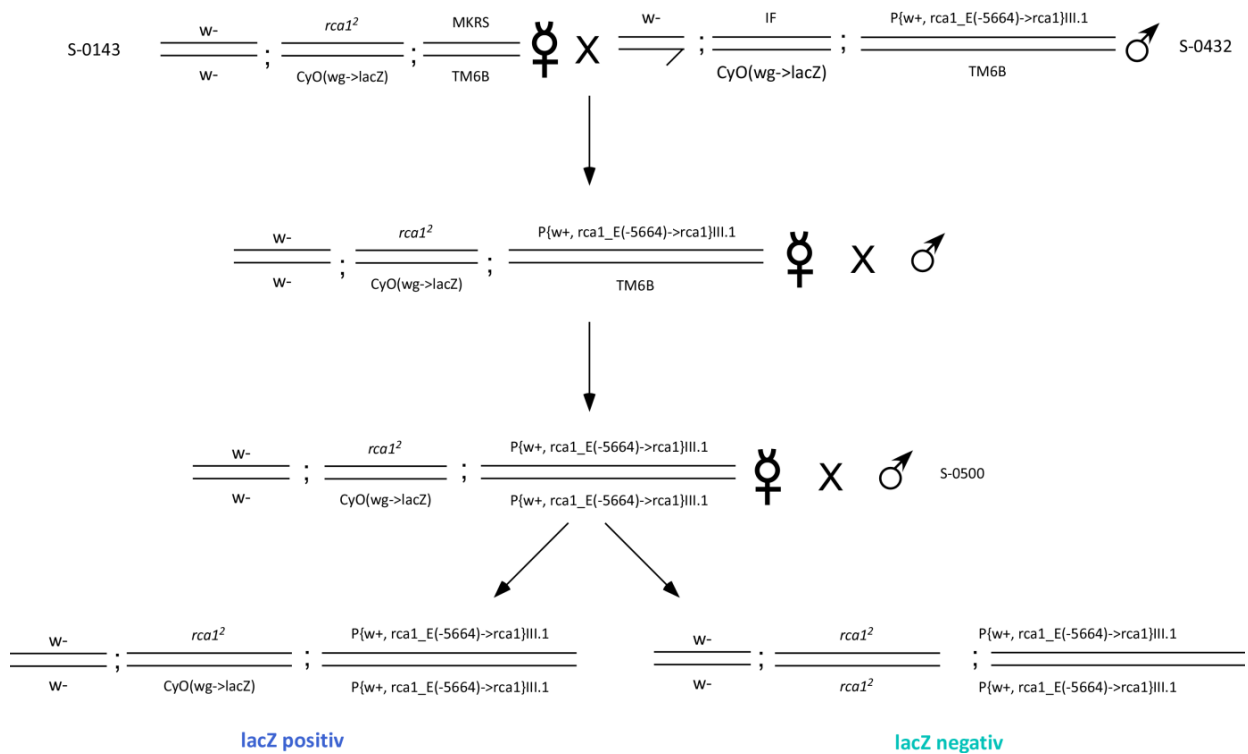


Abbildung 3.5 Kreuzungsschema und Genotypen der im Folgenden betrachteten Fliegenstämme

Exemplarisch ist ein Kreuzungsschema dargestellt, wie die Fliegenstämme hergestellt wurden, die mikroskopisch analysiert wurden. Die Ausgangsstämme S-0143 und S-0432 wurden gekreuzt. Das Endprodukt enthielt das *rca1*² Allel auf Chromosom 2 und die genomische Region auf Chromosom 3.

Die N-terminale Fusion mit einem HA-Epitop beeinträchtigt die Funktionalität von Rca1 nicht. HA-Rca1 kann genauso wie das nicht-Epitop-markierte Rca1 unter der Kontrolle des putativen Promoters den *rca1*-mutanten Phänotyp in Mitose 16 komplementieren (Abbildung 3.7). Die Betrachtung der Komplementation des *rca1*-mutanten Phänotyps von Embryonen im Stadium 13 ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die N-terminale Fusion von Rca1 mit einem HA-Epitop keinen Einfluss auf die Funktionalität von Rca1 besitzt.

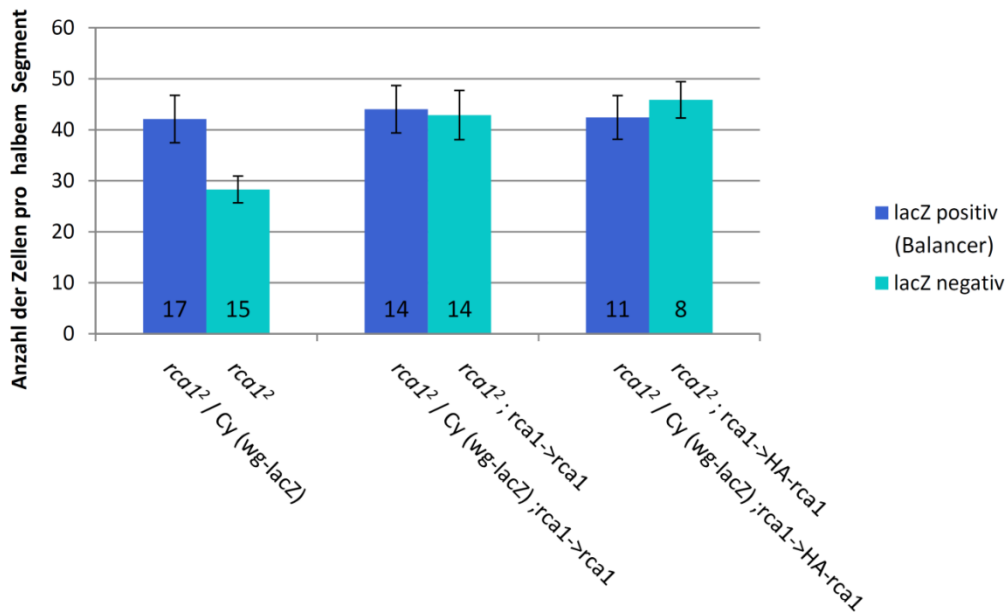


Abbildung 3.6 Die Expression von Rca1 oder HA-Rca1 unter Kontrolle des putativen endogenen Promoters kann *rca1²*-mutanten Pnötotyp komplementieren

Embryonen, die homozygot für *rca1²* sind und Rca1 oder HA-Rca1 unter der Kontrolle des putativen endogenen Promoters exprimieren, können den *rca1²*-mutanten Phänotyp komplementieren und in die Mitose 16 eintreten. Sie zeigen keine Verminderung der Zellzahl.

3.1.3 Analyse von HA-Rca1ΔF-box unter Kontrolle der genomischen Region im Embryo

Es wurde im Folgenden überprüft, ob endogene Mengen von HA-Rca1ΔF-box unter Kontrolle der genomischen regulatorischen Elemente den Arrest in der G2-Phase des 16. Zellzyklus aufheben können. Es wurde bereits gezeigt, dass bei Überexpression von HA-Epitop markiertem Rca1 mit deletierter F-box eine Komplementation dieses Phänotyps möglich ist (Zielke *et al.*, 2006).

Die Fliegenstämme wurden analog zum Kreuzungsschema in Abbildung 3.6 gekreuzt. Es wurden dann homozygote und heterozygote Embryonen für die *rca1*-Allele *rca1²* und *rca1^{C1474}* analysiert und verglichen.

Im Unterschied zur Überexpression von HA-Rca1ΔF-box im Embryo (Zielke *et al.*, 2006) konnten HA-Rca1ΔF-box unter Kontrolle der genomischen regulatorischen Region den Arrest in Zellzyklus 16 nicht aufheben (Abbildung 3.8). Es gibt dabei keinen Unterschied, ob HA-Rca1ΔF-box im Hintergrund von *rca1²* oder *rca1^{C1474}* exprimiert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass die F-box-Funktion von Rca1 *in vivo* auch schon während der Embryogenese im 16. Zellteilungszyklus benötigt wird.

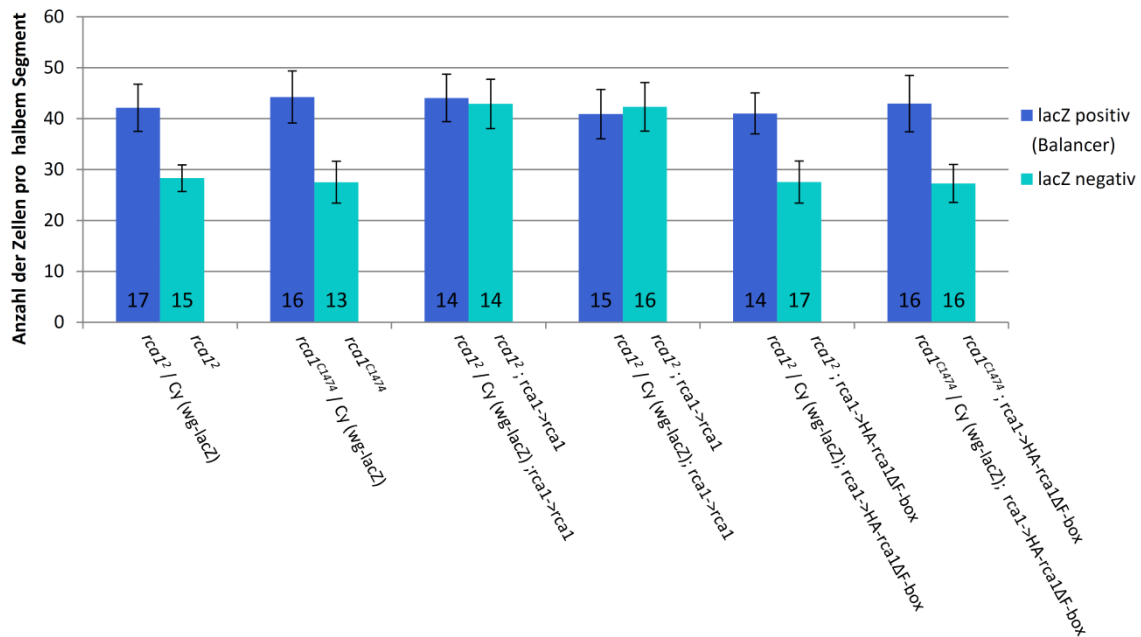


Abbildung 3.7: Die Expression von HA-Rca1ΔF-box unter Kontrolle der genomischen Region kann den *rca1*-mutanten Phänotyp nicht komplementieren, die Expression von Rca1 dagegen schon

Embryonen, die homozygot für *rca1²* oder *rca1^{C1474}* sind und Rca1 unter der genomischen Region exprimieren, können den Arrest in der G2-Phase des 16. Zellzyklus komplementieren und in die Mitose 16 eintreten. Sie zeigen keine Verminderung der Zellzahl. Die Expression von HA-Rca1ΔF-box kann dies jedoch nicht.

3.1.4 Dacapo als mögliches Substrat eines SCF^{Rca1}-Komplexes

Während der Embryogenese wurde Rca1 bisher ausschließlich eine Rolle in der direkten APC/C-Inhibition zugeschrieben, indem Rca1 als Pseudosubstrat agiert. Die Ergebnisse aus dem vergangenen Abschnitt legen jedoch nahe, dass es auch eine F-box-abhängige Funktion bei der Inhibition des APC/C in der Embryogenese gibt. Der APC/C wird während der Embryogenese neben Rca1 auch durch Cyclin A/Cdk1, Cyclin E/Cdk2 und Rca1 inhibiert (Dienemann und Sprenger, 2004, Knoblich *et al.*, 1994; Sigrist und Lehner, 1994). Es konnte außerdem in vorangegangenen Analysen eine F-box-abhängige Interaktion von Rca1 mit SCF-Komponenten nachgewiesen werden (Zielke *et al.*, 2006). Rca1 könnte also ein Teil eines SCF-Komplexes sein, der den negativen Regulator von Cyclin E/Cdk2, Dacapo, für den Abbau markiert und somit die Inhibition des APC/C indirekt und F-box-abhängig, beeinflusst. Wenn Rca1 eine F-box-abhängige Funktion bei der Regulation von Dacapo während der Embryogenese erfüllt, dann müssten Embryonen, die das *rca1*-Allel *rca1^{C1474}* tragen und außerdem *dacapo*-mutant sind, keinen Arrest im Zellzyklus zeigen, weil die F-box-abhängige Funktion dann nicht gebraucht werden sollte. Die direkte APC/C-Inhibition als Pseudosubstrat sollte ein Rca1-Protein ausführen können, das aus dem *rca1*-Allel *rca1^{C1474}* hervorgeht, welches einen Aminosäureaustausch innerhalb der F-box trägt.

Deswegen wurden Embryonen untersucht, die sowohl für *rca1* als auch für *dacapo*-mutant sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *dacapo*-Allel *dap⁶* verwendet. Das *dacapo*-Allele *dap⁶* entstand

durch unpräzises Ausschneiden eines P-Elements aus *dap*¹ (Lehner, persönliche Kommunikation). *dap*¹ wiederum ist ein Allel, das bei einem Enhancer Trap Screen identifiziert wurde und im Promoter-Bereich eine P-Element Insertion trägt (Lane *et al.*, 1996; de Nooij *et al.*, 1996). Bei *dap*⁶ handelt es sich aufgrund der fehlenden Cdk2-Bindestelle, um ein Nullallel (C. Lehner, persönliche Mitteilungen).

Zunächst wurden *dap*⁶-mutante Embryonen untersucht, die auf dem dritten Chromosom die Transgeninsertion der genomischen Region tragen, die die Expression von Rca1 und HA-Rca1ΔF-box vermittelt, um mögliche negative Auswirkungen von erhöhter Rca1-Expressionsmenge durch diese Transgeninsertionen auszuschließen. Die Anwesenheit der genomischen Region, die die Expression von Rca1 und HA-Rca1ΔF-box vermittelt, wirkte sich nicht auf die Anzahl der Zellen pro halbem Segment aus (Abbildung 3.8). In der Gegenwart dieser Konstrukte zeigte sich der *dap*⁶-mutante Phänotyp. Dieser Phänotyp spiegelt sich in einer Erhöhung der Zellzahl wider, da epidermale Zellen einen weiteren kompletten 17. Zellzyklus durchlaufen, und nicht wie im Wildtyp aus dem Zellzyklus austreten und eine stabile G1-Phase einleiten.

Im nächsten Schritt sollten Embryonen analysiert werden, die die *rca1*-Allele *rca1*² oder *rca1*^{C1474} und zusätzlich das *dacapo*-Allel *dap*⁶ auf einem Chromosom tragen.

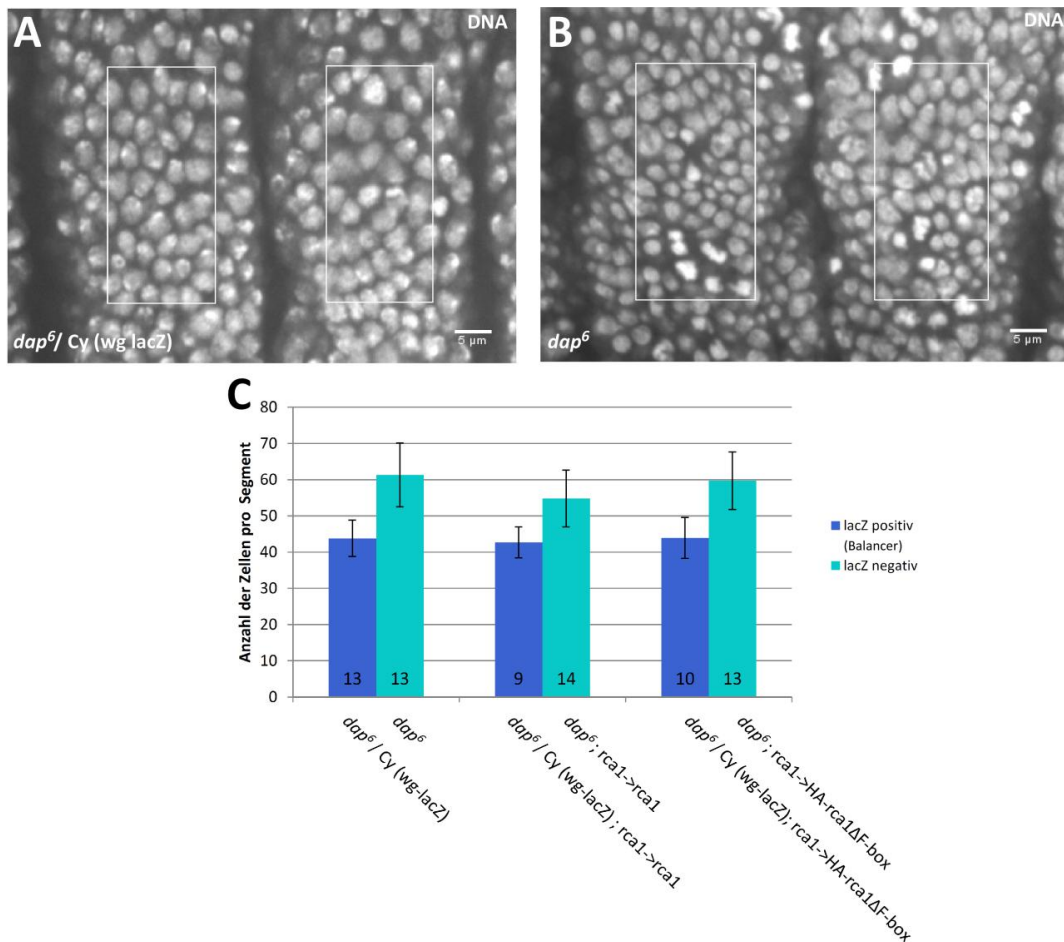


Abbildung 3.8: Die Expression von Rca1 und HA-Rca1ΔF-box unter der Kontrolle der genomischen Region wirken sich nicht auf den *dacapo*-mutanten Phänotyp aus

Embryonen, die homozygot für *dap⁶* sind durchlaufen einen zusätzlichen 17. Zellzyklus und können keine stabile G1-Phase nach Mitose 16 ausbilden. Dies führt zu einer erhöhten Zahl epidermaler Zellen pro ausgewertetem halbem Segment (B). Embryonen, die heterozygot für *dap⁶* sind, entwickeln sich normal (A). Die zusätzliche Expression von Rca1 unter Kontrolle des putativen endogenen Promoters mit und ohne F-box verändert diesen Phänotyp nicht (C).

Ziel war es hierbei, Fliegenstämme zu generieren, die sowohl ein *rca1*-Allel als auch das *dacapo*-Allel auf dem zweiten Chromosom tragen. Aus diesem Grund wurden rekombinante Fliegen hergestellt, die auf Chromosom 2 neben den mutanten Allelen *rca1²* oder *rca1^{C1474}* auch das *dacapo*-Allel *dap⁶* besitzen. Das für die Erstellung des rekombinanten Stammes mit *rca1²* und *dap⁶* zugrunde liegende Kreuzungsschema ist in Abbildung 3.9 dargestellt und ist gleichzeitig exemplarisch für die Herstellung des rekombinanten Stammes mit *rca1^{C1474}* und *dap⁶*.

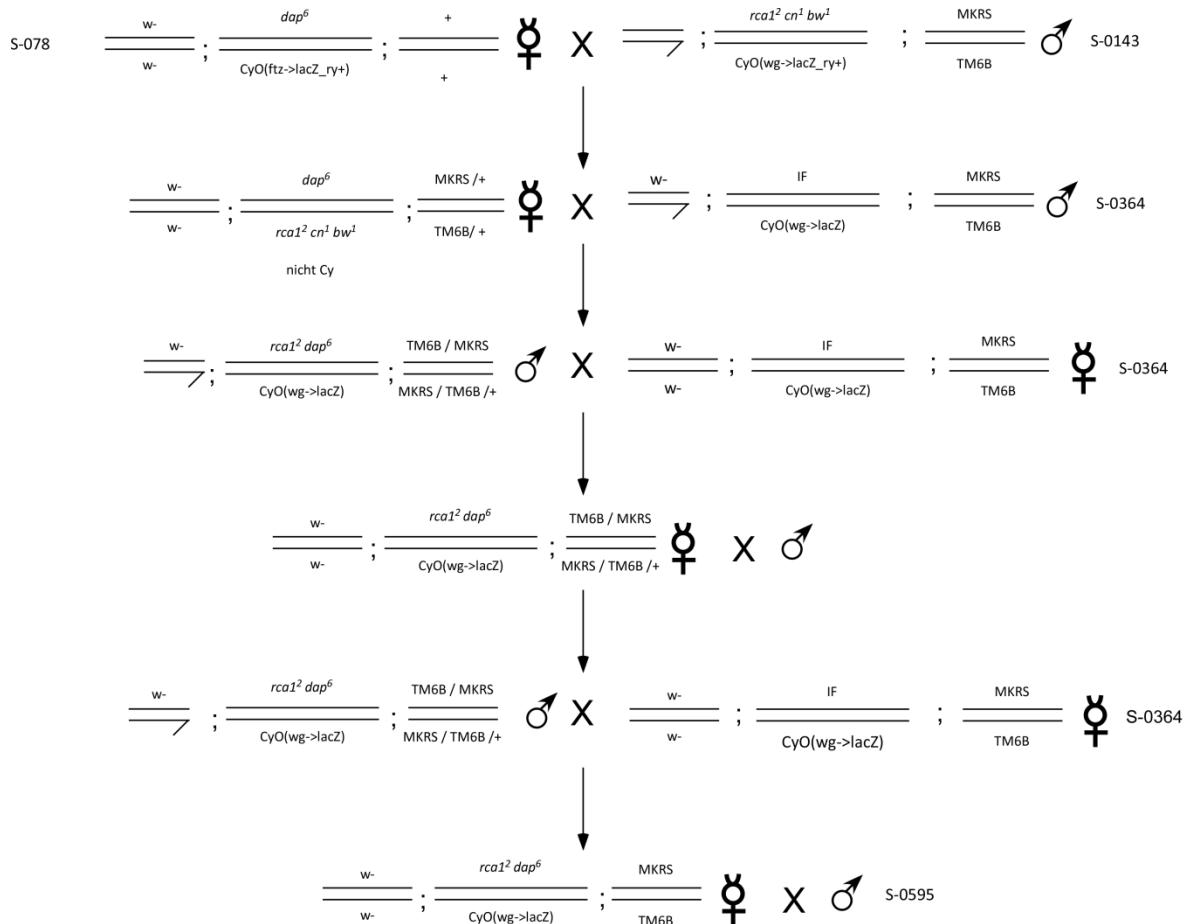


Abbildung 3.9: Kreuzungsschema für die Herstellung eines auf dem zweiten Chromosom rekombinanten Fliegenstammes mit den Allelen $rca1^2$ und dap^6

Aus den Ausgangsstämmen S-078 und S-0143 wurden rekombinante Fliegenstämme für $rca1^2$ und dap^6 hergestellt. Analog dazu wurde ein ebenfalls für das zweite Chromosom rekombinanter Stamm aus S-0413 $rca1^{C1474}$ und S-0078 dap^6 hergestellt.

Es konnten erfolgreich Stämme etabliert werden, die $rca1^2 dap^6$ oder $rca1^{C1474} dap^6$ auf dem zweiten Chromosom tragen. Die Rekombinanten aus den beiden $rca1$ -Allelen $rca1^2$ oder $rca1^{C1474}$ und dap^6 lieferten unterschiedliche Phänotypen. Bei $rca1^2 dap^6$ kam der dap^6 -Phänotyp zum Tragen, da eine Erhöhung der Zellzahl pro ausgewertetem halben Segment erkennbar war. Bei der Rekombinante aus $rca1^{C1474}$ und dap^6 ist bei homozygoten Embryonen der $rca1$ -mutante Phänotyp ausgeprägt, es ist also eine Verringerung der Zellzahl erkennbar, wie schon bei den $rca1$ -Allelen allein wie in Abbildung 3.2 dargestellt (Abbildung 3.11).

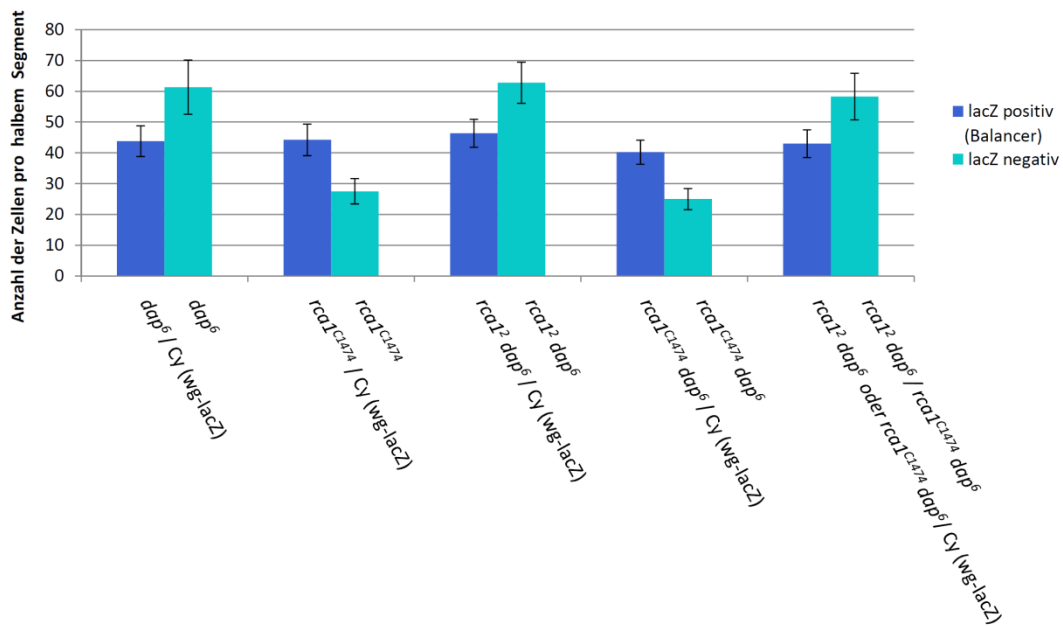


Abbildung 3.10 Die Rekombinanten aus *dap⁶* und *rca1²* bzw. *rca1^{C1474}* zeigen unterschiedliche Phänotypen

Homozygote *rca1² dap⁶*-mutante Embryonen durchlaufen genauso wie homozygote *dap⁶*-Mutanten einen zusätzlichen Zellzyklus und können keine stabile G1 Phase ausbilden. Es kommt zu einer Zunahme epidermaler Zellen. Dagegen arretieren homozygote *rca1^{C1474} dap⁶*-mutante Embryonen, wie homozygote *rca1*-mutante Embryonen in Mitose 16, und weisen als Folge eine verringerte Anzahl epidermaler Zellen auf.

Bei transheterozygoten Embryonen, die auf Chromosom 2 *rca1² dap⁶* und *rca1^{C1474} dap⁶* tragen, findet kein Arrest in Mitose 16 statt, sondern ein zusätzlicher 17. Zellzyklus und eine Erhöhung der Anzahl an epidermalen Zellen, wie es bei homozygoten *rca1² dap⁶* Embryonen der Fall ist.

Zur Kontrolle wurde außerdem überprüft, ob die Expression von Rca1 in endogenen Mengen in den rekombinanten Fliegenstämmen zur Ausprägung des *dacapo*-mutanten Phänotyps führt. Außerdem wurden endogene Mengen von HA-Rca1ΔF-box in den rekombinanten Fliegenstämmen exprimiert. Die Stämme wurden durch Kreuzungen analog zum Kreuzungsschema in Abbildung 3.5 erstellt, die neben dem rekombinanten zweiten Chromosom auf dem dritten Chromosom homozygot für die genomische Region, die die Expression von Rca1 oder HA-Rca1ΔF-box vermittelt, sind. Im ersten Fall ergab sich für die Stämme *rca1² dap⁶* und *rca1^{C1474} dap⁶* mit der zusätzlich durch die genomische Region vermittelten Rca1-Expression die Ausprägung des *dap⁶*-Phänotyps. Die epidermalen Zellen konnten nach der Mitose 16 nicht aus dem Zellzyklus austreten und durchliefen einen 17. Zellzyklus. Im Falle der Expression von HA-Rca1ΔF-box zeigte sich bei *rca1² dap⁶* wie bereits in der Abwesenheit von Rca1 in Abbildung 3.10 der *dap⁶*-Phänotyp (Abbildung 3.11). Im Falle von *rca1^{C1474} dap⁶* arretierten die Embryonen ebenfalls in der G2-Phase der Mitose 16 (Abbildung 3.10; Abbildung 3.11).

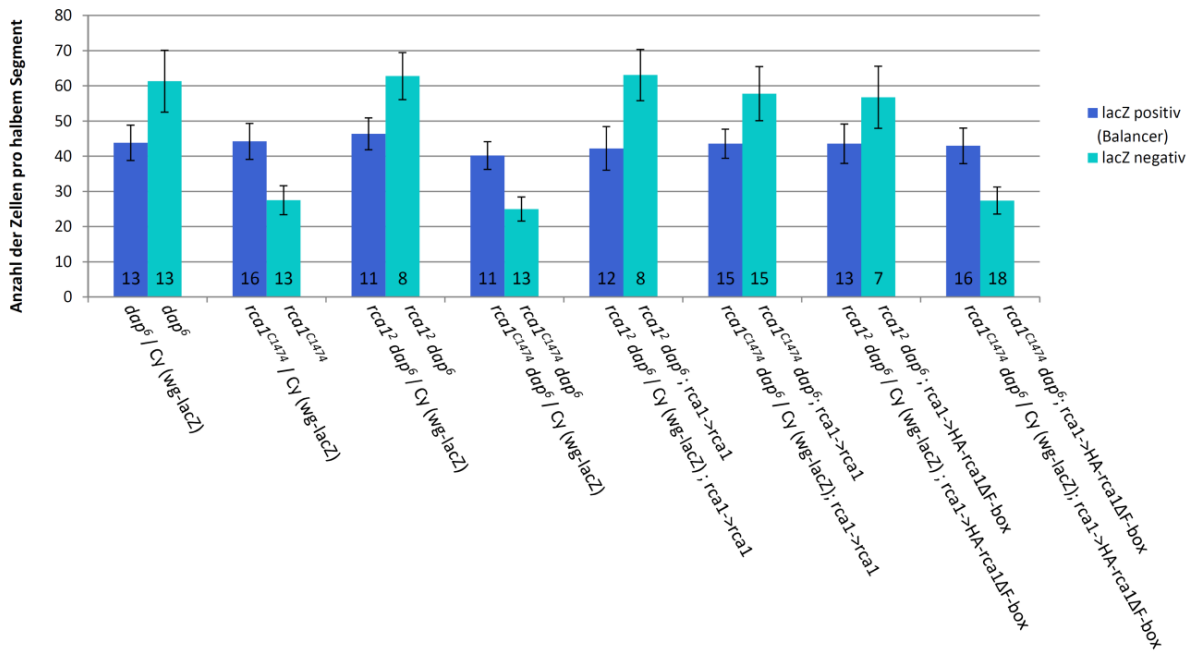


Abbildung 3.11: HA-Rca1ΔF-box kann in *rca1² dap⁶* bzw. *rca1^{C1474} dap⁶*-mutanten Embryonen *rca1* nicht komplementieren

Homozygote *rca1² dap⁶*-mutante Embryonen, die zusätzlich endogen Rca1 exprimieren, durchlaufen einen zusätzlichen Zellzyklus, wie auch *rca1² dap⁶* alleine. Sie können keine stabile G1 Phase ausbilden und es kommt zu einer größeren Anzahl an epidermalen Zellen. Die Expression von Rca1 unter Kontrolle des endogenen Promoters führt auch bei homozygoten *rca1^{C1474} dap⁶*-Mutanten zur Komplementation des *rca1*-mutanten Phänotyps. Diese Embryonen können ebenfalls keine stabile G1-Phase ausbilden und zeigen eine Zunahme epidermaler Zellen.

Die endogene Expression von HA-Rca1ΔF-box bewirkt bei homozygoten *rca1² dap⁶* Mutanten, wie zu erwarten, eine Zunahme an epidermalen Zellen, wie es bei (*rca1²*) *dap⁶* Mutanten der Fall war.

Der Phänotyp der *rca1^{C1474} dap⁶*-mutanten homozygoten Embryonen bleibt ebenfalls unverändert, wenn HA-Rca1ΔF-box unter der Kontrolle des putativen endogenen Rca1 Promoters exprimiert wird. Es findet ein Arrest in Mitose 16 statt, der sich in einer Reduzierung an epidermalen Zellen äußert.

Dieser interessante, Allel-spezifische Unterschied zwischen *rca1² dap⁶* und *rca1^{C1474} dap⁶* deutet darauf hin, dass es eine spezifische Funktion der F-box in Rca1 gibt und Dacapo vermutlich mit dieser F-box-Funktion in Verbindung steht.

3.2 Analyse von Rca1 in S2R+-Zellen

Um die Interaktion zwischen Rca1 und Dacapo näher zu untersuchen, wurden weitere Analysen von Rca1 und Dacapo in S2R+-Zellen durchgeführt. Diese Zellen ermöglichen eine schnelle und einfache Analyse von unterschiedlichen Rca1-Proteinen und deren Auswirkungen auf Dacapo. Zudem enthält der Zellzyklus dieser Zellen eine stabile G1-Phase. Es ist außerdem möglich lebende Zellen unter dem Mikroskop zu verfolgen oder durch Durchflusszytometrie Zellpopulationen verschiedenen Zellzyklusphasen zuzuordnen.

3.2.1 Die Überexpression von Rca1 führt zu einer Verkürzung der G1-Phase

Rca1 wird benötigt, um den APC/C^{F^{Zr}} in der G2-Phase und am G2-M-Übergang des Zellzyklus zu inhibieren (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). Die Überexpression von Rca1 kann außerdem S-Phasen induzieren. Diese beiden Funktionen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit näher charakterisiert. Aus vorangegangenen Studien in *Drosophila* Embryonen ist bekannt, dass die Überexpression von Rca1 während der Augenentwicklung zu einer Induktion von S-Phasen führt. Wird HA-Rca1 während der Augenentwicklung in *Drosophila* überexprimiert, dann entstehen raue Augen, weil ektopische S-Phasen in Zellen induziert werden, die sich normalerweise in der G1-Phase befinden würden. Dieser Effekt ist F-box-abhängig (Zielke *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurde der G1-S-Übergang näher untersucht. Hierfür wurde während dieser Arbeit ein Zellkultursystem etabliert, welches es ermöglicht, den Einfluss der Überexpression verschiedener Rca1-Derivate auf den G1-S-Übergang, zu ermöglichen. Es wurde zunächst untersucht, wie sich die Überexpression von Rca1 auf den G1-S-Übergang und den Zeitpunkt des Eintritts in die S-Phase auswirkt. Mithilfe von Lebendzellbeobachtungen (*live cell imaging*) wurde die Länge der G1-Phase bestimmt. Es wurde ein Zeitraum zwischen der Anaphase und dem Beginn der S-Phase betrachtet. Um den Eintritt in die S-Phase annähernd zu bestimmen, wurde der Zellzyklusmarker E2F1 1-230-3xCherry überexprimiert (Abbildung 13, A).

E2F1 gehört der Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren an, die sowohl die Expression von Genen, die in der DNA-Synthese, Mitose, Apoptose, DNA Reparatur und Zelldifferenzierung regulieren (Burkhart und Sage, 2008; van den Heuvel und Dyson, 2008). In *Drosophila* wird der starke positive Aktivator des G1-S-Übergangs durch die Ubiquitin-E3-Ligase CRL4^{Cdt2} für den Abbau markiert. Dies geschieht über die im N-Terminus vorhandene PIP-box zu Beginn der S-Phase (Shibutani *et al.*, 2008).

Der Zellzyklusmarker E2F1 1-230-3xCherry (Abbildung 3.13) enthält im N-Terminus die PIP-box, jedoch sind die Struktur motive für die DNA-Bindung, die Interaktion mit Dp oder dem Retinoblastoma-Protein (Rb) im C-Terminus deletiert. Somit sollte der Zellzyklus bei Überexpression dieses Konstrukts

nicht beeinflusst werden. Der Zellzyklus-spezifische Abbau ist jedoch aufgrund des Degrons im N-Terminus immer noch möglich.

In Abbildung 3.13 sind Zellen dargestellt, bei denen der Zellzyklusmarker E2F1 1-230-3xCherry überexprimiert wurde. Es wurde dabei der Zeitraum von der Anaphase bis zum Verschwinden des Zellzyklusmarkers E2F1 1-230-3xCherry betrachtet. Diese Zeitwerte als Maß für die Länge der G1-Phase wurden mit und ohne die simultane Überexpression von 4xFLAG-Rca1 (Abbildung 3.13) verglichen. Die transient transfizierten Zellen wurden via *live cell imaging* über 48 h beobachtet. Die in Abbildung 3.13 dargestellten Zellen sind repräsentativ für die in Abbildung 14 in Boxplots dargestellten Zellen, bei denen die relative Länge der G1-Phase bestimmt wurde.

Abbildung 3.13, A zeigt eine sich teilende Zelle. E2F1 1-230-3xCherry befindet sich während der Interphase im Kern. Nach dem Zusammenbruch der Kernmembran (Abbildung 3.13, A: 20 min) verteilt sich das Protein innerhalb der gesamten Zelle. Nach der Mitose akkumuliert E2F1 1-230-3xCherry wieder im Kern (ab 60 min). Das Signal verschwindet bei ca. 540 min, d.h., dass zu diesem Zeitpunkt

E2F1 1-230-3xCherry vom CRL4^{Cdt2} für den Abbau markiert und im 26 S Proteasom degradiert wurde. Der Zeitraum für die G1-Phase liegt ohne zusätzliche Überexpression von Rca1 bei ca. 490 min. Bei der simultanen Überexpression von 4xFLAG-Rca1 und E2F1 1-230-3xCherry (Abbildung 3.13, B) ist die Signalintensität des Cherry-Signals etwas geringer als bei A. Der Zusammenbruch der Kernmembran findet ebenfalls nach ca. 20 min statt. Nach der Anaphase akkumuliert E2F1 1-230-3xCherry erneut nach ca. 50 min im neugebildeten Kern. Nach ca. 170 min wird E2F1 1-230-3xCherry abgebaut, was am Verschwinden des Cherry-Signals erkennbar ist. Die zeitliche Differenz zwischen der Anaphase und dem Verschwinden des Cherry-Signals bei der Überexpression von 4xFLAG-Rca1 liegt bei ca. 130 min. Die Differenz mit und ohne Rca1-Überexpression (Abbildung 3.13, A und B) liegt demnach bei ca. 360 min. Die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 verkürzt somit wesentlich die Dauer der G1-Phase.

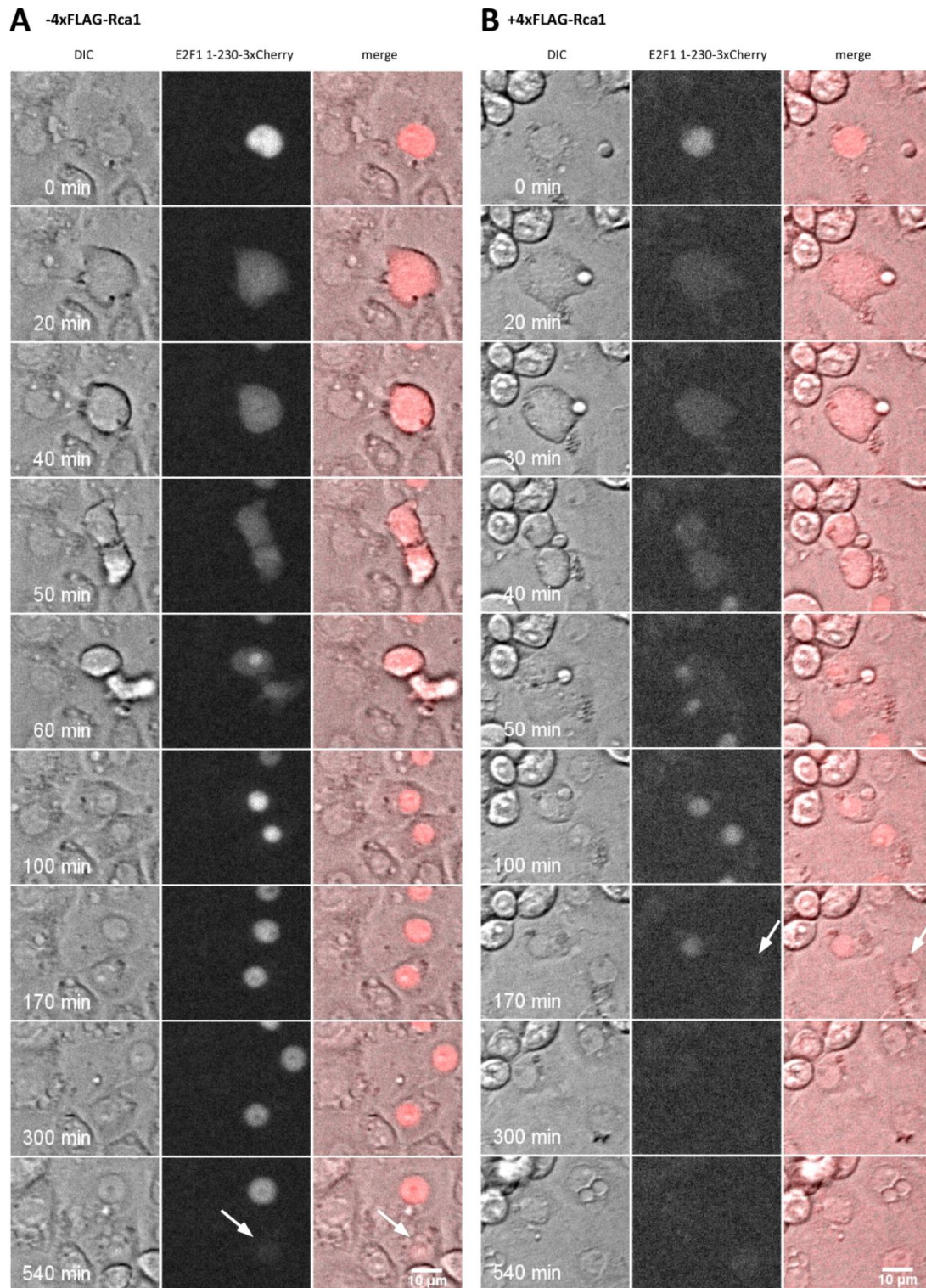


Abbildung 3.12: Exemplarische Zellen für die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 in Gegenwart des S-Phasenmarkers E2F1 1-230-3xCherry

In S2R⁺-Zellen wurde der S-Phasenmarker E2F1 1-230-3xCherry transient transfiziert und überexprimiert, um die Dauer der G1-Phase durch Rca1-Überexpression zu bestimmen. Die Zellen wurden 48 h beobachtet und sind repräsentativ für die Ergebnisse in

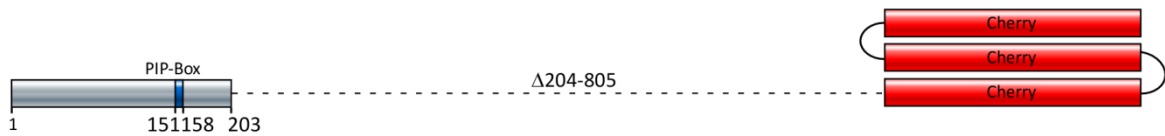
Abbildung 3.13 ,B. Es wurde der Zeitraum zwischen Anaphase und Abbau von E2F1 1-230-3xCherry zu Beginn der S-Phase gemessen. Die Zellen wurden ohne (A) und mit 4xFLAG-Rca1-Überexpression (B) verglichen.

Nach ca. 170 min ist E2F1 1-230-3xCherry bei 4xFLAG-Rca1-Überexpression komplett abgebaut und nicht mehr detektierbar (B, weißer Pfeil). Ohne 4xFLAG-Rca1-Überexpression, also nur in Gegenwart von E2F1 1-230-3xCherry verschwindet E2F1 erst nach ca. 540 min (A, weißer Pfeil). Das bedeutet, dass die G1-Phase bei Rca1-Überexpression verkürzt ist.

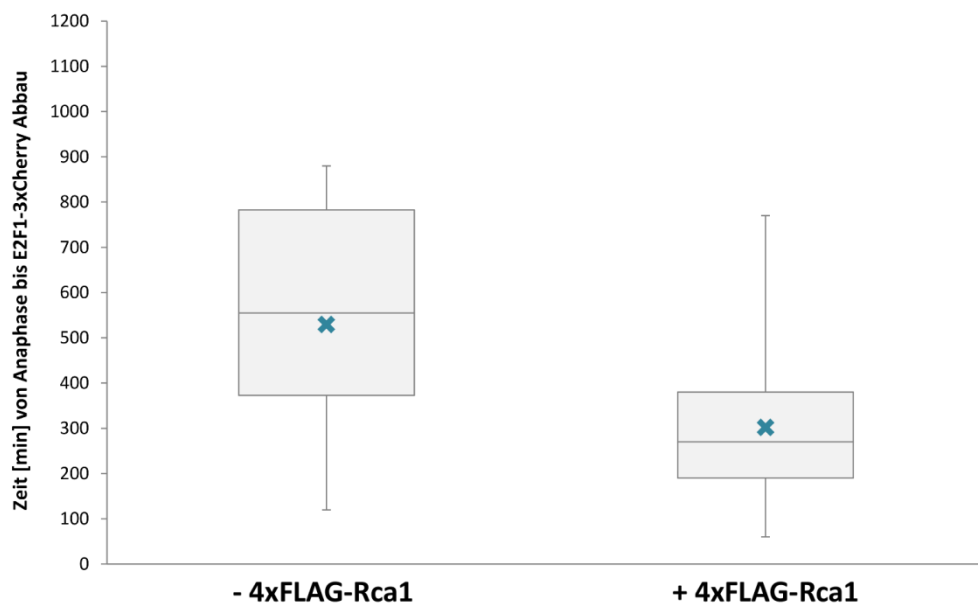
DIC: Durchlichtkanal, E2F1 1-230-3xCherry: Cherry Fluoreszenz, merge: Überlagerung aus Durchlicht- und Cherry Kanal

In Abbildung 3.14, B sind die Ergebnisse aus dem *live cell imaging* in einem Boxplot dargestellt. Die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 führt zu einem vorzeitigen Eintritt in die S-Phase und somit zu einer verkürzten G1-Phase.

A E2F1 1-203-3xCherry



B



Mittelwert [min]	529,5	301,7
Median [min]	555	270
Anzahl der Zellen	22	41

Abbildung 3.13: Die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 führt zu einer verkürzten G1-Phase

A: Schematische Darstellung des S-Phasen-Zellzyklusmarkers E2F1 1-203-3xCherry, der ohne den Zellzyklus zu beeinflussen über die PIP-box im N-Terminus Zellzyklus-spezifisch am Beginn der S-Phase von der Ubiquitin-Ligase CRL4^{Cdt2} abgebaut wird.

B: E2F1 1-203-3xCherry wird im Zellzyklus früher abgebaut, wenn 4xFLAG-Rca1-Überexprimiert wird, weil die Zellen früher in die S-Phase eintreten. Die Überexpression von Rca1 führt somit zu einer Verkürzung der G1-Phase. Innerhalb der Box ist das Spektrum der mittleren 50 % der Daten dargestellt, die Fehlerbalken zeigen die maximalen Abweichungen auf, also die geringsten und die höchsten Datenwerte. Der Querstrich innerhalb der Box steht für den Median, den Zentralwert. Die Werte oberhalb des Medians sind die größeren 50 % der Datenwerte, die Werte unterhalb des Medianes also die kleineren 50 % der Datenwerte. Außerdem sind die Mittelwerte und der Median der dargestellten Werte angegeben.

Grünes Kreuzchen: Mittelwert

Mittlerer Querstrich im Box-Plot: Median

Die Verkürzung der G1-Phase durch die Rca1-Überexpression wurde außerdem anhand eines weiteren S-Phasenmarkers bestätigt. Für diese Analysen wurde der Lebendzellmarker HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP verwendet. Cdt 1 ist ein Protein, das für die Lizenzierung von DNA-Replikationsstellen benötigt wird (Maiorano *et al.*, 2000). Der Abbau von Cdt1 erfolgt in *Drosophila* ebenfalls PIP-box-abhängig und wird durch die E3-Ligase CRL4^{Cdt2} vermittelt (Lee *et al.*, 2010). Beim Zellzyklusmarker HA-NLS-Cdt1 1-102-2xGFP ist ein Großteil der Geminin-bindenden Domäne sowie die Domäne für die Interaktion mit MCM deletiert, aber der PIP-box-abhängige Abbau ist nach wie vor möglich. Der Zellzyklus-spezifische Abbau von Cdt1 erfolgt durch den CRL4^{Cdt2}-Komplex. HA-NLS-Cdt1 1-102-2xGFP eignet sich somit genauso wie E2F1 1-230-3xCherry als Marker, um die Länge der G1-Phase zu bestimmen. Während der Interphase lokalisiert HA-NLS-Cdt1 1-102-2xGFP im Zellkern (Abbildung 3.15). Nach dem Zusammenbruch der Kernmembran verteilt sich HA-NLS-Cdt1 1-102-2xGFP über die gesamte Zelle (Abbildung 3.15, 20 min). Nach der Mitose lokalisiert HA-NLS-Cdt1 1-102-2xGFP erneut im Zellkern (Abbildung 3.15, 50 min). HA-NLS-Cdt1 1-102-2xGFP wird nach ca. 600 min abgebaut (Abbildung 3.15, A). Daraus ergibt sich ein Zeitraum von ca. 550 min von der Anaphase bis zum Abbau des Proteins in der S-Phase. Wird zusätzlich 4xFLAG-Rca1 überexprimiert, dann erfolgt der Abbau von HA-NLS-Cdt1 1-102-2xGFP bereits nach ca. 210 min abgebaut (Abbildung 3.15, B). Dies bedeutet wiederum, dass HA-NLS-Cdt1 1-102-2xGFP nach ca. 160 min abgebaut wird. Die zeitliche Differenz mit und ohne 4xFLAG-Rca1-Überexpression liegt demnach bei ca. 390 min.

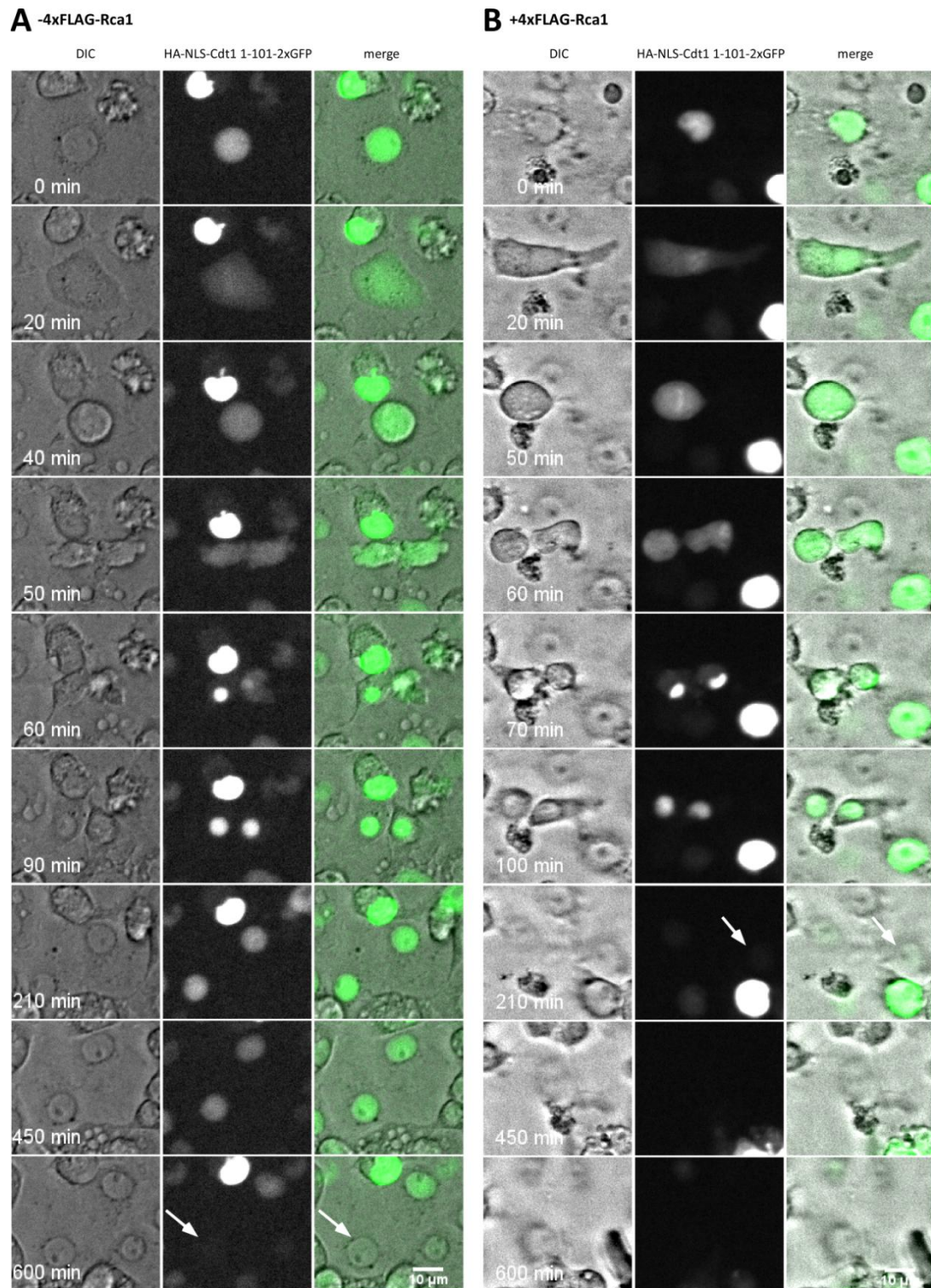


Abbildung 3.14: Exemplarische Zellen für die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 in Gegenwart des S-Phasenmarkers HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP

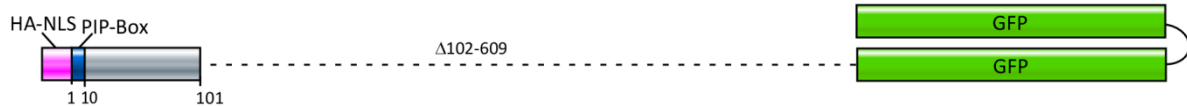
In S2R⁺-Zellen wurde der S-Phasenmarker HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP überexprimiert, um die Verkürzung der Länge der G1-Phase durch Rca1-Überexpression zu bestimmen. Die Zellen wurden 48 h beobachtet und sind repräsentativ für Ergebnisse in Abbildung 3.16. Es ist der Zeitraum zwischen Mitose (Zusammenbruch der Kernmembran) und Abbau von Cdt1 dargestellt. HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP wird am Beginn der S-Phase abgebaut. Es wurden Zellen ohne (A) und mit (B) Rca1-Überexpression verglichen, in denen auch der Zellzyklusmarker HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP überexprimiert wurde.

Nach ca. 210 min ist HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP bei 4xFLAG-Rca1-Überexpression komplett abgebaut und nicht mehr detektierbar (B, weißer Pfeil). Ohne 4xFLAG-Rca1-Überexpression, also nur in Gegenwart von HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP, verschwindet Cdt1 erst nach ca. 600 min (A, weißer Pfeil). Das bedeutet, dass die G1-Phase bei Rca1-Überexpression verkürzt ist.

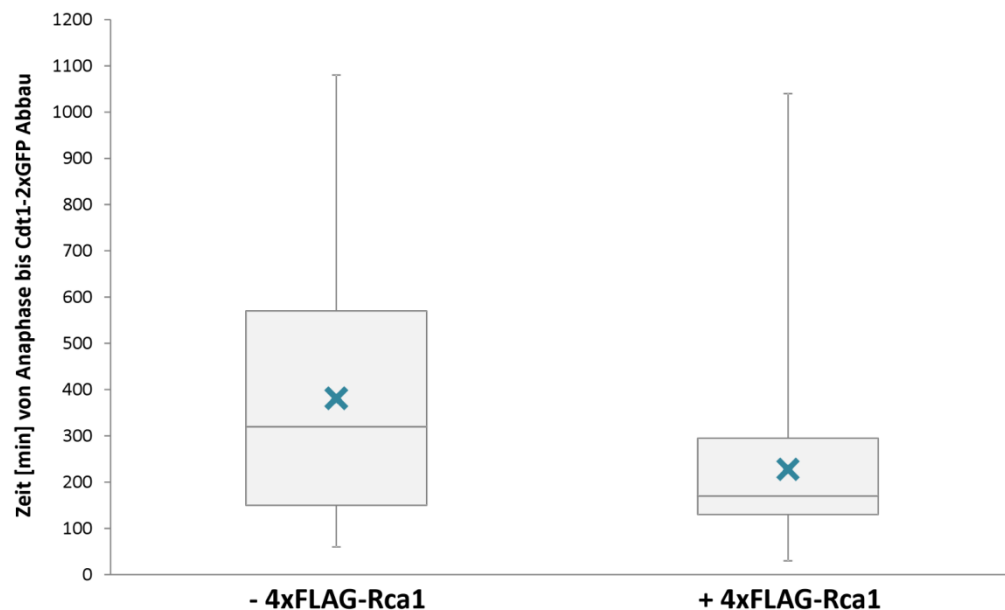
DIC: Durchlichtkanal, HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP: GFP-Fluoreszenz, merge: Überlagerung aus Durchlicht- und GFP-Fluoreszenz.

Die Auftragung, der beim *Live-Cell-Imaging* aufgenommenen Zellen, erfolgte ebenfalls durch einen Boxplot (Abbildung 3.16, B). Wie auch bei E2F1 1-230-3xCherry, zeigte die Verwendung des Markers HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP eine Verkürzung der G1-Phase bei Rca1-Überexpression.

A HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP



B



Mittelwert [min]	381,3	227,6
Median [min]	320	170
Anzahl der Zellen	31	59

Abbildung 3.15: Die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 führt zu einer verkürzten G1-Phase

A: Schematische Darstellung des S-Phasenzellzyklusmarkers HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP. Dieses Konstrukt beeinflusst den Verlauf des Zellzyklus nicht, wird aber wie Cdt1 Zellzyklus-spezifisch über die Erkennung der PIP-box am Beginn der S-Phase von der Ubiquitin-Ligase CRL4 für den Abbau markiert.

B: Die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 führt zu einem verfrühten Abbau von HA-NLS-Cdt1 1-101. Die Zellen treten somit vorzeitig in die S-Phase ein. Es sind die Mittelwerte und der Median der dargestellten Werte angegeben.

Grünes Kreuzchen: Mittelwert

Mittlerer Querstrich im Box-Plot: Median

Beim Vergleich der Mittelwerte und Mediane aus den Boxplots (Abbildung 3.14, B und Abbildung 3.16, B) fällt auf, dass E2F1 1-230-3xCherry und HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP nicht zur gleichen Zeit abgebaut werden. Diese beiden Zellzyklusmarker sind noch nicht vollständig charakterisiert und der genaue Zeitpunkt des Abbaus ist nicht genau bekannt. Sie liefern jedoch einen ungefähren zeitlichen Rahmen über die Verkürzung der G1-Phase nach Rca1-Überexpression.

Es konnte durch die Verwendung zweier unterschiedlicher S-Phasenmarker gezeigt werden, dass die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 zu einer verkürzten G1-Phase führt.

3.2.2 Die Rolle von F-box und Zinkbinderegion auf den G1-S-Übergang in S2R+-Zellen

Den Beobachtungen aus dem *live cell imaging* lag technisch bedingt nur eine limitierte Anzahl von Zellen zu Grunde. Es wurden deswegen im Folgenden lebende, transfizierte Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Diese Technik erlaubt die Analyse einer größeren Zellpopulation. Es wurde dabei die Überexpression von verschiedenen Rca1-Versionen auf Verschiebungen des Zellzyklusprofils überprüft. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Induktionsfähigkeit von S-Phasen von verschiedenen Deletionen und Aminosäureaustauschen in Rca1.

Im Durchflusszytometer wurde der DNA-Gehalt durch die Färbung der Zellen mit Hoechst sichtbar gemacht. Hoechst 33342 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA bindet und im UV-Bereich angeregt werden kann. Durch diese DNA-Färbung ist es möglich aufgrund des DNA-Gehaltes bestimmte Zellpopulationen bestimmten Zellzyklusstadien zuzuordnen. Zellen, die in der G1-Phase sind, enthalten den einfachen DNA-Gehalt und bilden den ersten Hochpunkt im Zellzyklusprofil (1C Zellen). Zellen, die den doppelten DNA-Gehalt aufweisen, weil das Genom repliziert wurde, bilden den 2. Hochpunkt im Zellzyklusprofil (2C-Zellen). Im Tiefpunkt zwischen dem 1C- und 2C-Peak sind Zellen enthalten, die sich in der S-Phase befinden und in denen das Genom noch nicht vollständig repliziert ist.

Die Expression der verschiedenen Rca1-Konstrukte, die mit HA- oder FLAG-Epitopen markiert sind, erfolgte durch transiente Transfektion. Transfizierte Zellen konnten durch die Expression von (HA-NLS-)3xCherry-Plasmiden identifiziert werden, die mit den Rca1-Plasmiden cotransfiziert wurden. Cotransfektions-Kontrollexperimente zeigten, dass über 90 % der transfizierten Zellen bei einer Cotransfektion Proteine von zwei verschiedenen Plasmiden exprimieren (Daten nicht gezeigt). Somit kann der Einfluss der Rca1-Überexpression anhand der Cherry-positiven Zellen untersucht werden. Durch die Analyse des DNA-Gehaltes über die Hoechst-Färbung und die anschließende Detektion im FL2-Kanal konnten Verschiebungen im Zellzyklusprofil von den Cherry-positiven Zellen analysiert werden. Alle Rca1-Konstrukte wurden außerdem unter dem gleichen induzierbaren Metallothionein-Promoter exprimiert, sodass angenommen werden kann, dass die mRNA-Menge und die Translation für alle Rca1-Derivate identisch ist.

Bei der Transfektion von (HA-NLS-)3xCherry ist eine leichte Zunahme an Cherry-positiven 2C-Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen erkennbar. Diese Verschiebung des allgemeinen Zellzyklusprofils kommt vermutlich daher, dass die Plasmid-DNA dieser Konstrukte bei der Transfektion zuerst nur ins Zytoplasma aufgenommen werden und erst transkribiert werden können, wenn die Plasmid-DNA in den Zellkern aufgenommen wurde. Nachdem die Zellen einen Zellteilungszyklus durchlaufen haben, bei dem zu Beginn der Mitose die Kernhülle aufgelöst und am Ende der Mitose neu gebildet wird, kann somit die Plasmid-DNA in den neu gebildeten Zellkern gelangen und transkribiert werden. In der folgenden G2-Phase tauchen die von der Plasmid-DNA synthetisierten Proteine auf und es sind

dann relativ gesehen eine größere Anzahl 2C-Zellen Cherry-positiv. Um dies zu berücksichtigen, wurde diese Verschiebung in die Berechnung mit einbezogen.

Bei den Zellzyklusprofilen kommt es zu einer Überlagerung der Zellpopulationen. Der 1C- und 2C-Peak kann dabei sehr frühe bzw. sehr späte S-Phase-Zellen enthalten. Um Zellen, die sich in der S-Phase befinden, aus der Berechnung von 1C/2C Verhältnissen zu entfernen, wurden in den folgenden Berechnungen mit halben 1C und 2C Peaks gearbeitet (Abbildung 3.17). Es wurden dafür die Anzahl der Zellen innerhalb distinkter Grenzen bestimmt, die 1C-Zellen bis zum 1C-Peak, bzw. 2C-Zellen vom 2C-Peak ab, beinhalteten. Somit wurden die S-Phasen-Zellen aus der Berechnung entfernt, die innerhalb der 1C und 2C-Peaks liegen. Es wurde zunächst der Quotient aus Cherry-positiven 1C- und 2C-Zellen gebildet und durch den Quotient aus nicht-transfizierten, Cherry negativen 1C- und 2C-Zellen geteilt, um die Zelldichte und die dadurch mögliche Verschiebung des Zellzyklusprofils mit einzubeziehen. Dieser Quotient der Cherry-positiven Zellen (ohne Rca1-Konstrukt) diente als Referenz in jeder Messreihe. Die Quotienten aus 1C- und 2C-Zellen der Cherry-positiven und Cherry negativen Zellen wurden ebenfalls für alle untersuchten Rca1-Derivate berechnet durch den Wert für die (HA-NLS-)3xCherry-Kontrolle geteilt. Der sich hier ergebende Faktor spiegelt wider, wievielfach mehr 2C-Zellen in Abhängigkeit von der (HA-NLS-)3xCherry Kontrolle bei der Überexpression von Rca1-Konstrukten vorhanden sind.

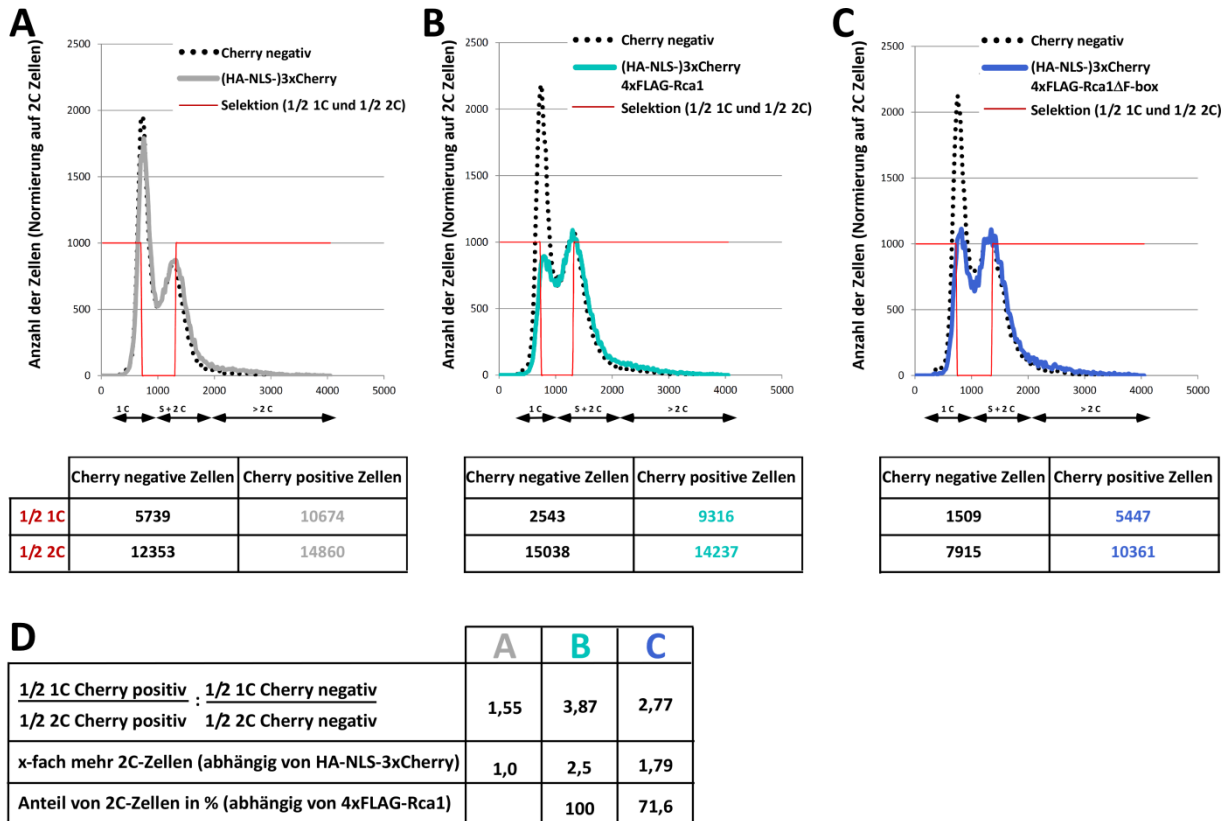


Abbildung 3.16: Auswertung der Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie

Die Einzelkurven aus der Durchflusszytometrie dienen dazu, die Zellzyklusprofile in die jeweiligen Zellzyklusphasen aufgrund der Intensität der DNA-Färbung einzuteilen. Die gestrichelten Histogramme stellen dabei das Zellzyklusprofil der nicht transfizierten, Cherry negativen Zellen dar. Die farbigen Histogramme stellen die transfizierten, Cherry-positiven Zellen dar. Es wurde dabei eine Selektion von halben Peaks verwendet (rot), um S-Phasen-Zellen aus der Berechnung zu entfernen. Die einzelnen Rechenschritte können in der Tabelle unterhalb der Histogramme nachvollzogen werden, die dazu verwendet wurden, die Daten aufzuarbeiten und um einzelne Messreihen miteinander zu vergleichen.

A: Histogramm für Cherry-negative und transfizierte, Cherry-positive Zellen.

B: Histogramm für Cherry-negative und transfizierte, Cherry-positive Zellen, die zusätzlich 4xFLAG-Rca1 überexprimieren.

C: Histogramm für Cherry-negative und transfizierte, Cherry-positive Zellen, die zusätzlich 4xFLAG-Rca1ΔF-box überexprimieren.

D: Rechenweg für die Prozessierung der Daten aus der Durchflusszytometrie, um zu berechnen, wievielfach mehr Zellen sich in der G2-Phase aufhalten, nachdem verschiedene Rca1-Derivate überexprimiert wurden. Diese Daten können auch in Abhängigkeit von 4xFLAG-Rca1 angegeben werden.

Zunächst wurde die Analysen des Einflusses der Überexpression verschiedener N-terminal markierter Epitope von Rca1 auf den G1-S-Übergang untersucht. Hierfür wurden N-terminale HA-, 10xHA-, FLAG- und 4xFLAG-Epitop-Markierungen von Rca1 transient transfiziert und miteinander verglichen. Der Vergleich erfolgte über die Zellzyklusprofile der transfizierten Zellen, die durch die Expression von HA-NLS-3xCherry markiert wurden. Die Werte für die oben beschriebene Berechnung sind für die Rca1-Konstrukte mit unterschiedlicher Epitopmarkierung in Abbildung 3.18 dargestellt.

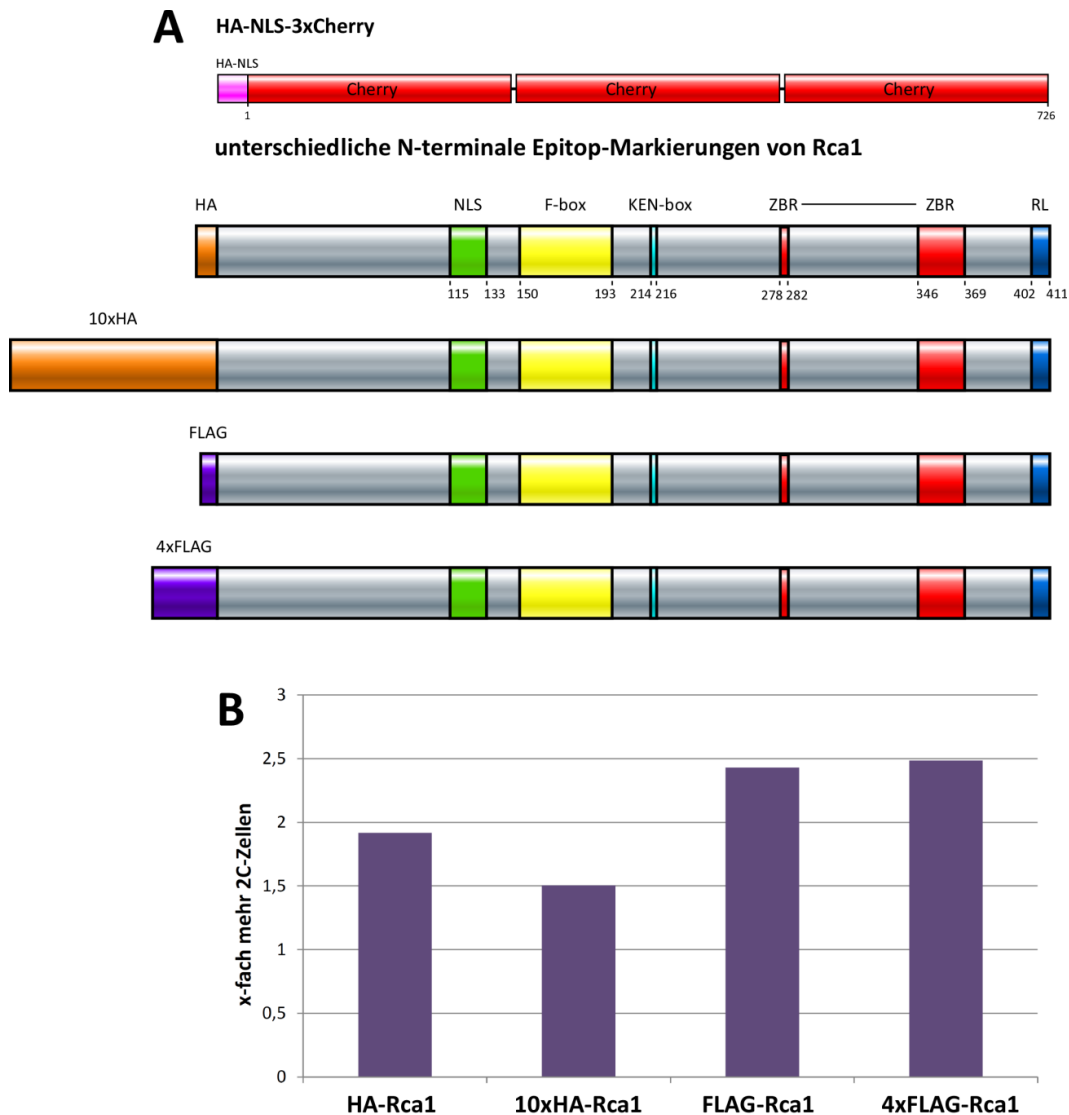


Abbildung 3.17: Unterschiedliche Epitope beeinflussen die Fähigkeit von Rca1 bei Überexpression die S-Phase zu induzieren

A: Schematische Darstellung der verwendeten Rca1-Konstrukte mit unterschiedlicher Epitop-Markierung

B: Die Induktionsfähigkeit der S-Phase bei der Überexpression von unterschiedlichen Rca1-Konstrukten ist als Faktor dargestellt, der beschreibt, wievielfach mehr Zellen sich nach Rca1-Überexpression in der G2-Phase aufhalten.

Es zeigte sich für alle Epitop-Markierungen, dass diese Einfluss auf den G1-S-Übergang ausüben, da alle Rca1-Proteine zu einer erhöhten Anzahl an G2-Zellen führten (Faktor > 1). Dabei zeigte sich, dass die N-terminale Fusion von FLAG oder 4xFLAG an Rca1 die höchste S-Phasen-Induktion verursachte. Es ist daher wichtig, dass in einer Messreihe nur Rca1-Derivate verglichen werden, die die gleiche Epitopmarkierung aufweisen.

Im Gegensatz zu Abbildung 3.18 wurden nun bei der Analyse verschiedener Rca1-Derivate auf den G1-S-Übergang die einzelnen Messreihen in Abhängigkeit von 4xFLAG-Rca1 dargestellt. Diese sind in Prozent angegeben (Abbildung 3.18, D). In Abbildung 3.18, A und B, ist eine Übersicht über die betrachteten Konstrukte angegeben. Abbildung 3.18, A zeigt das cotransfizierte HA-NLS-3xCherry Konstrukt, das verwendet wurde, um transfizierte Zellen zu markieren. Es wurden dabei Konstrukte analysiert, bei denen die F-box deletiert (4xFLAG-Rca1 Δ F-box) ist oder eine Mutation innerhalb der F-box

vorliegt (4xFLAG-Rca1 M182T). Außerdem wurde ein Austausch eines Cysteins im zweiten Teil der Zinkbinderegion (4xFLAG-Rca1 C351S) und eine Austausch am Rande des zweiten Teils der Zinkbinderegion (4xFLAG-Rca1 A344T) analysiert (Abbildung 3.19, B). Der Austausch der Aminosäuren M182T und A344T stammen aus Proteinsequenzen, die sich aus der sequenzierten kodierenden Region der beiden *rca1*-Allele *rca1*^{C1474} und *rca1*² ergeben. Es wurden des Weiteren die Kombination aus der Deletion der F-box und der Mutation C351S (4xFLAG-Rca1ΔF-box C351S) und der Mutationen M182T und A344T (4xFLAG-Rca1M182T A344T) hergestellt.

Die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 führt wie bereits bei der Lebendzellbeobachtung erkennbar, zu einer verkürzten G1-Phase (Abbildung 3.18, C). Im Zellzyklusprofil ist der 1C Peak im Vergleich zur Transfektionskontrolle HA-NLS-3xCherry stark erniedrigt (Abbildung 3.18 C). Diese Verkürzung der G1-Phase wird gleichzeitig damit kompensiert, dass prozentual mehr Zellen in der G2-Phase sind. Der Rückgang der G1-Zellen nach der Überexpression von 4xFLAG-Rca1ΔF-box ist weniger stark ausgeprägt (Abbildung 3.18, C und D). Alle 2C Peaks der Zellzyklusprofile in Abbildung 3.18, C sind normiert und die jeweiligen Messreihen wurden in Abhängigkeit von 4xFLAG-Rca1 dargestellt. Es zeigte sich, dass 4xFLAG-Rca1ΔF-box in seiner Aktivität eingeschränkt ist. Dies kann ebenfalls für 4xFLAG-Rca1 M182T, 4xFLAG-Rca1 C351S und 4xFLAG-Rca1 A344T beobachtet werden. Die Kombination aus deletierter F-box und mutiertem Cystein im zweiten Teil der Zinkbinderegion (4xFLAG-Rca1ΔF-box C351) oder Mutation in F-box M182T und unmittelbar vor dem zweiten Teil der Zinkbinderegion A344T (4xFLAG-Rca1 M182T A344T) führt zu einer fast vollständigen Einschränkung der Aktivität. Die Fähigkeit der Konstrukte, S-Phasen zu induzieren ist kein Effekt, der nur von der F-box oder nur von der Interaktionsfähigkeit mit dem APC/C^{F^{zr}} abhängt. Es scheint vielmehr ein additiver Effekt zu sein.

In Abbildung 3.18, E sind die Proteinnachweise der 4xFLAG-Epitop markierten Proteine dargestellt. Es wurde dabei eine konstante Zellmenge aufgetragen, bei der die Transfektionsrate nicht berücksichtigt wurde. Es ist erkennbar, dass die Banden von 4xFLAG-Rca1 eine größere Proteinmenge aufweisen. Es ist davon auszugehen, dass die Menge an Transkript bzw. die Expressionslevel gleich sind, da konstante DNA-Mengen transfiziert wurden und derselbe induzierbare Metallothionein-Promoter bei allen Konstrukten verwendet wurde. Die Banden im Western Blot sind nur bedingt vergleichbar, weil die Transfektionsrate unterschiedlich ist, die Rca1-Versionen den Zellzyklus unterschiedlich stark beeinflussen und die Stabilität von Rca1 vom Zellzyklustadium abhängt. So wird Rca1 in der G1-Phase abgebaut (Morgenthaler, persönliche Mitteilungen) und kann somit in einem Experiment, in dem der Anteil an G1-Zellen größer ist, nicht so stark akkumulieren. Bei 4xFLAG-Rca1 Überpression kommt es insgesamt zu der größten Verschiebung des Zellzyklusprofils, was eine erhöhte Menge an 2C-Zellen bewirkt. Aus diesem Grund findet man für 4xFLAG-Rca1 die höchsten Intensitäten im Western Blot, da eine Verschiebung des Zellzyklusprofils zu mehr Zellen in der G2-Phase und zu einer Stabilisierung des Proteins führt.

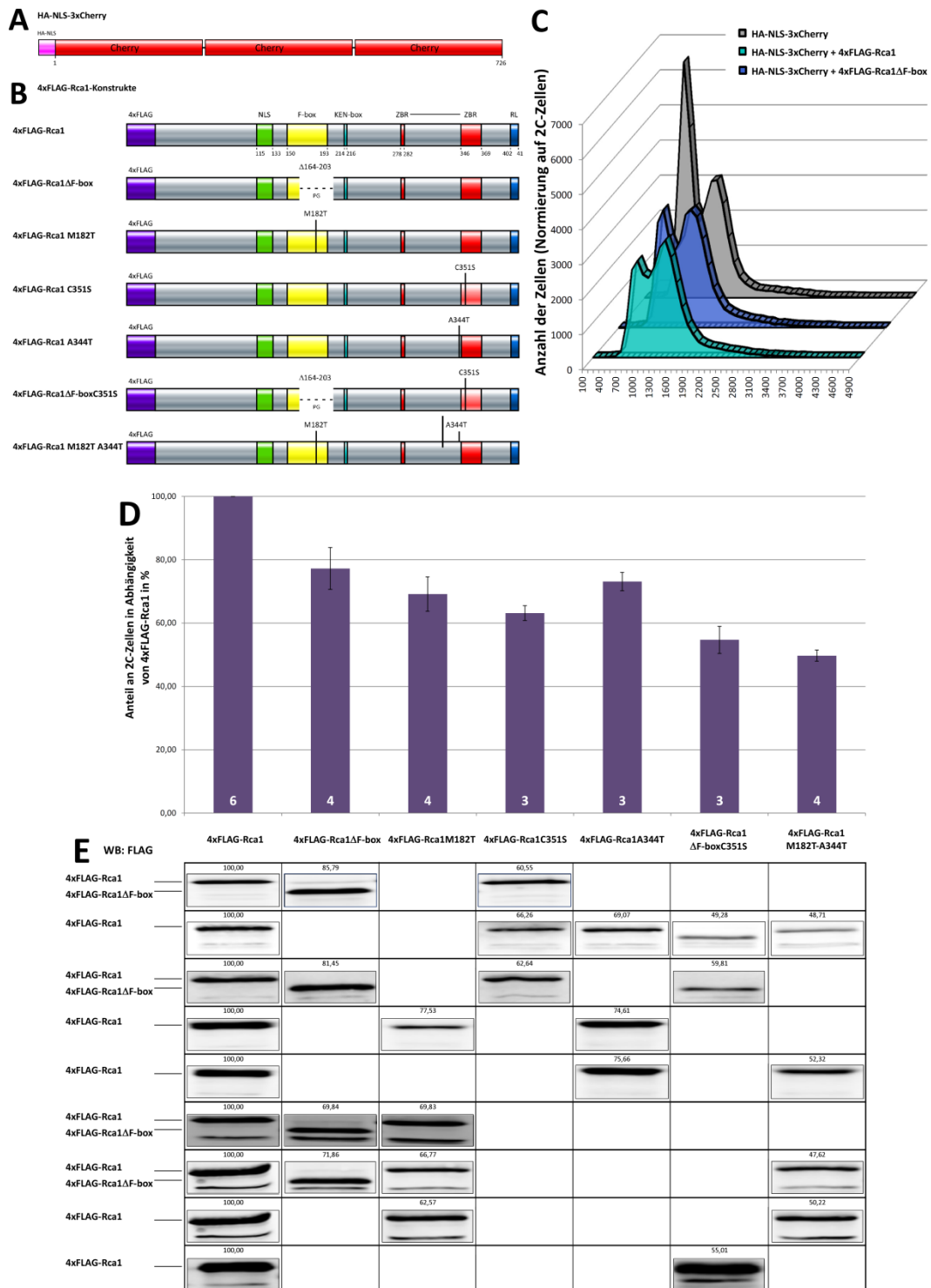


Abbildung 3.18: Der Einfluss der Überexpression verschiedener 4xFLAG-markierter Rca1-Derivaten mit Mutationen und Deletionen auf den G1-S-Übergang

Es wurden u.a. Deletionen und Mutationen in F-box und Zinkbinderegion und die Kombination aus Deletion und Mutationen analysiert. Die Zellen wurden transient transfiziert und im Durchflusszytometer analysiert.

A: Die Überexpression von HA-NLS-3xCherry beeinflusst den Zellzyklus nicht und diente als Marker für transfizierte Zellen.

B: Schematische Darstellung der verwendeten, 4xFLAG-Epitop markierten Rca1-Derivaten.

C: Histogramme von Zellen, die neben der Überexpression von HA-NLS-3xCherry (grau) zusätzliche 4xFLAG-Rca1 (türkis) oder 4xFLAG-Rca1ΔF-box (blau) überexprimieren. Die Histogramme wurden auf 2C-Zellen normiert.

D: Auftragung der S-Phaseninduktionsfähigkeit verschiedener getesteter Rca1 Konstrukte (siehe B). Die Auftragung erfolgte in Abhängigkeit der Messung von 4xFLAG-Rca1 (100 %) aus jeder Messreihe.

E: Übersicht über den immunologischen Proteinnachweis im Western Blot aus den Einzelmessreihen. 4xFLAG-Rca1 ist 51 kDa, 4xFLAG-Rca1ΔF-box 46,6 kDa groß.

Die Zahlen innerhalb der Säulen im Diagramm geben die Anzahl der durchgeführten Messungen in der Durchflusszytometrie wieder.

Die Deletion oder der Austausch von Aminosäuren in konservierten Sequenzen oder Strukturmotiven führt dazu, dass die Überexpression dieser Rca1-Versionen den G1-S-Übergang weniger stark beschleunigen können. Dies ist erkennbar bei der Deletion der F-box oder beim Austausch der Aminosäure M182T innerhalb der F-box, aber auch beim Austausch der Aminosäuren C351S und A344T innerhalb oder der Zinkbinderegion angrenzend.

3.2.3 Analyse von Mutationen innerhalb des F-box-Motivs

Im vorherigen Abschnitt war erkennbar, dass die Deletion der F-box eine größere Aktivität am G1-S-Übergang zeigte, als der Aminosäureaustausch M182T. Um den Einfluss des Austausches von Aminosäuren innerhalb der F-box näher zu analysieren, wurden weitere Aminosäuren innerhalb der F-box ausgetauscht und überprüft. Es wurden über *in vitro* Mutagenese zwei Mutationen in das F-box-Motiv von Rca1 eingebracht. Aus klonierungstechnischen Gründen wurde dafür ein Konstrukt verwendet, in dem schon zwei Punktmutationen enthalten waren, die eine *Xma*I Schnittstelle bildeten. Diese Punktmutationen, Q164P und P165G, wirken sich jedoch nicht auf die Rca1-Aktivität aus (Daten nicht gezeigt).

Es wurden die Aminosäuren Leucin 160 zu Asparaginsäure mutiert und Isoleucin 170 zu Threonin. Die unpolaren Aminosäuren wurden somit zu sauren bzw. polaren Aminosäuren verändert. Die Wahl dieser Aminosäuren wurde aufgrund der Proteinstruktur der F-box-Domäne von humanem Skp2 mit der SCF-Komponente Skp1 getroffen. Die beiden Aminosäuren liegen an der Interaktionsfläche von Skp1 und Skp2. Ein Vergleich der Sequenzen der Emi1 und Emi2 homologen Proteine in *Xenopus*, Maus, Zebrafisch und Mensch ergab, dass diese beiden Reste auch in Rca1 konserviert sind. Abbildung 3.19 zeigt die möglichen äquivalenten Aminosäuren der mutierten Aminosäurereste aus Rca1 in der Raumstruktur der F-box-Domäne von Skp2. Des Weiteren sind die F-box-Mutationen im Sequenzvergleich markiert. Es wurde hierbei auch die F-box-Mutation M182T aus dem *rca1*-Allel *rca1*^{C1474} eingezeichnet.

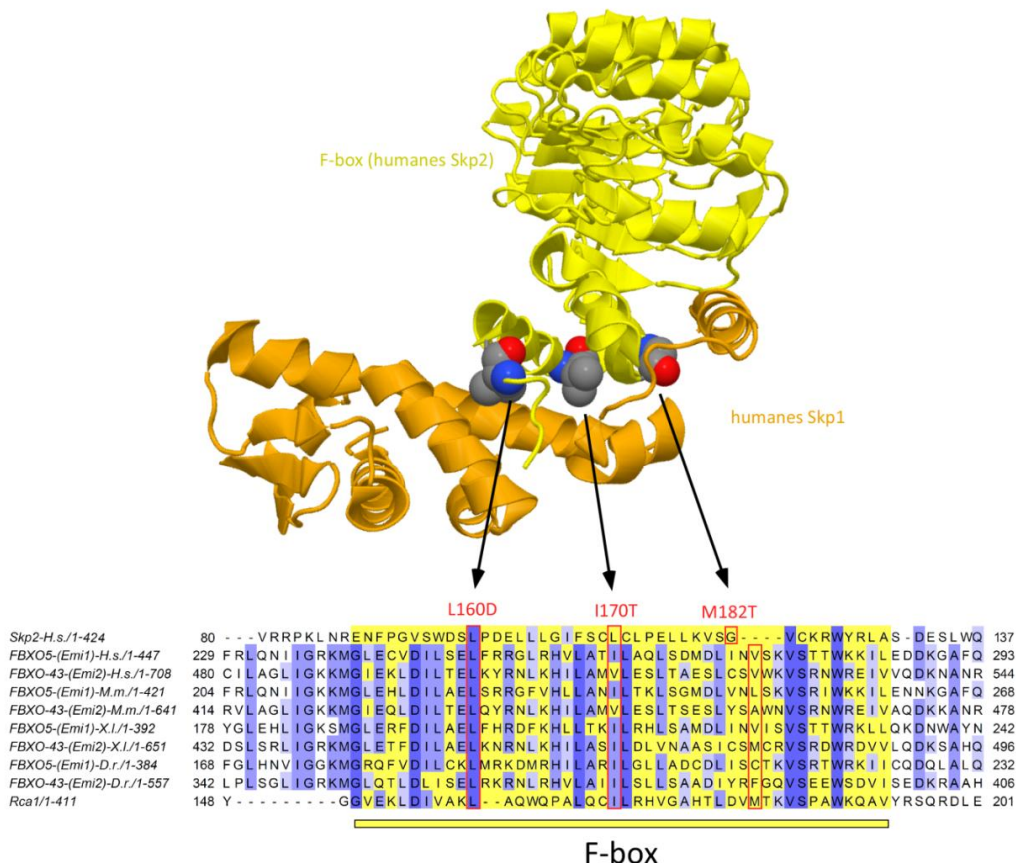


Abbildung 3.19: Auswahl von Aminosäure-Resten, die an der Interaktionsfläche von F-box und Skp1 liegen sollten und mutiert wurden

Innerhalb der F-box befinden sich viele konservierte Aminosäurereste. Aufgrund der Proteinstruktur von Skp1 und der F-box-Domäne aus Skp2 wurden konservierte Aminosäuren mutiert, die auch in der F-box von Rca1 wichtig für Protein-Protein-Interaktionen sein könnten. Dabei wurden die unpolaren Aminosäuren Leucin 160 und Isoleucin 170 ausgewählt und mutiert (PDB:1FQV, Schulman *et al.*, 2000; F-Box Protein Sequenzen: Jin *et al.*, 2004).

Es wurde analysiert, wie gut die F-box-Mutationen den G1-S-Übergang beschleunigen können. In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Übersicht über die transient transfizierten Konstrukte ist in Abbildung 3.21, A und B gezeigt. Wie zuvor wurde HA-NLS-3xCherry cotransfiziert, um transfizierte Zellen zu markieren.

Es zeigte sich wie bereits vorher für 4xFLAG-Rca1ΔF-box beobachtet, dass die F-box-Mutationen den G1-S-Übergang im Gegensatz zu 4xFLAG-Rca1 weniger gut beschleunigen können wie das volle Länge 4xFLAG-Rca1-Konstrukt. Interessanterweise zeigten dabei die Punktmutationen in der F-Box weniger Aktivität als die komplette Deletion der F-Box Region. Alle hier getesteten F-box-Mutationen können nicht mehr mit SkpA interagieren und stellen deshalb vermutlich keinerlei F-box-Funktion mehr zur Verfügung (siehe Abschnitt 3.3). Das jedoch die komplette Deletion der F-box eine höhere Aktivität zeigt, ist überraschend.

Die Punktmutationen in der F-box führen vermutlich zu einer fehlerhaft gefalteten F-box-Domäne und damit zu einem verstärktem Abbau dieser Proteine. Eine komplette Deletion der normalerweise gefalteten F-box könnte dagegen stabiler sein, da die ganze Domäne nicht vorhanden ist.

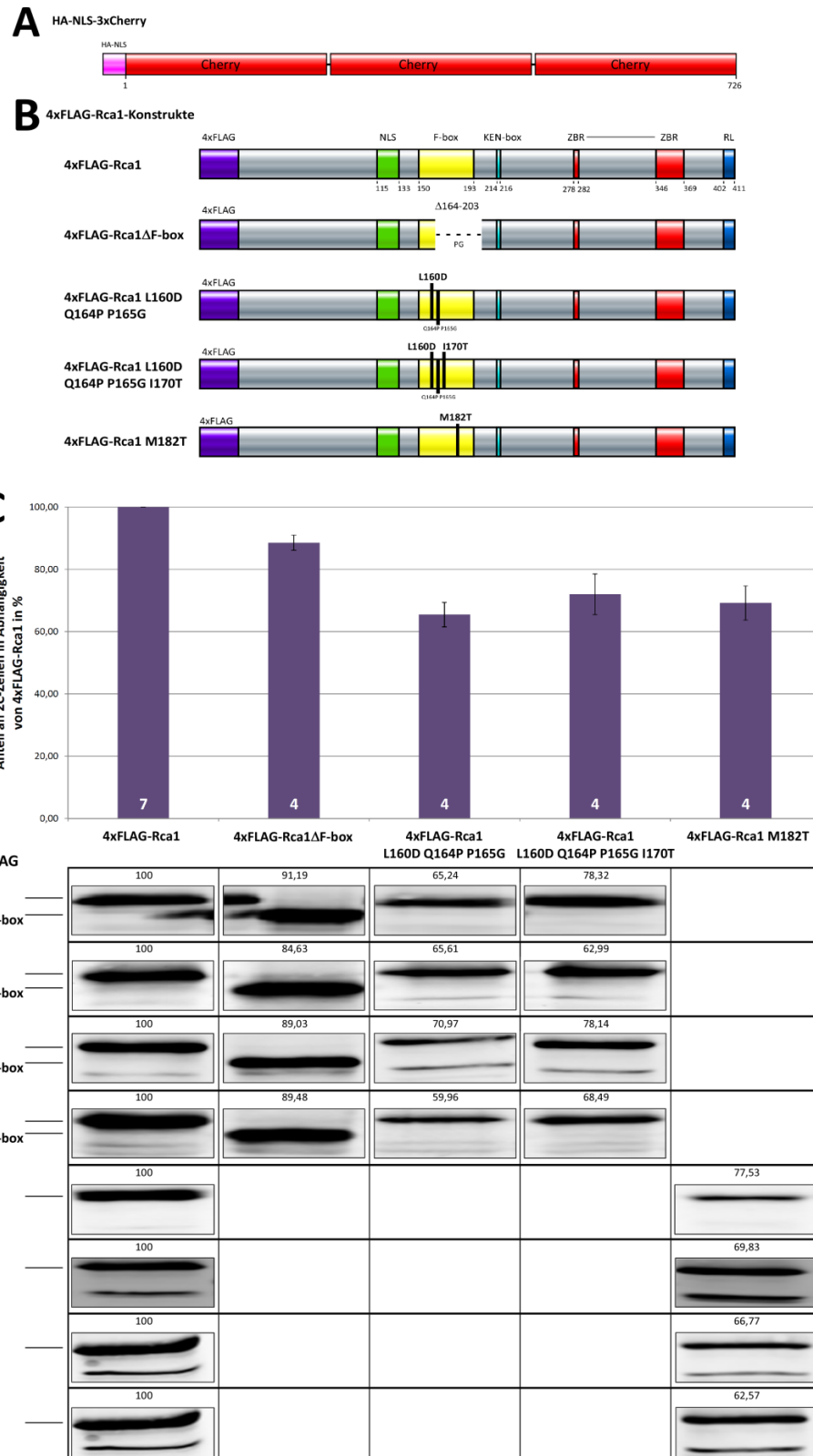


Abbildung 3.20: Die Induktionsfähigkeit von S-Phasen von Konstrukten mit mutierter oder deletierter F-box

A: Die Überexpression von HA-NLS-3xCherry erfolgte, um transfizierte Zellen zu markieren.

B: Schematische Darstellung der verwendeten Rca1-Versionen mit N-terminal fusioniertem 4xFLAG-Epitop.

C: Auftragung der S-Phaseninduktionsfähigkeit verschiedener Rca1-Derivate. Die Auftragung erfolgte in Abhängigkeit der Messung von 4xFLAG-Rca1 (100 %) aus jeder Messreihe.

D: Übersicht über den immunologischen Proteinnachweis im Western Blot aus den Einzelmessreihen. Die Werte über den Western Blot Banden sind die Einzelwerte der Messreihen, die im Diagramm in C dargestellt sind. 4xFLAG-Rca1 ist 52 kDa, 4xFLAG-Rca1ΔF-box 46,6 kDa groß.

Die Zahlen innerhalb der Säulen im Diagramm geben die Anzahl der durchgeführten Messungen in der Durchflusszytometrie wieder.

Die Deletion oder der Austausch von konservierten Aminosäuren innerhalb der F-box wirken sich auf den G1-S-Übergang aus. Dabei wird die Aktivität der Rca1-Derivate mit dem Austausch von Aminosäuren innerhalb der F-box stärker beeinflusst als die Deletion der gesamten F-box-Domäne.

3.3 Interaktion von Rca1 mit SkpA

Um die F-box-Funktion von Rca1 in einem SCF-Komplex (Skp-Cullin-F-box-Protein) weiter zu analysieren, wurde die Interaktion von den F-box-Mutationen mit SkpA überprüft. Das SkpA-Protein ist dabei der direkte Bindungspartner zu den restlichen Komponenten in solch einem Komplex. In *Drosophila* konnte bereits eine Interaktion von Rca1 mit SkpA nachgewiesen werden (Zielke *et al.*, 2006). Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit erstellten Mutationen in der F-Box sowie die Punktmutation des Allels *rca1*^{C1474} die Interaktion mit SkpA beeinträchtigen, sollte die Interaktion von Rca1 mit SkpA durch Yeast 2 Hybrid sowie durch Immunpräzipitation getestet werden.

3.3.1 Interaktionsstudien mittels Yeast 2 Hybrid

Zunächst wurde in einem Yeast-2-Hybrid Interaktionsscreen die Wechselwirkung von verschiedenen Rca1-Versionen mit SkpA getestet. Von den beiden Komponenten des Yeast-2-Hybrid-System (Hefe-Zwei-Hybrid, Y2H), der DNA-Bindedomäne und der Transkriptions-Aktivierungsdomäne wurden N-terminale Fusionen mit Rca1 bzw. SkpA hergestellt. Verschiedene 12xFLAG-Rca1-Proteine wurden dafür N-terminal mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne fusioniert. HA-SkpA dagegen wurde N-terminal mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Beide Domänen wurden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Ein X-Gal-Farbassay und ein Wachstumstest sollten Aufschluss über die Interaktionen verschiedener Rca1-Konstrukte mit SkpA geben.

3.3.1.1 Analyse der Interaktion von SkpA und Rca1 durch X-GalFarbassay

Beim X-Gal Farbassay findet eine Blaufärbung statt, wenn die DNA-Binde- und Transkriptionsaktivierungsdomäne in räumliche Nähe kommen und miteinander interagieren, weil dann die β -Galaktosidase chromogenes Substrat umsetzen kann, was zu einer Blaufärbung führt.

In Abbildung 3.21, A sind eine Positiv- und eine Negativkontrolle für den Farbassay dargestellt. Außerdem sind in Abbildung 3.21, B die positive Interaktion (Blaufärbung) für die Aktivierungsdomäne (AD) am N-Terminus von 12xFLAG-Rca1 und DNA Bindedomäne (BD) am N-Terminus von HA-SkpA zu sehen. Eine negative Interaktion (keine Blaufärbung) zeigte sich für 12xFLAG-Rca1 Δ F-box und HA-SkpA fusioniert an die jeweilige Transkriptionsfaktordomäne. Es konnte somit bestätigt werden, dass die Interaktion von Rca1 und SkpA F-box-abhängig ist (Zielke *et al.*, 2006).

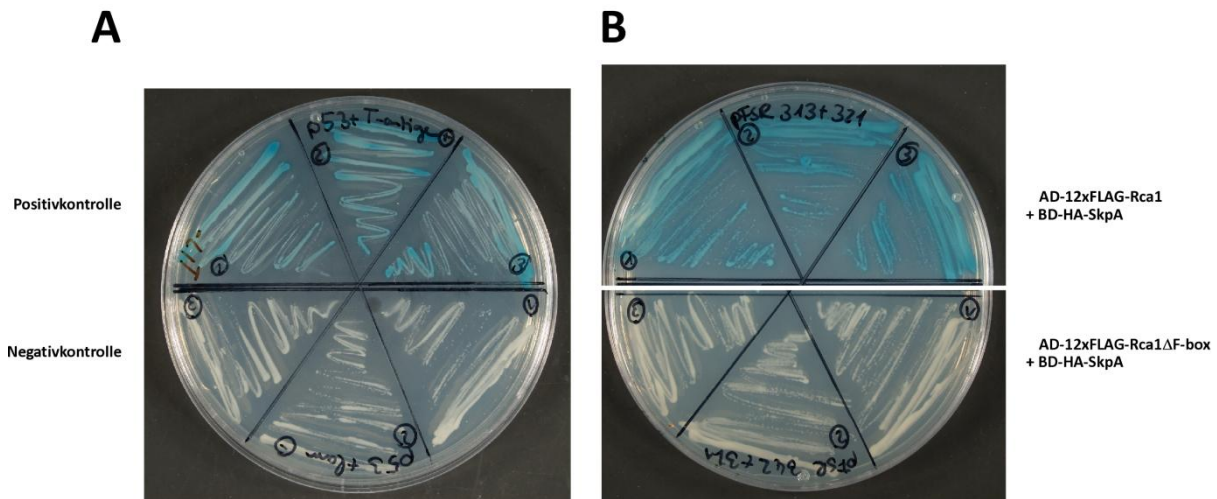


Abbildung 3.21 X-Gal Farbbassay für verschiedene Kontrollen im Yeast-2-Hybrid Experiment

Beim Yeast-2-Hybrid System wurden verschiedene Kontrollen verwendet. Eine Positivkontrolle, die eine Blaufärbung zeigte, eine Negativkontrolle, die keine Blaufärbung zeigte

Die Fusionsproteine AD-12xFLAG-Rca1 und BD-HA-SkpA zeigten eine Interaktion und somit eine Blaufärbung. Bei der Deletion der F-box-Domäne konnte die Interaktion nicht stattfinden.

Es wurden zudem noch weitere Interaktionen von verschiedenen Aminosäureaustauschen in AD-12xFLAG-Rca1 mit BD-HA-SkpA überprüft. Sowohl die Rca1-Proteine mit dem Austausch der KEN-box zu KAA und der Aminosäureaustausch in der Zinkbinderegion, C351S, zeigten eine Interaktion mit BD-HA-SkpA.

Wie bereits erwähnt, verhindert die Deletion der F-box eine Interaktion mit SkpA. Dies war auch bei dem Aminosäureaustausch innerhalb der F-box von L160D(Q164P P165G) und bei AD-12xFLAG-Rca1 L160D (Q164P P165G) I170T zu beobachten. Der Austausch von (Q164P P165G) I170T zeigte jedoch eine Blaufärbung und somit nach wie vor eine Interaktion mit BD-HA-SkpA. Es wurden außerdem unspezifische Interaktionen von BD-HA-SkpA mit der Aktivierungsdomäne ohne 12xFLAG-Rca1 und AD-12x-FLAG-Rca1 mit der DNA-Bindedomäne ohne HA-SkpA überprüft. Hierbei war keine unspezifische Blaufärbung erkennbar. Es findet daher keine unspezifische Interaktion statt, die im Farbbassay nachweisbar wäre. Die Ergebnisse des Farbbassays wurden in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Ergebnisse des X-Gal-Farbbassays

Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD)	DNA-Bindedomäne (BD)	Interaktion / Blaufärbung
AD-12xFLAG-Rca1	BD-HA-SkpA	ja
AD-12xFLAG-Rca1ΔF-box	BD-HA-SkpA	nein
AD-12xFLAG-Rca1 L160D Q164P P165G	BD-HA-SkpA	nein
AD-12xFLAG-Rca1 Q164 P165GP I170T	BD-HA-SkpA	ja
AD-12xFLAG-Rca1 L160D Q164P P165G I170T	BD-HA-SkpA	nein
AD-12xFLAG-Rca1ΔKEN-box (KAA)	BD-HA-SkpA	ja
AD-12xFLAG-Rca1C351S	BD-HA-SkpA	ja

Die AD-12xFLAG-Rca1 Proteine konnten im Vergleich zu BD-HA-SkpA im Western Blot nicht eindeutig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Deswegen könnten die nicht vorhandenen Interaktionen (keine Blaufärbung), auch bedeuten, dass die Proteine nicht oder nur zu einem geringen Maße exprimiert wurden, sodass die Menge für eine Interaktion nicht ausreicht.

3.3.1.2 Analyse der Interaktion von SkpA und Rca1 Konstrukten im Wachstumstest

Es wurde deswegen für die Rca1-Derivate mit Aminosäureaustauschen innerhalb der F-box ein Wachstumstest durchgeführt. In diesem Fall ist ein Wachstum der Hefe nur möglich, wenn eine Interaktion zwischen der Aktivator-domäne und der DNA-Bindedomäne stattfindet (Abbildung 3.22), da dies eine Komplementation der Aminosäure-Auxotrophien zur Folge hat.

Der Wachstumstest konnte die Ergebnisse der Blaufärbung bestätigen.

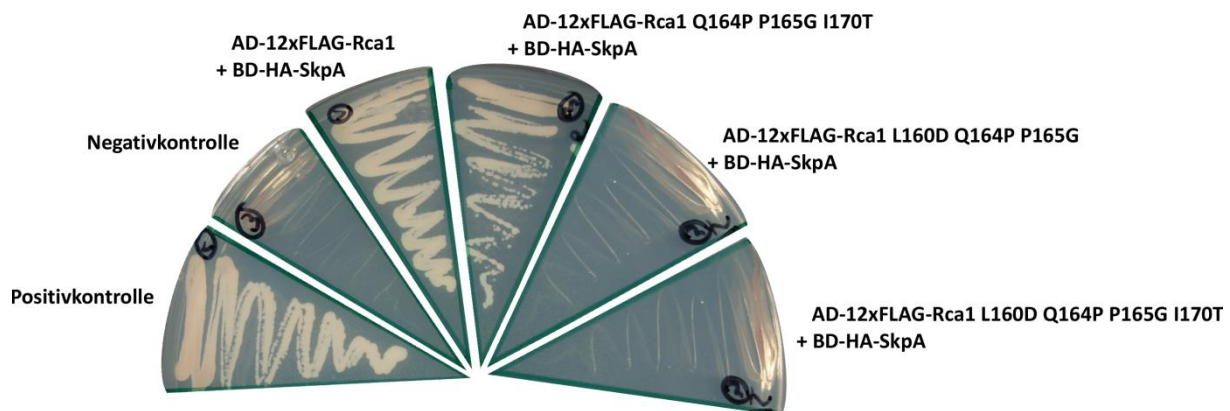


Abbildung 3.22: Überprüfung der Interaktion von HA-SkpA und verschiedenen F-box-Mutationen in 12xFLAG-Rca1 durch einen Wachstumstest

Der Wachstumstest bestätigt die Ergebnisse des Farbassays. Die F-box-Mutante AD-12xFLAG-Rca1 L160D Q164 P165G und 12xFLAG-Rca1 L160D Q164 P165G I170T zeigen keine Interaktion mit BD-HA-SkpA. 12xFLAG-Rca1 Q164 P165G I170T können dagegen miteinander interagieren.

3.3.2 Biochemische Interaktion von SkpA und Rca1

Um die Daten aus dem Yeast-2-Hybrid-Experiment zu bestätigen, wurden im Folgenden biochemische Analysen verwendet. Es wurden HA-Epitop-markiertes SkpA und 4xFLAG-Epitop markierte Rca1 Proteine in S2R⁺-Zellen exprimiert. Durch die Verwendung von monoklonalen FLAG-Antikörpern für die Immunpräzipitation sollte HA-SkpA mit den 4xFLAG-Rca1-Proteinen copräzipitiert werden.

Abbildung 3.23 zeigt die Ergebnisse aus der Co-Immunpräzipitation. HA-SkpA konnte mit dem volle Länge Konstrukt 4xFLAG-Rca1 copräzipitieren, jedoch nicht wenn die F-box deletiert (4xFLAG-Rca1 Δ F-box) oder die Aminosäureaustausche innerhalb der F-box vorhanden waren, wie dies bei

4xFLAG-Rca1 L160D Q164P P165G und 4xFLAG-Rca1 L160D Q164P P165G I170T (Abbildung 3.23), der Fall ist.

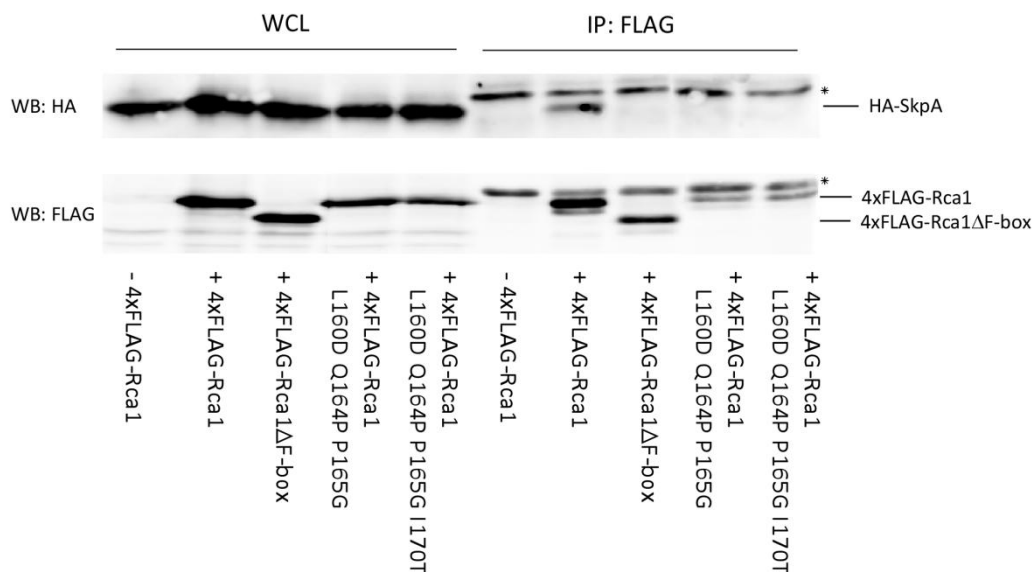


Abbildung 3.23 Mutationen in der F-box wirken sich auf die Interaktion mit SkpA aus

Es wurden HA-SkpA und verschiedene 4xFLAG-Rca1-Konstrukte in S2R⁺-Zellen überexprimiert. Die Zelllysate (*whole cell lysate*, WCL) und die im Anschluss durchgeführte Immunpräzipitation mittels FLAG-Antikörper wurde im Western Blot analysiert. Es wurde dabei eine Färbung gegen das HA- (oben) und das FLAG-(unten) Epitop vorgenommen.

4xFLAG-Rca1ΔF-box und die F-box-Mutationen 4xFLAG-Rca1 L160D Q164P P165G und 4xFLAG-Rca1 L160D Q164P P165G I170T können nicht mehr mit HA-SkpA interagieren. Somit kann HA-SkpA nicht copräzipitieren. Die Proteinmengen dieser beiden Mutationen sind signifikant niedriger im Vergleich zu 4xFLAG-Rca1. Dies kann entweder an einer verringerten Proteinexpression oder einer höheren Degradationsrate innerhalb der Zellen liegen. Es wurden jedoch auch Präzipitationen vorgenommen, in denen eine höhere Proteinmenge dieser beiden Konstrukte eingesetzt wurde (größere Ausgangszellmenge), dies wirkte sich aber nicht auf das Ergebnis der Präzipitation aus (Daten nicht gezeigt).

Sternchen: Immunoglobulin-Kreuzreaktion

Die Proteinmengen von Rca1 mit Aminosäureaustauschen innerhalb der F-box waren im Vergleich zu 4xFLAG-Rca1 deutlich unterrepräsentiert. Dies kann zum einen an der weniger starken Verschiebung des Zellzyklusprofils liegen. Aufgründessen ist eine größere Anzahl an Zellen, die Rca1-Derivate enthalten, in der G1-Phase, in der Rca1 instabil ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Mutationen die Faltung der F-box-Domäne beeinflussen, sodass die Proteine somit weniger stabil sind und verstärkt abgebaut werden. Es wurde deshalb auch eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt, in die eine größere Ausgangsmenge an Zellen, die mit diesen Konstrukten transfiziert wurden, eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Interaktion.

Es konnte in weiteren Co-Immunpräzipitationen gezeigt werden, dass 4xFLAG-Rca1 mit der F-box – Mutation M182T (Abbildung 3.24) genauso wie die Deletion der F-box eine Interaktion mit HA-SkpA verhindert. Dagegen konnten die 4xFLAG-Rca1-Proteine mit Aminosäureaustausch innerhalb der Zinkbinderegion oder ihr angrenzend weiterhin mit HA-SkpA interagieren (Abbildung 3.24).

Die Deletion der F-box verhindert die Interaktion mit der SCF-Komponente SkpA wie auch der Austausch von konservierten Aminosäuren innerhalb der F-box.

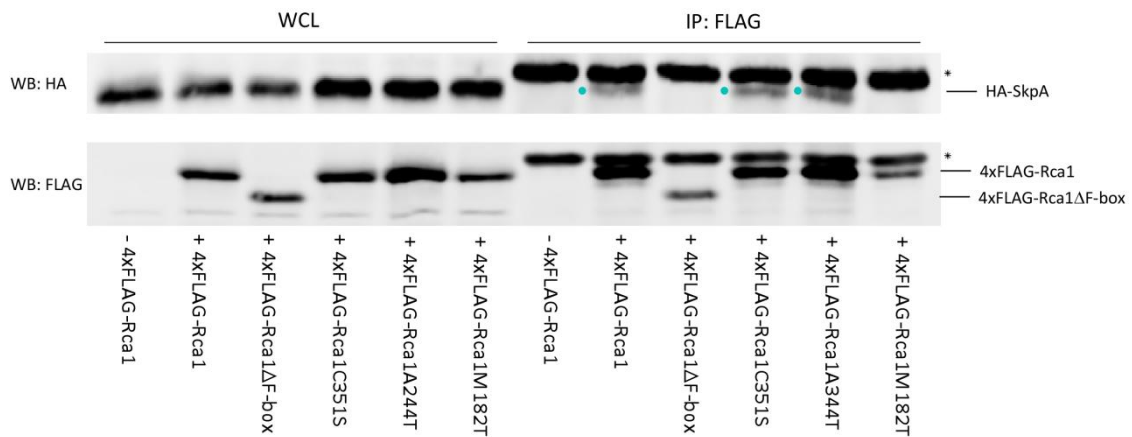


Abbildung 3.24: Eine intakte F-box ist wichtig für die Interaktion mit SkpA

Es wurde HA-SkpA und verschiedene 4xFLAG-Rca1-Konstrukte in S2R⁺-Zellen überexprimiert. Die Zellysate (WCL) und die im Anschluss durchgeführte Immunpräzipitation mittels FLAG-Antikörper wurde im Western Blot analysiert. Es wurde dabei eine Färbung gegen HA-(oben) und FLAG-(unten) Epitop vorgenommen.

4xFLAG-Rca1ΔF-box und 4xFLAG-Rca1M182T können nicht mehr mit HA-SkpA interagieren. Somit kann HA-SkpA nicht copräzipitieren. Die Mutation A344T in der Nähe der Zinkbinderegion und die Mutation C351S innerhalb der Zinkbinderegion beeinflussen die Interaktion mit HA-SkpA nicht.

Sternchen: Immunoglobulin-Kreuzreaktion

Türkiser Punkt: Nachweis von Ha-SkpA in der FLAG-IP.

3.4 Die Rolle der KEN-box am G1-S-Übergang

Die KEN-box ist genauso wie die D-box ein Interaktionsmotiv, das vom APC/C erkannt wird (Glutzer *et al.*, 1991; Pflieger und Kirschner, 2000). Wenn die Aminosäuren des KEN-box-Motivs in Rca1 ausgetauscht werden, KEN zu KAA, ist trotzdem eine Interaktion mit SCF-Komponenten möglich (Daten nicht gezeigt). Es ist davon auszugehen, dass sich die Mutation des KEN-box-Motivs auf die Interaktion von Rca1 und dem APC/C auswirkt (Radermacher, 2007).

Die Überexpression von 4xFLAG-Rca1, bei dem das KEN-box-Motiv mit KAA oder AEN ausgetauscht wurde, führt ebenfalls zu einer Verringerung der S-Phaseninduktion von Rca1. Dabei handelt es sich um einen F-Box-unabhängigen Effekt, der auf die veränderte Interaktion dieses Proteins mit dem APC/C zurückgeht, denn die Deletion der F-box und der Austausch der Aminosäuren in der KEN-box von KEN zu KAA führen zu einer noch größeren Verringerung der S-Phaseninduktion (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Überexpression von 4xFLAG-Rca1 mit zu KAA oder AEN ausgetauschten KEN-box sind in der folgenden Abbildung 3.25 zusammengestellt.

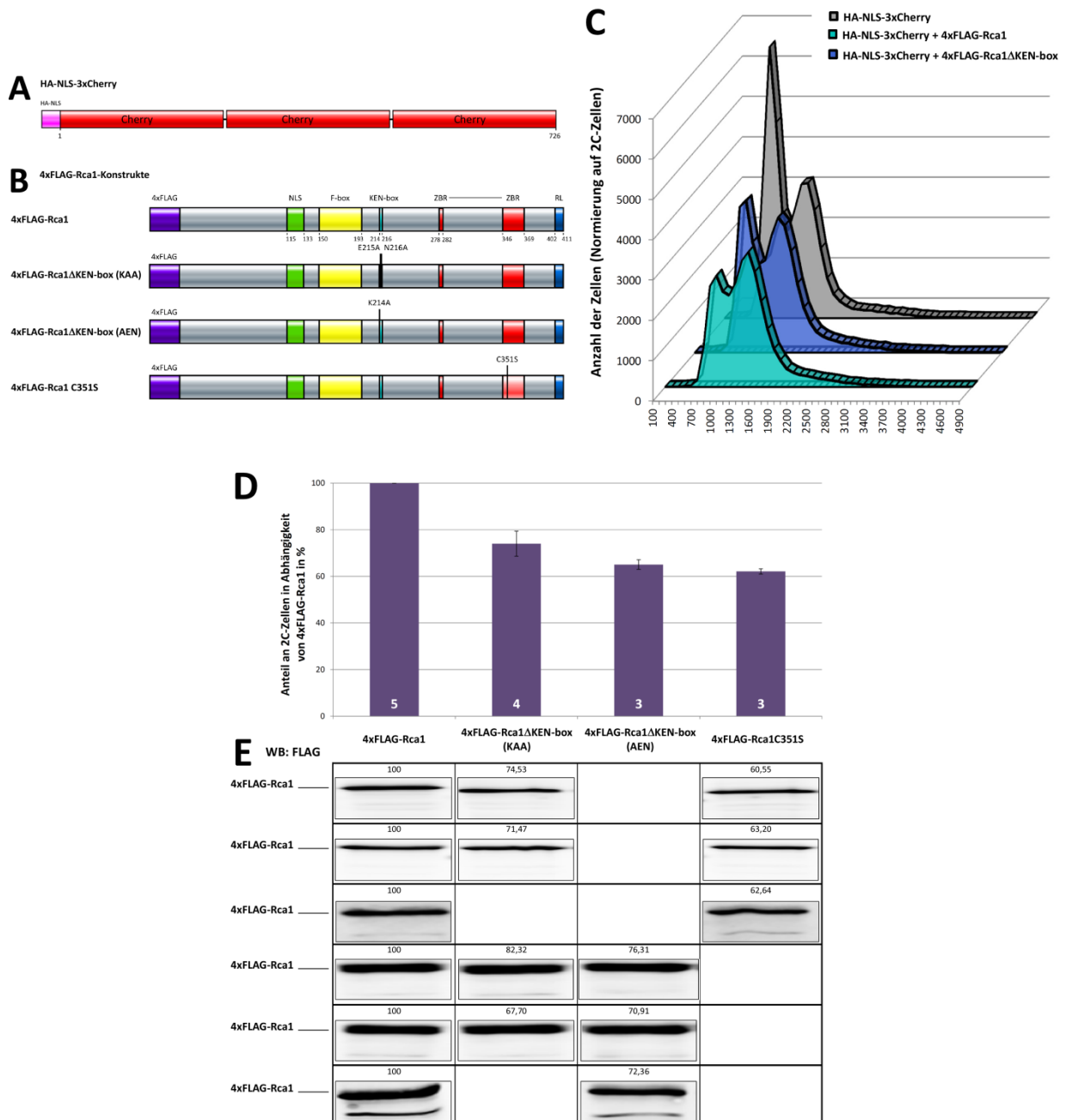


Abbildung 3.25: Der Einfluss der Überexpression verschiedener 4xFLAG-markierter Rca1 Konstrukte mit einem mutierten KEN-box-Motiv auf den G1-S-Übergang

Es wurden Aminosäureaustausche innerhalb des KEN-box-Motivs analysiert. Die Zellen wurden transient transfiziert und im Durchflusszytometer analysiert.

A: Die Überexpression von HA-NLS-3xCherry beeinflusst den Zellzyklus nicht und diente als Marker für transfizierte Zellen.

B: Schematische Darstellung der transfizierten 4xFLAG-Rca1 Konstrukte.

C: Histogramme von HA-NLS-3xCherry transfizierten Zellen (grau), die zusätzlich 4xFLAG-Rca1 (türkis) oder 4xFLAG-Rca1ΔKEN-box (blau) überexprimieren. Die Histogramme wurden auf 2C-Zellen normiert. Bei der Überexpression von 4xFLAG-Rca1 ist eine starke Abnahme von 1C-Zellen zu beobachten. Die Deletion der KEN-box bewirkt eine weniger große Abnahme der 1C-Zellpopulation.

D: Auftragung der S-Phaseninduktionsfähigkeit verschiedener getesteter Rca1 Konstrukte (siehe B). Die Auftragung erfolgte in Abhängigkeit der Messung von 4xFLAG-Rca1 (100 %) aus jeder Messreihe.

E: Übersicht über den immunologischen Proteinnachweis im Western Blot aus den Einzelmessreihen. 4xFLAG-Rca1 ist 51 kDa groß.

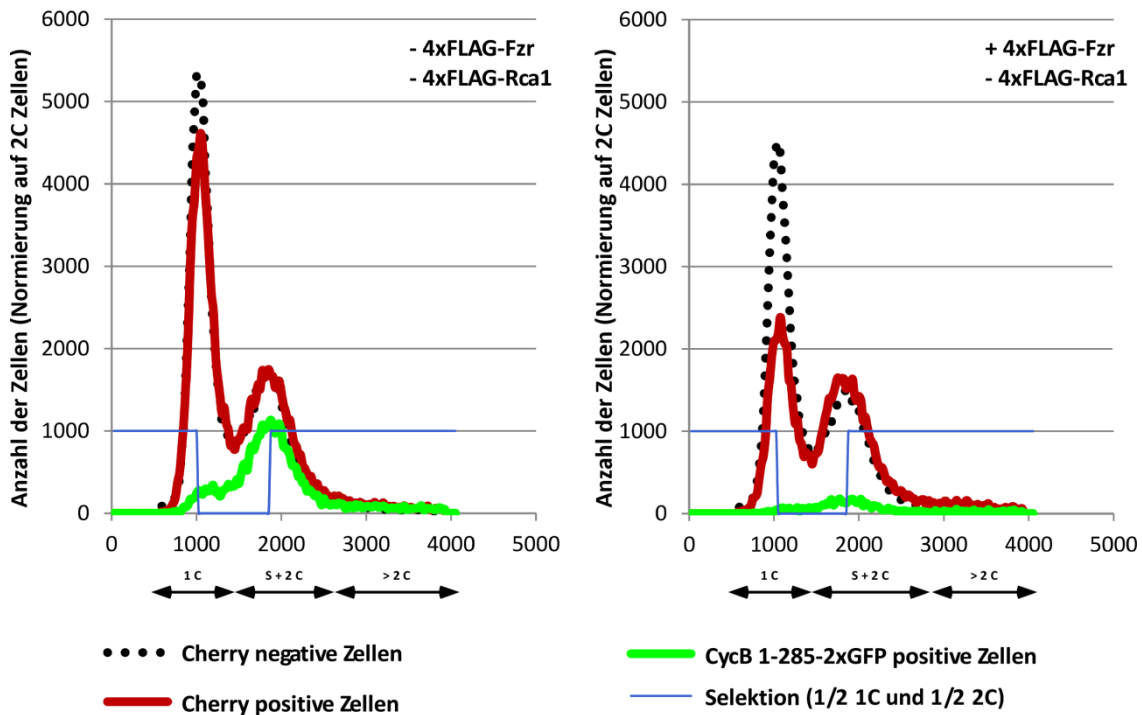
Die Zahlen innerhalb der Säulen im Diagramm geben die Anzahl der durchgeführten Messungen in der Durchflusszytometrie wieder.

Der Austausch von Aminosäuren innerhalb des KEN-box-Motivs führt bei der Überexpression der Rca1-Proteine zu einer weniger starken Induktionsfähigkeit des G1-S-Übergangs. Die F-box ist in diesen Proteinen intakt, deshalb wirkt sich der Austausch der Aminosäuren des KEN-box-Motivs auf die Interaktion mit dem APC/C aus. Am G1-S-Übergang ist der Einfluss von Rca1 sowohl auf APC/C-Inhibition als auch auf die F-box-Funktion zurückzuführen.

3.5 Die APC/C-Inhibitionsfähigkeit von verschiedenen Rca1-Konstrukten

Um den Einfluss der APC/C-Inhibition der verschiedenen Rca1-Derivaten näher zu untersuchen, wurde ein *in vivo* APC/C-Inhibitionsassay etabliert. Dieser Assay beruht darauf, dass APC/C-Aktivität in der G2-Phase des Zellzyklus induziert wird, in der dieser Komplex normalerweise nicht aktiv ist. Dies erfolgt durch die Überexpression von Fzr. Die APC/C-Aktivität wiederum wird durch einen Zellzyklusmarker detektiert. Als Zellzyklusmarker wurde in diesem Assay HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP verwendet. Dieser Zellzyklusmarker enthält im N-Terminus eine D-box, die als Degron des APC/C^{Fzr} fungiert und einen Zellzyklus-spezifischen Abbau ermöglicht. Außerdem sind die Cyclin-Boxen im C-Terminus deletiert, die für eine Interaktion mit Cdk1 benötigt werden. Somit eignet sich das Cyclin B-Konstrukt als indirekter Sensor für APC/C^{Fzr}-Aktivität. Cycline akkumulieren im Zellzyklus in der G2-Phase und werden für den Eintritt in die Mitose gebraucht. Durch die Überexpression von Fzr wird in der G2-Phase APC/C-Aktivität induziert, was anhand einer fehlenden Akkumulation des Cyclin B-Konstrukts detektiert werden kann (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). Neben der Überexpression von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP wurde HA-NLS-3xCherry überexprimiert, um transfizierte Zellen zu markieren (Abbildung 3.26, Abbildung 3.27, Abbildung 3.28, A).

In der G1-Phase, wenn der APC/C^{Fzr} aktiv ist, wird HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP abgebaut. Es ist bereits bekannt, dass die Überexpression von Fzr in der Embryogenese zu APC/C^{Fzr}-Aktivität in der G2-Phase führt (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). Es wurde zunächst getestet, ob dies auch in S2R+-Zellen der Fall ist. Durch die Transfektion und Überexpression von 4xFLAG-Fzr wurde die Akkumulation des APC/C Sensors in der G2-Phase mittels Durchflusszytometrie verfolgt. Durch die Überexpression von 4xFLAG-Fzr konnte erfolgreich der APC/C^{Fzr} in der G2-Phase aktiviert werden. Es kam dadurch zu einer sehr starken Abnahme an HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP-positiven Zellen und es war eine Akkumulation von Zellen in der G2-Phase erkennbar (Abbildung 3.26). In den Zellen, in denen 4xFLAG-Fzr überexprimiert wurde, konnte aufgrund der APC/C^{Fzr}-Aktivität in G2 keine Akkumulation der Cycline stattfinden. Um die APC/C-Inhibitionsfähigkeit verschiedener 4xFLAG-Rca1-Derivate zu berechnen, wurde die Abnahme an HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP positiven Zellen berechnet (Abbildung 3.26). Es wurde für jede Messreihe die Abnahme der Anzahl von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP-positiven Zellen nach Überexpression von 4xFLAG-Fzr berechnet und auf 100 % gesetzt.



	- 4xFLAG-Fzr - 4xFLAG-Rca1	+ 4xFLAG-Fzr - 4xFLAG-Rca1
Anzahl der Zellen (1/2 2C GFP positiv)	6250	1197
Anzahl der Zellen (1/2 2C Cherry positiv)	9431	9180
$\frac{1/2 \text{ 2C GFP positiv}}{1/2 \text{ 2C Cherry positiv}}$	0,66	0,13
$100 - 100 \times \frac{\frac{1/2 \text{ 2C GFP positiv}}{1/2 \text{ 2C Cherry positiv}}}{\frac{1/2 \text{ 2C GFP positiv}}{1/2 \text{ 2C Cherry positiv}}}$	80,32	
Anteil der Abnahme von GFP-positiven 2C Zellen (abhängig von -4xFLAG-Rca1, in %)	100	

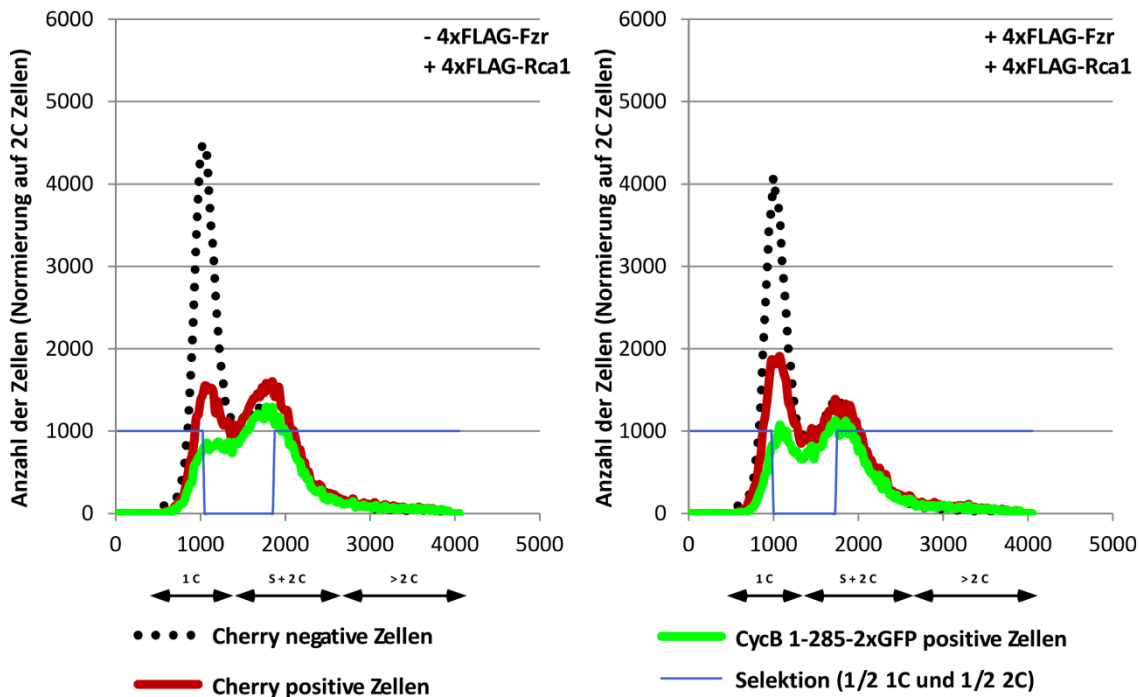
Abbildung 3.26: Berechnung der Abnahme von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP in der G2-Phase vor und nach Überexpression von 4xFLAG-Fzr

Histogramme mit und ohne 4xFLAG-Fzr-Überexpression für HA-NLS-3xCherry und HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP. Es ist eine starke Abnahme an GFP-positiven Zellen zu erkennen, wenn 4xFLAG-Fzr überexprimiert wird.

Es wurde die Abnahme an HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP positiven Zellen berechnet. Die Abnahme von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP nach 4xFLAG-Fzr Überexpression diente in jeder Messreihe als Referenz und wurde auf 100 % gesetzt.

Durch die zusätzliche Überexpression von 4xFLAG-Rca1 konnte die Aktivität des APC/C^{Fzr} in der G2-Phase erneut inhibiert werden. Daraufhin konnte eine Akkumulation von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP in der G2-Phase im Zellzyklus beobachtet werden (Abbildung 3.27). Es wurde außerdem die Verschiebung des Zellzyklusprofils mit einbezogen, die durch die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 und die daraus resultierende Beschleunigung des G1-S-Übergangs zustande kommt. Aus diesem Grund wurde 4xFLAG-Rca1 mit und ohne 4xFLAG-Fzr überexprimiert. Es wurde dann die Abnahme

von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP nach 4xFLAG-Rca1 und 4xFLAG-Fzr Überexpression berechnet (Abbildung 3.27).



	- 4xFLAG-Fzr + 4xFLAG-Rca1	+ 4xFLAG-Fzr + 4xFLAG-Rca1
Anzahl der Zellen (1/2 2C GFP positiv)	9982	12597
Anzahl der Zellen (1/2 2C Cherry positiv)	8779	10746
$\frac{1/2 \text{ 2C GFP positiv}}{1/2 \text{ 2C Cherry positiv}}$	0,79	0,82
$100 - 100 \times \frac{\frac{1/2 \text{ 2C GFP positiv}}{1/2 \text{ 2C Cherry positiv}}}{\frac{1/2 \text{ 2C GFP positiv}}{1/2 \text{ 2C Cherry positiv}}}$	-3,10	
Anteil der Abnahme von GFP-positiven 2C Zellen (abhängig von -4xFLAG-Rca1, in %)	-3,86	

Abbildung 3.27: Berechnung der Abnahme von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP in der G2-Phase nach Überexpression von 4xFLAG-Rca1 und/ oder 4xFLAG-Fzr

Histogramme mit und ohne 4xFLAG-Fzr Überexpression für HA-NLS-3xCherry, HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP und 4xFLAG-Rca1. Es wurde die Abnahme an HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP positiven Zellen nach 4xFLAG-Fzr Überexpression berechnet. Die Überexpression von 4xFLAG-Rca1 kann den überaktiven APC^{Fzr} inhibieren und die Überexpression von 4xFLAG-Fzr kompensieren. HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP kann bei der Überexpression von 4xFLAG-Rca1 und 4xFLAG-Fzr akkumulieren.

Die Berechnung erfolgte auch in Abhängigkeit der Abnahme von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP nach 4xFLAG-Fzr Überexpression aus Abbildung 3.27.

Mithilfe dieses Assay konnte die APC/C^{Fzr} Inhibitionsfähigkeit verschiedener 4xFLAG-Rca1 Derivate getestet werden (Abbildung 3.28). Im Fokus dieses Experiments standen 4xFLAG-Rca1ΔF-box, 4xFLAG-Rca1 M182T, das einen Austausch innerhalb der F-box enthält, 4xFLAG-Rca1 C351S und

4xFLAG-Rca1 A344T, die einen Austausch innerhalb bzw. der Zinkbinderegion angrenzend aufweisen (Abbildung 3.28, D und E). Es zeigte sich, dass nach 4xFLAG-Fzr Überexpression 4xFLAG-Rca1 die Inhibition von APC/C^{Fzr}-Aktivität in der G2-Phase vollständig wiederhergestellt werden konnte. 4xFLAG-Rca1ΔF-box und 4xFLAG-Rca1 M182T konnten den APC/C^{Fzr} nur noch partiell inhibieren (Abbildung 3.28, D). Der Aminosäureaustausch des Cysteins 351 in der Zinkbinderegion führte zu einem vollständigen Verlust der APC/C^{Fzr} Inhibition und bestätigt somit, dass die Zinkbinderegion für die APC/C-Inhibition essentiell ist. Der Aminosäureaustausch an Position 344 von Alanin zu Threonin wirkte sich nicht ganz so stark auf die APC/C-Inhibition aus (Abbildung 3.28, D).

Bei der Western Blot Analyse der Messreihen zeigte sich, dass 4xFLAG-Rca1 Proteine mit geringer APC/C-Inhibitionsfähigkeit, wie 4xFLAG-Rca1 C351S und 4xFLAG-Rca1 A344T, nur sehr schwache Banden lieferte. Das kann daran liegen, dass Rca1 vermutlich auch ein Substrat des APC/C^{Fzr} ist und eine eingeschränkte Aktivität der überexprimierten Rca1-Proteine dazu führt, dass die Proteine ein gutes Substrat für den APC/C^{Fzr} sind und deshalb nur sehr schwache Banden erkennbar sind.

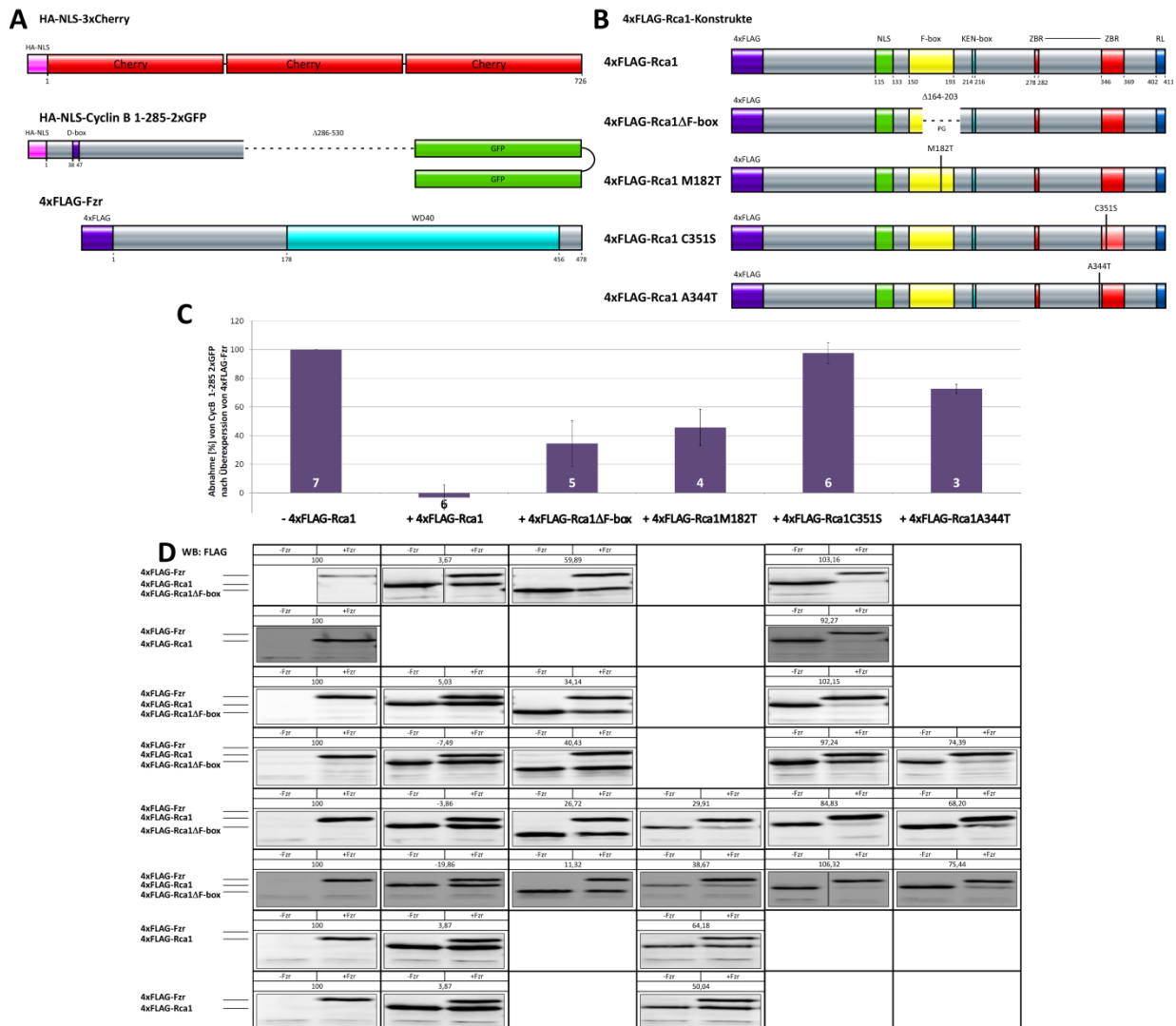


Abbildung 3.28: Assay zur Überprüfung der APC/C inhibitorischen Funktion verschiedener 4xFLAG-Epitop markierter Rca1-Konstrukte

Durch die Überexpression von verschiedenen 4xFLAG-Epitop-markierten Rca1-Derivate und 4xFLAG-Fzr wurde anhand der Abnahme der HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP positiven Zellen überprüft, wie gut diese Proteine in der G2-Phase aktivierten APC/C^{Fzr} inhibieren können.

A: Schematische Darstellung von HA-NLS-3xCherry, das benutzt wurde, um transfizierte Zellen zu identifizieren, von HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP, der Sensor, der für die Messung der APC/C-Aktivität eingesetzt wurde und 4xFLAG-Fzr, das für die Aktivierung des APC/C verwendet wurde.

B: Schematische Darstellung der N-terminal mit 4xFLAG-Epitop-markierten Rca1 Derivate.

C: Abnahme an HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP positiven Zellen nach 4xFLAG-Fzr-Überexpression. Dargestellt ist die Abnahme in Prozent nach Überexpression von 4xFLAG-Fzr und dem entsprechenden Rca1-Protein, wobei als Referenz (100 %) für jeden Wert die Anzahl an HA-NLS-Cyclin B 1-285-2xGFP positiven Zellen nach alleiniger Expression des Rca1-Proteins genommen wurde

D: Die jeweiligen 4xFLAG-Epitop-markierten Proteine wurden über den immunologischen Proteinnachweis im Western Blot nachgewiesen. Der Wert über den Proteinbanden gibt die jeweiligen Einzelwerte an, die im Diagramm D dargestellt sind. 4xFLAG-Fzr ist 57,8 kDa groß, 4xFLAG-Rca1 51 kDa und 4xFLAG-Rca1ΔF-box 46,6 kDa.

Die Zahlen innerhalb der Säulen im Diagramm geben die Anzahl der durchgeführten Messungen in der Durchflusszytometrie wieder.

Diese Daten bestätigen, dass die Zinkbinderegion für die APC/C-Inhibition essentiell ist, denn durch die Mutation C351S, geht die APC/C^{Fzr}-Inhibitionsfähigkeit verloren. Die Mutation A344T des *rca1*²-Allels zeigt dagegen noch eine begrenzte Aktivität, sodass diese Mutation wohl keine Null-Mutation darstellt. Interessanterweise zeigen die F-Box-Mutation und die F-box-Deletion auch eine verringerte APC/C^{Fzr}-Inhibitionsfähigkeit.

3.6 Identifikation von Substraten des SCF^{Rca1}-Komplexes

Aufgrund der Interaktion von Rca1 und Komponenten von SCF-Komplexen war es von Interesse, welche Substrate möglicherweise von einem solchen SCF^{Rca1}-Komplex für den Abbau im 26 S-Proteasom markiert werden könnten.

Die Überexpression von Rca1 bewirkt einen vorzeitigen Eintritt in die S-Phase. Dies legt nahe, dass Rca1 in einem SCF^{Rca1}-Komplex den Abbau eines negativen Regulators des G1-S-Übergangs vermitteln könnte. Es wurden deshalb verschiedene Regulatoren untersucht und überprüft, ob sie ein Substrat von diesem Komplex sein könnten. Neben Dacapo kommt auch die Kinase Wee in Frage, die Cyclin A/Cdk1 und Cyclin B/Cdk1 inhibitorisch phosphoryliert (Sprenger *et al.*, 1997). Außerdem könnte ein Faktor, der die Cyclin E/Cdk2 Transkription negativ reguliert ein Ziel dieses SCF-Komplexes sein. Dies könnte z.B. das Retinoblastoma Protein (Rb) sein, das E2F1 inhibiert und somit Einfluss auf die Transkription von Cyclin E nimmt (Du *et al.*, 1996; Du und Dyson, 1999; Frolov *et al.*, 2001). Archipelago, das ebenfalls in einem SCF-Komplex vorkommt und den Abbau von Cyclin E vermittelt, könnte wiederum auch über einen SCF^{Rca1}-Komplex abgebaut werden (Koepp *et al.*, 2001; Moberg *et al.*, 2001; Schwab und Tyers, 2001). Cyclin A/Cdk1-Aktivität kann ebenfalls den Eintritt in die S-Phase auslösen. Deswegen käme auch der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor von Cyclin A Roughex (Rux) (Sprenger *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1997) oder Fzr, das als Aktivatorprotein des APC/C^{Fzr} Cyclin A abbauen kann, in Frage (Pimentel und Venkatesh, 2005).

Studien in S2R+-Zellen haben gezeigt, dass die Überexpression von Rca1 die Stabilität von Rux, Wee, Fzr, Archipelago oder Rb nicht beeinflusst (Bauer, 2011). Deswegen war die Analyse von Dacapo, als mögliches Substrat eines SCF^{Rca1}-Komplexes, vielversprechend, weshalb der Einfluss von Rca1 auf Dacapo näher untersucht wurde.

3.6.1 Die Überexpression von 10xHA-Rca1 bewirkt eine Abnahme von GFP-Dacapo

Wie bereits in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, wurde der Zusammenhang zwischen Rca1 und Dacapo während der Embryogenese untersucht. Diese Analysen wurden mithilfe der Zellkultur fortgesetzt. Dafür wurde die simultane Überexpression von Dacapo und verschiedenen Rca1-Derivaten in S2R+-Zellen näher betrachtet. Hierfür wurden GFP-Dacapo (Abbildung 3.29, C) und 10xHA-Epitop markierte Rca1-Proteine (Abbildung 3.29, D) überexprimiert und dabei die Stabilität von GFP-Dacapo mittels Durchflusszytometrie verfolgt. Außerdem wurde 3xCherry überexprimiert (Abbildung 3.29, B), um transfizierte Zellen zu markieren.

Die Überexpression von GFP-Dacapo führt zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Abbildung 3.29, A). GFP-Dacapo ist ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor von Cyclin E/Cdk2, der bei

Überexpression verhindert, dass die Zellen in die S-Phase eintreten können. Bei der gleichzeitigen Überexpression von 10xHA-Rca1 nehmen die Proteinmengen von GFP-Dacapo um ca. 50 % ab (Abbildung 3.29, A und E). Bei der Überexpression anderer 10xHA-Rca1 Derivate (Abbildung 3.29, D) findet keine Abnahme von GFP-Dacapo statt. Die Überexpression eines Rca1-Proteins mit Deletion (10xHA-Rca1 Δ F-box) oder ein Aminosäureaustausch (10xHA-Rca1 M182T) in der F-box, hatte keinen Effekt auf die Proteinlevel von GFP-Dacapo. Die Überexpression eines Rca1-Proteins mit einem Aminosäureaustausch innerhalb (10xHA-Rca1 C351S) oder der Zinkbinderegion angrenzend (10xHA-Rca1 A344T) bewirkt eine Abnahme der GFP-Dacapo Menge um 15 - 20 %. Es handelt sich bei dieser Abnahme aber um keine signifikante Abnahme (Abbildung 3.29, E).

In Abbildung 3.29, F sind die immunologischen Nachweise einzelner Messreihen von 10xHA-Epitop-markierten Rca1-Konstrukte im Western Blot dargestellt.

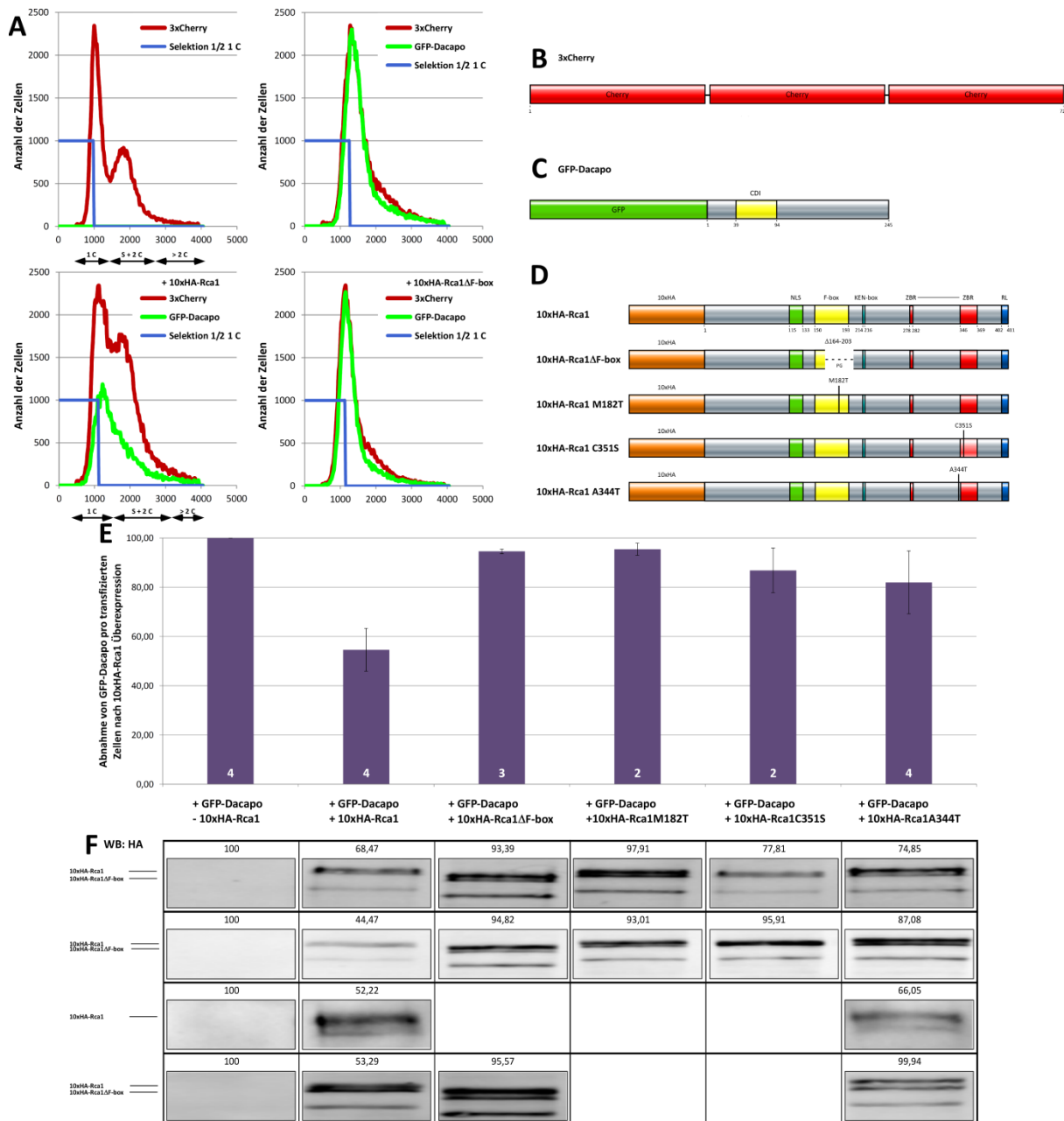


Abbildung 3.29 Die Überexpression von 10xHA-Rca1 führt zu einer Abnahme von GFP-Dacapo

A: Verschiedene Histogramme mit überexprimierten Proteinen. Die Überexpression von 3xCherry allein beeinflusst den Zellzyklus nicht und stellt das allgemeine Zellzyklusprofil dar. Die Überexpression von GFP-Dacapo führt zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Die Überexpression von 10xHA-Rca1 führt zu einer Abnahme von GFP-Dacapo in den transfizierten Zellen. Die Deletion der F-box dagegen verhindert eine Abnahme der GFP-Dacapo Menge. In blau ist die Selektion von 1/2 1C-Zellen gekennzeichnet, die für die Berechnung in E verwendet wurden. Es wurde insgesamt auf 1C Zellen normiert. Die GFP-positiven Zellen wurden mit dem jeweiligen Faktor zur Angleichung multipliziert.

B: Um transfizierte Zellen zu markieren wurde, 3xCherry überexprimiert.

C: Schematische Darstellung von Dacapo, das N-terminal mit einem GFP-Epitop fusioniert und überexprimiert wurde.

D: Schematische Darstellung der 10xHA-Epitop-markierten Rca1-Proteine, die in den Einzelmessungen verwendet wurden.

E: Dargestellt ist die Menge an GFP-Dacapo nach der Überexpression von 10xHA-Rca1 Proteinen. Die Einzelwerte wurden auf die Anzahl von überexprimiertem GFP-Dacapo in der Abwesenheit von 10xHA-Rca1 normiert.

F: Übersicht über den immunologischen Nachweis im Western Blot von 10xHA-Epitop-markierten Rca1-Proteinen der einzelnen Messreihen. Die Werte über den einzelnen Proteinbanden geben die Einzelmesswerte an, die im Diagramm E dargestellt sind. 10xHA-Rca1 ist 59,3 kDa groß, 10xHA-Rca1ΔF-box 54,8 kDa.

Die Zahlen innerhalb der Säulen im Diagramm geben die Anzahl der durchgeführten Messungen in der Durchflusszytometrie wieder.

3.6.2 Die Überexpression von 10xHA-Rca1 kann den Zellzyklusarrest in G1 aufheben

Die gleichzeitige Überexpression von GFP-Dacapo und 10xHA-Rca1 hat auch Auswirkungen auf den durch GFP-Dacapo induzierten G1-Arrest. Bei den transfizierten Zellen, also den Cherry-positiven Zellen, ist eine Abnahme an 1C-Zellen und eine Zunahme von S-Phasen und 2C-Zellen zu beobachten. Die Überexpression von 10xHA-Rca1 führt demnach dazu, dass der Arrest in der G1-Phase überwunden werden kann und die Zellen im Zellzyklus fortschreiten können (Abbildung 3.30, A, E). Diese Aufhebung des Arrestes in der G1-Phase des Zellzyklus kann nur durch 10xHA-Rca1 stattfinden, jedoch nicht durch die Überexpression von anderen 10xHA-Rca1 Derivaten, die Deletionen bzw. den Austausch von Aminosäuren aufweisen, die sich in wichtigen Strukturdomänen befinden (Abbildung 3.30, D, E).

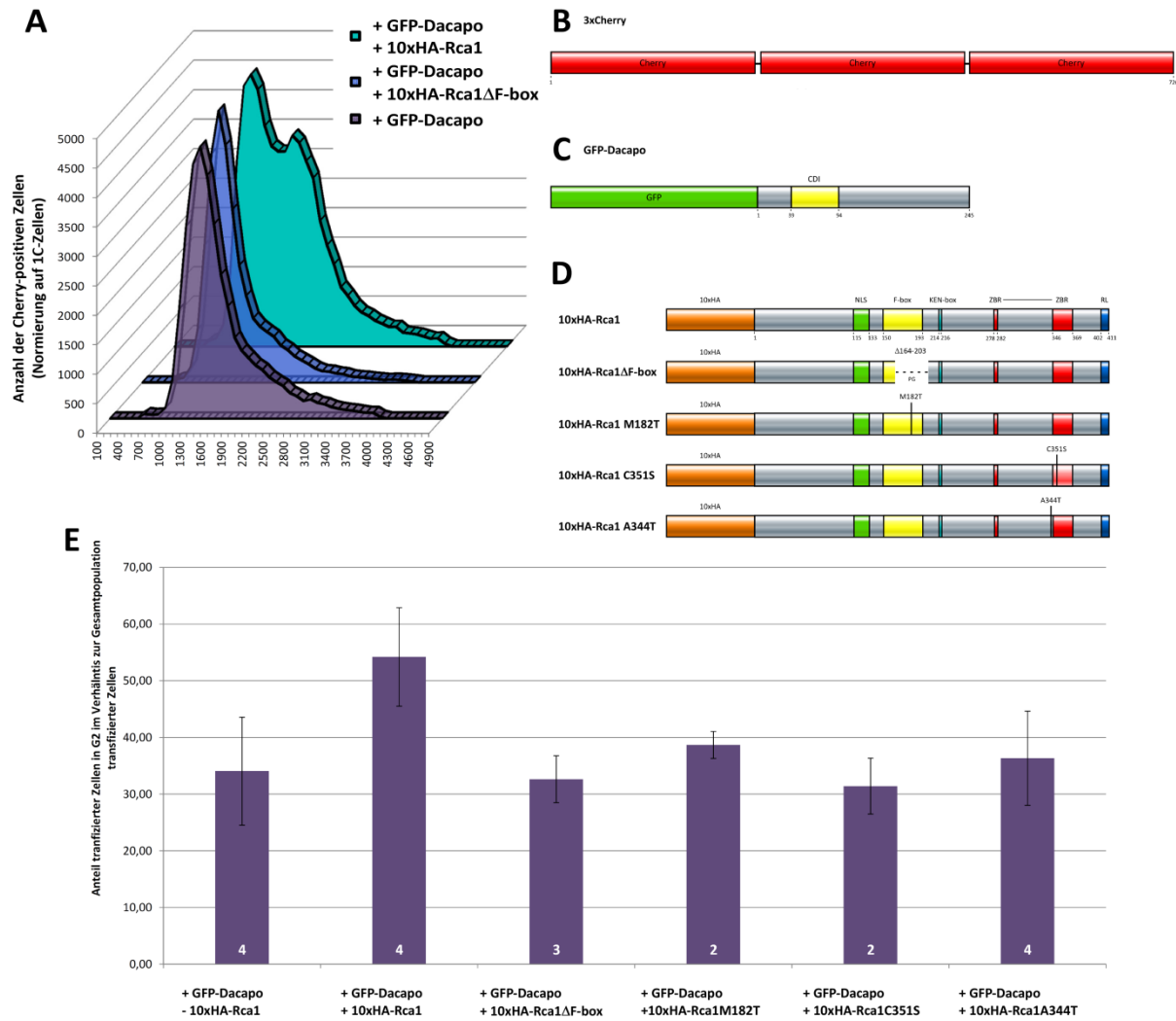


Abbildung 3.30: Durch die Überexpression von 10xHA-Rca1 konnte der G1-Arrest aufgehoben werden

Die Überexpression von 10xHA-Rca1 führt dazu, dass die Zellen in die S-Phase eintreten und den durch GFP-Dacapo induzierten G1-Arrest überwinden können. Deletionen oder der Austausch von Aminosäuren in Rca1 können dies verhindern und bleiben im G1-Arrest.

A: Zellzyklus-Profile von transfizierten Zellen (Cherry-positive Zellen), die GFP-Dacapo und zusätzlich 10xHA-Rca1 oder 10xHA-Rca1ΔF-box enthalten.

B: Transfizierte Zellen wurden durch die Überexpression von 3xCherry markiert.

C: Schematische Darstellung von GFP-Dacapo, das bei Überexpression zu einer Akkumulation von Zellen in der G1-Phase führte.

D: Schematische Darstellung der transfizierten 10xHA-Rca1-Konstrukte.

E: Im Diagramm E sind die Anteile transduzierter 2C-Zellen im Verhältnis zur Gesamtpopulation der transfizierten Cherry-positiven Zellen dargestellt.

Die Zahlen innerhalb der Säulen im Diagramm geben die Anzahl der durchgeführten Messungen in der Durchflusszytometrie wieder.

Diese Daten bestätigen, dass Dacapo bei Rca1-Überexpression destabilisiert wird und deuten darauf hin, dass Dacapo ein Substrat eines SCF^{Rca1}-Komplexes sein könnte. Dieser Effekt ist F-box-abhängig, genauso wie die Aufhebung des durch Dacapo-Überexpression induzierten G1-Arrestes durch Rca1.

3.6.3 In Abwesenheit von Rca1 findet eine Stabilisierung von Dacapo statt

Es konnte gezeigt werden, dass eine Destabilisierung von GFP-Dacapo nach Überexpression von 10xHA-Rca1 vorhanden ist. Im Folgenden wurde die Expression von Rca1 durch RNA-Interferenz (RNAi) abgereichert und gleichzeitig inaktives GFP-Dacapo überexprimiert. Die Proteinmengen des inaktiven GFP-Dacapo wurden mittels Durchflusszytometrie verfolgt. Das inaktive GFP-Dacapo kann aufgrund von Aminosäuredeletionen, 38-44 und 103-105, nicht mehr mit Cyclin E /Cdk2 interagieren (Abbildung 3.31, A; Abbildung 3.33) und somit den Zellzyklus nicht beeinflussen. Das inaktive Dacapo wird nach wie vor Zellzyklus-spezifisch abgebaut (Bauer, 2011). Es wurde wie in vorangegangenen Versuchen HA-NLS-3xCherry cotransfiziert und überexprimiert, um transfizierte Zellen zu markieren. Nach RNA-Interferenz gegen endogenes Rca1 wurden die Proteinmengen von überexprimiertem inaktiven GFP-Dacapo im Durchflusszytometer verfolgt.

Nach RNAi gegen Rca1 fand eine Abnahme von 1C-Zellen statt. Die Menge an 2C Zellen und überreplizierenden Zellen (>2C) nahm zu. In der Abwesenheit von Rca1 kann der APC/C^{Fzf} in der G2-Phase des Zellzyklus nicht mehr ausreichend inhibiert werden und es kann keine Akkumulation von mitotischen Cyclinen erfolgen. Die Zellen können sich nicht mehr teilen, aber trotzdem noch DNA replizieren. Aus diesem Grund steigt die Anzahl an überreplizierenden Zellen an, wie bereits für das Rca1 Ortholog Emi1 beschrieben wurde (Machida und Dutta, 2007) (Abbildung 3.31, A). Das inaktive GFP-Dacapo wird am G1-S-Übergang abgebaut. Aus diesem Grund kann anhand der 2C Zellen eine Aussage über die Stabilität von inaktivem Dacapo getroffen werden.

Nach RNAi gegen Rca1 findet eine starke Stabilisierung von GFP-Dacapo in 2C Zellen statt (Abbildung 3.31, C). Über 80 % der transfizierten 2C Zellen sind GFP-positiv und exprimieren inaktives GFP-Dacapo.

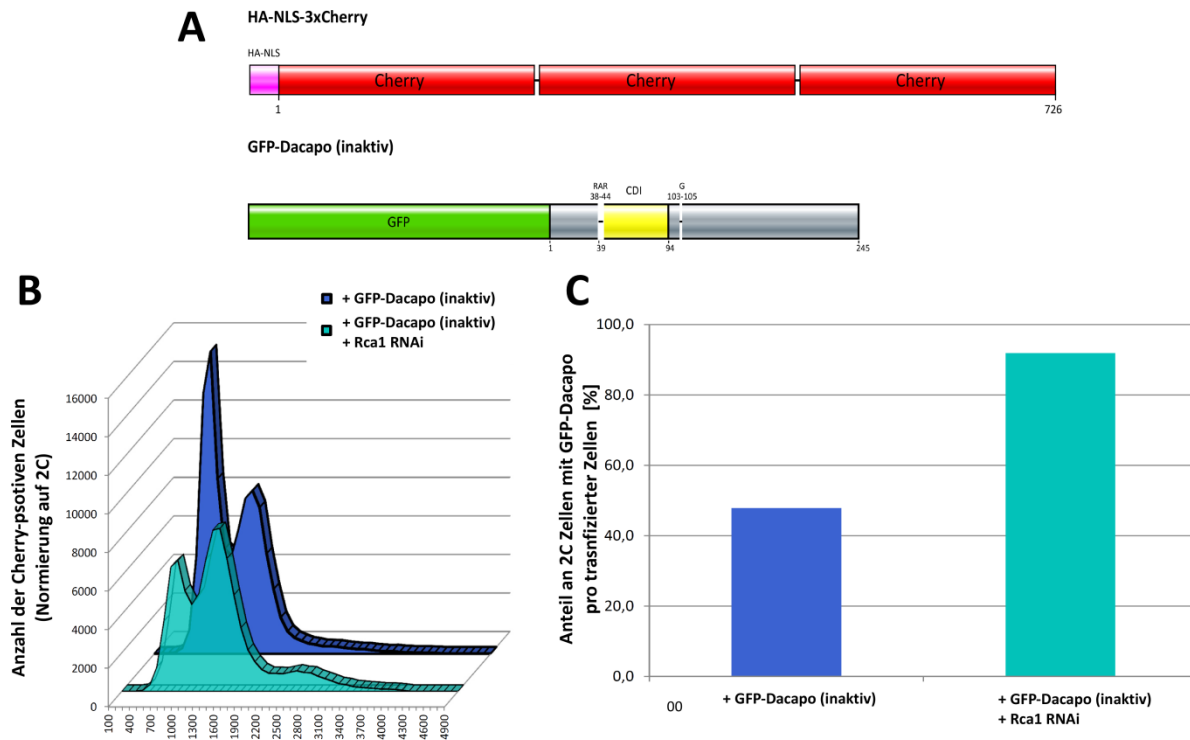


Abbildung 3.31: Die Stabilität von GFP-Dacapo ist abhängig von Rca1

A: Schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte, HA-NLS-3xCherry für die Markierung transfizierter Zellen und das inaktive Dacapo.

B: Das Zellzyklusprofil der transfizierten Zellen verschiebt sich nach RNAi stark gegen Rca1. Die Zellen in 1C verringern sich und die Zahl der 2C-Zellen und der überreplizierenden Zellen (>2C) nimmt zu. Die Histogramme wurden auf 2C-Zellen normiert.

C: Anteil an GFP-positiven 2C-Zellen, die inaktive Dacapo überexprimieren, in Abhängigkeit zu allen transfizierten Zellen, der nach RNAi gegen Rca1 stark ansteigt. Es kommt also zu einer Stabilisierung des inaktiven GFP-Dacapos.

SCF-Substrate werden in den meisten Fällen phosphoryliert, bevor sie vom SCF-Komplex erkannt und für den Abbau markiert werden können (Deshaies *et al.*, 1999; Skaar *et al.*, 2013). Dies könnte auch für Dacapo der Fall sein. Dacapo ist zwar ein Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor, der spezifisch Cyclin E/Cdk2 inhibiert. Jedoch könnte Cyclin E/Cdk2 auch die Kinase sein, die Dacapo vor dem Abbau phosphoryliert.

Aus diesem Grund wurden HA-Cyclin E und inaktives Dacapo in S2R⁺-Zellen überexprimiert. Im nächsten Schritt wurde die Expression von Rca1 durch RNA-Interferenz herunterreguliert und die Stabilität von inaktivem GFP-Dacapo wurde im Durchflusszytometer analysiert. Dabei zeigte sich eine sehr starke Abnahme an inaktivem GFP-Dacapo nach Überexpression von HA-Cyclin E (Abbildung 3.32, C). Dies kann zum einen dadurch zustande kommen, dass HA-Cyclin E Dacapo phosphoryliert und somit einen vorfrühten Abbau von Dacapo induziert und die S-Phase vorzeitig einleitet, weil Dacapo als negativer Regulator des G1-S-Übergangs nicht mehr vorhanden ist. Zum anderen bewirkt die Überexpression von HA-Cyclin E eine sehr starke Verschiebung des Zellzyklusprofils (Abbildung 3.32, A).

Nach zusätzlicher Abreicherung von Rca1 durch RNAi konnte erneut eine Stabilisierung von inaktivem GFP-Dacapo beobachtet werden (Abbildung 3.32, C).

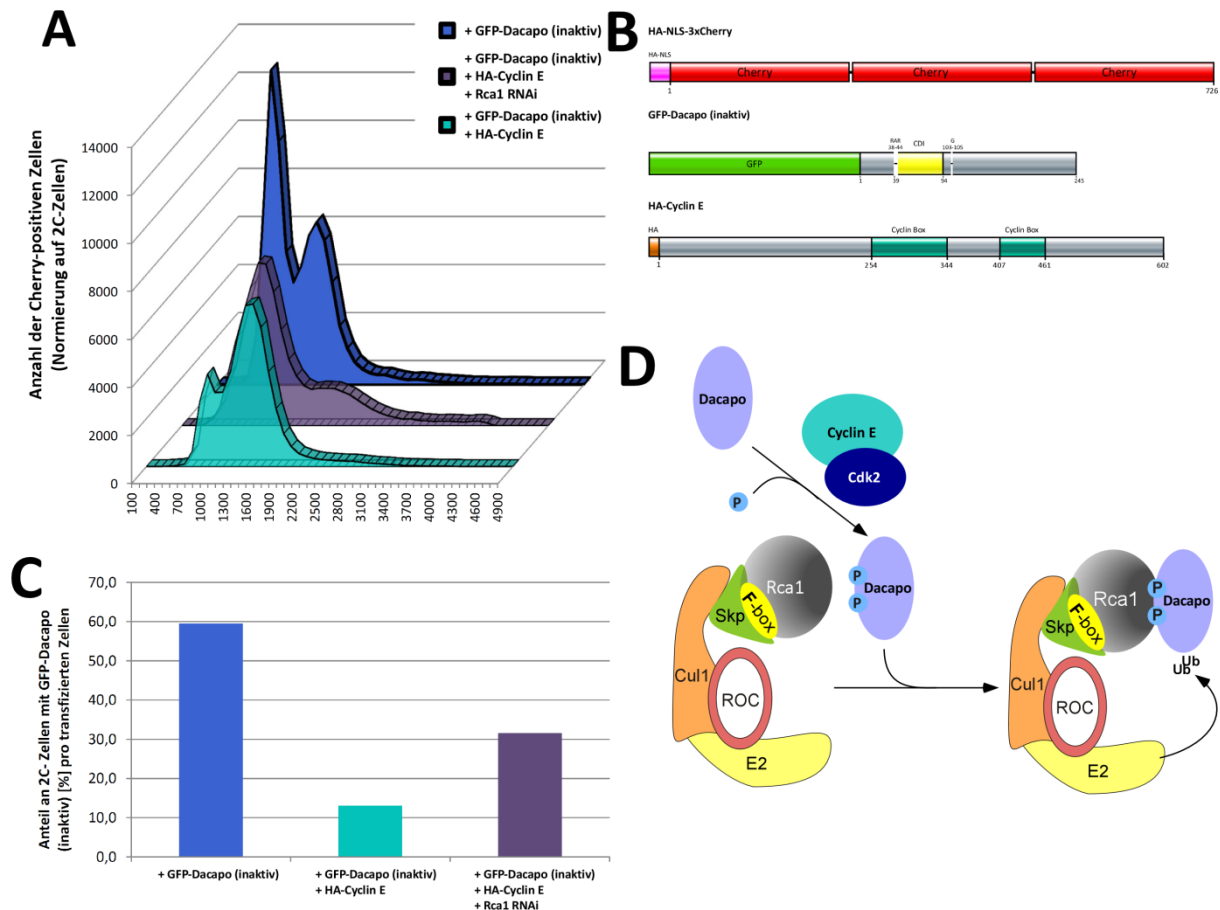


Abbildung 3.32: Die Stabilität von Dacapo ist abhängig von der Phosphorylierung durch Cyclin E24

A: Das Zellzyklusprofil der transfizierten, Cherry-positiven Zellen verschiebt sich stark nach Überexpression von HA-Cyclin E und RNAi gegen Rca1. Die 1C-Zellen verringern sich stark nach der Überexpression von HA-Cyclin E (türkis). Nach RNAi gegen Rca1 nimmt zusätzlich die Zahl der überreplizierenden Zellen (>2C) zu (lila). Die Histogramme wurden auf 2C-Zellen normiert.

B: Schematische Darstellung über die transfizierten Proteine. HA-NLS-3xCherry wurde verwendet, um transfizierte Zellen zu markieren, außerdem sind inaktives GFP-Dacapo und HA-Cyclin E gezeigt.

C: Der Anteil an GFP-positiven 2C-Zellen, die das inaktive Dacapo überexprimieren, sinkt sehr stark nach der Überexpression von HA-Cyclin E. Die Anzahl der Dacapo-positiven Zellen steigt jedoch nach RNAi gegen Rca1 stark an.

D: Modell für den Dacapo-Abbau. Bevor Dacapo durch den SCF^{Rca1} erkannt wird, muss Dacapo von einer Kinase phosphoryliert werden. Diese Kinase könnte Cyclin E/Cdk2 sein.

Diese Daten legen nahe, dass Dacapo ein Substrat des SCF^{Rca1}-Komplex sein könnte, das vor der Erkennung durch den SCF-Komplex durch Cyclin E/Cdk2 phosphoryliert wird (Abbildung 3.32, D).

3.6.4 Identifikation von Cdk-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Dacapo

Sowohl in humanem p27 als auch in humanem p21 konnten Aminosäurereste im C-Terminus identifiziert werden, die durch Cdks phosphoryliert werden und somit eine Erkennung durch einen SCF-Komplex ermöglichen. Bei p27 handelt es sich um die Aminosäure T187 (Montagnoli *et al.*, 1999), bei p21 um T130 (Bisteau *et al.*, 2013) (Abbildung 3.33). Deshalb wurden Aminosäuren im C-Terminus von Dacapo an Position 205 und 214 ausgewählt, weil sie potentielle Cdk-Phosphorylierungsstellen sein könnten, die vor der Erkennung durch den SCF-Komplex phosphoryliert werden könnten. Die Konsensussequenz von Cdks, S/T-P-X-Z (Z: typischerweise eine basische Aminosäure), ist für das Serin

205 gegeben. Bei Serin 214 fehlt jedoch die flankierende basische Aminosäure (Adams *et al.*, 1996). Obwohl keine starke Konservierung von Dacapo und seinen homologen Proteinen im humanen System vorhanden ist, wurde getestet, ob mögliche Cdk-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus identifiziert werden können, die den Abbau von Dacapo beeinflussen können. Aus diesem Grund wurden die im C-Terminus liegenden Aminosäuren Serin 205 und 214 ausgetauscht (Abbildung 3.33). Zum einen erfolgte der Austausch dieser Aminosäuren zu Glutamat, um eine permanente Phosphorylierung zu imitieren. Zum anderen wurde ein Austausch dieser Aminosäuren zu Alanin verwendet, die eine Phosphorylierung verhindert sollte und somit eine Stabilisierung von Dacapo zur Folge haben sollte.

In Abbildung 3.33 ist ein Sequenzvergleich von humanem p27 und p21 mit dem *Drosophila*-Homolog Dacapo dargestellt. Es sind die Cdk-Phosphorylierungsstellen von p21 und p27 eingezeichnet sowie die potentiellen Cdk-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Dacapo. Außerdem sind die Deletionen angegeben, die innerhalb der Cyclin- und Cdk-Bindestelle liegen und zur Inaktivität dieses Proteins führen, aber nach wie vor einen Zellzyklus-abhängigen Abbau gewährleisten.

<i>D.m. Dacapo</i>	1	MV SARV L NP VM I SE F CK M S S S P A V S R N L A C G R Q L N R I K R	39
<i>h.s. p27</i>	1	MS NV RV S NG S P S L E R M D A R Q A E H P K - - - - - P S A C R	30
<i>h.s. p21</i>	1	- - - - - M S E P A G D V R Q N P C G - - - - - S K A C R	19
		Deletion von Cyclin-Bindestelle	
<i>D.m. Dacapo</i>	40	DL FG S S K S A E G T A N K T P F N S E L E R H Q E L A T Q K W G F D F R A	78
<i>H.s. p27</i>	31	NL F G P V D H E E L T R - - - D L E K H C R D M E E A S Q R K W N F D F Q N	66
<i>H.s. p21</i>	20	RL F G P V D S E Q L S R - - - D C D A L M A G C I Q E A R E R W N F D F V T	55
		Deletion von Cdk-Bindestelle	
<i>D.m. Dacapo</i>	79	G C P L A E K S P Y I W E R V S F Q E S S F A P E M Y T L T R A A H V R P S A	117
<i>H.s. p27</i>	67	H K P L E G - - K Y E W Q E V E K G S - - - L P E F Y Y R P P R P P K G A C K	100
<i>H.s. p21</i>	56	E T P L E G - - D F A W E R V - - - R G L G L P K L Y L - P T G P R R G R D E	88
<i>D.m. Dacapo</i>	118	D A S - - - - - P S D M D I L V N E R S E R E N F G S N L V N S S L	146
<i>H.s. p27</i>	101	V P A Q E S Q D V S G S R P A A P L I G A P A N S E D T H L V D P K T D P S D	139
<i>H.s. p21</i>	89	L G G - - - G R R P G T S P A L L Q G T A E E D H V D L S L S C T L V P R S	123
		T130	
<i>D.m. Dacapo</i>	147	E S N T D N E S C Y D S Q D E S L A M R L S S S S T T S T S S I V L R K R Q P	185
<i>H.s. p27</i>	140	S Q T G L A E Q C A G I R K R - - - - - P A T D D S S T Q N K R A N R T E E	172
<i>H.s. p21</i>	124	- - G E Q A E G S P G G - - - - - P G D - - - - - S Q G R K R R Q T S M T	148
		T187 S205 S214	
<i>D.m. Dacapo</i>	186	K I T E F M K E R K R L A Q A P K K L S P A K R M R T S P S S S A T S S S S	224
<i>H.s. p27</i>	173	N V S D G S P N A G S V E Q T P K K P G L R R R Q T - - - - -	198
<i>H.s. p21</i>	149	D F Y H S K R R L I F S K R K P - - - - -	164
<i>D.m. Dacapo</i>	225	S S G G F G L G A H F G A M L K R P R H N	245
<i>H.s. p27</i>		- - - - -	
<i>H.s. p21</i>		- - - - -	

Abbildung 3.33: Sequenzvergleich der Proteinsequenzen von Dacapo (*Drosophila*), p27 (human) und p21 (human)

Die Sequenzen von Dacapo und p21/p27 sind nur wenig konserviert. Die regulierenden Cdk-Phosphorylierungsstellen in p21/p27 befinden sich im C-Terminus. p21 wird an T130 durch Cyclin D/Cdk 4 oder Cdk6 phosphoryliert (Bisteau *et al.*, 2013, p27 dagegen an T187 von Cyclin E/Cdk2 (Montagnoli *et al.*, 1999). Deshalb wurden bei Dacapo die Positionen S205 und S214 ausgewählt, weil diese Aminosäuren Teil einer Cdk-Phosphorylierungsstelle sein könnten und im C-Terminus von Dacapo liegen.

In türkis sind die Bereiche innerhalb der Cyclin- und Cdk-Bindestellen eingezeichnet, deren Deletion eine Interaktion von Dacapo mit Cyclin E/Cdk2 verhindern.

Die Mutationen der Aminosäuren 205 und 214 in GFP-Dacapo wurden im Hintergrund des inaktiven Dacapo getestet, um die Auswirkungen der Mutationen im Bezug auf Stabilisierung oder Destabilisierung unabhängig der Beeinflussung des Zellzyklus zu analysieren.

Die GFP-Dacapo-Konstrukte wurden zusammen mit HA-NLS-3xCherry transfiziert und die GFP-Dacapo Mengen mit und ohne Überexpression von 4xFLAG-Rca1 verglichen (Abbildung 3.34, A). Die Abnahme an inaktiven GFP-Dacapo positiven Zellen nach 4xFLAG-Rca1-Überexpression ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Anhand der Histogramme in Abbildung 3.34, B ist das Verhältnis zwischen GFP- und Cherry-positiven Zellen zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigten jedoch die Konstrukte des inaktiven GFP-Dacapo mit dem Austausch der Aminosäuren S204E und S214E keine erhöhte Abnahme der GFP-positiven Zellen nach 4xFLAG-Rca1-Überexpression (Abbildung 3.34, C). Die Imitation einer Phosphorylierung durch den Aminosäureaustausch zu Glutamat zeigte keine signifikant höhere Instabilität des

Proteins. Auch der Austausch zu Alanin von S204 und S214 im inaktiven GFP-Dacapo konnte wiederum keine Stabilisierung des Proteins erwirken (Abbildung 3.34, C). Der Aminosäureaustausch zu Alanin sollte, wenn diese putativen Cdk-Phosphorylierungsstellen vor dem Abbau von Dacapo phosphoryliert werden, zu einer erhöhten Stabilität des Proteins führen.

Diese Daten zeigen, dass die Aminosäuren Serin 205 und Serin 214 für den Abbau von Dacapo nicht entscheidend sind.

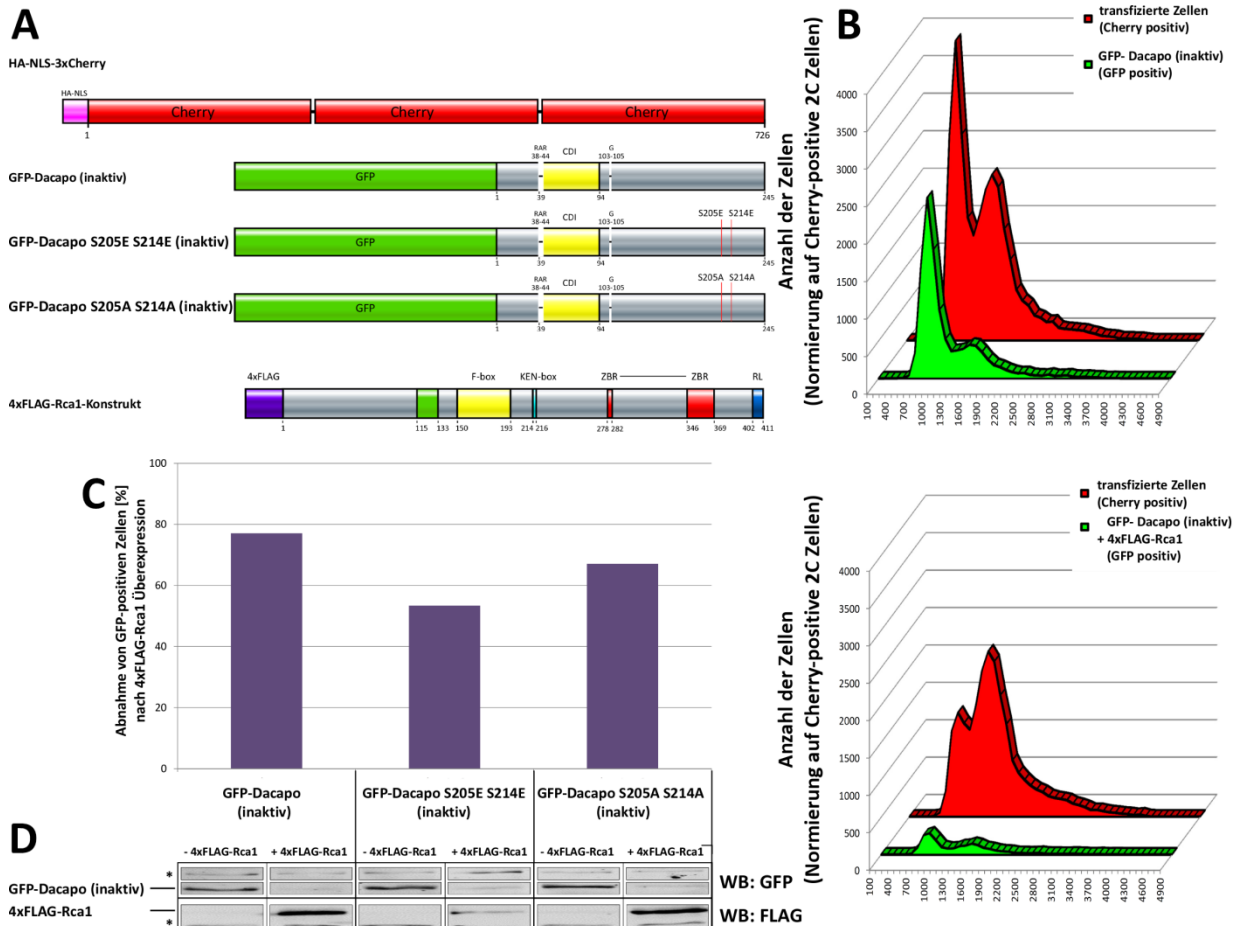


Abbildung 3.34 Punktmutationen von potentiellen Cdk-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Dacapo

Es wurden im C-Terminus Punktmutationen eingefügt, um potentielle Cdk-Phosphorylierungsstellen (S/T-P) zu identifizieren. Dabei wurden S205 und S214 ausgewählt (Abbildung 3.33). Die Serine wurden zu Glutamin oder Alanin ausgetauscht. Für das inaktive GFP-Dacapo S205E S214E wurde ein schnellerer Abbau erwartet, wenn S205 und S214 Phosphorylierungsstellen sind, denn die Mutation beider Positionen zu Alanin sollte eine erhöhte Stabilität vermitteln.

A: Übersicht über die verwendeten Konstrukte: Transfizierte Zellen wurden durch HA-NLS-3xCherry markiert. Die Mutationen der potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden im Hintergrund des inaktiven Dacapos getestet, um die Beeinflussung des Zellzyklus von Dacapo auf den Zellzyklus auszuschließen. Es wurde zusätzlich 4xFLAG-Rca1 überexprimiert, um einen Unterschied in der Stabilität der Konstrukte zu überprüfen.

B: Die Einzelhistogramme repräsentieren die Überexpression des inaktiven GFP-Dacapo, mit oder ohne 4xFLAG-Rca1-Überexpression.

C: Es waren nur minimale Unterschiede in der Stabilität von inaktivem GFP-Dacapo nach 4xFLAG-Rca1-Überexpression erkennbar. Diese Daten sprechen dafür, dass es sich um keine für die Stabilität von Dacapo relevanten Cdk-Phosphorylierungsstellen handelt.

D: Immunologischer Nachweis von inaktivem GFP-Dacapo und 4xFLAG-Rca1 durch die jeweiligen N-terminalen Epitope der einzelnen Messungen im Durchflusszytometer. Das inaktive GFP-Dacapo ist 53,3 kDa groß, 4xFLAG-Rca1 51 kDa.

3.7 Nickel NTA Präzipitation für *in vivo* Ubiquitylierungsassay

Sowohl durch Daten aus der Embryogenese als auch durch die Analyse von S2R⁺-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein regulatorischer Zusammenhang zwischen Dacapo und Rca1 besteht. Diese *in vivo* Daten sollten durch biochemische Experimente zusätzlich untermauert werden. Dazu wurde zunächst versucht einen *in vitro* Ubiquitylierungsassay für Dacapo zu etablieren. Hierfür sollte der SCF^{Rca1}-Komplex durch Co-Immünpräzipitation von 4xFLAG-Rca1 präzipitiert werden. Durch Zugabe von 4xHA-Dacapo, das durch *in vitro* Translation in Retikulozytenlysate aus Kaninchen hergestellt wurde, sollte die Ubiquitylierung gezeigt werden. Dacapo (hier inaktives Dacapo) könnte vor dem Abbau phosphoryliert werden, bevor es durch einen SCF^{Rca1}-Komplex erkannt und für den Abbau markiert werden kann. Hierfür wurde HA-Cyclin E und HA-Cdk2 ebenfalls *in vitro* translatiert. Es gelang jedoch nicht, mit diesen Komponenten eine *in vitro* Ubiquitylierung zu erhalten. Dies kann möglicherweise daran liegen, dass Cyclin E/Cdk2 zunächst selbst durch *cyclin activation kinases* (CAK) phosphoryliert werden muss, um aktiv zu sein (Rank *et al.*, 2000). Es wurde versucht diese Phosphorylierung durch die Zugabe von Embryonenlysate (1-2h), dass eine hohe Aktivität am CAKs aufweist, zu induzieren, jedoch konnte auch dann keine *in vitro* Ubiquitylierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Alternative zu der *in vitro* Ubiquitylierung sollte ein *in vivo* Ubiquitylierungsassay sein, in dem die Ubiquitylierung von Dacapo durch die gleichzeitige Überexpression von Rca1 verstärkt wird. Dafür wurde ein leicht abgeändertes Protokoll für eine Nickel-NTA-Präzipitation verwendet, das bei Campanero und Flemington, 1997 beschrieben wurde. Mithilfe dieses Protokolls konnte in der Vergangenheit bereits ein *in vivo* Ubiquitylierungsassay etabliert werden, bei dem das Zentriolenprotein HsSAS-6 als Substrat des SCF^{FBXW5}-Komplexes mit dem F-box Protein FBXW5 copräzipitierte (Puklowski *et al.*, 2011).

Verschiedene Proteine, die während des Zellzyklus ubiquityliert werden, wurden mit einem 6xHis-4xFLAG-Epitop versehen und überexprimiert. Außerdem erfolgte eine Überexpression von 4xFLAG-Ubiquitin, um endogene Ubiquitin-Mengen zu erhöhen. Das 6xHis-Epitop wurde für die Nickel-NTA-Präzipitation verwendet, der Nachweis im Western Blot erfolgte über das 4xFLAG-Epitop. Der His-Antikörper war nicht spezifisch genug, um aus den Zelllysaten verlässlich die Proteinfusionen nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Es wurde außerdem das 26S Proteasom durch MG132 inhibiert, um den Abbau der mit Polyubiquitin konjugierten Proteine zu verhindern (Lee und Goldberg, 1998).

Abbildung 3.35, A zeigt eine Übersicht über die verwendeten Proteine. Es wurde zum einen aktives und inaktives 6xHis-4xFLAG-Epitop-markiertes Dacapo verwendet. Als Kontrolle für Proteine, die während des Zellzyklus ubiquityliert und abgebaut werden, diente 6xHis-4xFLAG-Geminin 1-101, das ein Substrat des APC/C^{Fzf} ist und am Ende der Mitose und während der G1-Phase im Zellzyklus abgebaut wird (McGarry und Kirschner, 1998). Rca1 wird ebenfalls während der G1-Phase abgebaut

(Morgenthaler, persönliche Kommunikation), vermutlich ebenfalls durch den APC/C^{Fzr} und wurde deswegen in einer inaktiven Form, als 6xHis-4xFLAG-Rca1 M182T A344T exprimiert, um den Zellzyklus nicht zu beeinflussen.

Die ubiquitinylierten Substrate sollten über die 6xHis-Epitope an Nickel-NTA-Beads gebunden werden und im Anschluss im Western Blot über die 4xFLAG-Epitope immunologisch nachgewiesen werden (Abbildung 3.35, B). Im Gesamtzelllysate vor der Präzipitation (*whole cell lysate*, WCL), (Abbildung 3.35, B links) konnten in jedem Lysat polyubiquitinylierte Proteine detektiert werden, die mit 4xFLAG-Ubiquitin konjugiert wurden. Nach der Präzipitation der 6xHis-4xFLAG-Epitop-markierten Proteine konnte nur für 6xHis-4xFLAG-Dacapo eine Anreicherung an ubiquitinylierten Proteinkonjugaten detektiert werden. Obwohl alle getesteten Substrate während des Zellzyklus für den Abbau markiert werden sollten, zeigt sich nur bei 6xHis-4xFLAG-Dacapo eine Anreicherung im höher molekularen Bereich (Abbildung 3.35, B rechts).

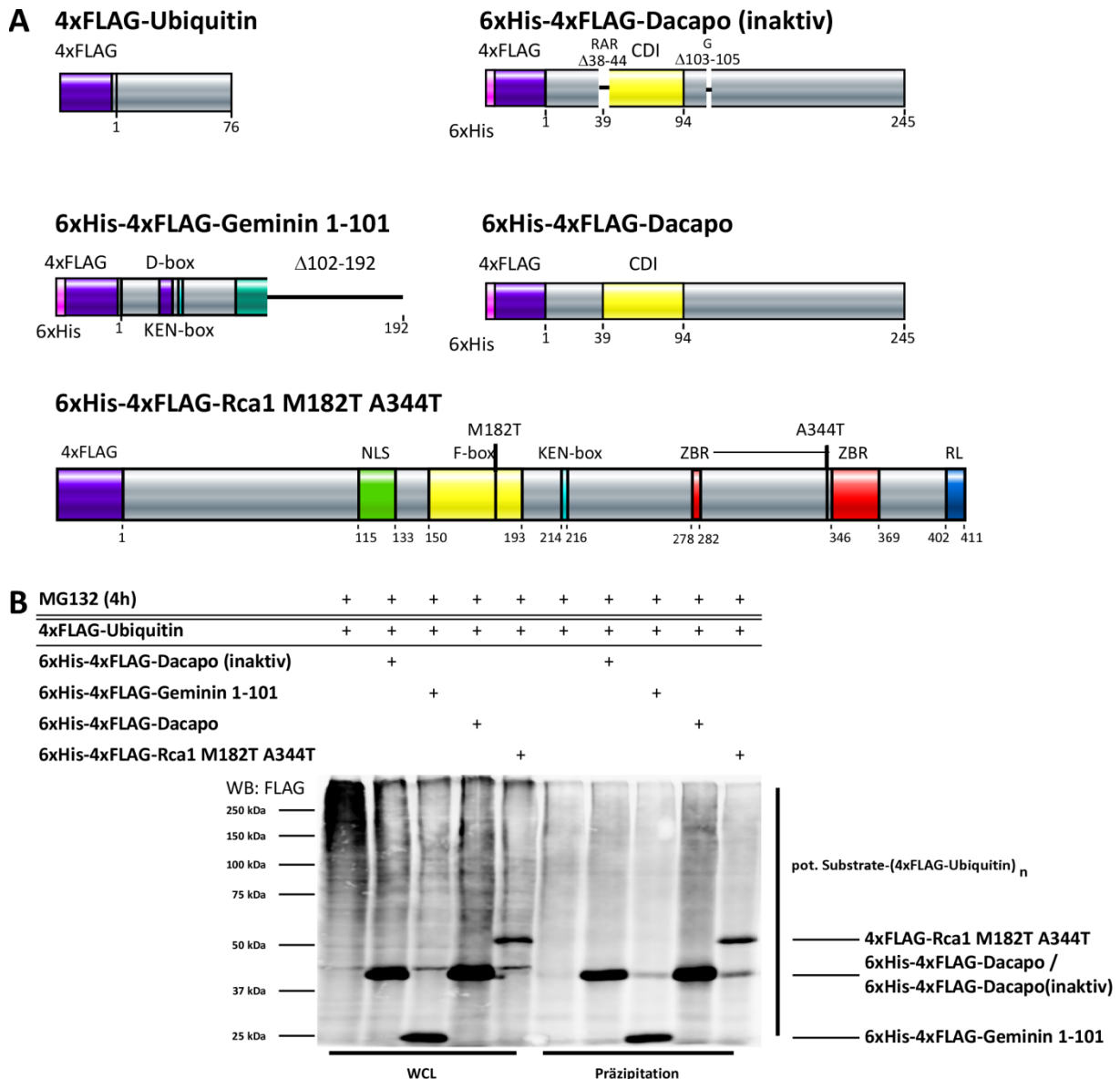


Abbildung 3.35 Verschiedene Substrate mit 6xHis-4xFLAG-Epitop wurden für einen *in vivo* Ubiquitylierungsassay überprüft

Es wurden verschiedene Substrate mit 6xHis-4xFLAG-Epitop in S2R⁺-Zellen überexprimiert, über Nickel-NTA Beads präzipitiert und im Western Blot überprüft. Dabei wurden alle Zellen zusätzlich mit 4xFLAG-Ubiquitin transfiziert, um endogene Level von Ubiquitin zu erhöhen und, um die Polyubiquitinkonjugate durch das 4xFLAG-Epitop sichtbar machen zu können. Außerdem wurde das 26S-Proteasom durch MG132 inhibiert, um die Anreicherung von Polyubiquitinkonjugaten zu erhöhen.

A: Übersicht über die transfizierten Konstrukte.

B: Western Blot der Zelllysate und Präzipitationen. Es ist eine signifikante Anreicherung an polyubiquityliertem 6xHis-4xFLAG-Dacapo erkennbar, jedoch nicht für die anderen Substrate.

Im Folgenden wurde überprüft, ob 6xHis-4xFLAG-Dacapo in Gegenwart von 4xFLAG-Rca1 verstärkt polyubiquityliert und somit verstärkt durch den SCF^{Rca1}-Komplex für den Abbau markiert wird. Dabei wurden Zellen analysiert, die unter MG132 Zugabe mit 4xFLAG-Ubiquitin und 6xHis-FLAG-Dacapo transfiziert wurden. Es wurde verglichen, ob die zusätzliche Überexpression von 4xFLAG-Rca1 eine Verstärkung der Polyubiquitylierung von 6xHis-4xFLAG-Dacapo bewirkt (Abbildung 3.36, A).

Der immunologische Nachweis im Western Blot zeigte jedoch, dass schon im Gesamtzelllysate von 6xHis-4xFLAG-Dacapo ohne 4xFLAG-Rca1 mehr polyubiquitylierte Proteinkonjugate zu detektieren

waren, als zusätzlich mit 4xFLAG-Rca1. Auch nach der Präzipitation zeigte sich keine Anreicherung von Polyubiquitin-Konjugaten nach Überexpression von 6xHis-4xFLAG-Dacapo und 4xFLAG-Rca1. Des Weiteren konnte eine unspezifische Bindung von 4xFLAG-Rca1 an die Nickel-NTA-Beads beobachtet werden (Abbildung 3.36, B).

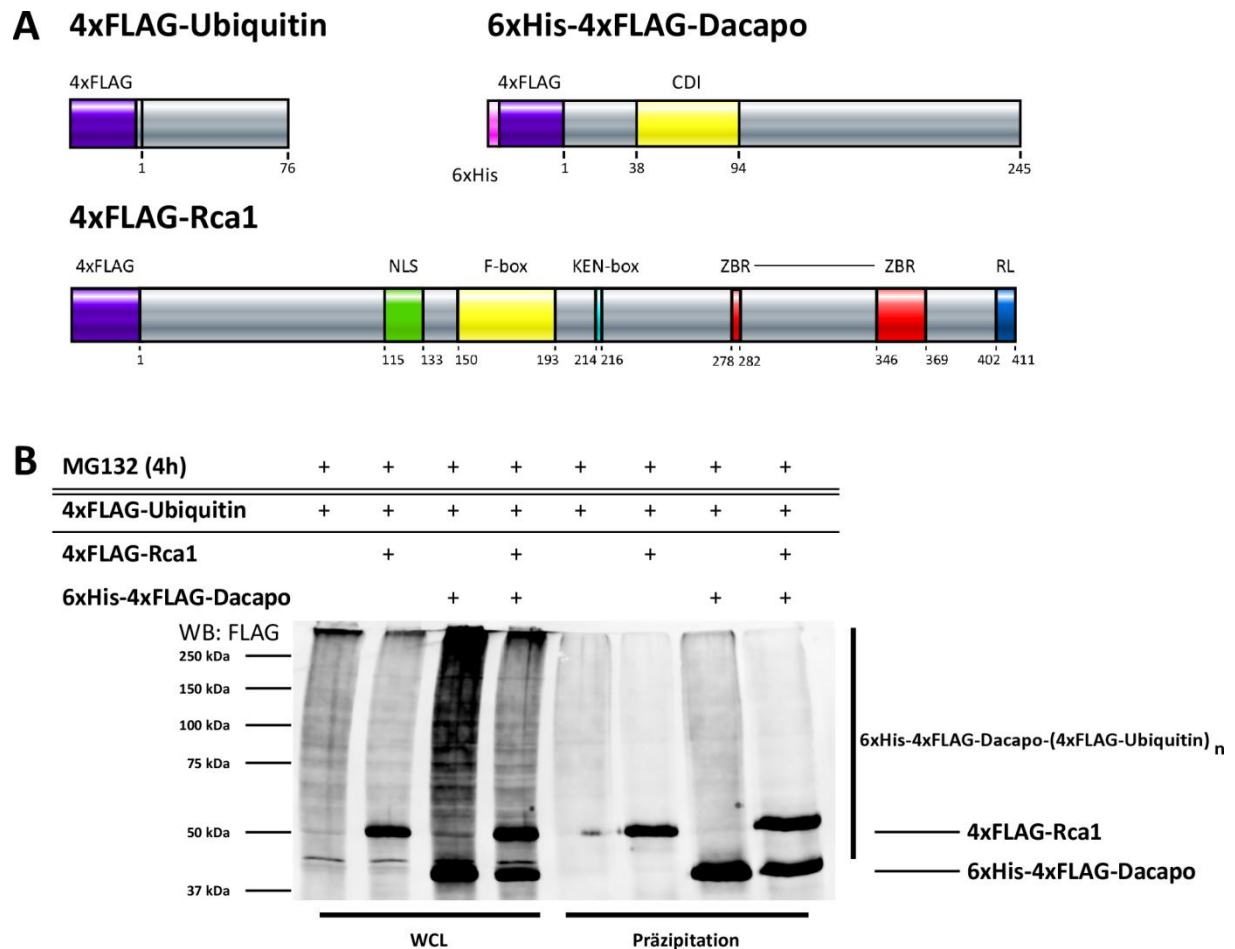


Abbildung 3.36 *in vivo* Ubiquitinierungssassay in Gegenwart von 4xFLAG-Rca1

A: Verwendete Konstrukte.

B: Immunologischer Nachweis von 4xFLAG-markierten Ubiquitin-Konjugaten. Es ist keine Zunahme an polyubiquitinyliertem 6xHis-4xFLAG-Dacapo erkennbar, wenn 4xFLAG-Rca1 zusätzlich überexprimiert wird. Außerdem scheint 4xFLAG-Rca1 unspezifisch an die Nickel-NTA Beads zu binden. Es konnte somit nicht nachgewiesen werden, dass 4xFLAG-Rca1 sich auf den Abbau von 6xHis4xFLAG-Dacapo auswirkt.

Aufgrund dessen, dass die Präzipitation von ubiquitinylierten Substraten für verschiedenste Proteine, die im Laufe des Zellzyklus polyubiquitinyliert und abgebaut werden und, mithilfe von Nickel-NTA-Beads wie in Abbildung 3.35 gezeigt, nicht erwartungsgemäß funktioniert hat, kann es sein, dass die Anreicherung von 6xHis-4xFLAG-Dacapo bei der Präzipitation andere Ursachen hat und nicht spezifisch war. Es könnte sein, dass die stark denaturierenden Pufferbedingungen des Harnstoffpuffers nicht optimal waren, um die Polyubiquitin-Konjugate zu präzipitieren.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der F-box-Funktion von Rca1 näher betrachtet. Zum einen lag ein Fokus auf der Rolle der F-box bei der APC/C-Inhibition im Zellzyklus. Zum anderen wurde die F-box-Funktion am G1-S-Übergang untersucht.

4.1 APC/C-Inhibition benötigt die F-box-Funktion im 16. Zellzyklus in der Embryogenese

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Überexpression von HA-Rca1 oder HA-Rca1 Δ F-box den *rca1*-mutanten Phänotyp in der G2-Phase des 16. Zellzyklus während der Embryogenese komplementieren kann und die F-box für die APC/C-Inhibition nicht gebraucht wird (Zielke *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von endogenen Mengen an HA-Rca1 Δ F-box den *rca1*-mutanten Phänotyp nicht retten kann. Das bedeutet, dass bei Überexpression die F-box nicht erforderlich ist, aber bei endogenen Mengen die F-box notwendig ist, um den APC/C erfolgreich inaktiv zu halten. Diese Schlussfolgerung wird durch die Analyse von *rca1*-Allelen und der Auswertung von transgenen Fliegen, die *rca1* unter Kontrolle der seiner genomischen Region exprimieren, gestützt.

Bei der Analyse von *rca1*-Allelen waren die Allele *rca1*² sowie *rca1*^{C1474} von entscheidender Bedeutung. Das *rca1*-Allel *rca1*² stammt aus dem Labor von Zipursky (Dong *et al.*, 1997). Bei diesem Allel kommt es zu einem Aminosäureaustausch an Position 344 (A344T), also kurz vor dem zweiten Teil der Zinkbinderegion. Das Allel *rca1*² wurde in vorigen Studien intensiv untersucht und es konnte gezeigt werden, dass der embryonale Phänotyp darauf beruht, dass der APC/C in der G2-Phase von Zellzyklus 16 nicht mehr inhibiert wird. Für die Inhibition des APC/C ist die ZBR essentiell und die Mutation in der Nähe der ZBR ist damit gut vereinbar.

Das andere Allel, *rca1*^{C1474}, aus dem Labor von Frank Schnorrer (Chen *et al.*, 2008) hat einen Aminosäureaustausch innerhalb des F-box-Motivs. Dabei wird an Position 182 ein Methionin gegen ein Threonin ausgetauscht.

Der Vergleich von *rca1*² und *rca1*^{C1474} homozygoten Embryonen zeigte den gleichen Phänotyp in der Embryogenese, obwohl bei dem *rca1*^{C1474}-Allel die Mutation in der F-box liegt und somit die Zinkbinderegion intakt ist. Es konnte auch keine Komplementation im transheterozygoten Zustand stattfinden. Prinzipiell wäre es möglich, dass eine Kombination aus beiden Proteinen zu einer Aufhebung des Phänotyps führt, wenn eine funktionale F-box und eine funktionale Zinkbinderegion auf zwei Proteinen verteilt vorliegen würden. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die exprimierten Proteinnengen durch Mutationen außerhalb der kodierenden Regionen beeinflusst werden, und somit

niedriger sind als die endogenen Mengen beim wildtypischen Rca1. Beide Allele wurden durch EMS induziert und die transkribierte Region sequenziert. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine weitere EMS-induzierte Mutation, die die Transkriptionsmenge beeinflusst, vorliegt ist zwar gering, aber nicht auszuschließen. Somit könnte die Menge an Transkripten reduziert sein und den Phänotyp verursachen.

Es wurden transgene Fliegen hergestellt, bei denen die Expression von Rca1 unter der Kontrolle der genomischen Region stand. Die genomische Region um *rca1*, die für die Expression von *rca1* benötigt wird, konnte erfolgreich kloniert werden. Orientiert wurde sich dabei an der 10 kb großen genomischen Region, die schon bei Dong *et al.*, 1997 erfolgreich den *rca1*-mutanten Phänotyp komplementieren konnte. Außerdem wurde eine Deletion der F-box vorgenommen, die unter der Kontrolle der genomischen Region exprimiert wird. Es konnten aus diesen klonierten Plasmiden erfolgreich transgene Fliegen erhalten und im Hintergrund beider Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474} getestet werden.

Die genomische Region enthält alle für die Expression und Regulation von Rca1 wichtigen Elemente, denn es konnte erfolgreich der *rca1*-mutante Phänotyp, also der Arrest in der G2-Phase des 16. Zellzyklus, komplementiert werden. Dies war sowohl für das *rca1*-Allel *rca1*² als auch für *rca1*^{C1474} möglich. Die Expression von HA-Rca1ΔF-box unter Kontrolle der genomischen Region konnte jedoch den *rca1*-mutanten Phänotyp nicht retten. Dabei ist die N-terminale Fusion von Rca1 mit einem HA-Epitop nicht der Grund, dass keine Komplementation stattfinden kann, denn die Expression von Rca1 mit N-terminalem HA-Epitop kann den *rca1*-mutanten Phänotyp komplementieren.

Da die Insertion der Transgene von Rca1 und HA-Rca1ΔF-box unter Kontrolle der genomischen Region durch eine zufällige Integration im Genom über P-Element vermittelte Keimbahntransformation entstanden sind, könnte der Insertionsort die Expression der Transgene beeinflussen. Aus diesem Grund wurden alle vorhandenen, unterschiedlichen Transgeninsertionen von HA-ΔF-box überprüft. Dabei konnten keine Unterschiede im Bezug auf die Rettung des *rca1*-mutanten Phänotyps festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es ist daher zwar nicht auszuschließen, dass die Expression von HA-Rca1ΔF-box niedriger ist als die von HA-Rca1, jedoch durch die Analyse von 3 unabhängigen transgenen Linien eher unwahrscheinlich. Außerdem zeigten alle transgenen Fliegen ähnliche Expression des *white*-Gens, das auf dem Integrationsplasmid vorhanden ist. Alle Transgene liegen somit in genomischen Regionen vor, die nicht stark durch epigenetische Effekte beeinflusst werden.

Leider war es nicht möglich, die Expression der Rca1-Proteine in den verschiedenen Allelen oder von den transgenen Linien zu bestimmen. Die zur Verfügung stehenden Rca1-Antikörper konnten die endogenen Rca1-Mengen nicht detektieren (Kies, persönliche Kommunikation). Auch der Nachweis der HA-Epitop-markierten Proteine mittels Immunfluoreszenz oder Western Blot mit HA-Antikörper war nicht möglich, weil die Expression für die Detektion vermutlich zu gering ist. Aus diesem Grund wurde begonnen Fliegenstämme zu erzeugen, die mit 4xFLAG-Epitop versehenes Rca1 und

Rca1 Δ F-box unter der Expression der genomischen Region enthalten und über eine virale Φ C31-Integrase an einer attP-Stelle auf dem dritten Chromosom integriert werden (Bergér, 2013; Bischof *et al.*, 2007). Diese Transgene werden also am gleichen Genort integriert und exprimieren dann vergleichbare Proteinmengen.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass neben der etablierten Inhibition des APC/C durch die C-terminale Hälfte von Rca1 weiterhin eine F-box-abhängige Funktion von Rca1 bei der Inhibition des APC/C während der Embryogenese notwendig ist.

4.2 Allelspezifische genetische Interaktion von Rca1 und Dacapo

Während der Embryogenese beruht die Inhibition des APC/C auf der direkten Interaktion von Rca1 mit dem APC/C, wodurch dieser, in Analogie zu den Emi1-Daten (Miller *et al.*, 2006), durch einen Pseudosubstratmechanismus inhibiert wird. Weiterhin wird eine erfolgreiche Komplexbildung vom APC/C mit dessen Aktivatorprotein Fzr durch dessen Phosphorylierung und durch die Phosphorylierung durch Cyclin A/Cdk1 und Cyclin E/Cdk2 verhindert (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002; Reber *et al.*, 2006). Die F-box-abhängige Funktion für die APC/C-Inhibition könnte somit auf diesem zweiten Weg, der Phosphorylierung von Fzr, einwirken. Ein Kandidat, für einen SCF-abhängigen Abbau wäre dann Dacapo, als Inhibitor von Cyclin E/Cdk2. Es sollte deshalb überprüft werden, ob in der Abwesenheit von Dacapo die F-box-abhängige Funktion von Rca1 benötigt wird.

Es wurden rekombinante Fliegen hergestellt, die die *rca1*-Allele *rca1*² oder *rca1*^{C1474} und *dap*⁶ auf dem 2. Chromosom tragen. Die Embryonen dieser Stämme zeigen unterschiedliche Phänotypen. Es kommt bei *rca1*² mit intakter F-box zu einer Ausprägung des *dacapo*-Phänotyps, also zu einer Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zu heterozygoten Fliegen, die eine Kopie von *rca1* auf dem Balancer-Chromosom tragen. Bei *rca1*^{C1474} mit intakter Zinkbinderegion dagegen kam es zur Ausprägung des *rca1*-mutanten Phänotyps, also zu einer Erniedrigung der Zellzahl pro halbem Segment. Diese Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen. Wenn Rca1 zwei Funktionen erfüllt, die Inhibition des APC/C und die Regulation von Cyclin E über Dacapo, dann sollte in der Abwesenheit von *dacapo* keine F-box-abhängige Funktion von Rca1 notwendig sein. Somit sollte es zu keinem Arrest in Zellzyklus 16 kommen.

Dacapo mRNA ist Teil der maternalen Kontribution im Ei (

Abbildung 1.2; Tomancak *et al.*, 2002; Tomancak, 2007; Lane *et al.*, 1996; de Nooij *et al.*, 1996). In den synzytialen Teilungen des Embryos wird diese mRNA verwendet, um Protein herzustellen. Die zygotische Expression startet während der Zellularisierung (Lane *et al.*, 1996; de Nooij *et al.*, 1996; Tomancak *et al.*, 2002; Tomancak, 2007). Die Expression von Dacapo ist vor allem in Regionen zu finden, in denen Zellen aus dem Zellzyklus austreten (de Nooij *et al.*, 1996).

Ein Unterschied zwischen den beiden *rca1*-Allelen *rca1*² und *rca1*^{C1474} ist, dass das aus dem *rca1*²-Allel resultierende Rca1-Protein mit dem Aminosäureaustausch A344T dazu führt, dass die Interaktion mit SkpA im SCF-Komplex nach wie vor möglich ist, beim Aminosäureaustausch M182T jedoch nicht (siehe Abbildung 3.24). Während der Embryogenese verschwinden die Transkripte maternalen Ursprungs im synzytialen Blastoderm und sind dann nicht mehr detektierbar. Es könnte sein, dass Reste der maternale Kontribution in Form von mRNA und/oder Proteinen bis in die Mitose 16 persistieren. Dann könnte das aus dem *rca1*²-Allel resultierende Rca1-Protein ausreichen, um den Abbau von diesen Dacapo-Proteinen zu vermitteln. Die *in situ* Hybridisierung der Transkripte oder der Protein-nachweis mittels Immunfluoreszenz könnten aber nicht sensitiv genug sein, um eventuelle Restmengen an mRNA oder Protein zu detektieren. Wenn maternale Kontribution von Dacapo solange persistieren würde, könnte es am G2-M-Übertritt Cyclin E/Cdk2 inhibieren. Für den Abbau dieser Dacapo-Proteine würde aber die F-box-Funktion in Rca1 benötigt werden. Somit könnte die Inaktivierung des APC/C durch die Phosphorylierung durch Cyclin A/Cdk1 oder mit geringen Mengen an Cyclin E/Cdk2 nicht ausreichen. Der APC/C wäre aktiv und könnte Cycline abbauen. Somit kann kein Eintritt in die Mitose erfolgen, weil die Cycline nicht akkumulieren können. Die aus dem *rca1*-Allel *rca1*² resultierenden Proteine haben eine intakte F-box und könnten den F-box-abhängigen Abbau von dem aus der maternalen Kontribution resultierenden Dacapo bewerkstelligen. Dadurch könnten größere Mengen an Cyclin E/Cdk2 vorhanden sein, die zusammen mit Cyclin A/Cdk1 den APC/C ausreichend inhibieren können.

Eine Möglichkeit dieser Hypothese nachzugehen wäre, die maternale Kontribution von Dacapo zu inaktivieren. Dies könnte mithilfe von RNA-Interferenz funktionieren. Durch die Injektion von doppelsträngiger RNA gegen Dacapo könnte vor der Zellularisierung von der Mutter deponierte mRNA von Dacapo beseitigt werden. Man könnte in Folge dessen die *rca1*² *dap*⁶-mutanten Embryonen ohne die Beeinflussung durch die maternale Kontribution analysieren.

Es könnte auch sein, dass in der regulatorischen Region des Allels *rca1*^{C1474} zusätzliche Mutationen vorhanden sind, die die Expressionsmenge beeinflussen. Es wurde lediglich die kodierende Region der Allele *rca1*² und *rca1*^{C1474} sequenziert. Der Austausch der Aminosäure M182T innerhalb der F-box könnte außerdem zu einer Instabilität im Protein führen, indem es zu einer Fehlfaltung der F-box-Domäne kommt. Eine Möglichkeit, dies zu überprüfen wäre die Erstellung eines rekombinanten Fliegenstamms, der *rca1*^{C0440} und *dap*⁶ enthält. Das Genprodukt aus *rca1*^{C0440} enthält eine Sinnentstellende Mutation, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon am Anfang des F-box-Motivs führt und der C-Terminus dadurch deletiert ist. In dem aus dem Allel *rca1*^{C0440} gebildeten Protein wären alle wichtigen Strukturdomänen wie F-box, KEN-box, ZBR und RL-Tail nicht enthalten. Somit wäre weder eine Interaktion mit dem APC/C noch mit dem SCF-Komplex möglich und der *rca1*-mutante Phänotyp sollte auftreten.

4.3 Ektopische S-Phaseninduktion durch Rca1-Überexpression benötigt die F-box und APC/C-Interaktionsmotive

Die Überexpression von Rca1 während der Augenentwicklung führt zu ektopischen S-Phasen. Dieser Effekt ist F-box-abhängig (Zielke *et al.*, 2006). In S2R+-Zellen führt die Überexpression von Rca1 zu einer Abnahme an G1-Zellen aufgrund dessen, dass der G1-S-Übergang beschleunigt wird. Dies wurde mit Lebendzellbeobachtungen von Zellen mit und ohne Rca1-Überexpression gezeigt. Die Länge der G1-Phase wurde mithilfe von den Zellzyklussensoren E2F1 1-230-3xCherry und HA-NLS-Cdt1 1-101-2xGFP gemessen, die beide zu Beginn der S-Phase abgebaut werden. Neben der APC/C-Inhibition, die durch den Austausch der Aminosäuren des KEN-box-Motivs gezeigt wurde ist auch eine F-box-abhängige Funktion von Rca1 am G1-S-Übergang zu beobachten.

Alle getesteten Rca1-Proteine, die Deletionen oder den Austausch von Aminosäuren in konservierten Strukturdomänen wie der F-box, der KEN-box und der Zinkbinderegion aufweisen, können den G1-S-Übergang weniger stark beschleunigen als 4xFLAG-Rca1. 4xFLAG-Rca1 Δ F-box zeigt dabei eine höhere Aktivität als der Austausch von Aminosäuren bei 4xFLAG-Rca1 M182T und 4xFLAG-Rca1 L160D (Q164P P165G). Der Unterschied zwischen der Aktivität von 4xFLAG-Rca1 Δ F-box und der etwas stärker reduzierten Aktivität von 4xFLAG-Rca1 M182T und 4xFLAG-Rca1 L160D kommt vermutlich dadurch zustande, dass durch den Aminosäureaustausch in der F-box die Raumstruktur des F-box-Motivs verändert wird und somit die F-box-Domäne weniger gut gefaltet ist. Fehlfaltete Proteine in der Zelle werden erkannt und für den Abbau im Proteasom markiert. Die Deletion der F-box dagegen führt anscheinend nicht zu einer Destabilisierung.

Sowohl die Deletion der F-box als auch der Austausch der Aminosäuren in der KEN-box zu KAA oder AEN oder der Austausch von Aminosäuren innerhalb oder der Zinkbinderegion angrenzend, führen alle zu einer Erniedrigung der S-Phaseninduktion bei Überexpression im Vergleich zum volle-Länge-Protein.

Neben der Funktion von Rca1 als Inhibitor des APC/C, erfüllt Rca1 bei Überexpression eine zweite Funktion am G1-S-Übergang als Teil eines SCF^{Rca1}-Komplexes, der Dacapo für den Abbau markieren könnte. Die Deletion oder der Austausch von Aminosäuren innerhalb der F-box verhindern, wie auch in den Interaktionsstudien durch Yeast-2-Hybrid oder Co-Immunpräzipitation gezeigt werden konnte, eine Interaktion mit der SCF-Komponente SkpA. Da Dacapo ein negativer Regulator des G1-S-Übergangs ist, kann Dacapo durch Überexpression von 4xFLAG-Rca1 früher oder schneller für den Abbau markiert werden, Rca1 ohne oder mit mutierter F-box kann dies dagegen nicht.

Der Austausch von Aminosäuren im KEN-box-Motiv oder innerhalb der Zinkbinderegion führt dagegen zu einer verringerten Inhibition des APC/C.

Die Überexpression von Rca1 gibt Hinweise auf eine Funktion neben der Rolle als direktem Inhibitor des APC/C am G1-S-Übergang. Diese Funktion könnte in einem SCF^{Rca1}-Komplex sein, durch den der Abbau eines negativen Regulators des G1-S-Übergangs, Dacapo, vermittelt wird.

4.4 F-box-abhängiger Abbau des Zellzyklusregulators Dacapo durch SCF^{Rca1}

Dacapo wird am G1-S-Übergang abgebaut und dies könnte durch einen SCF^{Rca1}-Komplex vermittelt werden. Durch den Abbau von Dacapo wird der Cyclin E/Cdk2 Inhibitor entfernt und Cyclin E/Cdk2 kann den G1-S-Übergang induzieren.

In Zellkultur konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von GFP-Dacapo in S2R+-Zellen zu einer Akkumulation in der G1-Phase des Zellzyklus führt. Die gleichzeitige Überexpression von 10xHA-Rca1 führt zu einer Progression im Zellzyklus und die Menge an GFP-Dacapo nimmt stark ab (Abbildung 3.29). Dieser Effekt ist F-box-abhängig, denn die Überexpression von 10xHA-Rca1ΔF-box in Gegenwart von überexprimiertem GFP-Dacapo führte weiterhin zu einer G1-Anreicherung der Zellen. Es könnte aber sein, dass die Überexpression von 10xHA-Rca1 das Zellzyklusprofil dahingehend verschiebt, dass sich die Zellen länger in der S- und G2-Phase des Zellzyklus aufhalten und somit kein G1-Arrest zustande kommt. Um dies zu überprüfen, wäre ein längerer Zeitraum zwischen Induktion der Proteinexpression und Analyse der Zellen im Durchflusszytometer möglich, um zu überprüfen, ob die Zellen nach längerer Zeit in der G1-Phase arretieren.

Es sollte zudem überprüft werden, ob Rca1 eine bestehende, durch Dacapo Überexpression induzierte Akkumulation der Zellen in der G1-Phase aufheben kann. Hierzu sollte eine konstitutive Expression von Dacapo durch einen actin-Promoter und dadurch ein G1-Arrest erreicht werden, bevor die Expression von Rca1 induziert wird. Die Expression von Dacapo durch den actin-Promoter reichte jedoch nicht aus, um einen Zellzyklusarrest zu erlangen. Es wäre daher sinnvoll, Dacapo unter der Kontrolle eines anderen starken, induzierbaren Promoters, z.B. unter Kontrolle des *Heat shock protein 70* Promoters, zu bringen, um nach dem Arrest der Zellen in der G1-Phase die Expression von Rca1 zu induzieren.

Dass Rca1 den Abbau von Dacapo fördern kann, zeigten die Experimente, bei denen durch Überexpression von 10xHA-Rca1 eine Abnahme von GFP-Dacapo zu beobachten war. Weiterhin konnte durch eine Abreicherung von Rca1 mittels RNAi eine Stabilisierung von GFP-Dacapo beobachtet werden.

Es wurde deshalb versucht, einen *in vivo* Ubiquitylierungsassay zu etablieren, um zu zeigen, dass Rca1 die Ubiquitylierung von Dacapo fördert. Es konnten jedoch keine optimalen Bedingungen für eine Polyubiquitylierung von Dacapo oder anderer APC/C-Substrate gefunden werden.

Die Abnahme von Dacapo nach Rca1-Überexpression ist klar erkennbar, jedoch kann dieser Effekt durch indirekte Effekte verursacht worden sein. So erfolgt der Abbau von Dacapo zusätzlich in der S-Phase PIP-box-abhängig durch die E3-Ligase CRL4 (Christina Swanson und Robert Duriono, University of North Carolina, unveröffentlicht). Die PIP-box befindet sich im C-Terminus von Dacapo. Der Abbau durch die E3-Ligase CRL4 findet spezifisch in der S-Phase statt und benötigt PCNA, das wiederum unter Kontrolle von E2F1 steht und in der S-Phase transkribiert wird (Royzman *et al.*, 1997). Der PIP-box-abhängige Abbau könnte dazu dienen, den Abbau von Dacapo zu beschleunigen und das Fortschreiten der S-Phase voranzutreiben. Der niedrige Level von Dacapo in der G2-Phase könnte auf den S-Phase Abbau durch CRL4 zurückzuführen sein. Um diesen Abbau auszuschalten, sollten Mutationen in dem PIP-box-Degron eingeführt werden und dann die Folgen von Rca1-Überexpression und RNAi gegen Rca1 nochmals untersucht werden.

In einer weiteren erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Dui *et al.*, 2013 wird außerdem der SCF^{Skp2}-Komplex für einen Abbau von Dacapo verantwortlich gemacht. Der Abbau soll analog zur Degradation der humanen homologen Cip/Kip Proteine p21^{cip1}, p27^{kip1}, und p57^{kip2} durch SCF^{Skp2} vermittelt werden (Yu *et al.*, 1998; Amati und Vlach, 1999; Carrano *et al.*, 1999; Tsvetkov *et al.*, 1999; Kossatz *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2004; Pagano, 2004; Bond *et al.*, 2006; Pateras *et al.*, 2006; Yung *et al.*, 2007). Jedoch erfolgte eine Untersuchung ohne Berücksichtigung der Zellzyklusstadien der verwendeten Zellen. Außerdem ist der Einfluss einer Überexpression von Skp2 auf den Zellzyklus nicht bekannt. Somit könnten Verschiebungen des Zellzyklusprofils den Abbau von Dacapo beeinflussen. In einer anderen Veröffentlichung von Ghorbani *et al.*, 2011, konnte kein Zusammenhang zwischen Skp2 und Dacapo gezeigt werden. Der Einfluss des Abbaus von Dacapo durch einen SCF^{Skp2}-Komplex ist demnach vermutlich nicht so bedeutend und die Fluktuation von Dacapo im Zellzyklus geht höchstwahrscheinlich nicht allein darauf zurück.

Im Bezug auf den Einfluss im Zellzyklus sind die Ergebnisse dieser Arbeit viel weitreichender und tiefergründiger durch die Verfolgung von GFP-Epitop-markierter Dacapo-Proteine durch Durchflusszytometrie während der einzelnen Zellzyklusphasen.

Die hier gezeigten Daten sprechen dafür, dass Rca1 einen F-box-abhängigen Abbau von Dacapo vermittelt und des Weiteren am G1-S-Übergang auch sowohl an der APC/C-Inhibition über direkte Bindung an den APC/C als auch indirekt über den Abbau des Cdk-Inhibitorproteins Dacapo beteiligt sein könnte. Das Modell für diese beiden Funktionen ist in der Abbildung 4.1 zusammengefasst.

4xFLAG-Epitop-markiertem Rca1 konnte die durch Überexpression von 4xFLAG-Fzr in der G2-Phase induzierte Aktivität des APC/C^{Fzr}, erfolgreich inhibieren.

Der Austausch des Cysteins an Position C351 zu Serin führte zu der stärksten Abnahme der APC/C-Inhibition. Diese Cystein ist Teil der Zinkbinderegion im C-Terminus, die innerhalb der Rca1/Emi1 Familie stark konserviert ist. Die Zinkbinderegion enthält 2 Zinkionen, die durch 8 Cysteine stabilisiert werden. Zusammen mit dem RL-Tail ist dieses Motiv für die APC/C-Inhibition sehr wichtig. Es wird vermutet, dass die Zinkbinderegion und der RL-Tail die Interaktion mit dem E2-Enzym verhindern, analog zu den jüngst veröffentlichten Strukturdaten des humanen Emi1 (Frye *et al.*, 2013).

Der Austausch des Alanins an Position 344 zu Threonin hat ebenso einen großen Einfluss auf die APC/C-Inhibition, jedoch nicht ganz so stark wie das Cystein 351. Die Aminosäure A344 in Rca1 liegt beim Vergleich der Aminosäuresequenz mit dem humanen Emi1 unmittelbar in der Nähe des stark konservierten Arginins 393 und könnte so die Umgebung dieser Aminosäure negativ beeinflussen (Frye *et al.*, 2013). Aus diesem Grund könnte sich der Austausch der Aminosäure 344 negativ auf die umliegenden Aminosäuren und damit auf die Tertiärstruktur in diesem Bereich des C-Terminus auswirken. Dadurch könnte die APC/C-Inhibition beeinflusst werden.

Der Austausch der Aminosäuren innerhalb des KEN-box-Motivs führt ebenfalls zu einer Verringerung der APC/C-Inhibition und einer Abnahme der Menge an Cyclin B 1-285-2xGFP um ca. 40 % (Daten nicht gezeigt). Der Grund dafür ist vermutlich, dass das KEN-box-Motiv für die Interaktion und Blockade mit der Substratbindestelle des APC/C wichtig ist. Emi1 enthält in diesem Bereich ein D-box-Motiv. Es handelt sich hierbei um ein schwaches D-box-Motiv, sodass die Inhibition des APC/C^{Cdh1} durch einen additiven Effekt aus D-box Interaktion innerhalb der Substratbindestelle und Inhibition des APC/C durch ZBR und RL-Tail zustande kommt (Frye *et al.*, 2013). Dadurch wirkt sich vermutlich der Austausch der Aminosäuren zu KAA oder AEN nicht so stark auf die APC/C-Inhibition aus.

Die Deletion der F-box bzw. der Austausch der Aminosäure an Position 182 wirkt sich vermutlich nur indirekt auf die APC/C-Inhibition aus. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression eines Rca1-Proteins ohne F-box den *rca1*-mutanten Phänotyp im Zellzyklus 16 der Embryogenese komplementieren kann (Zielke *et al.*, 2006). Die Überexpression eines Rca1-Proteins, bei dem die F-box deletiert ist, sollte sich also nicht so stark auf die APC/C-Inhibition auswirken. Jedoch wird der APC/C am G2-M-Übergang nicht allein durch Rca1 inhibiert, sondern ebenfalls durch die Cyclin-abhängigen Kinasen Cyclin A /Cdk1 und Cyclin E/Cdk2 unterstützt (Dienemann und Sprenger, 2004; Knoblich *et al.*, 1994; Sigrist und Lehner, 1997). Die Aktivität von Cyclin E/Cdk2 wird vermutlich auch durch den SCF^{Rca1}-Komplex beeinflusst, wenn dieser Komplex das Cdk-Inhibitor-Protein Dacapo für den Abbau markiert. Wenn also Fzr überexprimiert wird, wird der APC/C in der G2-Phase aktiv und das gleichzeitig überexprimierte Rca1, ohne funktionsfähige F-box, wird für die Inhibition des APC/C, aber auch im SCF-Komplex gebraucht, um den Abbau von Dacapo zu vermitteln. Es wird also die Ba-

lance zwischen den APC/C-Inhibitoren Kinasen Cyclin A /Cdk1 und Cyclin E/Cdk2 sowie Rca1 gestört, weil der SCF-Komplex durch die endogenen Rca1-Mengen nur eingeschränkt funktionsfähig ist. Deswegen ist bei der Überexpression von Fzr und Rca1 ohne funktionsfähige F-box die APC/C-Inhibition weniger gut als durch das volle-Länge-Protein.

Der *in vivo* APC/C-Inhibitionsassay liefert demnach nur eine begrenzte Aussage über die direkte APC/C-Inhibitionsfähigkeit von Rca1-Derivaten, weil am G2-M-Übergang höchstwahrscheinlich auch das Cdk-Inhibitor-Protein Dacapo für die Inhibition des APC/C eine Rolle spielt, für dessen Regulation die F-box-Funktion von Rca1 gebraucht wird. In Abbildung 4.2 ist das Modell für die Regulation des APC/C am G2-M-Übergang dargestellt, an dem auch Dacapo als Substrat eines SCF^{Rca1}-Komplexes beteiligt ist.

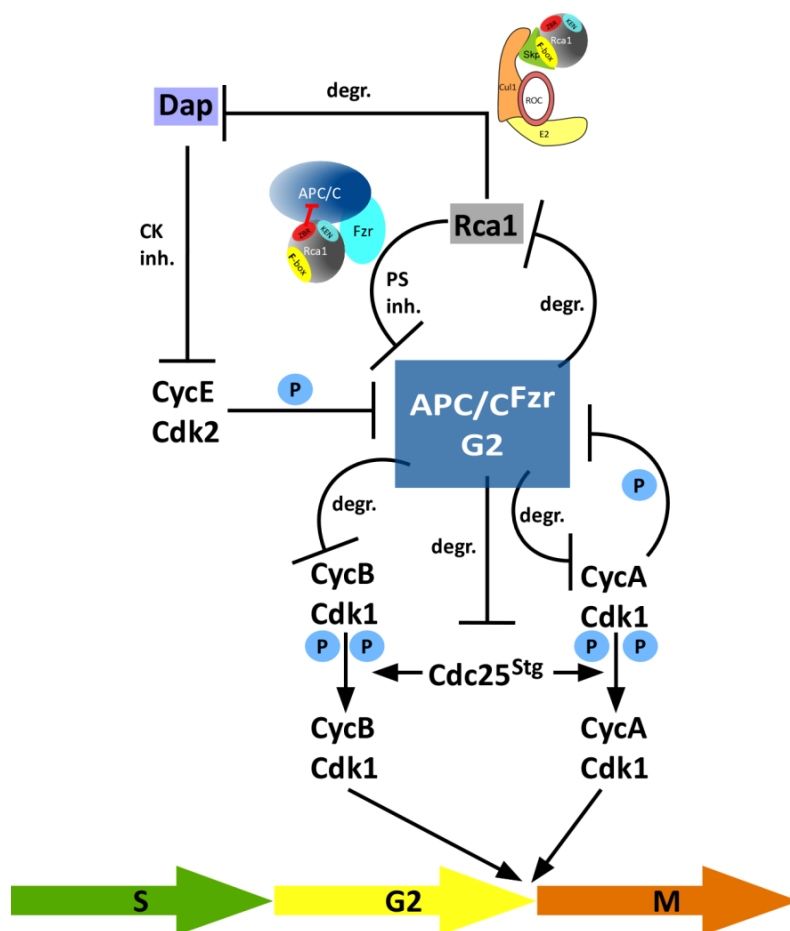


Abbildung 4.2: Modell für die Regulation des G2-M-Übergangs

Am G2-M-Übergang ist ein komplexes, verzahntes Netzwerk an Regulation vorhanden. Der APC/C wird über Cyclin A/Cdk1, Cyclin E/Cdk2 und Rca1 inhibiert (Dienemann und Sprenger, 2004; Knoblich *et al.*, 1994; Sigrist und Lehner, 1997). Ein SCF^{Rca1}-Komplex könnte jedoch das Cdk-Inhibitor-Protein Dacapo für den Abbau markieren und somit die APC/C-Inhibition über Cyclin E/Cdk2 zusätzlich beeinflussen. Des Weiteren kann der APC/C jedoch Cyclin A und die Phosphatase Cdc25^{Stg}, die inhibitorische Phosphorylierungen von Cyclin A/Cdk1 und Cyclin B/Cdk1 entfernt, für den Abbau markieren (Reber *et al.*, 2006). Rca1 selbst kann höchstwahrscheinlich ebenfalls zu einem Substrat des APC/C werden. Es handelt sich hierbei also um ein sehr fein abgestimmtes Regulationssystem.

Abkürzungen: degr.: Abbau; P: Phosphorylierung, PS inh.: Pseudosubstratinhibition, CK inh.: Cdk-Inhibition

5 Materialien

5.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösungen (30 % 37,5:1)	Roth
Agar-Agar, bakteriologisch	Roth
Agarose ultra	pureInvitrogen
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	Roth
Apfelsaft	Rio D'Oro, Aldi Süd
Bactoagar	Becton
Bacto Trypton	Becton
Bacto Yeast Extract	Becton
Bromphenolblau	SERVA
Dinatriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Fluka
DMFA (Dimethylformamid)	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra- essigsäure)	Sigma Aldrich
Ethanol (100 %)	Roth
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis
EDTA (Ethylendiamtetraacetat)	Fluka
Glucose	Merck
Glycerin	Roth
Hoechst 33342	Sigma Aldrich
Igepal CA-630	Sigma Aldrich
Isopropanol	Roth, Merck
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Lithiumacetat	AppliChem
Magermilchpulver	Milchunion eG Lasana, Everswinkel
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich

Methanol	Roth
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat, (Na ₂ HPO ₄)	Fluka
Natriumhydroxid	Merck
Natrium-β-Glycerophosphat pH 7,3	Roth
Nipagin	Merck
Paraformaldehyd	AppliChem
Polyethylenglykol PEG 3350	Sigma Aldrich
Phenylendiamin	AppliChem
Propylgallat	Merck
D-Saccharose	Merck
Salzsäure	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA
TEMED (N,N,N',N',Tetramethylendiamin)	Fluka
Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	USB
Tween 20	Roth
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	AppliChem
β-Mercaptoethanol	AppliChem
Kupfersulfat	Sigma Aldrich
YeastNitrogen Base	Becton Dickinson
Natriumacetat	Fluka
Ammoniumsulfat	Merck
Harnstoff	Merck
L-Alanin	AppliChem
L-Arginin	Sigma Aldrich
L-Asparagin-Monohydrat	AppliChem
L-Asparaginsäure	AppliChem
L-Cystein-HCl-Monohydrat	AppliChem
L-Glutamin	AppliChem
L-Glutaminsäure	AppliChem
L-Histidine HCl	Serva
L-Isoleucin	AppliChem
L-Leucin	AppliChem
L-Lysin-Monohydrochlorid	AppliChem

L-Methionin	AppliChem
L-Phenylalanin	AppliChem
L-Prolin	Merck
L-Serin	AppliChem
L-Threonin	AppliChem
L-Tyrosin	AppliChem
L-Valin	AppliChem
L-Glycin	Biomol
(myo)-Inositol	AppliChem
p-Aminobenzoesäure	Sigma Aldrich
MG132	Enzo Live Sciences und Sigma Aldrich
dNTPs	New England Biolabs
Propidiumiodid	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin 100x	Pan Biotech
Trypan-Blau	Sigma Aldrich

5.2 Enzyme und Proteine

ProteoBlock (Protease Inhibitor)	Fermentas
RiboLock (RNase Inhibitor)	Fermentas
T7-RNA-Polymerase	Bioline und Fermentas
T4-Ligase und –Puffer	New England Biolabs
Restriktionsenzyme und –Puffer	New England Biolabs
Precision Plus Protein Standard	Biorad
KOD-DNA-Polymerase	Novagen
1 kb Gene Ruler DNA-Mix	Fermentas
RNase A	Roche Diagnostics GmbH
1x Trypsin/EDTA	Pan Biotech
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich
Lysozym	Fluka
Kälberserumalbumin (FCS)	Pan Biotech

5.3 Antikörper

5.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper Nr.	Antigen	hergestellt in	Verdünnung	Herkunft	Verwendungszweck
294	GFP	Kaninchen	1:2500	Torrey Pines Biolabs Inc	Western Blot
371	β -Galactosidase	Maus	1:80	AG Schneuwly	Embryonenfärbung
373	HA	Maus	1:5000	Cavance	Western Blot
374	FLAG	Maus	1:5000	Sigma Aldrich	Western Blot

5.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper Nr.	Antigen	markiert mit	hergestellt in	Verdünnung	Herkunft	Verwendung
286c	Maus	Alexa 488	Ziege	1:500	Molecular Probes	Embryonenfärbung
364	Maus	IR-Dye-800CW	Ziege	1:5000	Licor	Western Blot
367	Kaninchen	IR-Dye-680	Ziege	1:5000	Licor	Western Blot

5.4 Verbrauchsmaterialien

1,0 ml ; 1,5 ml ; 2,0 ml Reagiergefäße	Sarstedt
10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l Pipettenspitzen	G. Kister Gbr
15 ml, 50 ml Falcon Tube	Sarstedt
Deckgläser 24 mm x 60 mm	Menzel
Elektroporationsküvetten	Equibio oder Peqlab Biotechnologie GmbH
Immersionsöl 518N	Zeiss
Impföse, steril	NeoLab Migge Laborbedarf
Nitrocellulose-Membran	Schleicher Schuell BioScience
Objektträger 76 mm x 26 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH KG

PCR Gefäße	Brand GmbH & Co
Petrischalen 92 x 26 mm (mit Nocken)	Sarstedt AG &Co
Petrischalen klein	
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell Bioscience GmbH
Whatman GB004 und GB005	Schleicher & Schuell Bioscience GmbH
Gel Extraction Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Peqlab
GenElute HP Plasmid DNA Midiprep Kit	Sigma Aldrich
Gel Extraction Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Peqlab
GenElute HP Plasmid DNA Midiprep Kit	Sigma Aldrich
Ultrapure Plasmid DNA-Prep	Qiagen
ProteinG-Sepharose-Beads 4 Fast Flow	GE Healthcare
Nickel NTA Beads	Sigma Aldrich
FUGENE HD	Promega und Roche
µ-Slide, 8 wells	IBIDI
6 well-Platten (83.1839.300)	Sarstedt
12 well-Platte (Kat. Nr. 665180) Cellstar	Greiner Bio-one
75 cm ³ , 250 ml Zellkulturflasche Cellstar	Greiner Bio-one
25 cm ³ , 50 ml Zellkulturflasche Cellstar	Greiner Bio-one
3,5 ml Tubes (FACS)	Sarstedt
Einwegpipetten 10 ml Cellstar, gestopft	Greiner Bio-one

5.5 Puffer, Lösungen und Medien

5.5.1 Medien und Agarplatten

5.5.1.1 Bakterienmedien

LB (autoklaviert)	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	NaOH	0,3 mM

Für die Herstellung von festem Medium wurde 1,7 % Bactoagar hinzugegeben. Außerdem wurden 10 µg / ml Ampicillin zur Selektion der Bakterien zugegeben.

SOC (sterilfiltriert)	Bacto Trypton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glucose	20 mM

5.5.1.2 Hefemedien und die dazugehörigen Stammlösungen

5.5.1.2.1 Hefemedien

Vollmedium (XY) autoklaviert	Bacto Pepton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g /l
	Tryptophan	200 mg/ l
	Adensinsulfat	100 mg/l
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	Zucker (nach Autoklavierung)	20 g /l
Selektivmedium (S)	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	100 ml /l
	10x Drop-out-5	100 ml/l
	Zucker	20 g /l
	Adenin	50 mg /l

Histidin	50 mg /l
Leucin	100 mg/l
Tryptophan	100 mg/l
Uracil	50 mg /l

Für eine Selektion nach Auxotrophiemarkern wurden Selektivmedien ohne die entsprechenden Aminosäuren bzw. Basen hergestellt.

Für die Herstellung von festem Medium wurde 1,7 % Bactoagar hinzugegeben.

Im Falle des X-Gal-Farbassays wurde festes Medium ohne Leucin und Tryptophan verwendet, im Wachstumstest zusätzlich ohne Histidin und Adenin.

5.5.1.2.2 Stammlösungen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Stammlösungen steril filtriert.

10x Drop-out-5	Alanin	0,5 g/l
	Arginin	0,5 g/l
	Asparagin	0,5 g/l
	Aspartat	1,0 g/l
	Cystein	0,5 g/l
	Glutamin	0,5 g/l
	Glutamat	1,0 g/l
	Glycin	0,5 g/l
	(myo-)Inositol	0,5 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Lysin	0,5 g/l
	Methionin	0,5 g/l
	p-Aminobenzoesäure	50 mg/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Prolin	0,5 g/l
	Serin	1,0 g/l
	Threonin	1,0 g/l
Tyrosin	0,5 g/l	
Valin	1,0 g/l	
20 % Glukose (autoklaviert)	Glukose-Monohydrat	20 g /l
100x Adenin	Adenin	5 g/l

100x Histidin	Histidin	5 g/l
100x Leucin	Leucin	10 g/l
100x Tryptophan	Tryptophan	10 g/l
10x YNB	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
	Ammoniumsulfat	50g/l

5.5.1.3 Zellkulturmedien und Stammlösungen

5.5.1.3.1 Zellkulturmedien

Transfektionsmedium		Pan Biotech
Vollmedium		Pan Biotech
	10 % FCS	Pan Biotech
	5 % Penicillin /Streptomycin	Pan Biotech

5.5.1.3.2 Stammlösungen

Kupfersulfat (steril filtriert)	0,1 M
---------------------------------	-------

5.5.1.4 Apfelagarplatten

Agar	12 g
Wasser	600 ml

Wasser und Agar 3x aufkochen oder autoklavieren. Leicht abkühlen lassen.

Saccharose in Apfelsaft	100 g / l
-------------------------	-----------

20 g Zucker in 200 ml Apfelsaft bei ca. 60°C lösen.

Nipagin in 100 % Ethanol	7,5 %
--------------------------	-------

Nipagin wurde in 10 ml Ethanol gelöst. Alle Lösungen wurden dann vereinigt und gut durchgerührt.

Anschließend wurden die Platten gossen.

5.5.1.5 Fliegenfutter

Agar	0,8 %
Zuckerrübensirup	2,2 %
Malzextrakt	8,0 %
Bierhefe	1,8 %
Sojamehl	1,0 %
Maismehl	8,0 %
Nipagin	0,3 %

Das Fliegenfutter wurde zusätzlich mit Trockenhefe bestreut.

5.5.2 Puffer und Lösungen

Dm-PBS-Puffer (10x)	NaCl	130 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	NaH ₂ PO ₄	3 mM
	pH	7,2
EasyPrep-Puffer	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	150 mg / ml
	Lysozym	2 mg / ml
	Rnase A	0,2 mg / ml
	BSA	0,1 mg / ml
Homemount	Glycerin	70 %
	Dm-PBS (10x)	5 %
	Tris pH 7,5	5 %
	Propylgallat	0,01 mg / ml
	Phenylendamin	0,5 mg / ml
	H ₂ O	20 %

Injektionspuffer (10x)	Natriumphosphatpuffer	1 mM
	pH 6,8	
	KCl	50 mM
DNA-Ladepuffer (10x)	Glycerin	50 %
	Xylencyanol	0,25 % (w / v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w / v)
	EDTA	1 mM
	Tris/HCl pH 7,8	10 mM
Paraformaldehyd (4 %)	In 1x Dm-PBS pH 7,2 gelöst	4 % (w / v)
PBS-Tween	PBS	1x
	Tween 20	0,1 %
	Natriumazid	0,01 %
Propidiumiodid	in H ₂ O gelöst	10 mg / ml
10x TE - Puffer	EDTA	10 mM
	Tris/HCl pH 7,5	100 mM
50x TAE-Puffer	Tris	2 M
	EDTA	50 mM
	Eisessig zum pH einstellen	pH=8
4x LSB	0,5 M Tris pH 6,8	240 mM
	SDS	80 mg / ml
	Glycerin	400 mg/ml
	Bromphenolblau	800 µg / ml
	β-Mercaptoethanol	20 %
Transferpuffer (für Proteine < 100 kDa)	Glycin	192 mM
	Tris-Base	25 mM
	SDS	0,04 %
	Methanol	20 %
Transferpuffer (für Proteine > 100 kDa)	Glycin	192 mM
	Tris-Base	25 mM
	SDS	0,1 %
	Methanol	10 %
10x Turbo LRB Puffer	Tris-Base	250 mM
	SDS	10 g / l
	Glycin	9,46 M

IP-Puffer	Tris pH 7,5	10 mM
	MgCl ₂	15 mM
	Na-β-Glycerophosphat pH 7,3	80 mM
	EGTA	20 mM
	Glycerin	10 %
	IGEPAL	0,2 % (nur Lyse-Puffer)
	DTT	0,5 mM
	Protease Inhibitor	1x
Ni-NTA-Präzipitation (Lyse-Puffer)	Na ₂ HPO ₄ pH 8.0	50 mM
	NaCl	0,3 M
	Protease Inhibitor	1x
	Harnstoff	6 M
Ni-NTA-Präzipitation (Wasch-Puffer)	Na ₂ HPO ₄ pH 8.0	50 mM
	NaCl	0,5 M
	Harnstoff	6 M

5.6 Oligonukleotide

Nummer	Sequenz	Verwendung
CO_004	ATATAGATCTCTCGCGCTGAAACTCGCCGGCCTGGATATTGCCATGGCCCGGGCGAG CTCGAATTC	Sequenzierung
CO_005	GGATAACAATTTACACAG	Sequenzierung
CO_166	GATGAACGAGTCTGGCTACACATC	Sequenzierung
CO_167	CCAAGCGACGCAAGAAACACTTTC	Sequenzierung
CO_373	GAGCTGGCAAATTTGTCAGTGGG	Sequenzierung
CO_380	GTTGACATTCCGCGGTAAATTACC	Sequenzierung
CO_381	CGAAAGGGTAGCAAGAATGAGTACTC	Sequenzierung
CO_389	GACTAATAAAATGTTATATCCCTGTAG	Sequenzierung
CO_401	GTAATACGACTCACTATAGGGCG	Sequenzierung
CO_481	AATTTACACAGGAAACAGC	Sequenzierung
OZH_013	TCTCTGTAGGTAGTTTGTCC	Sequenzierung
SPO_002	GATGGAGGATGGGGTGGAGTTGGAGATG	Sequenzierung
SPO_007	GTCCTGGGAAGTCGTGGTCACCC	Sequenzierung
SPO_011	GCCTCATTGTCCTTCTAAATGCTT	Sequenzierung
SPO_017	CCAATTGCGATTTTGTGTATTTT	Sequenzierung

Nummer	Sequenz	Verwendung
SPO_025	TTTTGGATCCTAGCTTTATCATAGGCTTTT	Klonierung
SPO_026	ATATTCTAGAAGTTAGTATTTTATTGGGG	Klonierung
SPO_096	TAATACGACTCACTATAGGG	PCR für RNAi
SPO_159	CCGGCATCCACGTCCATCAG	Klonierung
SPO_160	ATATGGTACCTAATACGACTCACTATAGGGCGAGGATCCATGTCCGCCTATTATCGGC GCG	Klonierung
SPO_174	ATATCCCGGGCCATTGCGCGTCCTTGCCACGATGTC	Mutagenese
SPO_175	ATATCCCGGGGCACTGCAGTGCACACTGCGTCATGTGGGCGCC	Mutagenese
SPO_240	CCAGGCACCCAAGAACTAGAGCCCGCAAAGCGCATGCGCACC	Mutagenese
SPO_241	GCAAAGCGCATGCGCACCAGTGAGCCAGTTCGTCCGCCACTTC	Mutagenese

5.7 Plasmide

Plasmid Nr.	Name	Verwendungszweck	Herkunft
pFSR-048	3xCherry-MT	FACS	Michaela Bauer
pFSR-081	rca1-E_(-5664)->Rca1-pCasper	Injektion	Adelheid Weißgerber
pFSR-092	pBSII Bluescript KS+	FACS	Alting-Mees und Short, 1989
pFSR-140	HA-NLS-3xCherry	FACS	Katharina Kawall
pFSR-201	rca1_E(-5664)->HA-Rca1 -pCasper	Injektion	Adelheid Weißgerber
pFSR-202	rca1_E(-5664)->HA-Rca1-d-Fbox-pCasper	Injektion	Adelheid Weißgerber
pFSR-207	HA-NLS-CycB-N285-2xGFP	FACS und <i>live cell imaging</i>	Adelheid Weißgerber
pFSR-213	Matchmaker pGBKT7-Gal4-DNA-BD Cloning Vector	Yeast-2-Hybrid	Clontech
pFSR-214	Matchmaker pGADT7-Gal4-AD Cloning Vector	Yeast-2-Hybrid	Clontech
pFSR-215	Matchmaker pGBKT7-53 Control Vector	Yeast-2-Hybrid	Clontech
pFSR-216	Matchmaker pGBKT7-Lam Control Vector	Yeast-2-Hybrid	Clontech
pFSR-244	E2F1-3-230-3X-Cherry	<i>live cell imaging</i>	Adelheid Weißgerber
pFSR-251	4x-Flag-Rca1 MP	CO-IP, FACS und <i>live cell imaging</i>	Adelheid Weißgerber
pFSR-255	T7-Rca1-T7	RNAi Rca1, FACS	Eigene Herstellung
pFSR-269	GFP-dap-MP (mit Linker)	FACS	Michaela Bauer
pFSR-299	T7-dap-T7-MP	FACS	Michaela Bauer
pFSR-313	13xFLAG-Rca1 in pGADT7	Yeast-2-Hybrid	Christoph Morgenthaler
pFSR-315	HA-SkpA in pGADT7	Yeast-2-Hybrid	Christoph Morgenthaler
pFSR-321	HA-SkpA in pGBKT7	Yeast-2-Hybrid	Christoph Morgenthaler
pFSR-342	13xFLAG-Rca1-dF-box-pGADT7	Yeast-2-Hybrid	Eigene Herstellung
pFSR-343	13xFLAG-Rca1_C351S-pGADT7	Yeast-2-Hybrid	Eigene Herstellung
pFSR-344	13xFLAG-Rca1-dKEN(KAA)-box-pGADT7	Yeast-2-Hybrid	Eigene Herstellung
pFSR-345	pADH1-GAL4-AD_13xFLAG_L160D_Q164P_P165G in pGADT7	Yeast-2-Hybrid	Eigene Herstellung
pFSR-346	pADH1-Gal4-AD_13xFLAG-	Yeast-2-Hybrid	Eigene Herstellung

Plasmid Nr.	Name	Verwendungszweck	Herkunft
	Rca1_Q164P_P165G_I170T-in pGADT7		
pFSR-347	pADH1-Gal4-AD_13xFLAG-Rca1_L160D_Q164P_P165G_I170T-in pGADT7	Yeast-2-Hybrid	Eigene Herstellung
pFSR-354	10xHA-Rca1dF-Box MP	FACS	Michaela Bauer
pFSR-361	10xHA-Rca1 MP	FACS	Michaela Bauer
pFSR-369	HA-NLS-Cdt1-1-101-2XGFP	<i>live cell imaging</i>	Mikhail Porfenenko
pFSR-372	4xFLAG-Rca1-dF-box-MP	CO-IP ,FACS und <i>live cell imaging</i>	Eigene Herstellung
pFSR-373	4xFLAG-Rca1C351S-MP	CO-IP, FACS	Eigene Herstellung
pFSR-374	4xFLAG-Rca1-dKEN-box(KAA)-MP	CO-IP, FACS	Eigene Herstellung
pFSR-392	4xFLAG-Fzr	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-393	E2F-1-224-GFP	<i>live cell imaging</i>	Philipp Denninger
pFSR-394	MtPro-4xFLAG-Rca1_L160D_Q164P_P165G_I170T	CO-IP und FACS	Eigene Herstellung
pFSR-405	MtPro-4xFLAG-Rca1_L160D_Q164P_P165G	CO-IP und FACS	Eigene Herstellung
pFSR-419	HA-CycE	FACS	Michaela Bauer
pFSR-437	4xFLAG-Rca1_d1-203(203-411)	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-481	4XFLAG-Rca1-dFbox-C351S	FACS	Adelheid Weißgerber
pFSR-499	4xFLAG-Rca1-dKEN-box(AEN)-MP	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-505	4xFLAG-Ubiquitin-MP	Nickel NTA Präzitation	Eigene Herstellung
pFSR-512	actin-3Xcherry	FACS	Frank Sprenger
pFSR-527	Dap-451-507_S205A-S214A in pUC57	Klonierung	Genscript
pFSR-533	4XFLAG-Rca1[2]-A344T	FACS	Matthias Kies
pFSR-540	4xFLAG-Rca1[w]-M182T	FACS	Matthias Kies
pFSR-574	Actin_P->3X-Cherry-MT->4XFLAG-Rca1	<i>live cell imaging</i>	Adelheid Weißgerber
pFSR-575	10xHA-Rca1dKEN-box_(KAA)-MP	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-576	10xHA-Rca1dKEN-box_(AEN)-MP	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-577	10xHA-Rca1_M182T_(C1474)-MP	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-578	10xHA-Rca1_C351S-MP	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-583	GFP(G)-dap-MP	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-584	GFP(G)-Dap-Del-38-44-RAR_Del-103-105-G-MP	FACS	Eigene Herstellung

Plasmid Nr.	Name	Verwendungszweck	Herkunft
pFSR-585	GFP(G)-Dap-Del-38-44-RAR_Del-103-105-G-S205A-S214A-MP	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-586	GFP(G)-Dap-Del-38-44-RAR_Del-103-105-G-S205E-S214E-MP	FACS	Eigene Herstellung
pFSR-595	Actin->3X-Cherry_MT->4xFLAG-Rca1[w]-M182T	<i>live cell imaging</i>	Adelheid Weißgerber
pFSR-605	4xFLAG-Rca1[w]-M182T_A344T-MP	FACS	Adelheid Weißgerber
pFSR-607	10XHA-Rca1-A344T-MP	FACS	Adelheid Weißgerber
pFSR-637	actin-HA-NLS-3Xcherry-MT-HA-NLS-GFP(G)-Dap-Del-38-44-RAR_Del-103-105-G	FACS	Frank Sprenger
pFSR-642	6xHis-4XFLAG-Dap-Del-38-44-RAR_Del-103-105-G	Nickel NTA Präzitation	Eigene Herstellung
pFSR-646	6xHis -4xFLAG-Geminin-1-101	Nickel NTA Präzitation	Frank Sprenger
pFSR-647	6xHis -4xFLAG-dap	Nickel NTA Präzitation	Frank Sprenger
pFSR-648	6xHis -4xFLAG-Rca1_M182T-A344T-MP	Nickel NTA Präzitation	Frank Sprenger
pHT-013	HA-SkpA in RmHARW2	CO-IP	Heidi Thelen
pOT-024	$\Delta 2$ -3 Transposase	Injektion	Laski <i>et al.</i> , 1986

5.8 Hefestämme

Bezeichnung	Genotyp	Verwendungszweck	Herkunft
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1 TATA-lacZ</i>	Yeast-2-Hybrid	James <i>et al.</i> 1996; A. Holtz, unpublished,
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met$-$, URA3::GAL1UAS-Gal1 TATA-LacZ, MEL1</i>	Yeast-2-Hybrid	Harper et al, 1993

5.9 Fliegenstämme

Es wurde als Wildtyp Kontrolle der Stamm w^{1118} verwendet.

Stamm	Genotyp	Herkunft
S-0078	dap ⁶ / CyO(wg-lacZ)	Christian Lehner, persönliche Kommunikation
S-0143	w; rca1 ² / CyO(wg-lacZ); MKRS / TM6B	Dong et.al., 1997
S-0364	IF / CyO(wg-lacZ); MKRS / TM6B	Thomas Klein
S-0413	rca1 ^{C1474} / CyO (x-lacZ)	Chen <i>et al.</i> , 2008
S-0432	IF / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→rca1 }	Eigene Herstellung
S-0460	IF / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→HA-Rca1ΔF-box}	Eigene Herstellung
S-0465	rca1 ² / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→HA-rca1 }	Eigene Herstellung
S-0465	Rca1→HA-Rca1	Eigene Herstellung
S-0466	Rca1→HA-Rca1	Eigene Herstellung
S-0469	rca1 ² / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→HA-Rca1ΔF-box}	Eigene Herstellung
S-0489	rca1 ^{C1474} / CyO(wg-lacZ); MKRS / prd-Gal4	Matthias Kies
S-0500	rca1 ² / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→rca1 }	Eigene Herstellung
S-0597	rca1 ² dap ⁶ / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→rca1 }	Eigene Herstellung
S-0601	rca1 ^{C1474} dap ⁶ / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→rca1 }	Eigene Herstellung
S-0603	dap ⁶ / CyO(wg-lacZ); MKRS / TM6B	Eigene Herstellung
S-0604	dap ⁶ / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→rca1 }	Eigene Herstellung
S-0605	rca1 ² dap ⁶ / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→HA-Rca1ΔF-box}	Eigene Herstellung
S-0607	rca1 ^{C1474} dap ⁶ / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→HA-Rca1ΔF-box}	Eigene Herstellung
S-0609	dap ⁶ / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→HA-Rca1ΔF-box}	Eigene Herstellung
S-0610	rca1 ^{C1474} / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→rca1 }	Eigene Herstellung
S-0611	rca1 ^{C1474} / CyO(wg-lacZ); P{w+, rca1→HA-Rca1ΔF-box}	Eigene Herstellung

5.10 Geräte und Software

5.10.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Apparatur für Agarosegele, Modell HE33	Hoefer
Brutschränke	Memmert
Durchflusszytometer	Partec
Elektroporationsapparatur Easyject Prima	Equibio
Heizblock	Peqlab
Magnetrührer	Heidolph
Photometer	Eppendorf
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschman Laborgeräte
Reagenzglasroller TC-7	New Brunswick Scientific
RED Imaging System	Biozym
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Biorad
Tischzentrifuge	Eppendorf
UV-Tisch TF-20 M	Vilbert Lourmat
Waage Kern EW6200-2NM	Wern & Sohn GmbH
Waage Mettler AE50	Mettler Toledo Intl. Inc.
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore GmbH
PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter	Peqlab
Odyssey Infrared Imaging System	Licor
Sterilbank	Ceag Schirp Reinraumtechnik
Zentrifuge	Hettich
Pipettierhilfe Fast Pipette V-2	Labnet
Vakuum Gaspumpe	VWR
Zeiss IM	Zeiss Mikroskop
Vortexer Reax Top	Heidolph
Heizsystem HT 200	IBIDI

5.10.2 Software

Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems
AxioVision 4.8	Zeiss
Microsoft Office 2007 und 2010	Microsoft Corp.
ImageJ	NIH
FilemakerPro 10	Filemaker Inc.
Vector NTI Advance 11	Invitrogen
Canvas 11	Deneba Systems
FCS Express 4	De Novo Software
Endnote X.4.0.2	Thomson Reuters
Bulk Rename Utility	TGRMN Software
FloMax©	Partec
Jalview 2.6.1	The Barton Group, Waterhouse <i>et al.</i> , 2009

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion erlaubt eine Vermehrung von DNA-Fragmenten *in vitro* (Mullis *et al.*, 1986). Der von 2 Primern flankierte Bereich wird dabei vervielfältigt. Die Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide, die komplementär zu den Enden des Zielfragments sind.

Für Polymerasekettenreaktionen wurde die KOD-Polymerase von Novagene (Merck) verwendet. Es wurde folgender PCR Ansatz verwendet:

DNA-Template	100-200 ng
10x KOD-Puffer	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	2 µl
dNTPs-Mix (2 mM)	2 µl
Forward Primer (10 µM)	5 µl
Reverse Primer (10 µM)	5 µl
KOD-Polymerase	1 µl
H ₂ O I	ad 50 µl

Das PCR-Programm setzte sich folgendermaßen zusammen.

Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	} 29 Zyklen
Primer-Annealing	55 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	1 min / 1kb Fragmentlänge	
Rest-Elongation	72 °C	10 min	

6.1.2 Restriktionshydrolyse von DNA

Restriktionsendonukleasen ermöglichen die spezifische Spaltung von DNA an gezielten Positionen. Die Verwendung von Restriktionsenzymen ermöglicht beispielsweise die Überprüfung einer Plasmid-DNA in einer analytischen Restriktionshydrolyse. Im präoperativen Restriktionsverdau werden die erzeugten gleichen oder kompatiblen Enden der Vektor- und Insertfragmente verwendet, um neue Plasmide zu klonieren.

Für analytische Restriktionshydrolysen wurde folgender Ansatz verwendet:

DNA	400 -600 ng
10x Restriktionspuffer	1,5 µl
Enzym(e)	4-6U
H ₂ O	ad 15 µl

Für präperative Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz verwendet:

DNA	5 µg
10x Restriktionspuffer	2 µl
Enzym(e)	20 U
H ₂ O	ad 30 µl

Restriktionshydrolysen wurden mit Enzymen von NEB durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen, wie Puffer, Temperatur und Inkubationszeit, wurden nach Empfehlung des Herstellers gewählt.

6.1.3 Dephosphorylierung

Nach Restriktionshydrolysen wurde die 5' Phosphatgruppe der Desoxyribose an den Vektorenden in Fällen von kompatiblen Enden oder Linearisierung der Vektoren entfernt, um eine Religation zu verhindern. Dabei wurde 1/10 Reaktionspuffer und 1 µl der Shrimp Alkaline Dephosphatase von NEB zum Reaktionsmix hinzugeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert.

6.1.4 Erstellung von glatten DNA-Enden

Für Ligationen mit glatten DNA-Enden wurden nach Restriktionshydrolysen die überhängenden Vektorenden mit der T4 DNA-Polymerase von NEB aufgefüllt oder entfernt. Die T4 DNA-Polymerase katalysiert dabei die DNA-Synthese in 5'-3' Richtung von einzelsträngiger DNA und hat eine 3' -5' Exonuklease Aktivität, wobei die 5'-3' Exonukleaseaktivität fehlt.

Nach dem Restriktionsverdau wurden 1/10 Reaktionspuffer zugegeben und 1 µl T4 DNA Polymerase.

6.1.5 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dabei wandert die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zur Anode. Kleinere DNA-Moleküle bewegen sich dabei im Agarosegel schneller als größere (Ausubel *et al.*, 2005).

Es wurden 1%ige Agarosegele mit 1x TAE-Puffer und einer Konzentration von 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Als Ladepuffer wurde ein 10x konzentrierter Puffer verwendet. Als DNA-

Größenstandard wurde der Gene Ruler DNA Ladder Mix verwendet. Der Gellauf erfolgte für 1 h bei 80 V.

Die DNA-Banden konnten mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden und wurden mit dem RED Imaging System dokumentiert.

6.1.6 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von PCR-Ansätzen bzw. die Elution von aus dem Agarosegel ausgeschnittenen DNA-Fragmenten erfolgte mit dem PCR Purification Kit bzw. mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen. Dabei wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µl nukleasefreiem Wasser.

6.1.7 Ligation

Zunächst wurde die DNA-Menge von Vektor- und Insertfragment auf einem 1%igen Agarosegel mithilfe des DNA Standards Gene Ruler DNA Ladder Mix der Firma Fermentas grob abgeschätzt.

Die Ligation von Vektor- und Insertfragmenten der DNA aus der Restriktionshydrolyse erfolgte dann in einem molaren Verhältnis von 1:4 in einem 20 µl Ansatz. Es wurde dabei die T4-DNA Ligase von NEB verwendet. Die Ligation erfolgte für mindestens 2 h bei Raumtemperatur.

6.1.8 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden *E. coli* DH5α in LB-Medium bei 37°C angezogen. Die Zellen wurden dann in 2x750 ml TB-Medium überimpft und bei 25°C über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 schüttelnd kultiviert. Nach dem Abkühlen der Kulturen auf Eis wurden die Zellen in sterilen GSA-Bechern bei 3000 rpm für 15 min und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden im Anschluss zweimal mit 150 ml kaltem Wasser gewaschen und, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 70 ml 10% Glycerin resuspendiert, in 2 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 4000 rpm für 10-15 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden zum Schluss in 2ml 10% Glycerin resuspendiert und in 100 µl Aliquots auf Trockeneis eingefroren. Die aliquotierten elektrokompenten Zellen wurden bei -70°C gelagert.

6.1.9 Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompenter Zellen des *E. coli* Bakterien-Stammes DH5 α von 100 μ l wurde zunächst auf Eis aufgetaut und dann mit 100 μ l H₂O verdünnt. 100 μ l der verdünnten Zellen wurden in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Für eine Retransformation von Plasmid-DNA wurden 40-50 ng der Plasmid-DNA zu den Zellen pipettiert, für die Transformation eines Ligationsansatzes wurden 1-2 μ l des Ligationsansatzes eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm, einem Widerstand von 200 Ω , einer Kapazität von 25 μ F und einer Kondensatorspannung von 2,5 kV.

Die Zellen wurden im Anschluss in 1 ml SOC-Medium überführt. Zur Selektion auf transformierte Bakterien wurden 100 μ l der Zellsuspension auf Selektivplatten mit entsprechender Antibiotikum-Resistenz ausplattiert. Je nachdem welche Resistenz auf dem transformierten Plasmid enthalten war, wurde bei Ampicillin direkt auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert, bei Kanamycin nach 3 h Inkubation bei 37°C auf LB_{Kan}-Platten.

6.1.10 Plasmidschnellisolierung

Bei der Plasmidschnellisolierung oder der Kochlysate-Methode wurden Plasmide mit hoher Kopienzahl aus *E. coli* isoliert (Berghammer and Auer, 1993).

Die bei der Transformation der Ligation entstandenen Kolonien wurden in 3 ml Flüssigmedium angezogen. 2 ml dieser Kultur wurden bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 40 μ l EasyPrep-Puffer gelöst. Das gelöste Pellet wurde dann 1 min bei 100 °C auf dem Heizblock erhitzt und danach 1 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zentrifugation wurden 5 μ l des Überstandes mit den isolierten Plasmiden durch Restriktionshydrolyse überprüft.

6.1.11 Plasmid Midi-Präparation

Die Plasmidisolierung erfolgte durch das Midikit von GenElute HP Plasmid DNA Midiprep Kit von Sigma nach Angaben des Herstellers oder durch die Verwendung des Minikits peqGOLD Plasmid Miniprep Kit. Das Protokoll des Herstellers wurde in abgewandelter Form verwendet.

Eine über Nacht Kultur von 50 ml wurde abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,6 ml Lösung I mit RNase A resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte über die Zugabe von 1,6 ml Lösung II. Die Neutralisation wurde durch die Zugabe von 1,6 ml Kaliumacetat pH 5,2 bewerkstelligt. Die Lösung wurde bei 4500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4 ml Isopropanol gefällt und erneut zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde in 800 μ l TE gelöst und 600 μ l Lösung III zugeben. Diese Lösung wurde in 2

Schritten auf die PerfectBind DNA Column aufgetragen. Im Anschluss wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen und trocken zentrifugiert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in TE-Puffer.

6.1.12 Ortsspezifische Mutagenese-PCR

Mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese-PCR können gezielt Mutationen in eine DNA Sequenz eingebracht werden. Als Primer dienten Oligonukleotide von ca. 50 bp Länge, die in der Mitte die zu mutierende Sequenz beinhalten, flankiert von der umgebenden Sequenz. Bei diesem Verfahren wurde ausgehend von den Primern das gesamte Plasmid amplifiziert. Während der PCR fand eine lineare Vermehrung der Plasmide statt.

Als Template wurde das Plasmid verwendet, in das die Mutation(en) eingefügt werden sollen.

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet.

DNA-Template	100-200 ng
10x KOD-Puffer	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	2 µl
dNTPs-Mix (2 mM)	5 µl
Forward Primer (10 µM)	5 µl
Reverse Primer (10 µM)	5 µl
KOD-Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Das PCR-Programm setzte sich folgendermaßen zusammen.

Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primer-Annealing	50 °C	30 sek	15 Zyklen
Elongation	72 °C	1 min / 1kb Fragmentlänge	
Rest-Elongation	72 °C	10 min	

Im PCR-Produkt liegt nach Ablauf der Reaktion eine Mischung des mutierten DNA-Fragments und des Templates vor. Da es sich bei der Matrize um eine Plasmid-DNA aus dem *E.coli*-Stamm DH5α handelt, die an 5'-GATC-3' methyliert ist, kann diese durch Restriktionshydrolyse mit *DpnI* verdaut werden. *DpnI* spaltet DNA an methylierten GATC-Sequenzen. Die mutierte, durch PCR entstandene DNA bleibt erhalten.

Für den *DpnI*-Verdau wurden 1/10 NEB Puffer 4 und 1 µl *DpnI* zu dem PCR-Ansatz gegeben und 2 h bei 37°C hydrolysiert. Nach der Entsalzung des verdauten PCR-Ansatzes durch das PCR-Purification Kit von Qiagen wurden 7µl des Ansatzes wie unter 6.1.9 transformiert.

6.1.13 Bestimmung der Konzentration einer DNA-Lösung mittels Photometer

Die Konzentration doppelsträngiger DNA wurde mithilfe eines Photometers mit einer 1:40 Verdünnung gemessen. Es wurde dabei die Extinktion bei 260 nm gemessen. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm gab dabei Auskunft über die Reinheit der DNA.

6.1.14 Bestimmung der Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Für die DNA-Konzentrationsabschätzung mithilfe der Agarosegelelektrophorese wurde 500 ng Plasmid-DNA in 30 µl linearisiert. Dafür wurde ein Restriktionsenzym gewählt, das genau einmal innerhalb des Plasmids schneidet. Die Restriktionshydrolyse erfolgte für mindestens 1 h bei 37°C. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl 10x Ladepuffer ohne Bromphenolblau abgestoppt. Es wurde dann 1/10 des Restriktionsverdau auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden mithilfe des RED Imaging System von Biozym mit UV-Licht bestrahlt, dokumentiert und elektronisch gespeichert. Die Bandenintensitäten wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert. Mithilfe des Gene Ruler DNA Ladder Mix der Firma Fermentas wurden die Bandenintensitäten in DNA-Konzentrationen umgerechnet.

Für die Quantifizierung der doppelsträngigen RNA wurden 1/10 des Transkriptionsansatzes (siehe Abschnitt 6.1.15) und die äquivalente Menge PCR-Produkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die Banden wurden, wie oben beschrieben, quantifiziert und die Konzentration der Ausgangs-DNA-Menge von der Konzentration des Transkriptionsprodukts subtrahiert.

6.1.15 *in vitro* Transkription für RNAi

Für die Herstellung von doppelsträngiger RNA für RNA-Interferenz wurden Plasmide erstellt, die die DNA-Sequenz, die in RNA transkribiert werden sollte, enthielt. Diese DNA-Sequenz wurde an jedem Ende flankiert von einer T7-Promoter-Sequenz, der Bindestelle für die DNA-abhängige RNA-Polymerase. Auf diesem Wege konnte *in vitro* jeweils eine einzelsträngige RNA-Sequenz in sense- und antisense-Richtung der DNA-Sequenz hergestellt werden. Um die Effektivität dieser Reaktion zu erhöhen, wurde die Region der DNA-Sequenz mit T7-Promotern an beiden Enden mit Primern, die in der Promoterregion binden, mithilfe von PCR mit der *taq*-Polymerase der Firma Qiagen amplifiziert. Es wurde dann eine T7-RNA-Polymerase von Bionline verwendet.

Der Transkriptionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

PCR-Produkt	35,5 µl
5x Ultimate Puffer	10 µl
NTP-Mix (100 m M)	1,6 µl
RNase Inhibitor	1,5 µl
RNA-Polymerase	1,4 µl (30 U)
H ₂ O	ad 50 µl

Die Transkription erfolgte bei 42°C für 4-8 h.

Die RNA wurde dann, wie unter Abschnitt 6.1.14 beschrieben, quantifiziert.

6.1.16 Sequenzierung

Zur Verifizierung von klonierten Plasmiden wurde Plasmid-DNA zur Sequenzierung an SeqLab (Göttingen) geschickt.

DNA	600 -700 ng
Primer (10µM)	2 µl
H ₂ O	ad 7 µl

Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Align X von Vector NTI 11, Invitrogen.

6.2 Methoden in der Zellkultur

6.2.1 Kultivierung von *Drosophila* Schneiderzellen

In den Zellkultur-Experimenten wurden adhäsive S2R⁺-Zellen verwendet (Yanagawa *et al.*, 1998). Die Zellen wurden bei 27°C in 200 ml Gewebekulturflaschen gehalten. Das Zellkulturmedium wurde von Promocell und Pan Biotech bezogen. Dem Medium wurden 10 % fötales Rinderserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Mix zugesetzt, im Falle des Mediums von Promocell musste zusätzlich 1,8 mg/l L-Glutamin zugesetzt werden.

Die Zellkulturarbeit wurde in einer Sterilbank durchgeführt.

6.2.2 Splitten von Zellen

Die Zellen wurden in der Regel zweimal pro Woche in einem Verhältnis 1:4 gesplittet. Dafür wurde das Medium aus den Gewebekulturflaschen mithilfe einer Pasteurpipette entfernt. Die adhäsiven Zellen wurden mit 5 ml sterilem 1xPBS in der Flasche gewaschen. Nach dem Absaugen wurden 4 ml Trypsin zugegeben, um die Zellen von der Gewebekulturflasche abzulösen. Nach einer Inkubations-

zeit von 2 min wurden die noch nicht gelösten Zellen durch auf- und abpipettieren gelöst und die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 2 min bei 1000 rpm in der Zentrifuge pelletiert. Nach dem Entfernen des Trypsinüberstandes wurde das Zellpellet in 8 ml Zellkulturmedium gelöst.

Zum Weiterführen der Zellen wurden 2 ml in eine neue Gewebekulturflasche mit 13 ml Zellkulturmedium pipettiert.

6.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Marienfeld) bestimmt. Die Zählkammer hatte eine Gesamtfläche von 16 mm², eine Tiefe von 0,2 mm und einen Rauminhalt von 3,2 µl. Die Zählkammer besteht aus 4x4 großen Quadraten, die wiederum jeweils in 4 kleine Quadrate unterteilt sind, also in insgesamt 256 kleine Quadrate. In der Regel wurden 4 kleine Quadrate von 8 großen Quadraten ausgezählt. Es wurde der Durchschnitt der Zellen pro kleinem Quadrat berechnet und mit dem Verdünnungsfaktor 0,32 multipliziert. Das Ergebnis ergibt die Zellzahl x 10⁶ pro ml Zellsuspension.

Für das Zählen der Zellsuspension wurden 20 µl Zellen in Zellkulturmedium aus Abschnitt 6.2.2. mit 80 µl Trypan-Blau gemischt und davon 20 µl in die Zählkammer pipettiert. Trypan-Blau wird von lebenden Zellen ausgeschleusst und diese erscheinen dann in weißer Färbung in der blauen Lösung.

6.2.4 Aussäen und Transfektion von Schneiderzellen

Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 6.2.2. und 6.2.3. beschrieben, trypsinisiert, in Zellkulturmedium gelöst und gezählt. Für die Zellkulturexperimente wurden die zwischen 600.000 und 750.000 Schneiderzellen in 6-well Platten und 125.000 Zellen in 12 well Platten ausgesät.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen transfiziert. Für die Transfektion wurden 150 µl Transfektionsmedium (Schneiderzellmedium ohne FCS und Penicillin/Streptomycin-Mix) in Reaktionsgefäße vorgelegt. Es wurden dann jeweils die zu transfizierenden Plasmide zum Transfektionsmedium gegeben. Es wurden Plasmide mit konstitutivem actin-Promoter und/oder mit CuSO₄ induzierbarem Metallothionein-Promoter verwendet.

Für die 6-well-Reaktionskammern wurden 750-800 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Bei zu hoher DNA Konzentration und demnach zu kleinen Pipettierolumina wurden die Plasmide mit Wasser verdünnt. Bei mehreren transfizierten Plasmiden in einer Messreihe wurden unterschiedliche DNA-Mengen mit

einem Leervektor (pBSII Bluescript KS+) aufgefüllt, um innerhalb einer Messreihe gleiche DNA-Mengen für die Transfektion zu verwenden.

Als Transfektionsreagenz wurde FUGENE HD von Roche oder Promega verwendet. Pro Reaktionsgefäß wurden 2-3 µl FUGENE zugegeben. Direkt nach der Zugabe des Transfektionsreagenz wurde kurz gevortext. Nach 15 min wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Frühestens nach 3 h wurde CuSO₄ zugeben, sodass eine Konzentration von 2 mM CuSO₄ im Medium eingestellt wurde. Die Zellen wurden in der Regel 2,5 bis 3 Tage nach der Induktion weiterverarbeitet.

6.2.5 Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wurde ein spezielles Einfriermedium hergestellt, dass sich aus 4,5 ml gebrauchtem Medium aus einer Zellkulturflasche, 4,5 ml frischem Zellkulturmedium und 1 ml sterilem DMSO zusammengesetzt hat.

Die einzufrierenden Zellen wurden, wie unter Abschnitt 6.2.2. beschrieben, trypsinisiert und in 4 ml Zellkulturmedium gelöst. Anschließend wurde die Zellzahl, wie unter Abschnitt 6.2.3. beschrieben, bestimmt.

Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und im Einfriermedium gelöst, sodass eine Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen / ml eingestellt wurde.

1 ml der Zellen wurde dann in vorgekühlte Cryoröhrchen gegeben. Die Zellen wurden dann zuerst auf -70°C und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.

6.3 Mikroskopie

Es wurden zum einen die Lebendzellbeobachtung (*live cell imaging*) von transient transfizierten Zellen unter einem Mikroskop beobachtet. Das Wachstum, die Zellteilungen und der Abbau von Fluoreszenz markierten Proteinen konnten somit im Zeitraffer analysiert werden. Es wurden Fusionsproteine verwendet, bei denen die zu beobachtenden Zielproteine mit Fluoreszenz-Epitopen wie GFP oder Cherry versehen wurden.

Außerdem wurden fixierte Embryonen mikroskopiert, bei denen die DNA durch Propidiumiodid angefärbt wurde und außerdem eine Antikörperfärbung gemacht wurde, die mithilfe von sekundären Antikörpern bei 488 nm angeregt wurden.

6.3.1 Mikroskopsystem

Das verwendete Mikroskopsystem für das *live cell imaging* war der Cell Observer©SD der Firma Carl Zeiss. Es handelt sich dabei um ein konfokales und inverses Mikroskopsystem, das mit einer Spinning Disc CSU-X1 von Yokogawa bestückt wurde. Es wurde das Modell Cell Observer Z.1 verwendet. Außerdem wurde die Heizkammer HT 200 von IBIDI verwendet, die die optimalen Bedingungen für die Beobachtung von Zellen über einen längeren Zeitraum gewährleistete.

In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht der verwendeten Laser gezeigt:

Tabelle 6.1: Übersicht über die verwendeten Laser

488 nm	100 mW	OPSL Laser
561 nm	40 mW	Dioden Laser

Die Mikroskopie-Aufnahmen der Zellen wurden mit Kameras des Typs AxioCam MRm Rev3 getätigt, die eine Auflösung von 1388 Pixel x 1040 Pixel betrug, bei einer Pixelgröße von 6,45 μm x 6,45 μm . Beim *live cell imaging* wurde vorwiegend das 20x Plan-Apochromat Objektiv verwendet. Für die Aufnahmen der Embryonen wurde das 20x Plan-Apochromat Objektiv und das 40x Fluar Objektiv verwendet.

6.3.2 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden in einem μ -slide von IBIDI ausgesät. Dieser spezielle Objektträger enthält 8 Kammern, in die Zellen ausgesät werden können. Es wurden 80.000 Zellen vorgelegt. Zur Transfektion wurde eine DNA-Menge von 150 ng DNA mit 1 μl FUGENE HD transfiziert. Wie bereits vorher (Abschnitt 6.2.4. beschrieben, wurden die Zellen mit CuSO_4 indiziert.

Vor dem Beginn der *live cell imaging* Aufnahmen wurde das Medium (mit CuSO_4) erneuert.

6.3.3 Bedingungen am Mikroskop

Das Mikroskop und die Inkubationskammer wurden vor dem *live cell imaging* angeschaltet und vorgewärmt. Während der Messung wurde eine Temperatur von 27°C verwendet.

2 h nach dem Beginn der *live cell imaging* Aufnahmen wurde die Fokussierung der Zellen überprüft und gegebenenfalls nachfokussiert.

Die Aufnahmen erfolgten über 48 h und es wurde alle 10 min eine Aufnahme gemacht. Es wurden in jeder Kammer der 8-well Platte 4 Positionen aufgenommen.

6.3.4 Prozessierung der Daten

Die Daten wurden mit der Software ImageJ prozessiert. Ein exemplarisches Makro, das für die Prozessierung der Daten verwendet wurde, befindet sich im Anhang im Abschnitt 9.3.

6.4 Proteinanalytische Methoden

6.4.1 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die Immunpräzipitation eignet sich, um mithilfe von Antikörpern, spezifisch Antigene zu präzipitieren. Ein bestimmtes Protein wird bei der Analyse z.B. von Zelllysaten mitsamt seiner Interaktionspartner co-präzipitiert. Diese Methode dient dadurch zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen, weil auch ganze Proteinkomplexe präzipitiert werden können. Der Nachweis funktioniert gewöhnlich über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Western-Blot und immunologischen Nachweis der Interaktionspartner.

Für die Co-Immunpräzipitation wurden 2 6-wells verwendet. Die Zellen wurden mit 1xPBS/0,5 mM EDTA im 6-well gewaschen und mit 700 µl Trypsin versetzt und abgelöst. Anschließend wurden die Zellen 4 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml 1xPBS resuspendiert und 1/10 entnommen (WCL). Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert. Die Input-Zellen wurden in 20 µl 4xLSB gelöst und bei 100°C 10 min aufgeköcht.

Die restlichen Zellen wurden in 200 µl Lyse-Puffer aufgenommen und durch auf- und abpipettieren gelöst. Die Zellen wurden dann für 1,5 - 2 h auf Eis inkubiert und alle 20-30 min wurde das Pipettieren wiederholt. Währenddessen wurden die Protein G Beads vorbereitet. Es wurden 20 µl Beads verwendet, die zunächst 30 min in 5% BSA in Verdünnungspuffer geblockt und danach zweimal mit 500 µl Verdünnungspuffer gewaschen wurden. Die Beads wurden jeweils 4 min bei 4000 rpm zentrifugiert.

Zu den lysierten Zellen wurden 500 µl IP-Puffer zugegeben und bei 13000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann zu den gewaschenen Beads gegeben und 1,5 µl FLAG-M2 Antikörper zugegeben. Es wurde 2 h rotierend bei 4°C inkubiert.

Die Beads wurden zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Außerdem wurden sie drei Mal mit 500 µl Verdünnungspuffer gewaschen. Zu den Beads wurde zum Schluss 40 µl 4xLSB gegeben und 10 min aufgeköcht.

Es wurden 10 µl Input und 10 µl CO-IP durch SDS-Gel, Western Blot und immunochemische Verfahren analysiert.

6.4.2 Präzipitation mithilfe von Nickel-NTA-Agarose

Mithilfe der Nickel-NTA-Präzipitation sollte ein *in vivo*-Assay für Dacapo erstellt werden. Dafür wurden 3 transfizierte 6-wells eingesetzt. Die Zellen wurden 4 h vor dem Ernten mit MG132 inkubiert, um das 26S-Proteasom zu inhibieren.

Zu Beginn wurden die Zellen mit 1xPBS/0,5 mM EDTA im 6-well gewaschen und mit 600 µl Trypsin versetzt und abgelöst. Die Zellen wurden dann 4 min bei 4000 rpm in der Zentrifuge pelletiert und in 1 ml 1xPBS resuspendiert. Es wurde 1/20 entnommen (WCL). Die Zellen wurden danach erneut abzentrifugiert. Die WCL-Fraktionen wurden in 20 µl 4xLSB gelöst und bei 100°C 10 min aufgeköcht. Es wurden später 8 µl auf einem SDS-Gel analysiert.

Die restlichen Zellen wurden in 1 ml Nickel-NTA-Lysepuffer resuspendiert und anschließend 3x 20 sec auf Eis sonifiziert. Die Suspension wurde dann bei 14000 rpm auf 4°C zentrifugiert.

Währenddessen wurden die Nickel-NTA-Beads vorbereitet. Es wurde pro Ansatz 50 µl Beads entnommen. Zuerst wurden die Beads mit 1 ml Wasser gewaschen, im Anschluss mit 1 ml Nickel-NTA-Waschpuffer.

Die lysierten Zellen wurden auf die Nickel-NTA-Beads pipettiert für mindestens 2 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads bei 4000 rpm abzentrifugiert und 2x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen.

Die Beads wurden dann mit 40 µl 4xLSB versetzt und 10 min bei 100°C aufgeköcht. Es wurden 20 µl auf einem SDS-Gel analysiert.

6.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) , Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden denaturierte Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt (Ausubel *et al.*, 2005). SDS (*sodium dodecylsulfate*) ist ein anionisches Detergenz, das sich an denaturierte Proteine anlagert. Durch die stark negative Ladung wandern die Proteine dann im elektrischen Feld, unabhängig von ihrer Eigenladung, zur Anode und werden dabei nach ihrer Masse aufgetrennt. Kleinere Proteine bewegen sich schneller durch die Polyacrylamidgelmatrix als größere.

Die Polyacrylamidgele bestanden nach dem Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE aus einem Sammel- und Trenngel. Diese zwei Gelschichten unterscheiden sich hinsichtlich der Polyacrylamidkonzentration, der Ionenstärke und des pH-Werts. Dabei werden die Proteine im niedrigkonzentrierten, großporigen Sammelgel in einer engen Bande aufkonzentriert und im höherprozentigen, engmaschigen Trenngel dann nach ihrer Größe aufgetrennt.

Als Acrylamid-Mix wurde eine 30% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung verwendet, die ein Mischungsverhältnis von Acrylamid/Bisacrylamid von 37,5:1 aufwies.

Die Proben wurden mit der Mini-PROTEAN Tetra Cell SDS-Gelapparatur von Biorad bei konstanter Spannung von 200 V aufgetrennt. Es wurden 1,5 mm dicke Gele gegossen und je nach Proteingröße wurden Gele von 10-17% verwendet. Die SDS-Gele wurden mithilfe der PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter von peqlab auf Nitrocellulose-Membranen geblottet bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA pro cm² für 1,5 h.

Die Membranen wurden in 5 % Milchpulver, PBS/ 0,1 % Tween 20 und 0,01 % Natriumazid 30 min lang geblockt.

Die Inkubation mit primärem Antikörper erfolgte schüttelnd in PBS/ 0,1 % Tween 20 oder 5 % Milchpulver, PBS/ 0,1 % Tween 20 und 0,01 % Natriumazid über Nacht bei 4°C. Nach zwei maligem Waschen in PBS/ 0,1 % Tween 20 wurde der sekundäre Antikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei maligem Waschen in PBS/ 0,1 % Tween 20 wurde die Membran in PBS gelegt.

Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System.

6.5 Yeast-2-Hybrid

Das Yeast-2-Hybrid-System (Hefe-Zwei-Hybrid, Y2H) wird zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen verwendet (Fields & Song, 1989; Chien *et al.*, 1991). Dabei nutzt man die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren üblicherweise aus zwei Teilen bestehen, einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptions-Aktivierungsdomäne. Es werden Fusionsproteine aus den zu untersuchenden Interaktionspartnern mit Transkriptions-Aktivierungsdomäne und DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors hergestellt. Beide können getrennt voneinander exprimiert werden, und durch geeignete Reportergene kann eine Interaktion nachgewiesen werden, wenn beide Proteine interagieren. Wenn die Fusionsproteine einen Komplex bilden und Transkriptions-Aktivierungsdomäne und DNA-Bindedomäne in räumliche Nähe zueinander kommen, kann der Transkriptionsfaktor wirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Yeast-2-Hybrid-System das Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 von Clontech verwendet, um die Interaktion von HA-SkpA und verschiedenen 13xFLAG-Rca1 Konstrukten zu zeigen. Dafür wurden dem Vektor pGADT7 (2µ, *Leu2*) zugrunde liegende Konstrukte kloniert, die unter einem ADH1-Promoter die 13xFLAG-Rca1-Konstrukte in N-terminaler Fusion an die Aktivierungsdomäne exprimieren. Des Weiteren wurde ein dem Vektor pGBKT7 (2µ, *Trp1*) zugrunde liegender Vektor kloniert, der HA-SkpA ebenfalls unter der Kontrolle des ADH1-Promoter in N-terminaler Fusion an die DNA-Bindedomäne exprimiert.

Die Aktivierungsdomänen-Fusionen wurden in den Stamm AH109 transformiert. Die DNA-Bindedomänen-Fusionen dagegen in den Stamm Y187. Es wurde sowohl eine Positiv- (pGADT7- T und

pGBKT7-53) als auch Negativkontrolle (pGBKT7-53 und pGBKT7-Lam) transformiert. Außerdem wurden die Ausgangsvektoren (Leervektoren) in Kombination mit dem AD-13xFLAG-Rca1 Konstrukte oder dem BD-HA-SkpA Konstrukt transformiert, um eine Autoaktivierung auszuschließen.

6.5.1 Hefetransformation

Die beiden Stämme AH109 und Y187 wurden in XYD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Kulturen wurden verwendet, um 20 ml Medium so zu überimpfen, dass eine OD von 0,8 zum Zeitpunkt der Ernte erreicht war.

Für die Hefetransformation wurden 2 ml Zellen geerntet und in 1 ml Wasser gewaschen. Auf die Zellen wurde folgender Transformationsansatz pipettiert:

PEG 50%	240 µl
1 M LiAc	36 µl
Träger-DNA	50 µl (Hering-oder Lachssperma 1:5 mit 1x TE verdünnt)
DNA	34 µl (ca. 1 µg DNA in H ₂ O)

Der Ansatz wurde gut gemischt (4x 10 sec vortexen) und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Inkubation von 15 min auf 42°C.

Der Ansatz wurde kurz bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Wasser aufgenommen. 250 µl davon wurden auf Selektivplatten und XYD-Platten ausplattiert.

Einzelkolonien von den XYD-Platten wurden auf Selektivplatten (ohne Leucin und Tryptophan) miteinander verkreuzt und für 2 Tage auf 30°C inkubiert.

6.5.2 X-Gal-Farbassay

Beim Farbassay macht man sich den Umstand zu Nutze, dass sowohl der Stamm AD109 als auch der Stamm Y187 unter *GAL1* (*URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ*) bzw. *MEL1* (*URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ*) Promoterkontrolle *lacZ* hergestellt wird, wenn der Transkriptionsfaktor GAL4 an die UAS (*upstream activating sequence*) bindet. Dies ist jedoch nur der Fall, wenn die beiden Fusionsproteine aus 13xFLAG-Rca1 und Aktivierungsdomäne und HA-SkpA und DNA-Bindedomäne miteinander interagieren. Durch die Verwendung chromogener Substrate kann die Expression der β -Galaktosidase auf Selektivplatten nachgewiesen werden. Die β -Galaktosidase spaltet X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) unter Bildung eines blauen Farbstoffs. Die Blaufärbung zeigt somit eine Interaktion der zu untersuchenden Proteinfusionen an.

Für den Farbossay wurden die diploiden Hefestämme auf Selektivmedium (ohne Leucin und Tryptophan) ausgestrichen und für 2 Tage auf 30°C inkubiert.

Es wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert und Luftblasen frei für die Überschichtung der Platten verwendet:

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

Die Platten wurden dann bei 30 °C über Nacht inkubiert und bei 4°C gelagert, bis eine gute Blaufärbung sichtbar wurde.

6.5.3 Wachstumstest

Für den Wachstumstest wurden die diploiden Hefezellen auf Selektivplatten ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin ausgestrichen. Das Wachstum ist nur möglich, wenn die Fusionsproteine interagieren und der Transkriptionsfaktor GAL4 die Auxotrophie der beiden Ausgangsstämme AD109 und Y187 komplementieren kann (*LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3*, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*). Dieser Test ist sensitiver als der Farbossay.

6.6 Durchflusszytometrie

Es wurde das Durchflusstzytometer CyFlow®space von Partec verwendet. In folgender Tabelle 6.2 sind die eingebauten Laser aufgelistet:

Tabelle 6.2: Übersicht über die im Durchflusszytometer verbauten Laser.

375 nm	16 mW	UV Dioden Laser	Hoechst Färbung
561 nm	100 mW	Gelber Laser	mCherry
488 nm	20 mW	Blauer Solid State Laser	GFP

Für die Durchflusszytometrie wurden S2R+-Zellen, wie unter 6.2.4. beschrieben, in 6-well Platten ausgesät und transfiziert. Die Zellen wurden 2,5- 3 h mit CuSO₄ induziert und dann lebend im Durchflusszytometer analysiert.

Die Zellen wurden folgendermaßen aufgearbeitet. Zuerst wurden die Zellen mit PBS/ 5 mM EDTA gewaschen und dann 5 min trypsinisiert. Es folgte die Überführung der Zellen in Reaktionsgefäße und eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 4 min, um die Zellen zu pelletieren. Die Zellen wurden dann in

1 ml PBS gelöst und für die durchflusszytometrische Analyse in PBS verdünnt. Es wurden 200-300 μ l Zellen in einem Endvolumen von 900 μ l analysiert.

Die Zellen wurden vor der Messung mit 1,5 μ l Hoechst 33342 (0,5 mg/ml in H₂O) für 10-15 min gefärbt. Die Endkonzentration betrug somit 0,83 mg/ μ l. Dieser Farbstoff kann von lebenden S2R⁺-Zellen aufgenommen werden und interkaliert bevorzugt in AT-reiche Sequenzen (Arndt-Jovin und Jovin, 1977). Dadurch konnte mithilfe einer UV-LED im Durchflusszytometer das Zellzyklus-Profil von gefärbten S2R⁺-Zellen analysiert werden.

Die Daten wurden mit der Software FCS von De Novo Software analysiert.

Die restlichen Zellen wurden für den Proteinnachweis im Western Blot verwendet und deswegen erneut abzentrifugiert, in 50- 100 μ l 4xLSB gelöst und 10 min bei 100 °C im Heizblock aufgeköcht.

6.7 *Drosophila*-Methoden

6.7.1 Fliegenhaltung und Zucht

Die Fliegen wurden in mit Schaumstoffstopfen verschlossenen Futterröhrchen gehalten und bei 18 oder 24°C gehalten (Ashburner, 1989; Wieschaus und Nüsslein-Vollhard, 1986).

6.7.2 Sammeln und Dechorionisierung von *Drosophila*-Embryonen

Die Fliegenstämme für die zu sammelnden Embryonen wurden in Kollektionskäfige überführt. Für die w-Fliegen, die für die Injektion verwendet wurden, wurden große Kollektionskäfige verwendet, für die Embryonen, die für die Fixierung und Antikörperfärbung verwendet wurden, wurden kleine Kollektionskäfige verwendet.

Die Käfige wurden mit befestigten Apfelagarplatten verschlossen und bei 23 °C gehalten. Für die Injektion wurden Eiablagen von 30 min verwendet, für die Antikörperfärbung von Embryonen Gelege, die über Nacht zustande kamen.

Die auf Apfelagar abgelegten Embryonen wurden in einem Netzchen vereinigt und in PBS/ 0,1 % Tween 20 gewaschen, um Hefereste zu entfernen. Danach wurden sie in eine Lösung aus 50 % Chlorbleiche überführt und für 3 min inkubiert. Die Embryonen wurden dann gewaschen, bis kein Chlorge-ruch mehr wahrnehmbar war.

6.7.3 Vorbereitung der DNA für die DNA-Mikroinjektion

Bei der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation wird ein bewegliches DNA-Element durch das Enzym Transposase mobilisiert. Dieses P-Element integriert dann idealerweise im Fliegen genom. Für die Herstellung transgener Fliegen nach Rubin und Spradling (Rubin und Spradling, 1982) wird ein Injektionsmix hergestellt, der ein Helferplasmid und ein Plasmid mit dem Zielgen enthält. Auf dem Helferplasmid ist die kodierende Sequenz der Transposase enthalten, wobei die gegenläufigen Wiederholungssequenzen (inverted repeats), die die Erkennungssequenz für die Transposase darstellen, fehlen. Dadurch kann die Transposase selbst nicht mobilisiert werden. Das Plasmid mit dem Zielgen kann jedoch mobilisiert werden, denn dieses Gen wird von den gegenläufigen Wiederholungssequenzen flankiert.

Die beiden Plasmide müssen im Verhältnis 1:4 Helferplasmid zu Plasmid mit Zielgen gemischt und in Injektionspuffer aufgenommen werden. Die DNA wurde deshalb gefällt, gewaschen und im Injektionspuffer aufgenommen. Dafür wurden 2 µg Helferplasmid und 8 µg Plasmid mit Zielgen vermischt. Es wurden 1/10 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Volumen kaltes 96 % Ethanol zugesetzt. Die Fällung erfolgte bei -70 °C für mindestens 1 h. Die DNA wurde dann bei 4 °C und maximaler Umdrehung in einer Tischzentrifuge pelletiert. Es erfolgte dann ein Waschschrift mit kaltem 70%-Ethanol. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets wurde die DNA in 10 µl Injektionspuffer aufgenommen. Mittels Photometer wurde die Konzentration des Injektionsmixes bestimmt. Der Mix wurde dann auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml mit Injektionspuffer verdünnt.

Vor der Verwendung des Injektionsmixes wurde dieser 5 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

6.7.4 Herstellung transgener Fliegen

Für die Injektion wurden 30 min Kollektionen von Embryonen angefertigt. Die Embryonen wurden nach dem Dechorionisieren auf Apfelagarblöckchen aufgereiht, sodass das anteriore Ende des Embryos nach außen zeigte. Die Embryonen wurden dann mithilfe eines Klebers auf Deckgläser aufgeklebt, der aus Heptan und Paketklebeband hergestellt wurde. Das posteriore Ende der Embryonen zeigt dann nach außen und kann injiziert werden. Die Embryonen wurden dann 8 min auf Kieselgel getrocknet und mit 10 S Voltalef-Öl überschichtet.

Die DNA-Mikroinjektion wurde an einer speziellen Injektionsapparatur am Lehrstuhl Zoologie bei Prof. Dr. Schneuwly durchgeführt.

Für die Injektion wurde der Fliegenstamm S-0394 verwendet. Das *white* Gen dieses Fliegenstammes ist mutiert, und die Fliegen haben deswegen weiße Augen. Wenn das P-Element mit dem Zielgen

mobilisiert wurde und in der Keimbahn des Genoms integriert wurde, ist es erst in der nächsten Generation sichtbar. Sind injizierte Embryonen transgen, geben sie diese Transgene über die Keimbahnzellen an die nächste Generation weiter. Die transgenen Fliegen sind dann anhand von roten Augen zu erkennen, denn das Plasmid mit dem Zielgen enthält auch das *mini-white* Gen, das für die Rotfärbung der Fliegenaugen verantwortlich ist.

Die injizierten Embryonen wurden dann bei 18 °C über Nacht auf eine teilweise mit Wasser gefüllte Apfelagarplatte gelegt. Am darauffolgenden Tag wurden die sich zu Larven entwickelnden, injizierten Embryonen in große Futterröhrchen überführt und auf 24 °C gestellt.

Die sich aus den Larven entwickelnden Fliegen wurden mit dem Männchen bzw. Weibchen mit dem Multimarker-Stamm S-0364 verkreuzt, um den Insertionsort der P-Elemente zu bestimmen.

6.7.5 Herstellung von rekombinanten Fliegen

*dap*⁶-mutante Jungfrauen (S-0078) wurden mit Männchen verkreuzt, die das *rca1*-Allel *rca1*² bzw. *rca1*^{C1474} tragen. Es wurden Weibchen gesammelt, die gerade Flügel haben, also auf dem 2. Chromosom das *dap*⁶- und *rca1*² bzw. *rca1*^{C1474} Allel tragen. Diese wurden mit Männchen des Multimarker-Stammes S-0364 verkreuzt.

Es wurden zunächst stabile Stämme etabliert. Um die erfolgreiche Rekombination auf Chromosom 2 zu überprüfen, wurden die etablierten Stämme mit den Ausgangsstämmen S-078 und S-0143 rückgekreuzt. Im Falle einer erfolgreichen Rekombination auf Chromosom 2 wurden bei beiden Rückkreuzungen keine Fliegen mit geraden Flügeln erhalten.

Die Herstellung der Stämme kann im Kreuzungsschema in Abbildung 3.9 für die Rekombinante *rca1*² *dap*⁶ nachvollzogen werden. Für *rca1*^{C1474} *dap*⁶ wurde analog dazu vorgegangen.

6.7.6 Fixierung von *Drosophila* Embryonen

Die Embryonen geeigneten Alters wurden, wie unter 6.6.3. beschrieben, dechorionisiert und in ein Reaktionsgefäß mit jeweils 700 µl 4% para-Formaldehyd und n-Heptan gegeben. Die Fixierung erfolgte für rotierend 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die untere para-Formaldehyd-Phase entnommen und 700 µl Methanol zugegeben, um die Embryonen zu devitellinisieren. Nach der Entfernung der oberen n-Heptanphase wurden erneut 700 µl Methanol hinzugegeben. Die Embryonen wurden im Anschluss mit 1 ml Methanol gewaschen und bei -20 °C eingefroren.

6.7.7 Antikörperfärbung von *Drosophila* Embryonen

Die Methanolphase der unter 6.6.6. fixierten Embryonen wurde entfernt und die Embryonen 3x 5 min in PBS/ 0,1 % Tween 20 gewaschen und rehydriert. Danach wurden sie in 5 % FCS in 1 ml PBS/ 0,1 % Tween 20 geblockt. Der primäre Antikörper wurde dann in 400 µl und 5% FCS über Nacht bei 4°C mit den Embryonen inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Embryonen wieder 3x 5 min in PBS/ 0,1 % Tween 20 gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde dann 1 h bei Raumtemperatur in 400 µl inkubiert. Es wurde außerdem 20 mg/ml RNase A zugegeben (10 mg/ml Stammlösung). Nachdem nochmal 3x 5 min in PBS/ 0,1 % Tween 20 gewaschen wurde, erfolgte dann die DNA Färbung durch die Zugabe von Propidiumiodid (Endkonzentration 0,02 mg/ml) für 15 min bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurde erneut 2x5 min mit 500 µl PBS/ 0,1 % Tween 20 gewaschen und mit 40-50 µl Homemount eingebettet.

7 Literatur

- Adams, P.D., Sellers, W.R., Sharma, S.K., Wu, A.D., Nalin, C.M., and Kaelin, W.G., Jr. (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* **16**, 6623-6633.
- Almeida, A., Bolanos, J.P., and Moreno, S. (2005). Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* **25**, 8115-8121.
- Alting-Mees, M.A., and Short, J.M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res* **17**, 9494.
- Amati, B., and Vlach, J. (1999). Kip1 meets SKP2: new links in cell-cycle control. *Nat Cell Biol* **1**, E91-93.
- Arias, E.E., and Walter, J.C. (2006). PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat Cell Biol* **8**, 84-90.
- Arndt-Jovin, D.J., and Jovin, T.M. (1977). Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J Histochem Cytochem* **25**, 585-589.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila - A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* **23**, 4709-4716.
- Ausubel, F.M.B., R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (2005). Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.*
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**, 263-274.
- Bauer, M. (2011). Analyse von G1/S-Regulatoren in *Drosophila* Schneiderzellen. In Universität Regensburg.
- Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**, 333-374.
- Bergér, D. (2013). Analyse des Zellzyklus Regulators "Rca1" in *Drosophila*. In Universität Regensburg
- Berghammer, H., and Auer, B. (1993). "Easypreps": fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* **14**, 524, 528.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312-3317
- Bisteau, X., Paternot, S., Colleoni, B., Ecker, K., Coulonval, K., De Groote, P., Declercq, W., Hengst, L., and Roger, P.P. (2013). CDK4 T172 phosphorylation is central in a CDK7-dependent bidirectional CDK4/CDK2 interplay mediated by p21 phosphorylation at the restriction point. *PLoS Genet* **9**, e1003546.

- Blais, A., and Dynlacht, B.D. (2004). Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 527-532.
- Blanco, M.A., Sanchez-Diaz, A., de Prada, J.M., and Moreno, S. (2000). APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J* **19**, 3945-3955.
- Blatch, G.L., and Lassle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939.
- Bond, M., Sala-Newby, G.B., Wu, Y.J., and Newby, A.C. (2006). Biphasic effect of p21Cip1 on smooth muscle cell proliferation: role of PI 3-kinase and Skp2-mediated degradation. *Cardiovasc Res* **69**, 198-206.
- Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* **8**, 671-682.
- Buschhorn, B.A., Petzold, G., Galova, M., Dube, P., Kraft, C., Herzog, F., Stark, H., and Peters, J.M. (2011). Substrate binding on the APC/C occurs between the coactivator Cdh1 and the processivity factor Doc1. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 6-13.
- Campanero, M.R., and Flemington, E.K. (1997). Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2221-2226.
- Campos Ortega, J.A. und Hartenstein, V. (1997). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*, Second edition edn (Springer-Verlag).
- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 739-751.
- Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* **1**, 193-199.
- Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbe, J.C., Prigent, C., and Lorca, T. (2002). APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* **3**, 457-462.
- Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbe, J.C., and Lorca, T. (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* **24**, 314-325.
- Chen, D., Ahlford, A., Schnorrer, F., Kalchhauser, I., Fellner, M., Viragh, E., Kiss, I., Syvanen, A.C., and Dickson, B.J. (2008). High-resolution, high-throughput SNP mapping in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* **5**, 323-329.
- Chen, R.H. (2007). Dual inhibition of Cdc20 by the spindle checkpoint. *J Biomed Sci* **14**, 475-479.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9578-9582.
- Ciliberto, A., and Shah, J.V. (2009). A quantitative systems view of the spindle assembly checkpoint. *Embo J* **28**, 2162-2173.

- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., and Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* **10**, 3081-3093.
- Cook, J.G., Chasse, D.A., and Nevins, J.R. (2004). The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 9625-9633.
- Dawson, I.A., Roth, S., Akam, M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1993). Mutations of the fizzy locus cause metaphase arrest in *Drosophila melanogaster* embryos. *Development* **117**, 359-376.
- De Marco, V., Gillespie, P.J., Li, A., Karantzelis, N., Christodoulou, E., Klompmaker, R., van Gerwen, S., Fish, A., Petoukhov, M.V., Iliou, M.S., et al. (2009). Quaternary structure of the human Cdt1-Geminin complex regulates DNA replication licensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19807-19812.
- de Nooij, J.C., Letendre, M.A., and Hariharan, I.K. (1996). A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **87**, 1237-1247.
- DeGregori, J., Kowalik, T., and Nevins, J.R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* **15**, 4215-4224.
- Descombes, P., and Nigg, E.A. (1998). The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *Embo J* **17**, 1328-1335.
- Deshai, R.J. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 435-467.
- Di Fiore, B., and Pines, J. (2007). Emi1 is needed to couple DNA replication with mitosis but does not regulate activation of the mitotic APC/C. *J Cell Biol* **177**, 425-437.
- Dienemann, A., and Sprenger, F. (2004). Requirements of cyclin a for mitosis are independent of its subcellular localization. *Curr Biol* **14**, 1117-1123.
- Dimova, D.K., Stevaux, O., Frolov, M.V., and Dyson, N.J. (2003). Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes Dev* **17**, 2308-2320.
- Dimova, N.V., Hathaway, N.A., Lee, B.H., Kirkpatrick, D.S., Berkowitz, M.L., Gygi, S.P., Finley, D., and King, R.W. (2012). APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1. *Nat Cell Biol* **14**, 168-176.
- Dong, X., Zavitz, K.H., Thomas, B.J., Lin, M., Campbell, S., and Zipursky, S.L. (1997). Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: rca1 regulates Cyclin A. *Genes Dev* **11**, 94-105.
- Du, W., and Dyson, N. (1999). The role of RBF in the introduction of G1 regulation during *Drosophila* embryogenesis. *Embo J* **18**, 916-925.
- Du, W., Vidal, M., Xie, J.E., and Dyson, N. (1996). RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**, 1206-1218.
- Dui, W., Wei, B., He, F., Lu, W., Li, C., Liang, X., Ma, J., and Jiao, R. (2013). The *Drosophila* F-box protein dSkp2 regulates cell proliferation by targeting Dacapo for degradation. *Mol Biol Cell* **24**, 1676-1687.

- Duronio, R.J., and O'Farrell, P.H. (1995). Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin E is a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* **9**, 1456-1468.
- Edgar, B., Sprenger, F., Duronio, R., Leopold, P. and O'Farrell, P. (1994) Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* **8**, 440-452.
- Edgar, B.A., and Datar, S.A. (1996). Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNAs terminates *Drosophila*'s early cell cycle program. *Genes Dev* **10**, 1966-1977.
- Edgar, B.A., and Lehner, C.F. (1996). Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* **274**, 1646-1652.
- Edgar, B.A., and O'Farrell, P.H. (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 177-187.
- Edgar, B.A., and O'Farrell, P.H. (1990). The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* **62**, 469-480.
- Edgar, B.A., and Orr-Weaver, T.L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**, 297-306.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* **2**, 163-171.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1999). Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1583-1590.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Foe, V.E. (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**, 1-22.
- Foe, V.E., and Alberts, B.M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* **61**, 31-70.
- Foley, E., and Sprenger, F. (2001). The cyclin-dependent kinase inhibitor Roughex is involved in mitotic exit in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 151-160.
- Foley, E., O'Farrell, P.H., and Sprenger, F. (1999). Rux is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) specific for mitotic cyclin-Cdk complexes. *Curr Biol* **9**, 1392-1402.
- Fraschini, R., Beretta, A., Sironi, L., Musacchio, A., Lucchini, G., and Piatti, S. (2001). Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *Embo J* **20**, 6648-6659.
- Frescas, D., and Pagano, M. (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 438-449.
- Frolov, M.V., Huen, D.S., Stevaux, O., Dimova, D., Balczarek-Strang, K., Elsdon, M., and Dyson, N.J. (2001). Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev* **15**, 2146-2160.

- Frye, J.J., Brown, N.G., Petzold, G., Watson, E.R., Grace, C.R., Nourse, A., Jarvis, M.A., Kriwacki, R.W., Peters, J.M., Stark, H., et al. (2013). Electron microscopy structure of human APC/C(CDH1)-EMI1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase shutdown. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 827-835.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381**, 438-441.
- Garnett, M.J., Mansfeld, J., Godwin, C., Matsusaka, T., Wu, J., Russell, P., Pines, J., and Venkitaraman, A.R. (2009). UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit. *Nat Cell Biol* **11**, 1363-1369.
- Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J.M., and Hunt, T. (2001). Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **153**, 137-148.
- Ghorbani, M., Vasavan, B., Kraja, E., and Swan, A. (2011). Cks85A and Skp2 interact to maintain diploidy and promote growth in *Drosophila*. *Dev Biol* **358**, 213-223.
- Giacinti, C., and Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**, 5220-5227.
- Gieffers, C., Dube, P., Harris, J.R., Stark, H., and Peters, J.M. (2001). Three-dimensional structure of the anaphase-promoting complex. *Mol Cell* **7**, 907-913.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L. Jr., White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R.A., McKenna, M.P., Chant, J., Rothberg, J.M. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-1736.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- Gorr, I.H., Boos, D., and Stemmann, O. (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell* **19**, 135-141.
- Grosskortenhaus, R., and Sprenger, F. (2002). Rca1 inhibits APC-Cdh1(Fzr) and is required to prevent cyclin degradation in G2. *Dev Cell* **2**, 29-40.
- Guardavaccaro, D., Kudo, Y., Boulaire, J., Barchi, M., Busino, L., Donzelli, M., Margottin-Goguet, F., Jackson, P.K., Yamasaki, L., and Pagano, M. (2003). Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev Cell* **4**, 799-812.
- Hamel, P.A., Gallie, B.L., and Phillips, R.A. (1992). The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. *Trends Genet* **8**, 180-185.
- Hansen, D.V., Loktev, A.V., Ban, K.H., and Jackson, P.K. (2004). Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* **15**, 5623-5634.

- Hardwick, K.G., Johnston, R.C., Smith, D.L., and Murray, A.W. (2000). MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol* **148**, 871-882.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**:805–816.
- Harper, J.W., Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* **16**, 2179-2206.
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernandez, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolanos, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* **11**, 747-752.
- Hershko, A. (1997). Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 788-799.
- Hershko, A., Ganoth, D., Pehrson, J., Palazzo, R.E., and Cohen, L.H. (1991). Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. *J Biol Chem* **266**, 16376-16379.
- Ho, M.S., Ou, C., Chan, Y.R., Chien, C.T., and Pi, H. (2008). The utility F-box for protein destruction. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1977-2000.
- Holloway, S.L., Glotzer, M., King, R.W., and Murray, A.W. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* **73**, 1393-1402.
- Hsu, J.Y., Reimann, J.D., Sorensen, C.S., Lukas, J., and Jackson, P.K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* **4**, 358-366.
- Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., and Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* **81**, 269-278.
- Isoda, M., Sako, K., Suzuki, K., Nishino, K., Nakajo, N., Ohe, M., Ezaki, T., Kanemori, Y., Inoue, D., Ueno, H., et al. (2011). Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs. *Developmental cell* **21**, 506-519.
- Jacobs, H., Richter, D., Venkatesh, T., and Lehner, C. (2002). Completion of Mitosis Requires Neither *fzr/rap* nor *fzr2*, a Male Germline-Specific *Drosophila* Cdh1 Homolog. *Curr Biol* **12**, 1435.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Current Biology* **9**, 227-236.
- Jiang, J., and Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* **391**, 493-496.
- Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R.C., Elledge, S.J., Pagano, M., and Harper, J.W. (2004). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* **18**, 2573-2580.

- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., and Reed, S.I. (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**, 303-314.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E., and Sherr, C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* **7**, 331-342.
- Kies, M. (2011). Analyse von rca1-Allelen und Herstellung von transgenen *Drosophila* zur Bestimmung von Rca1-Aktivität *in vivo*. Universität Regensburg.
- Kim, A.H., Puram, S.V., Bilimoria, P.M., Ikeuchi, Y., Keough, S., Wong, M., Rowitch, D., and Bonni, A. (2009). A centrosomal Cdc20-APC pathway controls dendrite morphogenesis in postmitotic neurons. *Cell* **136**, 322-336.
- Kim, Y., and Kipreos, E.T. (2007). The *Caenorhabditis elegans* replication licensing factor CDT-1 is targeted for degradation by the CUL-4/DDB-1 complex. *Mol Cell Biol* **27**, 1394-1406.
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M.W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**, 279-288.
- Kipreos, E.T., and Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biol* **1**, reviews 3002.1-7.
- Knoblich, J.A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., and Lehner, C.F. (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77**, 107-120.
- Koepp, D.M., Schaefer, L.K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* **294**, 173-177.
- Kondo, T., Kobayashi, M., Tanaka, J., Yokoyama, A., Suzuki, S., Kato, N., Onozawa, M., Chiba, K., Hashino, S., Imamura, M., et al. (2004). Rapid degradation of Cdt1 upon UV-induced DNA damage is mediated by SCF^{Skp2} complex. *J Biol Chem* **279**, 27315-27319.
- Kossatz, U., Dietrich, N., Zender, L., Buer, J., Manns, M.P., and Malek, N.P. (2004). Skp2-dependent degradation of p27^{kip1} is essential for cell cycle progression. *Genes Dev* **18**, 2602-2607.
- Kramer, E.R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M., and Peters, J.M. (1998). Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol* **8**, 1207-1210.
- Kramer, E.R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Peters, J.M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* **11**, 1555-1569.
- Kuras, L., Rouillon, A., Lee, T., Barbey, R., Tyers, M., and Thomas, D. (2002). Dual regulation of the met4 transcription factor by ubiquitin-dependent degradation and inhibition of promoter recruitment. *Mol Cell* **10**, 69-80.
- Lane, M.E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y.N., Lehner, C.F., and Vaessin, H. (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* **87**, 1225-1235.

- Laski, F.A., Rio, D.C., and Rubin, G.M. (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* **44**, 7-19.
- Lee, C., Hong, B., Choi, J.M., Kim, Y., Watanabe, S., Ishimi, Y., Enomoto, T., Tada, S., and Cho, Y. (2004). Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature* **430**, 913-917.
- Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**, 397-403.
- Lee, H.O., Zacharek, S.J., Xiong, Y., and Duronio, R.J. (2010). Cell type-dependent requirement for PIP box-regulated Cdt1 destruction during S phase. *Mol Biol Cell* **21**, 3639-3653.
- Lee, L.A., and Orr-Weaver, T.L. (2003). Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. *Annu Rev Genet* **37**, 545-578.
- Lehner, C.F., and O'Farrell, P.H. (1989). Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell* **56**, 957-968.
- Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R.S., and Nevins, J.R. (1998). E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev* **12**, 2120-2130.
- Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P., and Wu, X. (2003). The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J Biol Chem* **278**, 30854-30858.
- Lilly, M.A., and Duronio, R.J. (2005). New insights into cell cycle control from the *Drosophila* endocycle. *Oncogene* **24**, 2765-2775.
- Listovsky, T., Zor, A., Laronne, A., and Brandeis, M. (2000). Cdk1 is essential for mammalian cyclosome/APC regulation. *Exp Cell Res* **255**, 184-191.
- Littlepage, L.E., and Ruderman, J.V. (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* **16**, 2274-2285.
- Liu, E., Li, X., Yan, F., Zhao, Q., and Wu, X. (2004). Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J Biol Chem* **279**, 17283-17288.
- Lukas, C., Sorensen, C.S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J.M., Bartek, J. and Lukas, J. (1999) Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-Dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* **401**, 815-818.
- Lundberg, A.S., and Weinberg, R.A. (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**, 753-761.
- Machida, Y.J., and Dutta, A. (2007). The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. *Genes Dev* **21**, 184-194.

- Maiorano, D., Moreau, J., and Mechali, M. (2000). XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* **404**, 622-625.
- Malmanche, N., Maia, A., and Sunkel, C.E. (2006). The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett* **580**, 2888-2895.
- Margottin-Goguet, F., Hsu, J.Y., Loktev, A., Hsieh, H.M., Reimann, J.D., and Jackson, P.K. (2003). Pro-phase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* **4**, 813-826.
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., and Kato, J.Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **14**, 2066-2076.
- Matyskiela, M.E., and Morgan, D.O. (2009). Analysis of activator-binding sites on the APC/C supports a cooperative substrate-binding mechanism. *Mol Cell* **34**, 68-80.
- McGarry, T.J., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* **93**, 1043-1053.
- Merrill, P.T., Sweeton, D. and Wieschaus, E. (1988) Requirements for autosomal gene activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*. *Development*, **104**, 495-509.
- Miller, J.J., Summers, M.K., Hansen, D.V., Nachury, M.V., Lehman, N.L., Loktev, A., and Jackson, P.K. (2006). Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev* **20**, 2410-2420.
- Moberg, K.H., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2001). Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* **413**, 311-316.
- Moberg, K.H., Mukherjee, A., Veraksa, A., Artavanis-Tsakonas, S., and Hariharan, I.K. (2004). The *Drosophila* F box protein archipelago regulates dMyc protein levels in vivo. *Current biology* **14**, 965-974.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A.C., Draetta, G.F., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* **13**, 1181-1189.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Morgan, D.O. (2006). The Cell Cycle - Principles of Control. *New Science Press Ltd*.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51** Pt 1, 263-273.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K.I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Developmental cell* **6**, 661-672.

- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 323-333.
- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369-381.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., and Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**, 625-628.
- Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Fujita, M., et al. (2006a). Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J* **25**, 1126-1136.
- Nishitani, H., Taraviras, S., Lygerou, Z., and Nishimoto, T. (2001). The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase. *J Biol Chem* **276**, 44905-44911.
- Ohe, M., Kawamura, Y., Ueno, H., Inoue, D., Kanemori, Y., Senoo, C., Isoda, M., Nakajo, N., and Sagata, N. (2010). Emi2 inhibition of the anaphase-promoting complex/cyclosome absolutely requires Emi2 binding via the C-terminal RL tail. *Mol Biol Cell* **21**, 905-913.
- Ohta, T., Michel, J.J., Schottelius, A.J., and Xiong, Y. (1999). ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* **3**, 535-541.
- Pacek, M., and Walter, J.C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *Embo J* **23**, 3667-3676.
- Pagano, M. (2004). Control of DNA synthesis and mitosis by the Skp2-p27-Cdk1/2 axis. *Mol Cell* **14**, 414-416.
- Pagano, M., Draetta, G., and Jansen-Durr, P. 1992. Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science* **255**(5048): 1144-1147.
- Pateras, I.S., Apostolopoulou, K., Koutsami, M., Evangelou, K., Tsantoulis, P., Liloglou, T., Nikolaidis, G., Sigala, F., Kittas, C., Field, J.K., et al. (2006). Downregulation of the KIP family members p27(KIP1) and p57(KIP2) by SKP2 and the role of methylation in p57(KIP2) inactivation in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* **119**, 2546-2556.
- Patra, D., and Dunphy, W.G. (1998). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev* **12**, 2549-2559.
- Peter, M., and Herskowitz, I. (1994). Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* **79**, 181-184.
- Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656.
- Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 9-20.

- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by *cdh1*. *Genes Dev* **14**, 655-665.
- Pimentel, A.C., and Venkatesh, T.R. (2005). *rap* gene encodes Fizzy-related protein (Fzr) and regulates cell proliferation and pattern formation in the developing *Drosophila* eye-antennal disc. *Dev Biol* **285**, 436-446.
- Prinz, S., Hwang, E.S., Visintin, R., and Amon, A. (1998). The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr Biol* **8**, 750-760.
- Puklowski, A., Homsy, Y., Keller, D., May, M., Chauhan, S., Kossatz, U., Grunwald, V., Kubicka, S., Pich, A., Manns, M.P., et al. (2011). The SCF-FBXW5 E3-ubiquitin ligase is regulated by PLK4 and targets HsSAS-6 to control centrosome duplication. *Nat Cell Biol* **13**, 1004-1009.
- Rabinowitz, M. (1941). Studies of the cytology and early embryogenesis of the egg of *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* **69**, 1-49.
- Radermacher, P. (2007). Untersuchungen zur Lokalisierung und Stabilität des Zellzyklus-Proteins Rca1 in *Drosophila melanogaster*. Universität Köln.
- Rank, K.B., Evans, D.B., and Sharma, S.K. (2000). The N-terminal domains of cyclin-dependent kinase inhibitory proteins block the phosphorylation of cdk2/Cyclin E by the CDK-activating kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 469-473.
- Reber, A., Lehner, C.F., and Jacobs, H.W. (2006). Terminal mitoses require negative regulation of Fzr/Cdh1 by Cyclin A, preventing premature degradation of mitotic cyclins and String/Cdc25. *Development* **133**, 3201-3211.
- Reimann, J.D., Freed, E., Hsu, J.Y., Kramer, E.R., Peters, J.M., and Jackson, P.K. (2001). Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**, 645-655.
- Richardson, H., O'Keefe, L.V., Marty, T., and Saint, R. (1995). Ectopic cyclin E expression induces premature entry into S phase and disrupts pattern formation in the *Drosophila* eye imaginal disc. *Development* **121**, 3371-3379.
- Rogulja, D., and Young, M.W. (2012). Control of sleep by cyclin A and its regulator. *Science* **335**, 1617-1621.
- Royzman, I., Hayashi-Hagihara, A., Dej, K.J., Bosco, G., Lee, J.Y., and Orr-Weaver, T.L. (2002). The E2F cell cycle regulator is required for *Drosophila* nurse cell DNA replication and apoptosis. *Mech Dev* **119**, 225-237.
- Royzman, I., Whittaker, A.J., and Orr-Weaver, T.L. (1997). Mutations in *Drosophila* DP and E2F distinguish G1-S progression from an associated transcriptional program. *Genes Dev* **11**, 1999-2011.
- Rubin, G.M., and Spradling, A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145-153.

- Saxena, S., Yuan, P., Dhar, S.K., Senga, T., Takeda, D., Robinson, H., Kornbluth, S., Swaminathan, K., and Dutta, A. (2004). A dimerized coiled-coil domain and an adjoining part of geminin interact with two sites on Cdt1 for replication inhibition. *Mol Cell* **15**, 245-258.
- Schulman, B.A., Carrano, A.C., Jeffrey, P.D., Bowen, Z., Kinnucan, E.R., Finnin, M.S., Elledge, S.J., Harper, J.W., Pagano, M., and Pavletich, N.P. (2000). Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* **408**, 381-386.
- Schwab, M., and Tyers, M. (2001). Cell cycle. Archipelago of destruction. *Nature* **413**, 268-269.
- Schwab, M., Lutum, A.S., and Seufert, W. (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* **90**, 683-693.
- Seol, J.H., Feldman, R.M., Zachariae, W., Shevchenko, A., Correll, C.C., Lyapina, S., Chi, Y., Galova, M., Claypool, J., Sandmeyer, S., et al. (1999). Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev* **13**, 1614-1626.
- Sherr, C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**, 1059-1065.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-1512.
- Shibutani, S.T., de la Cruz, A.F., Tran, V., Turbyfill, W.J., 3rd, Reis, T., Edgar, B.A., and Duronio, R.J. (2008). Intrinsic negative cell cycle regulation provided by PIP box- and Cul4Cdt2-mediated destruction of E2f1 during S phase. *Dev Cell* **15**, 890-900.
- Shirayama, M., Zachariae, W., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1998). The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* **17**, 1336-1349.
- Sigrist, S., Jacobs, H., Stratmann, R., and Lehner, C.F. (1995). Exit from mitosis is regulated by *Drosophila* fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3. *Embo J* **14**, 4827-4838.
- Sigrist, S.J., and Lehner, C.F. (1997). *Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* **90**, 671-681.
- Skaar, J.R., Pagan, J.K., and Pagano, M. (2013). Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 369-381
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209-219.
- Skowyra, D., Koepp, D.M., Kamura, T., Conrad, M.N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1999). Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science* **284**, 662-665.
- Smith, A.V., and Orr-Weaver, T.L. (1991). The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis: the transition to polyteny. *Development* **112**, 997-1008.

- Sorensen, C.S., Lukas, C., Kramer, E.R., Peters, J.M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Nonperiodic activity of the human anaphase-promoting complex-Cdh1 ubiquitin ligase results in continuous DNA synthesis uncoupled from mitosis. *Mol Cell Biol* **20**, 7613-7623.
- Sprenger, F., Yakubovich, N., and O'Farrell, P.H. (1997). S-phase function of *Drosophila* cyclin A and its downregulation in G1 phase. *Curr Biol* **7**, 488-499.
- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* **154**, 925-936.
- Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U., and Krek, W. (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* **1**, 207-214.
- Tang, W., Wu, J.Q., Chen, C., Yang, C.S., Guo, J.Y., Freel, C.D., and Kornbluth, S.A. (2010). Emi2-mediated inhibition of E2-substrate Ubiquitin Transfer by the APC/C through a D-Box-independent Mechanism. *Mol Biol Cell*. **21**, 2589-2597
- Thomas, B.J., Gunning, D.A., Cho, J., and Zipursky, L. (1994). Cell cycle progression in the developing *Drosophila* eye: roughex encodes a novel protein required for the establishment of G1. *Cell* **77**, 1003-1014.
- Thomas, B.J., Zavitz, K.H., Dong, X., Lane, M.E., Weigmann, K., Finley, R.L., Jr., Brent, R., Lehner, C.F., and Zipursky, S.L. (1997). roughex down-regulates G2 cyclins in G1. *Genes Dev* **11**, 1289-1298.
- Thornton, B.R., and Toczyski, D.P. (2006). Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes Dev* **20**, 3069-3078.
- Thornton, B.R., Ng, T.M., Matyskiela, M.E., Carroll, C.W., Morgan, D.O., and Toczyski, D.P. (2006). An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* **20**, 449-460.
- Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmann, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V., Celniker, S.E., et al. (2002). Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0088.1-14.
- Tomancak, P., Berman, B.P., Beaton, A., Weiszmann, R., Kwan, E., Hartenstein, V., Celniker, S.E., and Rubin, G.M. (2007). Global analysis of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol* **8**, R145.1-24.
- Tsvetkov, L.M., Yeh, K.H., Lee, S.J., Sun, H., and Zhang, H. (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Current biology* **9**, 661-664.
- van den Heuvel, S., and Dyson, N.J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 713-724.
- van Leuken, R., Clijsters, L., and Wolthuis, R. (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 49-59.
- van Roessel, P., Elliott, D.A., Robinson, I.M., Prokop, A., and Brand, A.H. (2004). Independent regulation of synaptic size and activity by the anaphase-promoting complex. *Cell* **119**, 707-718.

- Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* **278**, 460-463.
- Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* **16**, 5334-5344.
- Wang, W., and Kirschner, M.W. (2013). Emi1 preferentially inhibits ubiquitin chain elongation by the anaphase-promoting complex. *Nat Cell Biol.* **15**, 797-806
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. and Barton, G.J. (2009) Jalview Version 2- a multiple sequence alignment editor and analysis workbench, *Bioinformatics* **25**, 1189-1191
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Weintraub, S.J., Chow, K.N., Luo, R.X., Zhang, S.H., He, S., and Dean, D.C. (1995). Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**, 812-815.
- Wieschaus, E. and Sweeton, D. (1988). Requirements for X-linked zygotic gene activity during cellularisation of early *Drosophila* embryos. *Development* **104**, 483-493.
- Wieschaus, E.N. and Nüsslein, V., C. (1986). Looking at embryos. In *Drosophila - A practical approach*. IRL Press. Oxford, Washington D.C.
- Williamson, A., Wickliffe, K.E., Mellone, B.G., Song, L., Karpen, G.H., and Rape, M. (2009). Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18213-18218.
- Wong, S., and Weber, J.D. (2007). Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1. *Biochem J* **407**, 451-460.
- Wu, T., Merbl, Y., Huo, Y., Gallop, J.L., Tzur, A., and Kirschner, M.W. (2010). UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1355-1360.
- Yamaguchi, S., Okayama, H., and Nurse, P. (2000). Fission yeast Fizzy-related protein srw1p is a G(1)-specific promoter of mitotic cyclin B degradation. *EMBO J* **19**, 3968-3977.
- Yanagawa, S., Lee, J.S., and Ishimoto, A. (1998). Identification and characterization of a novel line of *Drosophila* Schneider S2 cells that respond to wingless signaling. *J Biol Chem* **273**, 32353-32359.
- Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z., and Hanaoka, F. (2002). Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *J Biol Chem* **277**, 40871-40880.
- Yu, Z.K., Gervais, J.L., and Zhang, H. (1998). Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11324-11329.
- Yung, Y., Walker, J.L., Roberts, J.M., and Assoian, R.K. (2007). A Skp2 autoinduction loop and restriction point control. *J Cell Biol* **178**, 741-747.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**, 1721-1724.

Zalokar, M.E., I. (1976). Division and migration of the nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Micro Biology of the Cell* **25**, 97-106.

Zielke, N., Querings, S., Grosskortenhaus, R., Reis, T., and Sprenger, F. (2006). Molecular dissection of the APC/C inhibitor Rca1 shows a novel F-box-dependent function. *EMBO Reports* **7**, 1266-1272.

8 Abstract

Rca1 is an important inhibitor of the ubiquitin E3-ligase APC/C with the activator Fzr (Fizzy-related, a homolog to Cdh1), mainly in the G2-phase of the cell cycle. It enables the accumulation of cyclins for the subsequent mitosis. Embryos that carry the *rca1*-alleles *rca1*² and *rca1*^{C1474} arrest in cell cycle 16 and cannot enter mitosis 16th. This phenotype could be complemented through the overexpression of Rca1 or Rca1 with a deleted F-box-motif. Here, the genomic region of *rca1* was cloned and introduced into flies. This region was able to rescue the *rca1*-mutant phenotype. However, the expression of Rca1ΔF box under the control of this region could not complement this phenotype.

Rca1 interacts with SkpA and therefore could be part of an SCF-complex. The Cyclin E/Cdk2 inhibitor Dacapo could be a substrate of this complex. Hence, recombinant fly strains were produced which carry apart from the *rca1*-alleles the *dap*⁶ allele on the second chromosome. For these recombinants different phenotypes for the two *rca1*-alleles could be observed. *rca1*² *dap*⁶ embryos show the phenotype of *dap*⁶ mutants and undergo an additional 17th cell cycle, whereas *rca1*^{C1474} *dap*⁶ mutant embryos arrested in the G2 phase of the cell cycle 16th like *rca1*-mutants. The coding region of *rca1*² carries the exchange of an amino acid at the position A344T proximately to the zinc binding region, whereas there is a amino acid exchange in the F-box-domain in the coding region of *rca1*^{C1474}. Thus, the F-box-function is needed at endogenous levels at the G2-M-transition in cell cycle 16.

Overexpression of Rca1 during eye development leads to ectopic S-phase and a rough eye phenotype. This phenotype is dependent on the F-box-motif and since the interaction of Rca1 with SkpA, a subunit of the SCF-E3-ligase is also F-box dependant, Rca1 has a further F-box-function at the G1-S-transition. By the use of live cell imaging it could be shown that the overexpression of 4xFLAG-Rca1 in S2R+ cells accelerates the G1-S-transition and the cells enter earlier into the S-phase. Through the overexpression of various 4xFLAG-epitope labeled Rca1 derivates and an *in vivo* APC/C-inhibition assay, it could also be shown that the function of Rca1 the G1 -S transition could be fulfilled by another function apart from the direct APC/C-inhibition as part of an SCF^{Rca1} complex.

Furthermore it was analyzed whether Dacapo could be a substrate of the SCF^{Rca1} complex. For this purpose, various 10xHA-epitope tagged Rca1 derivates were simultaneously overexpressed with GFP-epitope tagged Dacapo. An F-box dependant reduction of GFP-Dacapo amounts to about 50 % could be observed using flow cytometry. Apart from that the G1-arrest induced by the overexpression of GFP-Dacapo in cell culture could be overcome by overexpression 10xHA-Rca1. Furthermore the depletion of Rca1 by RNAi led to a stabilization of GFP-Dacapo. Dacapo therefore could be a substrate of an SCF^{Rca1} complex, that is on the one hand involved in the APC/C regulation at the G2-M-transition by influencing the activity of Cyclin E/Cdk2 as a regulator of the APC/C apart from

Cyclin A/Cdk1 and Rca1. And on the other hand Rca1 could regulate Dacapo as a negative regulator of the G1-S-transition by mediating the degradation of Cyclin E/Cdk2 at the G1-S-transition.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
1C	einfacher DNA-Gehalt (vor der Replikation)
2C	doppelter DNA-Gehalt (nach der Replikation)
amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C-Terminus	Carboxy-Ende der Polypeptidkette
<i>D.m.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
DIC	Differentialinterferenzkontrast (differential interference contrast)
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPS	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	(Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra-essigsäure)
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	Und andere (et alii)
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
<i>H.s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
HA	Hemagglutinin
IP	Immunpräzipitation
k	Kilo
kb	Kilobasenpaar
KOD-DNA-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermococcus kodakaraensis</i>
l	Liter

LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
M	Mol pro Liter
min	Minute
mol	molar
mW	Milliwatt
N-Terminus	Amino-Ende der Polypeptidkette
NTP	Ribonukleotidtriphosphat
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
<i>taq</i> DNA-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris /EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
U	Unit
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WCL	Gesamtzelllysat (whole cell lysate)
wt	Wildtyp
ZBR	Zinkbinderegion

9.2 Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

9.3 Makros für *live cell imaging*

```
setBatchMode(true);
```

```
ibid01="-2012-06-19 \npFSR-207 HA-NLS-CycB-N285-2xGFP \npFSR-244 E2F1-3-230-3X-Cherry pFSR-092a pBSII Bluescript KS+";
```

```
////////1-4
```

```
ibid02="CM-2012-06-19-CM \npFSR-207 HA-NLS-CycB-N285-2xGFP \npFSR-244 E2F1-3-230-3X-Cherry pFSR-251-B 4XFLAG-Rca1";
```

```
////////5-8
```

```
ibid03="CM-2012-06-19-CM \npFSR-369 HA-NLS-Cdt1-1-101-2XGFP \npFSR-150 CycB-N285-Cherry-Aktin-Hygro pFSR-092a pBSII Bluescript KS+";
```

```
////////9-12
```

```

ibid04="CM-2012-06-19-CM \npFSR-369 HA-NLS-Cdt1-1-101-2XGFP \npFSR-150 CycB-N285-Cherry-Aktin-HydropFSR-251-B
4XFLAG-Rca1";
////////13-16
ibid05="CM-2012-06-19-CM \npFSR-584 GFP(G)-Dap-Del-38-44-RAR_Del-103-105-G-MP \n pFSR-092a pBSII Bluescript KS+";
////////17-20
ibid06="CM-2012-06-19-CM \npFSR-584 GFP(G)-Dap-Del-38-44-RAR_Del-103-105-G-MP \n pFSR-251-B 4XFLAG-Rca1";
////////21-24
ibid07="CM-2012-06-19-CM \npFSR-580 HA-NLS-GFP(G)_Rca1-204-218-G_Dap-Del-1-105 \n ";
////////25-28
ibid08="CM-2012-06-19-CM \npFSR-567 HA-NLS-GFP-Rca1-DEL-1-25_DEL-204-411 \npFSR-115-D Rca1-3xCherry-Metallo ";
////////29-32
///// enter number images (num)to process: default is 9999, for testing the script change to small number that can be
evenly divided by the number of z-stacks
num=9999;
t=10;
zstacks=3;
///// directories
dir1="R:\\2012-06-19-CM"
dir2="2012-06-19-CM-0005"
dirout="N:\\2012-06-19"
run("Colors...", "foreground=white background=white selection=white");
/////m is the number of different positions
for (m=1; m<33; m++)
{
//////////DIC-average-ch01
run("Image Sequence...", "open="+dir1+"\\\\"+dir2+"\\\\"+dir2+"_"+m+".tif_Files\\ number=num starting=1 increment=1
scale=100 file=c01 or=[] sort");
rename("ch01");
run("Grouped Z Project...", "projection=[Average Intensity] group=zstacks");
rename("ch01avg");
selectWindow ("ch01");
run("Close");
call("java.lang.System.gc");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35 normalize normalize_all");
run("Time Stamper", "starting=0 interval=t x=10 y=1000 font=40 decimal=0 anti-aliased or=min");
run("Tiff...", "save="+dirout+"\\\\"+m+"-ch01avg.tif");
rename("ch01");
getDimensions(w,h,c,s,f);
if (s>1)
{
rd=" slices keep";
}
}
if (f>1)

```

```
{
rd=" frames keep";
}
frames=f;
//////////GFP-ch03
run("Image Sequence...", "open="+dir1+"\\\\"+dir2+"\\\\"+dir2+"_" +m+".tif_Files\\ number=num starting=1 increment=1
scale=100 file=c03 or=[] sort");
rename("ch03");
run("Grouped Z Project...", "projection=[Sum Slices] group=zstacks");
rename("ch03sum");
selectWindow ("ch03");
run("Close");
call("java.lang.System.gc");
selectWindow ("ch03sum");
Stack.getStatistics(voxelCount, mean, min, max, stdDev);
setMinAndMax(0.000000000, max);
run("16-bit");
run("Tiff...", "save="+dirout+"\\\\"+m+"-ch03sum.tif");
rename("ch03");
call("java.lang.System.gc");
//////////Cherry-ch02
run("Image Sequence...", "open="+dir1+"\\\\"+dir2+"\\\\"+dir2+"_" +m+".tif_Files\\ number=num starting=1 increment=1
scale=100 file=c02 or=[] sort");
rename("ch02");
run("Grouped Z Project...", "projection=[Sum Slices] group=zstacks");
rename("ch02sum");
selectWindow ("ch02");
run("Close");
call("java.lang.System.gc");
Stack.getStatistics(voxelCount, mean, min, max, stdDev);
setMinAndMax(0.000000000, max);
run("16-bit");
run("Tiff...", "save="+dirout+"\\\\"+m+"-ch02sum.tif");
rename("ch02");
call("java.lang.System.gc");
//////////Hyperstack
run("Concatenate ", " title=[Concatenated Stacks] image_1=ch01 image_2=ch02 image_3=ch03 image_4=[-- None --]");
run("Stack to Hyperstack...", "order=xytcz channels=3 slices=1 frames=frames display=Composite");
run("Channels Tool...");
Stack.setDisplayMode("color");
Stack.setChannel(1);
run("Grays");
Stack.setChannel(2);
```

```
run("Red");
Stack.setChannel(3);
run("Cyan");
Stack.setDisplayMode("composite");
run("Tiff...", "save="+dirout+"\\m+hyper.tif");
run("Size...", "width=333 height=309 time=frames constrain average interpolation=Bilinear");
rename("hyper2");
run("Stack to Hyperstack...", "order=xyctz channels=3 slices=1 frames=frames display=Composite");
//run("Fonts...");
//setTool(9);
setFont("SansSerif", 16, "bold antialiased");
selectWindow("hyper2");
run("Channels Tool...");
Stack.setDisplayMode("grayscale");
Stack.setChannel(1);
run('Duplicate...', 'title=ch1 duplicate channels=1-1 ');
run("Enhance Contrast", "saturated=0.1 normalize_all use");
run("Grays");
run("8-bit");
run("Canvas Size...", "width=336 height=312 position=Center");
drawString("Ch1-DIC", 100, 100);
rename("ch1");
selectWindow("hyper2");
Stack.setDisplayMode("grayscale");
Stack.setChannel(2);
run('Duplicate...', 'title=ch2 duplicate channels=2-2 ');
run("Enhance Contrast", "saturated=0.1 normalize_all use");
run("Grays");
run("8-bit");
run("Canvas Size...", "width=336 height=312 position=Center");
drawString("Ch2-Cherry", 100, 150);
rename("ch2");
selectWindow("hyper2");
Stack.setDisplayMode("grayscale");
Stack.setChannel(3);
run('Duplicate...', 'title=ch3 duplicate channels=3-3 ');
run("Enhance Contrast", "saturated=0.1 normalize_all use");
run("Grays");
run("8-bit");
run("Canvas Size...", "width=336 height=312 position=Center");
drawString("Ch3-GFP", 100, 200);
rename("ch3");
////////red-cyan
```

```
run("Merge Channels...", "red=ch2 green=ch3 blue=*None* gray=*None* create keep");
Stack.setChannel(1);
run("Red");
Stack.setChannel(2);
run("Cyan");
run("RGB Color", rd);
rename("RGB1");
//////////Gray-red
run("Merge Channels...", "red=ch1 green=ch2 blue=*None* gray=*None* create keep");
Stack.setChannel(1);
run("Grays");
Stack.setChannel(2);
run("Red");
run("RGB Color", rd);
rename("RGB2");

//////////Gray-cyan
run("Merge Channels...", "red=ch1 green=ch3 blue=*None* gray=*None* create keep");
Stack.setChannel(1);
run("Grays");
Stack.setChannel(2);
run("Cyan");
run("RGB Color", rd);
rename("RGB3");
run("Stack Combiner", "stack1=ch1 stack2=ch2");
run("Stack Combiner", "stack1=[Combined Stacks] stack2=ch3");
run("RGB Color");
rename("combine1");
run("Stack Combiner", "stack1=RGB1 stack2=RGB2");
run("Stack Combiner", "stack1=[Combined Stacks] stack2=RGB3");
rename("combine2");
run("Stack Combiner", "stack1=combine1 stack2=combine2 combine");
rename("combined");
call("java.lang.System.gc");
run("Colors...", "foreground=yellow background=yellow selection=yellow");
//run("Fonts...");
//setTool(9);
setFont("SansSerif", 18, "bold antialiased");
if (m<5) {
drawString(""+ibid01+"", 40, 40);
}
else
if (m<9) {
```

```
drawString(""+ibid02+", 40, 40);
}
else
if (m<13) {
drawString(""+ibid03+", 40, 40);
}
else
if (m<17) {
drawString(""+ibid04+", 40, 40);
}
else
if (m<21) {
drawString(""+ibid05+", 40, 40);
}
else
if (m<25) {
drawString(""+ibid06+", 40, 40);
}
else
if (m<29) {
drawString(""+ibid07+", 40, 40);
}
else
if (m<33) {
drawString(""+ibid08+", 40, 40);
}
run("AVI... ", "compression=JPEG frame=7 save=["+dirout+"\\"+m+".avi]");
while (nImages>0) close();
call("java.lang.System.gc");
print(m);
}
```

10 Danksagung

Frank: Ich möchte mich bei Dir bedanken, dass Du es mir ermöglicht hast, bei Dir Doktorarbeit zu machen. Ich habe in dieser Zeit sehr viel von Dir lernen können. Du hast mich immer unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Christoph: Es ist fast unmöglich alles in Worte zu fassen. Ich möchte Dir für unzählige gute Gespräche und Diskussion über wissenschaftliche und private Themen danken. Für Deine große Hilfsbereitschaft im Allgemeinen, aber vor allem auch für Deine Unterstützung beim injizieren der Promoter Konstrukte. Außerdem für das eine oder andere Bier, dass Du mir mitgebracht hast, für Deine Nase ;-). Des Weiteren dafür, dass ich mich immer auf Dich verlassen konnte und dass Du mir immer den Rücken gestärkt hast. Es war wirklich eine tolle Zeit mit Dir als Kollege und Freund.

Christiane: Ich möchte mich bei Dir dafür bedanken, dass Du Dich um die Zellkultur und viele Kleinigkeiten im Labor gekümmert hast. Außerdem für viel gute private Gespräche und die ein oder anderen Schokoküsse, die Du bei uns ins Büro gestellt hast.

Ein großes Dankeschön geht auch an Adelheid Weißgerber. Vielen Dank für die eine oder andere Klonierung, insbesondere aber für die Klonierung der Rca1-Promoter Konstrukte. Außerdem für viele wissenschaftliche Diskussionen und Ratschläge. Aber auch für viele gute private Gespräche, bei denen ich Dich das eine oder andere Mal von der Arbeit abgehalten habe und natürlich für deine Chilipflanzen.

Bei der AG Schneuwly möchte ich mich vor allem bei Evi und Conny vielmals bedanken. Es war uns eine große Hilfe, dass Evi für uns Fliegenfutter gekocht hat und vor allem Conny mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, wenn ich Hilfe gebraucht habe! Viele Dank außerdem für den LacZ Antikörper und, dass Ihr uns die Injektionsapparatur zur Verfügung gestellt habt.

Bei meinen Mentoren Stefan Schneuwly und Peter Gallant möchte ich mich für die guten Ratschläge und Diskussionen im Rahmen meiner Jahresberichte bedanken.

Bei Frank Schnorrer möchte ich mich für die Zusendung des Fliegenstamms *rca1*^{C1474} bedanken.

Bei Wolfgang Seufert möchte ich mich auch herzlich bedanken, dass er immer kritisch meine Vorträge verfolgt hat und mich quasi wie ein zusätzlicher Mentor mitbetreut hat. Vielen

Dank für die vielen guten Ratschläge, Diskussionen und aber auch kritischen Gedanken, die mir sehr geholfen haben.

Ich möchte mich außerdem beim gesamten Lehrstuhl Genetik bedanken. Ich habe mich in den Jahren sehr wohlgeföhlt bei Euch.

Adelheid, Antje, Andrea und Christiane: Ihr habt durch Eure tolle Arbeit vieles einfacher gemacht.

Kathi, Nina und Philipp: es war toll bei Euch im Büro den einen oder anderen Tee zu trinken, Kuchen zu essen oder einfach nur zu reden, wenn ich eine kleine Auszeit gebraucht hab. Vielen Dank für die schönen Stunden innerhalb und außerhalb der Uni.

Ich möchte mich bei meiner ganzen Familie bedanken, dass sie mich nicht nur während meiner Doktorarbeitszeit unterstützt haben. Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, auf deren grenzenlose Unterstützung in jeglicher Form ich mich immer verlassen konnte und die mich immer wieder aufgebaut haben, wenn es nötig war.

Bei meinem Bruder Stefan möchte ich mich bedanken, dass Du immer für mich da warst, wenn ich Dich gebraucht habe und mich immer wieder aufgeheitert hast, wenn es mir schlecht ging. Und sei es nur, dass du mit mir eine Runde Cabrio gefahren bist.

Bei meinem Opa möchte ich mich auch für den ein oder anderen Geldbetrag bedanken, den er mir zugesteckt oder überwiesen hat und mir somit den ein oder anderen kleinen Luxus oder Urlaub ermöglicht hat.

Dani, Evi, Nina, die Michis, Lisa, Stefan, Matthias und Konstantin: Vielen Dank, dass Ihr mir so gute Freunde seid. Ich kann mich bedingungslos auf Euch verlassen und Ihr habt mich immer gestützt, unterstützt und abgelenkt, wenn es nötig war.

Marlene und Christian: Vielen Dank für eure gute Freundschaft. Ich find es super, dass wir so gut im Kontakt sind und freue mich auf viele weitere Unternehmungen, Spieleabende und gegrillte Spanferkel.

Zuletzt möchte ich mich bei Hans Emmert, Matthias Kies, Christoph Morgenthaler und Daniela Wanke für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, 26.11.2013

Martina Frank

12 Lebenslauf

Name		Frank
Vorname		Martina
Adresse		Leubl fingstraße 7 93053 Regensburg
Geburtsdatum		16.05.1985
Geburtsort		Aschaffenburg
Nationalität		deutsch
Familienstand		ledig
Schullaufbahn	1991-1995	Rusamvolksschule Sachsen bei Ansbach
	1995-1998	Platen Gymnasium Ansbach
	1998-2003	Deutsche evangelische Oberschule Kairo, Ägypten
Studium	2003-2007	Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth
	2007-2008	Diplomarbeit unter der Betreuung von PD Dr. Stefan Heidmann am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth mit dem Titel: „Untersuchung zur Struktur und Funktion der Condensin-Untereinheit Cap-G aus <i>Drosophila melanogaster</i> “
	2008-2009	Forschungsaufenthalt am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Karl-Friedrich-Bonhoeffer-Institut) in Göttingen, Abteilung für molekulare Entwicklungsbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Jäckle, Arbeitsgruppe um Ronald Kühnlein Thema: „Genetische und biochemische Charakterisierung von Fettspeicherregulatoren in <i>Drosophila</i> “
	seit 2009	Promotion unter der Betreuung von Prof. Dr. Frank Sprenger am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg mit dem Titel: „Analyse der F-box-Funktion von Rca1 in <i>Drosophila melanogaster</i> “