

**Asymmetrische Segregation
von nukleolären Proteinen
in der Mitose von *S.cerevisiae***



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

vorgelegt von Philipp Girke

aus Freising

im Jahr 2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

27.04.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Abstract	10
3. Einleitung	12
3.1 Asymmetrische Zellteilung von <i>S.cerevisiae</i>	12
3.1.1 Knospung als besondere Form der Zellteilung.....	12
3.1.1.1 Zellpolarisation und gerichtetes Wachstum	13
3.1.1.2 Cytokinese	14
3.1.2 Asymmetrische Segregation subzellulärer Strukturen und Faktoren	15
3.1.2.1 Mitotische Kernteilung.....	15
3.1.2.2 Mitotische Vererbung weiterer Zellkompartimente	17
3.1.2.3 Mechanismen der asymmetrischen Segregation determinierender Faktoren in der Mitose.....	17
3.2 Mitotische Chromosomentrennung in <i>S.cerevisiae</i>	19
3.2.1 Regulation der Chromosomentrennung	20
3.2.2 Geometrie und Mechanik der Chromosomentrennung	21
3.2.3 Einfluss der Phosphatase Cdc14 auf Chromosomentrennung.....	23
3.2.3.1 Cdc14 kontrolliert die Elongationsrate der mitotischen Spindel	24
3.2.3.2 Cdc14 ist notwendig für rDNA-Trennung.....	25
3.3 Der Nukleolus von <i>S.cerevisiae</i>	25
3.3.1 Struktur der rDNA.....	27
3.3.2 Transkription durch RNA Polymerase I und rRNA-Prozessierung	28
3.3.3 rDNA-Chromatin.....	29
3.3.4 Nukleoläre Assemblierung	30
4. Ergebnisse	32
4.1 Mitotische Segregation eines nukleoplasmatischen Proteins und eines Kernhistons	32
4.2 Mitotische Segregation nukleolärer Proteine	34
4.2.1 Mitotische Segregation von Rpa135	35
4.2.2 Mitotische Segregation von Nop56.....	36
4.2.3 Mitotische Segregation von Nsr1	37
4.2.4 Mitotische Segregation von Net1.....	38
4.2.5 Mitotische Segregation von Fob1.....	39
4.2.6 Mitotische Segregation von Hmo1.....	41
4.2.7 Übersicht zur mitotischen Segregation nukleolärer Proteine.....	42
4.3 Dynamik nukleolärer Proteine	43
4.3.1 Dynamik von Rpa135.....	44
4.3.2 Dynamik von Hmo1	46

4.4 Einfluss der Phosphatase Cdc14 auf das Segregationsverhalten von Rpa135 und Hmo1	48
4.5 Einfluss der Trennungsdynamik auf das Segregationsverhalten von Rpa135 und Hmo1	51
4.6 Einfluss von RNA Polymerase I auf das Segregationsverhalten nukleolärer Proteine	56
4.7 Reziprokes Verhalten von Rpa135 und Hmo1	60
4.8 Struktur-Funktionsanalysen zu Hmo1	64
4.8.1 Überexpression von Hmo1	66
4.8.2 Bedeutung von Nukleinsäurebindung für die Lokalisation von Hmo1	69
4.8.3 Bedeutung der Selbstinteraktion für die Lokalisation von Hmo1	80
4.8.4 Bedeutung des C-Terminus für die Lokalisation von Hmo1	86
5. Diskussion	91
5.1 Allgemeine Mechanismen nukleolärer Proteinsegregation	91
5.1.1 Die Assoziation mit rDNA ist entscheidend für das Segregationsverhalten nukleolärer Proteine	91
5.1.2 Die transkriptionsabhängige Organisation des Nukleolus beeinflusst die mitotische Verteilung nukleolärer Proteine	93
5.1.3 Geometrie und Mechanik der Chromosomentrennung sind ausschlaggebend für die Segregation nukleolärer Proteine	96
5.1.4 Modellvorstellung zur mitotischen Segregation nukleolärer Proteine allgemein	98
5.2 Nukleoläre Lokalisation und mitotische Segregation von Hmo1	99
5.2.1 Eine Kernlokalisationssequenz und hochaffine rDNA-Bindung sind grundlegend für die normale nukleoläre Lokalisation von Hmo1	100
5.2.2 Oligomerisierung von Hmo1 leistet einen entscheidenden Beitrag zu nukleolärer Lokalisation und mitotischer Segregation	101
5.2.3 Offene Fragen zur nukleolären Lokalisation von Hmo1	102
5.2.4 Verdrängung durch RNA Polymerase I könnte der Schlüssel zum besonderen Segregationsverhalten von Hmo1 sein	103
5.2.5 Hmo1 trägt zur Kompaktierung der rDNA bei	105
5.2.6 Multiple Regionen von Hmo1 sind notwendig für seine biologische Aktivität	106
5.2.7 Modell zur mitotischen Segregation von Hmo1	106
5.3 Konsequenzen der asymmetrischen Nukleolustrennung	107
6. Methoden	110
6.1 Arbeiten mit <i>E.coli</i>	110
6.1.1 Kultivierung von <i>E.coli</i>	110
6.1.2 Transformation von <i>E.coli</i> mittels Elektroporation	110
6.2 Arbeiten mit <i>S.cerevisiae</i>	111
6.2.1 Kultivierung von <i>S.cerevisiae</i>	111
6.2.2 Transformation von Hefezellen mit der Lithium-Acetat-Methode	111
6.2.3 Konservierung von Hefestämmen	112
6.2.4 Kreuzung haploider Hefestämme	112

6.2.5 Sporulation diploider Hefestämme	112
6.2.6 Wachstumstest von Hefestämmen	113
6.3 Genetische und molekularbiologische Methoden	113
6.3.1 DNA-Präparation	113
6.3.1.1 Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> mittels Kochlysatmethode	113
6.3.1.2 Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	113
6.3.1.3 Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> mittels Säulenreinigung	114
6.3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus <i>S.cerevisiae</i>	114
6.3.2 Agarosegelelektrophorese und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	114
6.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	115
6.3.3.1 Standard PCR mit KOD-Polymerase	116
6.3.3.2 PCR für C-terminale Epitopmarkierung	116
6.3.3.3 MAT-PCR.....	117
6.3.4 Gerichtete Mutagenese.....	118
6.3.5 Restriktionsverdau von DNA	118
6.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	119
6.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	119
6.3.8 Sequenzierung.....	119
6.3.9 <i>In vitro</i> Transkription	119
6.4 Proteinreinigung und proteinanalytische Methoden.....	120
6.4.1 Proteinreinigung aus <i>E.coli</i>	120
6.4.2 Proteinlysate von <i>S.cerevisiae</i> Kulturen	121
6.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	121
6.4.4 Western-Blot, Immunodetektion und Quantifizierung von Western-Blots.....	122
6.4.5 Konzentrationsbestimmung und Angleichung von gereinigten Proteinen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.....	124
6.5 Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen	125
6.5.1 Nicht konfokale Mikroskopie.....	125
6.5.2 Konfokale Spinning-disc-Mikroskopie	125
6.5.3 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie und Bleichexperimente	127
6.5.4 Bearbeitung und Quantitative Auswertung von Mikroskopiedaten	128
6.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	129
7. Material.....	131
7.1 Medien	131
7.1.1 Bakterienmedien und Stammlösungen für Bakterienmedien	131
7.1.2 Hefemedien und Stammlösungen für Hefemedien	131
7.2 Puffer und Lösungen.....	134
7.3 Nukleinsäuren für EMSA-Studien.....	137

7.4 Proteine	137
7.4.1 Antikörper und Antiseren.....	137
7.4.2 Proteine für EMSA-Studien.....	138
7.5 Hefestämme	138
7.6 Software und Makros	142
7.6.1 Software	142
7.6.2 Makros.....	142
8. Literatur	144
9. Anhang	152
9.1 Ergänzungen zu den Ergebnissen	152
9.1.1 Wachstumstests zu endogenen GFP-Fusionen	152
9.1.2 Wachstumstests zu Hmo1-Derivaten	153
9.1.3 Proteinangleichung und Kontrollen zu EMSAs	155
9.1.4 Einfluss von <i>rrn3(S213P)</i> auf die Segregation nukleolärer Proteine	157
9.1.5 Sonde für transkriptionelle Aktivität der RNA Polymerase I <i>in vivo</i>	158
9.1.6 Mitotische Segregation einer Kondensinuntereinheit	160
9.2 Verzeichnisse	162
9.2.1 Abkürzungsverzeichnis	162
9.2.2 Abbildungsverzeichnis	165
9.2.3 Tabellenverzeichnis	166
10. Lebenslauf	167
11. Dank	168

1. Zusammenfassung

Der Nukleolus der Bäckerhefe ist ein Subkompartiment des Zellkerns, welches um die ribosomale DNA auf Chromosom XII assembliert. Neben ribosomaler DNA und RNA beinhaltet der Nukleolus eine Vielzahl an Proteinen, welche für Transkription ribosomaler Gene, Prozessierung der Primärtranskripte und auch Zellzyklusregulation von Bedeutung sind (Taddei und Gasser, 2012; Pederson, 2011). Ribosomale DNA wird in der Mitose wie jegliche chromosomale DNA symmetrisch auf Mutter und Tochter verteilt, der umgebende Zellkern hingegen wird asymmetrisch vererbt (Enserink und Kolodner, 2010; Jorgensen et al., 2007). Daher ergibt sich die Frage, welches Verhalten nukleoläre Proteine in der Mitose zeigen. Das Ziel dieser Arbeit war, einen tieferen Einblick in das mitotische Segregationsverhalten nukleolärer Proteine und die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten. Hierfür wurden endogene GFP-Fusionen von verschiedenen nukleolären Proteinen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Es konnte festgestellt werden, dass nukleoläre Proteine in der Mitose drei verschiedene Segregationsmuster vorweisen. Von der RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135, den Prozessierungsfaktoren Nop56 und Nsr1, sowie der RENT-Komponente Net1 erhielt der Nukleolus der Mutter im Zuge der mitotischen Segregation einen höheren Proteinanteil als der Nukleolus der Tochter. Die Verteilung dieser Proteine entsprach somit der des nukleoplasmatischen Proteins mCherry-NLS. Das rDNA bindende Protein Fob1 hingegen zeigte eine gleichmäßige Verteilung auf Mutter und Tochter, was ebenso für das stabil an DNA bindende Kernhiston Hta2 zutrifft. Das rDNA-Bindeprotein Hmo1 wiederum, welches mit transkribierten Regionen der rDNA assoziiert, zeigte ein besonderes Verteilungsverhalten in der Mitose. Von diesem Protein erhielt der Nukleolus der Tochter den höheren Anteil und damit zeigte Hmo1 eine der Kernsegregation und den meisten anderen nukleolären Proteinen genau gegenläufige Asymmetrie.

Als grundlegender Punkt musste getestet werden, ob die asymmetrische Kernteilung einen entscheidenden Einfluss auf die Segregation nukleolärer Proteine nimmt. Verschiedene Experimente machten deutlich, dass dies nicht der Fall ist. Sowohl Rpa135 als auch Hmo1 zeigten bei Bleichexperimenten keinen effizienten Austausch zwischen zwei separaten nukleolären Strukturen innerhalb eines nukleoplasmatischen Kontinuums während der Anaphase. Zudem wurde in einer *Δrpa12* Mutante ein gegenläufiger Effekt auf die Segregation nukleolärer Proteine und Nukleoplasma beobachtet. Nach diesen Ergebnissen sollte die Art der Assoziation eines nukleolären Proteins mit rDNA entscheidend für das Segregationsverhalten sein. Da in *Δrpa12* ein nukleolusspezifischer Effekt auf Proteinsegregation auftrat lässt zudem vermuten, dass Transkription durch RNA Polymerase I während der Anaphase in *S.cerevisiae* stattfindet und dass die organisatorische Funktion von RNA Polymerase I für den Nukleolus die mitotische Segregation von nukleolären Proteinen beeinflusst.

Da die Chromosomentrennung in der Bäckerhefe deutlich asymmetrisch verläuft und eine spezielle Mechanik aufweist (Renshaw et al., 2010), wurde vermutet, dass dies der ausschlaggebende Faktor sein könnte. Bestätigt wurde dies durch in den Mutanten *cdc14-3* und *Δcin8* gemachte Beobachtungen. Hier konnte eine deutlich veränderte Trennungsmechanik ausgemacht werden und die Proteine Rpa135 und Hmo1 wurden wesentlich symmetrischer verteilt. Geometrie und Mechanik der Chromosomentrennung sollten also die mitotische Segregation nukleolärer Proteine bestimmen. Zudem konnte durch diese Experimente ausgeschlossen werden, dass der Knospenhals als mögliche Barriere die mitotische Segregation nukleolärer Proteine beeinflusst.

Das Zurückbleiben eines Proteins im Nukleolus der Mutter kann durch effiziente nukleoläre Retention des Proteins in Verbindung mit dynamischer rDNA-Assoziation und der asymmetrischen Chromosomentrennung erklärt werden. Dies sollte für die RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135 und die Prozessierungsfaktoren Nop56 und Nsr1 zutreffen. Gleichverteilung wie im Falle von Fob1 sollte durch stabile DNA-Bindung zustande kommen. Das besondere Verhalten von Hmo1 allerdings kann mit diesen Argumenten nicht erklärt werden. Daher wurden Struktur-Funktionsanalysen für Hmo1 durchgeführt, um die Mechanismen seiner nukleolären Lokalisation und mitotischen Vererbung aufzuklären. Hierbei wurden verschiedene Derivate von Hmo1 hinsichtlich subzellulärer Lokalisation und Nukleinsäurebindung mittels EMSA-Studien charakterisiert. rDNA-Bindung stellte sich als grundlegend, jedoch nicht hinreichend für normale Lokalisation und Segregation heraus. Zudem stellte Oligomerisierung eine Grundvoraussetzung dar. Des Weiteren zeigte Hmo1 in Situationen niedriger transkriptioneller Aktivität eine massive nukleoläre Anreicherung, welche ebenso von Oligomerisierung abhängig war und die Aktivität von RNA Polymerase I war notwendig für die Etablierung der Asymmetrie von Hmo1. Daher wird vermutet, dass das besondere Segregationsverhalten von Hmo1 durch seine intrinsischen Eigenschaften im Zusammenhang mit einer durch RNA Polymerase I verursachten Verdrängung zustande kommt. Während der Anaphase wird ein Schwesterchromatid aus dem Nukleolus der Mutter in die Knospe gezogen, wobei speziell das für die Tochter bestimmte Chromatid starke Streckungs- und Kompaktierungsereignisse durchläuft. Dadurch wird dieses vermutlich deshalb von RNA Polymerase I depletiert, da das Enzym dynamisch mit rDNA wechselwirkt und somit im Nukleolus der Mutter zurückgehalten wird. Innerhalb einer elongierten Anaphasestruktur könnte dann eine Verschiebung von Hmo1 in die töchterlichen Bereiche erfolgen, welche von Polymerase depletiert sind. Hier könnte Hmo1 durch rDNA-Bindung und Oligomerisierung massiv anreichern. Nach vollständiger rDNA-Trennung kann kein Austausch zwischen beiden Nukleoli erfolgen und die Asymmetrien sind endgültig etabliert.

Vermutlich werden durch Geometrie und Mechanik der rDNA-Trennung unterschiedliche rDNA-Chromatinzustände von Mutter- und Tochternukleolus etabliert. Der Mutternukleolus verfügt nach der Trennung über eine höhere Menge an RNA Polymerase I und Prozessierungsfaktoren als der

Tochternukleolus und befindet sich vermutlich in einem transkriptionell hochaktiven Zustand. Der Tochternukleolus hingegen verfügt über eine höhere Menge an Hmo1 und befindet sich vermutlich in einem transkriptionell weniger aktiven Zustand.

2. Abstract

The budding yeast nucleolus is a subnuclear compartment which assembles around ribosomal DNA located on Chromosome XII. In addition to ribosomal DNA and RNA, the nucleolus comprises various proteins, which are necessary for transcription of ribosomal genes, processing of the primary transcripts and cell cycle regulation (Taddei and Gasser, 2012; Pederson, 2011). Like any chromosomal DNA, rDNA is equally distributed between mother and daughter cells during mitosis (Enserink and Kolodner, 2010). On the contrary, the surrounding nucleoplasm is asymmetrically inherited (Jorgensen et al., 2007). Therefore, the question arises how nucleolar proteins are distributed in mitosis. The aim of this study was to get insight into the mitotic segregation behaviour of nucleolar proteins and the underlying mechanisms. To this end, endogenous GFP-fusions of nucleolar proteins were analyzed by confocal fluorescence microscopy.

The basic observation was that nucleolar proteins show three different mitotic segregation patterns. In case of the RNA polymerase I subunit Rpa135, the processing factors Nop56 and Nsr1, as well as the RENT component Net1, the mother nucleolus obtained a larger portion than the daughter nucleolus. This resembled the segregation behaviour of the nucleoplasmic protein mCherry-NLS. However, the rDNA binding protein Fob1 showed equal distribution, which was also the case for stably DNA bound core histone Hta2. Astonishingly, the rDNA binding protein Hmo1, which associates with transcribed rDNA regions, showed special segregation behaviour. For this protein, the daughter nucleolus obtained a larger portion than the mother nucleolus. Therefore, Hmo1 showed converse segregation compared to nucleoplasm and most other analyzed nucleolar proteins.

As a basic matter, a possible influence of the segregation of nucleoplasm on nucleolar protein segregation had to be tested. Several experiments showed that nuclear division is not the crucial factor for nucleolar protein segregation. In bleaching experiments, Rpa135 as well as Hmo1 displayed nucleolar retention and therefore no efficient exchange between two nucleolar structures in a nucleoplasmic continuum during anaphase. Furthermore, a differential effect on nuclear and nucleolar protein segregation could be observed in a *Δrpa12* mutant. The conclusion was drawn that the nature of rDNA association should determine the mode of mitotic segregation for a nucleolar protein. The fact that a nucleolus specific segregation effect was observed in *Δrpa12* suggests that rDNA transcription takes place during mitosis and that the organizing function of RNA polymerase I for the nucleolus plays a role for nucleolar protein segregation.

The fact that the process of chromosome segregation is highly asymmetric in budding yeast and shows special mechanics (Renshaw et al., 2010) led to the conclusion that this could be the crucial factor for nucleolar protein segregation. Confirmation came from experiments conducted in *cdc14-3* and *Δcin8* mutants. In those strains, geometry and mechanics of nucleolar segregation were severely affected

and in addition Rpa135 and Hmo1 showed quite equal segregation. So geometry and mechanics of chromosome segregation should be crucial for nucleolar protein segregation. Furthermore, this experiments excluded the bud neck as a potential barrier influencing nucleolar segregation.

Mother retention can be explained with efficient nucleolar retention of the protein, dynamic rDNA association, and asymmetric chromosome segregation. This should be the case for the RNA polymerase I subunit Rpa135 and the processing factors Nop56 and Nsr1. The equal distribution of Fob1 should be caused by stable DNA binding. However, the special behaviour of Hmo1 cannot be explained with those arguments. Therefore, structure function analyses for Hmo1 were conducted to elucidate the mechanisms of nucleolar localization and mitotic segregation. Several derivatives of Hmo1 were characterized by microscopy and EMSAs. rDNA binding turned out to be essential, but not sufficient for normal localization and segregation. In addition, oligomerization is a requirement for normal behaviour of the protein. Hmo1 showed massive nucleolar enrichment in situations of low RNA polymerase I activity and therefore, oligomerization was a prerequisite. Furthermore, high RNA polymerase I activity was necessary for the establishment of Hmo1 asymmetry during mitosis. Therefore, the conclusion was drawn that the intrinsic properties of Hmo1 and a displacement mechanism caused by polymerase I could work together to establish the special segregation behaviour. During anaphase, one sister chromatid is being pulled out of the mother nucleolus in direction of the bud. During this process, only the daughter destined chromatid experiences massive stretching and recoiling. This sister chromatid gets depleted from RNA polymerase I supposedly because of the dynamic rDNA association of the enzyme and resulting mother retention. Within the elongated structure, Hmo1 could move to daughter located regions which are depleted from RNA polymerase I. Here, it should be able to bind massively through direct rDNA binding and oligomerization. After complete segregation, no exchange can occur between the two nucleoli and the asymmetries are finally established.

Therefore, geometry and mechanics of rDNA segregation seem to cause the establishment of differential rDNA chromatin states in mother and daughter cells. The mother nucleolus gets a larger portion of RNA polymerase I as well as processing factors and is supposedly in a highly transcriptional state. On the contrary, the daughter nucleolus gets a larger portion of Hmo1 and is supposedly in a state of low transcriptional activity.

3. Einleitung

3.1 Asymmetrische Zellteilung von *S.cerevisiae*

Bei vorliegender Arbeit wurde die asymmetrische Teilung des Nukleolus als Subkompartiment des Zellkerns in der Mitose der Bäckerhefe untersucht. *S.cerevisiae* durchläuft eine besondere Form der vegetativen Zellteilung, nämlich Knospung, und stellt als einzelliger Eukaryot einen attraktiven Modellorganismus zur Erforschung der grundlegenden Mechanismen von Zellpolarisation und asymmetrischer Zellteilung dar (Bi und Park, 2012). Neben asymmetrischen Wachstums und asymmetrischer Teilung des Zellkörpers an sich erfolgt letztendlich auch eine asymmetrische Segregation subzellulärer Kompartimente, wie z.B. des Zellkerns (Jorgensen et al., 2007). Auf Ebene einzelner determinierender Faktoren, wie z.B mRNA oder episomaler DNA, nehmen verschiedene Mechanismen Einfluss auf die asymmetrische Segregation, welche teils sehr detailliert beschrieben sind (Heym und Niessing, 2012; Gehlen et al., 2011).

Der Nukleolus ist ein nicht membranbegrenztes Subkompartiment des Zellkerns, welches um die ribosomale DNA, gelegen auf Chromosom XII, als Kernkomponente assembliert. Neben dieser speziellen DNA sind viele Proteinkomponenten und weitere Nukleinsäuren im Nukleolus anzutreffen, welche für Transkription, Prozessierung von Transkripten, Instandhaltung der rDNA, sowie Zellzyklusregulation erforderlich sind (Hernandez-Verdun et al., 2010; Pederson, 2011). Regulation, Geometrie und Mechanik der mitotischen Chromosomentrennung an sich wurden bereits ausführlich erforscht und auch besondere Ansprüche im Falle der rDNA-Trennung, wie z.B. die Notwendigkeit der Phosphatase Cdc14, konnten bereits herausgearbeitet werden (Enserink und Kolodner, 2010; Renshaw et al., 2010; Torres-Rosell et al., 2004). rDNA wird über die mitotische Spindel gleichverteilt, hinsichtlich der mitotischen Segregation von nukleolären Proteinkomponenten und den zugrunde liegenden Mechanismen allerdings ist wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit soll einen tieferen Einblick in eben diese Thematik und damit auch in die nukleoläre Architektur selbst ermöglichen.

3.1.1 Knospung als besondere Form der Zellteilung

Das Wachstum von Hefezellen stellt einen hochgeordneten Prozess dar, welcher mit dem Ablauf der Zellzyklusphasen reguliert wird (Bi und Park, 2012). In der G1-Phase (Gap1-Phase) erfolgt isotropes Wachstum, um das Zellvolumen nach vorangegangener Teilung zu vergrößern. Während der folgenden S-Phase (Synthese-Phase) ist die Wachstumsmaschinerie polarisiert und das gerichtete Auswachsen einer Knospe findet statt. Die anschließende G2-Phase (Gap2-Phase) dient wiederum dem isotropen Wachstum der gebildeten Knospe, damit diese vor der Teilung eine ausreichende Größe erlangt. In der M-Phase (Mitose-Phase) erfolgt eine Neuorientierung des Wachstumsapparates hin zum Knospenhals, damit an dieser Stelle die Invagination der Plasmamembran und die Bildung der Septa stattfinden

können. Mit der Cytokinese entstehen letztendlich zwei unabhängige Zellen, welche erneut in die G1-Phase eintreten können.

Von der Bäckerhefe bis zum Menschen nehmen die sog. GTPase-Module eine ganz zentrale Rolle für Zellpolarisation und gerichtetes Wachstum ein (Bi und Park, 2012). Daher sollen diese vorweg erläutert werden, bevor auf die Mechanismen von Zellpolarisation, gerichtetem Knospungswachstum und Cytokinese eingegangen wird. GTPase-Module bestehen aus G-Proteinen (GTPasen) und deren Aktivitätszustand regulierenden GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) und GAPs (GTPase Activating Proteins). Die GTPasen können in einem aktiven, GTP (Guanosintriphosphat) gebundenem Zustand oder einem inaktiven, GDP (Guanosindiphosphat) gebundenem Zustand vorliegen. GEFs fördern den Austausch von GDP gegen GTP und können die G-Proteine in den aktiven Zustand überführen, GAPs wiederum stimulieren die intrinsische Hydrolyseaktivität der GTPasen und fördern somit den Übergang in den inaktiven Zustand. Nach neueren Erkenntnissen ist für die Funktionen der G-Proteine nicht das Vorliegen eines bestimmten Aktivitätszustandes, sondern der dynamische, durch GEFs und GAPs geförderte Wechsel der Aktivitätszustände entscheidend.

3.1.1.1 Zellpolarisation und gerichtetes Wachstum

Grundlegend treten im Falle der Bäckerhefe definierte Knospungsmuster auf, die Festlegung der Knospungsstelle erfolgt also nicht zufällig (Bi und Park, 2012). Haploide Zellen des Paarungstyps a oder α (und auch diploide a/a und α/α Zellen) zeigen axiale Knospung, wobei nach Cytokinese die nächste Knospungsstelle in unmittelbarer Nachbarschaft zur vorhergehenden festgelegt wird. Diploide a/α Zellen hingegen zeigen ein bipolares Muster, wobei die Knospung abwechselnd an den entgegengesetzten Zellpolen stattfindet. Im Falle der Mutter kann hier jedoch auch axiale Knospung stattfinden. Das Knospungsmuster wird durch *BUD* Gene bestimmt. Für die Aufrechterhaltung der räumlichen Information dienen molekulare Orientierungspunkte, im Falle von axialer Knospung wären dies zum einen grundlegend Septine und zum anderen die Proteine Bud3, Bud4, Axl1 und Axl2. Bei bipolarer Knospung dienen Bud8, Bud9, Rax1 und Rax2 als räumliche Orientierung und deren Position wird wiederum teils durch Septine und teils durch Cytoskelettelemente bestimmt.

Nach Festlegung der Knospungsstelle muss in der späten G1-Phase die Rekrutierung der Wachstumsmaschinerie erfolgen und gerichtetes Wachstum kann stattfinden (Bi und Park, 2012). Hierbei leistet das Rsr1 GTPase-Modul einen entscheidenden Beitrag. Durch seine Aktivität wird ein weiteres Modul, das Cdc42 GTPase-Modul, an die Knospungsstelle rekrutiert und dessen Aktivität wiederum sorgt für die Rekrutierung und Aktivierung des Formins Bni1, welches eine Untereinheit des Polarisoms darstellt. Ausgehend von Formin erfolgt die Nukleation von Aktinfilamenten und damit entsteht ein polarisiertes, zur Knospungsstelle hin gerichtetes Transportsystem. Mit Hilfe des Motorproteins Myo2 können dann mit entscheidenden Faktoren beladene Golgi-Vesikel gezielt zur

Knospungsstelle transportiert werden und gerichtetes Wachstum kann stattfinden. Ein weiteres Modul, das Rho1 GTPase-Modul, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für polares Wachstum. Es nimmt Einfluss auf Aktinorganisation und ist als Aktivator von Glukan- und Chitinsynthasen entscheidend für die Remodellierung und Expansion der Zellwand an der Knospungsstelle. Neben den Aktinkabeln werden auch Aktinflecken an der Knospungsstelle gebildet, deren Nukleation ausgehend von Arp2/3 Komplexen erfolgt und welche entscheidend für Endocytose sind. Durch Exo- und Endocytose kann die Menge an Plasmamembran und die Menge von Enzymen für Zellwandsynthese, den Glukan- und Chitinsynthasen, an der Knospungsstelle reguliert werden. Während der S-Phase erfolgt ein in die Länge gerichtetes apikales Wachstum der Knospe durch hohe Präsenz von Cdc42 und Bni1 vorwiegend an der Knospenspitze. Gleichzeitig werden zusätzliche Aktinkabel durch ein weiteres Formin, nämlich Bnr1, auf den entstehenden Knospenhals ausgerichtet. Nach Ende der S-Phase erfolgt eine gleichmäßige Verteilung von Cdc42 über den Knospenkortex und damit verbunden ein gleichmäßiges, sog. isotropes Knospenwachstum.

3.1.1.2 Cytokinese

Nach Auswachsen der Knospe und mitotischer Segregation diverser Zellkompartimente und Faktoren muss letztendlich die vollständige räumliche Trennung und physische Separation der Knospe von der Mutterzelle erfolgen. Diese abschließenden Schritte des Zellzyklus werden als Cytokinese bezeichnet (Bi und Park, 2012). Septine lokalisieren zu einem sehr frühen Zeitpunkt an einer Knospungsstelle und haben unter anderem eine Funktion als räumliche Orientierungspunkte für die Zellpolarisationsmaschinerie und damit auch Cdc42. Trotzdem ist die frühe Assemblierung von Septinringen an der Knospungsstelle auch wiederum abhängig von Cdc42. Generell scheinen Septinringe ein notwendiges Grundgerüst für die Rekrutierung weiterer Cytokinesefaktoren und –strukturen, wie z.B. des kontraktiven Aktomyosinringes, am Knospenhals darzustellen. Mit zunehmendem Knospenwachstum erfolgt eine Erweiterung des Septinringes am Knospenhals und letztendlich eine Spaltung in eine töchterlich und eine mütterlich gelegene Ringstruktur in der späten Anaphase bzw. Telophase der Mitose. An diesem Punkt erfolgt auch eine Reorientierung der Wachstumsmaschinerie hin zum Knospenhals. Nun kann der kontraktile Aktomyosinring zwischen den Septinringen assembliert werden und bei Kontraktion des selbigen kann über Vesikeltransport an den Knospenhals ausreichend Membran für die Invagination zur Verfügung gestellt werden. Gleichzeitig mit diesen Prozessen erfolgt auch die Bildung des primären Septums vom Kortex des Knospenhalses aus, welches einen hohen Chitinanteil aufweist. Abschließend werden dann auf Mutter- und Tochterseite die sekundären Septa gebildet, welche eine Chitin- und Glukanzusammensetzung entsprechend der regulären Zellwand aufweisen und die Degradation des primären Septums, sowie geringer Anteile des sekundären Septums erfolgt von der Tochter ausgehend durch hydrolytische

Enzyme. Somit ist die Knospe letztendlich physisch von der Mutterzelle separiert. Die folgende Abbildung 3.1 zeigt die Lokalisation der GTPase Cdc42 und die Organisation des Aktincytoskellts in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus.

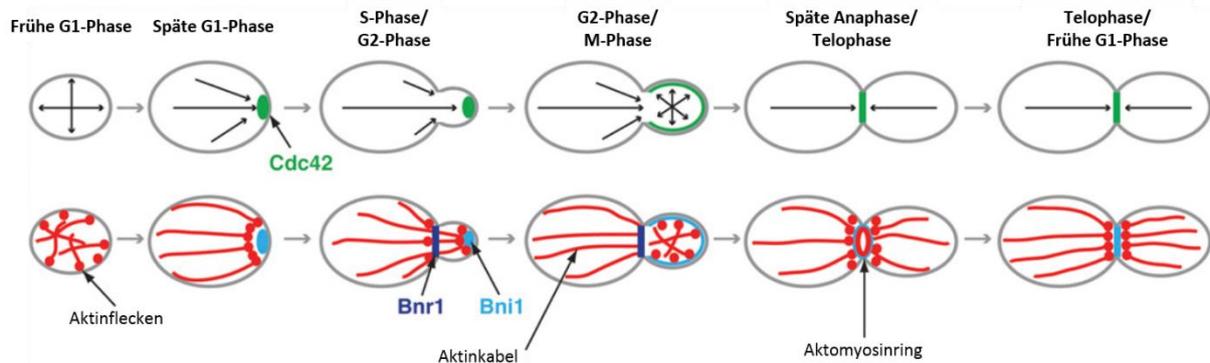


Abbildung 3.1: Gerichtetes Wachstum und Cytokinese im Zellzyklus der Bäckerhefe

In der frühen G1-Phase erfolgt isotropes Zellwachstum und das Aktincytoskelet ist nicht polarisiert. In der späten G1-Phase lokalisiert Cdc42 an der determinierten Knospungsstelle, rekrutiert und aktiviert das Formin Bni1, wodurch das Aktincytoskelet polarisiert wird. Während der S-/G2-Phase findet apikales Knospenswachstum statt und durch das Formin Bnr1 wird bereits ein Teil der Wachstumsmaschinerie auf den Knospenhals gerichtet. In der G2-/M-Phase lokalisiert Cdc42 über den gesamten Knospenkortex, wodurch auch der Wachstumsapparat homogen auf den gesamten Knospenkortex gerichtet wird und isotropes Wachstum stattfinden kann. In der späten Mitose wird Cdc42 an den Knospenhals rekrutiert und das Aktincytoskelet ist nun in Mutter und Tochter auf diesen Bereich gerichtet. Der kontraktile Aktomyosinring kann nun assembliert werden und während dessen Kontraktion erfolgt die Bildung der Septa in der Cytokinese. Verändert nach Bi und Park, 2012.

3.1.2 Asymmetrische Segregation subzellulärer Strukturen und Faktoren

3.1.2.1 Mitotische Kernteilung

Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten bleibt die Kernhülle im Falle der Bäckerhefe über den gesamten Zellzyklus hinweg erhalten, weswegen von einer Endomitose gesprochen wird. Aus diesem Grunde muss auch die Spindel von *S.cerevisiae* eine andere Organisation als bei höheren Eukaryoten aufweisen (De Souza und Osmani, 2007). Die Spindelpolkörper der Hefe sind im Gegensatz zu den Centrosomen höherer Eukaryoten in die Kernhülle eingebettet und somit können auf nukleoplasmatischer Seite nukleierende Mikrotubuli Kontakt zu den Kinetochoren der Chromosomen aufnehmen und auf cytoplasmatischer Seite nukleierende Astralmikrotubuli können Kontakt zum Zellkortex aufnehmen und für eine korrekte Orientierung während der Zellteilung sorgen. Für die Positionierung des Zellkerns am Knospenhals und die Orientierung der Spindel entlang der Polarisationsachse existieren zwei bekannte Mechanismen (Markus et al., 2012). Zum einen agiert ein früher, Kar9 abhängiger Mechanismus über polarisierte, in die Tochter gerichtete Aktinkabel. Über die Adapterproteine Bim1 und Kar9 stellen die Astralmikrotubuli Kontakt zu dem Motorprotein Myo2 her, welches entlang der Aktinkabel wandert und eine in die Tochter gerichtete Zugkraft auf den Kern erzeugt. Ein weiterer Mechanismus zur korrekten Spindelorientierung agiert über das Mikrotubuli-bindende Motorprotein

Dyn1. Das Motorprotein weist eine asymmetrische Lokalisation am Kortex der Knospe auf und bei Kontakt mit einem Astralmikrotubulus kann es ebenfalls eine in die Tochter gerichtete Zugkraft erzeugen. In der Anaphase kommt es zur Chromosomensegregation und durch innerhalb des Kerns verbundene interpolare Mikrotubuli, die sog. Zentralspindel, wird über Motorproteine eine auf beide Spindelpolkörper gerichtete Druckkraft erzeugt (Khmelninskii und Schiebel, 2008). Zusammen mit über Astralmikrotubuli zum Kortex gerichteten Zugkräften erfolgt die Elongation des Zellkerns durch den Knospenhals (Markus et al., 2012). Im Bereich des Knospenhals wird eine Invagination der Kernmembran ausgebildet, welche mit zunehmendem Abstand der Kerne eine stärkere Ausprägung erfährt und bei maximalem Abstand der globulären Kerne sind diese in der späten Anaphase noch kurzzeitig über einen dünnen Nukleoplasmakanal miteinander verbunden. In diesem Bereich wird eine Diffusionsbarriere etabliert, was effizienten Proteinaustausch der beiden Kerne unterbindet, noch bevor diese endgültig physisch voneinander getrennt vorliegen (Boettcher et al., 2012). Nach vollständiger Segregation verfügen die kleineren Tochterzellen immer über einen kleineren Kern als die Mutterzellen (Jorgensen et al., 2007). Wie dieser Größenunterschied mechanistisch genau zustande kommt, ist bislang unklar. Zellen könnten über unbekannte Mechanismen ein konstantes Verhältnis von Kernvolumen zu Cytoplasmavolumen aufrechterhalten und Volumenunterschiede von Mutter und Knospe könnten somit entscheidend sein. Auch die asymmetrische Organisation der Spindel selbst könnte als entscheidender Faktor der Trennungsgeometrie einen Einfluss auf die asymmetrische Kernteilung nehmen (McCarthy und Goldstein, 2006). Des Weiteren könnten der Knospenhals als Engstelle oder Trennungsdynamik eine Rolle spielen. Der schematische Ablauf der mitotischen Kernteilung in *S.cerevisiae* ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

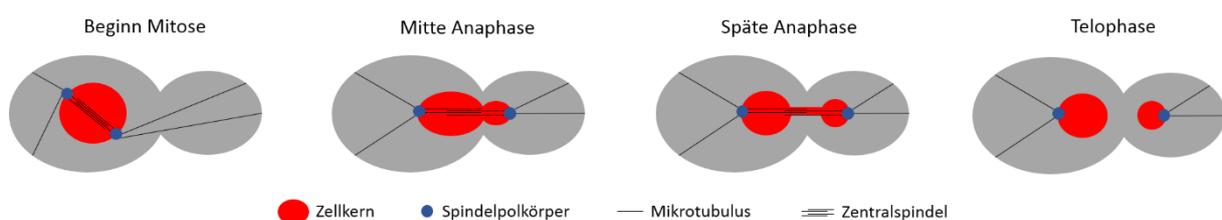


Abbildung 3.2: Asymmetrische Kernteilung der Bäckerhefe

Mit Beginn der Mitose wird der Zellkern durch Interaktion von Astralmikrotubuli und Zellkortex am Knospenhals positioniert. Bei Einsetzen der Anaphase elongiert die Zentralspindel durch Aktivität von Kinesinmotorproteinen und neben diesen Druckkräften werden Zugkräfte über Astralmikrotubuli aufgebaut. Die Elongation des Kerns durch den Knospenhals schreitet fort und in der späten Anaphase sind die beiden Kerne in Mutter und Tochter durch einen zunehmend verjüngten Nukleoplasmakanal miteinander verbunden. Im Bereich dieses Nukleoplasmakanals erfolgt die Ausbildung einer Diffusionsbarriere. In der Telophase deassembliert die mitotische Spindel und die Kerne in Mutter und Tochter sind endgültig voneinander getrennt, wobei der Tochterkern über das deutlich geringere Volumen verfügt.

3.1.2.2 Mitotische Vererbung weiterer Zellkompartimente

Auch im Falle weiterer zellulärer Kompartimente spielen Zellpolarisation und gerichteter Transport über das Cytoskelett eine wichtige Rolle bei der Vererbung. Vakuolen, Mitochondrien, Peroxisomen, und der Golgi-Apparat werden über Motorproteine entlang polarisierter Aktinkabel in die Knospe transportiert und in manchen Fällen erfolgt auch eine kortikale Verankerung, was eine Regulation der von der Knospe aufgenommenen Anteile ermöglicht (Bretscher, 2003; Boldogh et al., 2004). Die Vererbung von Zellkompartimenten erfolgt durch Wachstum und Teilung bereits existierender Matrizen, wobei dies sicherlich für gewisse Kompartimente, wie z.B. die Mitochondrien der einzige Biosyntheseweg sein sollte. Generell wäre allerdings auch denkbar, dass das endoplasmatische Retikulum als Plattform für de novo Synthese zumindest mancher Kompartimente, wie z.B. Peroxisomen, dient. Im Jahre 2013 wurde eine Studie der Gruppe um Jacques Neefjes veröffentlicht, welche sich ausführlich mit der Beantwortung dieser Fragen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie beschäftigte (Menendez-Benito et al., 2013). Hierbei wurde das sog. RITE-System (Recombination Induced Tag Exchange) verwendet, bei welchem endogene Markierung mit einem gewünschten Fluoreszenzprotein erfolgt und dieses durch Induktion des Cre/LoxP Rekombinasesystems zu einem beliebigen Zeitpunkt durch ein weiteres Fluoreszenzprotein ersetzt werden kann. Dies ermöglicht somit eine Differenzierung von alten und neu synthetisierten Proteinen eines Kompartiments. Jeweils eine Proteinkomponente von Nukleolus (Nop56), Vakuolen (Vma2), Mitochondrien (Tom70), Golgi-Apparat (Mnn9), kortikalem endoplasmatischem Retikulum (Sec61) und Peroxisomen (Pex3) wurde mit dem RITE-System markiert. Bei all diesen Fällen erfolgte die Inkorporation neusynthetisierten Proteins ausschließlich in bereits vorhandene Kompartimente und innerhalb dieser eine homogene Verteilung alten und neuen Proteins. De novo Synthese hingegen trat in keinem Fall auf. Des Weiteren zeigten jeweils alte und neusynthetisierte Vertreter aller genannten Kompartimente gleiches Verteilungsverhalten in der Mitose, wobei der größere Proteinanteil in der Mutterzelle verblieb. Wie im Falle des Zellkerns scheint also die Knospe auch einen geringeren Anteil aller weiteren subzellulären Kompartimente zu erhalten, allerdings müssten für jedes Kompartiment sicherlich weitere Proteinkomponenten als Vertreter untersucht werden.

3.1.2.3 Mechanismen der asymmetrischen Segregation determinierender Faktoren in der Mitose

Die asymmetrische Verteilung bestimmter molekularer Faktoren hat vielfältigen Einfluss auf den physiologischen Zustand der neu entstehenden Zellen. Beispielsweise kann mütter- oder tochter-spezifische Aktivität bestimmter Enzyme erreicht werden oder auch eine Verjüngung der Tochterzellen. Die grundlegenden Mechanismen sind unterschiedlicher Natur, wobei gerichteter Transport durch das polarisierte Aktincytoskelett, die Etablierung von Diffusionsbarrieren oder

Geometrie und Dynamik der Segregation bestimmter Strukturen entscheidend sein können. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick zu bekannten Mechanismen und deren Bedeutung gegeben werden.

Gerichteter Transport von mRNA und lokalisierte Translation sind häufig auftretende Mechanismen für Etablierung von Zellsymmetrie auch bei höheren Eukaryoten. Das wohl bekannteste Beispiel im Falle der Bäckerhefe hierfür wäre der gerichtete Transport von *ASH1* mRNA in die Knospe und deren lokalisierte Translation am Knospenkortex, was letztendlich zur tochter-spezifischen Reprimierung der für den Paarungstypwechsel verantwortlichen HO-Endonuklease führt (Heym und Niessing, 2012; Cosma 2004). mRNA kodierend für den entsprechenden Repressor Ash1 wird durch das RNA-Bindeprotein She2 gebunden und passiert den Nukleolus, wobei die Bindung der Translationsrepressoren Puf6 und Khd1 an die mRNA im Nukleolus bzw. im Nukleoplasma stattfindet. Nukleolärer Transit spielt definitiv eine Rolle für die korrekte Lokalisation der *ASH1* mRNA. Nach dem Nup60 spezifischen Kernexport des Komplexes bindet dieser über den Adapter She3 an das Motorprotein Myo4 (She1) und kann somit über das polarisierte Aktincytoskelett gerichtet in die Knospe transportiert werden. Am Knospenkortex erfolgt dann Phosphorylierung von Puf6 und Khd1, wodurch deren Affinität zu *ASH1* mRNA sinkt und ihre Translation initiiert wird. Translationsaktivierung an der Knospenspitze steht des Weiteren in enger Verbindung zur Aufrechterhaltung der halbmondförmigen Lokalisation von *ASH1* mRNA in dieser Region. Die molekulare Maschinerie, welche Verankerung der mRNA an der Zellmembran der Knospenspitze verursacht, wurde bisher nicht identifiziert. Nach lokalisierter Translation erfolgt Anreicherung des Repressors Ash1 spezifisch im Tochterkern während der späten Anaphase und damit die tochter-spezifische Repression der HO-Endonuklease.

Auch die Ausbildung von Diffusionsbarrieren, z.B. zwischen Mutter- und Tochterkern während der späten Anaphase noch vor Cytokinese und Kernteilung, leistet einen essentiellen Beitrag zur Etablierung asymmetrischer Proteinverteilung zwischen Mutter und Tochter. Dies wurde für den Transkriptionsfaktor Ace2 gezeigt, welcher in der späten Anaphase deutlich vor Ablauf der Cytokinese spezifisch im Tochnukleus anreichert und dort Transkriptionsprogramme aktiviert (Boettcher et al., 2012; Colman-Lerner et al., 2001). Voraussetzung für die tochter-spezifische Kernanreicherung von Ace2 ist die Aktivität der ausschließlich in der Tochterzelle lokalisierten, regulatorischen Kinase Cbk1 (Mazanka et al., 2008). Ace2 zeigt vor der Anaphase hohen nukleocytoplasmatischen Austausch und kann nicht effizient im Kern anreichern. Tochter-spezifische Phosphorylierung von Ace2 durch Cbk1 in der Anaphase inhibiert die Interaktion von Ace2 mit der Kernexportmaschinerie und sorgt für die Anreicherung des Transkriptionsfaktors im Tochterkern. Ganz entscheidend für die asymmetrische Lokalisation von Ace2 ist die Kompartimentierung von Mutter und Tochterkern vor Kerntrennung, was durch die fortschreitende Verjüngung des verbindenden Nukleoplasmakanals in der Anaphase

zustande kommt (Boettcher et al., 2012). In Mutanten mit anormaler Kernmorphologie und daraus resultierender unzureichender Diffusionsbeschränkung zwischen Mutter- und Tochterkern kann die Asymmetrie von Ace2 in der späten Anaphase nicht etabliert werden. Unter anderem erfolgt letztendlich durch asymmetrische Segregation von Ace2 die tochter-spezifische Expression hydrolytischer Enzyme, welche im Zuge der Cytokinese für Degradation der Septa verantwortlich sind (Colman-Lerner et al., 2001).

Endomitose an sich in Verbindung mit der speziellen Kerngeometrie hat nicht nur einen Einfluss auf die asymmetrische Segregation von Proteinen, sondern auch für die Retention frei im Kern diffundierender episomaler DNA in der Mutter. Durch Rekombinationsereignisse der hochrepetitiven rDNA können sog. ERCs (Extrachromosomal rDNA Circles) entstehen, deren Vorhandensein replikatives Altern von Zellen beschleunigt (Sinclair und Guarente, 1997). Die Vorstellung wäre hierbei, dass generell Episomen mit *ARS*-Elementen (Autonomously Replicating Sequence) im Zellzyklus exponentielle Amplifikation erfahren und evtl. essentielle Faktoren für z.B. Replikation vom restlichen Genom titrieren (Falcón und Aris, 2003). Die Retention episomaler DNA in der Mutterzelle ist also von hoher Wichtigkeit für die Verjüngung neugeborener Tochterzellen. Die der mütterlichen Retention episomaler DNA zugrunde liegenden Mechanismen wurden in der Vergangenheit intensiv und kontrovers diskutiert, wobei ein Modell der Arbeitsgruppe um Susan M. Gasser als sehr überzeugend hervorging (Gehlen et al., 2011). Hierbei wurde ein Plasmid mit multiplen LacI-Bindestellen generiert, dessen Visualisierung in der Fluoreszenzmikroskopie durch die Bindung des Lac-Repressors als GFP-Fusion erfolgte. Das Plasmid zeigte das Verhalten eines frei im Kern diffundierenden Partikels und die beobachtete effiziente Retention in der Mutterzelle während der Mitose konnte auf die Geometrie des Zellkerns während mitotischer Teilung und die hohe Dynamik der Kernteilung zurückgeführt werden. Die Engstelle des Zellkerns im Bereich des Knospenhalses während der Anaphase stellte hierbei den entscheidenden morphologischen Faktor dar.

3.2 Mitotische Chromosomentrennung in *S.cerevisiae*

Neben gerichtetem Wachstum werden auch weitere entscheidende Prozesse in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen reguliert. Hinsichtlich des Erbgutes muss innerhalb eines vollständigen Zyklus die präzise Verdopplung der Chromosomen und anschließend die exakte Verteilung auf Mutter und Tochter erfolgen. Während der S-Phase erfolgt die Replikation von Chromosomen, welche dann aus zwei über Kohäsin verbundenen Schwesterchromatiden bestehen. In der Mitose muss dann die kontrollierte Spaltung von Kohäsin und die gleichmäßige Verteilung der Schwesterchromatiden auf Mutter und Tochter durch die mitotische Spindel stattfinden. Damit eine fehlerfreie Vererbung der Chromosomen gewährleistet werden kann, muss der zeitliche Ablauf verschiedener Ereignisse im Zellzyklus und der Übergang von einer Phase in die nächste streng reguliert werden. Im Allgemeinen

sind hierfür die cyclinabhängige Kinase Cdc28 (Cdk1) und die zellzyklusregulierten Cycline, welche Aktivatoren und Spezifitätsfaktoren von Cdc28 darstellen, verantwortlich (Enserink und Kolodner, 2010). Durch die periodische Expression verschiedener Cycline erlangt Cdc28 phasenspezifische Substratspezifität und kann durch Phosphorylierung der jeweils relevanten Faktoren die entsprechenden phasenspezifischen Prozesse in Gang setzen. Weitere wichtige Faktoren für den korrekten Ablauf des Zellzyklus stellen die E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexe SCF (Skip1-Cullin-F-Box) und APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) dar. Ihre Funktion liegt in der zellzyklusabhängigen Markierung von Proteinen durch Polyubiquitylierung, welche dann durch das 26S Proteasom degradiert werden. Einerseits wird die Aktivität des SCF sowie des APC/C von Cyclin-Cdk1-Komplexen reguliert und andererseits beeinflussen SCF und APC/C wiederum die Aktivität von Cdk1. Speziell im Falle der Chromosomentrennung ist der APC/C als Teil eines Kontrollsystems von hoher Wichtigkeit. Der Focus vorliegender Arbeit liegt auf dem mitotischen Segregationsverhalten von Proteinkomponenten des Nukleolus, welcher um die ribosomale DNA auf Chromosom XII assembliert. Da chromosomale rDNA die Kernkomponente des Nukleolus darstellt und die Assoziation nukleolärer Proteine mit dieser entscheidend für deren Segregationsverhalten sein könnte, sollte also ein Einfluss grundlegender Mechanismen der mitotischen Chromosomentrennung auf nukleoläre Proteinvererbung in Erwägung gezogen werden. Erläutert werden im Anschluss die zellzyklusabhängige Regulation der Chromosomentrennung, sowie die zugrunde liegende Geometrie und der genaue mechanische Ablauf dieses Prozesses. Des Weiteren ist die Phosphatase Cdc14 speziell für rDNA-Trennung notwendig (Torres-Rosell et al., 2004) und sollte über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Trennungsmechanik der rDNA nehmen.

3.2.1 Regulation der Chromosomentrennung

Bei Eintritt in die Mitose sind die Schwesterchromatiden eines Chromosoms in der Centromerregion und entlang der Chromosomenarme über Kohäsinkomplexe physisch miteinander verbunden, was grundlegend für eine korrekte Segregation ist (Enserink und Kolodner, 2010; Lodish et al., 2008). Die Kohäsinkomplexe bestehen aus den Untereinheiten Smc1, Smc3, Scc1 und Scc3, welche zusammen eine Ringstruktur bilden, die beide Schwesterchromatiden umschließt. Die Spaltung von Kohäsion und damit der Beginn der Anaphase darf erst dann einsetzen, wenn die Chromosomen korrekten Kontakt zur mitotischen Spindel etabliert haben und eine Fehlsegregation damit vermieden werden kann. Daher garantiert der sog. Spindle Assembly Checkpoint (SAC) als Kontrollsystem die Aufrechterhaltung von Kohäsion bis zu dem Zeitpunkt, an welchem die Kinetochore der Schwesterchromatiden über Mikrotubuli bipolare Anheftung zu den beiden Spindelpolkkörpern an den entgegengesetzten Polen des Zellkerns aufweisen (Lew und Burke, 2003). Ist diese Voraussetzung erfüllt und treten beiderseitig Zugkräfte auf die Kinetochore auf, so kann die Spaltung von Kohäsion und damit

Chromosomensegregation durch die Aktivität der Spindel erfolgen. Das Protein Mad2 spielt bei diesem Kontrollmechanismus eine entscheidende Rolle und inhibiert den APC^{Cdc20} solange, bis alle Kinetochore korrekt mit Mikrotubuli assoziiert sind (Lodish et al., 2008). Bei vollständiger Besetzung der Kinetochore wird die Inhibition des APC^{Cdc20} aufgehoben und Pds1 (Securin) kann für die Degradation markiert werden (Enserink und Kolodner, 2010). Nach Proteolyse seines Inhibitors Pds1 liegt die Separase Esp1 im aktiven Zustand vor und kann die Scc1-Untereinheit (Kleisin) des Kohäsinkomplexes spalten. Nun erfolgt mit Elongation der mitotischen Spindel und beginnender Chromosomentrennung der Eintritt in die Anaphase.

Nach vollständiger Spindelelongation und Segregation der Schwesterchromatiden, sowie des Zellkerns kann die Auflösung der mitotischen Spindel und der Austritt aus der Mitose erfolgen (Enserink und Kolodner, 2010; Lodish et al., 2008). Hierfür dient in *S.cerevisiae* unter anderem die Phosphatase Cdc14, welche einen Antagonisten zu mitotischen Cyclin-Cdk1-Komplexen darstellt und deren Substrate dephosphoryliert. Diese ist während des Zellzyklus im Nukleolus sequestriert und wird mit Beginn der Anaphase über das FEAR-Netzwerk (Fourteen Early Anaphase Release) transient aus dem Nukleolus freigesetzt (Enserink und Kolodner, 2010). Das MEN (Mitotic Exit Network) sorgt dann in der späten Anaphase für die vollständige Freisetzung von Cdc14 (Lew und Burke, 2003). Als weitere Mechanismen sorgen die APC-abhängige Degradation mitotischer Cycline und die Expression des Inhibitors Sic1 für einen Rückgang der mitosespezifischen Aktivität von Cdc28 und die Mitose kann abgeschlossen werden (Enserink und Kolodner, 2010).

3.2.2 Geometrie und Mechanik der Chromosomentrennung

Bei höheren Eukaryoten wird die Mitose in mehrere Phasen unterteilt, welche sich durch den Ablauf charakteristischer Prozesse auszeichnen (Lodish et al., 2008; Sirri et al., 2008). Zu Beginn der Mitose erfolgt eine starke Kondensation der Chromosomen, was als Prophase bezeichnet wird. Gleichzeitig deassemblieren Kernmembran und Nukleoli. In der folgenden Prometaphase werden Kinetochore an den Centromeren der kondensierten Chromosomen gebildet und über Mikrotubuli mit den Centriolen verbunden. Durch die mitotische Spindel erfolgt dann die Positionierung aller Chromosomen in einer Äquatorialebene, auch Metaphaseplatte genannt, welche senkrecht zur Spindelachse orientiert ist. Mit Beginn der Anaphase wandern die kompaktierten Chromatiden zunächst zu den Spindelpolen (Anaphase A) und daraufhin elongiert die Spindel und der Abstand der Centriolen nimmt zu (Anaphase B). In der abschließenden Telophase löst sich der Spindelapparat auf, die Chromosomen dekondensieren, Neubildung der Nukleoli findet statt und die Kernhüllen werden wieder aufgebaut. In der Bäckerhefe hingegen weist der Ablauf der Mitose deutliche Unterschiede zu höheren Eukaryoten auf. Hier erfolgt keine deutliche Kondensation der Chromosomen vor der Segregation und die Ausbildung einer Metaphaseplatte ist nicht erkennbar (Straight et al., 1997). Die Kompaktierung

von Chromosom XII beispielsweise findet nicht vor, sondern während der Anaphase statt (Sullivan et al., 2004). Des Weiteren werden weder die Kernhülle, noch der Nukleolus während der Mitose aufgelöst (De Souza und Osmani, 2007; Sirri et al., 2008). Der genaue mechanische Ablauf der Chromosomentrennung in *S.cerevisiae* konnte durch eine Studie der Arbeitsgruppe von Tomoyuki U. Tanaka unter Verwendung sog. Chromosomendots in der Fluoreszenzmikroskopie aufgeklärt werden (Renshaw et al., 2010). Das Erbgut ist vor Beginn der Segregation in der Mutterzelle positioniert und bei Beginn der Anaphase erfolgt diese nicht unmittelbar, sondern graduell und reißverschlußartig von centromerproximalen zu centromerdistalen Bereichen. Hierbei kommt es bei Elongation der mitotischen Spindel zu starken Streckungs- und anschließenden Kompaktierungsereignissen, welche während der Trennung vom Centromer ausgehend in Richtung Telomer über den Chromosomenarm laufen. Dies tritt allerdings hauptsächlich im Falle des für die Knospe bestimmten Chromatids auf, welches zusammen mit dem Kern in Richtung Knospenkortex gezogen wird. Das in der Mutter verbleibende Chromatid hingegen erfährt keine derart ausgeprägte Positionsänderung innerhalb der Zelle, sowie kaum Streckung und Kompaktierung. Bei Beginn der Anaphase ist Kohäsion der beiden Schwesterchromatiden nur unvollständig aufgehoben und die verbleibende Restkohäsion ist im Zusammenspiel mit Zugkräften der Spindel verantwortlich für das Auftreten von Streckungsereignissen des Chromatins. Die Restkohäsion ist zumindest teilweise abhängig von Kohäsinkomplexen, welche bei Anaphasebeginn nicht durch Separaseaktivität entfernt wurden. Die anschließende Kompaktierung gedehnter Chromatinbereiche ist wiederum abhängig von Kondensinkomplexen und erzeugt zusätzliche Zugkräfte, welche für die Auflösung der Restkohäsion sorgen. Es erfolgt also eine graduelle und deutlich asymmetrische Chromosomentrennung, wobei hauptsächlich das für die Knospe bestimmte Chromatid eine deutliche Positionsänderung, sowie starke Streckung und Kompaktierung erfährt. Dies ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

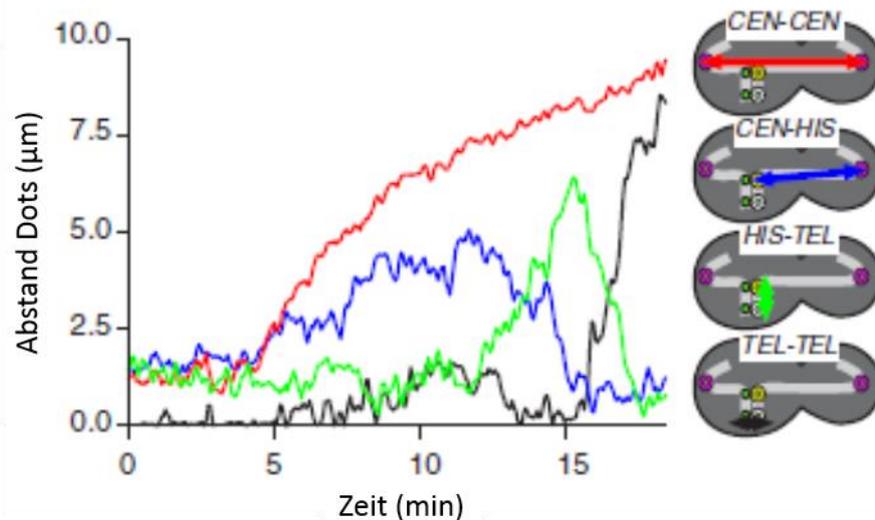


Abbildung 3.3: Tochterstreckung und Kompaktierung eines Schwesterchromatids bei mitotischer Chromosomentrennung

TetO-Sequenzen wurden an verschiedenen Loci von Chromosom XV integriert und durch Expression von TetR-GFP in der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Markiert wurde die Centromerregion (*CEN*), der *HIS*-Lokus mittig zwischen Centromer und Telomer (*HIS*) auf dem langen Arm, sowie die Telomerregion auf dem langen Arm (*TEL*). Mit beginnender Chromosomentrennung nimmt zunächst der Abstand zwischen den Centromeren der beiden Schwesterchromatiden zu (rot). Darauf erfolgt eine Streckung der *CEN-HIS* Region auf dem für die Tochter bestimmten Chromatid (blau). Während erneute Kompaktierung der *CEN-HIS* Region (blau) stattfindet, erfährt bereits die benachbarte *HIS-TEL* Region (grün) eine starke Streckung und ebenfalls eine anschließende Kompaktierung. Mit Segregation der Telomerregionen (schwarz) ist die Chromosomentrennung abgeschlossen. Verändert nach Renshaw et al., 2010.

3.2.3 Einfluss der Phosphatase Cdc14 auf Chromosomentrennung

Die Phosphatase Cdc14 ist als Gegenspieler zur Aktivität mitotischer Cyclin-Cdk1-Komplexe notwendig für den Abschluss der Mitose, da es deren Substrate dephosphoryliert und somit den Übergang in einen weiteren Zellzyklus ermöglicht (Enserink und Kolodner, 2010). Während der G1-Phase, der S-Phase und der frühen Mitose ist Cdc14 durch seinen Inhibitor Net1 im Nukleolus verankert und inaktiv. Mit Beginn der Anaphase erfolgt zunächst eine transiente Freisetzung aus dem Nukleolus durch das FEAR-Netzwerk (Fourteen Early Anaphase Release) (Enserink und Kolodner, 2010). Die Separase Esp1 wird bei Inaktivierung des SAC von seinem Inhibitor Pds1 freigesetzt und inhibiert durch eine nicht-proteolytische Funktion die Aktivität der Phosphatase PP2A^{Cdc55}. Durch diese Inhibition kommt es zu verstärkter Phosphorylierung von Net1 durch die Kinasen Cdk1 und Cdc5, was eine Freisetzung und Aktivierung von Cdc14 bewirkt. Cdc14 wiederum revertiert die Phosphorylierung von Pds1 durch mitotische Cyclin-Cdk1-Komplexe und sorgt somit für eine weitere Degradation von Pds1 und damit Freisetzung von Separaseaktivität, wodurch eine positive Rückkopplung zustande kommt.

Die vollständige Freisetzung von Cdc14 wird in der späten Anaphase durch das MEN (Mitotic Exit Network) ausgelöst (Lew und Burke, 2003; Enserink und Kolodner, 2010). Inaktivierung von PP2A^{Cdc55} durch Separase und die Annäherung des Tochterspindelpols an den Knospenkortex verursachen die

Aktivierung der mit diesem Spindelpol assoziierten GTPase Tem1. Die Aktivierung von Tem1 wiederum löst eine Phosphorylierungskaskade aus, welche letztendlich die vollständige Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus bewirkt. Der Tem1 aktivierende GEF Lte1 ist mit dem Knospenkortex assoziiert und kann somit nur bei einer korrekten Orientierung der mitotischen Spindel die mit dem Tochterspindelpol assoziierte GTPase aktivieren. Dies stellt somit ein räumliches Kontrollsystem dar, welches als Spindle Orientation Checkpoint (SPOC) bezeichnet wird.

3.2.3.1 Cdc14 kontrolliert die Elongationsrate der mitotischen Spindel

Neben vielerlei Funktionen und der bekannten Notwendigkeit von Cdc14 speziell für rDNA-Trennung hat die Phosphatase auch eine Rolle für die Assemblierung der mitotischen Spindel und fördert deren Elongation in der Anaphase (Khmelinskii et al., 2007). Da Streckungsereignisse des Tochterchromatids durch verbleibende Restkohäsion und Elongation der Spindel verursacht werden, kann angenommen werden, dass eine hohe Elongationsrate tochtterspezifische Chromatinstreckung fördert. Damit sollte also Cdc14 über seinen Einfluss auf die mitotische Spindel den mechanischen Ablauf der Chromosomentrennung mitbestimmen.

Die kortikale Assoziation von Astralmikrotubuli ist entscheidend für die Erzeugung von Zugkräften auf die Spindelpole (Markus et al., 2012). Zudem wird in der Anaphase durch Zusammenlagerung antiparalleler interpolärer Mikrotubuli und das Wirken von Kinesin-Motorproteinen auch eine Druckkraft innerhalb des Kerns erzeugt (Khmelinskii und Schiebel, 2008). Diese überlappende Region interpolärer Mikrotubuli mit ihren gebundenen Faktoren wird als Zentralspindel bezeichnet. Durch die sog. Chromosome Passenger-Komplexe erfolgt eine Regulierung dieser Struktur in der Anaphase (Rozelle et al., 2011). Die Assemblierung der Anaphasespindel ist zellzyklusgekoppelt und von vielen Faktoren abhängig, unter anderem von mitotischen Cyclin-Cdk1-Komplexen (Enserink und Kolodner, 2010). Zwei bekannte Organisatoren der Zentralspindel sind zum einen der Separase-Slk19-Komplex und zum anderen das Mikrotubulus-bündelnde Protein Ase1, welche beide durch Cdc14 reguliert werden (Khmelinskii et al., 2007). Im Fall von Ase1 erfolgt eine direkte Dephosphorylierung durch Cdc14 nach deren Freisetzung zu Beginn der Anaphase. Imitation des dauerhaft phosphorylierten Zustandes von Ase1 hat Fehllokalisierung von Zentralspindelkomponenten, wie z.B. dem Motorprotein Cin8, und eine verringerte Elongationsrate zur Folge. Imitation des dauerhaft dephosphorylierten Zustandes hingegen hat eine erhöhte Elongationsrate und oftmals den Zusammenbruch der Spindel zur Folge. Über den Phosphorylierungszustand des Spindelorganitors Ase1 kann Cdc14 also die Elongationsrate der mitotischen Spindel regulieren.

3.2.3.2 Cdc14 ist notwendig für rDNA-Trennung

Im Falle der ribosomalen DNA müssen im Gegensatz zum übrigen Chromatin spezielle Voraussetzungen für die mitotische Segregation gegeben sein. Ohne die Aktivität von Cdc14 kann rDNA-Trennung nicht erfolgen (Torres-Rosell et al., 2004).

Bekannt ist, dass Transkription der rDNA durch RNA Polymerase I kohäsinunabhängige Wechselwirkungen hervorruft (Tomson et al., 2006) und die Aktivität von Cdc14 für die Aufhebung kohäsinunabhängiger Wechselwirkungen im Bereich der rDNA notwendig ist (Sullivan et al., 2004). Des Weiteren ist Cdc14 für kondensinabhängige rDNA-Trennung notwendig und durch erhöhte transkriptionelle Aktivität kann der Kondensinkomplex in transkribierten Bereichen von RNA Polymerase I verdrängt werden (D'Amours et al., 2004; Wang et al., 2006). Bei einer weiteren Studie wurden unter anderem Synchronexperimente durchgeführt, um die genaue Rolle von Cdc14 für rDNA-Trennung zu untersuchen (Clemente-Blanco et al., 2009). Hierbei wurde durch Mikroskopie der Ablauf des Zellzyklus erfasst und die Inkorporation von [³H]-Uracil in Gesamt-RNA wurde gemessen. Zudem wurden *in vivo* und *in vitro* Versuche durchgeführt, durch welche der Einfluss von Cdc14 auf RNA Polymerase I Transkription analysiert werden konnte. Man kam zu dem Schluss, dass Cdc14 zu Beginn der Anaphase bestimmte RNA Polymerase I Untereinheiten dephosphoryliert und dadurch Transkription inhibiert, was die Voraussetzung für rDNA-Trennung darstellt. Eine aktuelle Studie wiederum trifft die Aussage, dass RNA Polymerase I während der Anaphase inhibiert wird, dies jedoch auf die Phosphorylierung von RNA Polymerase I Untereinheiten durch die Kinase Rio1 zurückgeht (Iacovella et al., 2015). Ob Transkription der 35S rDNA in der Mitose der Bäckerhefe inhibiert wird, ist allerdings nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Eine etwas ältere Studie besagt, dass im Gegensatz zur periodischen Variation von DNA-Synthese die Synthese von rRNA durchaus über den gesamten Zellzyklus hinweg stattfindet (Elliot und McLaughlin, 1979).

Zuvor wurde bereits erläutert, dass Cdc14 durch Regulation der Spindelelongation einen Einfluss auf Streckungsereignisse während der Chromosomensegregation nehmen könnte. Zudem steuert Cdc14 kondensinabhängige Kompaktierungsereignisse während der rDNA-Segregation. Daher sollte die Mechanik der rDNA-Trennung maßgeblich von Cdc14 abhängen.

3.3 Der Nukleolus von *S.cerevisiae*

Der Nukleolus der Bäckerhefe stellt ein Subkompartiment des Zellkerns dar, welches nicht durch eine Membran vom übrigen Nukleoplasma abgegrenzt ist. Die ribosomale DNA auf Chromosom XII stellt die Kernkomponente des Nukleolus dar und an dieser und ihrer näheren Umgebung lokalisieren diverse Proteine und Nukleinsäuren, welche unterschiedlichste Aufgaben erfüllen, in sehr hoher Konzentration (Hernandez-Verdun et al., 2010). Die Nukleoli von *Xenopus* Oocyten beispielsweise

zeigen im Vergleich zum umgebenden Nukleoplasma die doppelte Massendichte (Pederson, 2011). Bereits in den 1830er Jahren wurden Nukleoli verschiedener Zelltypen beschrieben, ihre Hauptfunktion als Orte für Ribosomenbiogenese kam jedoch erst sehr viel später in den 1960er Jahren zu Tage. Diese Hauptfunktion widerspiegelnd dienen viele nukleoläre Proteine und Nukleinsäuren der Transkription von ribosomalen Genen, sowie der weiteren Prozessierung der Primärtranskripte und der Assemblierung von rRNA mit ribosomalen Proteinen. In der Elektronenmikroskopie zeigen Nukleoli höherer Eukaryoten entsprechend den verschiedenen Aufgabenfeldern bei der Ribosomenbiogenese eine dreiteilige Organisation (Hernandez-Verdun et al., 2010). Das fibrilläre Zentrum beherbergt die rDNA, deren Transkription an der Übergangsstelle zur benachbarten dichten fibrillären Komponente stattfindet. In der dichten fibrillären Komponente und der granulären Komponente wiederum finden frühe bzw. späte Prozessierungsschritte statt. In der Bäckerhefe hingegen weist der Nukleolus eine einfachere, nur zweiteilige Organisation auf. Diese beiden in der Elektronenmikroskopie erkennbaren Komponenten werden als fibrilläre Stränge und Granula bezeichnet. Neben Ribosomenbiogenese übernimmt der Nukleolus jedoch auch eine Vielzahl weiterer Aufgaben (Pederson, 2011). Zellzyklusregulatoren, sind im Nukleolus anzutreffen, die Biosynthese des SRP (Signal Recognition Particle) findet unter anderem im Nukleolus statt und bestimmte mRNAs passieren den Nukleolus bevor ihr Kernexport erfolgt.

Entsprechend seiner essentiellen Funktionen nimmt der Nukleolus auch eine besondere räumliche Position innerhalb des Zellkerns ein (Taddei et al., 2010; Taddei und Gasser, 2012; Albert et al., 2013b; Zimmer und Fabre, 2011). In *S.cerevisiae* zeigen alle Chromosomen mit Ausnahme von Chromosom XII eine Rabl-ähnliche Konformation. In der G1-Phase sind ihre Kinetochore über Mikrotubuli mit dem Spindelpolkörper verbunden und befinden sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zu diesem. Ihre Telomere hingegen sind abseits des Spindelpols an der Kernhülle verankert. Der rDNA-tragende Bereich von Chromosom XII, und damit der Nukleolus, liegt abseits der restlichen Chromosomen an dem Pol des Zellkerns, welcher dem Spindelpolkörper genau gegenüber liegt. Zudem ist der Nukleolus über die Proteine Heh1 und Nur1 an der Kernhülle verankert, was die Integrität der rDNA fördert. Die Architektur des Zellkerns von *S.cerevisiae* während der G1-Phase ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt.

Bei einer älteren Sichtweise ging man davon aus, dass der Nukleolus ein eher statisches System darstellt. Mit der Entwicklung von Mikroskopietechniken, wie z.B. FRAP (Fluorescence Recorey After Photobleaching) und FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching), stellte sich allerdings zunehmend heraus, dass eine Vielzahl nukleolärer Proteine in höheren Eukaryoten ein dynamisches Verhalten und damit einen stetigen Austausch zwischen Nukleolus und Nukleoplasma aufweisen (Pederson, 2011; Leung und Lamond, 2003; Dundr et al., 2002). Dies trifft unter anderem für viele Komponenten des RNA Polymerase I Transkriptionssystems und auch für bestimmte Prozessierungsfaktoren zu.

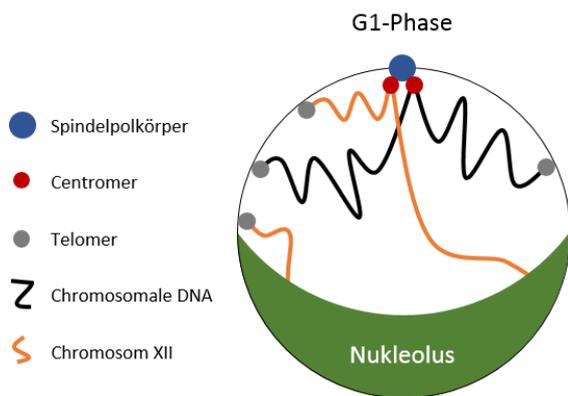


Abbildung 3.4: Architektur des Zellkerns von *S.cerevisiae* in der G1-Phase

Alle Chromosomen mit Ausnahme von Chromosom XII nehmen eine Rabl-ähnliche Konformation innerhalb des Zellkerns an. Ihre Centromere sind mit dem Spindelpolkkörper verbunden und liegen in unmittelbarer Nähe zu diesem. Die Telomere sind abseits des Spindelpols an der Kernhülle verankert. Die ribosomale DNA von Chromosom XII liegt abseits der übrigen chromosomalen DNA und ist durch Heh1 und Nur1 an der Kernhülle verankert. Der Nukleolus liegt somit während der gesamten G1-Phase dem Spindelpol genau gegenüber.

3.3.1 Struktur der rDNA

Der rDNA-Lokus von *S.cerevisiae* befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom XII und besteht aus einer repetitiven Aneinanderreihung von ca. 100-200 Wiederholungseinheiten. Eine Einheit umfasst dabei 9,1 kbp und besteht aus verschiedenen genetischen Elementen, welche für die RNA-Bestandteile der Ribosomen (rRNAs) kodieren und für die Integrität des Lokus entscheidend sind (Kobayashi, 2011; Fromont-Racine et al., 2003). Das 35S Primärtranskript wird durch Transkription von *RDN37* durch RNA Polymerase I erzeugt und umfasst die für 25S, 5,8S und 18S rRNA kodierenden Sequenzen (*RDN25*, *RDN58*, *RDN18*). Am 5'- und 3'-Ende von *RDN37* befinden sich die nicht-kodierenden *ETS*-Sequenzen (External Transcribed Spacer) und die kodierenden Bereiche sind zudem durch die *ITS1* bzw. *ITS2* Regionen (Internal Transcribed Spacer) voneinander getrennt. *RDN5* kodiert für die durch RNA Polymerase III transkribierte 5S rRNA und hat entgegengesetzte Orientierung zu *RDN37*. Zwischen den 5'-Enden eines 35S und eines 5S Gens liegt jeweils die *NTS2*-Region (Non Transcribed Spacer 2), welche die Promotorbereiche beider ribosomaler Gene, sowie das *rARS*-Element (ribosomal Autonomously Replicating Sequences) als Replikationsursprung beinhaltet. Zwischen den 3'-Enden eines 35S und eines 5S Gens befindet sich jeweils die *NTS1*-Region (Non Transcribed Spacer 1), welche die Terminationssequenzen beider ribosomaler Gene umfasst und in welcher die sog. RFB (Replication Fork Barrier) ausgebildet wird. Durch die RFB kommt es zu einem Block der Replikation, um eine Kollision von Replikations- und Transkriptionsmaschinerien zu verhindern. Zudem liegt in der *NTS1*-Region der bidirektionale Promotor E-pro, welcher nicht-kodierende Transkription durch RNA Polymerase II initiiert. Eine Folge dieser Transkription ist die Induktion von Rekombination und damit kann die Anzahl an rDNA-Wiederholungseinheiten durch E-pro reguliert werden.

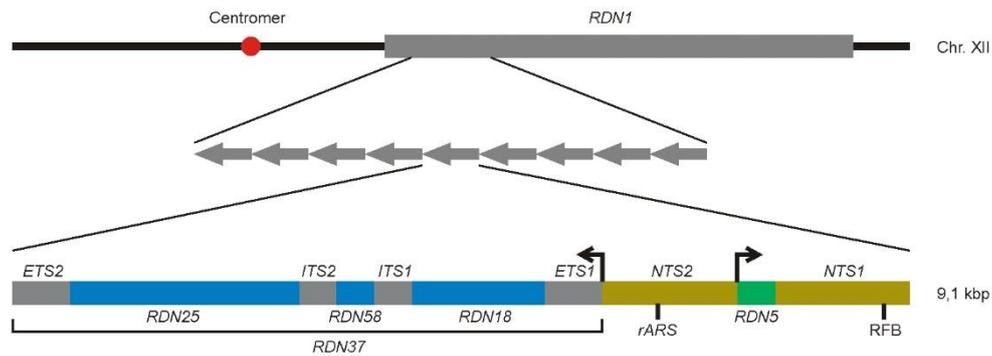


Abbildung 3.5: rDNA-Struktur in *S.cerevisiae*

Der *RDN1*-Lokus der Bäckerhefe liegt auf Chromosom XII und umfasst ca. 100-200 Wiederholungseinheiten. Eine Einheit umfasst die durch RNA Polymerase I transkribierte *RDN37* Region und die durch RNA Polymerase III transkribierte *RDN5* Region, sowie verschiedene nicht kodierende Bereiche. *RDN37* enthält wiederum die kodierenden Regionen *RDN25*, *RDN58* und *RDN18*, welche durch *ITS* Regionen (Internal Transcribed Spacer) voneinander getrennt sind und von den *ETS* Regionen (External Transcribed Spacer) flankiert werden. In der nicht transkribierten *NTS2* Region (Non Transcribed Spacer) liegt der Replikationsursprung *rARS* und in der nicht transkribierten *NTS1* Region erfolgt die Ausbildung der RFB (Replication Fork Barrier).

3.3.2 Transkription durch RNA Polymerase I und rRNA-Prozessierung

Transkription durch RNA Polymerasen kann allgemein in die drei Phasen Initiation, Elongation und Termination unterteilt werden. Bevor die Initiation stattfinden kann, müssen zunächst Initiationsfaktoren an verschiedene Elemente des RNA Polymerase I Promotors binden (Schneider, 2012). In der Bäckerhefe existieren vier essentielle Initiationsfaktoren, nämlich Core Factor (CF), Upstream Activation Factor (UAF), TBP (TATA-Binding Protein) und Rrn3. CF bindet an den Core Promotor und UAF an das Upstream Element des Promotors. CF und UAF zeigen physische Interaktion und stehen des Weiteren über TBP in Kontakt. Diese gegenseitigen Wechselwirkungen stimulieren die Assoziation der Faktoren mit der Promotorregion. Damit das aus 14 Untereinheiten bestehende Holoenzym nun an den Promotor rekrutiert werden kann, muss seine Untereinheit Rpa43 mit dem Initiationsfaktor Rrn3 interagieren. Rrn3 wiederum wechselwirkt mit CF und somit kann die Polymerase an den Promotor rekrutiert werden und die Initiation erfolgt. Die Assoziation von Rrn3 und Rpa43 ist entscheidend für die Initiation und unterliegt regulatorischen Mechanismen. Im Gegensatz zu anderen RNA Polymerasen verfügt die RNA Polymerase I über intrinsische Elongationsfaktoren (Rpa49 und Rpa34), was ihre Abhängigkeit von trans-agierenden Faktoren verringert und für eine hohe Prozessivität des Enzyms sorgt (Schneider, 2012). Zudem wird die Aktivität von RNA Polymerase I durch den Chromatinremodellierungskomplex FACT (Facilitates Chromatin Transcription) gefördert, welcher die Assemblierung und Depletion von Nukleosomen reguliert (Johnson et al., 2013). Die Termination erfolgt durch Bindung von Nsi1 in der Terminatorregion im Zusammenspiel mit einer T-reichen Sequenz (Merkl et al., 2014).

Für die Entstehung von Ribosomen muss das 35S Primärtranskript prozessiert werden, wobei im Allgemeinen Spaltereignisse, sowie Pseudouridylierungen und Methylierungen durchgeführt werden

(Tschochner und Hurt, 2003; Fromont-Racine et al., 2003). Viele Prozessierungsschritte und auch die Assoziation ribosomaler Proteine, sowie der 5S rRNA mit den RNA Polymerase I Transkripten finden bereits im Nukleolus statt. Das SSU-Prozessom (Small SubUnit) beinhaltet unter anderem das U3 snoRNP (small nucleolar RiboNucleoProtein Particle) und bindet noch während der Elongation kotranskriptionell an das entstehende 35S Primärtranskript. Nach Spaltung des 90S Präribosoms treten die resultierenden 60S und 40S Präribosomen in das Nukleoplasma über, wobei hier das 60S Präribosom weitere Modifikationen erfährt. Nach Kernexport können die Ribosomen im Cytoplasma assemblieren.

3.3.3 rDNA-Chromatin

In der Bäckerhefe können die 35S Gene von rDNA-Wiederholungseinheiten in einer „geschlossenen“, nukleosomalen Form oder einer „offenen“, transkriptionell aktiven Chromatinform vorliegen. Im Falle der „offenen“ Form bindet anstelle der Nukleosomen das HMGB-Protein Hmo1 (High Mobility Group Box) in der *RDN37* Region (Merz et al., 2008). Im Verlauf des Zellzyklus findet ein periodischer Wechsel der Wiederholungseinheiten zwischen der „geschlossenen“ und „offenen“ Form statt. Im Zuge der Replikation erfolgt die Assemblierung von Nukleosomen und durch transkriptionelle Aktivität der RNA Polymerase I erfolgt wiederum die Depletion von Nukleosomen und Hmo1 kann folglich in diesen Bereichen binden (Wittner et al., 2011). Die „offene“ Form garantiert die Biogenese von Ribosomen und damit Proliferation, die „geschlossene“ Form hingegen dient vermutlich der strukturellen Integrität der rDNA.

Auch in weiteren Bereichen der rDNA erfolgt Regulation der Chromatinstruktur. In *Ter*-Sequenzen der *NTS1*-Region bindet das Protein Fob1, welches für die Ausbildung der RFB notwendig ist (Mohanty und Bastia, 2004). Über Fob1 wiederum bindet der RENT-Komplex (Regulator of Nucleolar Silencing and Telophase Exit) bestehend aus Net1, Cdc14 und Sir2 an rDNA und des Weiteren bindet RENT auch Fob1-unabhängig in der Promotorregion von *RDN37* (Huang und Moazed, 2003). Net1 und Cdc14 spielen eine entscheidende Rolle für Zellzyklusregulation, worauf bereits eingegangen wurde. Sir2 ist eine hochkonservierte Histondeacetylase und reguliert Nukleosomenbildung in Abhängigkeit von NAD⁺ (Nikotinamidadenindinukleotid) (Blander und Guarente, 2004). Durch seine biochemische Aktivität werden Histone deacetyliert und rDNA kann somit in Nukleosomen verpackt werden, wodurch Rekombinationsereignisse und die Entstehung von ERCs (Extrachromosomal rDNA Circles) unterdrückt werden. Damit wird durch Sir2-Aktivität die replikative Lebensspanne von Hefezellen erhöht.

Um die mitotische Segregation von rDNA zu ermöglichen, muss der Kondensinkomplex an diese binden. Hierbei existieren vier distinkte Bindestellen, zwei davon in der 35S Region und zwei in der *NTS1*-Region (Wang et al., 2006). Kondensinbindung aller vier Bereiche ist von Fob1 abhängig und

spezifisch in der *RDN37* Region wird Kondensinbindung durch drastische Reduzierung der Anzahl an rDNA-Wiederholungseinheiten und damit erhöhter transkriptioneller Aktivität der verbleibenden Einheiten völlig eliminiert.

RNA Polymerase I bestimmt also die Assoziation von Nukleosomen, Hmo1 und Kondensin in der 35S Region und stellt damit einen wichtigen Regulator von rDNA-Chromatin dar. Die Abbildung 3.6 zeigt einen Überblick zu den mit rDNA assoziierten Proteinen und den verschiedenen Chromatinformen.

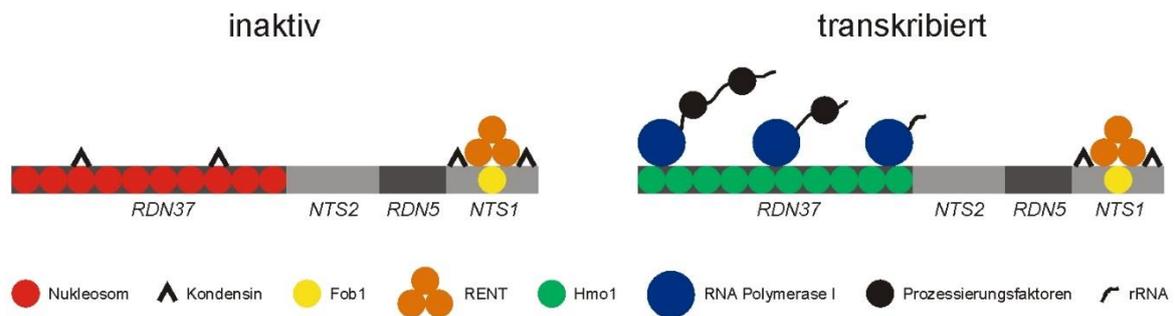


Abbildung 3.6: rDNA-Chromatin in *S.cerevisiae*

Die *RDN37* Region einer rDNA Wiederholungseinheit kann in einer inaktiven („geschlossenen“) Form vorliegen oder in einer aktiv transkribierten („offenen“) Form. Die inaktive Form ist in Nukleosomen organisiert und Kondensin kann binden. Durch Transkription von RNA Polymerase I werden Nukleosomen und Kondensin depletiert, wodurch Hmo1 an diese Region binden kann. Während der Elongation binden Prozessierungsfaktoren kotranskriptionell an die entstehende rRNA. In der *NTS1* Region binden Fob1 und Kondensin. Der für Zellzyklusregulation und silencing wichtige RENT-Komplex (Regulator of Nucleolar Silencing and Telophase Exit), bestehend aus Net1, Cdc14 und Sir2 bindet über Fob1 ebenfalls in der *NTS1* Region.

3.3.4 Nukleoläre Assemblierung

Nukleoli stellen Subkompartimente des Zellkerns mit einer höheren Massendichte als das umgebende Nukleoplasma dar (Pederson, 2011). Nukleoli gelten zudem als dynamische Strukturen, können jedoch als Einheit isoliert werden, obwohl keine Membran zur Abgrenzung und zum Zusammenhalt von Nukleoli beiträgt, wie dies bei diversen anderen Zellorganellen der Fall ist (Leung und Lamond, 2003; Pederson, 2011). Daher stellt sich die Frage, wie Nukleoli genau organisiert sind. Wie findet die Assemblierung von Nukleoli statt, wie gelangen nukleoläre Proteine in den Nukleolus und wie kann die Integrität dieser Struktur gewährleistet werden?

Es wurden verschiedene Sequenzen in nukleolären Proteinen identifiziert, welche zur nukleolären Lokalisation beitragen. Hierbei handelt es sich nicht wie im Falle von Kernlokalisationssequenzen um Signale, welche von einer Transportmaschinerie erkannt werden, sondern ausschließlich um Interaktionsdomänen, welche für die Wechselwirkung mit weiteren nukleolären Komponenten notwendig sind. Darunter befinden sich z.B. RNA-Bindemotive von Nsr1 der Bäckerhefe, über welche rRNA gebunden werden kann (Yan und Mélése, 1993). rDNA ist in der Bäckerhefe hinreichend für die Assemblierung ektopischer Nukleoli und transkriptionelle Aktivität von RNA Polymerase I scheint zudem ausschlaggebend für diesen Prozess zu sein (Oakes et al., 2006; Taddei und Gasser, 2012). Dies

deutet auf eine funktionsabhängige Organisation des Nukleolus hin, wobei die Entstehung von rRNA eine zentrale Rolle einnehmen sollte.

Unter Anwendung synthetischer Biologie konnten Experimente in menschlichen Zellen durchgeführt werden, mit welchen heterologe rDNA-Elemente identifiziert werden konnten, die für nukleoläre Assemblierung hinreichend sind (Grob et al., 2014). Sog. *XEn* Elemente (*Xenopus* *Enhancer*), welche Bindestellen für das nukleoläre Protein UBF (*Upstream Binding Factor*) der höheren Eukaryoten darstellen, werden als grundlegende Sequenzen benötigt. Diese alleine stellen bereits Pseudo-NORs (*Nucleolar Organizer Regions*) dar, da durch sie neben UBF bereits ein gewisser Anteil weiterer nukleolärer Komponenten rekrutiert werden kann, allerdings keine Transkription stattfindet. RNA Polymerase I wird beispielsweise in Abhängigkeit von UBF an *XEn* Elemente rekrutiert, obwohl diese keine Promotorregion umfassen (Mais et al., 2005). Werden *XEn* Elemente mit Promotor und Terminator umfassenden kodierenden rDNA-Transkriptionseinheiten aus Mäusen kombiniert (Promotor: *H.sapiens*; Terminator: *M.musculus*), so erfolgt die Assemblierung transkriptionell aktiver synthetischer Nukleoli (neo-Nukleoli) in menschlichen Zellen, welche reife rRNAs hervorbringen und sich im Zellzyklus wie endogene Nukleoli verhalten (Grob et al., 2014). Die Assemblierung der neo-Nukleoli ist zudem unabhängig von der chromosomalen Umgebung, in welche neo-NORs, also *XEn* Elemente in Verbindung mit Transkriptionseinheiten, integriert wurden. Es werden also zunächst einige grundlegende Faktoren an UBF-Bindestellen rekrutiert und wenn zudem in Anwesenheit von kodierender rDNA mit Promotorregion Transkription durch RNA Polymerase I stattfinden kann, erfolgt die vollständige Assemblierung funktionsfähiger Nukleoli. Dies spricht eindeutig für eine funktionsabhängige Organisation von Nukleoli auch in höheren Eukaryoten. Die Sequenz der entstehenden, kodierenden rRNA sollte den zentralen Rekrutierungspunkt für diverse nukleoläre Faktoren darstellen.

4. Ergebnisse

Die Aufgabe vorliegender Arbeit war es, das mitotische Segregationsverhalten verschiedener nukleolärer Proteine zu analysieren und dadurch Einblicke in die Architektur des Nukleolus zu gewinnen. Hierfür wurden endogene GFP-Fusionen von nukleolären Proteinen in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Das experimentelle Vorgehen umfasste zum einen Bleichexperimente und zum anderen Untersuchungen in verschiedenen Mutanten. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf die RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135 und das HMGB-Protein Hmo1, welche in engem funktionellem Verhältnis stehen, allerdings stark unterschiedliches Verhalten in der Mikroskopie zeigten. Da Hmo1 im Gegensatz zu vielen anderen nukleolären Proteinen ein spezielles Segregationsverhalten aufwies, galt diesem Protein besondere Aufmerksamkeit. Es wurden verschiedene Derivate von Hmo1 sowohl mittels Mikroskopie als auch durch biochemische Experimente charakterisiert, um die grundlegenden Mechanismen seiner nukleolären Lokalisation und seines besonderen Segregationsverhaltens besser verstehen zu können.

4.1 Mitotische Segregation eines nukleoplasmatischen Proteins und eines Kernhistons

In der Mitose der Bäckerhefe bleibt die Kernhülle im Gegensatz zu höheren Eukaryoten erhalten und der Zellkern wird asymmetrisch auf Mutter- und Tochterzellen verteilt, wobei Mutterzellen immer einen größeren Kern erhalten als Tochterzellen (Jorgensen et al., 2007). Ribosomale DNA hingegen wird wie sämtliche chromosomale DNA über die mitotische Spindel gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzellen verteilt (Enserink und Kolodner, 2010). Der Nukleolus formiert sich als Subkompartiment des Zellkerns um die ribosomale DNA auf Chromosom XII und verschiedene nukleoläre Proteine können stabil oder dynamisch an diese binden oder auch keinerlei direkte Wechselwirkung mit ihr aufweisen. Mögliche Szenarien wären, dass nukleoläre Proteine durch relativ freie Diffusion wie Nukleoplasma ungleichmäßig segregieren oder bei stabiler Bindung der rDNA zusammen mit dieser gleichmäßig auf Mutter und Tochter verteilt werden. Aus diesem Grund soll im Vorfeld das mitotische Segregationsverhalten sowohl eines frei im Zellkern diffundierenden Proteins als auch das eines bekanntermaßen stabil mit sämtlicher chromosomalen DNA assoziierten Proteins betrachtet werden, bevor auf das Verhalten nukleolärer Proteine eingegangen wird. Als Beispiel für ein frei im Kern diffundierendes Protein wurde hierbei eine Fusion des Fluoreszenzproteins mCherry mit einer mutagenisierten und daher konstitutiv agierenden Kernlokalisationssequenz des Transkriptionsfaktors Swi5 verwendet (Moll et al., 1991), welche unter Kontrolle des konstitutiven Promotors *pTEF2* gestellt und stabil in das Genom integriert wurde. Da Kernhistone als Komponenten der Nukleosomen stabil

an jegliche chromosomale DNA binden (Kornberg und Lorch, 1999), wurde zudem eine endogene GFP-Fusion des Kernhistons Hta2 (H2A) als DNA bindendes Protein ausgewählt.

Obwohl die Proteine mCherry-NLS und Hta2 auf den ersten Blick in der Mikroskopie sehr ähnliche, über den gesamten Kern verteilte Signale zeigten, konnten doch vor allem während der Kerntrennung deutliche Unterschiede zwischen beiden Signalen ausgemacht werden (Abb. 4.1). Während mCherry-NLS eine sehr homogene Verteilung zeigte, wies Hta2 teils stärkere lokale Konzentrationsunterschiede innerhalb des Kerns auf. Besonders deutlich wurde dies während der Anaphase, als bereits ein gewisser Anteil des Zellkerns den Knospenhals passiert hatte. Im töchterlichen Bereich des Zellkerns konnte während der Trennung für das Signal von Hta2 eine Aufkonzentrierung beobachtet werden, was für das frei diffundierende mCherry-NLS nicht der Fall war (Abb. 4.1a, $t=4$ min, 6 min). Bei Quantifizierung der Gesamtsignale über den Zeitverlauf wurde ersichtlich, dass mCherry-NLS wie erwartet stark asymmetrisch auf Mutter- und Tochterzelle verteilt wurde, wobei das stärkere Signal in der Mutter anzutreffen war. Hta2 hingegen zeigte eine wesentlich gleichmäßigere Verteilung (Abb. 4.1b). Die quantitative Auswertung wurde für mehrere Zellen durchgeführt, wobei die prozentualen Signalanteile in Mutter und Tochter nach vollständiger Trennung anhand eines Streuplots dargestellt wurden. Während das Signalverhältnis Mutter:Tochter im Falle des frei diffundierenden mCherry-NLS in einem Bereich von 60:40 bis 70:30 lag, zeigte das Kernhiston ein weitaus gleichmäßigeres Verteilungsverhältnis von ca. 55:45, wobei hier auch die Streuung sehr viel geringer ausfiel (Abb. 4.1c). Frei im Kern diffundierendes Protein segregiert also wie erwartet deutlich asymmetrisch und stabile DNA-Bindung hat eine nahezu symmetrische Proteinsegregation zur Folge.

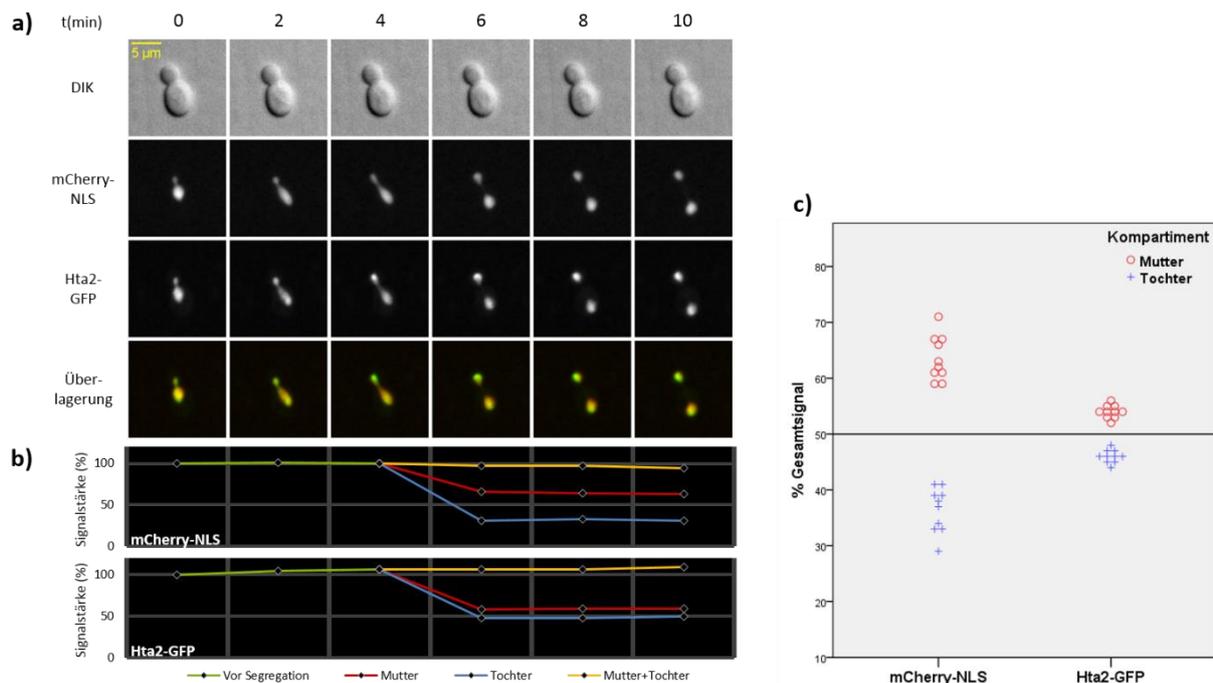


Abbildung 4.1: Unterschiedliches Verteilungsverhalten von mCherry-NLS und Hta2 in der Mitose

a) Spinning-disc-Mikroskopie der mitotischen Segregation von mCherry-NLS und endogenem Hta2-GFP in einer Zeitreihe mit Intervallen von zwei Minuten. Gezeigt sind drei Zeitwerte vor mitotischer Teilung der Signale und drei Zeitwerte nach vollständiger Trennung. Die optischen Schnitte wurden im Falle der Fluoreszenzkanäle aufsummiert. Stamm: W13869 (*mCherry-NLS HTA2-GFP*).

b) Quantifizierung von mCherry-NLS bzw. Hta2-GFP zu den entsprechenden Zeitwerten der in a) gezeigten Mikroskopaufnahmen. Angegeben sind das Signal vor Segregation (grün), die Signalanteile in Mutter und Tochter nach Segregation (rot bzw. blau), sowie die Summe der Signalanteile in Mutter und Tochter nach Segregation (orange). Es wurde hierbei auf die Signalstärke des jeweils ersten gezeigten Zeitwerts normiert.

c) Im Streuplot gezeigt sind die prozentualen Verteilungen der Proteine mCherry-NLS und Hta2-GFP auf Mutter- und Tochterzellen während der Mitose (rot bzw. blau). Für einzelne Zellen wurden zunächst die Mittelwerte der Signale in Mutter und Tochter nach vollständiger Trennung über mehrere Zeitwerte gebildet und diese anschließend auf ihre Summe (Gesamtsignal) normiert. Es wurden n=10 Zellen des Stammes W13869 untersucht.

4.2 Mitotische Segregation nukleolärer Proteine

Der Nukleolus der Bäckerhefe weist eine Vielzahl an Funktionen auf, wobei Ribosomenbiogenese und Zellzyklusregulation zwei der wichtigsten Aufgaben darstellen. Um ein möglichst umfassendes Bild nukleolärer Proteinsegregation während der Mitose zu erlangen, wurden daher Repräsentanten aus verschiedenen Aufgabenbereichen untersucht, welche zudem unterschiedliche Wechselwirkungen innerhalb des Nukleolus vorweisen. Ein Teil der unter diesem Punkt gezeigten Daten wurde bereits im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit erhoben (Girke, 2011), allerdings erfolgte für die vorliegende Arbeit eine andere Form der Auswertung (siehe Rpa135, Net1, Fob1). Bei allen untersuchten nukleolären Proteinen handelte es sich hier um endogene, C-terminale GFP-Fusionen.

4.2.1 Mitotische Segregation von Rpa135

Als Komponente des RNA Polymerase I Holoenzym wurde Rpa135 in der Mikroskopie untersucht. Es handelt sich dabei um die zweitgrößte Untereinheit der Polymerase (Yano und Nomura, 1991), welche für die Lebensfähigkeit der Bäckerhefe essentiell ist. RNA Polymerase I wird durch Wechselwirkung mit Transkriptionsinitiationsfaktoren an den Promotorbereich des 35S rDNA Gens rekrutiert, wobei die Wechselwirkung des Initiationsfaktors Rrn3 mit der Polymerase Untereinheit Rpa43 für die Initiation der Transkription entscheidend ist (Schneider, 2012). Zudem sind Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen nukleolären Komponenten, wie z.B. Net1, bekannt und diese könnten ebenfalls eine Rolle für die nukleoläre Lokalisation des gesamten Holoenzym oder einzelner Komponenten spielen (Shou et al., 2001). Auch Selbstinteraktion könnte die Lokalisation des Proteins beeinflussen, da RNA Polymerase I in Form eines nicht initiationskompetenten Dimers vorliegen kann (Milkereit et al., 1997).

Rpa135 zeigte generell ein typisches, oft halbmondförmiges und relativ homogenes, nukleoläres Signal innerhalb des Zellkerns. Zu Beginn der Anaphase war das Signal im mütterlichen Bereich des Zellkerns positioniert und mit fortschreitender Segregation wanderte ein Teil des Signals aus der Mutterzelle heraus in die Tochterzelle (Abb. 4.2a). Während der Trennung zeigte das elongierte Signal von Rpa135 Diskontinuitäten im Bereich des Knospenhalses oder innerhalb der Tochterzelle (Abb. 4.2a, t=0 min, 2 min, 4 min) und gegen Ende des Trennungsvorgangs waren die nukleolären Strukturen wieder etwas kompakter als während der Trennung. Bei Quantifizierung wurde deutlich, dass der Nukleolus der Mutterzelle im Zuge der Trennung eine deutlich höhere Menge von diesem Protein erhielt, als der Nukleolus der Tochterzelle (Abb. 4.2b). Rpa135 zeigte also ein asymmetrisches Verteilungsverhalten, welches dem von Nukleoplasma sehr ähnlich war. Zusätzlich zum nukleolären Signal von Rpa135 konnte auch ein schwaches cytoplasmatisches Signal beobachtet werden.

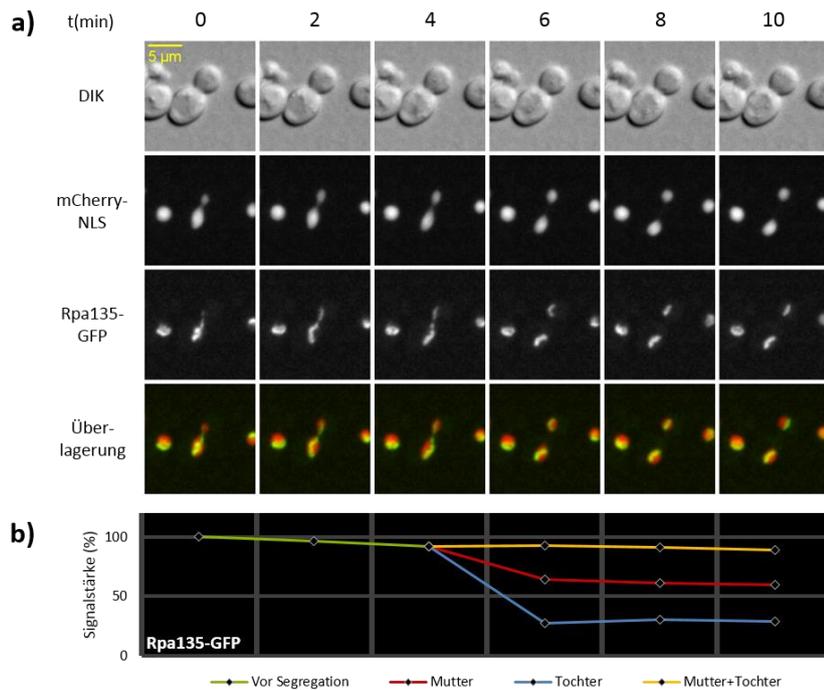


Abbildung 4.2: Asymmetrische Segregation der RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135

a) Spinning-disc-Mikroskopie von mCherry-NLS und endogenem Rpa135-GFP in einer mitotischen Zelle bei einer zeitlichen Auflösung von 2 minütigen Intervallen. Projektionsverfahren der Fluoreszenzkanäle: Aufsummierung der optischen Schnitte. Stamm: W10293 (Hintergrund: W303).

b) Quantifizierung des Signals von Rpa135-GFP zu den entsprechenden Zeitwerten der in a) gezeigten Aufnahmen. Das Ausgangssignal (grün) teilt sich im Laufe der Mitose auf Mutter und Tochter auf (rot bzw. blau), als Kontrolle wurden die beiden Signale nach Trennung aufsummiert (orange). Die Normierung erfolgte auf das Signal des ersten gezeigten Zeitwerts.

4.2.2 Mitotische Segregation von Nop56

Innerhalb des Nukleolus sind verschiedene sog. snoRNPs (small nucleolar Ribonucleoprotein particle) anzutreffen, Komplexe bestehend aus sog. snoRNAs (small nucleolar RNAs) und Proteinen, welche an der Prozessierung von ribosomaler RNA teilhaben (Fromont-Racine et al., 2003; Tschochner und Hurt, 2003). Im Großen und Ganzen unterscheidet man zwischen den box C/D und den box H/ACA snoRNPs, welche Basenmethylierungen bzw. Pseudouridylierungen an der rRNA durchführen, sowie wichtig für Spalt ereignisse der rRNA sein können. Nop56 ist als Untereinheit des U3 snoRNP Komplexes an der Reifung von rRNA beteiligt. Die U3 snoRNA dirigiert dabei den Komplex durch Basenkomplementarität an den entsprechenden Sequenzabschnitt der rRNA. U3 snoRNPs, und damit Nop56, sind ein Teil des SSU-Prozessoms, welches bereits kotranskriptionell an die Prä-rRNA bindet.

Wie im Falle von Rpa135 konnte auch für Nop56 eine sehr gleichmäßige, nukleoläre Lokalisation beobachtet werden (Abb. 4.3a), allerdings war das Signal von Nop56 um ein Vielfaches stärker. Im Allgemeinen waren die während der Segregation beobachteten Strukturen und Abläufe sehr ähnlich, wobei zunächst eine Streckung des Signals aus dem Mutterzellkörper heraus erfolgte und nach der Segregation eine gewisse Kompaktierung, zumindest im Falle des Tochnukleolus, zu erkennen war

(Abb. 4.3a, $t=4$ min, 6 min). Es konnte in diesem Fall kein Auftreten von Signallücken während des Trennungsprozesses festgestellt werden. Das mitotische Verteilungsverhältnis war dem von Rpa135 sehr ähnlich, der Nukleolus der Mutterzelle verfügte nach vollständiger Trennung über eine deutlich höhere Proteinmenge von Nop56 als der Nukleolus der Knospe (Abb. 4.3b). Nop56 zeigte also ebenso eine deutlich asymmetrische Verteilung.

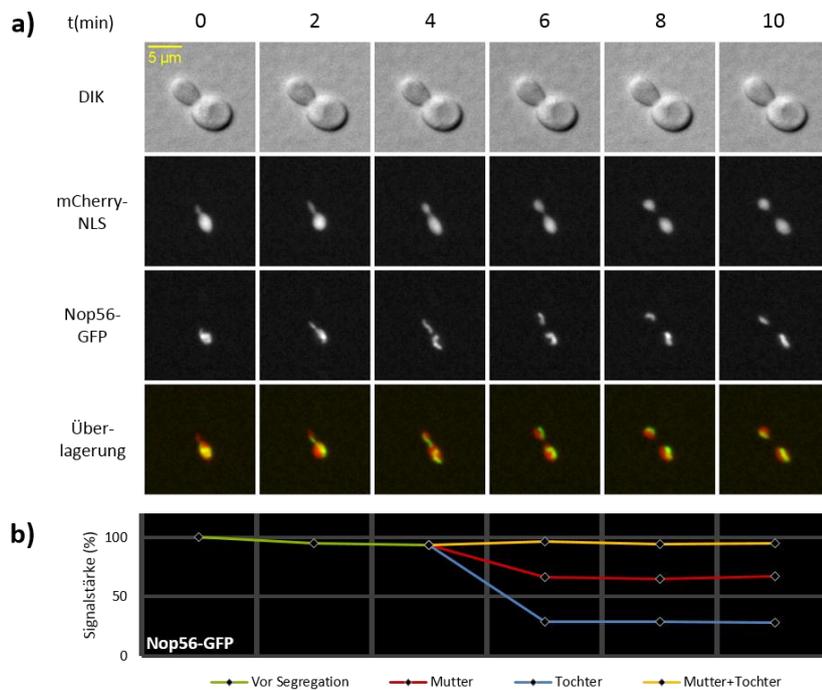


Abbildung 4.3: Asymmetrische Segregation des rRNA Prozessierungsfaktors Nop56

a) Spinning-disc-Mikroskopie von mCherry-NLS und endogenem Nop56-GFP während der Mitose bei Zeitintervallen von 2 Minuten. Für die zweidimensionale Darstellung wurden die optischen Schnitte der Fluoreszenzkanäle aufsummiert. Stamm: W12933 (Hintergrund: W303).

b) Quantitative Auswertung des Signals von Nop56-GFP für die in a) gezeigte Zeitreihe. Dargestellt ist die Signalintensität vor Trennung (grün) und nach Trennung in jeweils Mutter- und Tochterzelle (rot bzw. blau). Die Signale in Mutter und Tochter wurden als Kontrolle aufsummiert (orange). Als Referenz wurde das Signal bei $t=0$ min verwendet.

4.2.3 Mitotische Segregation von Nsr1

Bei Nsr1 handelt es sich um einen rRNA Prozessierungsfaktor mit starker Ähnlichkeit zu Nukleolin der Säugetiere (Kondo und Inouye, 1992), welcher über zwei sog. RRM (RNA Recognition Motifs) verfügt, also ein RNA bindendes Protein darstellt (Lee et al., 1991). Zumindest das Nukleolin der Säuger kann direkt mit Prä-rRNA wechselwirken und ist für frühe Spalttereignisse nötig (Ginisty et al., 1998). Sowohl die RRM als auch weitere Domänen von Nsr1 leisten einen Beitrag zur nukleolären Lokalisation des Proteins (Yan und Mélése, 1993).

Nsr1 zeigte ein relativ homogenes nukleoläres Signal, welches in seiner Intensität dem von Nop56 entsprach, und wies zusätzlich cytoplasmatische Lokalisation auf (Abb. 4.4a). Das nukleoläre Signal

elongierte während der Trennung ausgehend von der Mutterzelle in die Knospe, nach endgültiger Segregation fand eine gewisse Kompaktierung des Tochtersignals statt (Abb. 4.4a, t=4 min, 8 min) und im Nukleolus der Mutterzelle war ein wesentlich stärkeres Signal vorhanden als im Nukleolus der Tochterzelle (Abb. 4.4b). Nsr1 entsprach in seinem asymmetrischen Segregationsmuster dem von Rpa135 und Nsr1. Wegen des relativ hohen cytoplasmatischen Signals wurde in diesem Falle der untere Grenzwert für die Signalerkennung nicht möglichst niedrig gesetzt, sondern derart, dass keine cytoplasmatische Population in die Messung mit einging.

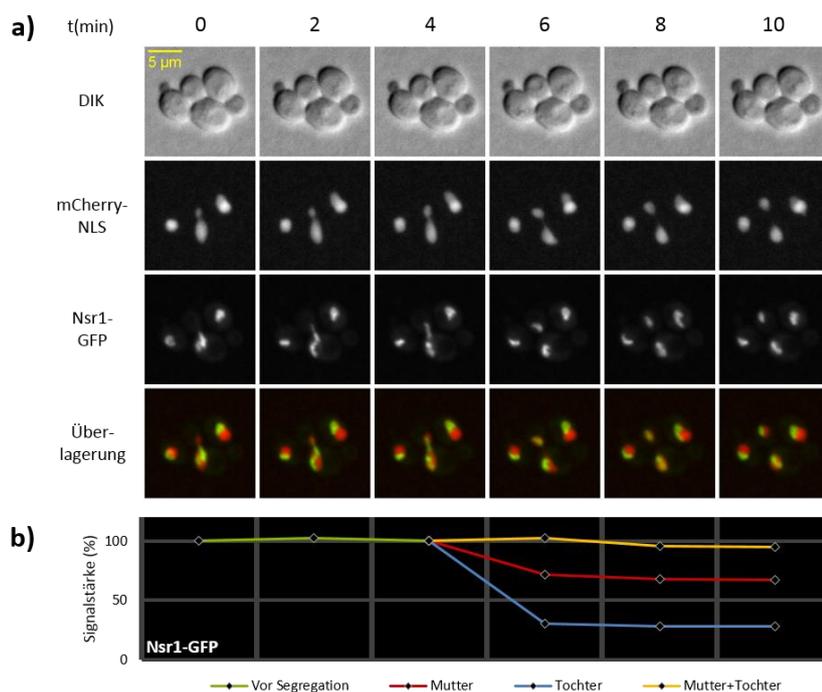


Abbildung 4.4: Asymmetrische Segregation des rRNA Prozessierungsfaktors Nsr1

a) Spinning-disc-Mikroskopie zur mitotischen Verteilung von mCherry-NLS und endogenem Nsr1-GFP in der Anaphase mit zeitlichen Intervallen von 2 Minuten. Als Projektionsverfahren wurde bei den Fluoreszenzsignalen die Aufsummlung der z-Stapel gewählt. Stamm: W10758 (Hintergrund: W303).

b) Vermessung des Signals von Nsr1-GFP zu den in a) dargestellten Mikroskopiedaten. Gezeigt sind das Ausgangssignal vor mitotischer Segregation (grün), sowie die Signalanteile in Mutter- und Tochterzelle nach vollständiger Trennung (rot bzw. blau) und deren Summe (orange). Alle Signale wurden auf den ersten Zeitwert normiert.

4.2.4 Mitotische Segregation von Net1

Das nukleoläre Protein Net1 ist Teil des sog. RENT-Komplexes (REgulator of Nucleolar Silencing and Telophase Exit), welcher innerhalb von NTS1 (Non Transcribed Spacer 1) Elementen der rDNA sowie im Promotorbereich der 35SrDNA bindet und für verschiedenste Prozesse von hoher Wichtigkeit ist (Shou et al., 1999; Huang und Moazed, 2003). Es zeigt physische Interaktion mit RNA Polymerase I, fördert die Synthese von rRNA *in vitro* und *in vivo* (Shou et al., 2001) und spielt als Inhibitor der Phosphatase Cdc14 eine entscheidende Rolle für deren zellzyklusabhängige Regulation (Shou et al.,

1999). Net1 ist des Weiteren wichtig für rDNA-silencing und die Integrität des Nukleolus (Straight et al., 1999). Seine nukleoläre Lokalisation scheint zumindest teilweise von einem weiteren nukleolären Protein, nämlich Fob1, abzuhängen (Girke, 2011).

Im Vergleich zu den bisher betrachteten Proteinen zeigte Net1 ein relativ schwaches nukleoläres Signal und schien auch etwas inhomogen innerhalb des Nukleolus zu lokalisieren (Abb. 4.5a). Während des Trennungsprozesses konnten hier sehr häufig deutliche Diskontinuitäten der elongierten Struktur (Abb. 4.5a, t=0 min, 4 min) und selten auch transiente nukleoplasmatische Lokalisation beobachtet werden (Abb. 4.5a, t=6 min). Die der Elongation und Trennung folgende Komprimierung des Tochtersignals war hier besonders deutlich. Auch von Net1 war nach vollständiger Trennung eine höhere Proteinmenge im Nukleolus der Mutterzelle vorhanden als im Nukleolus der Tochterzelle (Abb 4.5b). Net1 zeigte damit das gleiche asymmetrische Verteilungsverhalten wie alle bisher untersuchten nukleolären Proteine.

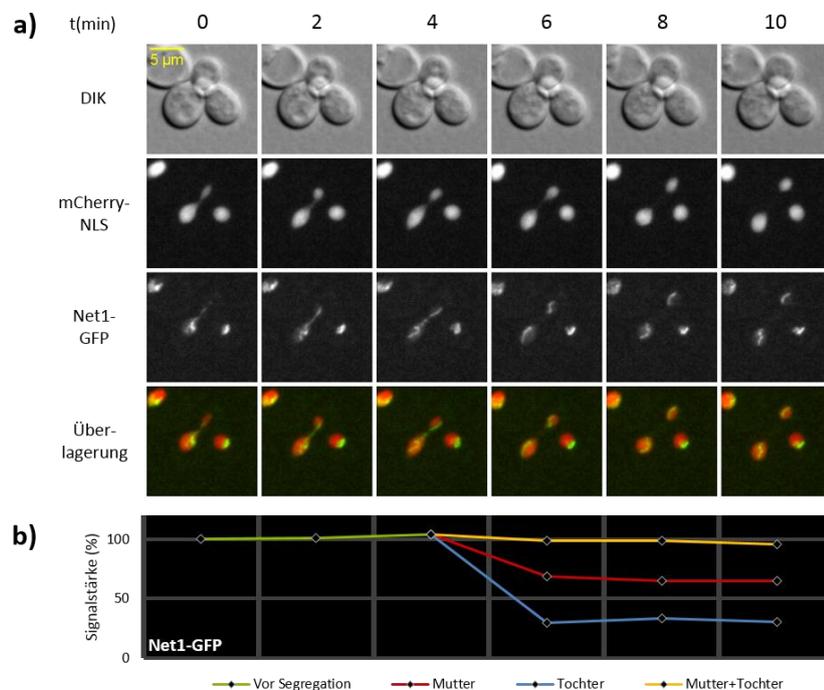


Abbildung 4.5: Asymmetrische Segregation der RENT-Komponente Net1

a) Spinning-disc-Mikroskopie von mCherry-NLS und endogenem Net1-GFP während der mitotischen Teilung einer Zelle mit Zeitintervallen von 2 Minuten. Die Pixelwerte der einzelnen fokalen Ebenen wurden aufsummiert. Stamm: W9642 (Hintergrund: W303).

b) Quantitative Erfassung des Signals von Net1-GFP zu den in a) gezeigten Zeitwerten. Das Signal vor Segregation (grün) teilte sich in ein mütterliches und ein töchterliches Signal (rot bzw. blau). Die Summe der Signale in Mutter und Tochter wurde zu Kontrollzwecken ebenfalls dargestellt (orange). Die Signalstärke bei t=0 wurde als 100% gesetzt.

4.2.5 Mitotische Segregation von Fob1

Die Assoziation des RENT-Komplexes mit der *NTS1* Region der rDNA ist abhängig von der Bindung des rDNA-Bindeproteins Fob1 in diesem Bereich (Huang und Moazed, 2003). Daher spielt auch Fob1 eine

wichtige Rolle für rDNA-silencing und nukleoläre Integrität. Darüber hinaus ist es nötig für Rekombinationsereignisse und die Ausbildung der sog. RFBs (eng. Replication Fork Barriers) innerhalb der rDNA, welche eine Kollision von Replikations- und Transkriptionsmaschinerien verhindern (Kobayashi und Horiuchi, 1996). Es bindet spezifisch an Ter1 und Ter2 Sequenzen innerhalb der nicht durch RNA Polymerase I transkribierten *NTS1* Regionen der rDNA und wechselwirkt mit sich selbst (Mohanty und Bastia, 2004).

Von allen untersuchten nukleolären Proteinen zeigte Fob1 das schwächste Signal in der Mikroskopie. Es konnten filigrane, in Foci organisierte Strukturen beobachtet werden, welche denen von Net1 sehr ähnlich waren (Abb. 4.5a; 4.6a). Auch bei diesem Protein traten während des Trennungsvorgangs häufig Signallücken bei der elongierten Struktur zu Tage (Abb. 4.6a, t=2 min). Ein deutlicher Unterschied zu den bisher betrachteten nukleolären Proteinen war die sehr gleichmäßige Verteilung von Fob1 auf die Nukleoli von Mutter- und Tochterzelle während der Mitose (Abb. 4.6b). Fob1 ist also ein Beispiel für symmetrische Verteilung und verhält sich damit wie rDNA selbst. Die stetige Signalabnahme über die Zeitreihe hinweg sollte auf Bleichen zurückzuführen sein.

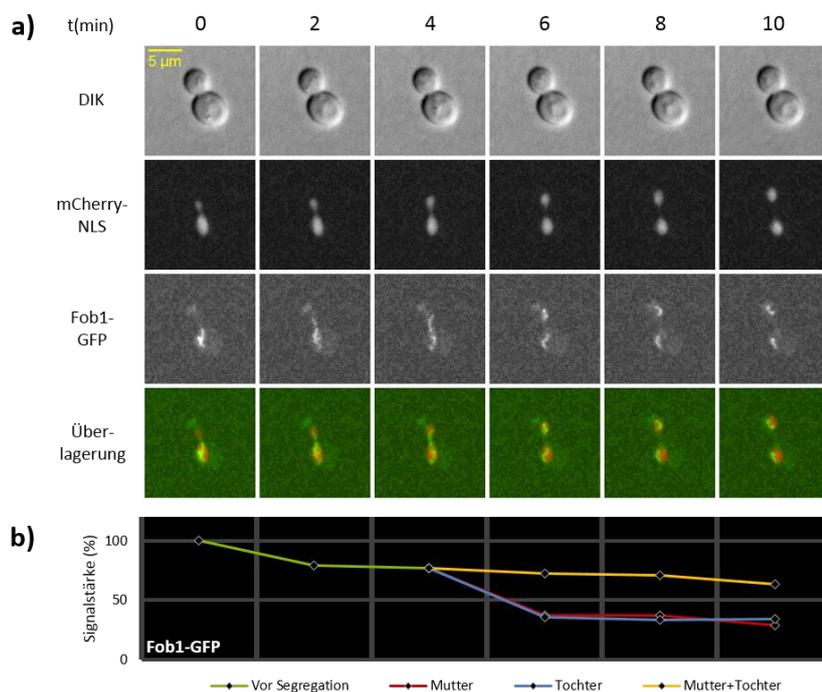


Abbildung 4.6: Gleichverteilung des rDNA-Bindeproteins Fob1

a) Spinning-disc-Mikroskopie der mitotischen Segregation von mCherry-NLS und endogenem Fob1-GFP in der Anaphase bei einer zeitlichen Auflösung von 2 Minuten. Als Projektionsart wurde die Aufsummierung der einzelnen z-Ebenen verwendet. Stamm: W10299 (Hintergrund: W303).

b) Signalvermessung von Fob1-GFP zu den entsprechenden, in a) gezeigten Mikroskopaufnahmen. Dargestellt sind das Signal vor Segregation (grün) und die Signalanteile in Mutter und Tochter nach der Segregation (rot bzw. blau). Zusätzlich wurden die Signale in Mutter und Tochter zur Überprüfung aufsummiert (orange). Alle Signale wurden auf den ersten Zeitwert angeglichen.

4.2.6 Mitotische Segregation von Hmo1

Hmo1 ist ein Angehöriger der HMGB-Familie (High Mobility Group Box) nukleinsäurebindender Proteine und gilt als Teil der RNA Polymerase I Maschinerie, da seine Überexpression den Wachstumsdefekt einer RNA Polymerase I Deletionsmutante ($\Delta rpa49$) supprimiert und seine Anwesenheit für hohe Fließgleichgewichtsmengen an rRNA nötig ist (Lu et al., 1996; Gadal et al., 2002). Es ist Teil der nukleosomenfreien, sog. „offenen“, Chromatinform der rDNA und beeinflusst die Topologie von DNA (Merz et al., 2008; Xiao et al., 2010). ChIP Experimente zeigten, dass Hmo1 nicht nur im gesamten, durch RNA Polymerase I transkribierten Bereich der rDNA bindet, sondern auch an Promotoren von Genen, welche für ribosomale Proteine kodieren (Berger et al., 2007; Hall et al., 2006). Des Weiteren zeigte Hmo1 auch ein komplexes Selbstinteraktionsverhalten in biochemischen Studien (Xiao et al., 2010), was für seine nukleoläre Lokalisation von Bedeutung sein könnte. Die Lokalisation könnte auch durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und SUMOylierung beeinflusst sein (Bauerle et al., 2006; Huber et al., 2009; Zhou et al., 2004).

Obwohl Hmo1 als Teil der RNA Polymerase I Maschinerie gilt, zeigte es deutlich unterschiedlichen Signalcharakter im Vergleich zu Rpa135. Zum einen war das nukleoläre Signal von Hmo1 etwas stärker und zum anderen wies es im Gegensatz zu der relativ homogenen Verteilung von Rpa135 eine eher inhomogene, in Foci organisierte nukleoläre Lokalisation auf, wie dies auch für Net1 und Fob1 beobachtet werden konnte (Abb. 4.5; 4.6; 4.7). Hmo1 bindet zwar auch an Promotoren, die aufgrund der Kernarchitektur von *S.cerevisiae* nicht in räumlicher Nähe des Nukleolus liegen können (Taddei et al., 2010), dennoch erschien Hmo1 in der Mikroskopie als ein ausschließlich nukleoläres Signal (Abb. 4.7a). Hinsichtlich seiner mitotischen Segregation zeigte Hmo1 des Weiteren ein besonderes Verhalten. Nach vollständiger Trennung war von diesem Protein im Nukleolus der Tochterzelle eine deutlich höhere Menge vorhanden als im Nukleolus der Mutterzelle und damit zeigte es eine gegenläufige Asymmetrie zu sowohl Nukleoplasma als auch zu den meisten anderen der untersuchten nukleolären Proteine (Abb. 4.7b).

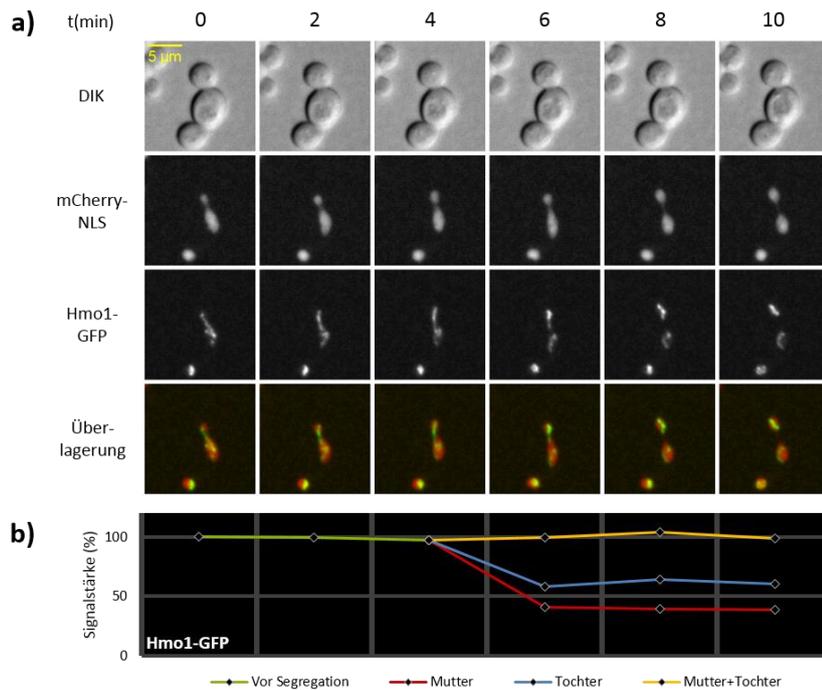


Abbildung 4.7: Besonderes Verteilungsverhalten des rDNA-Bindeproteins Hmo1

a) Spinning-disc-Mikroskopie zur mitotischen Verteilung von mCherry-NLS und endogenem Hmo1-GFP mit Zeitabständen von 2 Minuten. Als Projektionsverfahren wurde eine Aufsummierung der optischen Schnitte durchgeführt. Stamm: W10146 (Hintergrund: W303).

b) Das Signal von Hmo1-GFP wurde über die in a) gezeigte Zeitreihe quantifiziert. Angegeben sind das Signal vor mitotischer Teilung (grün), sowie die Signalanteile in Mutter und Tochter nach der Teilung (rot bzw. blau) und deren Summe (orange). Die Signalintensitäten wurden auf den ersten Zeitwert normiert.

4.2.7 Übersicht zur mitotischen Segregation nukleolärer Proteine

Der grundlegende Ablauf der mitotischen Segregation war bei allen untersuchten Signalen sehr ähnlich. Bei Trennungsbeginn waren die nukleolären Strukturen asymmetrisch auf Seite der Mutterzelle lokalisiert. Während der Elongation des Signals wurde ein Schwesterchromatid durch den Knospenhals in die Tochter gezogen und anschließend wieder kompaktiert. Bei den etwas schwächeren bzw. inhomogeneren Signalen konnte zudem häufig das Auftreten von Diskontinuitäten des in die Tochter wandernden Signals beobachtet werden. Für einen besseren Überblick zum Verteilungsverhalten nukleolärer Proteine in der Mitose der Bäckerhefe wurden für jedes in Abb. 4.2-4.7 behandelte Protein mehrere Zellen der jeweiligen Stämme untersucht und die Ergebnisse zusammenfassend in einem Streuplot dargestellt (Abb. 4.8).

Von den Prozessierungsfaktoren Nop56 und Nsr1, welche mit rRNA assoziieren, erhielt der Mutternukleolus im Zuge der Trennung eine deutlich höhere Proteinmenge als der Tochternukleolus. Dies war auch für die RENT-Komponente Net1, sowie die RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135 zutreffend. RNA Polymerase I wechselwirkt vermutlich dynamisch mit rDNA und ist nur während aktiver Transkription stabil mit dieser assoziiert. Die Verteilungsverhältnisse Mutter:Tochter dieser vier Proteine lagen in einem Bereich von ca. 60:40 bis 80:20 und waren damit dem Verteilungsverhalten

des frei im Kern diffundierenden mCherry-NLS sehr ähnlich. Das direkt an rDNA bindende Fob1 zeigte eine sehr gleichmäßige Verteilung bei allen untersuchten Zellen, was eher dem Verhalten der Kernhistonfusion als dem von mCherry-NLS entsprach. Für das ebenfalls direkt an rDNA bindende Hmo1 war erstaunlicherweise die Proteinmenge im Tochnukleolus nach mitotischer Segregation höher als im Mutternukleolus (Abb. 4.8). Damit zeigte Hmo1 ein besonderes, den meisten anderen untersuchten Proteinen genau gegenläufiges Segregationsverhalten. Beim Vergleich der verschiedenen Proteine war kein Zusammenhang zwischen Signalintensität und Verteilungsverhalten erkennbar. Die relativen nukleolären Mengenverhältnisse der verschiedenen Proteine zueinander konnten allerdings nicht exakt berechnet werden, da sowohl die Anregung der Signale als auch die bei der Quantifizierung gesetzten Grenzwerte unterschiedlich waren. Es kann an dieser Stelle jedoch die Aussage getroffen werden, dass in der Mitose aus einem Ausgangsnukleolus der Mutterzelle zwei neue Nukleoli mit deutlich unterschiedlicher Proteinkomposition entstehen.

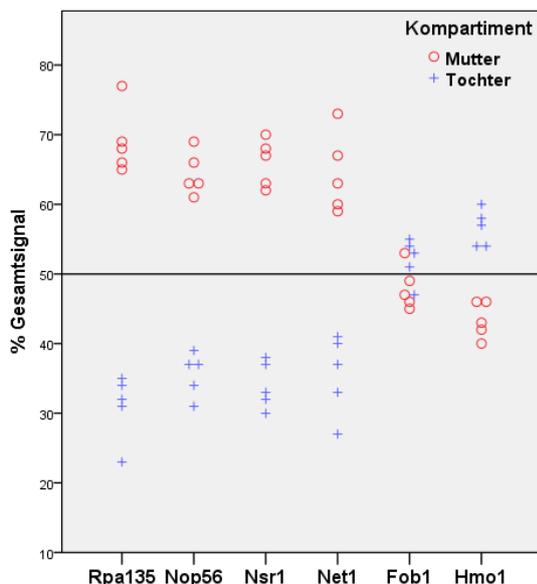


Abbildung 4.8: Statistische Auswertung zur mitotischen Segregation nukleolärer Proteine

Mitotische Verteilung endogener GFP-Fusionen der angegebenen nukleolären Proteine. Die Signalstärken in Mutter und Tochter nach mitotischer Trennung wurden für einzelne Zellen über mehrere Zeitwerte gemittelt, dann erfolgte die Aufsummierung der Signale in Mutter und Tochter (Gesamtsignal) für Einzelzellen und die Normierung auf das so erhaltene Gesamtsignal. Signalanteil Mutter: rot. Signalanteil Tochter: blau. Für jeden Stamm wurden n=5 Zellen analysiert. Verwendete Stämme: W10293 (*RPA135-GFP*), W12933 (*NOP56-GFP*), W10758 (*NSR1-GFP*), W9642 (*NET1-GFP*), W10299 (*FOB1-GFP*), W10146 (*HMO1-GFP*). Bei allen Stämmen handelte es sich um den genetischen Hintergrund W303.

4.3 Dynamik nukleolärer Proteine

Da die meisten untersuchten nukleolären Proteine ein Segregationsverhalten zeigten, welches dem des nukleoplasmatischen mCherry-NLS entsprach, könnte zunächst vermutet werden, dass diese evtl. eine hohe Dynamik innerhalb des Zellkerns aufweisen und ihre asymmetrische Segregation somit durch die Verteilung des umgebenden Nukleoplasmas bestimmt wird. FLIP-Experimente (Fluorescence Loss In Photobleaching) sollten Aufschluss darüber geben, ob im Falle der beiden Proteine Rpa135 und Hmo1 die deutlich unterschiedlichen Verteilungsmuster auf unterschiedliche Dynamiken

zurückgeführt werden können. Das Verhalten von endogenen GFP-Fusionen der beiden nukleolären Proteine wurde dabei mit dem von mCherry-NLS verglichen.

4.3.1 Dynamik von Rpa135

Bereits durchgeführte FRAP-Analysen (Fluorescence Recovery After Photobleaching) einer Gruppe um Tom Misteli offenbarten eine biphasische Kinetik verschiedener RNA Polymerase I Untereinheiten in Säugerzellen. Eine aus den Daten gezogene Schlussfolgerung war, dass der Großteil verschiedener RNA Polymerase I Untereinheiten transkriptionell inaktiv ist und sich damit innerhalb des Zellkerns dynamisch verhält (Dundr et al., 2002). Ob RNA Polymerase I Untereinheiten der Bäckerhefe ein ähnliches Verhalten zeigen ist unklar und muss bei einer Untersuchung des mitotischen Segregationsverhaltens geklärt werden. In wachsenden Zellen von *S.cerevisiae* liegt nur ein geringer Anteil von RNA Polymerase I (weniger als 2%) als mit Rrn3 assoziiertes, initiationskompetentes Monomer vor, der Großteil des Enzyms jedoch bildet inaktive Dimere (Milkereit und Tschochner, 1998; Milkereit et al., 1997). Daher könnte erwartet werden, dass auch in der Bäckerhefe der Großteil der nukleolären RNA Polymerase I Population transkriptionell inaktiv ist und sich damit innerhalb des gesamten Kerns dynamisch verhält.

Zunächst sollte getestet werden, welches Verhalten die Untereinheit Rpa135 während der Anaphase zeigt, wenn der Nukleolus als kontinuierliche, elongierte Struktur vorliegt (Abb. 4.9a). Jeder dem Kontrollwert (Prä) folgenden Aufnahme war hier ein Bleichereignis vorgeschaltet, nur jede fünfte Aufnahme ist gezeigt. Es wurde ein kleiner Bereich des Zellkerns und des Nukleolus innerhalb des Mutterzellkörpers in beiden Fluoreszenzkanälen gebleicht, die entsprechenden Bereiche sind mit einer roten Markierung gekennzeichnet. mCherry-NLS zeigte eine rapide und über den gesamten Kern homogene Abnahme des Signals bereits nach fünf Bleichereignissen (Abb. 4.9a, $t=26,49$ sec), wie dies für ein frei diffundierendes Protein zu erwarten ist. Rpa135 hingegen zeigte eine vergleichsweise langsame Signalabnahme über die gesamte nukleoläre Struktur, erst nach zwanzig Bleichereignissen (Abb. 4.9a, $t=105,96$ sec) war das Signal über die gesamte, elongierte nukleoläre Struktur nahezu ausgelöscht. Eine gewisse cytoplasmatische Population von Rpa135 war bei allen Zeitwerten erkennbar, diese schien durch das Bleichen nicht betroffen zu sein. Rpa135 zeigte also eine gewisse Dynamik während der Anaphase, welche allerdings deutlich unterschiedlich zu mCherry-NLS war. Die Gesamtsignale konnten bei diesem Versuch nicht erfasst werden, da nur ein optischer Schnitt aufgenommen wurde.

Als weiteres Experiment wurde untersucht, ob Rpa135 einen Austausch zwischen zwei nukleolären Strukturen in der Anaphase zeigt (Abb. 4.9b, c). Hierbei wurde getestet, ob einmaliges, massives Bleichen des Mutternukleolus unmittelbar nach rDNA-Trennung einen Einfluss auf das Signal von Rpa135 in der Tochter zeigt. Zur Überprüfung, ob Austausch zwischen Mutter- und Tochterkern

stattfinden konnte, wurde neben Rpa135 auch mCherry-NLS gebleicht. Durch die Verwendung von z-Stapeln konnten bei diesem Experiment die jeweiligen Gesamtsignale in Mutter und Tochter quantifiziert und über einen längeren Zeitraum präzise verfolgt werden. Die Mikroskopie ist für eine ausgewählte Zelle gezeigt (Abb. 9b). Die Quantifizierung wurde für mehrere Zellen durchgeführt, wobei auch ungebleichte Kontrollzellen ausgewertet wurden, da neben gewolltem Bleichen sowohl ungewolltes Bleichen durch die Aufnahme als auch Proteinbiosynthese und Proteindegradation Einfluss auf die untersuchten Signale nehmen können (Abb. 4.9c). Vor dem Bleichen wurde ein Kontrollwert (Prä) aufgenommen, anschließend folgte das Bleichereignis und die Beobachtung der Signale. Die gebleichten Bereiche sind beim Kontrollwert rot markiert. Zu Beginn des Experiments war die Distanz zwischen beiden Kernen noch nicht maximal und sie waren durch eine dünne Nukleoplasmabrücke verbunden (Abb. 4.9b, Prä), erst bei den Zeitwerten 4-8 min hatten sie maximalen Abstand zueinander. Eine Arbeit der Gruppe um Yves Barral zeigte, dass der Austausch von Nukleoplasma zwischen Mutter- und Tochterkern erst in der späten Anaphase, bei großem Abstand der Kerne zueinander, stark eingeschränkt ist (Boettcher et al., 2012). Einmaliges starkes Bleichen von mCherry-NLS in der Mutter hatte bei geringem Abstand der Kerne und vorhandener Nukleoplasmabrücke einen unmittelbaren und deutlichen Signalabfall von mCherry-NLS auch in der Knospe zur Folge (Abb. 4.9c, mCherry-NLS, t=0min). Dies spricht für einen hohen Austausch von mCherry-NLS zwischen den Kernen über den Nukleoplasmakanal. Gleichzeitig mit mCherry-NLS wurde auch das Signal von Rpa135 im Nukleolus der Mutter gebleicht, was allerdings nur eine moderate Signalabnahme von Rpa135 im Nukleolus der Knospe zur Folge hatte (Abb. 4.9c, Rpa135-GFP). Das Signal von Rpa135 im Nukleolus der Tochter nahm bis t=4 min leicht ab und blieb dann konstant. Da hier die Signalabnahme etwas stärker war als bei den Kontrollzellen, sollte ein gewisser Austausch von Rpa135 zwischen beiden Nukleoli stattgefunden haben. Rpa135 zeigte also eine gewisse Dynamik während der Anaphase, jedoch nur geringen Austausch zwischen zwei nukleolären Strukturen innerhalb eines nukleoplasmatischen Kontinuums. Die in Abbildung 4.9a beobachtete Dynamik könnte daher vorwiegend intranukleolärer Natur sein. Das Verhalten von Rpa135 unterschied sich deutlich von frei diffundierendem mCherry-NLS und damit sollte seine mitotische Verteilung nicht primär durch die nukleoplasmatische Umgebung bestimmt sein.

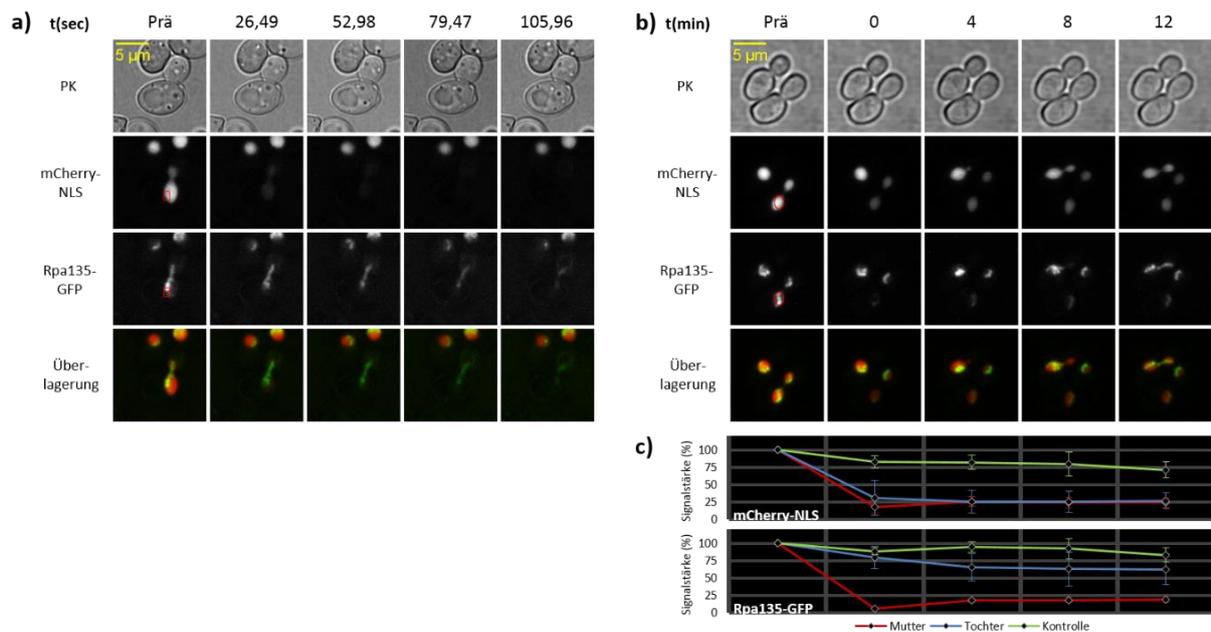


Abbildung 4.9: Dynamik von Rpa135 in der Anaphase

Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie von mCherry-NLS und endogenem Rpa135-GFP in verschiedenen Bleichexperimenten. Stamm: W10293 (Hintergrund: W303).

a) Bleichen von Rpa135-GFP in einer elongierten Anaphasestruktur. Eine optische Ebene bei einem Pinhole-Durchmesser von 2 Airy Units erfasst. Prä: Aufnahme vor Beginn des Experiments, in Rot dargestellt sind die im Anschluss wiederholt in beiden Fluoreszenzkanälen gebleichten Flächen. Jeder folgenden Aufnahme in der Zeitreihe war ein Bleichereignis vorgeschaltet, nur jede fünfte Aufnahme des Experiments ist gezeigt.

b) Bleichen von Rpa135-GFP im Nukleolus der Mutter unmittelbar nach rDNA-Trennung bei vorhandener Verbindung von Mutter und Tochterkern. Gezeigt ist eine Reihe von aufsummierten z-Stapeln, wobei ein Pinhole-Durchmesser von 1 Airy Unit angewandt wurde. Nach dem ersten z-Stapel (Prä) wurde nur einmal intensiv gebleicht und eine Reihe von weiteren z-Stapeln aufgenommen. Die roten Bereiche geben die in beiden Fluoreszenzkanälen gebleichten Flächen wieder.

c) Das in b) gezeigte Experiment wurde für insgesamt n=3 Zellen durchgeführt und die Signale von mCherry-NLS und Rpa135-GFP wurden in Mutter und Tochter quantifiziert (rot bzw. blau). Als Kontrollen sind zusätzlich die Signale von mCherry-NLS und Rpa135-GFP in nicht gebleichten Zellen angegeben (n=2 bzw. 3; grün). Die gemittelten prozentualen Signalstärken bezüglich der Ausgangswerte wurden zusammen mit den entsprechenden Standardabweichungen angegeben.

4.3.2 Dynamik von Hmo1

Hmo1 ist in höheren Eukaryoten nicht vorhanden, allerdings verfügen diese über das HMGB-Protein UBF (Upstream Binding Factor), welches zumindest teilweise sehr ähnliche Eigenschaften wie Hmo1 der Bäckerhefe aufweist. Beide Proteine binden unter anderem in der durch RNA Polymerase I transkribierten Region der rDNA und fördern die transkriptionelle Aktivität selbiger (Berger et al., 2007; O'Sullivan et al., 2002; Gadal et al., 2002; Albert et al., 2012). UBF kann in der Bäckerhefe des Weiteren anstelle von Hmo1 die Aktivität von RNA Polymerase I fördern (zumindest die Isoform UBF1) und zeigt interessanterweise auch nukleoläre Lokalisation bei Expression in *S.cerevisiae* (Albert et al., 2013a). Bei den bereits erwähnten FRAP-Studien wurde auch UBF1 untersucht, wobei es im Vergleich zu RNA Polymerase I Untereinheiten eine deutlich höhere Kinetik und nur eine schnelle Phase zeigte (Dundr et al., 2002). Dieser Faktor scheint also relativ dynamisch mit rDNA assoziiert zu sein. Hmo1 und UBF1

weisen allerdings auch gravierende strukturelle und funktionelle Unterschiede auf, weswegen unterschiedliches Verhalten bei Bleichexperimenten denkbar wäre.

Für Hmo1 wurden die Bleichexperimente analog zu Rpa135 durchgeführt. Wie im Falle von Rpa135 soll auch für Hmo1 zunächst das Verhalten bei Vorliegen einer kontinuierlichen, elongierten nukleolären Struktur in der Anaphase mit hoher zeitlicher Auflösung betrachtet werden. Wiederum wurden die Signale des Kernmarkers und der GFP-Fusion gleichzeitig in einem kleinen Bereich des Mutterzellkörpers kontinuierlich geblichen. Das Signal von mCherry-NLS zeigte auch hier eine schnelle und gleichmäßigen Abnahme im gesamten Kern nach bereits fünf Bleichereignissen (Abb. 4.10a, $t=26,49$ sec). Hmo1 verhielt sich vergleichbar zu Rpa135 und zeigte ein relativ langsames, graduelles Erlöschen in der elongierten nukleolären Struktur über die Zeitreihe hinweg (Abb. 4.10a). Hmo1 zeigte also eine gewisse Dynamik, welche wie im Fall von Rpa135 zu Nukleoplasma jedoch deutlich geringer war.

Auch für Hmo1 sollte getestet werden, ob unmittelbar nach rDNA-Trennung ein Austausch des Proteins zwischen zwei Nukleoli in der Mitose stattfindet (Abb. 4.10b, c). Ein Kontrollwert (Prä) wurde aufgenommen, anschließend erfolgte massives Bleichen von Hmo1 und mCherry-NLS im Mutterzellkörper (Abb. 4.10b, Prä, rote Markierungen) und die Signale wurden über 12 min hinweg beobachtet. Bei diesen Aufnahmen handelte es sich um z-Stapel und die Gesamtsignale konnten daher quantifiziert werden. Der Kernmarker belegte, dass zum Zeitpunkt des Bleichens effizienter Austausch zwischen den beiden Kernen möglich war, da starkes Bleichen von mCherry-NLS im Mutterkern einen unmittelbaren, drastischen Signalabfall in der Tochter verursachte. Trotz vollständigen Bleichens von Hmo1 im Mutternukleolus blieb das Tochter-signal von Hmo1 über die gesamte Zeitserie erhalten. Hmo1 des Tochter-nukleolus verhielt sich zu den Signalen von Kontrollzellen identisch, weswegen ein Austausch zwischen Mutter- und Tochter-nukleolus ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.10b, c). Hmo1 wird also hocheffizient innerhalb eines Nukleolus gehalten und zeigt eine gewisse intranukleoläre Dynamik während der Anaphase.

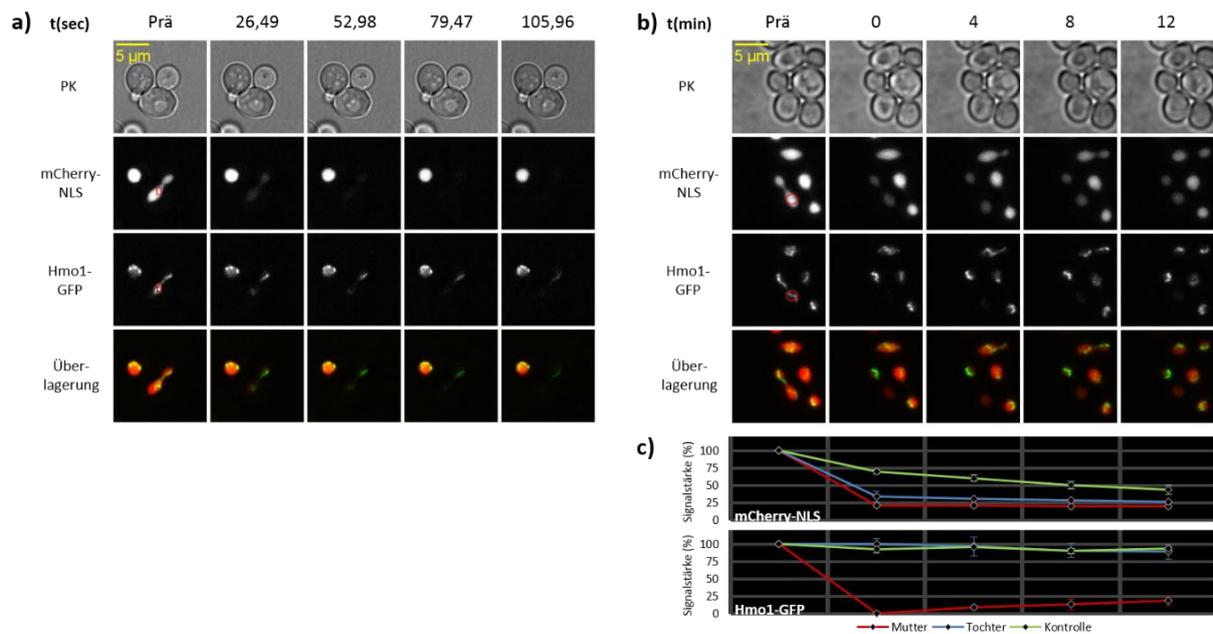


Abbildung 4.10: Dynamik von Hmo1 in der Anaphase

Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie von mCherry-NLS und endogenem Hmo1-GFP in verschiedenen Bleichexperimenten. Stamm: W10146 (Hintergrund: W303).

a) Bleichen von Hmo1-GFP in einer elongierten Anaphasestruktur. Pro Aufnahme wurde ein optischer Schnitt mit einem Pinhole-Durchmesser von 2 Airy Units erfasst. Prä: Zeitwert vor Experimentbeginn, die im Anschluss in beiden Fluoreszenzkanälen wiederholt gebleichten Bereiche sind rot markiert. Unmittelbar vor Jeder weiteren Aufnahme erfolgte ein Bleichschritt, nur jeder fünfte Zeitwert ist dargestellt.

b) Bleichen von Hmo1-GFP im Mutterzellkörper unmittelbar nach rDNA-Trennung bei nukleoplasmatischer Verbindung zwischen Mutter- und Tochterkern. z-Stapel wurden bei einem Pinhole-Durchmesser von 1 Airy Unit aufgenommen und für die zweidimensionale Darstellung der Daten aufsummiert. Es wurde ein Kontrollwert aufgenommen (Prä), die rot angegebenen Flächen wurden in beiden Fluoreszenzkanälen einmalig intensiv gebleicht und es erfolgte die anschließende Beobachtung der Signale über mehrere Zeitwerte hinweg.

c) Das in b) dargestellte Experiment wurde für n=3 Zellen durchgeführt. Neben den Signalen von Mutter und Tochter in den gebleichten Zellen (rot bzw. blau) wurden als Kontrollen mCherry-NLS und Hmo1-GFP auch in nicht gebleichten Zellen quantifiziert (n=3; grün). Alle Signale wurden auf ihre Ausgangswerte angeglichen und sind mit Standardabweichungen dargestellt.

4.4 Einfluss der Phosphatase Cdc14 auf das Segregationsverhalten von Rpa135 und Hmo1

Durch die Bleichexperimente wurde deutlich, dass zumindest die nukleolären Proteine Hmo1 und Rpa135 sehr effizient in einer nukleolären Struktur gehalten werden, aber scheinbar innerhalb einer solchen Struktur eine gewisse Dynamik aufweisen. Damit sollte die Verteilung dieser Proteine zwar nicht primär durch die Größenverhältnisse der beiden entstehenden Kerne bestimmt werden, allerdings könnten dem Segregationsverhalten von Nukleoplasma und nukleolären Proteinen gleiche Mechanismen zugrunde liegen. Welche Rolle z.B. der Knospenhals als Engstelle für die Segregation spielt, ist an dieser Stelle völlig unklar. Die Literatur gibt ein sehr detailliertes Bild davon, wie die Trennung der Schwesterchromatiden in der Mitose von *S.cerevisiae* genau abläuft (Renshaw et al., 2010). Die Geometrie der Chromosomensegregation ist stark asymmetrisch, wobei das Chromatin zu

Trennungsbeginn innerhalb der Mutterzelle liegt. Mit Beginn der Anaphase setzt die Spaltung von Kohäsion ein, allerdings bleibt während der Segregation eine gewisse Restkohäsion bestehen, was dazu führt, dass eines der beiden Schwesterchromatiden von Chromosom XII schrittweise aus dem Nukleolus der Mutter heraus durch den Knospenhals in die Tochter gezogen wird und dabei starke, kohäsionabhängige Streckungs- und kondensinabhängige Kompaktierungsereignisse erfährt. Dies trifft für das in der Mutter verbleibende Chromatid wenn überhaupt nur in geringem Maße zu. Die Phosphatase Cdc14 ist essentiell für die mitotische Segregation von ribosomaler DNA und nimmt hierbei Einwirkung auf einige der erwähnten Prozesse, wie zum Beispiel die Elongation der mitotischen Spindel oder die Rekrutierung von Kondensin an die ribosomale DNA (Torres-Rosell et al., 2004; Khmelinskii et al., 2007; D'Amours et al., 2004; Sullivan et al., 2004). Mit der Vermutung, dass der geordnete Ablauf diverser an rDNA-Trennung beteiligter Prozesse eine Rolle für nukleoläre Proteinsegregation spielen könnte und mit dem Wissen, dass mit der Phosphatase Cdc14 ein Faktor gegeben ist, welcher einen entscheidenden Einfluss auf einige dieser Prozesse ausübt, sollte die mitotische Segregation von endogenem Rpa135-GFP und Hmo1-GFP in einer thermosensitiven *cdc14-3* Mutante analysiert werden.

Der Einfluss von Cdc14 auf die mitotische Segregation von Rpa135 und Hmo1 ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Bei 37°C zeigten die Kontrollstämme ein Verhalten wie bei Raumtemperatur (21-23°C), allerdings schien hier die Nukleolustrennung etwas schneller abzulaufen. Von Rpa135 erhielt der Mutternukleolus die höhere Proteinmenge, von Hmo1 erhielt der Tochnukleolus die höhere Menge (Abb. 4.11a, b). In der *cdc14-3* Mutante hingegen war bei restriktiven Bedingungen (37°C) ein stark veränderter Trennungsprozess für Rpa135 und auch Hmo1 bei den gezeigten Zellen zu beobachten. Im Vergleich zur Elongation des Zellkerns war die Segregation von Rpa135 und Hmo1 stark verzögert. Im Fall von Rpa135 war über mehrere Zeitwerte eine elongierte Struktur sichtbar (Abb. 4.11a, Rpa135, *cdc14-3*, t=0, 2, 4 min), welche sich dann sehr symmetrisch trennte. Für Hmo1 lief die Segregation in *cdc14-3* sehr abrupt ab, ohne erkennbare elongierte Strukturen (Abb. 4.11a, Hmo1, *cdc14-3*, t=4, 6 min). Bei Quantifizierung der Signale konnte festgestellt werden, dass sowohl Rpa135 als auch Hmo1 in der *cdc14-3* Mutante sehr gleichmäßig auf Mutter und Tochter verteilt wurden (Abb. 4.11b). Eine statistische Analyse bestätigte die gleichmäßige Verteilung von Rpa135 und Hmo1 in der *cdc14-3* Mutante bei restriktiven Bedingungen (Abb. 4.11c). Im Kontrollstamm lag das Verteilungsverhältnis (Mutter:Tochter) für Rpa135 in einem Bereich von etwa 75:25 bis 60:40, in der Mutante bei 65:35 bis 50:50. Die Streuung der Werte war in beiden Stämmen sehr ähnlich und homogen. Hmo1 zeigte im Kontrollstamm Verteilungen in einem Bereich von etwa 25:75 bis 45:55 und in der Mutante war die Verteilung im Schnitt wesentlich symmetrischer, allerdings war in der Mutante auch eine sehr starke Streuung der Werte zu verzeichnen. Die Kontrollzellen wurden vor Aufnahmebeginn mindestens 50 min bei 37°C inkubiert und auch wenn diese mehr als 80 min vor Aufnahmestart bei 37°C am Mikroskop

inkubiert wurden, zeigten sie ein Segregationsverhalten wie bei Raumtemperatur. Die *cdc14-3* Zellen hingegen wurden nur maximal 50 min bei 37°C vorinkubiert, da bereits hier teils unüberwindbare Trennungsprobleme hinsichtlich der nukleolären Signale auftraten. Eine weitere Beobachtung war, dass die Fluoreszenzsignale von Rpa135 und Hmo1 bei 37°C eine teils sehr starke Oszillation zeigten, die bei allen Zellen eines Präparats synchron lief (Abb. 4.11b). Dies sollte vermutlich durch Temperaturschwankungen verursacht worden sein, da das Heizelement die eingestellte Temperatur über den Zeitverlauf nicht absolut konstant hielt. Die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von GFP könnte hier eine Rolle spielen (Leiderman et al., 2006). Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass hohe Aktivität von Cdc14 sowohl für eine normale Mechanik der rDNA-Trennung als auch für die Etablierung der gegensätzlichen Asymmetrien von Rpa135 und Hmo1 notwendig ist.

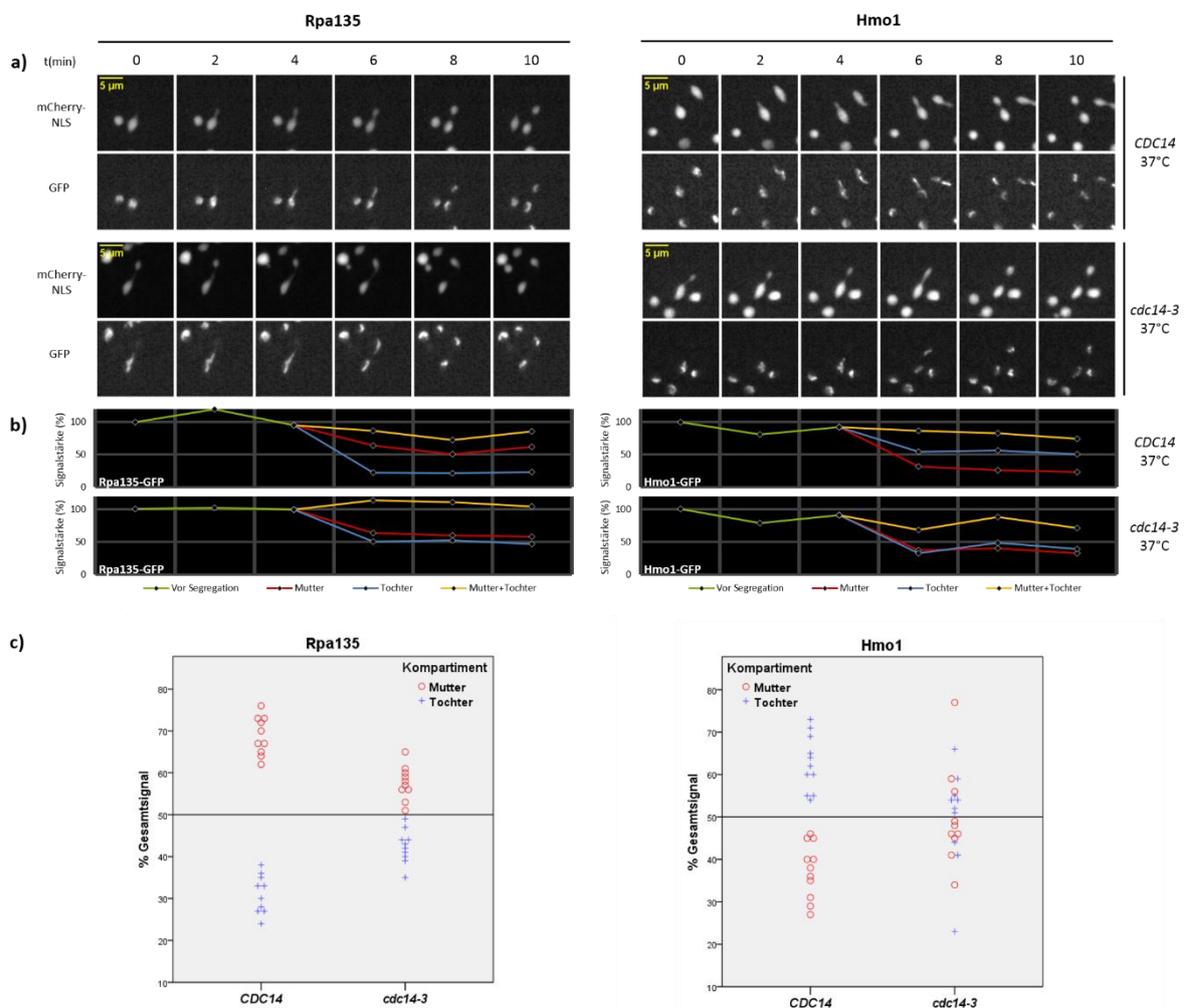


Abbildung 4.11: Cdc14 beeinflusst die mitotische Segregation von Rpa135 und Hmo1
Beschreibung: siehe folgende Seite

a) Spinning-disc-Mikroskopie zur mitotischen Segregation von endogenem Rpa135-GFP und Hmo1-GFP bei 37°C in einem *CDC14* Wildtypstamm und einer thermosensitiven *cdc14-3* Mutante. Als Projektionsverfahren wurde Aufsummierung gewählt. Alle Präparate wurden vor Aufnahmestart bei 37°C präinkubiert. Rpa135-GFP *CDC14*: bei t=0 bereits 60 min bei 37°C. Rpa135-GFP *cdc14-3*: bei t=0 bereits 56 min bei 37°C. Hmo1-GFP *CDC14*: bei t=0 bereits 62 min bei 37°C. Hmo1-GFP *cdc14-3*: bei t=0 bereits 50 min bei 37°C.

b) Quantifizierung von Rpa135-GFP und Hmo1-GFP zu den in a) gezeigten Zeitreihen. Dargestellt sind die Ausgangssignale vor mitotischer Teilung (grün), die Signalanteile in Mutter- und Tochterzelle nach der Trennung (rot bzw. blau) und deren Summe (orange). Alle Signale wurden auf den ersten gezeigten Zeitwert normiert.

c) Für die statistische Auswertung wurden mehrere Zellen der in a) verwendeten Stämme analysiert. *CDC14*-Zellen wurden vor Aufnahmestart mindestens 50 min bei 37°C präinkubiert, *cdc14-3*-Zellen wurden maximal 50 min bei 37°C präinkubiert. Nach vollständiger Trennung in der Mitose erfolgte für einzelne Zellen die Mittelung der Signale in Mutter bzw. Tochter über mehrere Zeitwerte, anschließend wurde die Summe gebildet und die Signale in Mutter- bzw. Tochterzelle konnten auf das somit erhaltene Gesamtsignal normiert werden (Mutter: rot; Tochter: blau). Stämme: W10293 (*RPA135-GFP mCherry-NLS CDC14*, n=10), W13558 (*RPA135-GFP mCherry-NLS cdc14-3*, n=10), W10146 (*HMO1-GFP mCherry-NLS CDC14*, n=11), W13947 (*HMO1-GFP mCherry-NLS cdc14-3*, n=10).

4.5 Einfluss der Trennungsdynamik auf das Segregationsverhalten von Rpa135 und Hmo1

Im Folgenden soll herausgearbeitet werden, über welche molekularen Strukturen und Mechanismen die Phosphatase Cdc14 Einfluss auf die Segregation von Rpa135 und Hmo1 nehmen könnte. Eine ganz entscheidende zelluläre Struktur, die dem Einwirken von Cdc14 unterliegt, ist die mitotische Spindel. Die Phosphatase trägt zur Assemblierung der Zentralspindel bei und fördert die Elongation des Spindelapparates in der Anaphase (Khmelinskii et al., 2007). Somit könnten die in der *cdc14-3* Mutante beobachteten Effekte unter anderem durch ein verändertes Elongationsverhalten der Spindel zustande kommen. Bei einer verringerten Elongationsrate wäre evtl. das zeitliche Arrangement gewisser Prozesse wie Kohäsinspaltung und physische Trennung der Schwesterchromatiden oder auch Kompaktierung der rDNA verändert. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden endogene GFP-Fusionen von Rpa135 und Hmo1 in einer $\Delta cin8$ Mutante untersucht. Bei Cin8 handelt es sich um ein nicht essentielles Motorprotein der Kinesinfamilie, deren Angehörige zumindest teilweise funktionelle Redundanz zeigen (Hoyt et al., 1992). Die Lokalisation von Cin8 und weiteren Faktoren innerhalb der Zentralspindel ist abhängig vom Phosphorylierungszustand von Ase1, der wiederum durch Cdc14 beeinflusst wird (Khmelinskii et al., 2007). Durch Deletion des *CIN8* Gens ist die Elongationsrate der Spindel in der Anaphase deutlich erniedrigt (Straight et al., 1998) und nukleolusspezifische Funktionen von Cin8 sind nicht bekannt.

Deletionsmutanten wurden generell aus der EUROSCARF-Kollektion bezogen, welche auf dem S288c Stammhintergrund basiert. In der Tat konnten bezüglich der Kontrollstämmen leichte Unterschiede zum zuvor verwendeten W303 Stammhintergrund für nukleoläre Segregation festgestellt werden. Im Allgemeinen trat bei Zellen des S288c Hintergrundes ein etwas deutlicheres nukleoplasmatisches Signal von Rpa135 auf als bei Zellen des W303 Hintergrundes. Des Weiteren schien die nukleoläre Segregation im S288c Kontext generell etwas schneller abzulaufen und die während der Trennung

auftretenden elongierten Strukturen schienen eine geringere räumliche Ausdehnung zu haben als im Fall von W303. Bei rDNA-arrays können eine Vielzahl von Polymorphismen auftreten und die beiden verwendeten Stammhintergründe zeigen deutliche Unterschiede bezüglich der Längen ihrer rDNA-arrays, wobei Zellen des W303 Hintergrundes über eine Anzahl von ca. 217 und Zellen des S288c Hintergrundes über eine Anzahl von ca. 128 Wiederholungseinheiten verfügen (James et al., 2009). Abgesehen von diesen Details zeigten die S288c Kontrollstämme ein sehr ähnliches Verhalten wie die W303 Kontrollstämme. Die Kernelongation begann, setzte sich stetig fort und leicht verzögert begann die Elongation und schließlich Segregation der nukleolären Signale von Rpa135 und Hmo1 (Abb. 4.12a, *CIN8*). Des Weiteren traten die gleichen Verteilungsverhältnisse und damit gegenläufigen Asymmetrien von Rpa135 und Hmo1 wie im W303 Hintergrund auf. Im $\Delta cin8$ Stamm hingegen traten anormale Kern- und Nukleolustrennungen auf und es zeigte sich teilweise ein sehr ähnliches Bild wie bei der *cdc14-3* Mutante. Die Elongation der Kerne lief bei den gezeigten Zellen nicht kontinuierlich ab und auch die Kernmorphologie war etwas verändert. Die Segregation der Signale von Rpa135 und Hmo1 fand im Vergleich zur Kernelongation stark verzögert statt. Die Segregation von Rpa135 erfolgte sehr abrupt und ohne das Auftreten einer elongierten Übergangsstruktur. Für Hmo1 konnte bei gezeigter Zelle kein deutlicher Unterschied des Trennungsprozesses im Vergleich zur Kontrolle ausgemacht werden (Abb. 4.12a, $\Delta cin8$). Die Quantifizierung zeigte, dass Rpa135 und Hmo1 in $\Delta cin8$ sehr gleichmäßig auf Mutter- und Tochnukleolus verteilt wurden (Abb. 4.12b). Die Betrachtung mehrerer Zellen verdeutlichte den Effekt von Cin8 auf die mitotische Verteilung von Rpa135 und Hmo1. Bei Rpa135 verschob sich das gesamte Verteilungsspektrum in der Mutante mit Ausnahme einer einzigen Zelle geschlossen hin zur Gleichverteilung. Im Wildtyp zeigte Rpa135 ein Mutter:Tochter Verhältnis von ca. 75:25 bis 60:40, in der Mutante ein Verhältnis von ca. 65:35 bis nahezu 50:50. Für Hmo1 zeigten nicht alle Zellen des Kontrollstammes nach Segregation einen höheren Signalanteil im Nukleolus der Tochter. Eine Zelle wies einen höheren Signalanteil in der Mutter auf und bei zwei Zellen fand Gleichverteilung statt. Trotzdem war ein relativ deutlicher Unterschied zum $\Delta cin8$ Stamm gegeben, da sich hier die berechneten Werte insgesamt wesentlich dichter um die 50% drängten (Abb. 4.12c). Wie in *cdc14-3* waren also auch in $\Delta cin8$ die Mechanik der rDNA-Trennung und die mitotischen Verteilungen von Rpa135 und Hmo1 verändert. Eine hohe Elongationsrate der mitotischen Spindel scheint also für die Ausbildung der gegenläufigen Asymmetrien von Rpa135 und Hmo1 in der Anaphase notwendig zu sein und die in *cdc14-3* beobachteten Effekte könnten auf Spindeldefekte zurückzuführen sein.

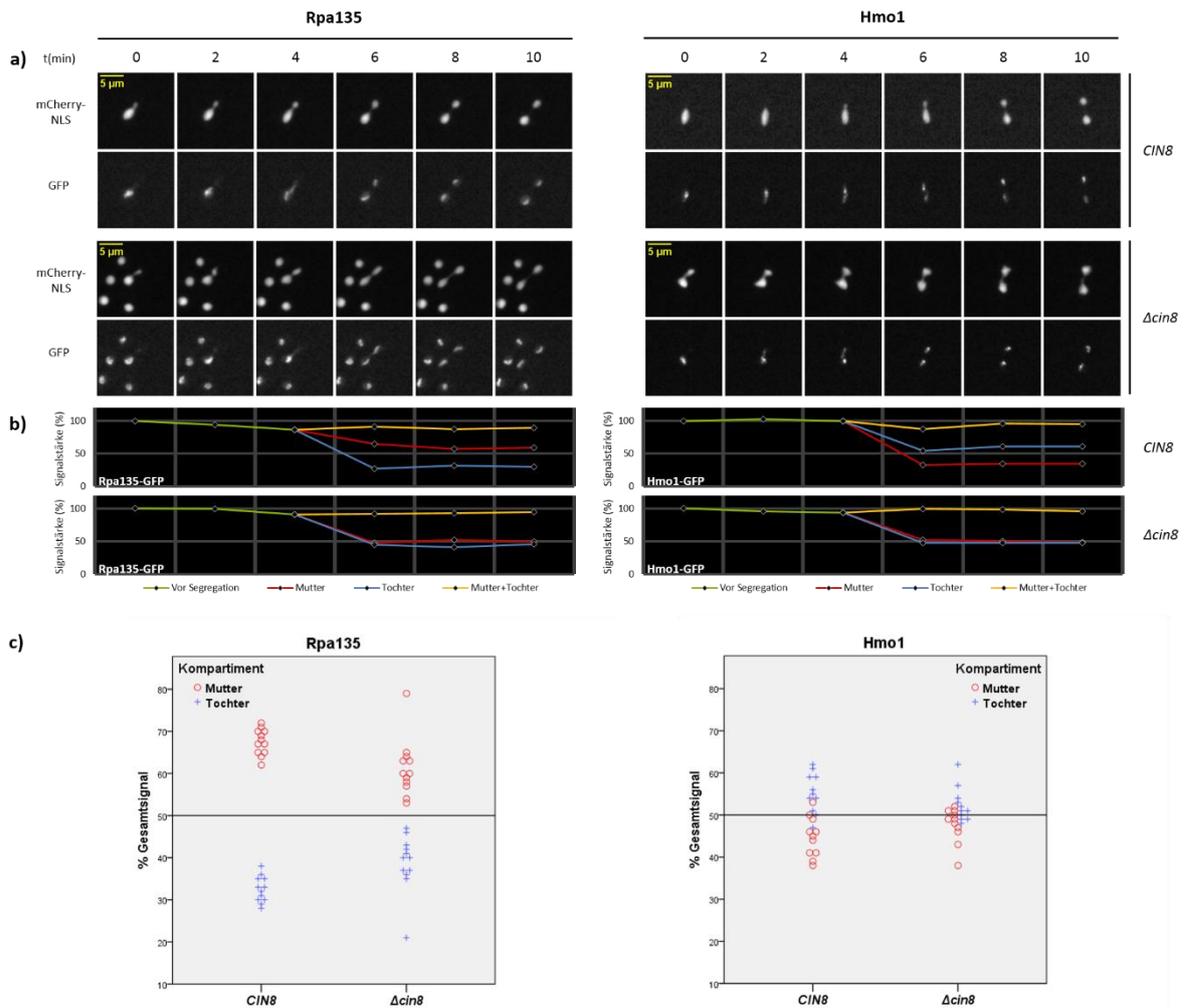


Abbildung 4.12: Das Motorprotein Cin8 fördert die Asymmetrie von Rpa135 und Hmo1

a) Spinning-disc-Mikroskopie zur mitotischen Segregation von endogenem Rpa135-GFP und Hmo1-GFP in einem *CIN8* Wildtypstamm und einer $\Delta cin8$ Mutante. Als Projektionsverfahren wurde Aufsummierung gewählt.

b) Quantifizierung von Rpa135-GFP und Hmo1-GFP zu den in a) gezeigten Zeitreihen. Dargestellt sind die Ausgangssignale vor mitotischer Teilung (grün), die Signalanteile in Mutter- und Tochterzelle nach der Trennung (rot bzw. blau) und deren Summe (orange). Alle Signale wurden auf den ersten gezeigten Zeitwert normiert.

c) Für die statistische Auswertung wurden mehrere Zellen der in a) verwendeten Stämme analysiert. Nach vollständiger Trennung in der Mitose erfolgte für einzelne Zellen die Mittelung der Signale in Mutter bzw. Tochter über mehrere Zeitwerte, anschließend wurde die Summe gebildet und die Signale in Mutter- bzw. Tochterzelle konnten auf das somit erhaltene Gesamtsignal normiert werden (Mutter: rot; Tochter: blau). Stämme: W12122 (*RPA135-GFP mCherry-NLS CIN8*, n=12), W13189 (*RPA135-GFP mCherry-NLS $\Delta cin8$* , n=12), W12115 (*HMO1-GFP mCherry-NLS CIN8*, n=11), W13188 (*HMO1-GFP mCherry-NLS $\Delta cin8$* , n=11).

Um die Situation in der $\Delta cin8$ Mutante näher zu beleuchten, wurde abschließend noch ermittelt, in welchem zeitlichen Verhältnis die Freisetzung von endogenem Cdc14-GFP als Zellzyklusmarker und die Segregation des Nukleolus, repräsentiert durch Hmo1-3mCherry, zueinander stehen. Bei beiden Fluoreszenzproteinen handelte es sich um endogene Fusionen. Mit Beginn der Anaphase setzen die allmähliche Spaltung von Kohäsion durch Separase und die partielle Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus durch das FEAR-Netzwerk ein (Enserink und Kolodner, 2010). Cdc14 lokalisiert dann nicht mehr ausschließlich im Nukleolus, sondern auch am für die Tochter bestimmten Spindelpol und die

graduelle Chromosomensegregation bei noch vorhandener Restkohäsion beginnt (Rozelle et al., 2011; Renshaw et al., 2010). Cdc14 sollte also einen wesentlich präziseren zeitlicher Marker für den Beginn der Anaphase darstellen als das Signal von mCherry-NLS.

In Abbildung 4.13a sind Zeitreihen im *CIN8* und $\Delta cin8$ Kontext mit endogenem Cdc14-GFP und Hmo1-3mCherry zu sehen. Das Signal von Hmo1-3mCherry hatte einen teils sehr unterschiedlichen Signalcharakter verglichen mit Hmo1-GFP, da es oftmals homogener und auch deutlich weiter über den Kern verteilt war. Allerdings konnte auch die 3mCherry-Fusion zumindest bei manchen Zellen das spezielle Segregationsmuster zeigen, wobei die Tochterzelle einen höheren Signalanteil erhielt. Das Signal von Cdc14 zeigte wie zu erwarten eine komplexe und dynamische Lokalisation. Vor Beginn der Anaphase war ein deutliches nukleoläres Signal vorhanden und zusätzlich unerwarteter Weise noch schwache und punktförmige cytoplasmatische Lokalisation, was in der Mutante deutlicher zum Vorschein kam. Im Kontrollstamm nahm bei Beginn der Anaphase das nukleoläre Signal von Cdc14 etwas ab und relokalierte am für die Tochter bestimmten Spindelpolkkörper (Abb. 4.13a, *CIN8*, t=4 min, weißer Pfeil). Kurz darauf setzte die nukleoläre Segregation für Hmo1 ein (Abb. 4.13a, *CIN8*, t=8 min, türkiser Pfeil), welche kontinuierlich über mehrere Zeitwerte hin ablief. Erst während Ablauf der rDNA-Trennung nahm dann das nukleoläre Signal von Cdc14 weiter ab und zeigte letztendlich nur noch ein punktförmiges Signal. Der maximale Abstand der beiden Nukleoli und damit endgültige Segregation der Schwesterchromatiden wurde erst spät im Vergleich zum Beginn der nukleolären Trennung erreicht (Abb. 4.13a, *CIN8*, t=20 min, rote Pfeile). In der $\Delta cin8$ Mutante konnte ein veränderter zeitlicher Ablauf dieser Ereignisse zueinander festgestellt werden. Hier zeigt Cdc14 mit Beginn der Anaphase ebenfalls eine Abnahme des nukleolären Signals und das gleichzeitige Auftreten eines punktförmigen Signals (Abb. 4.13a, $\Delta cin8$, t=4 min, weißer Pfeil). Allerdings setzte die Segregation des nukleolären Signals im Vergleich zum Kontrollstamm stärker verzögert bezüglich der Spindellocalisation von Cdc14 ein (Abb. 4.13a, $\Delta cin8$, t=12 min, türkiser Pfeil) und fand dann auch deutlich abrupter statt, da der maximale Abstand der beiden Nukleoli bei vollständiger Trennung bereits kurz nach Trennungsbeginn erreicht war (Abb. 4.13a, $\Delta cin8$, t=16 min, rote Pfeile). Am oberen Bildrand ist für die Mutante eine Zelle zu sehen, welche bereits ein Spindelsignal von Cdc14 aufwies, allerdings setzte bei dieser über die gesamte observierte Zeitreihe die Nukleolussegregation nicht ein. Bei manchen solcher Extremfälle konnte die Nukleolussegregation allerdings durchaus noch stattfinden. Allgemein wiesen die Zellen im Falle der Mutante eine ungewöhnliche Kern- und Nukleolusmorphologie auf. Für eine genauere Analyse wurde die Zeit zwischen der partiellen Freisetzung von Cdc14 (Auftreten des punktförmigen Signals) und Beginn der nukleolären Trennung (beginnende Elongation des nukleolären Signals) bestimmt, sowie die Dauer der nukleolären Segregation. Die statistische Auswertung zeigte, dass in der Mutante mit verringerter Spindelelongationsrate der Beginn der Nukleolustrennung im Vergleich zur Cdc14-Freisetzung deutlich

verzögert war (Abb. 4.13b), der Prozess der nukleolären Segregation dann allerdings schneller ablief (Abb. 4.13c). Die eigentlichen zeitlichen Intervalle des Experiments betragen 2 min, die statistische Auswertung erfolgte also mit höherer zeitlicher Genauigkeit als bei den Mikroskopaufnahmen in Abb. 4.13a dargestellt.

Eine mögliche Interpretation wäre, dass bei Spindeldefekten die rDNA-Trennung im Vergleich zum Anaphasebeginn stark verzögert einsetzt und bei Beginn der rDNA-Trennung Kohäsion evtl. bereits vollständig gespalten ist. Dadurch wäre keine Restkohäsion bei beginnender Chromosomentrennung vorhanden und rDNA-Trennung sowie die Segregation nukleolärer Proteine erfolgt dann abrupt und symmetrisch.

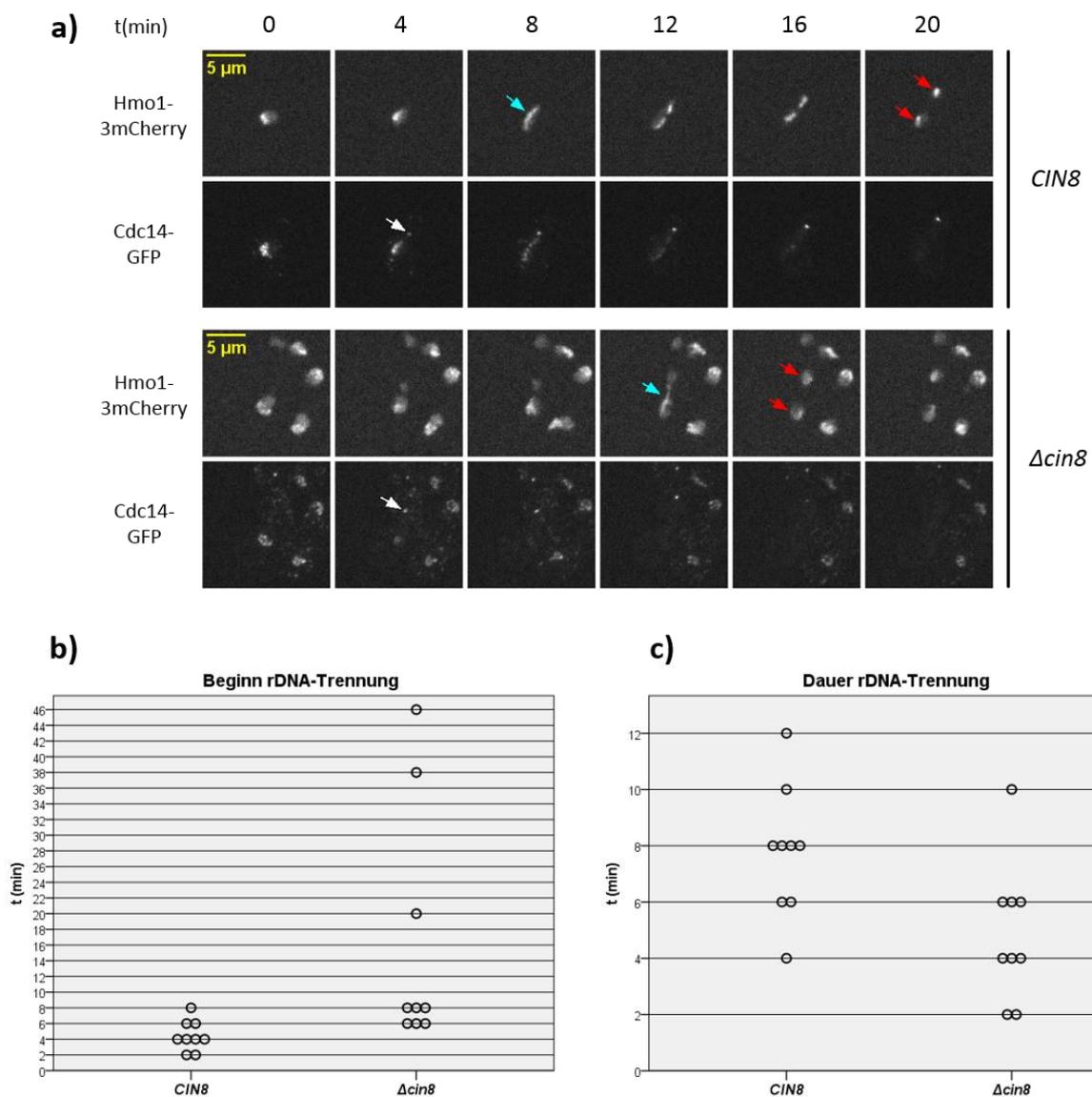


Abbildung 4.13: Zeitlich verzögerte und abrupte nukleoläre Segregation in *Δcin8*

Beschreibung: siehe folgende Seite

- a)** Spinning-disc-Mikroskopie von endogenem Hmo1-3mCherry und endogenem Cdc14-GFP während der Anaphase in einem *CIN8* Wildtypstamm (W13751) und einer $\Delta cin8$ Mutante (W13753). Beim genetischen Hintergrund handelte es sich um S288c. Für die Darstellung der Mikroskopiedaten wurden in beiden Fluoreszenzkanälen die Maximalwerte projiziert. Die zeitliche Auflösung betrug 2 min, wobei nur ausgewählte Zeitwerte gezeigt sind. Weißer Pfeil: Erste deutliche Lokalisation von Cdc14-GFP am Spindelpol nach Freisetzung. Türkiser Pfeil: Beginn der Nukleolustrennung. Rote Pfeile: Vollständig segregierte nukleoläre Strukturen.
- b)** Zeit zwischen Cdc14-Freisetzung (erstes deutliches Signal von Cdc14 am Spindelpol) und nukleolärem Trennungsbeginn (beginnende Elongation von Hmo1-3mCherry) in einem *CIN8* Wildtypstamm (W13751, n=9) und einer $\Delta cin8$ Mutante (W13753, n=9).
- c)** Dauer der nukleolären Segregation (beginnende Elongation von Hmo1-3mCherry bis zur endgültigen Trennung) in einem *CIN8* Wildtypstamm (W13751, n=9) und einer $\Delta cin8$ Mutante (W13753, n=9).

4.6 Einfluss von RNA Polymerase I auf das Segregationsverhalten nukleolärer Proteine

Ein Prozess, welcher entscheidenden Einfluss auf die Segregation nukleolärer Proteine nehmen könnte, wäre die Transkription der ribosomalen DNA durch die RNA Polymerase I, da diese weitreichende Auswirkungen auf die nukleoläre Chromatinorganisation hat. So werden zum Beispiel die Auflösung von Nukleosomen und die Assoziation von sowohl Hmo1 als auch Kondensin mit rDNA durch die Aktivität von RNA Polymerase I bestimmt (Wittner et al., 2011; Wang et al., 2006). Zudem übernimmt die RNA Polymerase I eine Schlüsselstellung für die generelle Organisation des Nukleolus (Oakes et al., 2006; Taddei und Gasser, 2012; Grob et al., 2014). Ist ein Prozessierungsfaktor bereits kotranskriptionell an Prä-rRNA gebunden, könnte auch in diesem Fall transkriptionelle Aktivität wesentliche Auswirkungen auf dessen Segregationsverhalten haben. Darüber hinaus könnten die in der *cdc14-3* Mutante beobachteten Effekte möglicherweise durch eine fehlerhafte Regulation der RNA Polymerase I in der Mitose verursacht worden sein. Bekannt ist, dass transkriptionelle Aktivität der RNA Polymerase I zur Etablierung eines kohäsionunabhängigen Zusammenhalts der rDNA-Loci auf den Schwesterchromatiden führt (Machín et al., 2006; Tomson et al., 2006) und die Bindung von Kondensin in den transkribierten Bereichen der rDNA verhindert (Wang et al., 2006). Bei einer weiteren Studie zur Segregation ribosomaler DNA kam man zu dem Schluss, dass die Cdc14 abhängige Inhibition der transkriptionellen Aktivität von RNA Polymerase I während der Anaphase notwendig für rDNA-Trennung ist (Clemente-Blanco et al., 2009). Dieser Punkt wird allerdings nach wie vor kontrovers diskutiert. Wegen der wichtigen Rolle der RNA Polymerase I als Organisator des Nukleolus wurde das Verhalten verschiedener nukleolärer Proteine als endogene GFP-Fusionen in einer konstitutiven RNA Polymerase I Mutante, nämlich einem $\Delta rpa12$ Stamm analysiert. Bei Rpa12 handelt es sich um eine nicht essentielle Untereinheit des RNA Polymerase I Holoenzym, deren Abwesenheit eine stark verringerte transkriptionelle Aktivität und ein deutliches Wachstumsdefizit zur Folge hat (Keener et al., 1998; Nogi et al., 1993). Die Untereinheit ist des Weiteren notwendig für die intrinsische RNA-Spaltaktivität der RNA Polymerase I, welche wiederum zur Fehlerkorrektur, einem frühen

Prozessierungsschritt, oder zur Termination der Transkription beitragen sollte (Kuhn et al., 2007; Schneider, 2012).

Rpa135, Hmo1, Nop56 und Nsr1 wurden in *Δrpa12* als nukleoläre Repräsentanten untersucht. Trotz eines starken Wachstumsdefizits zeigten die Zellen der *Δrpa12* Stämme generell nur einen leicht veränderten Ablauf des mitotischen Trennungsprozesses. Allgemein konnte in *Δrpa12* für alle Signale eine schnellere Nukleolustrennung als im Wildtyp beobachtet werden. Elongierte Strukturen traten in der Mutante nur selten auf (Abb. 4.14a). Zudem konnten auch proteinspezifische Unterschiede zum Wildtyp ausgemacht werden. Die RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135 zeigte in der Mutante eine deutlich erniedrigte Signalintensität. Die nukleolären Gesamtsignale in der Mutante betragen durchschnittlich nur 24 % der Signale im Kontrollstamm. Dies ist in Abbildung 4.14a dadurch ersichtlich, dass bei identischen Einstellungen in der Mikroskopie für Rpa135 im Falle von *Δrpa12* die Helligkeit bei der Bildbearbeitung derart erhöht werden musste, dass auch der Hintergrund sehr deutlich hervortrat. Die Untereinheiten Rpa135 und Rpa190 wurden bereits in einer grundlegenden Studie zu *RPA12* mittels Western-Blot analysiert. Hierbei war in einem *Δrpa12* Stamm bei 21°C eine deutlich erniedrigte Gesamtproteinmenge von Rpa190, aber nicht von Rpa135 detektiert worden (Nogi et al., 1993). Sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Mutante konnte bei vorliegender Arbeit in der Mikroskopie eine gewisse cytoplasmatische Population detektiert werden. Ob die cytoplasmatische Population von Rpa135 im *Δrpa12* Stamm größer ausfiel, wurde nicht ermittelt und sollte mit den vorhandenen Daten vermutlich auch nicht durchführbar sein. Auch für Nop56 zeigte sich ein spezifischer Effekt. Die Signalstärke in der Mutante entsprach dem des Wildtyps, allerdings war das Lokalisationsmuster von Nop56 in *Δrpa12* deutlich verändert. Neben einem nukleolären Signal zeigten sich in der Mutante auch Foci außerhalb des Nukleolus. Diese schienen bei Betrachtung mehrerer Zellen nicht frei zu diffundieren, sondern wurden meist nach Segregation des nukleolären Signals effizient auf Mutter und Tochter aufgeteilt (Abb. 4.14a, Nop56, *Δrpa12*). Dieses Lokalisationsmuster erinnerte stark an das der (Histon)Deacetylase Sir2 (Silent information regulator 2), welche neben ribosomaler DNA auch an den stillgelegten Paarungstyploci HMR und HML auf Chromosom 3, sowie an Telomerregionen bindet (Praktikum Stephan Ringshandl; Blander und Guarente, 2004). Eine Kolokalisation wurde jedoch nicht durchgeführt. Hmo1 und Nsr1 zeigten in *Δrpa12* allgemein einen Signalcharakter, welcher dem Wildtyp entsprach. Bei Quantifizierung und statistischer Auswertung wurde ersichtlich, dass jedes der untersuchten nukleolären Proteine in der Mutante mit verringerter Effizienz in die Knospe gelangte. Der Signalanteil der Tochter war bei allen Proteinen nach der Segregation geringer als im Wildtyp (Abb. 4.14b). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Transkription von RNA Polymerase I in der Anaphase stattfindet und die transkriptionsabhängige Organisation des Nukleolus einen Einfluss auf die mitotische Segregation nukleolärer Proteine nimmt.

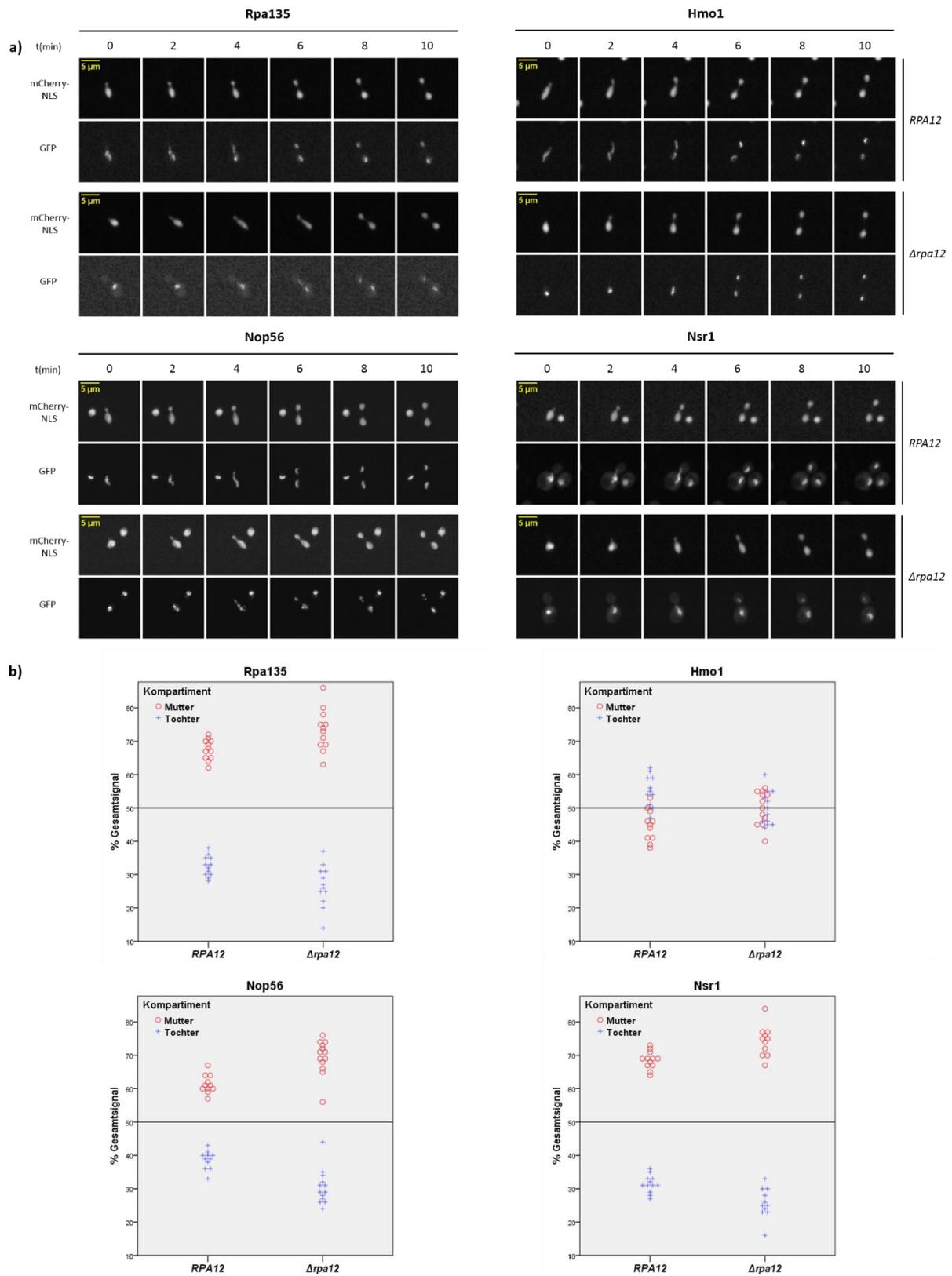


Abbildung 4.14: Rpa12 fördert den Transport von nukleolären Proteinen in die Knospe
 Beschreibung: siehe folgende Seite

a) Spinning-disc-Mikroskopie der mitotischen Verteilung endogener GFP-Fusionen von Rpa135, Hmo1, Nop56 und Nsr1 in *RPA12* Wildtypstämmen und $\Delta rpa12$ Mutanten. Die z-Stapel wurden für Rpa135, Hmo1 und Nsr1 aufsummiert. Bei Nop56 wurden die Maximalwerte projiziert.

b) Streuplots zum Segregationsverhalten von Rpa135, Hmo1, Nop56 und Nsr1 in $\Delta rpa12$. Für einzelne Zellen der in a) gezeigten Stämme erfolgte zunächst die Bildung der Mittelwerte des Mutter- bzw. Tochtersignals nach der Trennung über mehrere Zeitwerte hinweg. Dann wurden diese auf ihre Summe (Gesamt-signal) normiert, um die relativen Signalanteile in Mutter und Tochter zu erhalten (rot bzw. blau). Stämme: W12122 (*RPA135-GFP mCherry-NLS RPA12*, n=12), W12124 (*RPA135-GFP mCherry-NLS $\Delta rpa12$* , n=12), W12115 (*HMO1-GFP mCherry-NLS RPA12*, n=11), W12120 (*HMO1-GFP mCherry-NLS $\Delta rpa12$* , n=12), W12930 (*NOP56-GFP mCherry-NLS RPA12*, n=11), W12928 (*NOP56-GFP mCherry-NLS $\Delta rpa12$* , n=13), W13198 (*NSR1-GFP mCherry-NLS RPA12*, n=12), W13196 (*NSR1-GFP mCherry-NLS $\Delta rpa12$* , n=11).

Da die Deletion von *RPA12* ein gravierender Eingriff in das Wachstum der Zellen ist, könnten die Beobachtungen zu den nukleolären Proteinen auch auf allgemein verringerte Proteinbiosynthese zurückgehen. Daher wurden zusätzlich sowohl frei im Kern diffundierendes mCherry-NLS als auch eine endogene GFP-Fusion des Kernhistons Hta2 im $\Delta rpa12$ Kontext untersucht, um festzustellen, ob es sich bei den gemachten Beobachtungen um ein globales oder ein nukleolusspezifisches Phänomen handelte. Die beiden Kontrollen mCherry-NLS und Hta2 zeigten in der Mutante bezüglich ihres Verteilungsverhaltens nicht die gleiche Tendenz wie die nukleolären Proteine sondern sogar gegenläufiges Verhalten (Abb. 4.15). Die für mCherry-NLS vermessenen Zellen waren genau diejenigen, in denen auch das Signal von Rpa135 untersucht wurde (Abb 4.14). Das bedeutet, dass keine Korrelation zwischen der mitotischen Verteilung von Nukleoplasma und der von Rpa135, Nop56, Nsr1 sowie Hmo1 besteht, d.h. die Kernverteilung hat keinen entscheidenden Einfluss auf die mitotische Verteilung dieser nukleolären Proteine. Die in $\Delta rpa12$ beobachteten, nukleolusspezifischen Segregationseffekte sollten also auf die organisatorische Funktion von RNA Polymerase I für den Nukleolus zurückgehen.

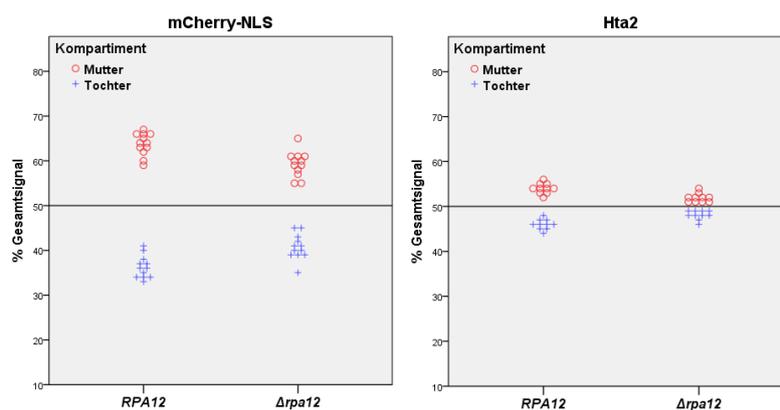


Abbildung 4.15: Rpa12 fördert nicht die Tochteranteile von mCherry-NLS und Hta2

Als Kontrollen zu den in Abb. 4.14 untersuchten nukleolären Proteinen wurden mCherry-NLS und endogenes Hta2-GFP in $\Delta rpa12$ durch Spinning-disc-Mikroskopie vermessen. Das experimentelle Vorgehen war analog zu den in Abb. 4.14 gezeigten Analysen. Für einzelne Zellen erfolgte zunächst die Bildung der Mittelwerte des Mutter- bzw. Tochtersignals nach der Trennung über mehrere Zeitwerte hinweg. Dann wurden diese auf ihre Summe (Gesamt-signal) normiert um die relativen Signalanteile in Mutter und Tochter zu erhalten. Die untersuchten Stämme lauten wie folgt: W12122 (*RPA135-GFP mCherry-NLS RPA12*, n=12), W12124 (*RPA135-GFP mCherry-NLS $\Delta rpa12$* , n=12), W13869 (*HTA2-GFP RPA12*, n=10), W13871 (*HTA2-GFP $\Delta rpa12$* , n=10).

4.7 Reziprokes Verhalten von Rpa135 und Hmo1

Es konnte gezeigt werden, dass zwei Komponenten der RNA Polymerase I Maschinerie, nämlich Rpa135 und Hmo1, in der Mitose völlig unterschiedliche Verteilungsmuster zeigen und in beiden Fällen die Aktivität der RNA Polymerase I einen Einfluss auf die Segregation hat. Dies wurde zum Anlass genommen, Kollokalisationsstudien mit endogen epitopmarkiertem Rpa135-GFP und Hmo1-3mCherry in verschiedenen Situationen durchzuführen, bei welchen entweder hohe oder sehr niedrige transkriptionelle Aktivität gegeben ist. Bei niedriger Aktivität von RNA Polymerase I könnte man evtl. ein schwaches nukleoläres oder diffuses Signal für eine Untereinheit des Holoenzym erwarten, wengleich auch die Möglichkeit bestünde, dass passive Untereinheiten über z.B. bestimmte Protein-Protein-Wechselwirkungen effizient im Nukleolus gehalten werden. Da transkriptionelle Aktivität eine Voraussetzung für die Assoziation von Hmo1 mit rDNA darstellt (Wittner et al., 2011), könnte für Hmo1-3mCherry in der Mikroskopie ein abgeschwächtes nukleoläres Signal bei niedriger Aktivität der RNA Polymerase I erwartet werden. Um Klarheit zu schaffen wurde eine Kollokalisierung von Rpa135-GFP und Hmo1-3mCherry in wachsenden und stationären Wildtypzellen durchgeführt. In wachsenden Zellen ist hohe Aktivität von RNA Polymerase I gegeben, in stationären Zellen hingegen geringe Aktivität. Des Weiteren wurden Rpa135 und Hmo1 in der thermosensitiven RNA Polymerase I Mutante *rrn3(S213P)* untersucht.

Bei einem Vergleich wachsender und stationärer Zellen bezüglich der Signale von Rpa135 und Hmo1 stach ein völlig unterschiedliches Verhalten der beiden Signale heraus. Rpa135-GFP zeigte in stationären Zellen eine im Vergleich zu wachsenden Zellen deutlich erniedrigte Signalstärke, Hmo1 andererseits zeigte bei Stationarität ein wesentlich stärkeres nukleoläres Signal als bei wachsenden Zellen (Abb. 4.16a, b). Darüber hinaus waren die Lokalisationsmuster der beiden Proteine in stationären Zellen teils sehr unterschiedlich. Die Untereinheit des Holoenzym zeigte häufig punktförmige Lokalisation, wobei das HMGB-Protein teils gewohnte nukleoläre und teils ringförmige Strukturen bildete (Abb. 4.16a). Durch die Arbeit von Virginia Babl am Lehrstuhl Biochemie III der Universität Regensburg ist bekannt, dass Hmo1 auch in Stationarität an ribosomale DNA bindet (persönliche Mitteilung). Es sollte ergänzt werden, dass bei einem Vergleich von endogenen GFP-Fusionen in wachsenden Zellen Hmo1 ein stärkeres nukleoläres Signal darstellt als Rpa135.

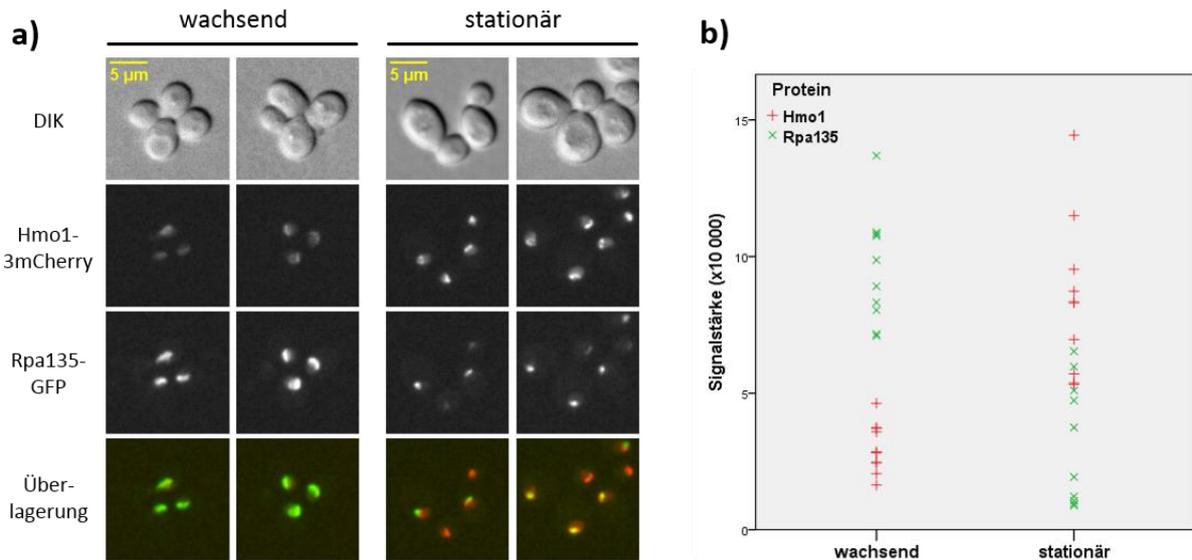


Abbildung 4.16: Reziprokes Lokalisationsverhalten von Rpa135 und Hmo1 in Wachstumsphase und Stationarität

a) Spinning-disc-Mikroskopie von endogenem Hmo1-3mCherry und Rpa135-GFP in wachsenden und stationären Zellen. Die wachsenden Zellen wurden aus einer wachsenden Vollmediumskultur (25°C) gewonnen. Die stationären Zellen wurden aus einer Vollmediumskultur gewonnen, welche mehrere Tage bei 25°C gerollert wurde (Stamm: jeweils W10581, Hintergrund: W303). In beiden Fällen wurde bei der Mikroskopie synthetisches Vollmedium verwendet. Die optischen Schnitte wurden aufsummiert und neben identischen Parametern in der Mikroskopie wurden für jedes Signal auch identische Wertebereiche für die Darstellung gesetzt.

b) Quantifizierung der Signale von Hmo1-3mCherry und Rpa135-GFP in wachsenden und stationären Zellen. Für jede Situation wurden jeweils n=10 Zellen analysiert. Die absoluten Signalintensitäten sind in Pixelgrauwerten dargestellt. Rpa135: grün; Hmo1: rot.

Neben den einzelnen Stapeln wurde auch eine Zeitreihe mit stationären Zellen gestartet, um die Entwicklung beider Signale bei ausreichend vorhandenem Nährstoffangebot verfolgen zu können. Stationäre Zellen zeigten wesentlich seltener Knospen als wachsende und häufig waren auch stark vergrößerte Vakuolen sichtbar (Abb. 4.17). Zu Beginn des Experiments waren starke, hochkonzentrierte nukleoläre Signale von Hmo1 zu beobachten, welche im Laufe der Zeit an Intensität verloren und das Protein schien sich etwas über den Zellkern zu verteilen. Rpa135 hingegen zeigte genau gegenläufiges Verhalten. Hier waren zu Beginn des Experiments schwache nukleoläre und weit über den Zellkern verteilte Signale sichtbar, welche sich sehr rasch mit Anwachsen der Zellen immer stärker aufkonzentrierten. Die beiden Signale zeigten anfangs keinerlei Kollokalisierung, mit fortschreitender Zeit wurden sich die Strukturen von Rpa135 und Hmo1 dann zunehmend morphologisch ähnlicher. Da Hmo1 auch in stationären Zellen an rDNA bindet (persönliche Mitteilung Virginia Bahl), sollte Hmo1 zu Beginn der Zeitreihe die Struktur der rDNA repräsentieren und nicht das Signal von Rpa135.

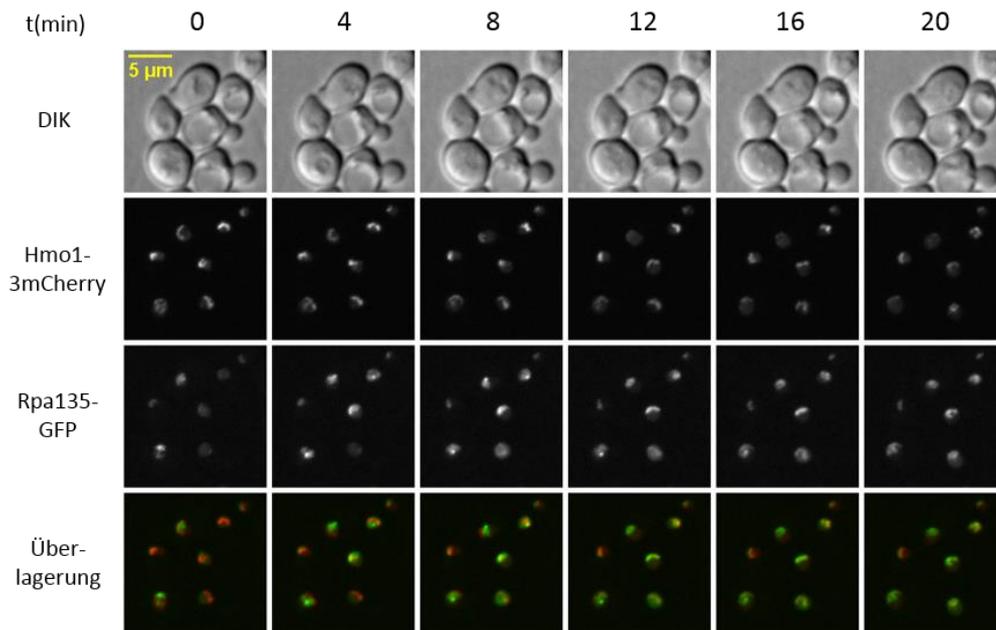


Abbildung 4.17: Reziprokes Lokalisationsverhalten von Rpa135 und Hmo1 bei Anwachsen aus Stationarität

Spinning-disc-Mikroskopie von endogenem Hmo1-3mCherry und Rpa135-GFP in aus Stationarität anwachsenden Zellen. Eine Vollmediumskultur wurde vier Tage bei 25°C gerollert, die geernteten Zellen wurden dann für die Mikroskopie mit synthetischem Vollmedium versorgt und es erfolgte die Aufnahme einer Zeitserie. Im Falle der Fluoreszenzsignale wurde eine Projektion der maximalen Pixelwerte durchgeführt und die dargestellten Wertebereiche waren für jeden Fluoreszenzkanal über die Zeitreihe hinweg konstant. Stamm: W10581 (Hintergrund: W303).

Ergänzend sollte auch das Verhalten der beiden Signale bei Abschaltung von RNA Polymerase I Transkription in wachsenden Zellen beobachtet werden. Zu diesem Zweck wurde eine thermosensitive *rnn3(S213P)* Mutante verwendet (Claypool et al., 2004). Vor der Initiation binden zunächst an speziellen Sequenzelementen des Promotorbereichs der 35S rDNA eine Reihe von Transkriptionsinitiationsfaktoren und über die Interaktion mit dem Initiationsfaktor Rrn3, welcher als Brückenelement agiert, kann anschließend das Holoenzym an den Promotor rekrutiert werden. Die Wechselwirkung von Rrn3 mit der Untereinheit Rpa43 des Holoenzym und damit dessen Rekrutierung wird vermutlich durch wachstumsabhängige Modifikationen beider Proteine reguliert, welche dem Tor Signalweg unterstehen (Schneider, 2012; Claypool et al., 2004). Die *rnn3(S213P)* Mutation ist für Hefezellen bei 37°C letal und die Promotorassoziation der RNA Polymerase I Untereinheit Rpa190 ist unter solchen Bedingungen stark erniedrigt, wie ChIP Experimente zeigten (Claypool et al., 2004).

Im Kontrollstamm lokalisierte Hmo1 bei 37°C sowohl im Nukleolus als auch im Nukleoplasma. Nach mitotischer Segregation zeigte es ein konzentriertes, nukleoläres Signal in den Tochterzellen und in den Mutterzellen ein wesentlich diffuseres Signal. Rpa135 zeigte zu jedem Zeitpunkt ein sehr exklusives nukleoläres Signal. Der Kontrollstamm entsprach also in seinem Verhalten bei 37°C dem bei Raumtemperatur (Abb. 4.18). In der thermosensitiven Mutante *rnn3(S213P)* hingegen zeigten die Signale bei 37°C vom Wildtyp stark abweichendes Verhalten. Hmo1 wies eine sehr konzentrierte

nukleoläre und nur geringe nukleoplasmatische Lokalisation auf. Besonders während des Trennungsvorgangs traten die Unterschiede zur Kontrolle sehr deutlich hervor, da hier sowohl in der Mutter als auch in der Tochter sehr konzentrierte Signale beobachtet werden konnten. Rpa135 hingegen zeigte in der Mutante neben der nukleolären auch eine deutliche nukleoplasmatische Population und während der Anaphase schien es nahezu vollständig über den Zellkern zu delokalisieren. Nach der Segregation konzentrierte es sich dann wieder etwas mehr im Nukleolus auf (Abb. 4.18).

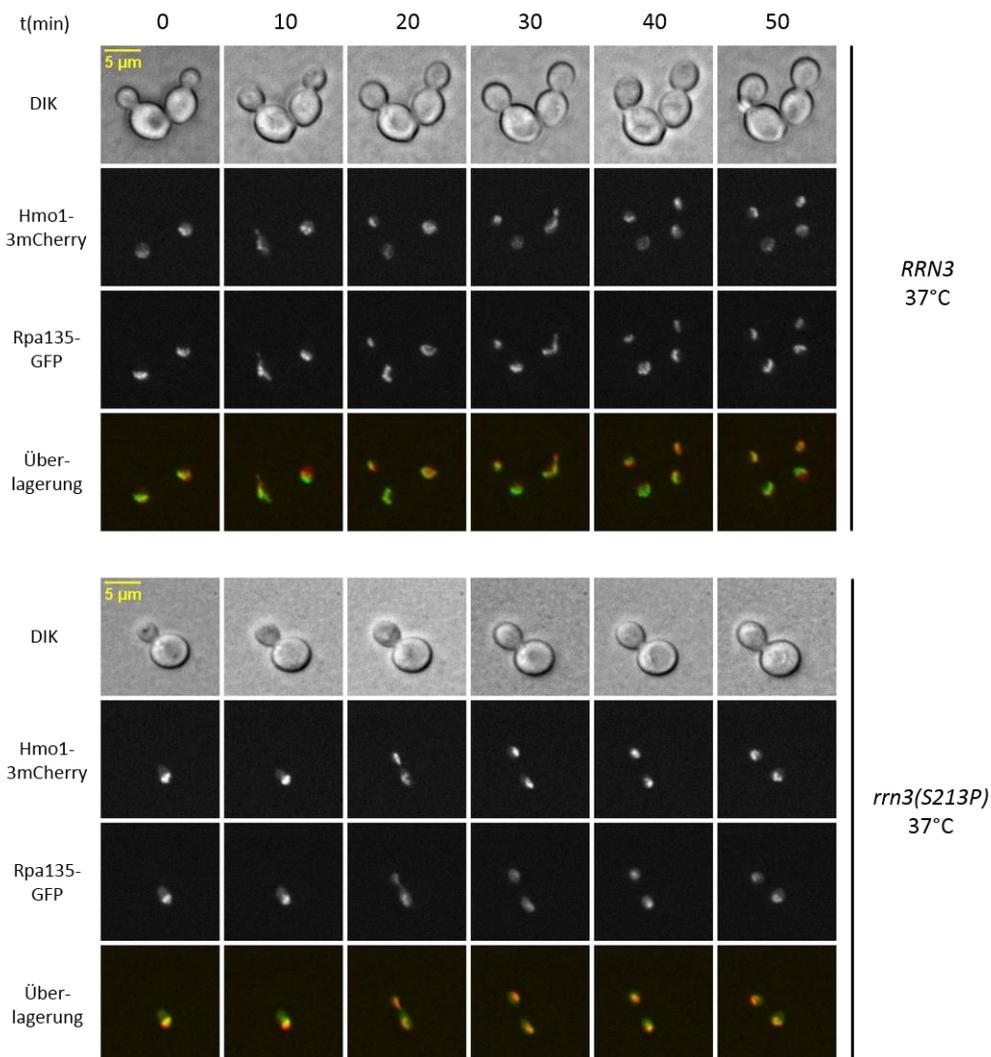


Abbildung 4.18: Reziprokes Lokalisationsverhalten von Rpa135 und Hmo1 in einer thermosensitiven RNA Polymerase I Mutante

Spinning-disc-Mikroskopie von endogenem Hmo1-3mCherry und Rpa135-GFP bei 37°C in einem *RRN3* Wildtypstamm (W10581; t=0: Präparat bereits 85 min bei 37°C präinkubiert) und einer *rrn3(S213P)* Mutante (W12600; t=0: Präparat bereits 15 min bei 37°C präinkubiert). Die Fluoreszenzsignale der Mutante gingen durch Kreuzung und Sporulation auf diejenigen des Wildtypstammes zurück, beim Hintergrund handelte es sich um W303. Neben identischen Aufnahmeparametern wurde für ein Fluoreszenzsignal in beiden Stämmen auch derselbe Wertebereich für die Darstellung gewählt. Bei den z-Stapeln der Fluoreszenzkanäle wurde eine Projektion der Maximalwerte durchgeführt.

Die beobachtete Antikorrelation von Rpa135 und Hmo1 könnte verschiedene Ursachen haben. Es könnte ein direkter Zusammenhang bestehen, wobei übermäßige rDNA-Bindung von Hmo1 durch die Aktivität von RNA Polymerase I verhindert wird oder eine übermäßige nukleoläre Menge von Hmo1 die Transkription der Polymerase inhibiert. Des Weiteren könnte auch eine Koregulation von RNA Polymerase I und Hmo1 durch SUMOylierung oder Phosphorylierung erfolgen. Die in *rrn3(S213P)* gemachten Beobachtungen würden für einen direkten Zusammenhang sprechen, wobei Hmo1 durch transkriptionelle Aktivität verdrängt werden könnte.

4.8 Struktur-Funktionsanalysen zu Hmo1

Das rDNA bindende HMGB-Protein Hmo1 zeigte bei den Segregationsstudien ein besonderes Verhalten, da der Nukleolus der Tochterzelle eben einen höheren Anteil erhielt als der Nukleolus der Mutterzelle. Dieses Segregationsmuster war genau gegenläufig zu dem der meisten anderen untersuchten nukleolären Proteine und auch zu Nukleoplasma. Zudem wurde das Protein bei Bleichexperimenten effizient im Nukleolus gehalten und schien eine gewisse Dynamik innerhalb einer nukleolären Struktur aufzuweisen, was allerdings auch für die RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135 zutraf. Neben den in verschiedenen Mutanten beobachteten Effekten konnte auch eine bemerkenswerte Antikorrelation von Hmo1 und Rpa135 in der Mikroskopie beobachtet werden. Hmo1 zeigte nämlich eine starke Aufkonzentrierung in nukleolären Strukturen bei Situationen niedriger transkriptioneller Aktivität. Neben diesen äußeren Einflüssen sollte nun auch herausgearbeitet werden, welche intrinsischen Elemente bzw. Eigenschaften von Hmo1 für dessen nukleoläre Lokalisation und sein Segregationsverhalten entscheidend sind. Daher wurden Derivate von Hmo1 generiert und diese sowohl mittels Mikroskopie als auch teilweise durch EMSA-Studien charakterisiert. An sich wurde Hmo1 bereits durch eine Vielzahl an Arbeiten sehr detailliert beschrieben, allerdings lag der Focus oftmals auf den biochemischen Eigenschaften des Proteins und Lokalisationsdaten liegen in wesentlich geringerem Umfang vor. Es handelt sich um ein relativ kleines Protein von ca. 27,5 kDa, welches unter anderem im gesamten durch RNA Polymerase I transkribierten Bereich der rDNA bindet und die Aktivität dieser fördert (Berger et al., 2007; Gadal et al., 2002). Eine Deletion von *HMO1* hat ein deutliches Wachstumsdefizit zur Folge (Lu et al., 1996). Das Genprodukt beinhaltet zwei DNA-Bindedomänen, die HMG-BoxA und die HMG-BoxB, sowie eine im lysinreichen C-terminalen Bereich gelegene Kernlokalisationssequenz (Lu et al., 1996; Kamau et al., 2004; Albert et al., 2013a). Die HMG-BoxB verleiht dem Protein eine hohe DNA-Affinität, wohingegen die HMG-BoxA nur einen schwachen Beitrag zur DNA-Bindung leistet (Kamau et al., 2004). Neben DNA-Bindung zeigt Hmo1 auch ein sehr komplexes Selbstinteraktionsverhalten. Glutaraldehyd-Quervernetzung mit anschließendem Gellauf zeigte, dass Hmo1 oligomerisieren kann und hierfür die HMG-BoxA, jedoch nicht der C-Terminus nötig ist (Xiao et al., 2010). Genauer sind sowohl die HMG-BoxA als auch die HMG-BoxB fähig, Homodimere

zu bilden. Eine Wechselwirkung der beiden HMG-Boxen untereinander konnte bei diesen Versuchen nicht nachgewiesen, allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Die Schlussfolgerung bezüglich Oligomerisierung war, dass vermutlich die HMG-Boxen mit ihren entsprechenden Gegenstücken eines anderen Moleküls wechselwirken und somit Filamentbildung erfolgen könnte. Eine weitere Studie zum Selbstinteraktionsverhalten konnte allerdings auch eine Wechselwirkung zwischen der HMG-BoxA und dem C-Terminus nachweisen, welche für DNA-Beugung durch Hmo1 nötig ist (Bauerle et al., 2006). Hierbei wurde die thermale Stabilität von Hmo1-Derivaten durch Zirkulardichroismusspektroskopie analysiert. Generell scheint Hmo1 ein HMGB-Protein zu sein, welches sequenzspezifisch an nukleosomenfreie DNA bindet. Für seine Assoziation mit bestimmten Bereichen von RPG-Promotoren (Ribosomal Protein Genes) könnte die vorausgegangene Entfernung von Nukleosomen in diesen Bereichen entscheidend sein und seine Assoziation speziell mit dem gesamten durch RNA Polymerase I transkribierten Bereich der ribosomalen DNA sollte durch transkriptionsabhängige Nukleosomen-depletion zustande kommen (Hall et al., 2006; Kasahara et al., 2011; Wittner et al., 2011). Über welche Mechanismen Hmo1 genau die Aktivität der RNA Polymerase I fördert, ist nach wie vor unklar. Theoretisch könnte hier sein genereller Einfluss auf DNA-Topologie und seine Fähigkeit, DNA-Schleifen zu induzieren, eine Rolle spielen (Bauerle et al., 2006; Xiao et al., 2010; Murugesapillai et al., 2014). Bei der Frage, über welche Mechanismen die nukleoläre Lokalisation von Hmo1 zustande kommt, gäbe es wohl mehrere Möglichkeiten. Neben Nukleinsäurebindung und Selbstinteraktion könnte auch die Wechselwirkung mit anderen nukleolären Proteinen von Wichtigkeit sein. Im Folgenden dargestellt ist die Struktur von Hmo1 mit seinen wichtigsten Elementen und deren Funktionen (Abb. 4.19).



Abbildung 4.19: Elemente von Hmo1 und deren Funktionen

Gezeigt ist der schematische Aufbau des rDNA bindenden Proteins Hmo1. Die mittels Sequenzvergleich vorhergesagten DNA-Bindedomänen HMG-BoxA (blau) und HMG-BoxB (rot) erstrecken sich von Aminosäure 12-86 bzw. 106-178 (Lu et al., 1996). Das Programm cNLS-mapper trifft die Vorhersage einer zweiteiligen, α -Importin abhängigen NLS von Aminosäure 212-236 (orange). Es handelt sich um ein relativ kleines Protein von insgesamt 246 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 27,5 kDa. Sowohl die beiden DNA-Bindedomänen als auch der C-Terminus sollten eine Rolle für das Selbstinteraktionsverhalten von Hmo1 spielen.

4.8.1 Überexpression von Hmo1

Bei nahezu allen für die Mikroskopie erzeugten Hmo1-Derivaten handelte es sich nicht um Manipulationen des endogenen Locus, sondern um auf integrativen Plasmiden gelegenen vollständige Konstrukte mit Promotor, *HMO1*-Derivatsequenz, GFP-Fusionsanteil und Terminator, welche durch Linearisierung und Transformation stabil in das Genom integriert wurden. Solche Konstrukte können mehrfach integrieren und ihr Expressionslevel ist dann im Vergleich zu einem endogenen Konstrukt erhöht. Neben der eigentlichen Manipulation des Zielgens kann eben auch die Expressionsstärke einen Einfluss auf das Lokalisationsmuster haben und somit soll als erster wichtiger Punkt das Verhalten von Wildtyp-Hmo1 bei Überexpression betrachtet werden. Die *HMO1-GFP*-Fusion wurde zum einen unter die Kontrolle des *pHMO1*-Promotors und zum anderen unter die Kontrolle des konstitutiven *pTEF2*-Promotors gestellt. Beide Konstrukte wurden in einen $\Delta hmo1$ Stamm mit Kernmarkerkonstrukt integriert.

Es wurden jeweils mehrere Transformanten durch Western-Blots analysiert und dabei diejenigen ausgewählt, welche die höchsten Gesamtproteinmengen von Hmo1-GFP zeigten. Hierfür wurde ein GFP-Antikörper verwendet. Abbildung 4.20a verdeutlicht das Maß der jeweiligen Überexpression im Vergleich zu einer endogenen *HMO1-GFP*-Fusion. Durch den *pHMO1*-Promotor konnte maximal eine sechsfache Proteinmenge im Vergleich zu endogenem Hmo1 erreicht werden und auch bei Einsatz sehr hoher DNA-Mengen in der Transformation lagen die Expressionsmengen aller untersuchten Transformanten sehr nahe an diesem Wert. Die Fähigkeit von Hmo1, die eigene Expression negativ regulieren zu können sollte hier wohl eine Rolle spielen (Xiao et al., 2011). Durch die Verwendung des *pTEF2*-Promotors konnte eine wesentlich höhere Expression erzielt werden, nämlich eine über zwanzigfach höhere Menge im Vergleich zu endogener Expression (Abb. 20a). Die Überexpressionskonstrukte konnten zudem den in $\Delta hmo1$ beobachteten Wachstumsdefekt komplementieren. Außer der Kontrolle enthielten alle Stämme zusätzlich das artifizielle Kernmarkerkonstrukt mCherry-NLS, welches allerdings keinen Wachstumsdefekt hervorrief (Abb. 4.20b).

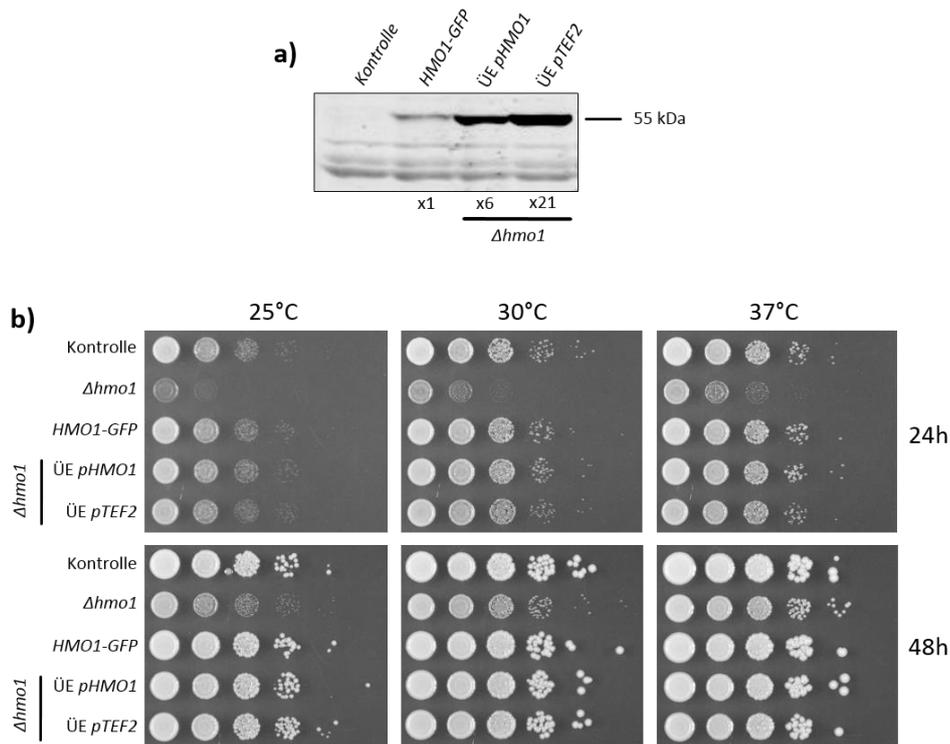


Abbildung 4.20: Starke Überexpression von Hmo1 hat keinen negativen Einfluss auf Wachstum

Ein durch *pHMO1*- und ein durch *pTEF2* exprimiertes Konstrukt zur Überexpression von Hmo1-GFP wurde stabil in das Genom eines $\Delta hmo1$ Stammes mit Kernmarker integriert (W12663).

a) Western-Blot zur Überprüfung der Hmo1-Überexpressionsstämme W13745 (ÜE *pHMO1*) und W13855 (ÜE *pTEF2*). Als Kontrollen dienten ein Wildtypstamm (BY4742) und ein Stamm mit endogener GFP-Fusion des *HMO1*-Lokus und Kernmarker (W12115). Es wurden je 2 OD Protein aufgetragen und der Nachweis erfolgte mit einem primären Antikörper, welcher gegen GFP gerichtet war. Die entsprechenden Banden wurden quantifiziert und auf endogenes Hmo1-GFP normalisiert.

b) Wachstumstest der Hmo1-Überexpressionsstämme. Für jeden Stamm wurden Verdünnungsreihen (1:10) auf Vollmediumsplatten mit Glukose gestempelt. Verwendet wurden der Wildtypstamm BY4742, der $\Delta hmo1$ Stamm W12663 mit Kernmarker, in welchen die Überexpressionskonstrukte transformiert wurden, der Stamm W12115, in welchem *HMO1* endogen mit GFP fusioniert war (mit Kernmarkerkonstrukt) und die beiden erzeugten Überexpressionsstämme W13745 (ÜE *pHMO1*) und W13855 (ÜE *pTEF2*).

In der Mikroskopie zeigten die Überexpressionsstämme in Vergleich zu endogenem Hmo1 deutlich erhöhte Signalintensitäten und nach wie vor scharf begrenzte nukleoläre Signale (Abb. 4.21a). Bei den Aufnahmen wurden unterschiedliche Laserintensitäten und Belichtungszeiten verwendet, aber für die Vermessung wurden die gleichen Grenzwerte gesetzt. Bei entsprechender Umrechnung wiesen der *pHMO1*-Überexpressionsstamm im Durchschnitt die sechsfache und der *pTEF2*-Überexpressionsstamm die dreizehnfache Signalintensität im Vergleich zu endogenem Hmo1 auf (jeweils 10-11 untersuchte Zellen). Bei der Überexpression durch *pTEF2* konnten häufiger sehr deutliche und über längere Zeit auftretende Signaldiskontinuitäten während der Segregation beobachtet werden (Abb. 4.21a, ÜE *pTEF2*). Auch bei starker Überexpression konnte für Hmo1 das typische Verteilungsmuster beobachtet werden (Abb. 4.21b).

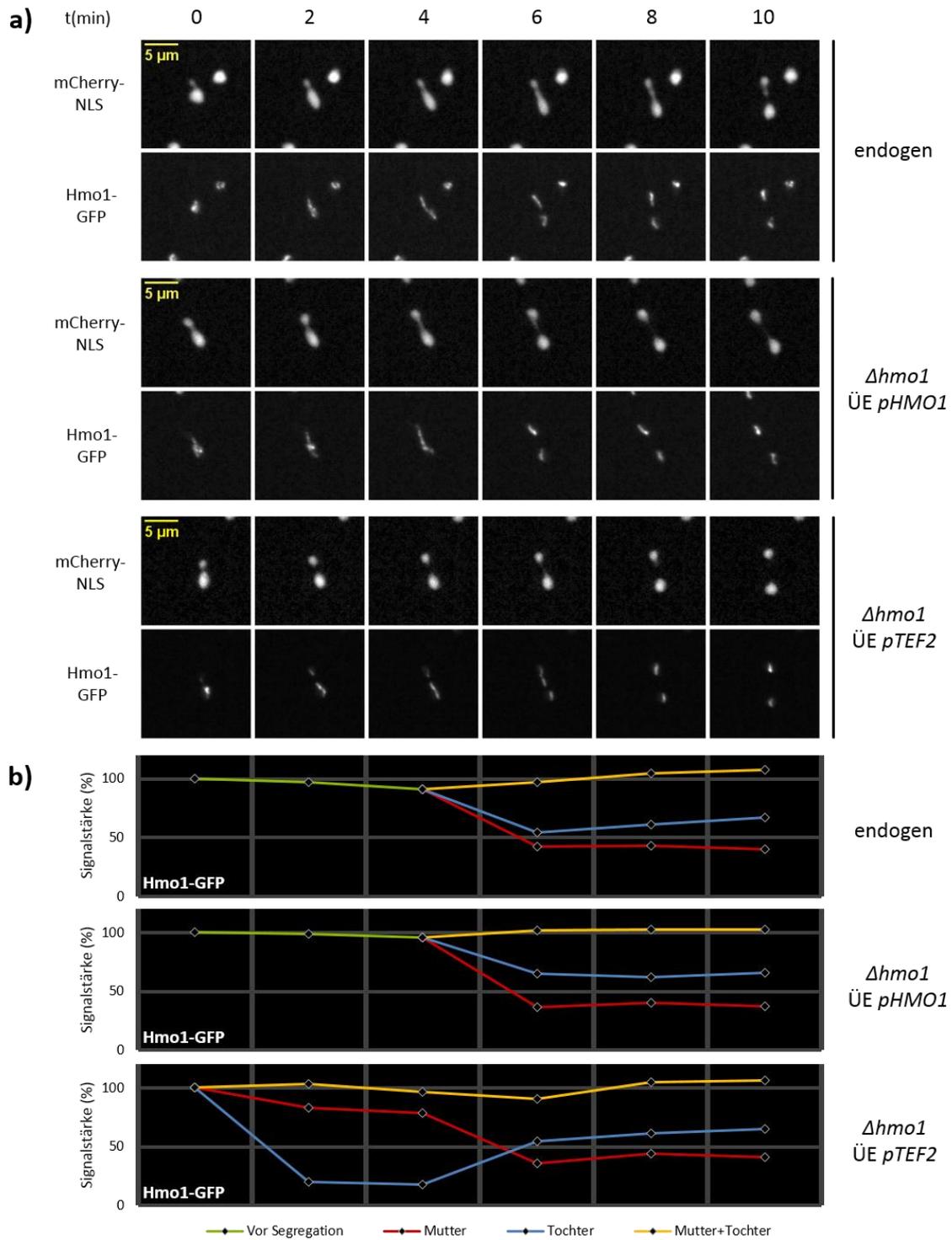


Abbildung 4.21: Hmo1 zeigt bei Überexpression normales Segregationsverhalten

a) Spinning-disc-Mikroskopie zum Vergleich des Verhaltens von endogenem Hmo1 (W12115) mit Überexpressionsstämmen (ÜE *pHMO1*: W13745, ÜE *pTEF2*: W13855). Die Einstellungen in der Mikroskopie wurden so gewählt, dass bei allen Stämmen eine vergleichbare Signalintensität detektiert wurde. In allen Fällen wurden die z-Stapel aufsummiert und der genetische Hintergrund war bei allen Stämmen S288c.

b) Vermessung von Hmo1-GFP zu den in a) dargestellten Zeitreihen. Dargestellt sind die Ausgangssignale vor mitotischer Segregation (grün), die in Mutter und Tochter detektierten Signalanteile nach Segregation (rot bzw. blau), sowie deren Summe (orange). Normiert wurde jeweils auf das Signal des ersten gezeigten Zeitwertes. Da die Parameter in der Mikroskopie so gewählt wurden, dass vergleichbare Gesamtsignalstärken detektiert wurden, wurde bei allen Stämmen derselbe untere Grenzwert für die Quantifizierung gesetzt.

Nach statistischer Analyse des Segregationsverhaltens von Hmo1 bei Überexpression schien die Proteinmenge einen gewissen Einfluss zu haben. Einige Zellen zeigten das normale Verhalten, aber im Schnitt wurde das Protein bei Überexpression doch etwas gleichmäßiger verteilt als bei der endogenen Kontrolle (Abb. 4.22). Bei Überexpression kann Hmo1-GFP also sehr stark im Nukleolus anreichern und nach wie vor das typische Segregationsmuster zeigen. Dies lässt vermuten, dass Oligomerisierung von Hmo1 für sein Verteilungsverhalten entscheidend ist. Die starke Anreicherung im Nukleolus hatte darüber hinaus zumindest auf das Wachstum der Zellen keinen negativen Effekt (Abb. 4.20; Abb. 4.21). Dieses Resultat ist interessant in Bezug auf die zuvor behandelte Antikorrelation von Rpa135 und Hmo1. Bei massiver nukleolärer Anreicherung von Hmo1 nimmt es also keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der RNA Polymerase I.

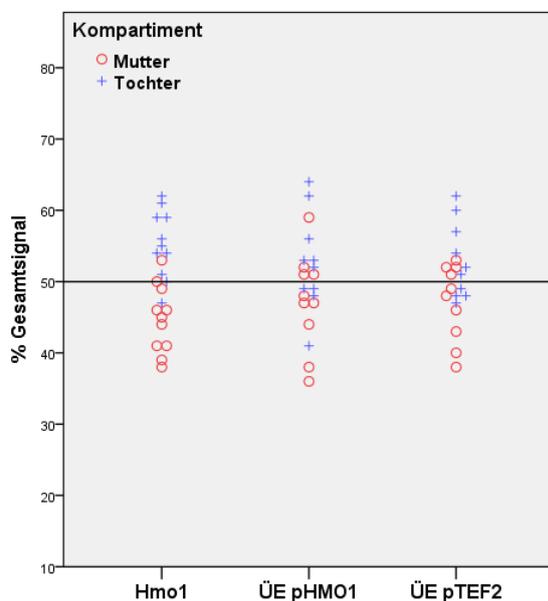


Abbildung 4.22: Statistische Analyse zum Segregationsverhalten von Hmo1 bei Überexpression

Wie bereits für endogen mit GFP fusioniertes Hmo1 durchgeführt, sollten auch zwei Hmo1-Überexpressionsstämme genauer bezüglich der mitotischen Proteinverteilung untersucht werden. Für einzelne mitotische Zellen jedes Stammes wurde die prozentuale Verteilung von Hmo1-GFP auf Mutter und Tochter ermittelt. Nach Signalteilung wurden hierfür die Werte in Mutter und Tochter über mehrere Zeitwerte gemittelt, aufsummiert und dann auf das somit erhaltene Gesamtsignal normiert. Signalanteil Mutter: rot. Signalanteil Tochter: blau. Verwendete Stämme: W12115 (Hmo1-GFP endogen, n=11), W13745 (ÜE pHMO1, n=10), W13855 (ÜE pTEF2, n=10).

4.8.2 Bedeutung von Nukleinsäurebindung für die Lokalisation von Hmo1

Bei der Untersuchung eines rDNA-bindenden nukleolären Proteins drängt sich natürlich die Vermutung auf, dass DNA-Bindung eine entscheidende Rolle für dessen Lokalisation spielen sollte. Daher wurden verschiedene Manipulationen der beiden DNA-Bindemotive von Hmo1 durchgeführt und die Konstrukte auf Lokalisation und Nukleinsäurebindung hin überprüft. Neben vollständigen Deletionen der beiden HMGB-Motive wurde auch gerichtete Mutagenese der HMG-BoxB als Haupt-DNA-Bindedomäne durchgeführt. HMGB-Domänen bestehen im Allgemeinen aus drei α -Helices, welche zusammen eine L-förmige Struktur annehmen. Sie binden doppelsträngige DNA in der kleinen Furche, wobei an bestimmten Positionen der Helices verschiedene Aminosäuren positioniert sein können, deren Seitenketten zwischen Basenpaare der DNA interkalieren und einen entscheidenden Beitrag zur DNA-Affinität leisten (Ohndorf et al., 1999; He et al., 2000). Durch die Interkalation und die L-förmige

Struktur dieser Domänen wird ein Knick der Nukleinsäure induziert (Bustin, 1999). Ein für Hmo1 durchgeführter Sequenzvergleich mit anderen HMGB-Proteinen deutet darauf hin, dass ein an Position 114 sitzendes Phenylalanin eine interkalierende Aminosäure im Falle von Hmo1 darstellen sollte (Kamau et al., 2004). Da sich an Position 113 ebenfalls ein Phenylalanin befindet, wurde eine Doppelmutante erstellt, wobei beide Phenylalanine durch Alanin ersetzt wurden. Alanin sollte nicht zur Interkalation fähig sein. Bei den nachfolgend betrachteten vier Derivaten für die Mikroskopie handelt es sich um Hmo1(F113,114A)-GFP (BoxBmut), Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246) (Δ BoxB), GFP-Hmo1(86-246) (Δ BoxA) und GFP-Hmo1(86-246;F113,114A) (Δ BoxA,BoxBmut). Die vollständigen Konstrukte mit Promotor und Terminator wurden stabil in das Genom eines Δ hmo1-Stammes mit Kernmarker integriert.

Abbildung 4.23a zeigt eine schematische Darstellung der Proteinderivate für die Mikroskopie. Es wurden Proteinlysate hergestellt und der Nachweis der Derivate erfolgte mittels eines gegen GFP gerichteten primären Antikörpers (Abb. 4.23b, c, d). Für jedes Konstrukt wurden Transformanten mit unterschiedlichen Expressionsmengen in der Mikroskopie überprüft (alle in Abb. 4.23b, c, d beschrifteten Transformanten), allerdings war in keinem Fall eine Dosisabhängigkeit der Lokalisation zu erkennen. Alle Transformanten eines Konstruktes zeigten immer das gleiche Lokalisationsmuster, obwohl die Proteinmengen im Western-Blot und auch die Signalstärken in der Mikroskopie deutlich unterschiedlich waren. In der nachfolgenden Abbildung 4.23e ist die Mikroskopie jeweils einer ausgewählten Transformante für jedes Konstrukt zusammen mit endogenem Hmo1 gezeigt. Im Falle von BoxBmut wurde Transformante Nr.1 gewählt, welche ein Expressionslevel vergleichbar mit dem des *pHMO1*-Überexpressionsstammes vorwies, in welchem normale Lokalisation von Hmo1 gegeben war. Das Konstrukt bildete Aggregate, was also nicht durch die Proteinmenge verursacht sein konnte, sondern auf die Mutation zurückging (Abb. 4.23b, e). Auch für Δ BoxB ist die Mikroskopie der Transformante Nr.1 dargestellt, welche ebenfalls eine dem *pHMO1*-Überexpressionsstamm entsprechende Proteinmenge zeigte. Die Lokalisation scheint zwar nukleolär, allerdings wesentlich ausgedehnter und homogener als dies für endogenes Hmo1 und überexprimiertes Hmo1 bei gleicher Expressionsstärke beobachtet werden konnte (Abb. 4.23c, e; Abb. 4.20-21). Für die beiden N-terminalen Verkürzungen Δ BoxA und Δ BoxA,BoxBmut sind jeweils die Transformanten Nr.2 gezeigt, da deren Expression der von endogenem Hmo1-GFP entsprach. Die in beiden Fällen beobachtete starke Delokalisation über den gesamten Zellkern war also definitiv nicht durch eine übermäßige Proteinmenge verursacht (Abb. 4.23d, e). Nach diesen Ergebnissen scheint die HMG-BoxA zunächst eine wichtigere Rolle für nukleoläre Lokalisation zu spielen als die HMG-BoxB und könnte zudem für *in vivo* Oligomerisierung notwendig sein, da die Mutagenese der HMG-BoxB bei Fehlen der HMG-BoxA keine Aggregatbildung mehr induzieren kann. Diese Resultate zeigten also grundlegend, dass die veränderten Lokalisationsmuster der erstellten Derivate keine dosisbedingten Effekte waren und im

Anschluss werden weitere Lokalisationsdaten in Kombination mit biochemischen Studien zur Nukleinsäurebindung aufgeführt, um einen tieferen Einblick in die Verhaltensweisen der Derivate zu erlangen. Wachstumstests zu den verschiedenen Konstrukten sind im Anhang beigefügt (Abb. 9.2).

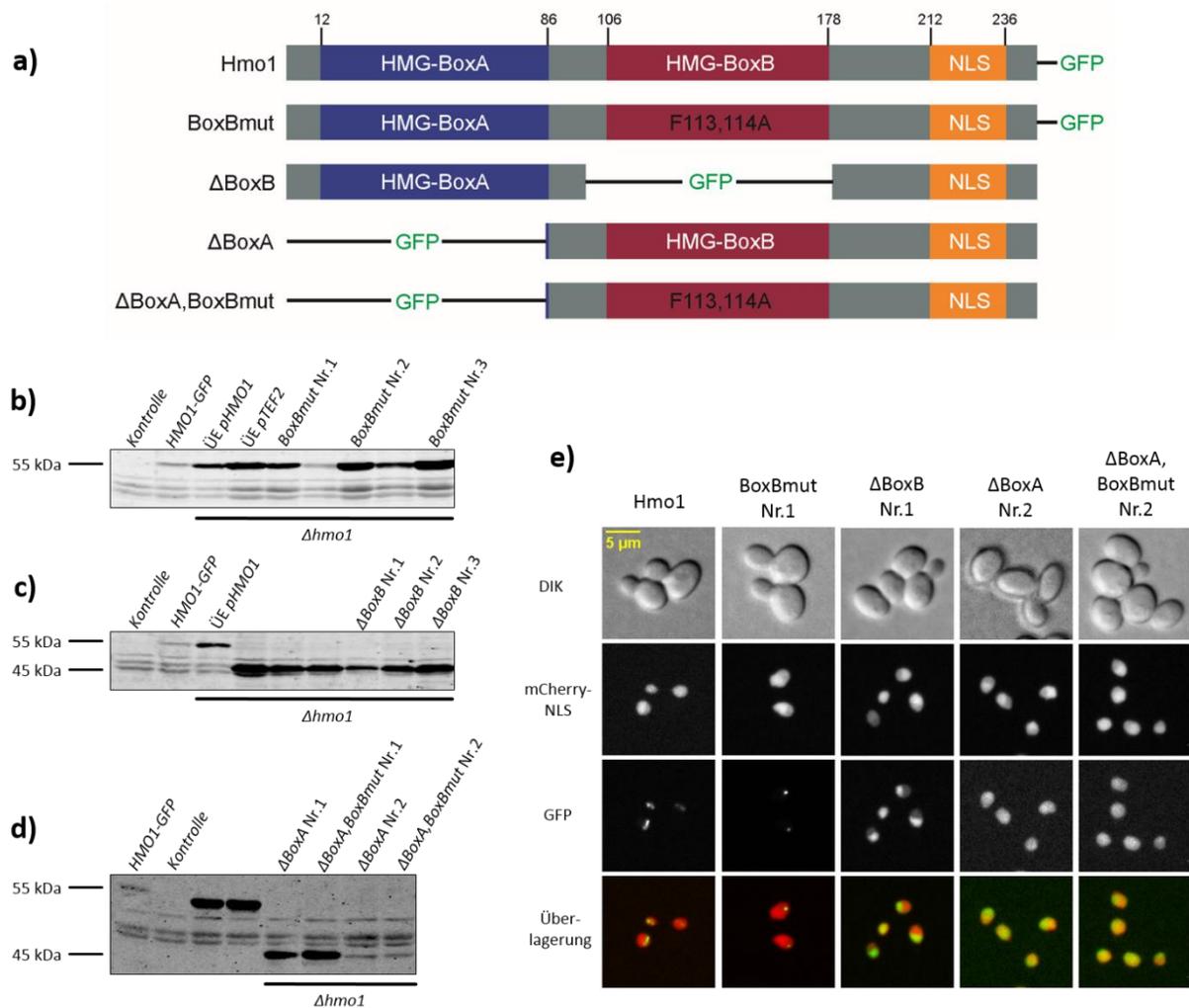


Abbildung 4.23: Hmo1-Derivate für die Mikroskopie

Verschiedene Derivate von Hmo1 wurden stabil in das Genom eines $\Delta hmo1$ Stammes mit Kernmarker integriert (W12663) und jeweils mehrere Transformanten wurden hinsichtlich Expression der Konstrukte getestet. Für jedes Konstrukt ist eine Transformante in der Mikroskopie gezeigt.

a) Schematische Darstellung der für die Mikroskopie erzeugten Derivate von Hmo1. Hmo1: endogenes Hmo1-GFP; BoxBmut: Hmo1(F113,114A)-GFP; Δ BoxB: Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246); Δ BoxA: GFP-Hmo1(86-246); Δ BoxA,BoxBmut: GFP-Hmo1(86-246;F113,114A).

b), c) und **d)** Western-Blots zur Überprüfung der Expression verschiedener Konstrukte. Als Negativkontrolle diente ein Wildtypstamm (Kontrolle: BY4742) und als Referenzen wurden ein Stamm mit endogener Hmo1-GFP-Fusion (HMO1-GFP: W12115), sowie zwei Überexpressionsstämme für Hmo1-GFP herangezogen, die unveränderte Lokalisation des Proteins zeigten (ÜE *pHMO1*: W13745; ÜE *pTEF2*: W13855). Stammnamen der Transformanten: W13744 (BoxBmut Nr.1), W12082 (BoxBmut Nr.2), W14200 (BoxBmut Nr.3), W13748 (Δ BoxB Nr.1), W13961 (Δ BoxB Nr.2), W13962 (Δ BoxB Nr.3), W12697 (Δ BoxA Nr.1), W13182 (Δ BoxA Nr.2), W12699 (Δ BoxA,BoxBmut Nr.1), W13183 (Δ BoxA,BoxBmut Nr.2). Von jeder Probe in b) wurden 2 OD Protein aufgetragen und von jeder Probe in c) und d) wurde 1 OD Protein aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit einem GFP-Antikörper.

e) Spinning-disc-Mikroskopie von endogenem Hmo1-GFP und Derivaten. Stämme: siehe b), c) und d). Die Maximalwerte wurden in eine Ebene projiziert.

Alle für die Mikroskopie als GFP-Fusionen erzeugten Derivate wurden auch als N-terminale 6xHis-Fusionen erzeugt und somit in *E.coli* exprimiert und affinitätsgereinigt. Zusätzlich zu den Lokalisationsstudien konnten die Derivate so auch mittels EMSA auf Nukleinsäurebindung hin getestet werden. HMG-Box-Proteine gelten im Allgemeinen als DNA-Bindeproteine, welche ihre biologischen Funktionen durch Induzierung von Konformationsänderungen der DNA ausüben (Bustin, 1999), allerdings gibt es auch HMG-Box-Proteine, welche nicht nur DNA, sondern auch dsRNA und ssRNA binden können (Yanai und Taniguchi, 2014). Zudem scheint Hmo1 neben vielen bereits erwähnten Funktionen auch an der Prozessierung von rRNA beteiligt zu sein (Hall et al., 2006). Daher kann die berechnete Frage gestellt werden, ob Hmo1 evtl. neben ribosomaler DNA auch ribosomale RNA binden kann. Ribosomale RNA ist in Nukleoli wachsender Zellen in sehr hoher Menge vorhanden und könnte als Bindungspartner einen großen Einfluss auf die nukleoläre Lokalisation von Hmo1 nehmen.

Als DNA-Substrat wurde ein doppelsträngiges 400bp Fragment aus der kodierenden *RDN18* Region der rDNA verwendet, welche Hmo1 *in vivo* bindet (Hall et al., 2006) und selbiges Fragment wurde zusätzlich als Matrize bei einer *in vitro* Transkription eingesetzt, um einzelsträngige rRNA zu erzeugen. Das verwendete rRNA-Fragment hatte somit gleiche Länge und gleiche Sequenzabfolge wie das verwendete rDNA-Fragment (mit Ausnahme weniger zusätzlicher Basen an den 5' und 3' Enden des *in vitro* Transkriptes). Zudem wurden rDNA und rRNA bei den EMSAs in gleicher Konzentration eingesetzt und alle Parameter der Elektrophorese waren ebenfalls identisch. Somit konnten die Affinitäten der Hmo1-Derivate für rDNA und rRNA direkt miteinander verglichen werden. Da es sich um relativ lange Nukleinsäuren handelte, wurden für die EMSAs dementsprechend Agarosegele verwendet. Eine HMG-Box sollte bei dsDNA-Bindung direkte Kontakte mit dieser in einem Bereich von etwa 7 Basenpaaren herstellen (Ohndorf et al., 1999) und somit sollten unter der Annahme, dass beide HMG-Boxen von Hmo1 direkte Nukleinsäurekontakte herstellen, ungefähr 20-30 Hmo1 Moleküle direkt an die verwendeten Substrate binden können. Da also somit nicht die Situation einer 1:1 Stöchiometrie der Bindungspartner gegeben war, wurde die Hill-Gleichung für die quantitative Auswertung herangezogen. Die Angleichung der Proteine für die *in vitro* Versuche und Kontrollexperimente mit gereinigtem GFP sind dem Anhang zu entnehmen (Abb. 9.3; Abb. 9.4). Um des Weiteren die Lokalisation der untersuchten Derivate präziser beurteilen zu können, wurden die bereits gezeigten GFP-Fusionen zusätzlich in einen $\Delta hmo1$ Stamm mit endogenem Nop56-3mCherry als nukleolärem Komarker eingebracht. Im Folgenden ist für die einzelnen Derivate jeweils die Lokalisation zusammen mit dem Nukleinsäurebindungsverhalten dargestellt.

Hmo1 zeigte ein wie bereits beschrieben räumlich stark begrenztes und teils in Foci organisiertes nukleoläres Signal (Abb. 4.24a). Die berechnete EC_{50} des Wildtypproteins betrug für die rDNA unter diesen Umständen 226 nM und die Bindung wies hohe positive Kooperativität auf (Hill-Koeffizient: 4,24). Die verwendete rRNA wurde ebenfalls durch Hmo1 gebunden, allerdings mit etwas geringerer

Affinität als rDNA (EC_{50} rRNA: 289 nM). Auch im Falle der rRNA war die Bindung hochkooperativ (Hill-Koeffizient: 4,34) (Abb. 4.24b, c). In der Literatur ist die positiv kooperative DNA-Bindung von Hmo1 bereits belegt, allerdings fiel diese in besagter Studie wesentlich geringer aus, vermutlich da mit sehr kurzen DNA-Fragmenten gearbeitet wurde (Bauerle et al., 2006). Das im Gel zu erkennende breite Laufverhalten der Nukleinsäuren verdeutlichte, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Protein-Nukleinsäure-Komplexe vorlagen und sollte wohl auch der Beurteilung dienen, ob bei unterschiedlichen Derivaten auch unterschiedliche Komplexe gebildet werden (Abb. 4.24b). Hmo1 kann also zumindest *in vitro* neben rDNA auch rRNA binden, allerdings mit etwas geringerer Affinität.

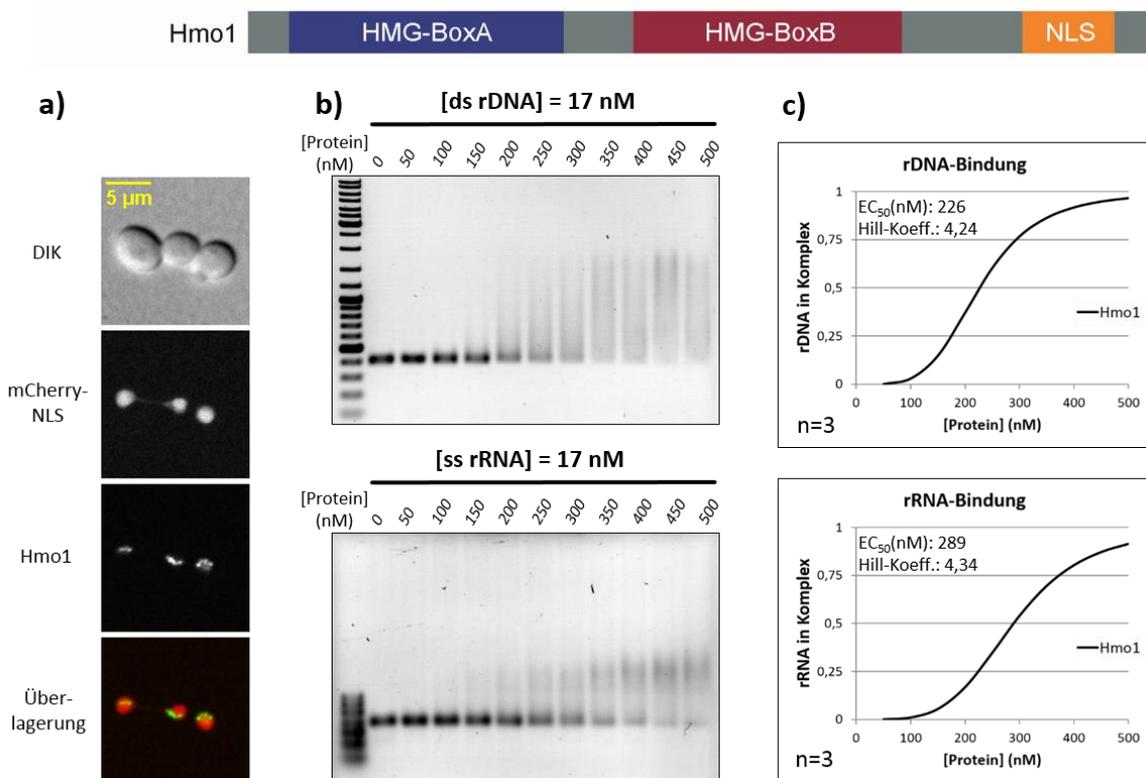


Abbildung 4.24: Hmo1 zeigt scharf begrenzte, inhomogene nukleoläre Lokalisation und bindet rDNA mit höherer Affinität als rRNA

a) Spinning-disc-Mikroskopie zur Lokalisation von endogenem Hmo1 (Hmo1-GFP) in einer lebenden Zelle. Die maximalen Werte wurden in eine Ebene projiziert. Stamm: W12115 (Hintergrund: S288c).

b) EMSAs zur Affinitätsbestimmung von Hmo1 (6xHis-Hmo1) bezüglich eines 400 bp Fragmentes der 18S rDNA bzw. des entsprechenden einzelsträngigen rRNA Fragmentes. Als Kontrolle wurde der Elutionspuffer verwendet, in welchem die gereinigten Proteine gelöst waren.

c) Mit den gemittelten empirischen Daten aus jeweils $n=3$ EMSA-Experimenten erfolgte die Kurvenanpassung und somit die Bestimmung der EC_{50} und des Hill-Koeffizienten. Dargestellt sind jeweils nur die mathematisch an die empirischen Werte angepassten Kurven.

Die Mutagenese zweier potentiell interkalierender Aminosäuren der Haupt-DNA-Bindedomäne hatte einen massiven Effekt auf die Lokalisation des Proteins. Dieses zeigte nun starke Aggregatbildung, wobei die Aggregate immer innerhalb des Nukleolus, repräsentiert durch Nop56, anzutreffen waren (Abb. 4.25a). Sowohl bezüglich rDNA- und rRNA-Bindung konnte für dieses Derivat eine verringerte

Affinität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, wobei der Effekt für rRNA sehr gering und für rDNA etwas deutlicher ausgeprägt war (Abb. 4.25c). Nach wie vor war hohe Kooperativität gegeben, welche im Falle der rRNA-Bindung sogar im Vergleich zum Wildtyp gesteigert schien. Zumindest bei der N-terminalen 6xHis-Fusion von BoxBmut lag also keine durch Fehlfaltung verursachte, unspezifische Aggregation vor. Das beobachtete Laufverhalten der Komplexe war von dem des Wildtypproteins nicht unterscheidbar, es sollten also ähnliche Komplexe gebildet worden sein (Abb. 4.25b).

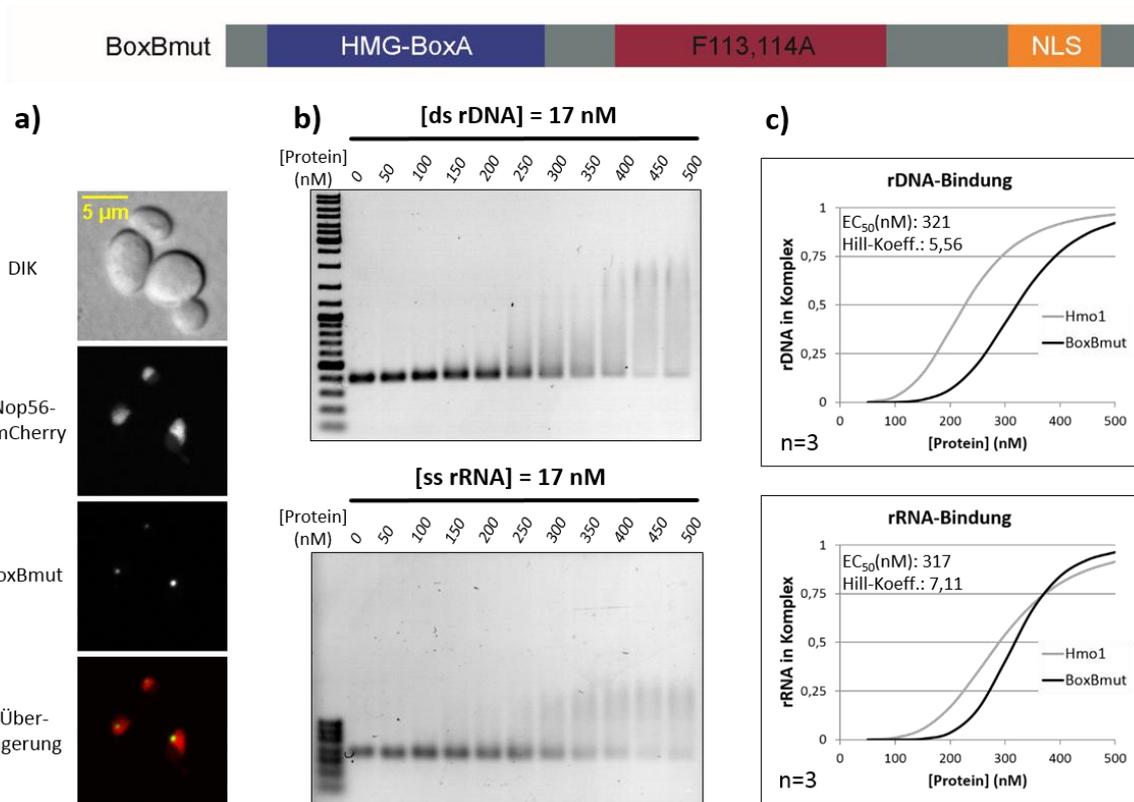


Abbildung 4.25: Ein Hmo1-Derivat mit leicht verringerter Nukleinsäureaffinität aggregiert *in vivo*

a) Spinning-disc-Mikroskopie zur Lokalisation von BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP) in einem $\Delta hmo1$ Stamm. Die maximalen Pixelwerte wurden projiziert, bei dem verwendeten Stamm handelte es sich um W12082 (Hintergrund: S288c).

b) Mittels Agarosegelelektrophorese wurde die Affinität von BoxBmut (6xHis-Hmo1(F113,114A)) für ein 400 bp Fragment der 18S rDNA und der entsprechenden einzelsträngigen rRNA getestet. Als Referenz diente Elutionspuffer.

c) Jeder in b) gezeigte EMSA wurde 3fach durchgeführt und mit den gemittelten experimentellen Bindekurven erfolgte dann die mathematische Kurvenanpassung. Dargestellt sind die berechneten Kurven und die damit ermittelte EC_{50} sowie der Hill-Koeffizient. Zum Vergleich sind auch die Kurven des Wildtypproteins angegeben.

Bei vollständiger Deletion der HMG-BoxB hingegen war keine Aggregatbildung, sondern eine relativ normale nukleoläre Lokalisation zu beobachten. Allerdings war das Signal weitaus homogener und breiter über den Kern verteilt als das beim Wildtyp der Fall war und Δ BoxB zeigte somit eine zum rRNA Prozessierungsfaktor Nop56 quasi identische Lokalisation (Abb. 4.26a). Bezüglich rDNA-Bindung hatte die Deletion der HMG-BoxB einen massiven Affinitätsverlust zur Folge, rRNA-Bindung jedoch war

unverändert. Interessanter Weise hatte dieses Derivat also im Gegensatz zum Wildtyp eine höhere Affinität zu rRNA als zu rDNA (EC_{50} rRNA: 297 nM; EC_{50} rDNA: 522 nM). Es schien sich bei der HMG-BoxB also um eine reine DNA-Bindedomäne zu handeln und ihre Abwesenheit hatte auch eine deutliche Verringerung der Kooperativität bezüglich rDNA-Bindung zur Folge (Abb. 4.26c). Zudem war zumindest bei rDNA-Bindung deutlich veränderte Komplexbildung erkennbar, da auch im hochmolekularen Bereich Signal detektiert werden konnte (Abb. 4.26b). Im Falle des Wildtyps lief das in Komplexen befindliche DNA-Signal wesentlich kompakter. Die HMG-BoxB ist also nicht notwendig für nukleoläre Lokalisation an sich, jedoch ist sie notwendig für hochaffine rDNA-Bindung und die Erzeugung des typischen, räumlich scharf begrenzten und inhomogenen Lokalisationsmusters von Hmo1.

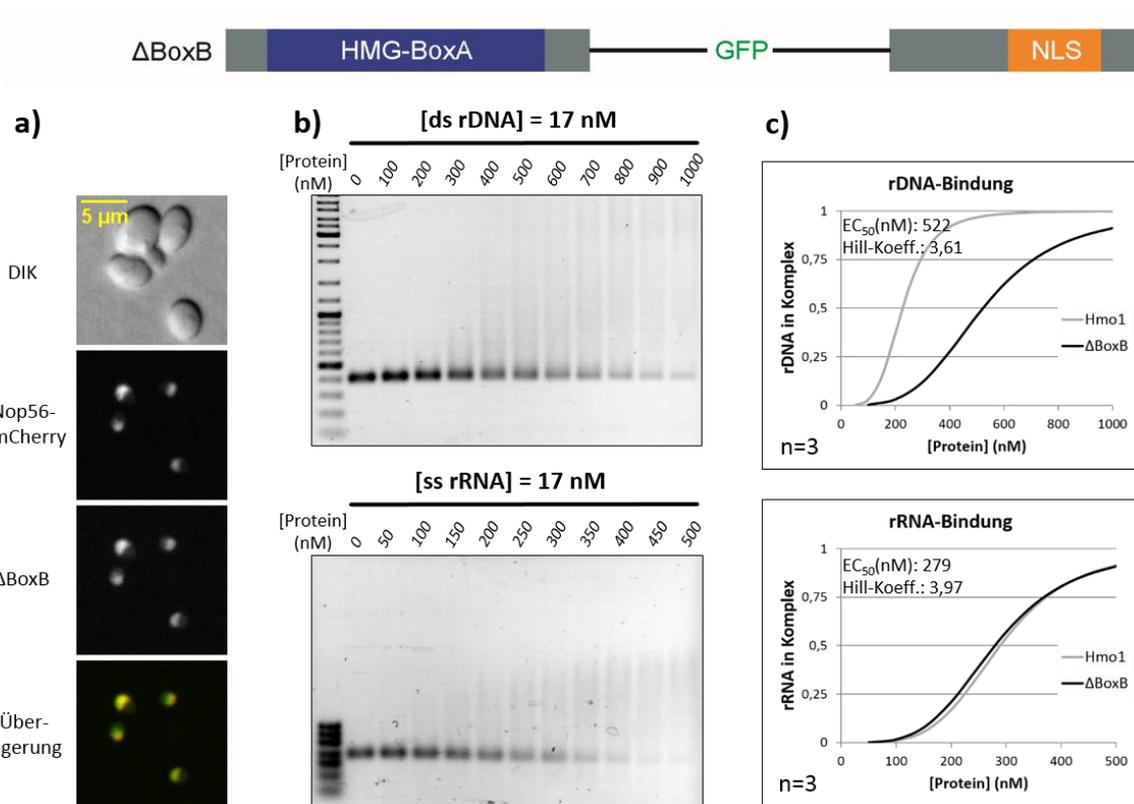


Abbildung 4.26: Ein Hmo1-Derivat mit höherer Affinität zu rRNA als rDNA zeigt das Lokalisationsmuster eines rRNA-Prozessierungsfaktors

a) Spinning-disc-Aufnahmen zeigen die Lokalisation des Hmo1-Derivats Δ BoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246)) in $\Delta hmo1$. Die maximalen Pixelwerte der optischen Schnitte sind dargestellt. Stamm: W14197 (Hintergrund: S288c).

b) EMSAs zur Ermittlung des rDNA- und rRNA-Bindungsverhaltens von Δ BoxB (6xHis-Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246)). Als Substrat dienten ein 400 bp DNA-Fragment des *RDN18*-Lokus bzw. die entsprechende Sequenz als einzelsträngige rRNA. Als Nullwert diente reiner Elutionspuffer.

c) Kurvenanpassung und damit einhergehende Berechnung der EC_{50} und des Hill-Koeffizienten. Die in b) gezeigten EMSAs wurden jeweils dreifach durchgeführt und die Kurvenanpassung erfolgte mit den gemittelten experimentellen Bindekurven. Neben den berechneten Kurven sind zusätzlich als Referenz die Bindekurven des Wildtypproteins angegeben.

Die Deletion der HMG-BoxA hatte den drastischsten Verlust nukleolärer Lokalisation zur Folge. Δ BoxA war fast gänzlich homogen über den Zellkern verteilt und zeigte nur noch minimale Anreicherung innerhalb des Nukleolus (Abb. 4.27a). Dies traf auch bei endogenem Expressionsniveau zu (Abb. 4.35, Δ BoxA Nr.2). Die Affinität zu rDNA war bei diesem Konstrukt im Vergleich zur Kontrolle unverändert, die Bindung von rRNA jedoch war erkennbar abgeschwächt (Abb. 4.27c). Somit könnte die HMG-BoxA eine reine RNA-Bindedomäne darstellen. Für Δ BoxA zeigten die rDNA-Protein-Komplexe ein sehr charakteristisches, U-förmiges Laufverhalten (Abb. 4.27b). Auch hier sollte also veränderte Komplexbildung stattgefunden haben. Die HMG-BoxA ist also notwendig für nukleoläre Lokalisation, jedoch nicht für hochaffine rDNA-Bindung.

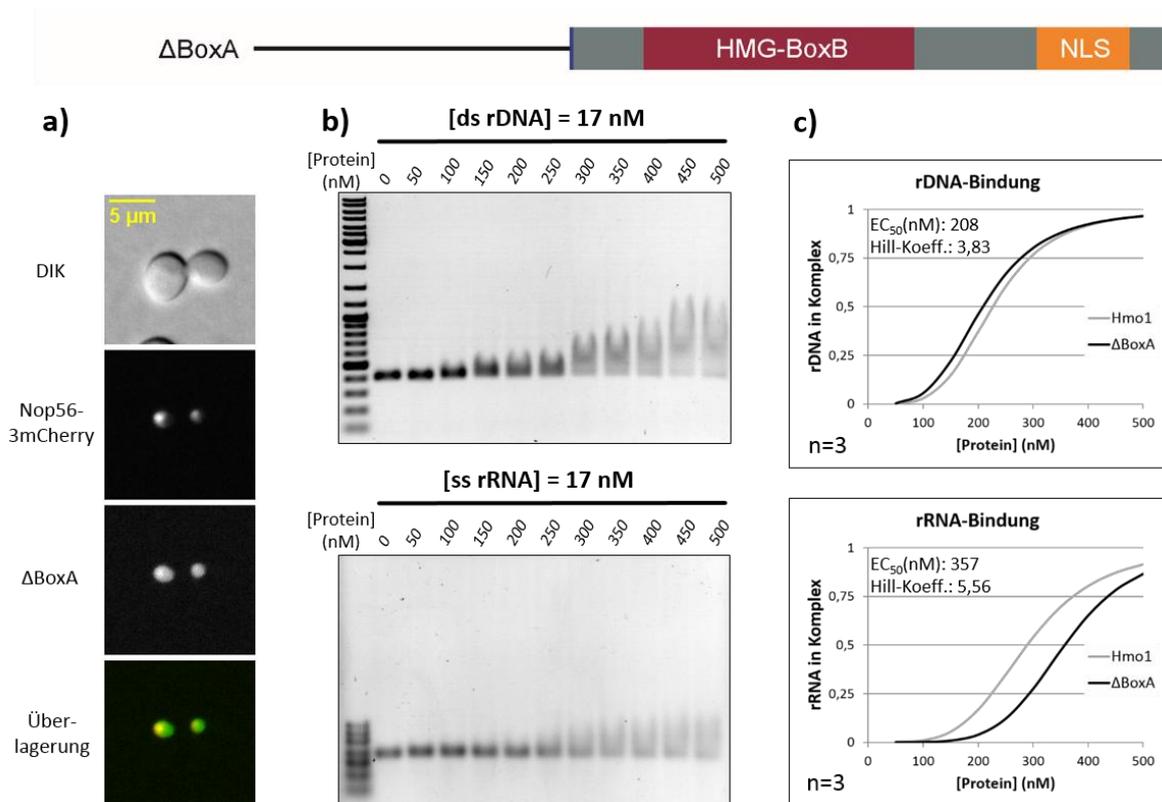


Abbildung 4.27: Die HMG-BoxA ist notwendig für nukleoläre Lokalisation, jedoch nicht für hochaffine rDNA-Bindung

a) Spinning-disc-Mikroskopie zur subzellulären Lokalisation des Δ BoxA-Derivats (GFP-Hmo1(86-246)) in einem Δ hmo1 Stamm. Die Maximalwerte wurden in eine Ebene projiziert, bei dem verwendeten Stamm handelte es sich um W14192 (Hintergrund S288c).

b) Durch EMSAs erfolgte die Überprüfung von Δ BoxA (6xHis-Hmo1(86-246)) bezüglich Nukleinsäurebindung. Verwendung fand zum einen ein 400 bp Fragment rDNA aus der *RDN18* Region und zum anderen dieselbe Nukleotidsequenz als einzelsträngige rRNA. Als Kontrolle diente Elutionspuffer.

c) Jeder EMSA wurde dreimal durchgeführt und die empirischen Kurven wurden gemittelt. Mit diesen gemittelten Kurven erfolgte die Kurvenanpassung und damit die Berechnung der EC_{50} und des Hill-Koeffizienten. Die für Δ BoxA berechneten Bindekurven sind zusammen mit denen des Wildtypproteins angegeben.

Als letztes Derivat wurde die Kombination von Deletion der HMG-BoxA und Mutagenese der HMG-BoxB betrachtet. Das Signal war weit über den Kern verteilt und geringfügig im Nukleolus angereichert, die Lokalisation entsprach somit der des Δ BoxA-Konstruktes und in keinsten Weise der des BoxBmut-Konstruktes (Abb. 4.28a). Dies bedeutet, dass die HMG-BoxA notwendig für die im Falle von BoxBmut beobachtete Aggregatbildung ist, wie zuvor bereits erwähnt wurde. Hier waren sowohl rDNA- als auch rRNA-Bindung abgeschwächt, wobei im Falle der rDNA-Bindung auch die Kooperativität deutlich verringert war (Abb. 4.28c). Auch zeigte sich im Falle der DNA-Protein-Komplexe ein U-förmiges Laufverhalten wie im Falle von Δ BoxA, welches hier allerdings weniger kompakt ausfiel (Abb. 4.28b). Die HMG-BoxA ist also notwendig für nukleoläre Lokalisation und scheinbar auch für Oligomerisierung *in vivo*, jedoch nicht für hochaffine rDNA-Bindung.

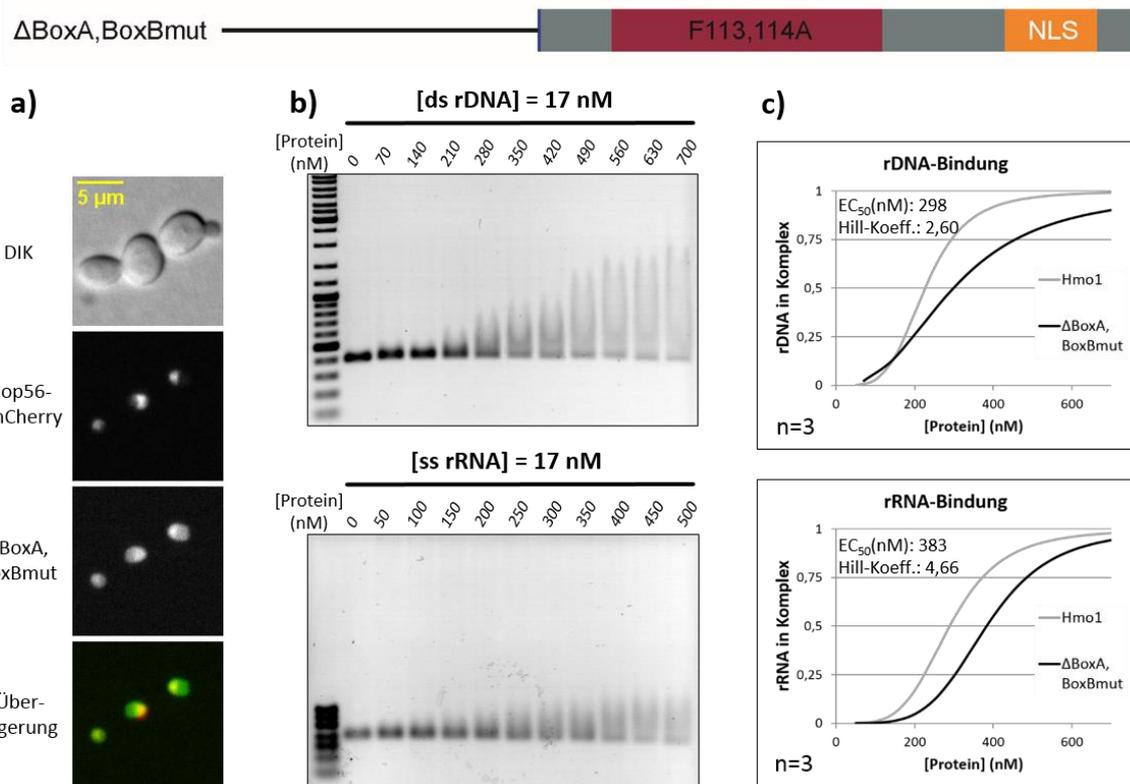


Abbildung 4.28: Die HMG-BoxA ist notwendig für durch Mutagenese der HMG-BoxB verursachte *in vivo* Aggregation

a) Die Lokalisation von BoxA, BoxBmut (GFP-Hmo1(86-246;F113,114A)) in Δ hmo1 wurde durch Spinning-disc-Mikroskopie ermittelt. Die Projektion der Maximalwerte wurde angewandt. Stamm: W14193 (Hintergrund: S288c).

b) Agarosegele zur Bestimmung der Affinität von Δ BoxA, BoxBmut (6xHis-Hmo1(86-246;F113,114A)) zu einem 400 bp Ausschnitt von *RDN18* und der entsprechenden einzelsträngigen rRNA. Als Kontrolle wurde der Elutionspuffer genutzt, in welchem alle gereinigten Proteine gelöst waren.

c) Nach dreifacher Durchführung jedes EMSA wurden die experimentell erhaltenen Kurven gemittelt und mit diesen erfolgte dann die Kurvenanpassung. Die EC₅₀ und der Hill-Koeffizient sind zusammen mit den berechneten Bindekurven für Δ BoxA, BoxBmut angegeben. Des Weiteren sind die Bindekurven des Wildtypproteins zum Vergleich dargestellt.

Sowohl die HMG-BoxA als auch die HMG-BoxB leisten also ihren Beitrag zur normalen Lokalisation von Hmo1 und da das Hauptinteresse vorliegender Arbeit auf dem Segregationsverhalten nukleolärer Proteine liegt, wurden sowohl das Δ BoxA- als auch das Δ BoxB-Konstrukt auf mitotische Verteilung hin untersucht.

Wie bereits gezeigt verhielt sich Δ BoxA größtenteils wie der Kernmarker, eine geringfügige Anreicherung im Nukleolus konnte jedoch beobachtet werden. Bei Betrachtung einer sich teilenden Zelle war ersichtlich, dass die mitotische Verteilung der von mCherry-NLS entsprechen musste (Abb. 4.29a). Im Falle von Δ BoxB zeigte sich auch während der Segregation ein Verhalten, welches dem des Prozessierungsfaktors Nop56 sehr ähnelte. Das Protein wies eben ein relativ voluminöses und homogenes nukleoläres Signal auf und nach Teilung verfügte der Tochternukleolus über eine deutlich geringere Menge an Protein (Abb. 4.29a). Die statistische Analyse verdeutlichte noch einmal, welche drastischen Effekte die Deletionen der HMG-Boxen nicht nur für Lokalisation, sondern auch Segregation hatten (Abb. 4.29b). Die beiden Deletionskonstrukte wurden dabei jeweils in einem Maß exprimiert, bei welchem die Wildtypkontrollen deutlich unterschiedliches Verhalten zeigten (Abb. 4.29c). Das bedeutet, dass sowohl die HMG-BoxA als auch die HMG-BoxB notwendig und nicht hinreichend für das normale Segregationsverhalten von Hmo1 sind.

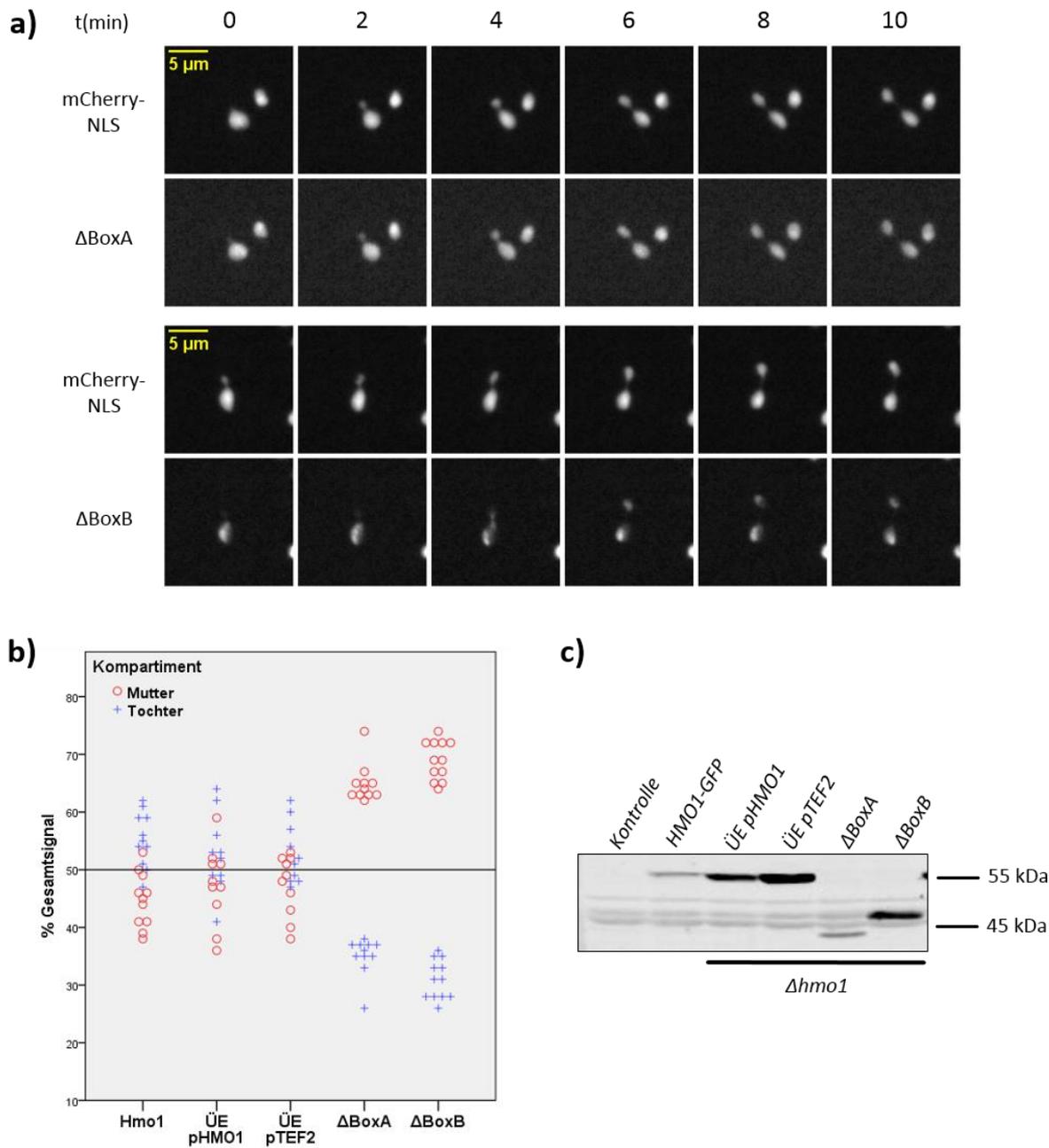


Abbildung 4.29: Sowohl die HMG-BoxA als auch die HMG-BoxB sind notwendig und nicht hinreichend für das normale Segregationsverhalten von Hmo1

a) Spinning-disc-Mikroskopie zur mitotischen Segregation von Δ BoxA (GFP-Hmo1(86-246)) und Δ BoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246)). Die z-Stapel wurden aufsummiert, bei den Stämmen handelte es sich um W13182 (Δ BoxA) und W13748 (Δ BoxB). Hintergrund: S288c.

b) Im Streuplot gezeigt ist das Segregationsverhalten für endogen markiertes Hmo1-GFP (Hmo1-GFP: W12115, n=11), überexprimiertes Hmo1-GFP (ÜE pHMO1: W13745, n=10 bzw. ÜE pTEF2: W13855, n=10) und die beiden Derivate (Δ BoxA: W13182, n=11 bzw. Δ BoxB: W13748, n=12). Für Einzelzellen wurden die Signalanteile in Mutter und Tochter nach Segregation berechnet (rot bzw. blau). Hierfür wurden die Signale in Mutter bzw. Tochter nach Trennung über mehrere Zeitwerte gemittelt, beide Werte wurden dann addiert und anschließend auf das somit erhaltene Gesamtsignal normiert.

c) Western-Blot zu den in a) und b) analysierten Stämmen. Es wurden je 2 OD Protein jeder Probe aufgetragen und der Nachweis erfolgte mittels GFP-Antikörper. Als Negativkontrolle wurde der Wildtypstamm BY4742 verwendet.

4.8.3 Bedeutung der Selbstinteraktion für die Lokalisation von Hmo1

Da Hmo1 bei starker Überexpression unveränderte Lokalisation zeigte und bei Mutagenese der HMG-BoxB Aggregatbildung erfolgte, liegt die Vermutung nahe, dass Oligomerisierung von Hmo1 einen bedeutenden Beitrag zu dessen Verhalten leistet. Die zuvor behandelten Konstrukte waren für die Mikroskopie stabil in das Genom eines $\Delta hmo1$ Stammes integriert worden und für Untersuchungen zum Selbstinteraktionsverhalten mussten diese vorhandenen Stämme lediglich mit einem *HMO1* Stamm gekreuzt, sporuliert und anschließend in der Mikroskopie untersucht werden. Ein Schwachpunkt dieser Vorgehensweise war die Expression der Konstrukte durch den Promotor *pHMO1*, da Hmo1 die eigene Expression negativ regulieren kann (Xiao et al., 2011). Somit sollte die Expression der Konstrukte in Anwesenheit von endogenem *HMO1* erniedrigt sein.

Im Falle von BoxBmut konnte ein sehr deutlicher Effekt beobachtet werden. Hier konnten die in $\Delta hmo1$ beobachteten Aggregate bei Anwesenheit von Wildtypprotein aufgelöst werden und das Konstrukt zeigte wieder eine normale nukleoläre Lokalisation (Abb. 4.30, BoxBmut). Auch im Falle des Δ BoxB Konstruktes waren Veränderungen erkennbar. Während dieses in $\Delta hmo1$ zwar nukleolär, jedoch homogen und breit verteilt lokalisierte, so war es bei Anwesenheit von *HMO1* räumlich deutlich schärfer begrenzt (Abb. 4.30, Δ BoxB). Für beide Konstrukte jedoch, welche nicht über die BoxA verfügten, konnte kein Effekt des Wildtypproteins auf die Lokalisation beobachtet werden (Abb. 4.30, Δ BoxA und Δ BoxA, BoxBmut). Diese mussten im heterozygot diploiden Stamm betrachtet werden, da hierbei die Integration ursprünglich in *pHMO1* des $\Delta hmo1$ Stammes erfolgte und die Konstrukte daher mit der Deletion gekoppelt waren. *HMO1* mag zwar einen Einfluss auf die Expression der Konstrukte haben, allerdings wurden beide Δ BoxA Konstrukte in den $\Delta hmo1$ Ausgangsstämmen auf endogenem Niveau exprimiert und BoxBmut sowie Δ BoxB auf Niveau des *pHMO1* Überexpressionsstammes (Abb. 4.23b, BoxBmut Nr.1; Abb. 4.23c, Δ BoxB Nr.1; Abb. 4.23d Δ BoxA Nr.2; Abb. 4.23d Δ BoxA,BoxBmut Nr.2). Bei den Δ BoxA Konstrukten kann also keine erhöhte Menge ursächlich für die nicht erkennbare Rekrutierung durch Wildtypprotein in den Nukleolus sein. Somit ist die HMG-BoxA notwendig für effiziente Rekrutierung durch Wildtypprotein, nicht jedoch die HMG-BoxB. Die HMG-BoxA sollte folglich einen höheren Stellenwert für die Selbstinteraktion von Hmo1 einnehmen als die HMG-BoxB. Ob die beobachtete Rekrutierung von HMG-BoxA enthaltenden Konstrukten durch Dimerisierung oder Oligomerisierung stattfand, ist an dieser Stelle unklar.

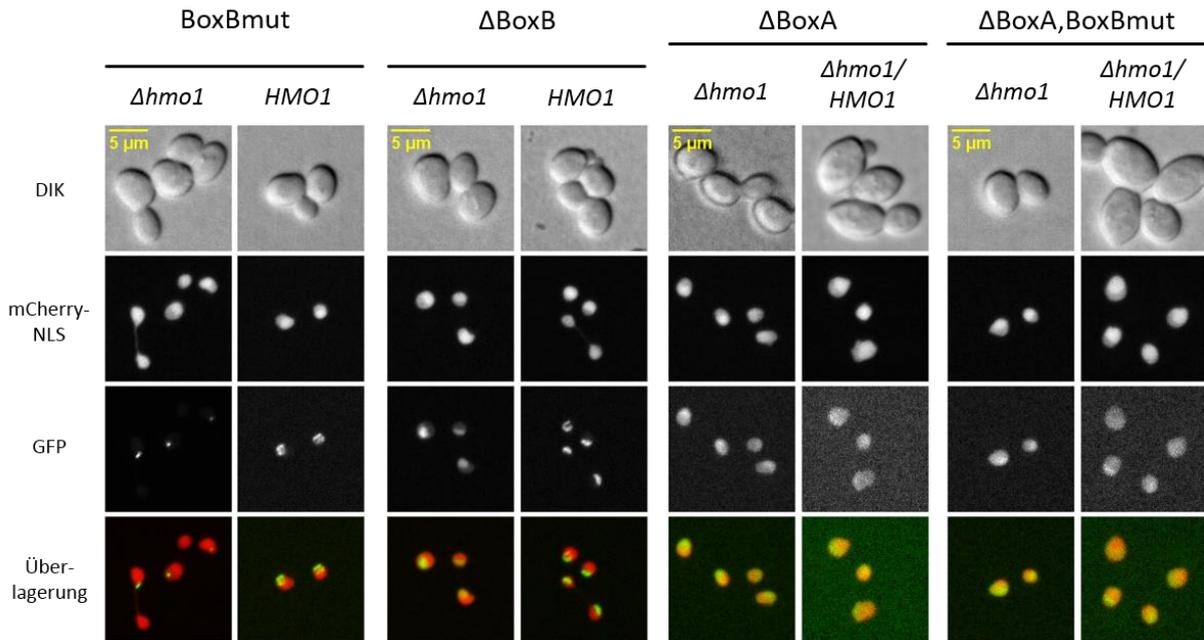


Abbildung 4.30: Die HMG-BoxA ist für Rekrutierung durch Wildtypprotein von höherer Wichtigkeit als die HMG-BoxB und der C-Terminus

Spinning-disc-Aufnahmen zeigen den Einfluss von Wildtyp-Hmo1 auf die Lokalisation verschiedener Derivate. Für die bereits in $\Delta hmo1$ auf Lokalisation hin untersuchten GFP-Konstrukte wurde jeweils eine Transformante ausgewählt und mit einem HMO1 Stamm verkreuzt. Danach erfolgte entweder die Sporulation oder die Betrachtung wurde direkt im heterozygot diploiden Stamm durchgeführt. In jedem Fall wurden die maximalen Werte projiziert. Im Folgenden die Bezeichnungen der verwendeten Stämme: W13744 (BoxBmut in $\Delta hmo1$), W14040 (BoxBmut in HMO1), W13748 (Δ BoxB in $\Delta hmo1$), W14037 (Δ BoxB in HMO1), W13182 (Δ BoxA in $\Delta hmo1$), W14023 (Δ BoxA in $\Delta hmo1/HMO1$), W13183 (Δ BoxA,BoxBmut in $\Delta hmo1$), W14024 (Δ BoxA,BoxBmut in $\Delta hmo1/HMO1$). Die Expression der Derivate in den $\Delta hmo1$ Ausgangsstämmen für die Kreuzungen ist in Abb. 4.35 dargestellt.

Die HMG-BoxA ist also notwendig für nukleoläre Lokalisation, *in vivo* Oligomerisierung und Rekrutierung durch Wildtypprotein, sowie hohe rRNA-Affinität. Nicht notwendig jedoch ist sie für hohe rDNA-Affinität. Um zu sehen, ob der Beitrag der BoxA zur nukleolären Lokalisation durch Selbstinteraktion oder durch Wechselwirkungen mit rRNA und/oder anderen nukleolären Komponenten zustande kommt, wurden zwei weitere Konstrukte erstellt. Zum einen Hmo1(1-98)-GFP (BoxA) und zum anderen Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-236) (BoxA-NLS). Abermals wurden die Konstrukte stabil in das Genom eines $\Delta hmo1$ Stammes mit Kernmarker integriert und anschließend mit einem HMO1 Stamm verkreuzt und sporuliert. Wiederum wurden für beide Konstrukte mehrere Transformanten überprüft, wobei die Lokalisation abermals dosisunabhängig war.

Eine schematische Darstellung der Konstrukte ist in Abbildung 4.31 zusammen mit den Mikroskopiedaten gezeigt. Die BoxA für sich zeigte cytoplasmatische Lokalisation und bei Anwesenheit von Wildtypprotein konnte sie sehr effizient in den Nukleolus rekrutiert werden. Sie lokalisierte dann recht scharf begrenzt, es war jedoch eine gewisse nukleoplasmatische und auch cytoplasmatische Population vorhanden. Dies stimmt mit Beobachtungen einer anderen Studie überein (Albert et al., 2013a). Die BoxA in Kombination mit der NLS von Hmo1 wies ein Lokalisationsmuster auf, welches dem

des Kernmarkers entsprach. Teils konnte eine leichte Abreicherung beider Proteine in einem kleinen Bereich des Kerns beobachtet werden (Abb. 4.31b, BoxA-NLS + Kernmarker in $\Delta hmo1$, Zelle am unteren Rand). In diesem Bereich geringerer Kernmarkerkonzentration liegt normalerweise der Nukleolus. Eine Kollokalisation von BoxA-NLS und Nop56-3mCherry in $\Delta hmo1$ lies keine Anreicherung des Derivats im Nukleolus erkennen. In Anwesenheit des Wildtypproteins wurde auch dieses Konstrukt effizient in den Nukleolus rekrutiert. Die gezeigten $\Delta hmo1$ Ausgangsstämme mit Kernmarker wiesen für BoxA und BoxA-NLS vor der Kreuzung grob die gleiche Expressionsstärke auf (Abb. 4.31c, d). Somit ist die HMG-BoxA hinreichend für Rekrutierung durch Wildtypprotein. Welche Form der Selbstinteraktion, Dimerisierung oder Oligomerisierung, der beobachteten Rekrutierung von BoxA zugrunde liegt, ist unklar. Da die BoxA also notwendig für nukleoläre Lokalisation und Rekrutierung durch Wildtypprotein ist, jedoch nicht hinreichend für nukleoläre Lokalisation, so sollte die Notwendigkeit der BoxA für nukleoläre Lokalisation von Hmo1 aus ihrer Funktion für Selbstinteraktion resultieren.

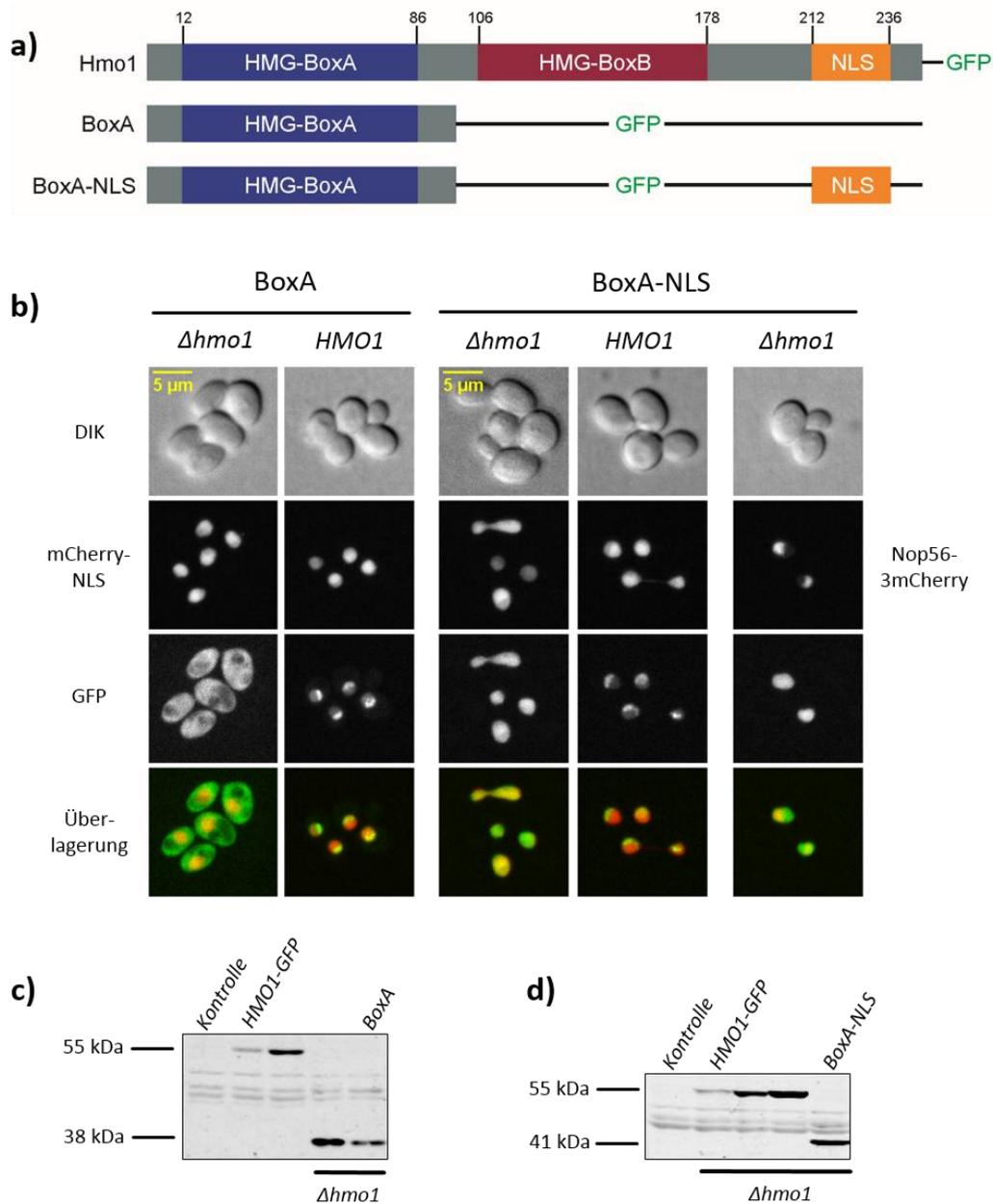


Abbildung 4.31: Die HMG-BoxA ist nicht hinreichend für nukleoläre Lokalisation, jedoch hinreichend für Rekrutierung durch Wildtyp-Hmo1

Für die Mikroskopie wurden die Hmo1-Derivate BoxA (Hmo1(1-98)-GFP) und BoxA-NLS(Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-236)) erzeugt, stabil in das Genom von $\Delta hmo1$ Stämmen integriert und hinsichtlich Expression überprüft.

a) Schematische Darstellung der für die Mikroskopie erzeugten Konstrukte BoxA und BoxA-NLS.

b) Spinning-disc-Mikroskopie zur Lokalisation von BoxA und BoxA-NLS in $\Delta hmo1$ und *HMO1*. Die gezeigten $\Delta hmo1$ Stämme mit Kernmarker wurden hierfür gegen einen *HMO1* Stamm gekreuzt. Als zusätzlicher Komarker wurde bei BoxA-NLS in $\Delta hmo1$ auch endogenes Nop56-3mCherry verwendet. Die Maximalwerte der z-Ebenen wurden in eine Ebene projiziert. Verwendete Stämme: W13742 (*BoxA mCherry-NLS Δhmo1*), W14033 (*BoxA mCherry-NLS HMO1*), W13960 (*BoxA-NLS mCherry-NLS Δhmo1*), W14039 (*BoxA-NLS mCherry-NLS HMO1*), W14199 (*BoxA-NLS NOP56-3mCherry Δhmo1*).

c) und **d)** Western-Blots zeigen die Expression von BoxA und BoxA-NLS für die in b) gezeigten $\Delta hmo1$ Stämme mit Kernmarker (W13742 bzw. W13960). Als Negativkontrolle diente ein Wildtypstamm (BY4742) und als Referenz ein Stamm mit endogenem Hmo1-GFP (W12115). In c) wurde je 1 OD Protein aufgetragen, in d) je 2 OD Protein. Der Nachweis wurde in beiden Fällen mit einem GFP-Antikörper geführt.

Als weiterer Punkt zur Selbstinteraktion sollte der quantitative Aspekt der Rekrutierung eines anormal lokalisierenden Hmo1-Derivats über endogenes Hmo1 etwas präziser behandelt werden. Hierfür wurde das Konstrukt mit mutagenisierter BoxB herangezogen (BoxBmut), welches in $\Delta hmo1$ Aggregate bildet. Um hohe Expressionsmengen zu erreichen und einen Einfluss von *HMO1* auf die Expression des Konstruktes nach Kreuzung zu unterbinden, wurde das Konstrukt hier unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors *pTEF2* gestellt. Wiederum wurde in $\Delta hmo1$ transformiert und anschließend mit einem Wildtypstamm gekreuzt und sporuliert.

Bei Expression von BoxBmut durch *pHMO1* hatte die Anwesenheit von Wildtypprotein nach Kreuzung der Transformanten mit einem *HMO1* Stamm einen deutlichen Signalrückgang zur Folge (Abb. 4.32a, vergleiche Spuren 5 und 6 bzw. 7 und 8). Bei Expression durch *pTEF2* hingegen konnten wesentlich höhere Gesamtproteinmengen bei Anwesenheit von Wildtypprotein erreicht werden. In $\Delta hmo1$ wies das Konstrukt die 59fache Proteinmenge im Vergleich zu endogener Menge auf und nach Kreuzung mit einem Wildtypstamm sowie Sporulation zeigte es im *HMO1* Kontext die 37fache Signalstärke. Allerdings war auch die aufgetragene Proteinmenge für den $\Delta hmo1$ Stamm deutlich höher, wie anhand der Hintergrundbanden und einer Ponceaufärbung ersichtlich war (Abb. 4.32a, vergleiche Spuren 9 und 10). Auch bei Expression von BoxBmut durch *pTEF2* war Aggregatbildung in $\Delta hmo1$ gegeben und nach Kreuzung und Sporulation konnten diese extremen Proteinmengen von BoxBmut zumindest bei manchen Zellen effizient durch die vergleichsweise geringen endogenen Mengen mobilisiert und an die rDNA rekrutiert werden. Bei einigen *HMO1* Zellen waren zusätzlich zum nukleolären Signal von BoxBmut auch noch Restaggregate sichtbar (Abb. 4.32b). Die effiziente Rekrutierung sehr hoher Mengen von BoxBmut durch vergleichsweise geringe endogene Mengen spricht dafür, dass in diesem Fall die Rekrutierung durch Oligomerisierung stattfand.

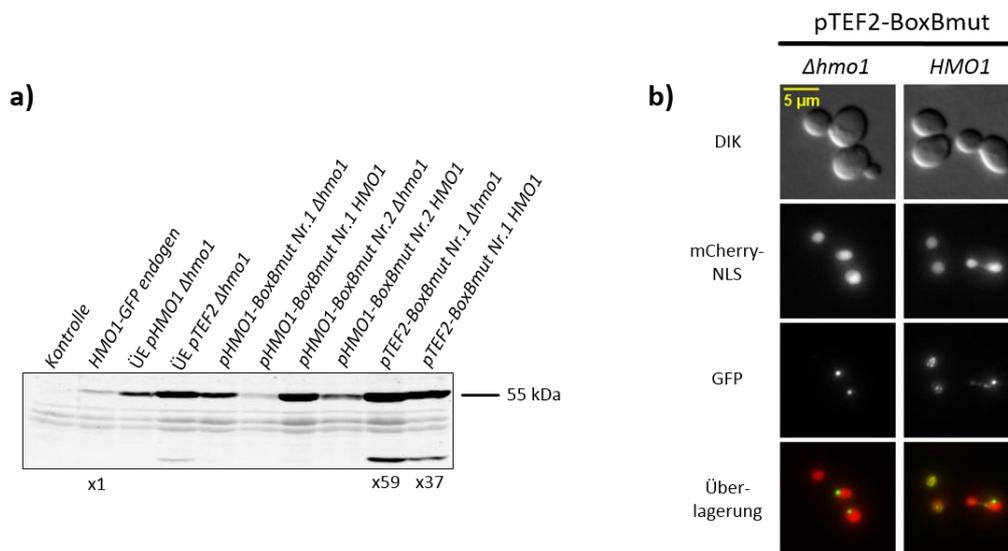


Abbildung 4.32: Sehr hohe Mengen eines anormal lokalisierenden Hmo1-Derivats können durch geringe endogene Mengen in den Nukleolus rekrutiert werden

a) Im Western-Blot zu sehen sind die Expressionsmengen von BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP) verschiedener unabhängiger Transformanten in $\Delta hmo1$ und nach Kreuzung selbiger Transformanten und Sporulation in *HMO1*. BoxBmut stand entweder unter der Kontrolle von *pHMO1* oder *pTEF2*. Die erzeugten Stämme tragen folgende Namen: W13744 (*pHMO1*-BoxBmut Nr.1 $\Delta hmo1$), W14040 (*pHMO1*-BoxBmut Nr.1 *HMO1*), W12082 (*pHMO1*-BoxBmut Nr.2 $\Delta hmo1$), W12081 (*pHMO1*-BoxBmut Nr.2 *HMO1*), W14200 (*pTEF2*-BoxBmut Nr.1 $\Delta hmo1$), W14204 (*pTEF2*-BoxBmut Nr.1 *HMO1*). Als Negativkontrolle diente ein Wildtypstamm (BY4742) und zum Vergleich wurden auch Lysate eines Stammes mit endogen fusioniertem Hmo1-GFP (W12115), sowie von zwei Überexpressionsstämmen aufgetragen, welche normale Lokalisation von Hmo1-GFP zeigten (ÜE *pHMO1*: W13745, ÜE *pTEF2*: W13855). Je Probe wurden 2 OD Protein auf das Gel geladen, die Visualisierung erfolgte mittels GFP-Antikörper. Quantifizierte Banden wurden auf endogenes Hmo1-GFP normalisiert.

b) Nicht konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisation von BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP) in $\Delta hmo1$ und *HMO1*. Es wurden die *pTEF2* Stämme W14200 und W14204 verwendet, da diese in a) die höchsten Expressionsniveaus zeigten. Es erfolgte eine Maximalprojektion der z-Stapel.

Der N-Terminus spielt also durch seine Wichtigkeit für Selbstinteraktion eine essentielle Rolle für die nukleoläre Lokalisation von Hmo1. Da zudem eine starke Aufkonzentrierung von Hmo1-3mCherry in Situationen geringer transkriptioneller Aktivität festgestellt werden konnte, sollte nun auch geklärt werden, ob dieses Verhalten durch rDNA-Bindung oder Oligomerisierung zustande kommt. Daher wurde ein Vergleich von endogenem Hmo1-GFP und des Δ BoxA-Konstruktes in stationären Zellen angestellt.

Die Expression der verwendeten N-terminalen Verkürzung entsprach der von endogenem Hmo1-GFP, weswegen ein Einfluss der Dosis ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.33a). In Stationarität zeigte endogenes Hmo1-GFP genau wie die 3mCherry-Fusion eine starke Anreicherung im Nukleolus. Bei Deletion der BoxA hingegen war in Stationarität eine Kernlokalisierung mit nur geringer nukleolärer Anreicherung gegeben (Abb. 4.33b). Die Fähigkeit von Hmo1, sich in Situationen niedriger transkriptioneller Aktivität im Nukleolus aufkonzentrieren zu können sollte also von seiner Fähigkeit zur Oligomerisierung abhängen.

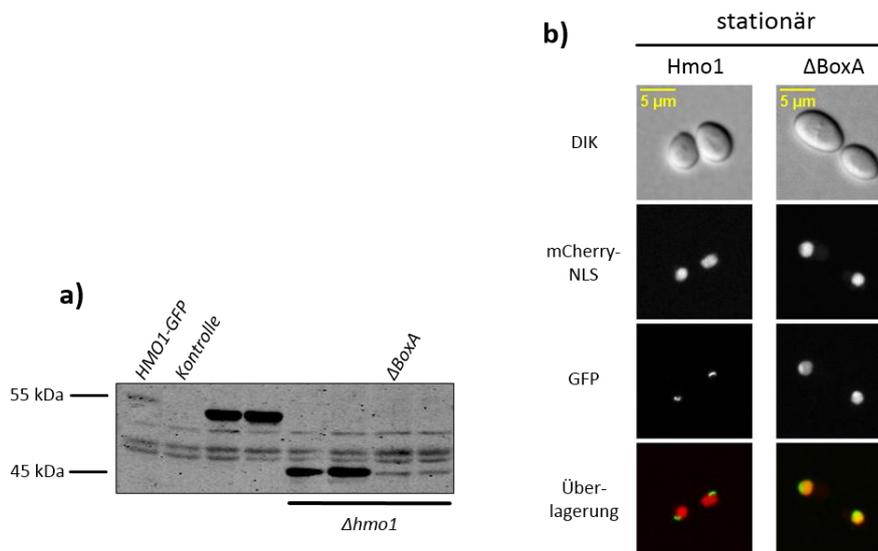


Abbildung 4.33: Starke Anreicherung von Hmo1 im Nucleolus bei niedriger transkriptioneller Aktivität benötigt die HMG-BoxA

Ein Stamm mit endogenem Hmo1-GFP (W12115) und ein $\Delta hmo1$ Stamm mit einer N-terminalen Verkürzung Δ BoxA (GFP-Hmo1(86-246)) von Hmo1 (W13182) wurden mittels Western-Blot und Spinning-disc-Mikroskopie analysiert.

a) Western-Blot-Analyse der beiden Stämme W12115 (*HMO1-GFP*) und W13182 (Δ BoxA). Als Negativkontrolle diente der Wildtypstamm BY4742. Von jeder Probe wurde 1 OD Protein aufgetragen und für die Immundetektion wurde ein GFP-Antikörper verwendet.

b) Vollmediumskulturen beider Stämme wurden mehrere Tage bei 25°C gerollt und mit dem Spinning-disc-System mikroskopiert. Es wurden die Maximalwerte der z-Ebenen projiziert.

4.8.4 Bedeutung des C-Terminus für die Lokalisation von Hmo1

Dass eine NLS im C-Terminus von Hmo1 anzutreffen sein sollte, wurde bereits durch Mikroskopie einer C-terminalen Verkürzung von der Arbeitsgruppe um Olivier Gadal gezeigt (Albert et al., 2013a). Zudem trifft das Programm cNLS Mapper die Vorhersage einer zweiteiligen, α -Importin-abhängigen Kernlokalisationssequenz von Aminosäure 212 bis einschließlich 236 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit. Es sollte daher überprüft werden, ob die Region 212-236 hinreichend für Kernimport ist. Abbildung 4.34a zeigt die schematische Darstellung der Konstrukte. Diese wurden abermals stabil in das Genom eines $\Delta hmo1$ Stammes integriert und hinsichtlich der Expressionsniveaus getestet.

Für die C-terminale Verkürzung Hmo1(1-210)-GFP (Δ NLS) und das Fragment GFP-Hmo1(212-236) (NLS) wurde jeweils eine Transformante für die hier gezeigte Mikroskopie gewählt, welche eine dem *pHMO1* Überexpressionsstamm entsprechende Menge aufwies (Abb. 4.34b, Spur 4; Abb. 4.34c, Spur 14). Mikroskopaufnahmen der ausgewählten Stämme sind in Abb. 4.34d gezeigt. Wie zu erwarten war bei Δ NLS das Fluoreszenzprotein über die gesamte Zelle verteilt und zudem war keine nukleoläre Anreicherung erkennbar. Dieses Konstrukt komplementierte allerdings den Wachstumsdefekt von $\Delta hmo1$, was auch bereits aus der Literatur bekannt war (Lu et al., 1996). Des Weiteren war die

vorhergesagte NLS, also der Aminosäureabschnitt 212-236 in der Tat hinreichend für Kernlokalisierung (Abb. 4.34d, NLS).

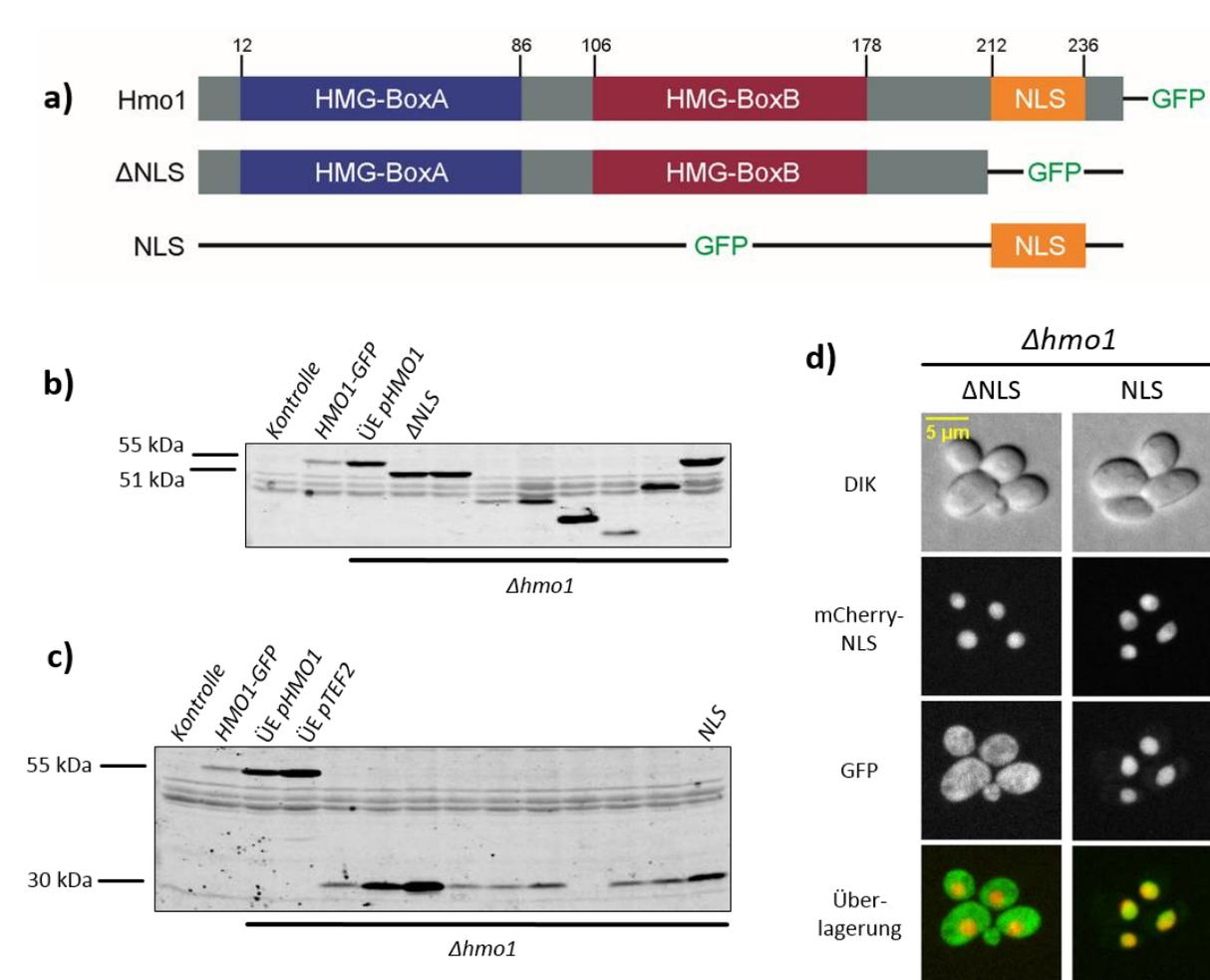


Abbildung 4.34: Der C-Terminus von Hmo1 beinhaltet eine NLS

Für die Mikroskopie wurden die Hmo1-Derivate Δ NLS (Hmo1(1-210)-GFP) und NLS (GFP-Hmo1(212-236)) erzeugt, stabil in das Genom eines Δ hmo1 Stammes integriert und auf Expression getestet.

a) Schematische Darstellung der Hmo1-Derivate Δ NLS und NLS.

b) und **c)** Expression der für die Mikroskopie ausgewählten Transformanten von Δ NLS (W12701) bzw. NLS (W13952). Neben der Negativkontrolle (BY4742) wurden auch Proben mit endogenem Hmo1-GFP (W12115) und überexprimiertem Hmo1-GFP (Δ UE pHMO1: W13745, Δ UE pTEF2: W13855) aufgetragen. In **b)** wurde 1 OD Protein verwendet, in **c)** 2 OD Protein. Auf beide Western-Blots wurde ein GFP-Antikörper angewandt.

d) Spinning-disc-Mikroskopie der in **b)** und **c)** hinsichtlich Expression untersuchten Transformanten für Δ NLS (W12701) und NLS (W13952). Die Maximalwerte wurden projiziert.

Das zuvor untersuchte Δ BoxB Konstrukt zeigte das Lokalisationsmuster eines rRNA Prozessierungsfaktors und im Gegensatz zu Hmo1 deutlich höhere Affinität zu rRNA als zu rDNA. Die BoxA scheint zudem eine RNA-Bindedomäne zu sein, allerdings war bei dem ebenfalls zuvor untersuchten BoxA-NLS-Konstrukt keinerlei nukleoläre Anreicherung erkennbar. Daher sollte herausgearbeitet werden, welche Elemente von Hmo1 notwendig für die Erzeugung des im Falle von Δ BoxB beobachteten, Nop56-ähnlichen nukleolären Lokalisationsmusters sind. Die letzten zehn Aminosäuren waren entbehrlich für Kernimport, allerdings sollte die NLS nun im Kontext mit eben

diesen betrachtet werden. Das resultierende Konstrukt war dementsprechend GFP-Hmo1(212-246) (NLS-C). Zudem wurde dieses Konstrukt noch N-terminal um die HMG-BoxA erweitert und ergab somit Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-246) (BoxA-NLS-C). Die Konstrukte wurden wiederum in einen *Δhmo1* Stamm mit Kernmarker transformiert und für eine bessere Übersicht wurde auch das bereits behandelte BoxA-NLS-Konstrukt noch einmal mit einbezogen. In Abbildung 4.35a sind die Derivate dargestellt.

BoxA-NLS zeigte eine Expression vergleichbar mit der des *pHMO1* Überexpressionsstammes (Abb. 4.35b) und identische Lokalisation mit mCherry-NLS (Abb. 4.35e). NLS-C wurde auf endogenem Niveau exprimiert (Abb. 4.35c) und war in der Mikroskopie über den gesamten Kern verteilt, zeigte jedoch eine leichte Anreicherung in eben den Kernregionen, in welchen mCherry-NLS abgereichert war (Abb. 4.35e). Eine Kombination aus beiden Konstrukten, nämlich BoxA-NLS-C, zeigte wiederum Proteinmengen des *pHMO1* Überexpressionsstammes (Abb. 4.35d) und eine nukleoläre Lokalisation, welche der von Nop56 entsprach (Abb. 4.35e). BoxA-NLS zeigte also keinerlei nukleoläre Anreicherung und NLS-C eine nur geringfügige nukleoläre Anreicherung bei ansonsten nukleoplasmatischem Signal. Jedoch bei einer Kombination aus BoxA, NLS und den letzten 10 Aminosäuren trat das resultierende Protein BoxA-NLS-C dann effizient in den Nukleolus ein. Dies bedeutet, dass N- und C-Terminus von Hmo1 synergistisch in Bezug auf nukleoläre Lokalisation wirken. Eine interessante, an dieser Stelle auftretende neue Frage wäre wohl, ob N- und C-Terminus von Hmo1 evtl. auch synergistisch in Bezug auf rRNA-Bindung wirken und ob die beobachteten Effekte bezüglich der Lokalisation nicht nur in cis, sondern auch in trans auftreten.

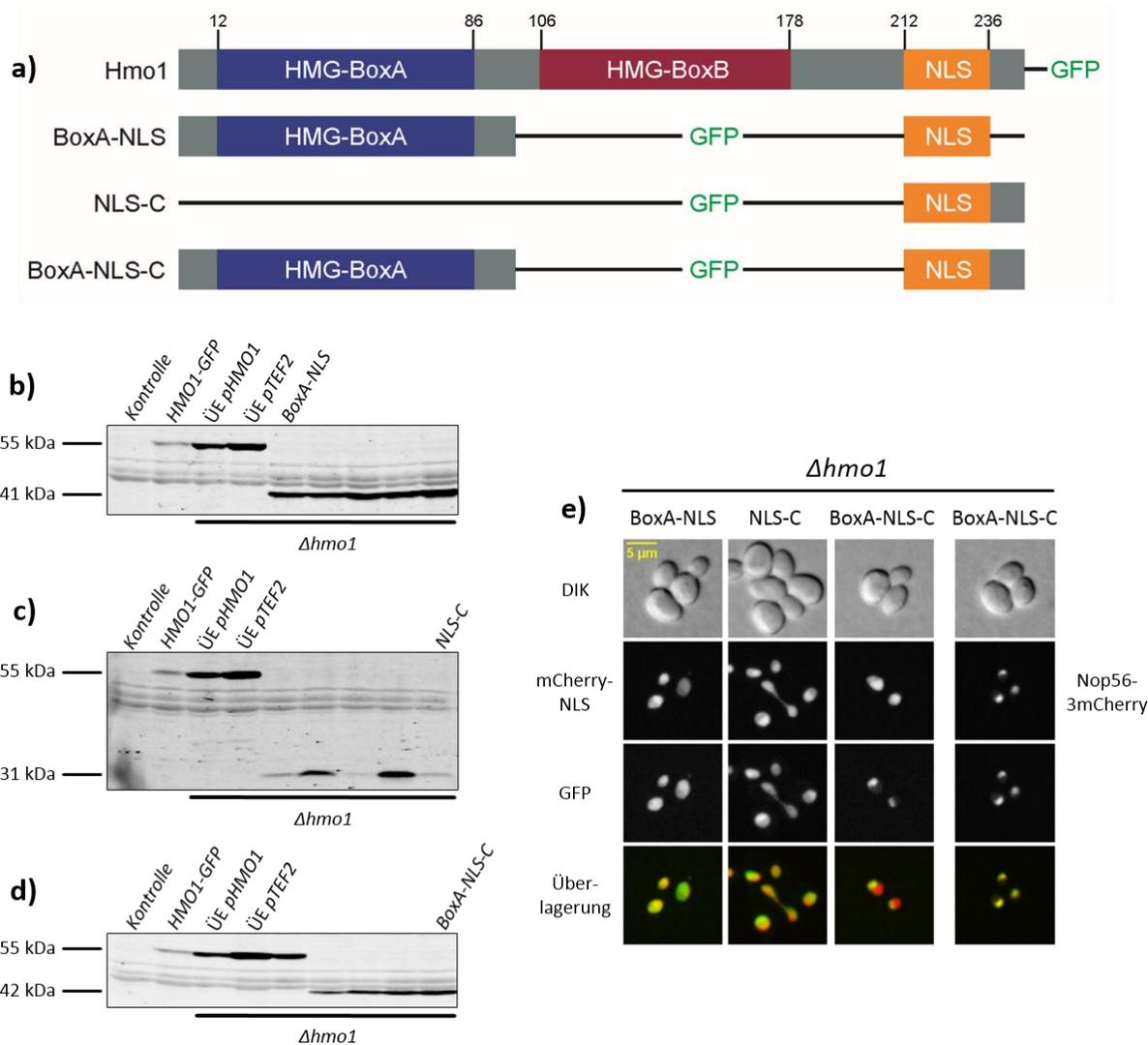


Abbildung 4.35: N- und C-Terminus von Hmo1 agieren synergistisch bezüglich nukleolärer Lokalisation

Die Konstrukte BoxA-NLS (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-236)), NLS-C (GFP-Hmo1(212-246)) und BoxA-NLS-C (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-246)) wurden stabil in das Genom von $\Delta hmo1$ Stämmen integriert, auf Expression überprüft und mikroskopiert.

a) Schematische Darstellung der Konstrukte BoxA-NLS, NLS-C und BoxA-NLS-C.

b), c) und **d)** Western-Blots zur Überprüfung der Expressionsniveaus von BoxA-NLS in $\Delta hmo1$ mit Kernmarker (W13960), NLS-C in $\Delta hmo1$ mit Kernmarker (W13949) und BoxA-NLS-C in $\Delta hmo1$ mit Kernmarker (W14189). Je Probe wurden 2 OD Protein aufgetragen, der Nachweis wurde mit einem GFP-Antikörper durchgeführt. Kontrolle: Wildtypstamm (BY4742), HMO1-GFP: endogenes Hmo1-GFP (W12115), ÜE *pHMO1*: Überexpression Hmo1-GFP (W13745), ÜE *pTEF2*: Überexpression Hmo1-GFP (W13855).

e) Mikroskopie der in b), c) und d) auf Expression überprüften Transformanten mit Kernmarker und zusätzlich von BoxA-NLS-C mit Nop56-3mCherry als nukleolärem Komarker (W14198). Es handelte sich um Spinning-disc-Aufnahmen, die Maximalwerte wurden projiziert.

Da die letzten 10 Aminosäuren zumindest im Kontext eines minimalen, zu nukleolärer Lokalisation fähigen Konstruktes BoxA-NLS-C einen entscheidenden Beitrag leisteten, sollte abschließend getestet werden, ob sie auch für die Lokalisation des Wildtypproteins wichtig sind. Somit wurde eine endogene Verkürzung Hmo1(1-236)-GFP (Δ C) erstellt und in der Mikroskopie betrachtet.

Die Deletion nur der letzten 10 Aminosäuren hatte keine erkennbare Veränderung der Lokalisation von Hmo1 zur Folge (Abb. 4.36). Es war ein inhomogenes und räumlich sehr begrenztes nukleoläres Signal wie auch im Falle des Wildtypproteins gegeben. Bei Betrachtung von Zellen, welche ihre Nukleoli im Zuge der Mitose geteilt hatten, schien auch bei diesem Konstrukt der Tochternukleolus den höheren Proteinanteil erhalten zu haben. Da es sich hierbei allerdings nicht um konfokale Aufnahmen handelte, wurde keine Quantifizierung durchgeführt.

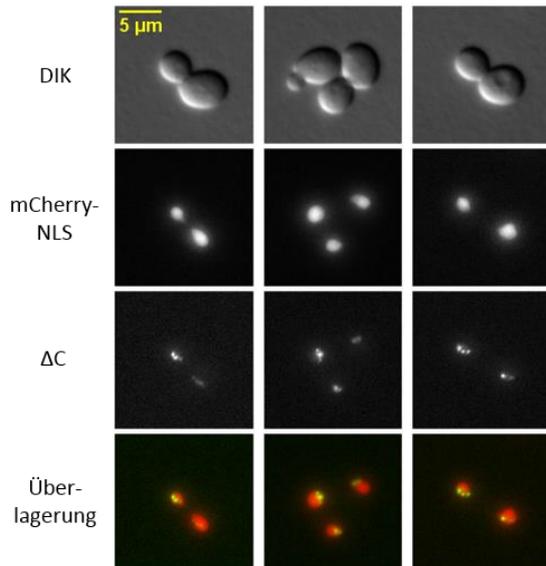


Abbildung 4.36: Ein C-terminales Fragment ist nicht notwendig für normale Lokalisation von Hmo1

Eine endogene Verkürzung ΔC von Hmo1 um zehn Aminosäuren wurde erzeugt (Hmo1(1-236)-GFP) und mit nicht konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wobei mCherry-NLS als Komarker Verwendung fand. Eine Maximalprojektion der z-Stapel wurde durchgeführt. Stammbezeichnung: W14201.

5. Diskussion

Eine grundlegende Sichtweise des Nukleolus, welche sich über vergangene Jahre hin etabliert hat, wäre diejenige, dass es sich um ein dynamisches Kompartiment handelt, dessen Mehrzahl verschiedenster Proteinkomponenten deutlich messbaren Austausch zwischen dem Nukleolus selbst und dem umgebenden Nukleoplasma zeigen (Leung und Lamond, 2003). Dies wurde im Falle von höheren Eukaryoten für diverse Untereinheiten der RNA Polymerase I und auch für andere direkt an rDNA bindende Proteine mittels FRAP-Analysen gezeigt (Dundr et al., 2002).

Die kontinuierlich verfolgte und letztendlich stark bekräftigte Hypothese vorliegender Arbeit war, dass die mitotische Segregation nukleolärer Proteine in der Bäckerhefe durch deren Assoziation mit rDNA bestimmt wird und eben nicht durch relativ freie Diffusion und damit durch die Segregation der nukleoplasmatischen Umgebung. Genauer konnte gezeigt werden, dass die spezielle Geometrie und Mechanik der Chromosomentrennung an sich entscheidenden Einfluss auf die Segregation nukleolärer Proteine hat. Das besondere, den meisten anderen nukleolären Proteinen gegenläufiges Segregationsverhalten des rDNA-Bindeproteins Hmo1 könnte durch eine Kombination seiner besonderen intrinsischen Eigenschaften mit einem durch RNA Polymerase I Aktivität verursachten Verdrängungsmechanismus zustande kommen. Im Folgenden wird dies detailliert dargelegt.

5.1 Allgemeine Mechanismen nukleolärer Proteinsegregation

5.1.1 Die Assoziation mit rDNA ist entscheidend für das Segregationsverhalten nukleolärer Proteine

Die grundlegende Beobachtung vorliegender Arbeit war, dass verschiedene nukleoläre Proteine unterschiedliches Verteilungsverhalten bei mitotischer Zellteilung vorweisen. Der Mutternukleolus erhält immer einen deutlich größeren Anteil der RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135, der rRNA Prozessierungsfaktoren Nop56 und Nsr1, sowie der RENT Komponente Net1. Das rDNA-Bindeprotein Fob1 wird des Weiteren sehr gleichmäßig auf Mutter- und Tochnukleolus verteilt und das ebenfalls direkt an rDNA bindende Protein Hmo1 zeigte ein zu Nukleoplasma und den meisten übrigen nukleolären Proteinen genau gegenläufiges Verhalten, da der Tochnukleolus hier die höhere Proteinmenge erhält (Abb. 4.8). Generell kämen verschiedene Mechanismen als Ursache für diese Asymmetrie in Frage. Erstens könnte der Knospenhals als Barriere einen entscheidenden Einfluss nehmen. Zweitens könnte eine hohe Dynamik eines nukleolären Proteins innerhalb des Kerns dazu führen, dass seine Segregation durch das umgebende Nukleoplasma bestimmt wird, was z.B. für Rpa135 zutreffen könnte. Drittens könnte die Art der Wechselwirkung mit rDNA der entscheidende Faktor für die mitotische Segregation eines nukleolären Proteins darstellen.

Der Knospenhals kann als Ursache für asymmetrische Segregation nukleolärer Proteine ausgeschlossen werden, da in den Mutanten *cdc14-3* und $\Delta cin8$ eine sehr gleichmäßige Verteilung von sowohl Rpa135 als auch Hmo1 stattfand, obwohl die Segregation durch den Knospenhals hindurch ablief (Abb. 4.11-12).

Auch die Verteilung der nukleoplasmatischen Umgebung ist nicht ausschlaggebend für die Segregation nukleolärer Proteine. Obwohl Rpa135 ein zu mCherry-NLS sehr ähnliches Verteilungsverhalten aufwies (Abb. 4.1; Abb. 4.8), waren ihre Dynamiken innerhalb des Zellkerns deutlich unterschiedlich. Während mCherry-NLS eine sehr hohe Diffusionsrate aufwies, wurde Rpa135 hingegen sehr effizient innerhalb einer nukleolären Struktur gehalten und zeigte über mehrere Minuten hinweg nur geringen Austausch zwischen zwei nukleolären Strukturen in der Anaphase (Abb. 4.9). Zudem konnte auch bei einem Vergleich der Verteilungsverhältnisse von mCherry-NLS und Rpa135 in einem *Δrpa12* Stamm ein gegenläufiger Effekt auf die Verteilung beider Proteine beobachtet werden. Die mitotische Segregation der RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135 kann also nicht primär durch das Verteilungsverhalten der nukleoplasmatischen Umgebung bestimmt sein. Dies trifft auch für Nop56 und Nsr1 zu, da diese Proteine in *Δrpa12* ebenso unterschiedliche Effekte verglichen mit mCherry-NLS zeigten (Abb. 4.14-15). Obwohl also verschiedene nukleoläre Proteine gleiches Verteilungsverhalten wie Nukleoplasma aufweisen, ist ihre Segregation dennoch nicht durch Nukleoplasma bestimmt.

Nach diesen Ergebnissen sollte definitiv die Art der Wechselwirkung mit rDNA entscheidend für das Segregationsverhalten nukleolärer Proteine sein. Rpa135 sollte dynamisch mit rDNA assoziiert sein und nur derjenige nukleoläre Anteil von Rpa135, welcher zu einem bestimmten Zeitpunkt Teil eines aktiv transkribierenden Komplexes ist, sollte transient stabil an rDNA binden. Eine intranukleoläre Dynamik von Rpa135 konnte experimentell nachgewiesen werden. Bei kontinuierlichem Bleichen eines kleinen Bereichs einer elongierten Anaphasestruktur über einen recht kurzen Zeitraum während der Segregation erlosch letztendlich das Signal von Rpa135 in der gesamten Struktur. Dies muss zumindest teilweise auf intranukleoläre Dynamik des Proteins zurückzuführen sein, da effiziente Retention von Rpa135 innerhalb einer nukleolären Struktur gegeben war (Abb. 4.9). Des Weiteren sollten die Prozessierungsfaktoren Nop56 und Nsr1 dynamisch mit rRNA assoziiert sein, da nach Durchführung der entsprechenden Prozessierungsschritte neues, unprozessiertes Substrat gebunden werden muss. Durch kotranskriptionelle Prozessierung wären diese Faktoren auch indirekt über rRNA und die transkriptionelle Maschinerie mit rDNA transient assoziiert. Eine dynamische/indirekte Assoziation mit rDNA bei dennoch effizienter nukleolärer Retention sollte also das für Rpa135, Nop56 und Nsr1 beobachtete Verteilungsverhalten verursachen. Des Weiteren zeigte das direkt in der *NTS1* Region der rDNA bindende Protein Fob1 eine sehr gleichmäßige Verteilung, wie dies auch für stabil an jegliche chromosomale DNA bindendes Kernhiston beobachtet werden konnte (Abb. 4.1; Abb. 4.6; Abb. 4.8) und wie dies natürlich auch für die rDNA selbst zutrifft. Bindet ein nukleoläres Protein stabil

an rDNA, so muss es natürlich genau wie rDNA selbst über die mitotische Spindel symmetrisch auf Mutter und Tochter verteilt werden. Das den meisten untersuchten Proteinen genau gegenläufige Verhalten von Hmo1 kann natürlich mit Stabilität von DNA-Bindung alleine nicht erklärt werden und soll später als eigenständiger Punkt behandelt werden.

Dass die Proteine Rpa135 und Hmo1 effizient innerhalb des Nukleolus gehalten wurden, jedoch eine gewisse intranukleoläre Dynamik aufwiesen (Abb. 4.9-10) und auch die Verteilung der Prozessierungsfaktoren Nop56 und Nsr1 in *Δrpa12* nicht mit mCherry-NLS korrelierte (Abb. 4.14-15), lässt Schlüsse zur nukleolären Organisation im Allgemeinen zu. Es wäre also möglich, dass zumindest manche nukleolären Proteine durch multiple Wechselwirkungen mit vielen anderen nukleolären Komponenten generell ein nukleolusplasmatisches Netzwerk von hoher Kohärenz und interner Dynamik bilden. Zudem interessant ist die Tatsache, dass nukleoläre Proteine sehr häufig auch Selbstinteraktion aufweisen, was einen hohen Zusammenhalt des Nukleolusplasmas entscheidend fördern könnte. Selbstinteraktion tritt z.B. im Falle von RNA Polymerase I, Fob1, sowie Hmo1 auf (Milkereit und Tschochner, 1998; Mohanty und Bastia, 2004; Xiao et al., 2010). Für Rpa135 scheint in wachsenden Zellen die Rekrutierung des Holoenzym durch Rrn3 und damit Initiation der Transkription grundlegend für seine nukleoläre Lokalisation zu sein, da in der thermosensitiven Mutante *rrn3(S213P)* bei restriktiven Bedingungen eine starke Delokalisation von Rpa135 vorlag (Abb. 4.18). Dimerisierung inaktiver RNA Polymerase I Komplexe und Wechselwirkungen mit anderen nukleolären Proteinen, wie z.B. Net1 könnten allerdings durchaus zur nukleolären Retention inaktiver RNA Polymerase I Untereinheiten/Komplexe beitragen.

5.1.2 Die transkriptionsabhängige Organisation des Nukleolus beeinflusst die mitotische Verteilung nukleolärer Proteine

Die RNA Polymerase I hat starken Einfluss auf die Chromatinzusammensetzung der rDNA, sowie die gesamte nukleoläre Organisation und könnte auch durch Cdc14 zellzyklusabhängig reguliert sein (Wittner et al., 2011; Wang et al., 2006; Oakes et al., 2006; Taddei und Gasser, 2012; Grob et al., 2014; Clemente-Blanco et al., 2009). Daher wurde eine konstitutive Mutante, nämlich *Δrpa12*, näher hinsichtlich Proteinsegregation überprüft. Die starke Abschwächung des nukleolären Signals von Rpa135 in dieser Mutante sollte eine stark verringerte transkriptionelle Aktivität widerspiegeln. In der Literatur wird von Wechselwirkungen zwischen den Schwesterchromatiden der rDNA gesprochen, welche durch transkriptionelle Aktivität der RNA Polymerase I etabliert werden (Machín et al., 2006; Tomson et al., 2006) und in Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte bei vorliegender Arbeit auch eine etwas schnellere Segregation der rDNA im Falle der *Δrpa12* Mutante beobachtet werden (Abb. 4.14). Abruptere rDNA-Trennung konnte auch bei den Mutanten *cdc14-3* und *Δcin8* beobachtet werden, allerdings waren in *Δrpa12* die Effekte auf nukleoläre Proteinsegregation im Vergleich zu den

beiden anderen Mutanten unterschiedlich. In *Δrpa12* wurden die nukleolären Proteine Rp135, Nop56, Nsr1 und Hmo1 nicht generell gleichmäßiger auf Mutter und Tochter verteilt, sondern der in die Tochter gelangende Anteil war in jedem Fall reduziert (Abb. 4.14). Nur im Falle von Hmo1 bedeutete dies hier auch eine gleichmäßigere Verteilung. In *cdc14-3* und *Δcin8* wurden hingegen sowohl Rpa135 als auch Hmo1 gleichmäßiger verteilt (Abb. 4.11-12). Bei diesem verstärkten Zurückbleiben nukleolärer Proteine in *Δrpa12* handelte es sich darüber hinaus nicht um einen globalen Effekt, da dieser für mCherry-NLS und auch Kernhiston nicht eintrat (Abb. 4.15). Also sollte dieser nukleolusspezifische Effekt wohl durch die organisatorische Funktion von RNA Polymerase I für den Nukleolus und nicht durch allgemein verringerte Proteinbiosynthese verursacht sein. Zudem war der Effekt auf nukleoläre Segregation nicht spezifisch für die *Δrpa12* Mutante, sondern trat auch in einer weiteren Polymerase I Mutante auf, nämlich *rrn3(S213P)* (Abb. 9.5). Dies spricht ebenso dafür, dass die transkriptionsabhängige organisatorische Funktion von RNA Polymerase I allgemeinen Einfluss auf nukleoläre Proteinsegregation nimmt. Hohe Aktivität von RNA Polymerase I hat also vermutlich eine stabilere Assoziation bestimmter Faktoren mit rDNA während der Anaphase zur Folge und fördert somit den Transport in die Tochterzelle. Im Falle der untersuchten frühen Prozessierungsfaktoren könnte die indirekte Assoziation mit rDNA durch kotranskriptionelle Prozessierung für die Segregation wichtig sein, welche bei geringer transkriptioneller Aktivität ebenso verringert wäre. Die neben Segregation generell veränderte Lokalisation von Nop56 in *Δrpa12* und *rrn3(S213P)* spricht für eine solche Annahme (Abb. 4.14; Abb. 9.5).

Ob transkriptionelle Aktivität durch RNA Polymerase I in der Anaphase der Bäckerhefe stattfindet, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Da in RNA Polymerase I Mutanten nukleolusspezifische Effekte auf Proteinsegregation und generell veränderte Lokalisation von Nop56 beobachtet werden konnten (Abb. 4.14-15; Abb. 9.5), kann angenommen werden, dass Transkription in der Anaphase generell stattfindet. In Wildtypzellen zeigte Nop56 während der Anaphase keine Foci außerhalb des Nukleolus, was bei Inhibition von RNA Polymerase I während der Segregation erwartet werden müsste (Abb. 4.3; Abb. 4.14). Auch weitere Argumente sprechen für aktive Transkription während der Anaphase. Erstens ist auch während der Anaphase die nukleoläre Lokalisation von Rpa135 stark von Rekrutierung durch Rrn3 und damit Transkriptionsinitiation abhängig (Abb. 4.18). Zweitens sollte laut Literatur mit einer Cdc14-abhängigen Inhibition der RNA Polymerase I in der Anaphase die Delokalisation der Untereinheit Rpa43 einhergehen (Clemente-Blanco et al., 2009), jedoch konnte bei vorliegender Arbeit vorangegangener Diplomarbeit keine Delokalisation von endogenem Rpa43-GFP während der Anaphase in lebenden Zellen beobachtet werden (Girke, 2011).

Lokalisationsdaten von RNA Polymerase I Untereinheiten können natürlich vielfältig interpretiert werden und sind alleine sicher nicht ausreichend, um absolut klare Aussagen zur transkriptionellen Aktivität einer nukleolären Struktur treffen zu können. Aus diesem Grund wurde versucht, eine *in vivo*

Sonde für transkriptionelle Aktivität zu erzeugen (Abb. 9.6). Es wurde hierfür ein Stamm von PD Dr. Joachim Griesenbeck verwendet, welcher in transkribierten, allerdings nicht-kodierenden Bereichen der 35S rDNA multiple Insertionen eines Bindemotivs für das RNA bindende Hüllprotein MSCP (MS2 Coat Protein) des Phagen MS2 trug. Die Insertionen wurden in der *ITS1* Region (Internal Transcribed Spacers 1) eingeführt, welche bei relativ frühen Spalttereignissen der rRNA entfernt und degradiert wird (Fromont-Racine et al., 2003). Bei Expression der modifizierten rRNA kann diese somit von MSCP spezifisch gebunden werden (Keryer-Bibens et al., 2008). Als Sonde wurde das Gen des entsprechenden Bindeproteins MSCP mit GFP und einer Kernlokalisationssequenz fusioniert und im Reporterstamm exprimiert. In der Theorie sollte die Sonde spezifisch modifizierte *ITS1* Regionen unprozessierter rRNA binden und die Konzentration dieser Sonde im Nukleolus sollte ein Maß für die Fließgleichgewichtsmenge an unprozessiertem Primärtranskript und damit ein Maß für transkriptionelle Aktivität einer nukleolären Struktur sein. Bei völliger transkriptioneller Inaktivität sollte sie entsprechend homogen über den Zellkern verteilt sein. Tatsächlich zeigte die Sonde ein Signal vergleichbar mit dem einer RNA Polymerase I Untereinheit oder eines frühen Prozessierungsfaktors und auch während der Anaphase blieb dieses Signal nukleolär und zeigte ein Segregationsverhalten, welches ebenfalls dem einer RNA Polymerase I Untereinheit oder eines frühen Prozessierungsfaktors glich, wobei also der Großteil des Signals in der Mutter verblieb. Zudem waren auch freie nukleo- und cytoplasmatische Populationen der Sonde gegeben, was für einen vollständigen Transkriptnachweis in Mutter und Tochter spricht. Als jedoch ein Kontrollstamm ohne entsprechende Insertionen innerhalb der rDNA durch Kreuzung und Sporulation des Reporterstammes erzeugt wurde, um gleiche Expression der Sonde zu gewährleisten, konnte auch in diesem eine gewisse nukleoläre Anreicherung der Sonde durch unspezifische Wechselwirkungen beobachtet werden. Des Weiteren trugen nicht alle rDNA-Wiederholungseinheiten des Reporterstammes die Insertionen und es konnte also nur die transkriptionelle Aktivität einer gewissen Subpopulation von Wiederholungseinheiten erfasst werden, was den Vergleich von mütterlichen und töchterlichen Strukturen erschwerte. Obwohl die Sonde nicht nur ausschließlich spezifisch band, sollte ihre nukleoläre Konzentration vermutlich trotzdem hauptsächlich die Fließgleichgewichtsmengen neu entstandener, unprozessierter rRNA und damit transkriptionelle Aktivität widerspiegeln. Da die Sonde auch während der Anaphase nukleoläre Lokalisation aufwies kann auch mit diesem Experiment die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Transkription durch RNA Polymerase I während der Anaphase generell stattfindet. Ein zumindest moderater Rückgang transkriptioneller Aktivität während der Anaphase kann allerdings keineswegs ausgeschlossen werden. Möglich wäre, dass RNA Polymerase I Aktivität unter einen bestimmten Schwellenwert sinken und daher in der Anaphase nur geringfügig inhibiert werden muss, damit rDNA-Trennung ungestört ablaufen kann. Zusammenfassend stellte sich also heraus, dass Transkription durch RNA Polymerase I in der Anaphase stattfindet und dass die Polymerase über ihre

organisatorische Funktion für den Nukleolus die mitotische Segregation nukleolärer Proteine beeinflusst.

5.1.3 Geometrie und Mechanik der Chromosomentrennung sind ausschlaggebend für die Segregation nukleolärer Proteine

Genaueren Aufschluss zu den Mechanismen nukleolärer Proteinsegregation lieferten die Mutanten *cdc14-3* und *Δcin8*. Bei diesen zeigten manche Zellen eine im Vergleich zur Kernelongation massiv verzögerte rDNA-Trennung und stark veränderte Trennungsmechanik. rDNA-Trennung lief dann sehr abrupt und wesentlich symmetrischer ab, ohne die im Wildtyp beobachteten tochter-spezifischen Streckungsereignisse, und zudem fand unter diesen Umständen eine sehr gleichmäßige Verteilung von Rpa135 und auch Hmo1 statt (Abb. 4.11-13). Daher wird vermutet, dass die spezielle Geometrie und der genaue mechanische Ablauf der rDNA-Trennung in *S.cerevisiae* entscheidend für die Segregation nukleolärer Proteine sein sollten.

Bei Beginn der rDNA-Trennung ist der Nukleolus innerhalb der Mutterzelle positioniert. Mit Beginn der Anaphase erfolgt die schrittweise Auflösung der Kohäsion von den Centromeren hin zu den Telomeren und die gleichzeitige Elongation der mitotischen Spindel bei noch verbleibender Restkohäsion. Ein Schwesterchromatid wird also unter restkohäsionsabhängigen Streckungs- und kondensinabhängigen Kompaktierungsereignissen aus dem in der Mutter positionierten Nukleolus und dessen Nukleolusplasma durch den Knospenhals in die Knospe gezogen (Renshaw et al., 2010; Abb. 4.2-7). Die beobachteten Signallücken bei Elongation der schwächeren nukleolären Signale sollten Streckungsereignisse widerspiegeln (Abb. 4.2; Abb. 4.5; Abb. 4.6). Cdc14 sollte über verschiedene Mechanismen die Mechanik der rDNA-Trennung entscheidend beeinflussen. Es ist nötig für eine hohe Elongationsrate der mitotischen Spindel, was im Zusammenspiel mit Restkohäsion Streckungsereignisse verursacht (Khmelninskii et al., 2007). Zudem ist sie nötig für kondensinabhängige rDNA-Segregation und sollte auch einen entscheidenden Einfluss auf Kompaktierungsereignisse nehmen (D'Amours et al., 2004; Sullivan et al., 2004; Torres-Rosell et al., 2004). In *cdc14-3* lief rDNA-Trennung teils stark verzögert, dann jedoch abrupt und symmetrisch ab, was auch eine gleichmäßige Segregation von Rpa135 und Hmo1 zur Folge hatte (Abb. 4.11). Eine naheliegende Interpretation dieser Beobachtung wäre, dass das zeitliche Arrangement verschiedener Ereignisse wie Kohäsionspaltung, Spindelelongation und rDNA-Kompaktierung durch Kondensin im Zusammenhang mit der Trennungsgometrie entscheidend für die Etablierung der nukleolären Asymmetrie sein sollte. Niedrige Aktivität von Cdc14 führt zu Defekten der Spindelorganisation und vermutlich daher auch zu stark verzögerter Chromosomentrennung nach Beginn der Anaphase. Bei Einsetzen der Chromosomensegregation könnte Restkohäsion bereits vollständig durch Separase beseitigt sein und es kommt zu einer relativ symmetrischen rDNA-Trennung und damit auch zu einer symmetrischen

Verteilung nukleolärer Proteine. Des Weiteren sollte transkriptionelle Aktivität kohäsionunabhängige Wechselwirkungen zwischen rDNA-Bereichen von Schwesterchromatiden verursachen und Cdc14 könnte RNA Polymerase I während der Anaphase zumindest bis zu einem gewissen Grad inhibieren (Machín et al., 2006; Clemente-Blanco et al., 2009). Dies könnte bedeuten, dass die Trennungsverzögerung in *cdc14-3* durch erhöhte Aktivität von RNA Polymerase I verursacht ist. Auch RNA Polymerase I abhängige Verzögerung der rDNA-Trennung könnte eine vollständige Kohäsionspaltung bei Einsetzen der Segregation und damit eine symmetrische Nukleolustrennung zur Folge haben. Spindelabhängige oder RNA Polymerase I abhängige Trennungsprobleme in *cdc14-3* könnten auch dazu führen, dass die elongierte rDNA-Struktur in der Anaphase länger bestehen bleibt und damit vor endgültiger Trennung ein Ausgleich dynamischer Faktoren innerhalb dieser Struktur stattfinden kann, was ebenso die gleichmäßigere Proteinsegregation erklären würde (Abb. 4.11). Die gemachten Beobachtungen deuten stark darauf hin, dass Geometrie und Mechanik der Chromosomentrennung eine entscheidende Rolle für die asymmetrische Segregation nukleolärer Proteine spielen.

Ob der Einfluss von Cdc14 auf nukleoläre Segregation evtl. über seinen Einfluss auf Spindelelongation zustande kommt, konnte anhand einer $\Delta cin8$ Mutante getestet werden. Es sind keine nukleolusspezifischen Funktionen des Motorproteins Cin8 bekannt und bei Deletion seines Gens ist die Elongationsrate der mitotischen Spindel deutlich erniedrigt (Straight et al., 1998; Rozelle et al., 2011). Zudem ist Cin8 ein Teil der Zentralspindel, welche in Abhängigkeit von Cdc14 organisiert wird (Khmelninskii et al., 2007). Die in der $\Delta cin8$ Mutante gemachten Beobachtungen waren denen in *cdc14-3* gemachten teils sehr ähnlich. Auch hier wurden sowohl Rpa135 als auch Hmo1 deutlich symmetrischer verteilt und der Trennungsprozess erfolgte auch hier im Vergleich zur Kernelongation teils stark verzögert, dann jedoch umso abrupter und symmetrischer (Abb. 4.12-13). Genauer konnte bei dieser Mutante festgestellt werden, dass der Zeitraum zwischen Cdc14-Freisetzung und Beginn der Nukleolustrennung verlängert war (Abb. 4.13). Die Interpretation der Ergebnisse wäre analog zu *cdc14-3* und somit sollte in $\Delta cin8$ bei Beginn der rDNA-Trennung im Vergleich zum Wildtyp die Kohäsionspaltung dementsprechend weiter vorangeschritten sein, was auch den abrupten Ablauf des Segregationsprozesses, das verminderte Auftreten von Streckung und damit symmetrische Nukleolustrennung erklären würde. Auch in $\Delta cin8$ könnte zudem die verringerte Elongationsrate und damit verringerte Streckung einen längeren und effizienteren Austausch nukleolärer Proteine innerhalb der elongierten Brückenstruktur verursachen, wodurch eine initiale Asymmetrie innerhalb der elongierten Struktur vor endgültiger Trennung ausgeglichen werden könnte. Da die in *cdc14-3* und $\Delta cin8$ beobachteten Effekte auf rDNA-Trennung sehr ähnlich waren, kann des Weiteren spekuliert werden, dass Cdc14 evtl. keinerlei nukleolusspezifische Funktionen für rDNA-Trennung aufweist. Die

Notwendigkeit der Phosphatase für rDNA-Trennung könnte ausschließlich über ihren Einfluss auf die mitotische Spindel zustande kommen.

Dass die Trennungsdynamik relevant für die Etablierung von nukleolärer Asymmetrie im Falle von Rpa135 und Hmo1 ist und dass effiziente Retention dieser nukleolären Proteine innerhalb einer nukleolären Struktur gegeben ist deutet eindeutig darauf hin, dass die Asymmetrien für diese Proteine während des Segregationsprozesses selbst etabliert werden. Es ist also sehr unwahrscheinlich, dass bereits vor der Trennung unterschiedliche Chromatinzusammensetzung der beiden Schwesterchromatiden hinsichtlich Rpa135 und Hmo1 gegeben ist.

5.1.4 Modellvorstellung zur mitotischen Segregation nukleolärer Proteine allgemein

An dieser Stelle kann also eine Modellvorstellung formuliert werden, welche zumindest zwei beobachtete Segregationsmuster nukleolärer Proteine, nämlich Retention im Nukleolus der Mutter und Gleichverteilung, erklären kann.

Verschiedene nukleoläre Komponenten bilden ein Netzwerk von hoher Kohärenz und interner Dynamik, wobei Transkription durch RNA Polymerase I auch während der rDNA-Trennung die zentrale organisatorische Rolle übernimmt. In der Anaphase erfolgt rDNA-Trennung asymmetrisch, wobei Restkohäsion einen entscheidenden Beitrag leistet. Der Nukleolus ist hierbei im Mutterzellkörper positioniert und ein Schwesterchromatid wird aus dem Nukleolusplasma der Mutter in die Knospe gezogen. Durch die Restkohäsion erfolgt keine unmittelbare und symmetrische Spaltung des Nukleolus, sondern eine graduelle und asymmetrische Trennung, wobei das für die Knospe bestimmte Schwesterchromatid aus dem Ausgangsnukleolus gezogen wird und dabei starke Streckungsereignisse und anschließend kondensinabhängige Kompaktierung erfährt. Stabil an rDNA bindende Faktoren können effizient zusammen mit einem Schwesterchromatid in die Tochter transportiert werden und zeigen somit wie rDNA selbst Gleichverteilung. Dynamisch mit rDNA assoziierte Faktoren hingegen werden durch multiple Wechselwirkungen im Nukleolusplasma der Mutter zurückgehalten und können weniger effizient mit einem Schwesterchromatid in die Tochter transportiert werden. Der Großteil dynamisch assoziierter Faktoren bleibt somit im Nukleolus der Mutter zurück. Ein relativ schneller Ablauf des Trennungsprozesses ist vermutlich essentiell, da ansonsten ein Ausgleich dynamischer Faktoren innerhalb der elongierten Anaphasestruktur vor endgültiger rDNA-Trennung stattfinden könnte. In der folgenden Abbildung 5.1 ist dieses Modell dargestellt.

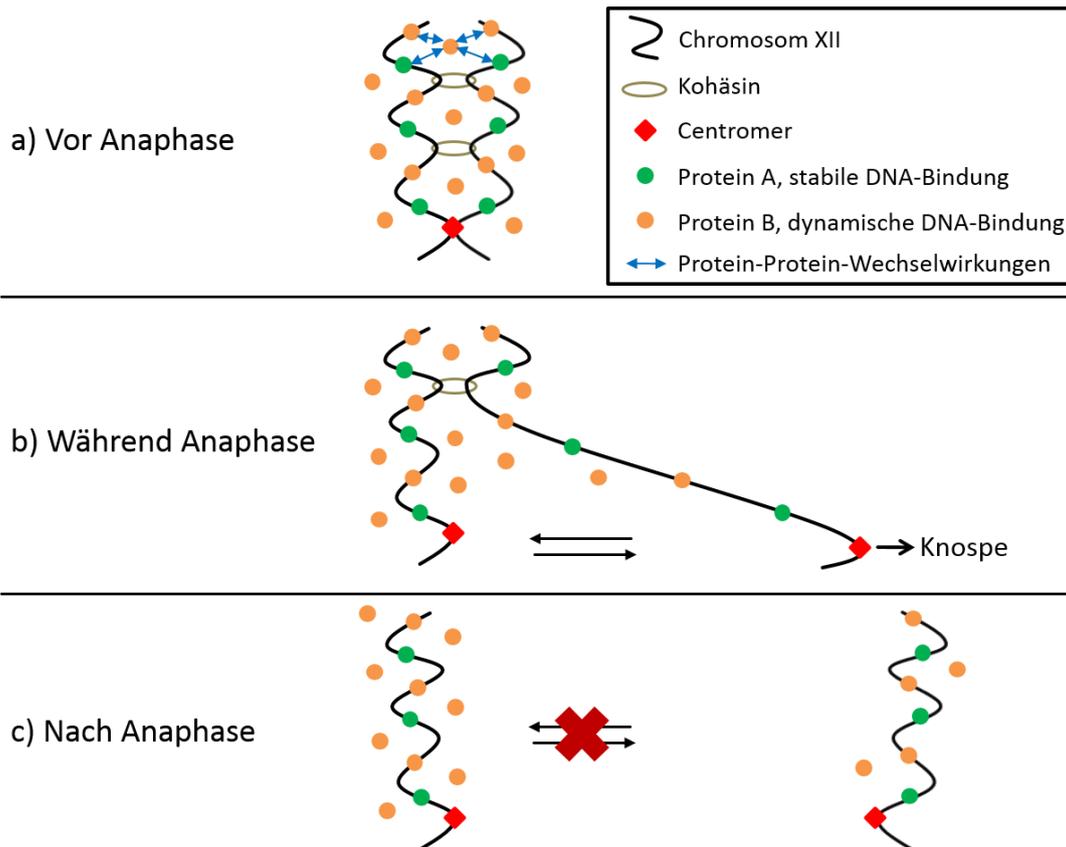


Abbildung 5.1: Modellvorstellung zur nukleolären Segregation allgemein

a) Unmittelbar vor der Anaphase liegt ein Nukleolus bestehend aus zwei über die Centromere und Kohäsin verbundenen Schwesterchromatiden vor. Protein A bindet stabil an rDNA und ein weiteres Protein B zeigt dynamische Wechselwirkung mit dieser. Durch verschiedene Protein-Protein-Wechselwirkungen wird auch das dynamisch bindende Protein B effizient im Nukleolus gehalten.

b) Ein Schwesterchromatid wird während der Anaphase zügig aus dem Nukleolus der Mutter in die Knospe gezogen und stabil bindendes Protein A kann effizient zusammen mit rDNA transportiert werden. Protein B hingegen wird wegen seiner nicht stabilen Assoziation mit rDNA durch verschiedene Wechselwirkungen im Nukleolusplasma der Mutter zurückgehalten und somit in den töchterlichen Bereichen der rDNA depletiert.

c) Nach vollständiger Trennung kann kein effizienter internukleolärer Proteinaustausch stattfinden und es sind zwei neue Nukleoli vorhanden, welche gleiche Mengen des stabil an rDNA bindenden Proteins A vorweisen, von dynamisch bindendem Protein B allerdings verblieb der Großteil im Mutternukleolus.

5.2 Nukleoläre Lokalisation und mitotische Segregation von Hmo1

Das rDNA Bindeprotein Hmo1 zeigte ein besonderes, dem der meisten anderen untersuchten Proteinen genau gegenläufiges Verteilungsverhalten (Abb. 4.8). In diesem Fall erhielt eben der Tochternukleolus, welcher von einem kleineren Zellkern umgeben ist, die höhere Proteinmenge. Ein solches Verteilungsmuster ist weder durch dynamisches Verhalten, noch durch stabile DNA-Bindung alleine zu erklären. Entscheidend für die Segregation von Hmo1 scheint zu sein, dass es größtenteils über Oligomerisierung im Nukleolus lokalisiert und womöglich von RNA Polymerase I verdrängt werden kann.

5.2.1 Eine Kernlokalisationssequenz und hochaffine rDNA-Bindung sind grundlegend für die normale nukleoläre Lokalisation von Hmo1

Damit ein Protein in den Nukleolus gelangen kann, muss es zunächst aus dem Cytoplasma in den Kern importiert werden. Wie bereits aus der Literatur bekannt wird eine C-terminale Verkürzung von Hmo1 nicht mehr in den Kern transportiert (Albert et al., 2013a). Dieses Ergebnis wurde bei vorliegender Arbeit bestätigt, allerdings konnte darüber hinaus eine kurze, für Kernlokalisierung hinreichende Region des C-Terminus (Aminosäuren 212-236) eingegrenzt werden (Abb. 4.34). Ohne diese Kernlokalisationssequenz war keinerlei nukleoläre Anreicherung mehr zu beobachten, allerdings war die biologische Aktivität von Hmo1 dadurch nicht beeinträchtigt, was ebenfalls bereits aus der Literatur bekannt war (Lu et al., 1996). Das Vorhandensein einer Kernlokalisationssequenz stellt also die erste fundamentale Voraussetzung für die nukleoläre Lokalisation von Hmo1 dar.

EMSA-Studien von Hmo1 zeigten, dass eine etwas höhere Affinität zu rDNA als zu rRNA gegeben ist (Abb. 4.24) und eine Reihe weiterer Experimente zeigte, dass hochaffine rDNA-Bindung grundlegend für die räumlich eng begrenzte und inhomogene nukleoläre Lokalisation von Hmo1 ist. Bei Mutagenese der Haupt-DNA-Bindedomäne HMG-BoxB war eine moderat verminderte Affinität zu ribosomalen Nukleinsäuren *in vitro* und eine extreme Aggregation *in vivo* zu verzeichnen (Abb. 4.23; Abb. 4.25). Die *in vivo* Aggregate konnten allerdings in Anwesenheit von Wildtypprotein aufgelöst werden, daher handelte es sich nicht um durch Fehlfaltung verursachte, unspezifische Aggregation (Abb. 4.30; Abb. 4.32). Diese Beobachtungen lassen Aussagen bezüglich der relativen Affinitäten von Hmo1 zu verschiedenen nukleolären Bindungspartnern zu. Die höchste Affinität von Hmo1 gilt also laut EMSA der rDNA, etwas geringer ist die Affinität zu rRNA. Da bei mäßig verminderter Nukleinsäureaffinität Aggregation auftrat und diese durch Wildtypprotein aufgelöst werden konnte, gilt die dritthöchste Affinität von Hmo1 sich selbst. Die niedrigste Affinität sollte Hmo1 zu weiteren potentiellen Bindungspartnern wie z.B. weiteren nukleolären Proteinen haben. Allerdings könnten auch hochaffine Bindungen mit anderen Proteinen gegeben sein, welche Aggregate von BoxBmut deshalb nicht auflösen können, weil sie in nur geringen Mengen vorhanden sind. Solche Faktoren würden allerdings dann auch keinen entscheidenden Beitrag zum Gesamtlokalisationsmuster von Hmo1 leisten.

Bei vollständiger Deletion der HMG-BoxB konnte im Gegensatz zu Wildtyp eine höhere Affinität zu rRNA als zu rDNA festgestellt werden und es zeigte sich präzise Kolo-kalisation mit dem rRNA-Prozessierungsfaktor Nop56, also ein wesentlich breiteres und homogeneres Lokalisationsmuster als im Falle des Wildtyps (Abb. 4.26). Die Affinität zu rDNA war stark abgeschwächt, allerdings war rRNA-Bindung unverändert und die HMG-BoxB stellt somit eine reine DNA-Bindedomäne dar. Würde Δ BoxB hauptsächlich rDNA binden und das anormale Lokalisationsmuster würde im Δ hmo1 Hintergrund durch anormale rDNA-Struktur an sich verursacht sein, so wäre wohl dennoch keine präzise

Kolokalisation mit Nop56 zu erwarten. Die Lokalisation von Δ BoxB sollte also hauptsächlich durch rRNA-Bindung zustande kommen.

Hmo1 bindet also rDNA mit höherer Affinität als rRNA und die reine DNA-Bindedomäne HMG-BoxB ist nötig für sowohl hochaffine rDNA-Bindung als auch die scharf begrenzte, inhomogene nukleoläre Lokalisation von Hmo1 (Abb. 4.24; Abb. 4.26). Die Bindung von rDNA durch die HMG-BoxB muss also grundlegend für die normale Lokalisation des Proteins sein. Auch die reversible Aggregation bei Mutagenese der HMG-BoxB deutet auf eine grundlegende Rolle von rDNA-Bindung hin (Abb. 4.30; Abb. 4.32). rRNA-Bindung scheint eine untergeordnete Rolle für die nukleoläre Lokalisation zu spielen, was neben den Derivat-Experimenten auch bei stationären Zellen deutlich wurde. Hmo1 zeigte eine massive nukleoläre Anreicherung in stationären Zellen (Abb. 4.16; Abb. 4.33). Bei diesen sollte nur geringfügige Transkription gegeben sein und damit sollte hier im Nukleolus kaum rRNA vorhanden sein. Auch mögliche Interaktionen mit anderen nukleolären Proteinen haben nach den hier gemachten Beobachtungen keinen erkennbaren Einfluss.

5.2.2 Oligomerisierung von Hmo1 leistet einen entscheidenden Beitrag zu nukleolärer Lokalisation und mitotischer Segregation

Eine weitere wichtige Erkenntnis war diejenige, dass hochaffine rDNA-Bindung alleine jedoch nicht hinreichend für nukleoläre Lokalisation von Hmo1 ist. Ein Konstrukt, welchem die N-terminal gelegene HMG-BoxA fehlte, zeigte nach wie vor hochaffine rDNA-Bindung, jedoch war das entsprechende Konstrukt in der Mikroskopie fast gänzlich homogen über den Zellkern verteilt und nur noch minimal im Nukleolus angereichert (Abb. 4.27). Die HMG-BoxA ist also nötig für nukleoläre Lokalisation, jedoch nicht für rDNA-Bindung. Daher könnte die Notwendigkeit der HMG-BoxA für nukleoläre Lokalisation generell durch Wechselwirkung dieser mit rRNA oder anderen nukleolären Proteinen, sowie durch Notwendigkeit für Oligomerisierung zustande kommen. Bei der HMG-BoxA scheint es sich durchaus um eine RNA-Bindedomäne zu handeln, da bei Deletion rRNA-Bindung abgeschwächt war (Abb. 4.27-28), allerdings war die HMG-BoxA für sich und auch in Verbindung mit der NLS von Hmo1 nicht fähig, im Nukleolus anzureichern. Im Gegenteil zeigte das BoxA-NLS-Konstrukt sogar wie mCherry-NLS nukleolären Ausschluss (Abb. 4.31; Abb. 4.35). Die HMG-BoxA wies also zumindest keine mit der Mikroskopie detektierbaren Wechselwirkungen mit anderen nukleolären Komponenten auf. Auf der anderen Seite war die HMG-BoxA für sich sowohl notwendig als auch hinreichend für die Rekrutierung durch Wildtypprotein in den Nukleolus und sie war ebenso für die durch Mutagenese der HMG-BoxB verursachte Aggregation, also für *in vivo* Oligomerisierung notwendig (Abb. 4.28), was mit *in vitro* Studien übereinstimmt (Xiao et al., 2010). Die Rekrutierung von BoxA und BoxA-NLS durch Wildtypprotein zeigte, dass die Derivate in nativer Faltung vorlagen und nicht detektierbare nukleoläre Anreicherung in Δ *hmo1* somit nicht auf Fehlfaltung zurückgehen kann (Abb. 4.31). In der Summe

deuten diese Ergebnisse also stark darauf hin, dass die Notwendigkeit der HMG-BoxA für nukleoläre Lokalisation aus seiner Notwendigkeit für Oligomerisierung resultiert. Die folgenden drei Argumente sprechen ebenso für eine entscheidende Rolle der Oligomerisierung für Lokalisation und Segregationsverhalten von Hmo1. Erstens wurde Hmo1 bei starker Überexpression effizient in den Nukleolus rekrutiert und konnte dann auch zumindest teilweise normales Segregationsverhalten vorweisen (Abb. 4.20-21). Zweitens konnten extreme Mengen eines aggregierenden Hmo1-Derivats durch vergleichsweise geringe endogene Mengen in den Nukleolus rekrutiert werden (Abb. 4.32). Drittens waren beide HMG-Boxen notwendig und nicht hinreichend für Oligomerisierung (Abb. 4.26; Abb. 4.28; Abb. 4.30; Abb. 4.31; Xiao et al., 2010), normale nukleoläre Lokalisation (Abb. 4.26; Abb. 4.27), sowie normales Segregationsverhalten von Hmo1 (Abb. 4.29). Eine geringe Menge von Hmo1 bindet also vermutlich direkt an rDNA und stellt dann den Ausgangspunkt für eine massive nukleoläre Rekrutierung durch Oligomerisierung dar.

Das Selbstinteraktionsverhalten von Hmo1 ist sehr komplex und es soll an dieser Stelle erläutert werden, wie genau die Oligomerisierung von Hmo1 erfolgen könnte. Die Literatur beschreibt mögliche Homodimerisierung der HMG-Boxen A und B, die Notwendigkeit der HMG-BoxA für Oligomerisierung, sowie eine Wechselwirkung zwischen HMG-BoxA und C-Terminus (Xiao et al., 2010; Bauerle et al., 2006). Vorliegende Arbeit konnte zumindest zeigen, dass die HMG-BoxA *in vivo* eine übergeordnete Funktion bezüglich Selbstinteraktion hat, da sie sowohl notwendig als auch hinreichend für die effiziente Rekrutierung durch Wildtypprotein war. Alleine war die BoxA jedoch nicht hinreichend für Oligomerisierung (Abb. 4.31). Die HMG-BoxB war zwar notwendig für Oligomerisierung *in vivo*, da im Gegensatz zur Mutagenese von BoxB deren vollständiger Verlust keine Aggregation verursachte, jedoch war sie weder notwendig noch hinreichend für Rekrutierung durch Wildtypprotein (Abb. 4.25; 4.26; Abb. 4.30). Auch der C-Terminus war nicht hinreichend für Rekrutierung durch Hmo1 (Abb. 4.30). Die HMG-BoxB eines Moleküls könnte also mit der eines weiteren Moleküls homodimerisieren und der C-Terminus mit der HMG-BoxA eines weiteren Moleküls wechselwirken. Die HMG-BoxA hingegen könnte ein Verzweigungsmodul darstellen, da sie sowohl mit der HMG-BoxA eines zweiten Moleküls homodimerisieren als auch mit dem C-Terminus eines dritten Moleküls wechselwirken könnte.

5.2.3 Offene Fragen zur nukleolären Lokalisation von Hmo1

Obwohl durch einige Experimente die Wichtigkeit der Selbstinteraktion für Hmo1-Lokalisation und die Wichtigkeit der HMG-BoxA wiederum für Selbstinteraktion hervorging, konnte die Rolle der HMG-BoxA nicht absolut detailliert herausgearbeitet werden. Auch der C-Terminus lässt noch Fragen bezüglich seiner über die Funktion als NLS hinausgehende Rolle für nukleoläre Lokalisation offen. Die HMG-BoxA scheint eine reine RNA-Bindedomäne zu sein, da bei Deletion die rRNA-Affinität sank (Abb. 4.27-28), allerdings zeigte das BoxA-NLS Konstrukt nukleolären Ausschluss (Abb. 4.31; Abb. 4.35). Des

Weiteren zeigte die NLS in Verbindung mit den letzten 10 Aminosäuren (NLS-C) eine leichte nukleoläre Anreicherung und eine Kombination von BoxA, NLS und den letzten 10 Aminosäuren lokalisierte wie der rRNA Prozessierungsfaktor Nop56 (Abb. 4.35). N- und C-Terminus von Hmo1 agieren also synergistisch bezüglich nukleolärer Lokalisation. An dieser Stelle könnte spekuliert werden, dass die BoxA vielleicht nur in Verbindung mit dem C-Terminus rRNA binden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine Wechselwirkung zwischen BoxA und C-Terminus die rRNA-Bindung durch BoxA induziert, ein Effekt der evtl. auch in trans stattfinden könnte. Weiterhin könnte der C-Terminus selbst eine Nukleinsäurebindedomäne darstellen, welche hohe Affinität zu rRNA, jedoch geringe Affinität zu rDNA hat. Möglich wäre, dass nur ein Konstrukt mit sowohl BoxA als auch dem C-Terminus als RNA-Bindedomänen eine ausreichend hohe rRNA-Affinität besitzt um durch diese auch im Nukleolus zu lokalisieren. Weiterhin könnte eine geringe nukleoläre Anreicherung des C-Terminus im Nukleolus durch rRNA- oder Protein-Protein-Wechselwirkung in Anwesenheit der BoxA durch erweiterte Selbstinteraktionsmöglichkeiten verstärkt werden. Die Anwesenheit einer weiteren Nukleinsäurebindedomäne im C-Terminus von Hmo1 könnte aus folgenden Gründen durchaus wahrscheinlich sein. Deletion der BoxA hatte moderaten Einfluss auf rRNA-Bindung, jedoch keinen Einfluss auf rDNA-Bindung. Deletion der BoxB hingegen hatte deutlichen Einfluss auf rDNA-Bindung, keinen jedoch auf rRNA-Bindung. Sowohl Δ BoxA als auch Δ BoxB konnten aber nach wie vor sowohl rRNA als auch rDNA binden (Abb. 4.26-27). Nach diesen Beobachtungen könnte durchaus neben den beiden bekannten HMG-Boxen noch eine zusätzliche Nukleinsäurebindedomäne im C-Terminus existieren, welche evtl. hohe Affinität zu rRNA und geringere Affinität zu rDNA hat. Allerdings ist auch fraglich, ob die kurze Sequenz der letzten 45 Aminosäuren, welche auch die NLS beinhaltet, wirklich eine Nukleinsäurebindedomäne enthalten könnte. Obwohl die letzten 10 Aminosäuren zusammen mit der NLS leichte nukleoläre Anreicherung zeigten, sind sie dennoch nicht notwendig für die normale Lokalisation von Hmo1 (Abb. 4.36). Prinzipiell müssten also weitere Konstrukte mittels EMSA überprüft werden, um den synergistischen Effekt von N- und C-Terminus bezüglich nukleolärer Lokalisation verstehen zu können. Ein weiterer, nicht untersuchter Punkt wäre der mögliche Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf das Lokalisationsverhalten von Hmo1. Das Protein kann sowohl phosphoryliert als auch SUMOyliert werden (Bauerle et al., 2006; Huber et al., 2009; Zhou et al., 2004).

5.2.4 Verdrängung durch RNA Polymerase I könnte der Schlüssel zum besonderen Segregationsverhalten von Hmo1 sein

Ein weiterer aufschlussreicher Befund zum Lokalisationsverhalten von Hmo1 war die beobachtete Antikorrelation zu Rpa135. Immer in Situationen niedriger transkriptioneller Aktivität von RNA Polymerase I, in denen das Signal von Rpa135 wie zu erwarten im Nukleolus sehr schwach war, zeigte Hmo1 hingegen eine verstärkte Anreicherung im Nukleolus (Abb. 4.16-18). Nach den Ergebnissen von

Virginia Babl ist Hmo1 in stationären Zellen ebenso wie in wachsenden an rDNA gebunden (persönliche Mitteilung), die Anreicherung sollte also an rDNA stattfinden. Zudem war für die nukleoläre Anreicherung von Hmo1 in Stationarität die HMG-BoxA nötig, was für eine hauptsächlich durch Oligomerisierung und nicht alleinig durch rDNA-Bindung verursachte Aufkonzentrierung spricht (Abb. 4.33), da die HMG-BoxA nicht notwendig für hochaffine rDNA-Bindung war (Abb. 4.27). Eine HMG-BoxA abhängige massive Aufkonzentrierung durch deren Funktion als rRNA-Bindedomäne kann in Stationarität ausgeschlossen werden.

Bei der beobachteten Antikorrelation von Rpa135 und Hmo1 könnte ein direkter Zusammenhang bestehen, wobei entweder die Aktivität von RNA Polymerase I die übermäßige Anreicherung von Hmo1 verhindern oder die übermäßige Anreicherung von Hmo1 die Rekrutierung der Polymerase inhibieren könnte. Bei starker Überexpression zeigte Hmo1 eine starke Anreicherung innerhalb des Nukleolus, zumindest auf das Wachstum der Zellen hatte dies jedoch keinen negativen Einfluss (Abb. 4.20-21). Die Inaktivierung der RNA Polymerase I hingegen durch die Verwendung der konditionalen Mutante *rnn3(S213P)* hatte eine deutliche nukleoläre Aufkonzentrierung von Hmo1 zur Folge (Abb. 4.18). Daher wird angenommen, dass wie in der Literatur beschrieben nach Replikation zunächst Nukleosomen im Bereich der rDNA durch transkriptionelle Aktivität depletiert werden und damit Hmo1 in diesen Bereichen der rDNA zunächst direkt binden kann (Wittner et al., 2011). Eine verstärkte weitere Anreicherung von Hmo1 an der rDNA durch Oligomerisierung würde durch kontinuierliche Transkription unterbunden werden, vielleicht im Zusammenspiel mit Chromatinremodellierungsfaktoren wie z.B. FACT (FAcilitates Chromatin Transcription). Kommt die Transkription in einer mit Hmo1 assoziierten Wiederholungseinheit der rDNA dann jedoch zum Erliegen, könnte sich Hmo1 folglich durch seine intrinsischen Eigenschaften über Oligomerisierung massiv an dieser rDNA aufkonzentrieren. Die hohe positive Kooperativität der rDNA-Bindung von Hmo1 stellt die optimale Voraussetzung für einen solchen Vorgang dar (Abb. 4.24). Für die Beteiligung eines Verdrängungsmechanismus bei der mitotischen Segregation von Hmo1 spricht die Tatsache, dass die Notwendigkeit hoher RNA Polymerase I Aktivität während der Anaphase für die Etablierung des Segregationsmusters von Hmo1 eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.14; Abb. 9.5). Trotzdem bestünde auch die Möglichkeit eines indirekten Zusammenhangs der beobachteten Antikorrelation von Rpa135 und Hmo1 durch Koregulationsmechanismen, da sowohl RNA Polymerase I Untereinheiten als auch Hmo1 z.B in bestimmten Stresssituationen SUMOyliert werden (Zhou et al., 2004). Auch durch Phosphorylierung könnte Koregulation stattfinden (Bauerle et al., 2006; Huber et al., 2009).

Zur Untermauerung der Verdrängungshypothese soll ein Protein erwähnt werden, welches identisches Segregationsverhalten zu Hmo1 zeigt und von dem definitiv bekannt ist, dass es bei erhöhter transkriptioneller Aktivität von RNA Polymerase I in den transkribierten Bereichen verdrängt wird,

nämlich die Kondensinuntereinheit Smc2. ChIP Analysen zeigten eine verminderte Bindung von Kondensin in transkribierten Bereichen der rDNA bei einer Verminderung der Anzahl an rDNA Wiederholungseinheiten und damit einher gehender verstärkter Transkription der verbleibenden Wiederholungseinheiten (Wang et al., 2006). Endogenes Smc2-GFP wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit mikroskopiert, die Ergebnisse sind im ergänzenden Anhang beigefügt (Abb. 9.7). Bei Smc2 handelt es sich um kein nukleoläres Protein, allerdings begann es sich unmittelbar vor der Anaphase in einer nukleolusähnlichen Struktur aufzukonzentrieren und zeigte dann identisches Verhalten zu Hmo1 derart, dass nach vollständiger Segregation in der töchterlichen Struktur die höhere Proteinmenge vorzufinden war (Abb. 9.7). Einige Minuten nach mitotischer Segregation verteilte sich dann das Signal wieder über die Zellkerne. Die asymmetrische Segregation von RNA Polymerase I könnte die Ursache für überwiegende Kondensinbindung in töchterlichen Bereichen der rDNA sein. Somit könnten durch Geometrie und Mechanik der Chromosomensegregation von RNA Polymerase I befreite Bindestellen für Kondensin in den töchterlichen Bereichen entstehen, was eine effiziente Kompaktierung und damit kondensinabhängige rDNA-Segregation ermöglicht, ohne dass RNA Polymerase I zusätzlich durch einen aktiven Mechanismus inhibiert würde. Bei einer solchen Vorstellung könnte also die Notwendigkeit von Cdc14 für kondensinabhängige rDNA-Segregation aus seiner Notwendigkeit für schnelle Spindelelongation und damit verbundener Depletion von RNA Polymerase I in den töchterlichen Bereichen der elongierten rDNA resultieren. Klar ist an dieser Stelle, dass ein Protein, welches von RNA Polymerase I verdrängt werden kann und während der Mitose im Nukleolus lokalisiert, ein zu Hmo1 identisches Segregationsverhalten aufweist.

5.2.5 Hmo1 trägt zur Kompaktierung der rDNA bei

Bei den schwächeren nukleolären Signalen wie Rpa135, Net1 und Fob1 konnten häufig Diskontinuitäten der elongierten Anaphasestrukturen beobachtet werden (Abb. 4.2; Abb. 4.5-6). Hierfür gäbe es wohl verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Es könnte zum einen sein, dass rDNA-Bereiche im Zuge von Streckung und Kompaktierung vielleicht kurzzeitig von bestimmten Faktoren depletiert sind. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da zumindest Rpa135 und Hmo1 während der Anaphase effiziente nukleoläre Retention zeigten (Abb. 4.9-10). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Streckung in Bereichen des für die Tochter bestimmten Chromatids derart massiv ist, dass rDNA hier transient gänzlich unkompaktiert vorliegt und gebundene Proteine in diesem Bereich wegen zu geringer Konzentration nicht mehr detektiert werden können. Definitiv sollten diese Signallücken Streckungsereignisse der rDNA während der Trennung widerspiegeln. Interessant war auch das deutlich verstärkte Auftreten solcher Signallücken bei starker Überexpression von Hmo1 (Abb. 4.20-21). Hmo1 zeigt rDNA-Bindung, sowie Selbstinteraktion, kann Schleifenbildung von DNA induzieren und diese Strukturen stabilisieren (Berger et al, 2007; Xiao et al, 2010; Murugesapillai et al., 2014). Eine

verstärkte Kompaktierung der rDNA in manchen Bereichen durch die Überexpression von Hmo1 und daraus resultierende verstärkte Streckung wiederum anderer Bereiche während der Trennung könnte also die Ursache für die gemachte Beobachtung sein.

Des Weiteren kann hinterfragt werden, wie die inhomogene, in Foci organisierte Lokalisation mancher nukleolärer Proteine wie z.B. Net1, Fob1 und auch Hmo1 zustande kommt (Abb. 4.5-7). Diese Foci könnten schlicht durch Selbstinteraktion gebildete Aggregate der entsprechenden Proteine an der rDNA sein. Sie könnten auch durch Zusammenlagerung bestimmter rDNA Abschnitte entstehen, welche durch Selbstinteraktion rDNA-bindender Proteine verursacht ist. Vielleicht clustern z.B. transkriptionell inaktive bzw. aktive rDNA-Abschnitte und die beobachteten Foci repräsentieren somit evtl. eine Organisationsebene der ribosomalen DNA.

5.2.6 Multiple Regionen von Hmo1 sind notwendig für seine biologische Aktivität

Bei Erzeugung verschiedener Derivate von Hmo1 wurde ersichtlich, dass multiple Elemente notwendig für Wachstumsstimulation sind. Bei Deletion der HMG-BoxA, sowie Mutagenese und Deletion der HMG-BoxB konnten die resultierenden Konstrukte nicht mehr die Deletion des Wildtypproteins komplementieren. Nur das BoxA-Konstrukt konnte bei starker Überexpression das Wachstum zumindest annähernd wiederherstellen (Abb. 9.2). Allerdings zeigten Zellen bei C-terminaler Verkürzung Hmo1(1-210)-GFP normales Wachstum, obwohl das Konstrukt in der Mikroskopie keinerlei nukleoläre Anreicherung mehr erkennen lies (Lu et al., 1996; Abb. 4.34). Es könnte also sein, dass die Stimulation von RNA Polymerase I nur geringe Mengen an nukleolärem Hmo1 benötigt, allerdings muss dieses in der Lage sein rDNA zu binden und ihre Topologie durch Selbstinteraktion zu modifizieren. Dies könnte die Notwendigkeit beider HMG-Boxen und die Komplementation im Falle von Δ BoxA bei Überexpression erklären, da dieses Konstrukt zum einen rDNA noch hochaffin bindet und zumindest zu Dimerisierung fähig sein sollte (Abb. 4.27; Xiao et al., 2010). Vielleicht liegt auch der Schwerpunkt der biologischen Aktivität von Hmo1 nicht innerhalb des Nukleolus.

5.2.7 Modell zur mitotischen Segregation von Hmo1

Generell konnte gezeigt werden, dass rDNA-Bindung in Verbindung mit Oligomerisierung von Hmo1 eine entscheidende Rolle für nukleoläre Lokalisation und sein Segregationsverhalten spielt. Darüber hinaus offenbarten Bleichexperimente die hocheffiziente Retention des Proteins innerhalb einer nukleolären Struktur, jedoch auch eine deutliche innernukleoläre Dynamik bei einer kontinuierlichen und durch den Knospenhals elongierten nukleolären Struktur während der Anaphase (Abb. 4.10). Entscheidend könnte eine durch RNA Polymerase I verursachte Verdrängung von Hmo1 sein, wie dies

zuvor detailliert beschrieben wurde. Hohe RNA Polymerase I Aktivität während der Segregation ist eindeutig entscheidend für die Segregation von Hmo1 (Abb. 4.14; Abb. 9.5).

Das besondere Segregationsverhalten von Hmo1 könnte folgendermaßen zustande kommen. Während der Trennung verbleibt der Großteil von RNA Polymerase I Komplexen im mütterlichen Bereich einer kontinuierlichen, elongierten nukleolären Struktur und in der Knospe treten Bereiche mit verringerten RNA Polymerase I Mengen auf. Eine durch Geometrie und Mechanik der rDNA-Trennung verursachte Depletion von RNA Polymerase I im töchterlichen Bereich der elongierten Struktur könnte die Voraussetzung für eine dorthin gerichtete Verschiebung von Hmo1 innerhalb der zusammenhängenden Struktur sein, da Hmo1 hier durch rDNA-Bindung und Oligomerisierung verstärkt anreichern kann. Dies wird im mütterlichen Bereich durch hohe RNA Polymerase I Mengen und höhere transkriptionelle Aktivität verhindert. Nach vollständiger rDNA Segregation sind die Unterschiede dann endgültig etabliert, da nun kein effizienter Austausch von RNA Polymerase I und Hmo1 zwischen den separaten Strukturen mehr stattfinden kann. Die folgende Abbildung 5.2 zeigt die beschriebene Modellvorstellung.

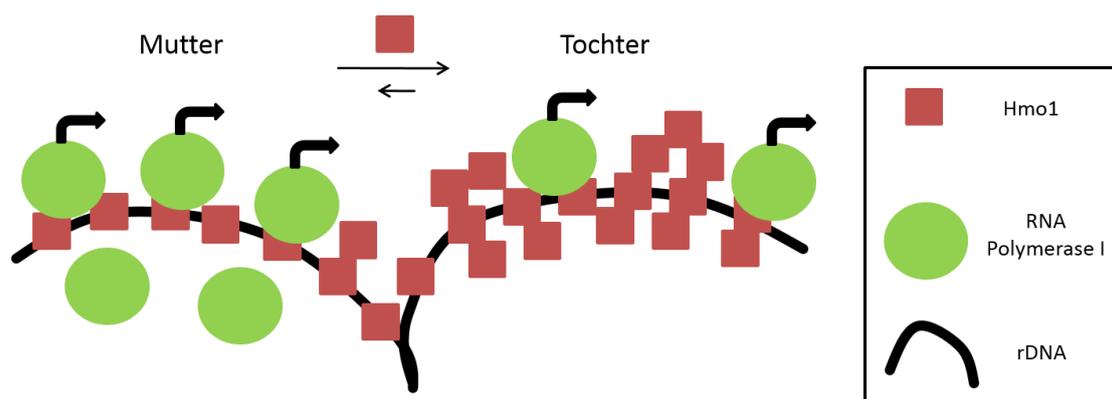


Abbildung 5.2: Modell zur mitotischen Segregation von Hmo1

Nach Beginn der rDNA-Trennung in der Anaphase sind die in die Knospe wandernden Bereiche der elongierten und kontinuierlichen nukleolären Struktur depletiert von RNA Polymerase I, da diese aufgrund der Trennungsgeometrie und dynamischer rDNA-Bindung im Nucleolusplasma der Mutter zurückgehalten wird. In töchterlichen rDNA-Bereichen, welche sowohl von Nucleosomen aufgrund transkriptioneller Aktivität als auch von RNA Polymerase I aufgrund des Segregationsprozesses depletiert sind, kann Hmo1 nun durch seine intranucleoläre Dynamik und seiner Fähigkeit zur rDNA-Bindung in Kombination mit Oligomerisierung verstärkt anreichern. Nach vollständiger Trennung sind diese Unterschiede dann endgültig etabliert, da RNA Polymerase I und Hmo1 zwar innerhalb einer zusammenhängenden Struktur eine gewisse Dynamik vorweisen, für beide aber nucleoläre Retention gegeben ist.

5.3 Konsequenzen der asymmetrischen Nucleolustrennung

Es konnte also gezeigt werden, dass im Zuge der mitotischen Zellteilung zwei neue Zellen entstehen, deren Nucleoli stark unterschiedliche Proteinzusammensetzung vorweisen. Unklar ist allerdings, ob sich die beiden neu entstandenen Nucleoli auch in unterschiedlichen funktionellen Zuständen befinden. Eine wichtige Frage wäre also, ob auch wirklich die Chromatinzusammensetzung dieser

Nukleoli letztlich unterschiedlich ist, oder ob die Chromatinzusammensetzung an sich identisch wäre und die gemessenen Unterschiede nur auf die das eigentliche rDNA Chromatin umgebenden Nukleolusplasmen zurückgehen. Im Falle von Hmo1 konnte gezeigt werden, dass rDNA-Bindung in Verbindung mit Oligomerisierung grundlegend für seine normale nukleoläre Lokalisation ist (Abb. 4.20-21; Abb. 4.24-28; Abb. 4.32) und für dieses Protein kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass nukleoläres rDNA-Chromatin der Tochter über einen höheren Anteil von gebundenem Hmo1 verfügt als rDNA-Chromatin der Mutter. Für die RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135 konnte gezeigt werden, dass Rekrutierung durch Rrn3 und damit Transkriptionsinitiation entscheidend für ihre nukleoläre Lokalisation ist (Abb. 4.18). Damit sollte eine geringere Menge von RNA Polymerase I im Nukleolus der Tochter vermutlich auch eine geringere transkriptionelle Aktivität widerspiegeln. Die FLIP-Experimente zeigten einen geringen internukleolären Austausch von Rpa135 (Abb. 4.9) und könnten in Verbindung mit den in *rrn3(S213P)* gemachten Beobachtungen derart interpretiert werden, dass der Großteil von Rpa135 im Nukleolus an Transkription beteiligt ist, ein nur geringer Anteil transkriptionell inaktiv vorliegt und ausschließlich der inaktive Anteil den beobachteten geringen Austausch zwischen zwei nukleolären Strukturen ermöglicht. Welcher Anteil der nukleolären Population von Rpa135 allerdings zu einem beliebigen Zeitpunkt tatsächlich aktiv an Transkription teilnimmt und ob nur transkriptionell aktive Untereinheiten/Komplexe effizient im Nukleolus gehalten werden, ist unklar. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass durch Geometrie und Mechanik der rDNA-Trennung unterschiedliche rDNA-Chromatinzustände in Mutter- und Tochternukleolus während der Anaphase etabliert werden, wobei sich der Nukleolus der Mutter in einem transkriptionell aktiveren Zustand befindet als der Nukleolus der Tochter. Auch die mit der provisorischen Sonde für transkriptionelle Aktivität gemachten Beobachtungen sprechen für einen solchen Sachverhalt (Abb. 9.6).

Neben der Frage nach Transkriptioneller Aktivität soll auch die Frage gestellt werden, welche weiteren physiologischen Konsequenzen, welche konkreten Vorteile eine asymmetrische Segregation nukleolärer Proteine mit sich bringen könnte. Bei einem Segregationsmechanismus, welcher dafür sorgt, dass stabiler mit rDNA assoziierte Faktoren auch effizienter in die Tochter transportiert werden, könnten somit vorwiegend während der Anaphase aktive Populationen von z.B. RNA Polymerase I oder Prozessierungsfaktoren in die Tochter gelangen und unfunktionale, geschädigte Faktoren, welche evtl. auch nicht mehr effizient mit rDNA oder rRNA assoziieren können, würden somit verstärkt im Nukleolusplasma der alten Mutterzelle zurückbleiben. Der beschriebene Mechanismus könnte also theoretisch einen gewissen Beitrag zur Verjüngung der neugeborenen Tochterzellen leisten. Des Weiteren könnten auch die sog. ERCs (Extrachromosomal rDNA Circles) über Proteinkomponenten mit dem Nukleolus assoziiert sein und durch Retention dieser Proteinfaktoren selbst könnten theoretisch auch ERCs im Nukleolus der Mutterzelle zurückgehalten werden.

Von Hmo1 ist bekannt, dass es neben seinen vielen bereits erwähnten Funktionen auch ein Faktor ist, welcher DNA schützen kann. Es kann z.B. den Verdau von DNA mit MNase unterbinden, es kann auch UV-induzierte Mutageneseraten mancher Gene im Zusammenspiel mit Komponenten von DNA-Reparatursystemen senken und scheint generell chromosomale Integrität zu fördern (Lu et al., 1996; Alekseev et al., 2002; Bermejo et al., 2009). Eine möglichst hohe Menge dieses Faktors würde also definitiv einen Vorteil für die neu entstandene Tochterzelle bedeuten. Generell könnte die unmittelbare massive Aufkonzentrierung von Hmo1 an nukleosomenfreier rDNA bei Abnahme der transkriptionellen Aktivität aufgrund seiner intrinsischen Eigenschaften einen effizienten Schutzmechanismus für diese enorm wichtige chromosomale Region darstellen.

6. Methoden

6.1 Arbeiten mit *E.coli*

Bei vorliegender Arbeit wurden zwei verschiedene *E.coli* Stämme verwendet. Zum einen der Stamm DH5 α zur Amplifikation von Plasmid-DNA und zum anderen der Stamm BL21-CodonPlus zur Proteinexpression. Die Genotypen der beiden Stämme lauten wie folgt.

DH5 α : *F* ϕ 80*dlacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*)-*U169 deoR endA1 gyrA96 hsdR17*(*r_k⁻, m_k⁺*) *phoA recA1 relA1 supE44 thi-1 λ*

BL21-CodonPlus: *F ompT hsdSB* (*r_B⁻, m_B⁻*) *gal dcm* (*DE3*) *pLysS* (*CamR*)

6.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Der Stamm DH5 α diente der Amplifikation von Plasmid-DNA und wurde immer über Nacht bei 37°C auf agaroseenthaltenden LB-Platten oder in LB-Flüssigmedium angezogen, wobei das Antibiotikum Ampicillin zur Selektion auf die zu amplifizierenden Plasmide verwendet wurde (Enkonzentration: 100 μ g/ml). Der Stamm BL21-CodonPlus diente der heterologen Genexpression und wurde ebenfalls auf agaroseenthaltenden LB-Platten und in LB-Flüssigmedium kultiviert, allerdings musste bei diesem Stamm zusätzlich zur Ampicillinresistenz (Expressionsplasmide) auch auf Chloramphenicolresistenz (Plasmid-DNA mit zusätzlichen Kopien bestimmter tRNA-Gene) selektiert werden. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug hier ebenfalls 100 μ g/ml, die Endkonzentration von Chloramphenicol betrug bei LB-Platten 34 μ g/ml und in LB-Flüssigmedium 50 μ g/ml. Für die Proteinexpression wurden Vorkulturen von BL21-CodonPlus (20-100 ml) über Nacht bei 37°C angezogen, ausgehend von diesen wurden dann am Folgetag Hauptkulturen auf 0,1 OD₆₀₀/ml angeimpft (1 l Gesamtvolumen), 2h bei ca. 30°C geschüttelt und anschließend mit 0,2 % Rhamnose induziert. Nach weiteren 22h bei 30°C im Schüttler wurden die Kulturen geerntet (15 min, 5000 Upm, 4°C) und bis zum Zellaufschluss und anschließender Proteinreinigung bei -70°C gelagert.

6.1.2 Transformation von *E.coli* mittels Elektroporation

Die elektrokompetenten DH5 α - bzw. BL21-CodonPlus-Zellen wurden auf Eis augetaut und 1:1 mit sterilem Wasser verdünnt. 100 μ l der verdünnten Zellen wurden in eine Elektroporationsküvette gegeben und auf Eis gestellt. Im Falle von konzentrierter und reiner Plasmid-DNA bzw. undialysierten Ligationsansätzen wurden 1-3 μ l DNA-Lösung zu den Zellen gegeben, im Falle von dialysierten Ligationsansätzen wurden 5-10 μ l bei der Transformation eingesetzt. Nach Durchführung der Elektroporation (Widerstand: 200 Ω , Felstärke: 12,5 kV/cm, Kapazität: 25 μ F, Spannung: 2,5 kV)

wurden die Zellen sofort in 1 ml auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikumzusatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2 Arbeiten mit *S.cerevisiae*

Alle bei dieser Arbeit verwendeten *S.cerevisiae*- Stämme gehen auf die Stammhintergründe W303 und S288c zurück. Unter diesem Punkt werden nur die grundlegenden Genotypen dieser Stammhintergründe (haploid) beschrieben, eine detaillierte Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeter Stämme und ihrer Genotypen erfolgt an späterer Stelle unter dem Punkt Materialien.

W303: *ho ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-2 ssd1 can1-100*

S288c: *ho his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0*

6.2.1 Kultivierung von *S.cerevisiae*

Zum Ausstreichen von Stämmen aus der Stammsammlung wurden Vollmediumsagarplatten mit Glukose (XYD) verwendet, beim Ausplattieren nach einer Hefetransformation wurden die Zellen auf dementsprechendes synthetisches Selektivmedium mit Glukose (SD) ausgebracht, bei welchem bestimmte Nukleobasen oder Aminosäuren nicht enthalten waren. Generell wurden Hefezellen bei allen Experimenten in flüssigem, organischem Vollmedium mit Glukose (XYD) bei 25-30°C angezogen. Dabei wurde eine Vorkultur über Nacht kultiviert und von dieser ausgehend eine Hauptkultur definiert überimpft. Die Hauptkulturen wurden wiederum über Nacht bei 25-30°C unter Schütteln angezogen und befanden sich zum Zeitpunkt der Ernte in Wachstumsphase.

6.2.2 Transformation von Hefezellen mit der Lithium-Acetat-Methode

Die Transformation von Hefezellen mit DNA durch die Lithium-Acetat-Methode erfolgte nach Gietz und Woods (Gietz und Woods, 2002). Hierbei wurde eine 5 ml Vorkultur über Nacht in Vollmedium angezogen und am Folgetag durch Verdünnung eine Hauptkultur von 20 ml, wiederum Vollmedium, angesetzt (ca. 0,1-0,25 OD₆₀₀/ml). Nach mehreren Stunden Wachstum bei 25°C und einer Dichte von ca. 1 OD₆₀₀/ml wurden pro Transformationsansatz 2 OD Zellen geerntet (2 min, 2000 Upm), mit 1 ml sterilem Wasser und anschließend 1 ml TE/LiAc gewaschen und pro Ansatz in 50 µl TE/LiAc aufgenommen. Ein typischer Transformationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Zellsuspension:	50 µl
Lachssperma-DNA (10 mg/ml):	5 µl
Plasmid-DNA (durch Restriktionsverdau linearisiert):	1-10 µl
PEG/LiAc:	300 µl

In seltenen Fällen wurde auch PCR-Produkt transformiert, davon allerdings 30-50 µl. Die Ansätze wurden für 20 min bei Raumtemperatur gerollert, dann für 15 min bei 42°C inkubiert, abzentrifugiert (2 min, 2000 Upm) und zum Ausplattieren auf Selektivmedium in 150 µl sterilem Wasser aufgenommen. Nach 2-5 Tagen bei 25-30°C waren deutlich sichtbare Einzelkolonien herangewachsen.

6.2.3 Konservierung von Hefestämmen

Zur dauerhaften Konservierung von Hefestämmen wurden diese zunächst über Nacht in 5 ml Vollmedium angezogen. Am nächsten Tag wurden dann 2 ml Zellkultur geerntet (2 min, 2000 Upm), die Zellen in 1 ml 15 % Glycerin aufgenommen und bei -70°C dauerhaft gelagert.

6.2.4 Kreuzung haploider Hefestämme

Zur Kreuzung zweier haploider Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps wurde von diesen etwas Zellmaterial von Agarplatten entnommen und auf einer Vollmediumsplatte miteinander vermengt. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde dann ein Verdünnungsausstrich der Mischkultur auf entsprechendes Doppelselektivmedium durchgeführt, auf welchem nur diploide Zellen, jedoch nicht die haploiden Ausgangszellen wachsen konnten. Nach Inkubation bei 25-30°C für mehrere Tage waren diploide Einzelkolonien angewachsen.

6.2.5 Sporulation diploider Hefestämme

Um diploide Hefestämme zu sporulieren wurden die Zellen zunächst in 2 ml Prä-Sporulationsmedium angeimpft und über Tag bei 30°C oder über Nacht bei 25-30°C gerollert. Anschließend wurden die Zellen dann in stickstoffarmes Sporulationsmedium überführt (evtl. Waschen mit H₂O oder Sporulationsmedium) und mehrere Tage bei 25°C gerollert, bis im Mikroskop eine deutliche Population an vier Sporen enthaltenden Asci zu erkennen war. Dieser Prozess dauerte beim Stammhintergrund W303 etwa 3-4 Tage, beim Stammhintergrund S288c etwa 4-6 Tage. Bei ausreichendem Sporulationsgrad wurden die Zellwände der Asci mit Novozym-Lösung 25 min bei Raumtemperatur verdaut und 500-700 µl Wasser zugegeben. Mit einer 1 ml Glaspipette wurde in die Suspension getaucht und diese auf dem Rand einer Vollmediumsplatte ausgestrichen. Mit einem Mikromanipulator wurden die Sporen von 8-12 Tetraden vereinzelt auf den Platten abgelegt. Nach Wachstum von mehreren Tagen bei 25-30°C waren aus den vereinzelt Sporen Kolonien

ausreichender Größe herangewachsen, welche nun auf ihren Genotyp getestet werden mussten. Hierfür wurde von jeder Kolonie etwas Zellmaterial in Wasser resuspendiert (Multititerplatte) und die Suspensionen wurden dann auf entsprechende Agarplatten gestempelt und für 1-2 Tage bei 25-30°C inkubiert. Abschließend konnte dann die Auswertung erfolgen.

6.2.6 Wachstumstest von Hefestämmen

Um epitopmarkierte Gene auf Funktionalität zu testen oder Komplementationstests durchzuführen, wurden Wachstumstests mit Verdünnungsreihen von Hefekulturen durchgeführt. Hierfür wurden die zu testenden Stämme und entsprechende Kontrollen über Nacht in 5 ml Vollmedium angezogen und am nächsten Tag auf eine Konzentration von 0,2 OD₆₀₀/200 µl eingestellt (Verdünnung mit H₂O). Diese eingestellten Suspensionen wurden dann in 1:10 Verdünnungsreihen weiter verdünnt, auf entsprechende Agarplatten gestempelt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 24h und 48h inkubiert.

6.3 Genetische und molekularbiologische Methoden

6.3.1 DNA-Präparation

6.3.1.1 Plasmidisolierung aus *E.coli* mittels Kochlysatmethode

Die Kochlysatmethode ist ein schneller Weg zur Isolierung von Plasmiden aus *E.coli*, die in hoher Kopienzahl vorliegen (Berghammer und Auer, 1993). Hierfür wurden Einzelkolonien von LB_{Amp}-Agarplatten genommen und in 5 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium resuspendiert. Wachstum erfolgte über Nacht bei 37°C unter Rollern und am Folgetag wurden je 1,8 ml Kultur abzentrifugiert (10 min, 13200 Upm), um Zellen zu ernten. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 40 µl EasyPrep-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 100°C inkubiert und dann für 1 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation von 15 min bei 13200 Upm pelletierte die Zelldebris und die Plasmide befanden sich im Überstand.

6.3.1.2 Plasmidisolierung aus *E.coli* mittels alkalischer Lyse

Bei Plasmiden, welche in geringer Kopienzahl vorliegen musste die alkalische Lyse durchgeführt werden. Die verwendeten Puffer und Lösungen stammen aus dem Sigma GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit. Auch Hierbei wurden Einzelkolonien von LB_{Amp}-Agarplatten genommen und in 5 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium angeimpft. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C im Roller wurden 4 ml Kultur abzentrifugiert (10 min, 5000 Upm), der Überstand abgenommen und die Zellen in 250µl Resuspension-Solution aufgenommen. Anschließend wurden 250 µl Lysis-Solution zugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach ca. 5 min wurden 250 µl Neutralization-Solution zugegeben, mehrfach invertiert und 10 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation (10 min, 13200 Upm) wurde der

Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei -20°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 13200 Upm) pelletierte die DNA und wurde mit je 500 µl 70% Ethanol und 100% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde das Pellet in 50 µl 1x TE resuspendiert.

6.3.1.3 Plasmidisolierung aus *E.coli* mittels Säulenreinigung

Um Plasmid-DNA aus *E.coli* in großen Mengen, hoher Konzentration und möglichst reiner Form zu gewinnen, wurde ein Präparationskit von Sigma Aldrich (GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit) verwendet. Ausgehend von Vorkulturen wurden Hauptkulturen von 80 ml angezogen und nach Wachstum über Nacht bei 37°C erfolgte die Ernte der Zellen (10 min, 4000 Upm). Das weitere Vorgehen entsprach den Herstelleranweisungen.

6.3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus *S.cerevisiae*

Für die Amplifikation bestimmter Abschnitte des Hefegenoms für anschließende Klonierungen oder Verwendung für *in vitro* Studien diente genomische DNA der Bäckerhefe als Matrize und musste somit zunächst aus Zellen extrahiert werden. Dies wurde mit Hilfe eines mechanischen Zellaufschlusses und Ethanol-fällung von DNA bewerkstelligt (Fujimura und Sakuma, 1993). Es wurden 5 ml Kulturen in flüssigem Vollmedium (XYD) über Nacht kultiviert, morgens geerntet (2 min, 2000 Upm) und in Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl Tris/EDTA/SDS resuspendiert und in ein 1,5 ml Schraubdeckelgefäß mit Glasperlen überführt. Der Aufschluß erfolgte mittels Retsch-Mühle bei 4°C, es folgte Zugabe von 500 µl Tris/EDTA/SDS und Inkubation für 10 min bei 70°C. Anschließend wurde dem Lysat 200 µl 5M Kaliumacetat zugegeben, dann erfolgte Kühlung für 10 min auf Eis und Zentrifugation für 5 min bei 13200 Upm und 4°C. Der Überstand wurde in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1ml 100% Ethanol versetzt, mehrmals gewendet und für 5 min bei 13200 Upm zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes und Trocknen des Pellets wurde dieses in 300 µl TE resuspendiert, mit 5 µl RNaseA (10 mg/ml) versetzt und 30 min lang bei 65°C inkubiert. Abschließend wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und letztlich in 50 µl 1x TE (auf 65°C vorgewärmt) gelöst.

6.3.2 Agarosegelelektrophorese und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese ist eine essentielle Methode, mit welcher DNA-Moleküle für analytische oder präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden können. Das Polysaccharid Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht (0,75-2 % Agarose) und bildete nach Abkühlung eine Gelmatrix. Die Gele wurden unter 1x TAE-Puffer gesetzt und nach Mischung der Nukleinsäureproben mit einem

entsprechenden Laufpuffer und Gelauftrag wurde ein elektrisches Feld angelegt, wobei die Anode sich in der Apparatur am gegengesetzten Ende zu den aufgetragenen Proben befand. Im elektrischen Feld wanderten Nukleinsäuren entsprechend ihrer negativen Ladungen innerhalb der Gelmatrix zur Anode und wurden entsprechend ihrer Größe nach aufgetrennt. Im Allgemeinen wurde eine konstante Spannung von 80-90 V für die Gelläufe gewählt, die Dauer der Gelläufe wurde an die Größe der untersuchten Nukleinsäuren und den Vernetzungsgrad der Gele angepasst. Um Nukleinsäuren im Gel zu visualisieren wurde das interkalierende Agens Ethidiumbromid verwendet, welches bei Bindung an Nukleinsäuren und Anregung durch UV-Licht starke Fluoreszenz zeigt. Ethidiumbromid wurde entweder beim Gießen der Gele bereits zugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml), oder die Gele wurden nach dem Lauf für 1 h in 70 ml 1x TAE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid unter Lichtausschluss und Wippen gefärbt. Für die Quantifizierung von Nukleinsäuren wurden diese zusammen mit entsprechenden Größenstandards bekannter Massenkonzentration (GeneRuler DNA Ladder Mix bzw. RiboRuler Low Range RNA Ladder der Firma Thermo Scientific) auf ein Gel aufgetragen. Im Falle von DNA wurde der 10x DNA-Laufpuffer für die Probenvorbereitung verwendet, im Falle von RNA musste für die Konzentrationsbestimmung ein spezieller RNA-Laufpuffer zur Anwendung kommen. Einzelsträngige RNA kann stark zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen, was wiederum das Laufverhalten und die Bindekapazität bezüglich Ethidiumbromid beeinflussen kann. Deswegen wurde bei der Quantifizierung von ssRNA ein denaturierender Laufpuffer (2x RNA Loading Dye der Firma Thermo Scientific) verwendet. Sowohl RNA-Größenstandard als auch zu messende RNA-Probe wurden vor dem Gelauftrag mit denaturierendem Laufpuffer gemischt, für 10 min bei 70°C inkubiert, wenige Minuten auf Eis gestellt und kurz anzentrifugiert. Die Gele wurden nach dem Lauf unter UV-Licht detektiert (Red™ Imaging System von Alpha Innotech), wobei bei den Einstellungen darauf geachtet wurde, dass die Signale deutlich sichtbar waren und keine Sättigung erreichten. Die erhaltenen digitalen Gelbilder wurden dann mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet, wobei der Hintergrund (durchschnittlicher Pixelwert aus Gelbereich ohne Signal) abgezogen und Grenzwerte für die Signalerkennung gesetzt wurden. Der untere Grenzwert wurde möglichst nahe am Hintergrund gesetzt, der obere Grenzwert auf Maximum. Es wurden die Gesamtsignale ermittelt (Raw Integrated Density) und nur Banden gleicher Laufweite für die Quantifizierung miteinander verglichen.

6.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion, oder kurz PCR (polymerase chain reaction), wurde eine Methode entwickelt, welche molekulargenetisches Arbeiten revolutioniert hat (Mullis et al., 1986). Musste zuvor genetisches Material stets mühsam isoliert werden, so konnte es nun zusätzlich *in vitro* exponentiell vervielfältigt werden. Hierbei sind Oligonukleotide, die sog. Primer, entscheidend dafür, welcher Abschnitt einer gegebenen DNA-Matrize amplifiziert wird. Bei hoher Temperatur wird der

Doppelstrang der DNA-Matrize aufgeschmolzen, bei darauffolgender Temperatursenkung binden die Primer durch komplementäre Basenpaarung an die entsprechenden Abschnitte der Matrize und in einem Elongationsschritt synthetisiert eine DNA-Polymerase dann ausgehend von den Primern den gewünschten DNA-Strang. Durch repetitiven Ablauf dieser Schritte wird das PCR-Produkt exponentiell amplifiziert, da entstehendes Produkt ebenfalls als Matrize dient.

6.3.3.1 Standard PCR mit KOD-Polymerase

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken und für *in vitro* Studien wurde die thermostabile KOD-DNA-Polymerase (ursprünglich aus *Thermococcus kodakaraensis*) verwendet, da diese über eine Korrekturfunktion (3'→5' Exonukleaseaktivität) verfügt und somit eine niedrige Fehlerrate aufweist. Im Folgenden ein allgemeines Beispiel für die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes und das Temperaturprofil einer KOD-PCR bei Plasmid-DNA als Matrize. Bei genomischer DNA als Matrize wurde deren Konzentration variiert und die DNA-Polymerase wesentlich verdünnter eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur T_H der Primer lag in der Regel 2-4°C unter deren Schmelztemperatur.

PCR-Ansatz		Temperaturprofil		
10x KOD-Puffer	5 µl	Denaturierung	94°C	4 min
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl			
dNTPs (2 mM)	5 µl	Denaturierung	94°C	40 sec
F-Primer (10 pmol/µl)	3 µl	Hybridisierung	T_H	20 sec
R-Primer (10 pmol/µl)	3 µl	Elongation	72°C	30 sec/1kb
Plasmid-DNA	1 µl (20-50 ng)			x25-30
KOD-Polymerase	1 µl	Restamplifikation	72°C	
H ₂ O	26 µl			

6.3.3.2 PCR für C-terminale Epitopmarkierung

Für die C-terminale Epitopmarkierung mancher Gene wurde ein PCR-basiertes System nach Sheff und Thorn verwendet (Sheff und Thorn, 2004). Der F-Primer muss hierbei am 5'-Ende eine ca. 50 bp zum Zielgen identische Sequenz enthalten, welche bis unmittelbar zum STOPP-Codon reicht und am 3'-Ende eine Sequenz, welche für die Amplifikation des entsprechenden Konstrukts aus einem Vektor nötig ist. Der R-Primer muss an seinem 5'-Ende eine Sequenz beinhalten, welche revers komplementär zu den 50 bp unmittelbar nach dem STOPP-Codon des Zielgens ist und am 3'-Ende ebenfalls eine Sequenz, welche für die Amplifikation des Konstrukts nötig ist. Die PCR wurde auch hier mit konzentrierter KOD-Polymerase durchgeführt.

PCR-Ansatz		Temperaturprofil		
10x KOD-Puffer	5 µl	Denaturierung	94°C	4 min
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl			
dNTPs (2 mM)	5 µl	Denaturierung	94°C	40 sec
F-Primer (10 pmol/µl)	3 µl	Hybridisierung	65°C	20 sec
R-Primer (10 pmol/µl)	3 µl	Elongation	72°C	140 sec
Plasmid-DNA	1 µl (20-50 ng)			
KOD-Polymerase	1 µl	Restamplifikation	72°C	5 min
H ₂ O	26 µl			

6.3.3.3 MAT-PCR

Um nach Sporulation eines diploiden Hefestammes den Paarungstyp der haploiden Nachkommen zu bestimmen wurde eine spezielle Art der PCR eingesetzt, nämlich die sog. MAT-PCR (Huxley et al., 1990). Hierbei wurden intakte Zellen zum Ansatz gegeben, durch starkes Erhitzen erfolgte der Zellaufschluss und ihre genomische DNA konnte dann in der Reaktion als Matrize dienen. Auf Chromosom III der Bäckerhefe liegen zwei verschiedene Loci (*HML* bzw. *HMR*) mit stillgelegten Allelen, welche für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren kodieren. Welches dieser Allele am exprimierten *MAT*-Lokus vorhanden ist, bestimmt den Paarungstyp einer Hefezelle. Durch Einsatz verschiedener Primer in einer PCR (WS826, WS827 und WS828) konnte ermittelt werden, welches Allel am *MAT*-Lokus vorhanden war. Bei Zellen des Paarungstyps *MAT α* entstand ein Produkt von 544 bp und bei Zellen des Paarungstyps *MAT α* entstand ein Produkt von 404 bp. Da hierbei nur die Länge des entstehenden Produkts von Bedeutung war, wurde die sog. Taq-Polymerase eingesetzt, welche nicht über Fehlerkorrektur verfügt. Zellmaterial wurde von Platte genommen und in 5 µl Wasser resuspendiert, dazu wurden 20 µl Reaktionsmix gegeben und die PCR gestartet.

Reaktionsmix		Temperaturprofil		
10x Koloniepuffer	2,5 µl	Denaturierung	94°C	5 min
dNTPs (2 mM)	2,5 µl			
Primer-Mix WS826,		Denaturierung	94°C	1 min
WS827, WS828 (je 3,33 pmol/µl)	3 µl	Hybridisierung	55°C	1 min
Taq-Polymerase	1 µl	Elongation	72°C	40 sec
H ₂ O	ad 20 µl			
		Restamplifikation	72°C	3 min

Zur Analyse wurden 5-10 µl bei einem Agarosegellauf eingesetzt.

6.3.4 Gerichtete Mutagenese

Durch die Methode der gerichteten Mutagenese kann die Sequenz einer doppelsträngigen DNA gezielt und nach Belieben verändert werden (Weiner et al., 1994). Dabei wurden Oligonukleotide eingesetzt, welche die gewünschten Veränderungen trugen und mit der zu verändernden, ringförmigen DNA hybridisieren. Ausgehend von diesen Oligonukleotiden erfolgte dann die Synthese des übrigen DNA-Stranges mit Hilfe der thermostabilen KOD-DNA-Polymerase. Da bei dieser Reaktion entstehendes Produkt nicht als Matrize genutzt werden kann, erfolgt die Amplifikation linear und nicht exponentiell.

Reaktionsansatz		Temperaturprofil		
10x KOD Puffer	5 µl	Denaturierung	95°C	3 min
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl			
dNTPs (2 mM)	5 µl	Denaturierung	95°C	30 sec
F-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	Hybridisierung	54°C	30 sec
R-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	Elongation	72°C	4,5 min
KOD-Polymerase	1 µl			
Matrize	30-50 ng	Restamplifikation	72°C	10 min
H ₂ O	ad 50 µl			

Nach Ablauf der Mutagenese wurden jedem Ansatz 10 U DpnI zugegeben und 1 h bei 37°C verdaut. Dieser Schritt diente dem Verdau der unmethylierten DNA-Matrize. Jeweils 1 µl Ansatz wurde dann in *E. coli* Zellen transformiert. Neben der gewünschten Änderung der entsprechenden, für Aminosäuren kodierenden Tripletts einer Gensequenz wurde auch das Restriktionsmuster verändert, um eine schnelle Identifizierung möglicher positiver Klone zu ermöglichen.

6.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Für Klonierungen und zur Überprüfung wurden DNA-Moleküle mit Restriktionsenzymen verdaut und durch einen Gellauf überprüft oder aufgereinigt. Im Folgenden ein Beispiel für einen Standardverdau mit Gesamtvolumen von 20 µl:

DNA:	100-500 ng
10x Restriktionspuffer:	2 µl
Restriktionsenzym:	10 U
H ₂ O:	ad 20 µl

Inkubation erfolgte je nach Anwendung für 1-3h (selten über Nacht) bei für die jeweilige Enzymaktivität optimaler Temperatur.

6.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau wurde der gesamte Verdau auf ein 0,75-1% Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gegeben und der Gellauf erfolgte in der Regel für 30-50 min bei 80V. Unter UV-Beleuchtung wurden die gewünschten Fragmente aus dem präparativen Gel geschnitten und mit dem Qiagen Gel Extraction Kit nach Herstelleranweisung aus den Gelblöckchen extrahiert.

6.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente zu ligieren, wurden Ligationsansätze von 20 µl Gesamtvolumen angesetzt:

Vektor-DNA:	3-10 ng
Insert-DNA:	vier- bis sechsfacher Teilchenüberschuss
T4-DNA-Ligase:	1-40 U
10x Ligasepuffer:	2 µl
H ₂ O:	ad 20 µl

Ligationsansätze wurden für mindestens 3h, jedoch meist über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. In der Regel wurden die Ligationsansätze für 20 min gegen Reinstwasser dialysiert, bevor sie in der Elektroporation eingesetzt wurden.

6.3.8 Sequenzierung

Um Nach Amplifikation von DNA-Sequenzen sicher zu gehen, dass keine ungewollte Veränderung dieser während der Amplifikation erfolgte, wurden diese sequenziert. Hierfür wurden die Dienste der Firmen GATC bzw. SeqLab genutzt und die Proben nach entsprechenden Angaben zusammengestellt. Meist wurden DNA-Sequenzen im Kontext eines pBluescript II KS+ Plasmides (Stratagene) sequenziert (F-Primer: WS84, R-Primer: WS85), selten wurde auch im Kontext eines C-terminal fusionierten GFP-Gens sequenziert (R-Primer: WS2404).

6.3.9 *In vitro* Transkription

Wird für gewisse Studien eine bestimmte Sequenz einzel- oder doppelsträngiger RNA benötigt, so kann diese mit Hilfe der *in vitro* Transkription erzeugt werden. Hierfür wird die entsprechende DNA in einen Vektor kloniert, in dessen Kontext sie unter Kontrolle von Promotoren steht, welche die Transkription durch bestimmte RNA-Polymerasen erlauben. In diesem Fall wurden 400 bp ribosomale DNA zunächst in einen pBluescript II KS+ Vektor (Stratagene) kloniert und sequenziert. Nun war die DNA in der

multiplen Klonierungsstelle des Vektors derart orientiert, dass durch Transkription über einen T7-Promotor ein Transkript entstand, welches ein Fragment der ribosomalen 18S rRNA der Bäckerhefe darstellte. Um eine effiziente Termination der Transkription zu gewährleisten, wurde der Vektor entsprechend mit einem Restriktionsenzym linearisiert und über eine Säule gereinigt, bevor er als Matrize verwendet wurde. Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

5x T7 Puffer	10 µl
DNA-Matrize linear (18 ng/µl)	3 µl
T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)	1,5 µl
NTPs (je 25 mM)	5 µl
RNasin (4,6 mg/ml)	0,5 µl
H ₂ O (RNase-frei)	ad 50 µl

Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag erfolgte die Degradation der DNA-Matrize durch Zugabe von DNase I (High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche). Hierfür wurde jedem Ansatz 1 µl DNase I (18,18 U/µl) beigegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurden alle Ansätze vereint, anschließend wieder aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

6.4 Proteinreinigung und proteinanalytische Methoden

6.4.1 Proteinreinigung aus *E.coli*

Alle bei dieser Arbeit gereinigten Proteine trugen N-terminal ein 6xHis-Epitop und wurden über eine Ni-NTA-Matrix (Ni-Nitrilotriacetic acid) aufgereinigt. Die frisch geernteten oder auf Eis aufgetauten Expressionskulturen (Kultivierung: siehe 6.1.1) wurden zunächst in 20-25 ml Waschpuffer (His-Equilibrierungs- und Waschpuffer) resuspendiert. Nach dreifachem mechanischem Zellaufschluss an der sog. French Press wurde die Zelldebris abzentrifugiert (15 min bei 15000 Upm und 4°C) und das Lysat sterilfiltriert. Die Reinigung erfolgte dann entweder durch Säulenreinigung oder durch eine Chargenreinigung. Für die Säulenreinigung wurde eine entsprechende Säule mit Ni-NTA-Matrix gepackt und das Lysat auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und das Protein durch Gabe des His-Elutionspuffers mit hoher Konzentration an Imidazol in Fraktionen zu je 1 ml eluiert. Für die Chargenreinigung wurde in eine 50 ml Falconröhre 2 ml Ni-NTA-Matrix gegeben, diese mit 10-25 ml Wasser und anschließend 10-25 ml Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation für 2 min bei 2000 Upm). 15-25 ml sterilfiltriertes Zelllysate wurden dann zu dem Säulenmaterial gegeben und mit diesem zusammen für 1 h bei 4°C gewippt. Nach Bindung des

rekombinanten Proteins an die Säulenmatrix wurde diese abzentrifugiert, der Überstand (Durchlauf) abgezogen und zweimal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation für 2 min bei 2000 Upm). Nach dem zweiten Waschschrift wurden 2-4 ml Pufferüberstand in der 50 ml Falconröhre belassen um das Säulenmaterial in zwei 2 ml Reaktionsgefäße überführen zu können. Zur Entfernung überschüssigen Waschpuffers wurden die 2 ml Reaktionsgefäße für 2 min bei 2000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Als letzter Schritt erfolgte dann die Elution des jeweiligen Proteins durch den His-Elutionspuffer mit hoher Konzentration an Imidazol. Hierfür wurden 0,5-1 ml Elutionspuffer zugegeben, mehrmals gewendet oder mehrere Minuten bei 4°C gerollert und für 2 min bei 2000 Upm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit eluiertem Protein dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde mehrfach wiederholt. Wann immer möglich wurde bei der Proteinreinigung auf Eis gearbeitet.

6.4.2 Proteinlysate von *S.cerevisiae* Kulturen

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden jeweils 15 OD₆₀₀ Zellen geerntet (Kultivierung: siehe 6.2.1), mit 1 ml Wasser gewaschen (4°C) und in 1,5 ml Schraubdeckelgefäße mit Glasperlen überführt. Nach Zentrifugation für 10-15 sec bei 13200 Upm wurde der Überstand abgezogen und entweder sofort weitergearbeitet oder die Zellen bei -20°C oder -70°C eingefroren. Nach Zugabe von 150 µl Puffer3 (4°C) erfolgte dann der mechanische Zellaufschluss in der Retsch-Mühle für 5 min bei maximaler Frequenz und 4°C. Die Zelldebris wurde dann für 3 min bei 13200 Upm und 4°C abzentrifugiert. Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurden 5 µl Lysat zu 45 µl Wasser gegeben, von dieser 1:10 Verdünnung wurden wiederum 5 µl zu 495 µl Wasser gegeben. Zu dieser 1:1000 Verdünnung wurden dann 500 µl Bradford-Reagenz gegeben und nach mehreren Minuten wurde die OD₅₉₅ gemessen. Für den Nullwert wurden 500 µl Wasser mit 500 µl Bradford-Reagenz verwendet. Des Weiteren wurden 50 µl Lysat mit 50 µl 2x LSB (Laemmli Sample Buffer) vermischt, 10 min bei 100°C inkubiert und auf Eis gestellt. Im Falle von Proteinlysaten aus Hefekulturen wurden 1 bzw. 2 OD Protein (1/OD₅₉₅ µl bzw. 2/OD₅₉₅ µl) bei einem SDS-Gellauf aufgetragen. Um Proteindegradation möglichst zu unterbinden wurde auf Eis gearbeitet.

6.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis) handelt es sich um eine Methode, durch welche Proteine für analytische Zwecke ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden können (Laemmli 1970). Grundlegend wird in einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid durch Zugabe von Ammoniumpersulfat als Radikalstarter und Tetramethylethylendiamin als Katalysator eine Radikalreaktion gestartet, welche die Bildung eines

vernetzten Polymers zur Folge hat. Proteine werden bei der Probenvorbereitung durch Kochen, Anlagerung von SDS (Natriumdodecylsulfat) und Reduktion von Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol vollständig denaturiert. SDS und β -Mercaptoethanol sind Komponenten des Probenpuffers LSB. Da die Anlagerung von negativem SDS proportional zur Länge der Aminosäurekette eines Proteins ist, erhalten die Proteine negative Ladungen proportional zu ihrer Länge. Bei Auftragung der Proben auf ein Polyacrylamidgel und Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Proteine durch die Gelmatrix zur Anode und werden dabei dem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Es wurden bei vorliegender Arbeit zweiteilige Gele von 1 mm Dicke erstellt, welche sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammensetzten. Zunächst wurden 9-12 %ige Trenngele zwischen Glasplatten gegossen und nach Auspolymerisieren der Trenngele wurden 4 %ige Sammelgele auf die Trenngele aufgegossen. Durch Einbringen eines Kammes in das Sammelgel waren nach Auspolymerisieren Aussparungen für die Probenauftragung vorhanden. Die Gele wurden in entsprechende Apparaturen eingesetzt und für den Gellauf unter Puffer gesetzt (1x Turbo-LRB). Sammelgele und Trenngele wiesen unterschiedliche pH-Werte und unterschiedlichen Vernetzungsgrad auf, was letztendlich ein Aufkonzentrieren der Proben am Übergang zwischen Sammelgel und Trenngel zur Folge hatte. Dadurch traten alle Proteine relativ gleichzeitig in das Trenngel ein. Neben den Proben wurde bei jedem SDS-Gellauf 5 μ l eines Proteingrößenstandards (ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range™ von NEB) aufgetragen. Die Gelläufe wurden bei 20-25 mA oder 200 V durchgeführt und abgestoppt, wenn das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau die untere Gelkante erreicht hatte. Die Gele wurden entweder für Western-Blots und anschließende Immunodetektion oder unspezifische Coomassie-Färbung verwendet.

6.4.4 Western-Blot, Immunodetektion und Quantifizierung von Western-Blots

Der sog. Western-Blot dient im Zusammenhang mit Immunodetektion des spezifischen und quantitativen Nachweises eines Zielproteins. Zunächst werden Proteine nach einem SDS-Gellauf durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979), ein primärer Antikörper kann dann an das Zielprotein binden und durch Bindung eines sekundären, mit einem Chromophor gekoppelten, Antikörpers an den primären kann dann die Detektion erfolgen. Nach dem Gellauf wurde in Transferpuffer getränktes Whatman-Paper auf die Anode einer Blotterapparatur gelegt, darauf die mit Wasser befeuchtete Nitrocellulosemembran. Auf die Membran wiederum wurde das in Wasser gewaschene Gel aufgelegt und darauf ein weiteres, in Transferpuffer getränktes Whatman-Paper. Auf diesen Aufbau wurde dann die Kathode der Blotterapparatur aufgesetzt und die Proteinübertragung wurde für 70 min bei 40 mA pro Gel durchgeführt. Mittels unspezifischer Ponceau-Färbung der Membran konnte die Proteinübertragung überprüft werden. Durch Wippen der Membran

unter Magermilchpulver enthaltendem Puffer (5 % Magermilchpulver in TBS-T) wurde diese für mindestens 30 min geblockt, um unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Anschließend erfolgte die Bindung des primären Antikörpers über Nacht unter Wippen bei 4°C. Nach Waschen der Membran (3x 5 min mit je 5 ml TBS-T) wurde der sekundäre Antikörper appliziert (2 h Wippen unter Lichtausschluss) und erneut gewaschen (3x 5 min mit je 5 ml TBS-T). Die Membran wurde dann in 5 ml TBS aufgenommen. Die Detektion der Western-Blots erfolgte am Odyssey Scanner der Firma LI-COR Biosciences. Die Anregung der Chromophore der an die Zielproteine indirekt gebundenen sekundären Antikörper erfolgte immer mit 780 nm Wellenlänge und durch Anregung mit 680 nm Wellenlänge konnte der Proteinstandard gut erfasst werden. Für die Quantifizierung von Western-Blots wurde das Programm ImageJ verwendet. Durch die Auswahl eines Membranbereichs ohne Signal konnte der durchschnittliche Pixelwert des Hintergrunds vom Gesamtblot subtrahiert werden. Es wurden nur Signale innerhalb eines Blots verglichen, wobei identische Grenzwerte für die Messung verschiedener Banden verwendet wurden. Die Gesamtsignale (Raw Integrated Density) wurden ermittelt. In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Scanintensitäten zu allen gezeigten Western-Blots gelistet.

Abbildung	Zielproteine	Intensität 780 nm
4.20a	Hmo1-GFP	6
4.23b	Hmo1-GFP; BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP)	5
4.23c	Hmo1-GFP; ΔBoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246))	6
4.23d	Hmo1-GFP; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246)); ΔBoxA,BoxBmut (GFP-Hmo1(86-246;F113,114A))	8
4.29c	Hmo1-GFP; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246)); ΔBoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246))	7
4.31c	Hmo1-GFP; BoxA (Hmo1(1-98)-GFP)	5
4.31d	Hmo1-GFP; BoxA-NLS (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-236))	6
4.32a	Hmo1-GFP; BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP)	5
4.33a	Hmo1-GFP; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246))	8
4.34b	Hmo1-GFP; ΔNLS (Hmo1(1-210)-GFP)	6
4.34c	Hmo1-GFP; NLS (GFP-Hmo1(212-236))	7
4.35b	Hmo1-GFP; BoxA-NLS (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-236))	6
4.35c	Hmo1-GFP; NLS-C (GFP-Hmo1(212-246))	7
4.35d	Hmo1-GFP; BoxA-NLS-C (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-246))	6
9.2a	Hmo1-GFP; ΔBoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246))	6
9.2b	Hmo1-GFP; BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP)	5
9.2c	Hmo1-GFP; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246)); ΔBoxA,BoxBmut (GFP-Hmo1(86-246;F113,114A))	8
9.3a	6xHis-Hmo1; 6xHis-ΔBoxA (6xHis-Hmo1(86-246)); 6xHis-BoxBmut (6xHis-Hmo1(F113,114A)); 6xHis-ΔBoxA,BoxBmut (6xHis-Hmo1(86-246;F113,114A)); 6xHis-ΔBoxB (6xHis-Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246)); 6xHis-GFP	5

Tabelle 1: Scanintensitäten Western-Blots

6.4.5 Konzentrationsbestimmung und Angleichung von gereinigten Proteinen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Eine Möglichkeit, Proteine in einem Polyacrylamidgel zu visualisieren, ist die Färbung mit dem Farbstoff Coomassie. Dieser Farbstoff bindet an jegliches Protein und färbt somit unspezifisch. Um die Massenkonzentrationen gereinigter Proteine zu bestimmen wurde eine BSA-Eichgerade (Bovine Serum Albumine) durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung erstellt. Bei der hier angewendeten Ni-NTA-Affinitätschromatographie 6xHis-markierter Proteine war meist ein deutlicher Proteinbackground vorhanden und durch dieses Vorgehen konnte spezifisch die Konzentration des eigentlichen Zielproteins durch Messung der entsprechenden Bande bestimmt werden. Von gereinigtem BSA der Firma NEB wurden verschiedene Massen auf ein Gel aufgetragen, nämlich 2 µg, 1 µg, 0,5 µg und 0,25 µg. Die Werte wurden unabhängig voneinander pipettiert. Auf selbiges Gel wurden zweimal 1 µl des zu messenden Proteins aufgetragen. Nach dem Gellauf erfolgte die Färbung mit Coomassie nach einem Quickstain Protokoll (Luo et al., 2006). Zur Entfernung von SDS wurden die Gele 3x 5 min mit deionisiertem Wasser gewaschen, anschließend erfolgte die Färbung mit einer 0,01% Coomassie G250 Lösung für 15 min auf der Wippe. Zum Entfernen überschüssigen Farbstoffes wurde 2x 5min mit deionisiertem Wasser gewaschen. An Protein gebundenes Coomassie zeigt starke Fluoreszenz in einem infrarotnahem Wellenlängenbereich, welche mit Licht von 680 nm effizient angeregt werden kann. Somit wurden alle mit Coomassie gefärbten Gele am Odyssey Scanner der Firma LI-COR im entsprechenden Kanal detektiert. Diese Methode ist sensitiv und quantitativ in einem Bereich von 10 ng bis 20 µg (Luo et al., 2006). Für die Quantifizierung der entsprechenden Banden in ImageJ wurde der Hintergrund abgezogen (durchschnittlicher Pixelwert in Gelbereich ohne Signal), der untere Grenzwert nahe dem verbleibenden Hintergrund und der obere Grenzwert auf Maximum gesetzt. Die Gesamtsignale wurden ermittelt (Raw Integrated Density) und es folgte die Erstellung einer Eichgerade in Excel, über deren Geradengleichung dann die aufgetragene Masse des Zielproteins und letztlich seine Konzentration bestimmt wurde.

Sämtliche gereinigten Derivate von 6xHis-Hmo1 mussten für *in vitro* Studien möglichst präzise auf das Wildtypprotein angeglichen werden. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen der Wildtypkontrolle und jeweils eines Derivats auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die eingesetzten Massen betragen jeweils 1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg und 0,125 µg (Einzelwerte unabhängig pipettiert). Coomassie-Färbung, Detektion und Quantifizierung wurden wie bei der Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Durch Normalisierung der Banden des Derivats auf die entsprechenden Banden des Wildtypproteins wurde die durchschnittliche Abweichung der Derivatbanden bezüglich der Wildtypbanden berechnet und entsprechend wurde die Konzentration des Derivats angeglichen. Dies wurde solange wiederholt, bis die durchschnittliche Abweichung der Banden eines Derivats bezüglich der Wildtypbanden maximal

11 % betrug. Dann galt das jeweilige Derivat als angeglichen. Gelfotos für die Proteinangleichungen sind in Abbildung 9.3b gezeigt. Hier wurde jeweils mit 680 nm bei einer Intensität von 5 angeregt.

6.5 Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen

Für die Mikroskopie wurden generell wachsende Vollmediumskulturen verwendet. Bei Verwendung stationärer Kulturen ist dies in den entsprechenden Abbildungslegenden angegeben. Es wurden jeweils 3-5 OD₆₀₀ Zellen abzentrifugiert, das organische Vollmedium abgegossen und die Zellen in 1 ml Wasser aufgenommen. Sofort wurden davon 5-7 µl auf ein Deckgläschen (24 x 60 mm) gegeben und ein Agaroseblöcken synthetischen Vollmediums (SD++) daraufgesetzt. Das organische Vollmedium wurde zur Reduzierung des Hintergrundrauschens entfernt. Alle gezeigten Aufnahmen wurden an inversen Fluoreszenzmikroskopen mit 63x Objektiven (Immersionöl) gemacht und bei den verwendeten Fluoreszenzproteinen handelte es sich immer um GFP (Green Fluorescent Protein) bzw. mCherry. Dementsprechende Filter waren vorhanden, bzw. dementsprechende AOBs-Einstellungen (Acousto-Optical Beam Splitter) wurden im Falle des Leica-Systems gewählt.

6.5.1 Nicht konfokale Mikroskopie

Nicht konfokale Mikroskopie wurde an einem Axio Observer.Z1 der Firma Zeiss in Verbindung mit einer 120 W HXP-Lampe Kübler Codix als Anregungsquelle durchgeführt. Die Lichtquelle wurde stets auf niedrigster Stufe betrieben, wobei die Belichtungszeit entsprechend der jeweiligen Signale gewählt wurde. Im Durchlichtkanal wurde differentieller Interferenzkontrast gewählt. Als Detektor diente die CCD-Kamera (Charge-coupled Device) AxioCam MRm (Zeiss). Obwohl es sich hierbei um kein konfokales System handelte, wurden z-Stapel mit 12 Ebenen aufgenommen, wobei der Abstand der Ebenen 500 nm betrug. Die Aufnahmen fanden stets bei Raumtemperatur statt, welche zwischen 22°C und 25°C schwankte. Die Aufnahmen wurden im 16bit Format angefertigt. Die Belichtungszeiten für mCherry und GFP zu den entsprechenden Experimenten sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Abbildung	Fluoreszenzfusionen	Belichtungszeit mCherry (ms)	Belichtungszeit GFP (ms)
4.32	mCherry-NLS; BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP)	50	25
4.36	mCherry-NLS; ΔC (Hmo1(1-236)-GFP)	50	80

Tabelle 2: Belichtungszeiten zu nicht konfokaler Mikroskopie

6.5.2 Konfokale Spinning-disc-Mikroskopie

Diese Form der konfokalen Mikroskopie wurde ebenfalls an einem Axio Observer.Z1 durchgeführt, allerdings mit verschiedenen Lasern als Lichtquellen. Für die Anregung von GFP diente ein OPLS (Optically Pumped Semiconductor Laser) bei einer Wellenlänge von 488 nm und für die Anregung von mCherry ein Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 561 nm. Die Ausgabeleistung wurde wie die

Belichtungszeit den entsprechenden Signalen angepasst und als Detektor diente auch hier eine AxioCam MRm. Als Kontrastmethode im Durchlichtkanal wurde bei diesem System differentieller Interferenzkontrast angewandt. Mit dem Mikroskop gekoppelt war eine CSU-X1 Spinning-disc-Einheit der Firma Yokogawa Electric Corporation. Die aufgenommenen z-Stapel umfassten immer 14 Ebenen mit einem Abstand von 400 nm. Im Falle des Spinning-disc-Systems wurden bei nahezu allen Zeitreihen 15 Zeitwerte mit Intervallen von 2 Minuten erfasst, um eine gute Vergleichbarkeit und Minimierung von sowohl Bleichen als auch Phototoxizität zu gewährleisten. Bei Mutanten, bei welchen der Trennungsvorgang in manchen Zellen deutlich länger benötigte (*Δcin8*, *cdc14-3*), mussten dementsprechend mehr Zeitwerte erfasst werden. Um bei bestimmten Experimenten Zellen über längere Zeiträume beobachten zu können, wurden dementsprechend größere Zeitintervalle gewählt, um die Zellen zu schonen. Für bestimmte Stämme mussten Aufnahmen bei 37°C gemacht werden und so wurde in diesem Fall statt eines Deckgläschens ein Multiwell-Slide (Firma ibidi) für die Probenvorbereitung verwendet, welches am Mikroskop in eine Heizkammer der Firma ibidi gesetzt wurde. Die Präparate wurden vor Start der Aufnahme vorinkubiert und auch während der Mikroskopie auf 37°C gehalten (Deckel und Platte der Heizkammer auf 37°C). Ansonsten erfolgten die Aufnahmen bei Raumtemperatur (21°C-23°C). Die Bildtiefe betrug 16bit. Die Laserintensitäten und Belichtungszeiten zu allen gezeigten Experimenten sind in der folgenden Tabelle gelistet. Die Grundleistungen der Laser waren bei allen Experimenten identisch.

Abbildung	Fluoreszenzfusionen	Laserintensität 561 (%)	Laserintensität 488 (%)	Belichtungszeit (ms)
4.1	mCherry-NLS; Hta2-GFP	50	1	100
4.2	mCherry-NLS; Rpa135-GFP	13	8	200
4.3	mCherry-NLS; Nop56-GFP	45	1	200
4.4	mCherry-NLS; Nsr1-GFP	35	1	200
4.5	mCherry-NLS; Net1-GFP	13	10	200
4.6	mCherry-NLS; Fob1-GFP	13	20	200
4.7	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
4.8	siehe 4.2-4.7			
4.11	mCherry-NLS; Rpa135-GFP	13	8	200
	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
4.12	mCherry-NLS; Rpa135-GFP	35	8	200
	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
4.13	Hmo1-3mCherry; Cdc14-GFP	45	20	200
4.14	mCherry-NLS; Rpa135-GFP	35	8	200
	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
	mCherry-NLS; Nop56-GFP	35	1	200
	mCherry-NLS; Nsr1-GFP	35	1	200
4.15	mCherry-NLS; Hta2-GFP	50	1	100
4.16	Hmo1-3mCherry; Rpa135-GFP	45	8	200
4.17	Hmo1-3mCherry; Rpa135-GFP	45	8	200
4.18	Hmo1-3mCherry; Rpa135-GFP	45	8	200
4.21	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
	mCherry-NLS; Hmo1-GFP (ÜE <i>pHMO1</i>)	35	1	200

	mCherry-NLS; Hmo1-GFP (ÜE <i>pTEF2</i>)	70	1	100
4.22	siehe 4.21			
4.23	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
	mCherry-NLS; BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP)	35	1	200
	mCherry-NLS; ΔBoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246))	35	5	200
	mCherry-NLS; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246))	35	5	200
	mCherry-NLS; ΔBoxA,BoxBmut (GFP-Hmo1(86-246;F113,114A))	35	5	200
4.24	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
4.25	Nop56-3mCherry; BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP)	60	1	100
4.26	Nop56-3mCherry; ΔBoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246))	25	5	200
4.27	Nop56-3mCherry; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246))	25	5	200
4.28	Nop56-3mCherry; ΔBoxA,BoxBmut (GFP-Hmo1(86-246;F113,114A))	25	5	200
4.29	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
	mCherry-NLS; Hmo1-GFP (ÜE <i>pHMO1</i>)	35	1	200
	mCherry-NLS; Hmo1-GFP (ÜE <i>pTEF2</i>)	70	1	100
	mCherry-NLS; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246))	35	10	200
	mCherry-NLS; ΔBoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246))	35	1	200
4.30	mCherry-NLS; BoxBmut (Hmo1(F113,114A)-GFP)	35	1	200
	mCherry-NLS; ΔBoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246)) (<i>Δhmo1</i>)	35	5	200
	mCherry-NLS; ΔBoxB (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246)) (<i>HMO1</i>)	35	1	200
	mCherry-NLS; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246))	35	5	200
	mCherry-NLS; ΔBoxA,BoxBmut (GFP-Hmo1(86-246;F113,114A))	35	5	200
4.31	mCherry-NLS; BoxA (Hmo1(1-98)-GFP)	35	10	200
	mCherry-NLS; BoxA-NLS (Hmo1-(1-98)-GFP Hmo1(212-236))	35	5	200
	Nop56-3mCherry; BoxA-NLS (Hmo1-(1-98)-GFP Hmo1(212-236))	25	5	200
4.33	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	25	5	200
	mCherry-NLS; ΔBoxA (GFP-Hmo1(86-246))	35	5	200
4.34	mCherry-NLS; ΔNLS (Hmo1(1-210)-GFP)	35	15	200
	mCherry-NLS; NLS (GFP-Hmo1(212-236))	35	5	200
4.35	mCherry-NLS; BoxA-NLS (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-236))	35	5	200
	mCherry-NLS; NLS-C (GFP-Hmo1(212-246))	35	10	200
	mCherry-NLS; BoxA-NLS-C (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-246))	35	1	200
	Nop56-3mCherry; BoxA-NLS-C (Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(212-246))	25	5	200
9.5	mCherry-NLS; Nop56-GFP	45	1	200
	mCherry-NLS; Hmo1-GFP (<i>RRN3</i>)	25	5	200
	mCherry-NLS; Hmo1-GFP (<i>rrn3(S213P)</i>)	30	5	200
	Nsr1-GFP	35	1	200
9.6	NLS-MSCP-GFP	-	20	200
	Hmo1-3mCherry; NLS-MSCP-GFP	50	20	200
9.7	mCherry-NLS; Smc2-GFP	45	25	200

Tabelle 3: Laserintensitäten und Belichtungszeiten zu Spinning-disc-Mikroskopie

6.5.3 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie und Bleichexperimente

Mit dem Leica TCS-SP8 stand ein konfokales Laser-Scanning System zur Verfügung, mit welchem Bleichexperimente durchgeführt werden konnten. Die Anregung von GFP erfolgte mittels eines Argonlasers bei 488 nm und die Anregung von mCherry durch einen Diodenlaser bei 561 nm, wobei die jeweilige Ausgabeleistung den untersuchten Signalen angepasst wurde. Im Durchlichtkanal wurde Phasenkontrast angewendet. Als Detektoren kamen bei den gezeigten Experimenten PMTs

(Photomultiplier Tubes) zum Einsatz. Grundlegende Einstellungen, welche bei allen gezeigten Aufnahmen identisch waren, sind eine Scanfrequenz von 600 Hz (unidirektional) und ein Scanbereich von 128 x 128 Pixel. Diese Parameter bestimmen zusammen, wie lange der Laserstrahl auf einem Pixel des Präparats verweilt (pixel dwell time). Bei gewissen Experimenten wurde nur der FRAP-Modus des Systems verwendet. Da in diesem Arbeitsmodus nur eine optische Ebene genutzt werden kann, wurde hierbei das Pinhole auf 2 AU (Airy Units) gesetzt. Trotzdem war in diesen Fällen keine Quantifizierung der Gesamtsignale möglich, da die Signale nicht vollständig erfasst wurden. Um bei bestimmten Experimenten eine quantitative Auswertung bezüglich der Gesamtsignale zu ermöglichen, wurde in diesen Fällen der FRAP-Modus mit z-Stapeln kombiniert. Es handelte sich dann um Stapel mit 14 optischen Schnitten im Abstand von jeweils 420 nm. In diesen Fällen betrug die Öffnungsweite des Pinhole sowohl im FRAP-Modus als auch bei den z-Stapeln 1 AU. Bei nicht quantifizierten Experimenten wurde eine Bildtiefe von 8bit gewählt, bei quantifizierten Experimenten wurde bei der Aufnahme eine Bildtiefe von 16bit gewählt und die Option direct overflow aktiviert. Die Aufnahmen wurden stets bei Raumtemperatur durchgeführt (21°C-24°C). In der folgenden Tabelle sind die Belichtungsintensitäten zu den gezeigten Experimenten angegeben. Die Grundleistung der Laser war bei allen Versuchen identisch.

Abbildung	Fluoreszenzfusionen	Laserintensität Aufnahme 561 (%)	Laserintensität Bleichen 561 (%)	Laserintensität Aufnahme 488 (%)	Laserintensität Bleichen 488 (%)
4.9a	mCherry-NLS; Rpa135-GFP	0,5	20	7	100
4.9b, c	mCherry-NLS; Rpa135-GFP	0,7	30	1,2	100
4.10a	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	1,2	30	2,4	100
4.10b, c	mCherry-NLS; Hmo1-GFP	1,8	10	1	100

Tabelle 4: Laserintensitäten zu Bleichexperimenten

6.5.4 Bearbeitung und Quantitative Auswertung von Mikroskopiedaten

Generell wurden sämtliche Mikroskopiedaten mit dem Programm ImageJ bearbeitet und ausgewertet. Da bei den meisten Aufnahmen z-Stapel durchgeführt wurden, mussten diese für die zweidimensionale Darstellung der Mikroskopiedaten in eine Ebene projiziert werden. Hierbei wurde für die Fluoreszenzkanäle entweder eine Aufsummierung der entsprechenden Pixelwerte aus den verschiedenen Ebenen oder die Darstellung des jeweils maximalen Werts gewählt. Bei Durchlichtkanälen wurde immer der durchschnittliche Wert projiziert. Helligkeits- und Kontrasteinstellungen wurden für Fluoreszenzkanäle derart getätigt, dass eine optimale Darstellung gegeben war (bestimmter Wertebereich oder Normalisierung). Im Fall von Zeitreihen wurde für einen Fluoreszenzkanal bei allen Zeitwerten derselbe Wertebereich für die Signaldarstellung gewählt. Durchlichtkanäle wurden immer derart normalisiert, dass 0,02 % der Pixel gesättigt waren. Für Quantifizierungen von konfokalen Aufnahmen wurde immer eine Aufsummierung der optischen Schnitte durchgeführt. Anschließend wurde der durchschnittliche Pixelwert aus einem Bereich

außerhalb der Zellen vom Gesamtbild subtrahiert und es mussten Grenzwerte für die Signalerkennung festgelegt werden. Der obere Grenzwert wurde stets auf den maximal möglichen Wert gesetzt, der untere wurde stets sehr nahe am verbleibenden Hintergrund gewählt, um einen möglichst hohen Signalanteil erfassen zu können. Die ermittelten Gesamtsignalwerte ergaben sich durch Addition der einzelnen Pixelgrauwerte eines Signals (Raw Integrated Density). Wurden Fluoreszenzsignale in verschiedenen genetischen Hintergründen verglichen, so hatten diese denselben genetischen Ursprung. Neben identischen Parametern in der Mikroskopie wurden dann auch identische Parameter bei der quantitativen Auswertung verwendet. Auch beim Vergleich von Zellen desselben Stammes in verschiedenen Situationen (wachsend/stationär) wurden identische Parameter für Mikroskopie und Quantifizierung gewählt.

6.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Beim Electrophoretic Mobility Shift Assay handelt es sich um eine Methode für den Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren. Durch die Bindung eines Proteins an eine Nukleinsäure ändert sich das Laufverhalten der Nukleinsäure bei der Gelelektrophorese und somit kann die Bildung von Komplexen nachgewiesen werden. Die grundlegend beschriebenen Vorgehensweisen (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981) wurden im Laufe der Jahre je nach Bedarf variiert und angepasst. Bei vorliegender Arbeit wurden relativ lange Nukleinsäuren (dsDNA: 400 Nukleotide; ssRNA: 427 Nukleotide) bei hoher Konzentration (17 nM) in den Bindeansätzen verwendet, weswegen Agarosegele und anschließende Färbung mit Ethidiumbromid für die Visualisierung verwendet wurden. Da wegen der Länge der verwendeten Nukleinsäuren keine 1:1 Stöchiometrie bei der Komplexbildung zu erwarten war und neben der Bindungskonstanten auch die Kooperativität der Nukleinsäurebindung analysiert werden sollte, wurde bei der Kurvenanpassung die Hill-Gleichung angewendet (Hill, 1910; Ryder et al., 2008).

Es wurden Vorverdünnungen der Proteine in Elutionspuffer erstellt, wobei die doppelten der in den Bindungsansätzen gewünschten Proteinkonzentrationen eingestellt wurden. Des Weiteren wurde ein Mix aus Nukleinsäure, Bindungspuffer (Restriktionspuffer NEB3 der Firma New England Biolabs), DNA-Laufpuffer und Wasser angesetzt, in welchem die Nukleinsäure und die Pufferkomponenten die doppelten Konzentrationen der in den Bindungsansätzen gewünschten aufwiesen. Es wurden dann je 5 µl Mix in Reaktionsgefäße vorgelegt, 5 µl vorverdünntes Protein zugegeben (Kontrolle: 5 µl Elutionspuffer) und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Bindungsansätze wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf 1,5 %ige Agarosegele aufgetragen. Der Gellauf erfolgte 1 h bei einer konstanten Spannung von 80 V und Raumtemperatur, der verwendete Laufpuffer war 1x TAE. Nach dem Lauf wurde 1 h unter Wippen mit Ethidiumbromid gefärbt (1xTAE-Puffer mit 1 µg/ml EtBr). Detektiert wurden die Gele mit einem RedTM Imaging System (Alpha Innotech), wobei

immer gleiche Apertur (Maximum-5), gleiche Vergrößerung (Maximum-12) und gleiche Belichtungszeit (dsDNA: 200 ms; ssRNA: 400 ms) gewählt wurden. Für die anschließende Quantifizierung wurde wiederum der durchschnittliche Pixelwert aus einem Gelbereich ohne Signal als Hintergrund abgezogen und es wurden zwei Grenzwerte gewählt, wobei der obere auf Maximum und der untere möglichst niedrig gesetzt wurde. Zusätzlich wurde durch Verwendung eines Rahmens für jede Gelspur nur derjenige Signalanteil quantifiziert, welcher gleiche Laufweite wie freie Nukleinsäure in der Kontrollspur aufwies (Raw Integrated Density verwendet). Durch Normalisierung der ermittelten Signale jeder Spur auf den Kontrollwert ohne Protein wurde somit für jede Titrantenkonzentration der Anteil freier Nukleinsäure als Wert zwischen 0 und 1 berechnet. Um den Anteil von in Komplex befindlicher Nukleinsäure k für die jeweiligen Proteinkonzentrationen zu erhalten, wurden dementsprechend die Werte für den Anteil freier Nukleinsäure von 1 subtrahiert. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt und die k -Werte wurden somit jeweils aus drei Werten gemittelt. Mit den aus den Experimenten ermittelten k -Werten, den gegebenen Titrantenkonzentrationen und der Hill-Gleichung konnte dann die Kurvenanpassung und damit die Berechnung der das Bindungsverhalten charakterisierenden Werte, nämlich der EC_{50} und des Hill-Koeffizienten, durchgeführt werden. Es wurden hierbei mit Hilfe des Solver Add-in und der Hill-Gleichung in Excel die Werte für EC_{50} und n derart eingestellt, dass eine Kurve mit theoretischen k -Werten möglichst exakt an die experimentell ermittelten k -Werte angepasst wurde (EC_{50} und n wurden von Excel-Solver unter der Bedingung berechnet, dass die Summe der quadrierten Abweichungen zwischen experimentellen und theoretischen k -Werten minimal wurde). Im Folgenden ist die für die Auswertung verwendete Hill-Gleichung dargestellt (nach Ryder et al., 2008).

$$k = \frac{1}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c_t}\right)^n}$$

k : Anteil von Nukleinsäure in Komplex (experimentell ermittelt)

c_t : Titrantenkonzentration (bekannt)

EC_{50} : Titrantenkonzentration bei halb maximalem Effekt (zu berechnen)

n : Hill-Koeffizient (zu berechnen)

7. Material

7.1 Medien

7.1.1 Bakterienmedien und Stammlösungen für Bakterienmedien

Bakterienmedien

LB-Medium (autoklaviert)	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	NaOH	300 µl (1 M)/l
	Für Platten: 1,7 % Agar	
	Antibiotikazusätze bei Bedarf	
	Ampicillin: Endkonzentration 100 µg/ml	
SOC-Medium (sterilfiltriert)	Chloramphenicol: Endkonzentration 50 µg/ml (Flüssigmedium)	
	Enkonzentration 34 µg/ml (Platten)	
	Bacto Trypton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
Glukose	20 mM	

Stammlösungen für Bakterienmedien

Ampicillin (sterilfiltriert)	Ampicillin	100 mg/ml
	Ethanol	50 %
Chloramphenicol	Chloramphenicol	50 mg/ml
	Ethanol	100 %
10 % Rhamnose (sterilfiltriert)	Rhamnose-Monohydrat	11 g/ 100 ml

7.1.2 Hefemedien und Stammlösungen für Hefemedien

Hefemedien

Organisches Vollmedium (XY) (autoklaviert)	Bacto Pepton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l

	Adenin	0,1 g/l
	Tryptophan	0,2 g/l
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	Zucker	20 g/l
	Für Platten: 1,7 % Agar	
	Antibiotikumzusatz bei Bedarf	
	G418 (S288c)	200 µg/ml
Synthetisches Vollmedium für Mikroskopie (SD++)	Agarose Ultra Pure	300 mg
	H ₂ O	21 ml
	10x Dropout++	3 ml
	10x YNB	3 ml
	Glukose (20%)	3 ml
	Bei Bedarf	
	Rapamycin	400 ng/ml
	Cycloheximid	100 µg/ml
Selektivmedium (S)	H ₂ O mit 1,7 % Agar autoklaviert	350 ml
	10x Dropout-5 bzw. 10x CSM-7	50 ml
	10x YNB	50 ml
	Zucker (20%)	50 ml
	Folgende Nucleobasen bzw. Aminosäuren nach Bedarf	
	100x Adenin	5 ml
	100x Histidin	5 ml
	100x Leucin	5 ml
	100x Tryptophan	5 ml
	50x Uracil	10 ml
	Antibiotikumzusatz bei Bedarf	
	G418 (S288c)	200 µg/ml
Novozymmedium (sterilfiltriert)	Sorbitol	1 M
	Tris/HCl pH7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	Frisch zugeben	

	DTT	50 mM
	Novozym	2 mg/ml
Prä-Sporulationsmedium (sterilfiltriert)	Bacto Pepton	3 g/l
	Bacto Yeast Extract	8 g/l
	Glukose	100 g/l
	Adenin	50 mg/l
Sporulationsmedium (sterilfiltriert)	10x Dropout++	0,1x
	Bacto Yeast Extract	1 g/l
	Glukose	0,5 g/l
	Kaliumacetat	10 g/l

Stammlösungen für Hefemedien

100x Adenin (sterilfiltriert)	Adeninsulfat	5 g/l
10x Complete Supplement Mixture-7 (CSM-7) (sterilfiltriert)	Arginin HCl	500 mg/l
	Asparaginsäure	800 mg/l
	Isoleucin	500 mg/l
	Phenylalanin	500 mg/l
	Threonin	1000 mg/l
	Tyrosin	500 mg/l
	Valin	1400 mg/l
Cycloheximid	Cycloheximid	10 mg/ml
	Ethanol	100 %
10x Dropout-5 (bzw. 10x Dropout++) (sterilfiltriert)	Alanin	500 mg/l
	Arginin	500 mg/l
	Asparagin	500 mg/l
	Asparaginsäure	1000 mg/l
	Cystein	500 mg/l
	Glutamin	500 mg/l
	Glutaminsäure	1000 mg/l
	Glycin	500 mg/l
	(myo-) Inositol	500 mg/l
	Isoleucin	500 mg/l
	Lysin	500 mg/l
Methionin	500 mg/l	

	p-Aminobenzoesäure	50 mg/l
	Phenylalanin	500 mg/l
	Prolin	500 mg/l
	Serin	1000 mg/l
	Threonin	1000 mg/l
	Tyrosin	500 mg/l
	Valin	1000 mg/l
	Für 10x Dropout++ zusätzlich folgende Nukleobasen bzw. Aminosäuren	
	Adenin	500 mg/l
	Histidin	500 mg/l
	Leucin	1000 mg/l
	Tryptophan	1000 mg/l
	Uracil	500 mg/l
G418 (sterilfiltriert)	G418-Sulfat	200 mg/ml
20 % Glukose (autoklaviert)	Glukose-Monohydrat	200 g/l
100x Histidin (sterilfiltriert)	Histidin	5 g/l
100x Leucin (sterilfiltriert)	Leucin	10 g/l
Rapamycin	Rapamycin	200 µg/ml
Tris/EDTA/SDS	Tris/HCl pH7,5	50 mM
	EDTA	20 mM
	SDS	1 %
100x Tryptophan (sterilfiltriert)	Tryptophan	10 g/l
50x Uracil (sterilfiltriert)	Uracil	2,5 g/l
10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
(sterilfiltriert)	Ammoniumsulfat	50 g/l

7.2 Puffer und Lösungen

10x Bindungspuffer EMSA (NEB3)	Tris/HCl pH7,9 (25°C)	500 mM
	NaCl	1 M
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	10 mM

Coomassie-Färbelösung	Coomassie G250	0,01 %
	Methanol	50 %
	Eisessig	10 %
10x DNA-Laufpuffer (LP)	Glycerin	50 %
	EDTA	1 mM
	Tris/HCl pH7,8	10 mM
	Xylen cyanol FF	0,25 %
	Bromphenolblau	0,25 %
	Für Quantifizierungen/EMSA andere Farbstoffkonzentrationen	
	Xylen cyanol FF	0,025 %
Bromphenolblau	0,025 %	
EasyPrep-Puffer (EP)	Tris/HCl pH8	10 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	150 mg/ml
	Lysozym	2 mg/ml
	RNaseA	0,2 mg/ml
	BSA	0,1 mg/ml
His-Elutionspuffer	NaPi pH8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
His-Wasch- und Equilibrierungspuffer	NaPi pH8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
KH ₂ PO ₄ (sterilfiltriert)	KH ₂ PO ₄	1 M
10x KOD-Puffer		
10x Koloniepuffer	Tris/HCl pH8,5	125 mM
	KCl	560 mM
	MgCl ₂	15 mM
2x LSB (Laemmli Sample Buffer)	Tris/HCl pH6,8	120 mM
	SDS	4 %
	Glycerin	20 %
	β-Mercaptoethanol	10 %

	Bromphenolblau	0,04 %
PEG/LiAc	Tris/HCl pH7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	Lithiumacetat pH7,5	100 mM
	Polyethylenglykol 3350	40 %
PonceauS	PonceauS	1 g/l
	Eisessig	5 %
Puffer3	NaCl	150 mM
	Tris/HCl pH7,5	50 mM
	NaF	50 mM
	EDTA	5 mM
	IGEPAL CA-630	0,1%
Lachssperma-DNA	DNA	10 mg/ml
	Gelöst in TE pH8	
RNaseA	RNaseA	10 mg/ml
	Tris/HCl pH7,5	10 mM
	NaCl	15 mM
50x TAE	Tris-Base	2 M
	EDTA	50 mM
	pH8 mit Eisessig eingestellt	
10x TBS	Tris-Base	200 mM
	NaCl	1,37 M
	pH7,6 mit HCl eingestellt	
TBS-T	10x TBS	100 ml/l
	Tween20	0,1 %
10x TE	Tris/HCl pH7,5	100 mM
	EDTA	10 mM
TE/LiAc	Tris/HCl pH7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	Lithiumacetat pH7,5	100 mM
Transferpuffer	Tris-Base	5,8 g/l
	Glycin	2,9 g/l
	SDS	370 mg/l
	Methanol	10 %

10x Turbo-LRB	Tris-Base	250 mM
	Glycin	9,46 M
	SDS	1 %

7.3 Nukleinsäuren für EMSA-Studien

Ein 400 bp rDNA-Fragment aus der durch RNA Polymerase I transkribierten *RDN18* Region wurde mit den Primern WS2744 und WS2745 aus genomischer DNA amplifiziert. Die Sequenz ist im Folgenden angegeben.

```
AGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATT
CAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAAT
GTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCC
AATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGCCCGGTTGGCCGGTC
CGATTTTTTCGTGTACTGGATTTCCAACGGGGCCTTTCCTTCTGGCTAACCTTGAGTCCTTGTGGCTC
TTGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCGTATTGCTC
```

Das gleiche 400 bp *RDN18*-Fragment wurde mit den Restriktionsschnittstellen enthaltenden Primern WS2778 und WS2779 aus genomischer DNA amplifiziert, in einen pBS II KS+ Vektor (Stratagene) kloniert und das resultierende Plasmid pWS4534 wurde als Matrize bei einer *in vitro* Transkription eingesetzt, um einzelsträngige rRNA identischer Sequenz zu erzeugen. Effiziente Termination wurde durch Linearisierung mit BglII erreicht. Zwischen Transkriptionsstart der T7 Polymerase und kodierender Sequenz bzw. zwischen Terminationsstelle und kodierender Sequenz waren kurze linker-Regionen vorhanden, wodurch zusätzliche Nukleotide an den 5'- und 3'-Enden des Transkriptes gegeben waren. Diese sind in der nachfolgenden Sequenz unterstrichen.

```
GGGCGAAUUGGAGCUCGGAUCCAGGGAGCCUGAGAAACGGCUACCACAUCCAAGGAAGGCAGCAGGCG
CGCAAAUUAACCAAUCCUAAUUCAGGGAGGUAGUGACAAUAAAUAACGAUACAGGGCCCAUUCGGGUC
UUGUAAUUGGAAUGAGUACAAUGUAAAUAACUUAACGAGGAACAUUGGAGGGCAAGUCUGGUGCCAG
CAGCCGCGGUAAUUCAGCUCUCCAAUAGCGUAUAUUAAGUUGUUGCAGUAAAAAGCUCGUAGUUGAA
CUUUGGGCCCGGUUGGCCGGUCCGAUUUUUCGUGUACUGGAUUUCCAACGGGGCCUUUCCUUCUGGC
UAACCUUGAGUCCUUGUGGCUCUUGGCCAACCAGGACUUUUACUUUGAAAAAAUUGAGUGUUCAAAG
CAGGCGUAUUGCUCCAGAUC
```

7.4 Proteine

7.4.1 Antikörper und Antiseren

	Name	Verdünnung	Beschreibung; Quelle
Primäre AK	α-GFP	1:2500	Polyklonales Antiserum (aus Kaninchen) gegen GFP; Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg
	α-His	1:2000	Monoklonaler AK (aus Maus) gegen 6xHis-Epitop; Qiagen GmbH, Hilden
Sekundäre AK	α-Kaninchen-IRDye®800CW	1:5000; 1:15000	Sek. AK (aus Ziege); LI-COR Biosciences, Bad Homburg
	α-Maus-IRDye®800CW	1:15000	Sek. AK (aus Ziege); LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Tabelle 5: Für Western-Blots verwendete Antikörper

7.4.2 Proteine für EMSA-Studien

Für die EMSA-Studien wurden N-terminale 6xHis-Fusionen von Hmo1 und seinen Derivaten, sowie GFP als Kontrolle in *E.coli* exprimiert und mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Im Folgenden sind die Namen der Expressionsvektoren für alle verwendeten Konstrukte zusammen mit den Aminosäuresequenzen der exprimierten Proteine angegeben.

pWS4224: Hmo1 (6xHis-Hmo1)

```
MTMI THHHHHHGSMTTDP SVKLKSAKDSL VSSLFELSKAANQTASSIVDFYNAIGDDEEEKIEAFTTL
TESLQTLTSGVNHLHGISSELVNPIDDDKDAI IAAPVKAVRRKIERDPNAPKKPLTVFFAYSAYVRQE
LREDRQKAGLPPLSSTEITQEISKKWKELSDNEKEKWKQAYNVELENYQREKSKYLEAKKNGTLPPAS
LENGPTHAPVPIPFSLQHAAEPPVEKRPHDDDG SSKKKKKKKKDKKKDKSNSSI
```

pWS4226: BoxBmut (6xHis-Hmo1(F113,114A))

```
MTMI THHHHHHGSMTTDP SVKLKSAKDSL VSSLFELSKAANQTASSIVDFYNAIGDDEEEKIEAFTTL
TESLQTLTSGVNHLHGISSELVNPIDDDKDAI IAAPVKAVRRKIERDPNAPKKPLTVAAAAYSAYVRQE
LREDRQKAGLPPLSSTEITQEISKKWKELSDNEKEKWKQAYNVELENYQREKSKYLEAKKNGTLPPAS
LENGPTHAPVPIPFSLQHAAEPPVEKRPHDDDG SSKKKKKKKKDKKKDKSNSSI
```

pWS4503: ΔBoxB (6xHis-Hmo1(1-98)-GFP-Hmo1(180-246))

```
MTMI THHHHHHGSMTTDP SVKLKSAKDSL VSSLFELSKAANQTASSIVDFYNAIGDDEEEKIEAFTTL
TESLQTLTSGVNHLHGISSELVNPIDDDKDAI IAAPVKAVRRKVDELMSKGEELFTGVVPILEVELDGD
VNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMP
EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVIIMADKQ
KNGIKVNFKIRHNI EDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITHGMDELYKTS GSEAKKNGTLPPASLENGPTHAPVPIPFSLQHAAEPPVEKRPHDDDG SSKKK
KKKKDKKKDKSNSSI
```

pWS4227: ΔBoxA (6xHis-Hmo1(86-246))

```
MTMI THHHHHHGS AIIAAPVKAVRRKIERDPNAPKKPLTVFFAYSAYVRQELREDRQKAGLPPLSSTE
ITQEISKKWKELSDNEKEKWKQAYNVELENYQREKSKYLEAKKNGTLPPASLENGPTHAPVPIPFSLQ
HAAEPPVEKRPHDDDG SSKKKKKKKKDKKKDKSNSSI
```

pWS4229: ΔBoxA,BoxBmut (6xHis-Hmo1(86-246;F113,114A))

```
MTMI THHHHHHGS AIIAAPVKAVRRKIERDPNAPKKPLTVAAAAYSAYVRQELREDRQKAGLPPLSSTE
ITQEISKKWKELSDNEKEKWKQAYNVELENYQREKSKYLEAKKNGTLPPASLENGPTHAPVPIPFSLQ
HAAEPPVEKRPHDDDG SSKKKKKKKKDKKKDKSNSSI
```

pJOE4056: GFP (6xHis-GFP)

```
MTMI THHHHHHGS SKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIE
LKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVIIMADKQKNGIKVNFKIRHNI EDG SVQLADHYQQNTPIGDGP
VLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK
```

7.5 Hefestämme

Es sind ausschließlich Stämme gelistet, welche bei gezeigten Experimenten Verwendung fanden. Ausgangsstämme, sowie für Stammerzeugung verwendete Plasmide und Oligonukleotide sind den entsprechenden Datenbanken des Lehrstuhls für Genetik zu entnehmen. MAT: Paarungstyp; SH: Stammhintergrund.

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Ursprung
BY4742	alpha	<i>his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0</i>	S288c	Sammlung
K700	alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-2 ssd1 can1-100 ho</i>	W303	Sammlung
W9642	alpha	<i>NET1-GFP-tADH1-HIS3MX6 ura3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-URA3</i>	W303	Sammlung
W10146	alpha	<i>HMO1-GFP-tCYC1-URA3 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	W303	Sammlung
W10293	alpha	<i>RPA135-GFP-tCYC1-TRP1 ura3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-URA3</i>	W303	Sammlung
W10299	alpha	<i>FOB1-GFP-tCYC1-URA3 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	W303	Sammlung
W10581	alpha	<i>RPA135-GFP-tCYC1-TRP1 HMO1-3mCherry-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10758	alpha	<i>NSR1-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	Sammlung
W10848	a	<i>SMC2-GFP-tADH1-SpHIS3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	Sammlung
W12081	alpha	<i>his3-Δ1::pHMO1-HMO1(F113A, F114A)-GFP-tCYC1-HIS3 Nop56-3mCherry-tCYC1-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W12082	alpha	<i>his3-Δ1::pHMO1-HMO1(F113A, F114A)-GFP-tCYC1-HIS3 Nop56-3mCherry-tCYC1-URA3 Δhmo1</i>	S288c	diese Arbeit
W12115	a	<i>HMO1-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12120	alpha	<i>HMO1-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δrpa12::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W12122	a	<i>RPA135-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12124	a	<i>RPA135-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δrpa12::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W12600	a	<i>RPA135-GFP-tCYC1-TRP1 HMO1-3mCherry-tCYC1-URA3 rrn3(S213P)</i>	W303	diese Arbeit
W12605	alpha	<i>HMO1-GFP-tCYC1-URA3 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 rrn3(S213P)</i>	W303	diese Arbeit
W12663	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	Sammlung
W12697	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pTEF2-GFP-HMO1(86-246)-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	Sammlung
W12699	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pTEF2-GFP-HMO1(86-246;F113,114A)-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	Sammlung
W12701	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(1-210)-GFP-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	Sammlung
W12739	a	<i>NSR1-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 rrn3(S213P)</i>	W303	diese Arbeit
W12928	alpha	<i>NOP56-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δrpa12::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W12930	alpha	<i>NOP56-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12931	a	<i>NOP56-GFP-tCYC1-URA3 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 rrn3(S213P)</i>	W303	diese Arbeit

W12933	a	<i>NOP56-GFP-tCYC1-URA3 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W13182	a	<i>pHMO1::pHMO1-GFP-HMO1(86-246)-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13183	a	<i>pHMO1::pHMO1-GFP-HMO1(86-246;F113,114A)-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13188	alpha	<i>HMO1-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δcin8::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13189	a	<i>RPA135-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δcin8::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13196	alpha	<i>NSR1-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δrpa12::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13198	alpha	<i>NSR1-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W13556	a	<i>leu2::pURA3-NLS-MSCP-GFP-tCYC1-LEU2 its1::6x MS2 operator hairpin</i>	W303	diese Arbeit
W13558	a	<i>RPA135-GFP-tCYC1-TRP1 ura3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-URA3 cdc14-3</i>	W303	diese Arbeit
W13734	a	<i>leu2::pURA3-NLS-MSCP-GFP-tCYC1-LEU2 HMO1-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W13742	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13744	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(F113,114A)-GFP-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13745	a	<i>tCYC1::pHMO1-HMO1-GFP-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im Kernmarkerkonstrukt) his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13748	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(180-246)-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13751	a	<i>CDC14-GFP-tCYC1-LEU2 HMO1-3mCherry-tCYC1-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W13753	a	<i>CDC14-GFP-tCYC1-LEU2 HMO1-3mCherry-tCYC1-URA3 Δcin8::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13855	a	<i>tCYC1::pTEF2-HMO1-GFP-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im Kernmarkerkonstrukt) his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13869	a	<i>HTA2-GFP-tADH1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W13871	alpha	<i>HTA2-GFP-tADH1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δrpa12::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13947	a	<i>HMO1-GFP-tCYC1-URA3 his3::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 cdc14-3</i>	W303	diese Arbeit
W13949	a	<i>tCYC1::pHMO1-GFP-HMO1(212-246)-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im Kernmarkerkonstrukt) his3-delta1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-13MYC-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13952	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-GFP-HMO1(212-236)-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13960	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(212-236)-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit

W13961	a	<i>tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(180-246)-tCYC1 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im Kernmarkerkonstrukt) his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W13962	a	<i>tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(180-246)-tCYC1 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im Kernmarkerkonstrukt) his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W14023	a/alpha	<i>pHMO1::pHMO1-GFP-HMO1(86-246)-tCYC1-URA3/pHMO1 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3/his3-Δ1 tCYC1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-LEU2/tCYC1 Δhmo1::kanMX4/HMO1</i>	S288c	diese Arbeit
W14024	a/alpha	<i>pHMO1::pHMO1-GFP-HMO1(86-246;F113,114A)-tCYC1-URA3/pHMO1 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3/his3-Δ1 tCYC1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-LEU2/tCYC1 Δhmo1::kanMX4/HMO1</i>	S288c	diese Arbeit
W14033	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-tCYC1-URA3-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W14037	alpha	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(180-246)-tCYC1-URA3-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W14039	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(212-236)-tCYC1-URA3-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W14040	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pHMO1-HMO1(F113,114A)-GFP-tCYC1-URA3-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W14189	a	<i>tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(212-246)-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im Kernmarkerkonstrukt) his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W14192	a	<i>tCYC1::pHMO1::pHMO1-GFP-HMO1(86-246)-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im NOP56-Lokus) NOP56-3mCherry-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W14193	a	<i>tCYC1::pHMO1::pHMO1-GFP-HMO1(86-246;F113,114A)-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im NOP56-Lokus) NOP56-3mCherry-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W14197	a	<i>tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(180-246)-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im NOP56-Lokus) NOP56-3mCherry-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W14198	a	<i>tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(212-246)-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im NOP56-Lokus) NOP56-3mCherry-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W14199	a	<i>tCYC1::pHMO1-HMO1(1-98)-GFP-HMO1(212-236)-tCYC1-URA3 (Integration entweder im CYC1-Lokus, oder im NOP56-Lokus) NOP56-3mCherry-tCYC1-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W14200	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pTEF2-HMO1(F113,114A)-GFP-tCYC1-URA3-HIS3 Δhmo1::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W14201	a	<i>HMO1(1-236)-GFP-tCYC1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W14204	a	<i>his3-Δ1::pTEF2-mCherry-SWI5-S/A-tCYC1::pTEF2-HMO1(F113,114A)-GFP-tCYC1-URA3-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
y2442	a	<i>its1::6x MS2 operator hairpin</i>	W303	Joachim Griesenbeck

Tabelle 6: In Experimenten verwendete Hefestämme

7.6 Software und Makros

7.6.1 Software

AxioVision	Carl Zeiss Vision, Göttingen
BioEdit	Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad (USA)
Clone Manager 6	Scientific & Educational Central
cNLS-mapper	nls-mapper.iab.keio.ac.jp
Compute pI/Mw (Protein)	web.expasy.org/compute_pi
CorelDRAW Graphics Suite X4	Corel Corporation
DNA Molecular Weight	bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html
ExpASy translate tool	web.expasy.org/translate
ImageJ	Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA)
Leica Application Suite	Leica Microsystems GmbH
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Mongo Oligo Mass Calculator (RNA)	mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo
Osyssey Infrared Imaging System Application Software	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Photoshop CS2	Adobe Systems Incorporated
Reverse Complement	bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

7.6.2 Makros

Als Beispiele sind zwei Makros aufgeführt, welche für die Bearbeitung von Spinning-disc-Aufnahmen verwendet wurden.

Makro1

Ausgangssituation: Die Kanäle DIK (1), mCherry (2) und GFP (3) liegen getrennt und in Form von Hyperstacks vor. Es handelt sich um Zeitreihen mit 14 z-Ebenen.

Funktion: Für DIK erfolgt die Projektion der Durchschnittswerte, für mCherry und GFP erfolgt eine Aufsummierung der z-Ebenen. In allen Kanälen wird nach erfolgter Projektion ein Bildausschnitt von 160x160 Pixel festgelegt und das Synchronisationswerkzeug wird aufgerufen. Die weitere Bearbeitung erfolgt durch Makro2.

```

selectWindow("1");
run("Z Project...", "start=1 stop=14 projection=[Average Intensity] all");
selectWindow("1");
close();
selectWindow("AVG_1");
run("Out [-]");
run("Out [-]");
run("Specify ROI", " width=160 height=160 x=0 y=0 slice=1");
selectWindow("2");
run("Z Project...", "start=1 stop=14 projection=[Sum Slices] all");
selectWindow("2");
close();
selectWindow("SUM_2");
run("Out [-]");
run("Out [-]");
run("Specify ROI", " width=160 height=160 x=0 y=0 slice=1");
selectWindow("3");
run("Z Project...", "start=1 stop=14 projection=[Sum Slices] all");
selectWindow("3");
close();
selectWindow("SUM_3");
run("Out [-]");
run("Out [-]");
run("Specify ROI", " width=160 height=160 x=0 y=0 slice=1");
run("Tile");
run("Sync Windows");

```

Makro2

Nach Synchronisation der projizierten Kanäle können Einzelzellen mit den festgelegten Bildausschnitten ausgewählt werden und Makro2 wird gestartet.

Funktion: Die gewählten Ausschnitte jedes Kanals werden für die gesamte Zeitreihe dupliziert und in einen temporären Ordner kopiert.

```

selectWindow("AVG_1");
run("Duplicate...", "title=AVG_1-1 duplicate range=[]");
selectWindow("AVG_1-1");
rename("DIC");
saveAs("Tiff", "D:\Philipp\temporär\DIC.tif");
close();
selectWindow("SUM_2");
run("Duplicate...", "title=SUM_2-1 duplicate range=[]");
selectWindow("SUM_2-1");
rename("ROT");
saveAs("Tiff", "D:\Philipp\temporär\ROT.tif");
close();
selectWindow("SUM_3");
run("Duplicate...", "title=SUM_3-1 duplicate range=[]");
selectWindow("SUM_3-1");
rename("GRUEN");
saveAs("Tiff", "D:\Philipp\temporär\GRUEN.tif");
close();

```

Die somit erhaltenen, projizierten Ausschnitte der Kanäle wurden dann entsprechend weiter bearbeitet und ggf. quantifiziert.

8. Literatur

- Albert B., Perez-Fernandez J, Léger-Silvestre I., Gadal O. (2012). Regulation of Ribosomal RNA Production by RNA Polymerase I: Does Elongation come First? *Genet Res Int* 2012, ID276948.
- Albert B., Colleran C., Léger-Silvestre I., Berger B.A., Dez C., Normand C., Perez-Fernandez J., McStay B., Gadal O. (2013a). Structure-function analysis of Hmo1 unveils an ancestral organization of HMG-Box factors involved in ribosomal DNA transcription from yeast to human. *Nucleic Acids Res* 41: 10135-10149.
- Albert B., Mathon J., Shukla A., Saad H., Normand C., Léger-Silvestre I., Villa D., Kamgoue A., Mozziconacci J., Wong H., Zimmer C., Bhargava P., Bancaud A., Gadal O. (2013b). Systematic characterization of the conformation and dynamics of budding yeast chromosome XII. *J Cell Biol* 202: 201-210.
- Alekseev S.Yu., Kovaltsova S.V., Fedorova I.V., Gracheva L.M., Evstukhina T.A., Peshekhonov V.T., Korolev V.G. (2002). *HSM2 (HMO1)* gene participates in mutagenesis control in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 1: 287-297.
- Bauerle K.T., Kamau E., Grove A. (2006). Interactions between N- and C-Terminal Domains of the *Saccharomyces cerevisiae* High-Mobility Group Protein HMO1 Are Required for DNA Bending. *Biochemistry* 45: 3635-3645.
- Berger A.B., Decourty L., Badis G., Nehrbass U., Jacquier A., Gadal O. (2007). Hmo1 Is Required for TOR-Dependent Regulation of Ribosomal Protein Gene Transcription. *Mol Cell Biol* 27: 8015-8026.
- Berghammer H., Auer B. (1993). "Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E.coli*. *Biotechniques* 14: 524, 528.
- Bermejo R., Capra T., Gonzalez-Huici V., Fachinetti D., Cocito A., Natoli G., Katou Y., Mori H., Kurokawa K., Shirahige K., Foiani M. (2009). Genome-Organizing Factors Top2 and Hmo1 Prevent Chromosome Fragility at Sites of S Phase Transcription. *Cell* 138: 870-884.
- Bi E., Park H.-O. (2012). Cell Polarization and Cytokinesis in Budding Yeast. *Genetics* 191: 347-387.
- Blander G., Guarente L. (2004). The SIR2 Family of Protein Deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73: 417-435.
- Boettcher B., Marquez-Lago T.T., Bayer M., Weiss E.L., Barral Y. (2012). Nuclear envelope morphology constrains diffusion and promotes asymmetric protein segregation in closed mitosis. *J Cell Biol* 197: 921-937.
- Boldogh I.R., Ramcharan S.L., Yang H.-C., Pon L.A. (2004). A Type V Myosin (Myo2p) and a Rab-like G-Protein (Ypt11p) Are Required for Retention of Newly Inherited Mitochondria in Yeast Cells during Cell Division. *Mol Biol Cell* 15: 3994-4002.
- Bretscher A. (2003). Polarized growth and organelle segregation in yeast: the tracks, motors, and

- receptors. *J Cell Biol* 160: 811-816.
- Bustin M. (1999). Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. *Mol Cell Biol* 19: 5237-5246.
- Claypool J.A., French S.L., Johzuka K., Eliason K., Vu L., Dodd J.A., Beyer A.L., Nomura M. (2004). Tor Pathway Regulates Rrn3p-dependent Recruitment of Yeast RNA Polymerase I to the Promoter but Does Not Participate in Alteration of the Number of Active Genes. *Mol Biol Cell* 15: 946-956.
- Clemente-Blanco A., Mayán-Santos M., Schneider D.A., Machín F., Jarmuz A., Tschochner H., Aragón L. (2009). Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature* 458: 219-222.
- Colman-Lerner A., Chin T.E., Brent R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 107: 739-750.
- Cosma M.P. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* *HO*: Ash1 is the commander. *EMBO Rep* 5: 953-957.
- D'Amours D., Stegmeier F., Amon A. (2004). Cdc14 and Condensin Control the Dissolution of Cohesin-Independent Chromosome Linkages at Repeated DNA. *Cell* 117: 455-469.
- De Souza C.P.C., Osmani S.A. (2007). Mitosis, Not just Open or Closed. *Eukaryot Cell* 6: 1521-1527.
- Dundr M., Hoffmann-Rohrer U., Hu Q., Grummt I., Rothblum L.I., Phair R.D., Misteli T. (2002). A Kinetic Framework for a Mammalian RNA Polymerase *in Vivo*. *Science* 298: 1623-1626.
- Elliot S.G., McLaughlin C.S. (1979). Regulation of RNA synthesis in yeast. III. Synthesis during the cell cycle. *Mol Gen Genet* 169: 237-243.
- Enserink J.M., Kolodner R.D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* 5:11.
- Falcón A.A., Aris J.P. (2003). Plasmid Accumulation Reduces Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 41607-41617.
- Fried M.G., Crothers D.M. (1981). Equilibria and kinetics of Lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9: 6505-6525.
- Fromont-Racine M., Senger B., Saveanu C., Fasiolo F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313: 17-42.
- Fujimura H., Sakuma Y. (1993). Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. *Biotechniques* 14: 538-540.
- Gadal O., Labarre S., Boschiero C., Thuriaux P. (2002). Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J* 21: 5498-5507.
- Garner M.M., Revzin A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9: 3047-3060.
- Gehlen L.R., Nagai S., Shimada K., Meister P., Taddei A., Gasser S.M. (2011). Nuclear Geometry and

- Rapid Mitosis Ensure Asymmetric Episome Segregation in Yeast. *Curr Biol* 21: 25-33.
- Gietz R.D., Woods R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87-96.
- Ginisty H., Amalric F., Bouvet P. (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J* 17: 1476-1486.
- Girke P. (2011). Studien zur mitotischen Segregation des rDNA-Lokus der Hefe. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg.
- Grob A., Colleran C., McStay B. (2014). Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division. *Genes Dev* 28: 220-230.
- Hall D.B., Wade J.T., Struhl K. (2006). An HMG Protein, Hmo1, Associates with Promoters of Many Ribosomal Protein Genes and throughout the rRNA Gene Locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26: 3672-3679.
- He Q., Ohndorf U.-M., Lippard S.J. (2000). Intercalating Residues Determine the Mode of HMG1 Domains A and B Binding to Cisplatin-Modified DNA. *Biochemistry* 39: 14426-14435.
- Hernandez-Verdun D., Roussel P., Thiry M., Sirri V., Lafontaine D.L.J. (2010). The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1: 415-431.
- Heym R.G., Niessing D. (2012). Principles of mRNA transport in yeast. *Cell Mol Life Sci* 69: 1843-1853.
- Hill A.V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* 40: 4-7.
- Hoyt M.A., He L., Loo K.K., Saunders W.S. (1992). Two *Saccharomyces cerevisiae* Kinesin-related Gene Products Required for Mitotic Spindle Assembly. *J Cell Biol* 118: 109-120.
- Huang J., Moazed D. (2003). Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes Dev* 17: 2162-2176.
- Huber A., Bodenmiller B., Uotila A., Stahl M., Wanka S., Gerrits B., Aebersold R., Loewith R. (2009). Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev* 23: 1929-1943.
- Huxley C., Green E.D., Dunham I. (1990). Rapid assessment of *S.cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet* 6: 236.
- Iacovella M.G., Golfieri C., Massari L.F., Busnelli S., Paqliuca C., Dal Maschio M., Infantino V., Visintin R., Mechtler K., Ferreira-Cerca S., De Wulf P. (2015). Rio1 promotes rDNA stability and downregulates RNA polymerase I to ensure rDNA segregation. *Nat Commun* 6: 6643.
- James S.A., O'Kelly M.J.T., Carter D.M., Davey R.P., van Oudenaarden A., Roberts I.N. (2009). Repetitive

- Sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. *Genome Res* 19: 626-635.
- Johnson J.M., French S.L., Osheim Y.N., Li M., Hall L., Beyer A.L., Smith J.S. (2013). Rpd3- and Spt16-Mediated Nucleosome Assembly and Transcriptional Regulation on Yeast Ribosomal DNA Genes. *Mol Cell Biol* 33: 2748-2759.
- Jorgensen P., Edgington N.P., Schneider B.L., Rupeš I., Tyers M., Futcher B. (2007). The Size of the Nucleus Increases as Yeast Cells Grow. *Mol Biol Cell* 18: 3523-3532.
- Kamau E., Bauerle K.T., Grove A. (2004). The *Saccharomyces cerevisiae* High Mobility Group Box Protein HMO1 Contains Two Functional DNA Binding Domains. *J Biol Chem* 279: 55234-55240.
- Kasahara K., Ohya Y., Kokubo T. (2011). Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. *Nucleic Acids Res* 39: 4136-4150.
- Keener J., Josaitis C.A., Dodd J.A., Nomura M. (1998). Reconstitution of Yeast RNA Polymerase I Transcription *in Vitro* from Purified Components: TATA-BINDING PROTEIN IS NOT REQUIRED FOR BASAL TRANSCRIPTION. *J Biol Chem* 273: 33795-33802.
- Keryer-Bibens C., Barreau C., Osborne H.B. (2008). Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins. *Biol Cell* 100: 125-138.
- Khmelinskii A., Lawrence C., Roostalu J., Schiebel E. (2007). Cdc14-regulated midzone assembly controls anaphase B. *J Cell Biol* 177: 981-993.
- Khmelinskii A., Schiebel E. (2008). Assembling the spindle midzone in the right place at the right time. *Cell Cycle* 7: 283-286.
- Kobayashi T., Horiuchi T. (1996). A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells* 1: 465-474.
- Kobayashi T. (2011). Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell Mol Life Sci* 68: 1395-1403.
- Kondo K., Inouye M. (1992). Yeast NSR1 Protein That Has Structural Similarity to Mammalian Nucleolin Is Involved in Pre-rRNA Processing. *J Biol Chem* 267: 16252-16258.
- Kornberg R.D., Lorch Y. (1999). Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell* 98: 285-294.
- Kuhn C.-D., Geiger S.R., Baumli S., Gartmann M., Gerber J., Jennebach S., Mielke T., Tschochner H., Beckmann R., Cramer P. (2007). Functional Architecture of RNA Polymerase I. *Cell* 131: 1260-1272.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee W.-C., Xue Z., Mélése T. (1991). The *NSR1* Gene Encodes a Protein that Specifically Binds Nuclear Localization Sequences and Has Two RNA Recognition Motifs. *J Cell Biol* 113: 1-12.

- Leiderman P., Huppert D., Agmon N. (2006). Transition in the Temperature-Dependence of GFP Fluorescence: From Proton Wires to Proton Exit. *Biophys J* 90: 1009-1018.
- Leung A.K.L., Lamond A.I. (2003). The Dynamics of the Nucleolus. *Critic Rev Eukaryot Gene Expr* 13: 39-54.
- Lew D.J., Burke D.J. (2003). The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu Rev Genet* 37: 251-282.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H. (2008). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company.
- Lu J., Kobayashi R., Brill S.J. (1996). Characterization of a High Mobility Group 1/2 Homolog in Yeast. *J Biol Chem* 271: 33678-33685.
- Luo S., Wehr N.B., Levine R.L. (2006). Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Analyt Biochem* 350: 233-238.
- Machín F., Torres-Rosell J., De Piccoli G., Carballo J.A., Cha R.S., Jarmuz A., Aragón L. (2006). Transcription of ribosomal genes can cause nondisjunction. *J Cell Biol* 173: 893-903.
- Machín F., Torres-Rosell J., Jarmuz A., Aragón L. (2005). Spindle-independent condensation-mediated segregation of yeast ribosomal DNA in late anaphase. *J Cell Biol* 168: 209-219.
- Mais C., Wright J.E., Prieto J.-L., Raggett S.L., McStay B. (2005). UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev* 19: 50-64.
- Markus S.M., Kalutkiewicz K.A., Lee W.-L. (2012). Astral microtubule asymmetry provides directional cues for spindle positioning in budding yeast. *Exp Cell Res* 318: 1400-1406.
- Mazanka E., Alexander J., Yeh B.J., Charoenpong P., Lowery D.M., Yaffe M., Weiss E.L. (2008). The NDR/LATS Family Kinase Cbk1 Directly Controls Transcriptional Asymmetry. *PLoS Biol* 6: e203.
- McCarthy E.K., Goldstein B. (2006). Asymmetric spindle positioning. *Curr Opin Cell Biol* 18: 79-85.
- Menendez-Benito V., van Deventer S.J., Jimenez-Garcia V., Roy-Luzarraga M., van Leeuwen F., Neefjes J. (2013). Spatiotemporal analysis of organelle and macromolecular complex inheritance. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 175-180.
- Merkl P., Perez-Fernandez J., Pils M., Reiter A., Williams L., Gerber J., Böhm M., Deutzmann R., Griesenbeck J., Milkereit P., Tschochner H. (2014). Binding of the Termination Factor Nsi1 to Its Cognate DNA Site Is Sufficient To Terminate RNA Polymerase I Transcription *In Vitro* and To Induce Termination *In Vivo*. *Mol Cell Biol* 34: 3817-3827.
- Merz K., Hondele M., Goetze H., Gmelch K., Stoeckl U., Griesenbeck J. (2008). Actively transcribed rRNA genes in *S.cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes Dev* 22: 1190-1204.
- Milkereit P., Schultz P., Tschochner H. (1997). Resolution of RNA polymerase I into dimers and monomers and their function in transcription. *Biol Chem* 378: 1433-1443.

- Milkereit P., Tschochner H. (1998). A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *EMBO J* 17: 3692-3703.
- Mohanty B.K., Bastia D. (2004). Binding of the Replication Terminator Protein Fob1p to the Ter Sites of Yeast Causes Polar Fork Arrest. *J Biol Chem* 279: 1932-1941.
- Moll T., Tebb G., Surana U., Robitsch H., Nasmyth K. (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S.cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66: 743-758.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Murugesapillai D., McCauley M.J., Huo R., Nelson Holte M.H., Stepanyants A., Maher L.J. 3rd, Israeloff N.E., Williams M.C. (2014). DNA bridging and looping by HMO1 provides a mechanism for stabilizing nucleosome-free chromatin. *Nucleic Acids Res* 42: 8996-9004.
- Nogi Y., Yano R., Dodd J., Carles C., Nomura M. (1993). Gene *RRN4* in *Saccharomyces cerevisiae* Encodes the A12.2 Subunit of RNA Polymerase I and Is Essential Only at High Temperatures. *Mol Cell Biol* 13: 114-122.
- Oakes M.L., Johzuka K., Vu L., Eliason K., Nomura M. (2006). Expression of rRNA Genes and Nucleolus Formation at Ectopic Chromosomal Sites in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26: 6223-6238.
- Ohndorf U.-M., Rould M.A., He Q., Pabo C.O., Lippard S.J. (1999). Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature* 399: 708-712.
- O'Sullivan A.C., Sullivan G.J., McStay B. (2002). UBF Binding *In Vivo* Is Not Restricted to Regulatory Sequences within the Vertebrate Ribosomal DNA Repeat. *Mol Cell Biol* 22: 657-668.
- Pederson T. (2011). The Nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a000638.
- Renshaw M.J., Ward J.J., Kanemaki M., Natsume K., Nédélec F.J., Tanaka T.U. (2010). Condensins Promote Chromosome Recoiling during Early Anaphase to Complete Sister Chromatid Separation. *Dev Cell* 19: 232-244.
- Rozelle D.K., Hansen S.D., Kaplan K.B. (2011). Chromosome passenger complexes control anaphase duration and spindle elongation via a kinesin-5 brake. *J Cell Biol* 193: 285-294.
- Ryder S.P., Recht M.I., Williamson J.R. (2008). Quantitative analysis of protein-RNA interactions by gel mobility shift. *Methods Mol Biol* 488: 99-115.
- Schneider D.A. (2012). RNA polymerase I activity is regulated at multiple steps in the transcription cycle: Recent insights into factors that influence transcription elongation. *Gene* 493: 176-184.
- Sheff M.A., Thorn K.S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 661-670.

- Shou W., Sakamoto K.M., Keener J., Morimoto K.W., Traverso E.E., Azzam R., Hoppe G.J., Feldman R.M.R., DeModena J., Moazed D., Charbonneau H., Nomura M., Deshaies R.J. (2001). Net1 Stimulates RNA Polymerase I Transcription and Regulates Nucleolar Structure Independently of Controlling Mitotic Exit. *Mol Cell* 8: 45-55.
- Shou W., Seol J.H., Shevchenko A., Baskerville C., Moazed D., Chen Z.W.S., Jang J., Shevchenko A., Charbonneau H., Deshaies R.J. (1999). Exit from Mitosis Is Triggered by Tem1-Dependent Release of the Protein Phosphatase Cdc14 from Nucleolar RENT Complex. *Cell* 97: 233-244.
- Sinclair D.A., Guarente L. (1997). Extrachromosomal rDNA Circles-A Cause of Aging in Yeast. *Cell* 91: 1033-1042.
- Sirri V., Urcuqui-Inchima S., Roussel P., Hernandez-Verdun D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129: 13-31.
- Straight A.F., Marshall W.F., Sedat J.W., Murray A.W. (1997). Mitosis in Living Budding Yeast: Anaphase A But No Metaphase Plate. *Science* 277: 574-578.
- Straight A.F., Sedat J.W., Murray A.W. (1998). Time-Lapse Microscopy Reveals Unique Roles for Kinesins during Anaphase in Budding Yeast. *J Cell Biol* 143: 687-694.
- Straight A.F., Shou W., Dowd G.J., Turck C.W., Deshaies R.J., Johnson A.D., Moazed D. (1999). Net1, a Sir2-Associated Nucleolar Protein Required for rDNA Silencing and Nucleolar Integrity. *Cell* 97: 245-256.
- Sullivan M., Higuchi T., Katis V.L., Uhlmann F. (2004). Cdc14 Phosphatase Induces rDNA Condensation and Resolves Cohesin-Independent Cohesion during Budding Yeast Anaphase. *Cell* 117: 471-482.
- Taddei A., Schober H., Gasser S.M. (2010). The Budding Yeast Nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000612.
- Taddei A., Gasser S.M. (2012). Structure and Function in the Budding Yeast Nucleus. *Genetics* 192: 107-129.
- Tomson B.N., D'Amours D., Adamson B.S., Aragón L., Amon A. (2006). Ribosomal DNA Transcription-Dependent Processes Interfere with Chromosome Segregation. *Mol Cell Biol* 26: 6239-6247.
- Torres-Rosell J., Machín F., Jarmuz A., Aragón L. (2004). Nucleolar Segregation Lags Behind the Rest of the Genome and Requires Cdc14p Activation by the FEAR Network. *Cell Cycle* 3: 496-502.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Tschochner H., Hurt E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13: 255-263.
- Wang B.-D., Butylin P., Strunnikov A. (2006). Condensin Function in Mitotic Nucleolar Segregation is Regulated by rDNA Transcription. *Cell Cycle* 5: 2260-2267.
- Weiner M.P., Costa G.L., Schoettlin W., Cline J., Mathur E., Bauer J.C. (1994). Site-directed mutagenesis

- of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151: 119-123.
- Wittner M., Hamperl S., Stoeckl U., Seufert W., Tschochner H., Milkereit P., Griesenbeck J. (2011). Establishment and Maintenance of Alternative Chromatin States at a Multicopy Gene Locus. *Cell* 145: 543-554.
- Yanai H., Taniguchi T. (2014). Nucleic acid sensing and beyond: virtues and vices of high-mobility group box 1. *J Intern Med* 276: 444-453.
- Yan C., Mélése T. (1993). Multiple Regions of NSR1 Are Sufficient for Accumulation of a Fusion Protein within the Nucleolus. *J Cell Biol* 123: 1081-1091.
- Yano R., Nomura M., (1991). Suppressor Analysis of Temperature-Sensitive Mutations of the Largest Subunit of RNA Polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: a Suppressor Gene Encodes the Second-Largest Subunit of RNA Polymerase I. *Mol Cell Biol* 11: 754-764.
- Xiao L., Williams A.M., Grove A. (2010). The C-Terminal Domain of Yeast High Mobility Group Protein HMO1 Mediates Lateral Protein Accretion and In-Phase DNA Bending. *Biochemistry* 49: 4051-4059.
- Xiao L., Kamau E., Donze D., Grove A. (2011). Expression of yeast high mobility group protein HMO1 is regulated by TOR signaling. *Gene* 489: 55-62.
- Zhou W., Ryan J.J., Zhou H. (2004). Global Analyses of Sumoylated Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: INDUCTION OF PROTEIN SUMOYLATION BY CELLULAR STRESSES. *J Biol Chem* 279: 32262-32268.
- Zimmer C., Fabre E. (2011). Principles of chromosomal organization: lessons from yeast. *J Cell Biol* 192: 723-733.

9. Anhang

9.1 Ergänzungen zu den Ergebnissen

9.1.1 Wachstumstests zu endogenen GFP-Fusionen

Alle in Abschnitt 4.2 untersuchten endogenen GFP-Fusionen nukleolärer Proteine wurden mit Hilfe von Wachstumstests auf Funktionalität hin überprüft. Im Falle von Rpa135 und Nop56 handelt es sich um essentielle Proteine und ein Funktionsverlust kann somit über Zellwachstum ermittelt werden. Die Proteine Nsr1, Net1 und Hmo1 sind nicht essentiell, dennoch geht bei ihnen ein Funktionsverlust mit einem deutlichem Wachstumsdefizit einher. Nur für Fob1-GFP ist ein Wachstumstest nicht ausreichend zur Überprüfung seiner biologischen Aktivität, da dieser Faktor auf die Wachstumsrate von Zellen keinen Einfluss nimmt.

Alle Stämme mit Ausnahme des Nsr1-GFP tragenden zeigten mit einem Wildtypstamm identische Wachstumsraten. Im Falle von Nsr1-GFP war das Wachstum allerdings nur sehr geringfügig beeinträchtigt. Auch die Anwesenheit des Kernmarkerproteins mCherry-NLS stellt somit kein Problem für das Wachstum dar (Abb. 9.1).

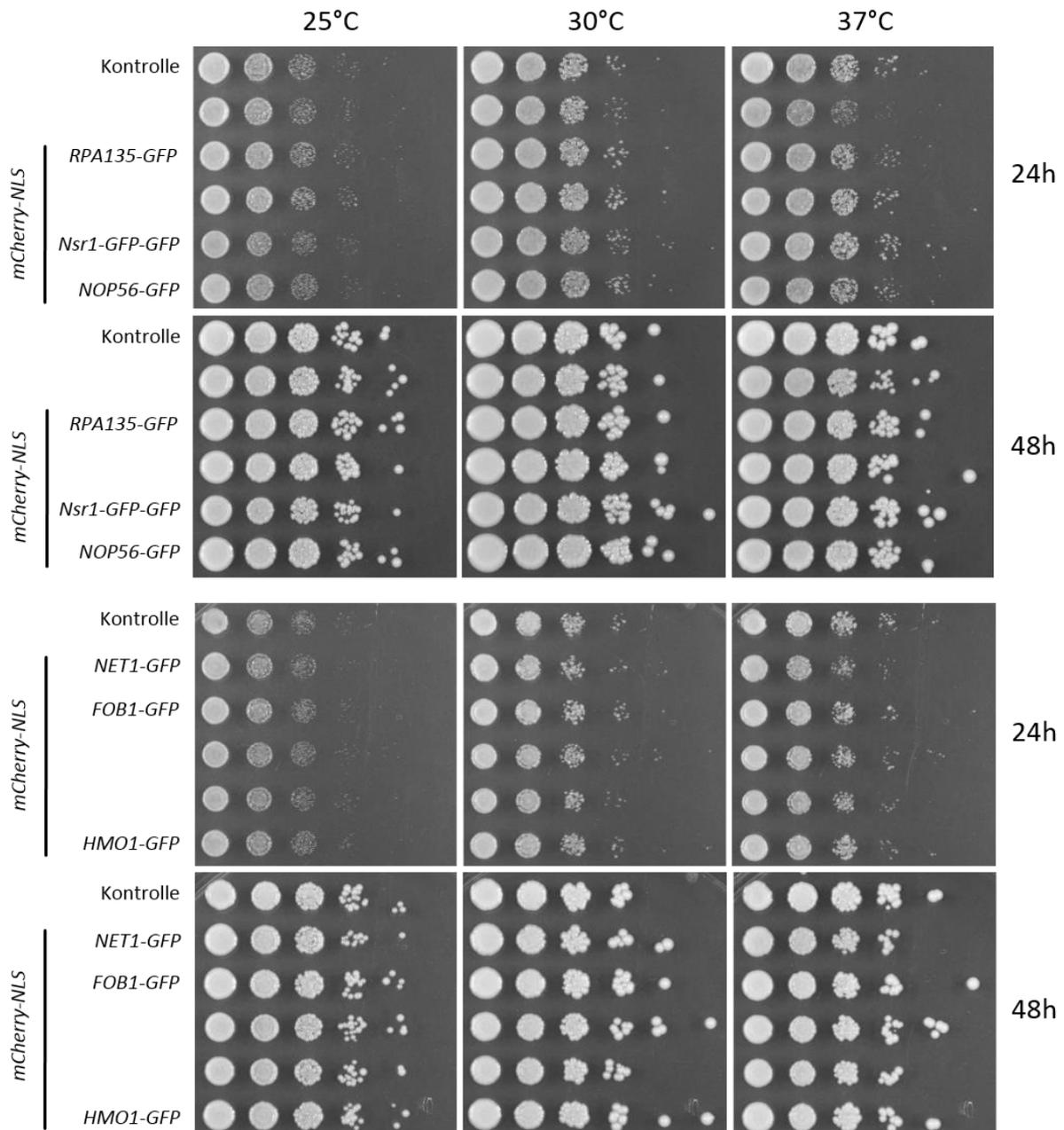


Abbildung 9.1: Wachstumstests zur Überprüfung endogener GFP-Fusionen nukleolärer Proteine

Alle in Abschnitt 4.2 behandelten Stämme mit endogenen Fusionen nukleolärer Proteine wurden in organischem Vollmedium angezogen, auf eine Konzentration von 1 OD/ml eingestellt und in einer 1:10 Verdünnungsreihe weiter verdünnt. Die Zellen wurden auf organisches Vollmedium gestempelt und unter angegebenen Bedingungen inkubiert. Verwendete Stämme: K700 (Kontrolle), W10293 (*RPA135-GFP*), W12933 (*NOP56-GFP*), W10758 (*NSR1-GFP*), W9642 (*NET1-GFP*), W10299 (*FOB1-GFP*), W10146 (*HMO1-GFP*). Der Stammhintergrund war in jedem Fall W303.

9.1.2 Wachstumstests zu Hmo1-Derivaten

Die in Abschnitt 4.8.2 hinsichtlich Lokalisation und Nukleinsäurebindung untersuchten Hmo1-Derivate wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Wachstumsdefekt von $\Delta hmo1$ komplementieren zu können. Für jedes Derivat wurden verschiedene Transformanten mit unterschiedlichen Expressionsniveaus getestet.

Der durch $\Delta hmo1$ hervorgerufene Wachstumsdefekt konnte nur durch das Δ BoxA Konstrukt zumindest teilweise komplementiert werden und das auch nur bei hohem Expressionsniveau (Abb. 9.2). Beide HMG-Boxen sind also wichtig für die biologische Funktion von Hmo1.

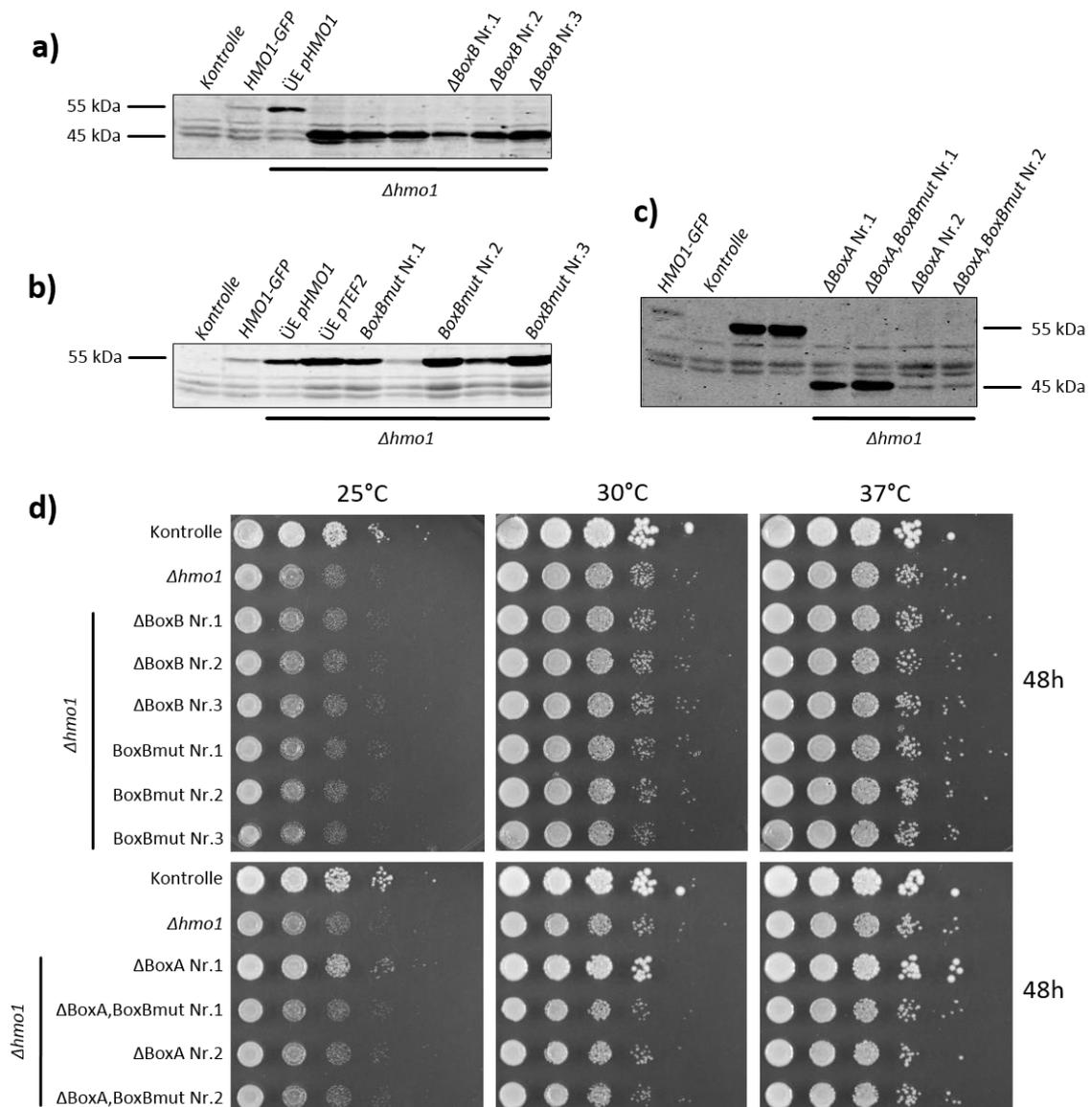


Abbildung 9.2: Wachstum von Stämmen mit Hmo1-Derivaten für die Mikroskopie

Die in Abb. 4.23 gezeigten Transformanten wurden auf ihre Fähigkeit zur Komplementation des Wachstumsdefektes von $\Delta hmo1$ hin überprüft.

a), b) und **c)** Zeigen nochmals die Western-Blots zur Überprüfung der Expression verschiedener Derivate. Ein Wildtypstamm diente als Negativkontrolle (BY4742) und als Referenzen wurden ein Stamm mit endogener Hmo1-GFP Fusion (W12115), sowie die beiden Überexpressionsstämme für Hmo1-GFP herangezogen, welche unveränderte Lokalisation des Proteins zeigten (ÜE *pHMO1*: W13745, ÜE *pTEF2*: W13855). In b) wurden 2 OD Protein aufgetragen und in a) und c) jeweils 1 OD Protein. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem GFP-Antikörper.

d) Alle in den Western-Blots beschrifteten Transformanten wurden auf ihr Wachstum überprüft. Zum Vergleich wurden ein Wildtypstamm (BY4742) und der $\Delta hmo1$ Ausgangsstamm für die Transformationen (W12663) herangezogen. Für jeden Stamm wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe auf Vollmedium mit Glukose gestempelt, wobei die Ausgangskonzentration 1 OD/ml betrug. Die genauen Stammbezeichnungen der Transformanten lauten wie folgt: W13748 (Δ BoxB Nr.1), W13961 (Δ BoxB Nr.2), W13962 (Δ BoxB Nr.3), W13744 (BoxBmut Nr.1), W12082 (BoxBmut Nr.2), W14200 (BoxBmut Nr.3), W12697 (Δ BoxA Nr.1), W13182 (Δ BoxA Nr.2), W12699 (Δ BoxA,BoxBmut Nr.1), W13183 (Δ BoxA,BoxBmut Nr.2). Alle Stämme gehen auf den S288c Hintergrund zurück.

9.1.3 Proteinangleichung und Kontrollen zu EMSAs

Für die Reinigung der 6xHis-Fusionsproteine wurde eine Ni-NTA Matrix verwendet, die den Nachteil eines hohen Hintergrundes aufweist, welcher von Protein zu Protein unterschiedlich stark ausfallen kann. Daher erfolgte die Proteinbestimmung mittels Gellauf und Coomassie-Färbung, um ausschließlich die relevanten Banden quantifizieren zu können. Als Referenz diente nahezu reines BSA. Zur eindeutigen Identifizierung der richtigen Banden wurde für jedes gereinigte Protein ein Western-Blot mit einem His-Antikörper durchgeführt (Abb. 9.3a).

Jedes Hmo1-Derivat wurde für die Angleichung in einer Verdünnungsreihe zusammen mit dem Wildtypprotein auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach Coomassie-Färbung konnten die entsprechenden Banden quantitativ verglichen werden. Die Derivate wurden jeweils an den Wildtyp angepasst, so lange bis eine akzeptable Abweichung erreicht wurde. Die endgültigen Vergleiche sind in Abbildung 9.3b zu sehen. 6xHis- Δ BoxB zeigte ein im Vergleich zum Wildtyp sehr langsames Laufverhalten, da die BoxB nicht einfach deletiert, sondern durch GFP substituiert war.

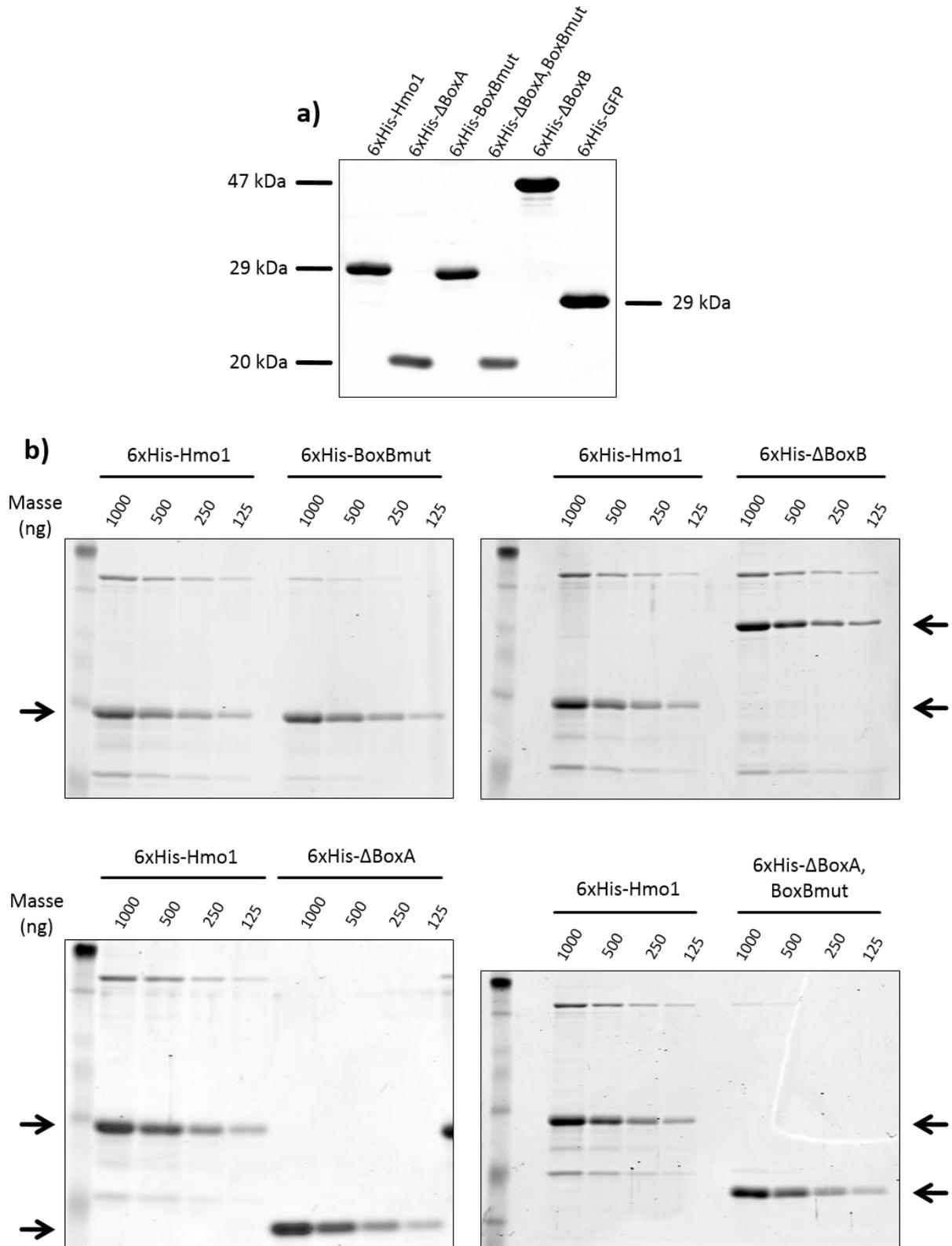


Abbildung 9.3: Proteinangleichung für EMSA-Studien

a) Western-Blot zur Identifizierung der entsprechenden Banden jeden Derivats. Für jedes gereinigte Protein wurde jeweils 1 μ g aufgetragen und die Detektion erfolgte mit einem His-Antikörper.

b) Coomassie-Färbungen von Proteingelen zeigen die endgültigen Angleichungen der Hmo1-Derivate an den Wildtyp. Im Folgenden sind die durchschnittlichen prozentualen Abweichungen zu den entsprechenden Wildtypbanden angegeben. 6xHis-BoxBmut: -6%; 6xHis- Δ BoxB: +11%; 6xHis- Δ BoxA: +3%; 6xHis- Δ BoxA,BoxBmut: -9%.

Um einen Einfluss des Ni-NTA-Hintergrundes auf rDNA- und rRNA-Bindung auszuschließen, wurde zusätzlich auch 6xHis-GFP als Negativkontrolle exprimiert und aufgereinigt. rDNA und rRNA wurden unter mit den übrigen EMSAs identischen Bedingungen auf ihr Gellaufverhalten bei Gabe von 6xHis-GFP hin überprüft, wobei die Negativkontrolle in einer 10-20 fach höheren Konzentration eingesetzt wurde als die übrigen Proteine. Es konnte keine Nukeinsäurebindung im Falle von 6xHis-GFP festgestellt werden (Abb. 9.4). 6xHis-GFP lief selbst in die Gele ein und war als deutlich grünfarbige Banden zu erkennen. Bei Detektion der Nukleinsäuren nach Ethidiumbromidfärbung mit UV-Licht wurde 6xHis-GFP ebenfalls erfasst.

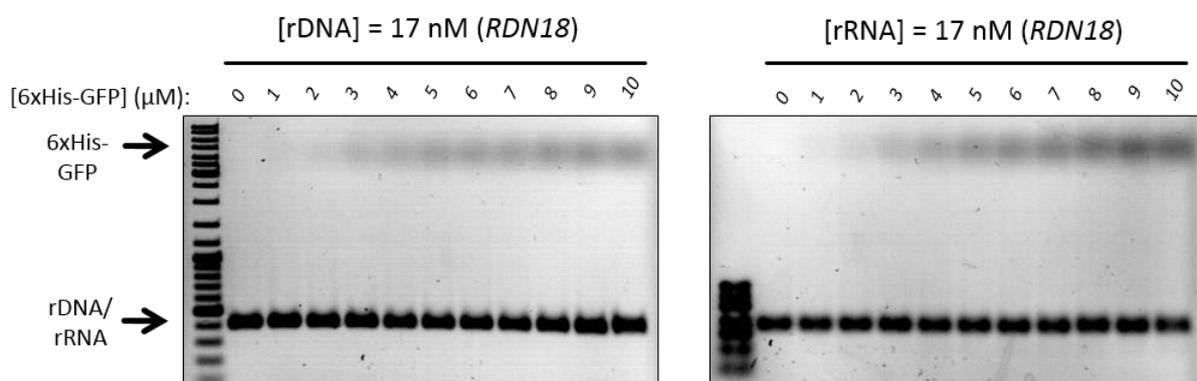


Abbildung 9.4: 6xHis-GFP diente als Negativkontrolle zu den durchgeführten EMSAs

Um einen möglichen Einfluss des Hintergrundes gereinigter Proteine bei den EMSAs ausschließen zu können, wurde 6xHis-GFP als Negativkontrolle verwendet. Sowohl rDNA als auch rRNA wurden getestet und die eingesetzten Konzentrationen von 6xHis-GFP betragen das 10-20 fache im Vergleich zu Hmo1 und seinen Derivaten bei ansonsten identischen Bedingungen.

9.1.4 Einfluss von *rrn3(S213P)* auf die Segregation nukleolärer Proteine

Neben der konstitutiven RNA Polymerase I Mutante *Δrpa12* wurde auch die konditionale Mutante *rrn3(S213P)* hinsichtlich nukleolärer Proteinsegregation überprüft. Es handelt sich hierbei um eine thermosensitive Mutante, welche bei 37°C nicht lebensfähig ist (Claypool et al., 2004), allerdings wurden die folgenden Daten bei Raumtemperatur, also bei permissiven Bedingungen erhoben. Auch bei Raumtemperatur konnte bereits eine gewisse Delokalisation von Rpa135 über den Kern beobachtet werden, weshalb dieses Protein außen vor gelassen wurde.

Auch bei permissiven Bedingungen konnte eine deutlich veränderte Lokalisation von Nop56 beobachtet werden, wie dies auch in *Δrpa12* der Fall war. Es traten Signalfoci außerhalb des Nukleolus auf (Abb. 9.5a). Bei den Proteinen Hmo1, Nop56 und Nsr1 konnte eine gleiche Tendenz wie in *Δrpa12* bezüglich mitotischer Verteilung festgestellt werden. Von allen gelangte in *rrn3(S213P)* ein geringerer Anteil in die Tochterzelle (Abb. 9.5b).

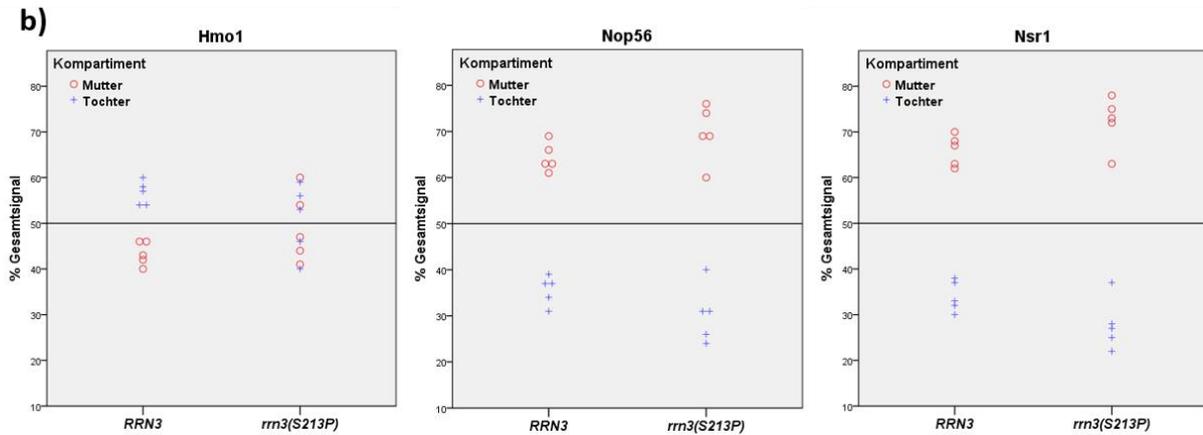
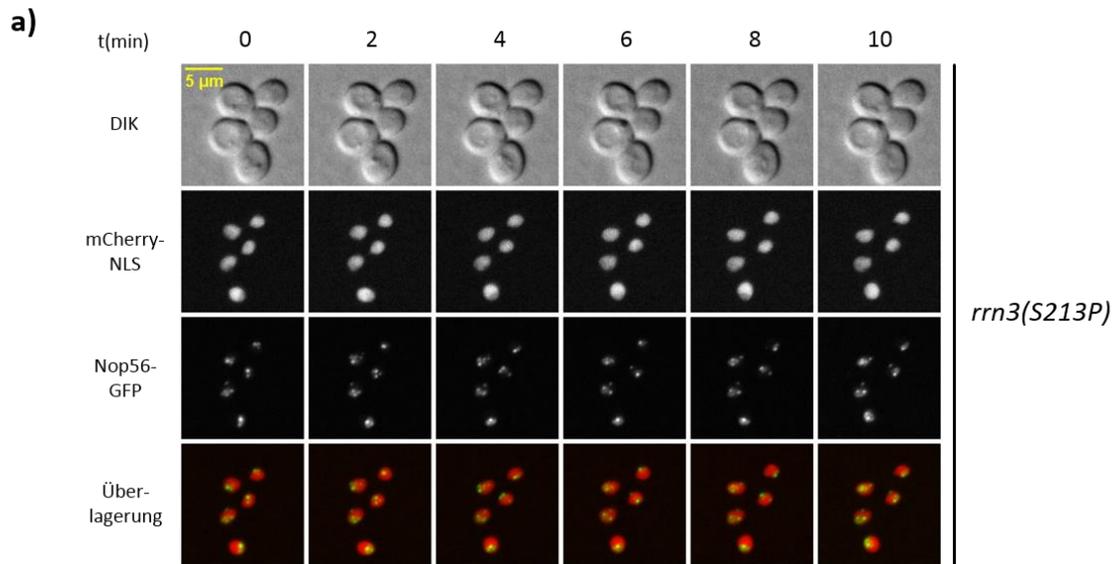


Abbildung 9.5: Veränderte Segregation nukleolärer Proteine in *rrn3(S213P)*

a) Spinning-disc-Mikroskopie zum Verhalten von endogenem Nop56-GFP in *rrn3(S213P)*. Die Maximalwerte der z-Ebenen wurden projiziert. Stamm: W12931 (Hintergrund: W303).

b) Statistische Auswertung zum mitotischen Segregationsverhalten von endogenem Hmo1-GFP, Nop56-GFP und Nsr1-GFP in *rrn3(S213P)*. Die Signale in Mutter und Tochter nach vollständiger Trennung wurden über mehrere Zeitwerte gemittelt und addiert, um so das Gesamtsignal zu erhalten. Die Werte in Mutter und Tochter wurden dann auf das Gesamtsignal normiert (rot bzw. blau). In jedem Fall wurden n=5 Zellen untersucht. Stammbezeichnungen: W10146 (*HMO1-GFP RRN3*), W12605 (*HMO1-GFP rrn3(S213P)*), W12933 (*NOP56-GFP RRN3*), W12931 (*NOP56-GFP rrn3(S213P)*), W10758 (*NSR1-GFP RRN3*), W12739 (*NSR1-GFP rrn3(S213P)*). Stammhintergrund: W303.

9.1.5 Sonde für transkriptionelle Aktivität der RNA Polymerase I *in vivo*

Um die Fragen zu klären, ob Transkription durch RNA Polymerase I während der Mitose stattfindet und ob Mutter- und Tochnukleolus nach mitotischer Segregation unterschiedliche transkriptionelle Aktivität aufweisen, wurde versucht eine Sonde für transkriptionelle Aktivität *in vivo* zu erzeugen. Ein Reporterstamm von Joachim Griesenbeck trug Insertionen des MS2 operator hairpins in der *ITS1* Region der rDNA. Bei Expression bilden diese Insertionen also hairpin-Strukturen der einzelsträngigen rDNA aus, welche ein Bindemotiv des RNA-bindenden Hüllproteins MSCP (MS2 Coat Protein) des Phagen MS2 darstellen (Keryer-Bibens et al., 2008). Es wurde entsprechend eine Fusion des RNA-

Bindeproteins MSCP mit einer NLS und dem Fluoreszenzprotein GFP hergestellt und stabil in das Erbgut des Reporterstammes integriert. Da bei einem relativ frühen Prozessierungsschritt die *ITS1* Region von kodierendem Transkript abgespalten und degradiert wird (Fromont-Racine et al., 2003), sollte also theoretisch die nukleoläre Konzentration der Sonde NLS-MSCP-GFP Fließgleichgewichtsmengen von neu entstandener, unprozessierter rRNA und damit transkriptionelle Aktivität der RNA Polymerase I widerspiegeln. Für die Erzeugung eines Kontrollstammes wurde der die Sonde tragende Reporterstamm mit einem Wildtypstamm bezüglich der *ITS1* Region und endogenem Hmo1-3mCherry gekreuzt und sporuliert. Damit konnten gleiche Expressionsmengen der Sonde in Reporterstamm und Kontrollstamm erreicht werden. Das Vorhandensein der Insertionen in der *ITS1* Region konnte durch eine Test-PCR überprüft werden.

Die Sonde zeigte im Reporterstamm ein nukleoläres Signal, welches dem von RNA Polymerase I Untereinheiten oder frühen Prozessierungsfaktoren sehr ähnlich war. Auch während der Anaphase zeigte sich keine Delokalisation, sondern typische nukleoläre Strukturen waren sichtbar und die Signalstärke in der Mutter war deutlich höher als das Signal in der Tochter. Zudem war Übersättigung gegeben, da noch gewisse nukleo- und cytoplasmatische Populationen der Sonde zu erkennen waren und rRNA sollte somit vollständig nachgewiesen worden sein (Abb. 9.6a). Allerdings ist eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse nicht möglich, da zum einen der Reporterstamm y2442, in welchen die Sonde transformiert wurde auch über rDNA-Wiederholungseinheiten ohne entsprechende Insertionen verfügte und zum anderen war auch im Kontrollstamm ohne jegliche Insertionen in der rDNA eine gewisse nukleoläre Anreicherung der Sonde gegeben (Abb. 9.6b, c). Vermutlich bindet die Sonde also unspezifisch nukleoläre RNA und repräsentiert somit nicht nur Fließgleichgewichtsmengen unprozessierter rRNA.

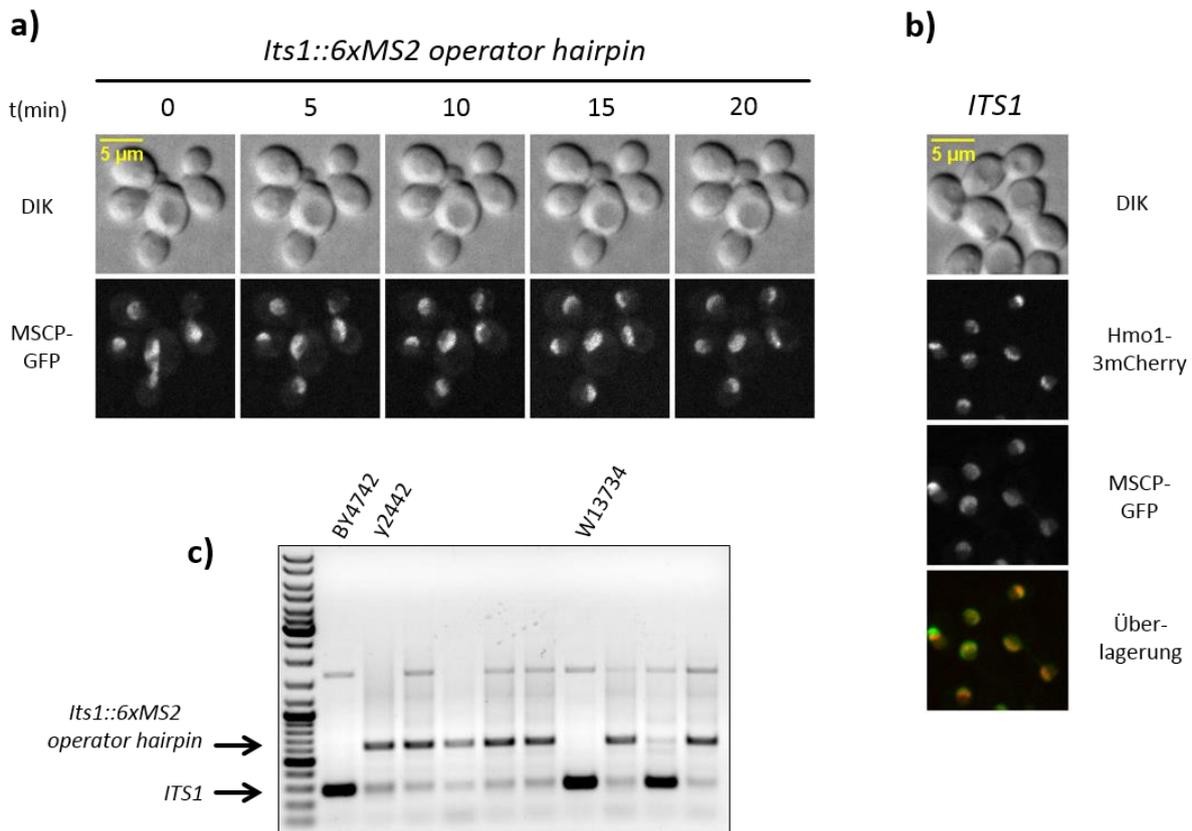


Abbildung 9.6: Sonde für transkriptionelle Aktivität

a) Lokalisation der Sonde MSCP-GFP in einem Stamm, welcher Insertionen des MS2 operator hairpins als entsprechende Bindefolge in der *ITS1* Region der rDNA trug. Es handelte sich um Spinning-disc-Mikroskopie, die Maximalwerte wurden projiziert. Stamm: W13556.

b) Lokalisation der Sonde MSCP-GFP in einem Kontrollstamm mit endogenem Hmo1-3mCherry, welcher keine Insertionen der MS2 operator hairpin-Sequenz in der rDNA trug. Wiederum wurde Spinning-disc-Mikroskopie angewandt und es erfolgte eine Projektion der Maximalwerte. Stamm: W13734.

c) Test-PCR und anschließende Gelelektrophorese zur Überprüfung der *ITS1* Region auf Insertionen der MS2 operator hairpin-Sequenz. Verwendete Primer: WS2627, WS2628. BY4742: Wildtypstamm; y2442: Reporterstamm mit Insertionen, in welchen die Sonde integriert wurde; W13734: Kontrollstamm mit Sonde und *ITS1* Region ohne Insertionen.

9.1.6 Mitotische Segregation einer Kondensinuntereinheit

Die Aktivität von Cdc14 wird in der Anaphase für kondensinabhängige rDNA-Segregation benötigt und des Weiteren ist bekannt, dass Kondensin in transkribierten Bereichen der rDNA bei hoher transkriptioneller Aktivität verdrängt wird und dass Cdc14 evtl. die RNA Polymerase I während der Anaphase inhibiert (D'Amours et al., 2004; Machín et al., 2005; Wang et al., 2006; Clemente-Blanco et al., 2009). Da für Hmo1 angenommen wurde, dass für sein besonderes Segregationsverhalten Verdrängung durch RNA Polymerase I ausschlaggebend sein könnte, sollte auch eine Kondensinuntereinheit, bei welcher Verdrängung von rDNA durch Transkription offensichtlich gegeben ist, hinsichtlich mitotischer Segregation untersucht werden. Daher wurde eine endogene GFP-Fusion der Kondensinuntereinheit Smc2 mikroskopiert.

Smc2-GFP konzentrierte sich kurz vor der Anaphase in einer nukleolusähnlichen Struktur auf und zeigte während der Trennung ein Verhalten, welches dem von Hmo1 sehr ähnlich war (Abb. 9.7a). Auch von Smc2 erhielt die Tochterstruktur wie im Falle von Hmo1 einen höheren Proteinanteil als die Mutterstruktur (Abb. 9.7b).

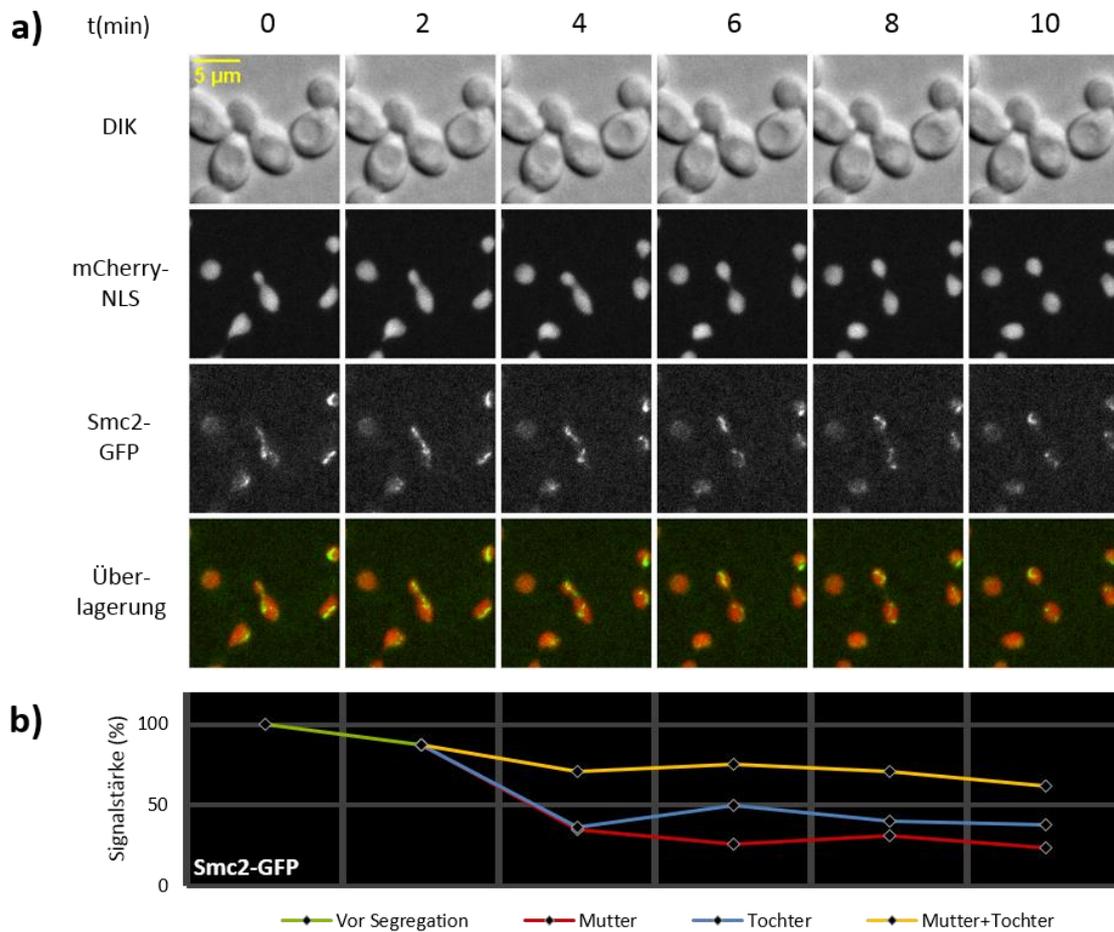


Abbildung 9.7: Smc2 zeigt identisches Segregationsverhalten zu Hmo1 in der Mitose

a) Spinning-disc-Mikroskopie von endogenem Smc2-GFP in der Anaphase bei Intervallen von 2 Minuten. Die Maximalwerte der optischen Schnitte sind dargestellt. Stamm: W10848.

b) Quantifizierung von Smc2-GFP zu der in a) gezeigten Zeitreihe. Dargestellt ist das Gesamtsignal vor Trennung (grün), die Signalanteile in Mutter und Tochter nach der Trennung (rot bzw. blau) sowie deren Summe (orange). Normiert wurde jeweils auf das Signal bei t=0 min.

9.2 Verzeichnisse

9.2.1 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt, die Schreibweise von Genen und Proteinen richtet sich nach der Hefenomenklatur. Gängige Fachausdrücke wurden aus dem Englischen übernommen, wenn keine entsprechende deutsche Bezeichnung existiert oder gebräuchlich ist.

[]	Konzentration
°C	Grad Celsius
%	Prozent
A	
α	anti (bei Antikörpern); alpha (bei Paarungstyp)
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
AS	Aminosäure(n)
ARS	Autonomously Replicating Sequence
B	
β	beta
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
C	
CF	Core Factor
Chr.	Chromosom
Cl	Chlorid
C-terminal	carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D	
Δ	Deletion
DIK	Differentieller Interferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay

ERC	Extrachromosomal rDNA Circle
et al.	et alii (und andere)
ETS	External Transcribed Spacer
F	
F	Fluorid
FACT	Facilitates Chromatin Transcription
FEAR	Fourteen Early Anaphase Release
FLIP	Fluorescence Loss In Photobleaching
F-Primer	Hin-Primer (Forward-Primer)
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
G	
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein (GTPase activating protein)
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (Guanine Nucleotide Exchange Factor)
GFP	Green Fluorescent Protein
H	
h	Stunden
HMG(B)	High Mobility Group (Box)
I	
ITS	Internal Transcribed Spacer
K	
K	Kalium
k	Kilo (10^3)
KOD-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermococcus kodakaraensis</i>
L	
l	Liter
LB	Luria Broth
Li	Lithium
M	
M	molar (Mol/Liter)
m	Milli (10^{-3}); mono (bei mCherry)
μ	Mikro (10^{-6})
MAT	Paarungstyp (Mating Type)
MEN	Mitotic Exit Network
min	Minuten
Mg	Magnesium
mRNA	Boten-RNA (Messenger RNA)
MS2	Phage MS2
MSCP	Hüllprotein des Phagen MS2 (MS2 Coat Protein)
N	
n	Nano (10^{-9})
Na	Natrium
Ni	Nickel
NLS	Kernlokalisationssequenz (Nuclear Localization Signal)

NOR	Nucleolar Organizer Region
NTA	Nitrilotriessigsäure (Nitrilotriacetic Acid)
N-terminal	amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTS	Non Transcribed Spacer
O	
OD	optische Dichte (Optical Density)
OH	Hydroxid
P	
p	Pico (10^{-12})
ρ	Promotor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
Pi	Anorganisches Phosphat
PK	Phasenkontrast
R	
r	ribosomal
RENT	Regulator of Nucleolar Silencing and Telophase Exit
RFB	Replication Fork Barrier
RITE	Recombination Induced Tag Exchange
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonucleoprotein Particle
R-Primer	Rück-Primer (Reverse-Primer)
S	
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s	Sekunde(n)
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SCF	Skip1-Cullin-F-Box-Komplex
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
sec	Sekunde(n)
sno	small nucleolar
SO ₄	Sulfat
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
SRP	Signal Recognition Particle
ss	einzelsträngig
SSU	Small Subunit
T	
t	Zeit
<i>t</i>	Terminator
T4-DNA-Ligase	DNA-Ligase des Phagen T4
T7-RNA-Polymerase	RNA-Polymerase des Phagen T7
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Binding Protein

TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween
TE	Tris/EDTA
T _H	Hybridisierungstemperatur
Tor	Target Of Rapamycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA (Transfer RNA)
ts	temperatursensitiv

U

UAF	Upstream Activation Factor
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

X

XEn	Xenopus Enhancer
-----	------------------

9.2.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Gerichtetes Wachstum und Cytokinese im Zellzyklus der Bäckerhefe	15
Abbildung 3.2: Asymmetrische Kernteilung der Bäckerhefe	16
Abbildung 3.3: Tochtterspezifische Streckung und Kompaktierung eines Schwesterchromatids bei mitotischer Chromosomentrennung	23
Abbildung 3.4: Architektur des Zellkerns von <i>S.cerevisiae</i> in der G1-Phase	27
Abbildung 3.5: rDNA-Struktur in <i>S.cerevisiae</i>	28
Abbildung 3.6: rDNA-Chromatin in <i>S.cerevisiae</i>	30
Abbildung 4.1: Unterschiedliches Verteilungsverhalten von mCherry-NLS und Hta2 in der Mitose	34
Abbildung 4.2: Asymmetrische Segregation der RNA Polymerase I Untereinheit Rpa135	36
Abbildung 4.3: Asymmetrische Segregation des rRNA Prozessierungsfaktors Nop56	37
Abbildung 4.4: Asymmetrische Segregation des rRNA Prozessierungsfaktors Nsr1	38
Abbildung 4.5: Asymmetrische Segregation der RENT-Komponente Net1	39
Abbildung 4.6: Gleichverteilung des rDNA-Bindeproteins Fob1	40
Abbildung 4.7: Besonderes Verteilungsverhalten des rDNA-Bindeproteins Hmo1	42
Abbildung 4.8: Statistische Auswertung zur mitotischen Segregation nukleolärer Proteine	43
Abbildung 4.9: Dynamik von Rpa135 in der Anaphase	46
Abbildung 4.10: Dynamik von Hmo1 in der Anaphase	48
Abbildung 4.11: Cdc14 beeinflusst die mitotische Segregation von Rpa135 und Hmo1	50
Abbildung 4.12: Das Motorprotein Cin8 fördert die Asymmetrie von Rpa135 und Hmo1	53
Abbildung 4.13: Zeitlich verzögerte und abrupte nukleoläre Segregation in <i>Δcin8</i>	55
Abbildung 4.14: Rpa12 fördert den Transport von nukleolären Proteinen in die Knospe	58
Abbildung 4.15: Rpa12 fördert nicht die Tochteranteile von mCherry-NLS und Hta2	59
Abbildung 4.16: Reziprokes Lokalisationsverhalten von Rpa135 und Hmo1 in Wachstumsphase und Stationarität	61
Abbildung 4.17: Reziprokes Lokalisationsverhalten von Rpa135 und Hmo1 bei Anwachsen aus Stationarität	62
Abbildung 4.18: Reziprokes Lokalisationsverhalten von Rpa135 und Hmo1 in einer thermosensitiven RNA Polymerase I Mutante	63
Abbildung 4.19: Elemente von Hmo1 und deren Funktionen	65
Abbildung 4.20: Starke Überexpression von Hmo1 hat keinen negativen Einfluss auf Wachstum	67
Abbildung 4.21: Hmo1 zeigt bei Überexpression normales Segregationsverhalten	68
Abbildung 4.22: Statistische Analyse zum Segregationsverhalten von Hmo1 bei Überexpression	69
Abbildung 4.23: Hmo1-Derivate für die Mikroskopie	71
Abbildung 4.24: Hmo1 zeigt scharf begrenzte, inhomogene nukleoläre Lokalisation und bindet rDNA mit höherer Affinität als rRNA	73
Abbildung 4.25: Ein Hmo1-Derivat mit leicht verringerter Nukleinsäureaffinität aggregiert <i>in vivo</i>	74
Abbildung 4.26: Ein Hmo1-Derivat mit höherer Affinität zu rRNA als rDNA zeigt das Lokalisationsmuster eines rRNA-Prozessierungsfaktors	75
Abbildung 4.27: Die HMG-BoxA ist notwendig für nukleoläre Lokalisation, jedoch nicht für hochaffine rDNA-Bindung	76
Abbildung 4.28: Die HMG-BoxA ist notwendig für durch Mutagenese der HMG-BoxB verursachte <i>in vivo</i> Aggregation	77
Abbildung 4.29: Sowohl die HMG-BoxA als auch die HMG-BoxB sind notwendig und nicht hinreichend für das normale Segregationsverhalten von Hmo1	79
Abbildung 4.30: Die HMG-BoxA ist für Rekrutierung durch Wildtypprotein von höherer Wichtigkeit als die HMG-BoxB und der C-Terminus	81
Abbildung 4.31: Die HMG-BoxA ist nicht hinreichend für nukleoläre Lokalisation, jedoch hinreichend für Rekrutierung durch Wildtyp-Hmo1	83
Abbildung 4.32: Sehr hohe Mengen eines anormal lokalisierenden Hmo1-Derivats können durch geringe endogene Mengen in den Nukleolus rekrutiert werden	85
Abbildung 4.33: Starke Anreicherung von Hmo1 im Nukleolus bei niedriger transkriptioneller Aktivität benötigt die HMG-BoxA	86
Abbildung 4.34: Der C-Terminus von Hmo1 beinhaltet eine NLS	87

Abbildung 4.35: N- und C-Terminus von Hmo1 agieren synergistisch bezüglich nukleolärer Lokalisation.....	89
Abbildung 4.36: Ein C-terminales Fragment ist nicht notwendig für normale Lokalisation von Hmo1	90
Abbildung 5.1: Modellvorstellung zur nukleolären Segregation allgemein	99
Abbildung 5.2: Modell zur mitotischen Segregation von Hmo1.....	107
Abbildung 9.1: Wachstumstests zur Überprüfung endogener GFP-Fusionen nukleolärer Proteine	153
Abbildung 9.2: Wachstum von Stämmen mit Hmo1-Derivaten für die Mikroskopie	154
Abbildung 9.3: Proteinangleichung für EMSA-Studien.....	156
Abbildung 9.4: 6xHis-GFP diente als Negativkontrolle zu den durchgeführten EMSAs.....	157
Abbildung 9.5: Veränderte Segregation nukleolärer Proteine in <i>rnn3(S213P)</i>	158
Abbildung 9.6: Sonde für transkriptionelle Aktivität.....	160
Abbildung 9.7: Smc2 zeigt identisches Segregationsverhalten zu Hmo1 in der Mitose	161

9.2.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Scanintensitäten Western-Blots	123
Tabelle 2: Belichtungszeiten zu nicht konfokaler Mikroskopie	125
Tabelle 3: Laserintensitäten und Belichtungszeiten zu Spinning-disc-Mikroskopie	127
Tabelle 4: Laserintensitäten zu Bleichexperimenten	128
Tabelle 5: Für Western-Blots verwendete Antikörper	137
Tabelle 6: In Experimenten verwendete Hefestämme.....	141

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Philipp Girke
Anschrift: Von-der-Tann-Str.17a, 93047 Regensburg
Geburtsdatum und -ort: 15.11.1983 in Freising
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion

2/2011 - 4/2015
Universität Regensburg, Lehrstuhl Genetik,
Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Titel: Asymmetrische Segregation von nukleolären
Proteinen in der Mitose von *S.cerevisiae*

Studium

10/2005 - 01/2011
Biologiestudium an der Universität Regensburg
Abschluss: Diplom Biologe
01/2010 - 01/2011
Diplomarbeit: Universität Regensburg, Lehrstuhl Genetik,
Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Titel: Studien zur mitotischen Segregation
des rDNA-Lokus der Hefe

Zivildienst

02/2004 - 11/2004
Ambulante Alten- und Krankenpflegestation,
Rottenburg a.d. Laaber

Schulbildung

1994 - 2003
Gabelsberger Gymnasium Mainburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1990 - 1994
Grundschule Pfeffenhausen

11. Dank

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Seufert für die Bereitstellung des Themas und die zahlreichen, fruchtbringenden Diskussionen während der letzten Jahre.

Auch bei meinen Mentoren Prof. Dr. Frank Sprenger und Dr. Philipp Milkereit bedanke ich mich für die konstruktive Kritik zu den Jahresberichten und das Eröffnen neuer Sichtweisen.

Prof. Dr. Herbert Tschochner danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit und als weiteren Mitgliedern des Prüfungsausschusses danke ich Prof. Dr. Reinhard Wirth und Prof. Dr. Frank Sprenger.

Besonderer Dank gilt natürlich allen Mitgliedern unseres Lehrstuhls. Für eine entspannte Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft jedes Einzelnen. Katharina Hannig, Nina Weber und Andrea Brücher danke ich für eine schöne Zeit im Büro. Benedikt Nagel, Stephan Ringshandl und Michael Beck möchte ich zudem für die Unterstützung meines Projektes durch ihre Praktika und Bachelorarbeiten danken. Weiterer Dank gilt Prof. Dr. Gernot Längst und Dr. Thomas Schubert für die Vermittlung grundlegender Kenntnisse, welche letztendlich bei EMSA-Studien angewandt werden konnten und Dr. Andrea Bleckmann für die Einführung am CLSM, wodurch es mir möglich war, Bleichexperimente durchzuführen.

Für das kritische Lesen dieser Arbeit danke ich Prof. Dr. Wolfgang Seufert, Dr. Philipp Milkereit und Sebastian Höckner.

Zu guter Letzt möchte ich Sandra von ganzem Herzen für ihre Liebe und Fürsorge danken.