

Net1 - ein modular aufgebautes und
multifunktionales Protein im Nukleolus der
Hefe *Saccharomyces cerevisiae*



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

vorgelegt von

Katharina Hannig

aus

Regensburg

Im Jahr

2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

30.03.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Unterschrift: _____

*Quod cum faciamus, prudenter facere dicimur,
iuste noch dicimur, ut intellegatis discrepare ab aequitate sapientia.*

(Cicero)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung.....	10
2. Abstract	12
3. Einleitung.....	13
3.1 Regulation der Mitose-Phase des Zellteilungszyklus	13
3.1.1 Aktivierung der Separase	13
3.1.2 Inaktivierung der PP2A und Aktivierung der Phosphatase Cdc14	14
3.1.2.1 FEAR – <i>Cdc Fourteen Early Anaphase Release</i>	15
3.1.2.2 MEN – <i>Mitotic Exit Network</i>	16
3.1.3 Trennung der rDNA	16
3.2 Der Nukleolus – Struktur und Aufgaben	17
3.2.1 Anordnung der rDNA.....	17
3.2.2 Net1 und der RENT-Komplex	19
3.2.2.1 Net1 als nukleoläre Strukturkomponente.....	20
3.2.2.2 Verankerung von Sir2 und <i>Silencing</i>	21
3.2.2.3 Inhibition und Verankerung von Cdc14 – die RENT-Kontroll-Hypothese	22
3.2.2.4 Aktivierung der RNA Polymerase I	23
4. Ergebnisse	25
4.1 Funktionen der N-terminalen Region von Net1 – Lokalisation.....	25
4.1.1 Net1(1-1189)-GFP lokalisiert im Nukleolus.....	26
4.1.2 Die N-terminale Region von Net1 ist hinreichend für Nukleoluslokalisation	28
4.1.3 Kurze N-terminale Net1-Fragmente zeigen Tendenz zur Aggregatbildung	34
4.1.4 Net1 besitzt die Fähigkeit zur Selbstinteraktion	37
4.1.4.1 Net1(1-1189) interagiert mit sich selbst	37
4.1.4.2 Net1(1-455) und Net1(1-341) können über Interaktion mit Net1(1-1189) Sir2 präzipitieren	39
4.1.4.3 Die Aggregatbildung N-terminaler Net1-Derivate korreliert mit der Proteinmenge.....	41
4.1.4.4 Net1-Aggregate lösen sich in der Anaphase auf	43
4.1.4.5 Die N-terminale Region beeinflusst die Lokalisation von verkürzten Net1-Derivaten	45
4.1.5 Proteinwechselwirkung mit Fob1	50
4.1.5.1 Net1 zeigt keine Interaktion mit Fob1 in der Immunpräzipitation	50
4.1.5.2 Net1 zeigt keine Interaktion mit Fob1 im <i>yeast two hybrid</i> -Assay	53
4.1.5.3 Fob1 beeinflusst die Lokalisation von Net1 nur geringfügig.....	55
4.1.6 Net1 besitzt Nukleinsäure-Bindefähigkeit	59
4.1.6.1 Net1 bindet an DNA	59
4.1.6.2 Net1 bindet auch tRNA, bevorzugt jedoch DNA-Fragmente	62

4.2 Funktionen der N-terminalen Region von Net1 – Regulation von Cdc14	65
4.2.1 Net1(234-455) ist hinreichend und notwendig für die Interaktion mit Cdc14	66
4.2.2 N-terminale Net1-Fragmente inhibieren die Cdc14-Aktivität	70
4.2.3 Erfolgt die Regulation der Cdc14-Interaktion über Phosphorylierung?	74
4.2.4 Der Aminosäurebereich 234-455 ist notwendig für die nukleoläre Lokalisation von Cdc1477	
4.3 Funktion der C-terminalen Region von Net1 –	79
Interaktion mit RNA-Polymerase I und Wachstumsstimulation	79
4.3.1 C-terminale Verkürzung von Net1 beeinträchtigt das Wachstum	80
4.3.2 Die C-terminale Verkürzung von Net1 um 138 Aminosäuren resultiert in einem Wachstums-defekt	81
4.3.3 Rettung des Wachstumsdefekts C-terminaler Net1-Verkürzungsstämmen	83
4.3.4 Lokalisation der C-terminalen Fragmente GFP-Net1(1052-1189) und GFP-Net1(929- 1189).....	85
4.3.5 Die Nukleoluslokalisation der C-Terminalen Fragmente ist unabhängig von Fob1 und Rpa12.....	87
4.3.6 Interaktion des kleinsten C-terminalen Fragments mit RNA Polymerase I-Untereinheit Rpa43.....	89
4.3.7 Charakterisierung der posttranslationalen Modifikation von Net1(1052-1189)	92
5. Diskussion	95
5.1 Die Rolle des <i>pfam10407</i> -Motivs	97
5.1.1 Das <i>pfam10407</i> -Motiv ist nicht notwendig für Cdc14-Bindung.....	97
5.1.2 Kernlokalisation und NLS	98
5.1.3 DNA-Bindung	99
5.1.4 Net1-Selbstinteraktion	100
5.2 Cdc14-Bindung und Zellzyklusregulation	102
5.2.1 Net1(234-455) ist hinreichend und notwendig für die Bindung und Inhibition von Cdc14102	
5.2.2 Net1(234-455) wirkt als Inhibitor der Phosphatase-Aktivität von Cdc14	103
5.2.3 Freisetzung von Cdc14 durch Phosphorylierung von Net1	105
5.3 Wachstums-Stimulation	107
5.3.1 Wachstumsdefekt bei Entfernung der C-terminalen Region von Net1.....	108
5.3.2 Der C-terminale Bereich von Net1 interagiert mit RNA-Polymerase I	108
5.3.3 Net1 und die Stimulation der RNA-Polymerase I-Aktivität	109
5.4 Modell der Net1-Funktionen	110
6. Methoden	112
6.1. Arbeiten mit Bakterien	112
6.1.1. Kultivierung von Bakterien (<i>E. coli</i>)	112
6.1.2. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	112

6.2. Arbeiten mit Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	113
6.2.1. Kultivierung von Hefestämmen	113
6.2.2. Kontrolle der Genexpression durch regulierbare Promotoren	113
6.2.3. Wachstumstests mittels Verdünnungsreihen	113
6.2.4. Kreuzung haploider Hefestämme	113
6.2.5. Sporulation diploider Hefestämme und Tetradenanalyse	114
6.2.6. Transformation von Hefezellen mittels Lithiumacetat-Methode	115
6.2.7. Konservierung von Hefestämmen	115
6.3. Mikroskopie von lebenden Zellen	115
6.3.1. Aufbereitung der Zellen	115
6.3.2. Aufnahmen am Cellobserver SD	116
6.3.3. Bildbearbeitung	117
6.4. Genetische und molekularbiologische Methoden	117
6.4.1. DNA-Isolation	117
6.4.1.1. Präparation von High Copy Plasmiden aus <i>E. coli</i> : Kochlysate-Methode	117
6.4.1.2. Säulenreinigung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> : MINI- und MIDI-Preps	117
6.4.1.3. Isolation genomischer DNA aus Hefe	118
6.4.1.4. Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen	118
6.4.2. PCR	119
6.4.2.1. PCR für Klonierungen	119
6.4.2.2. PCR für Epitopmarkierungen und Deletionen durch homologe Rekombination	120
6.4.2.3. PCR für ortsspezifische Mutagenese	120
6.4.2.4. Analyse des Paarungstyps (<i>MAT</i> -PCR)	121
6.4.3. Restriktionsverdau	122
6.4.4. Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	123
6.4.5. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	123
6.4.6. Ligation	123
6.4.7. Sequenzierung	124
6.5. Proteinanalytische Methoden	124
6.5.1. Zellaufschluss und Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	124
6.5.1.1. Testexpression	124
6.5.1.2. Zellaufschluss mittels French Press	124
6.5.1.3. Reinigung von 6xHis-Fusionsproteinen	125
6.5.1.4. Reinigung von MBP-Fusionsproteinen	125
6.5.2. Proteinlysate aus Hefe	125
6.5.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	126

6.5.3.1. Bradford-Test.....	126
6.5.3.2. Bradford-Schnelltest zur Verfolgung von Proteinreinigungen	126
6.5.4. Immunpräzipitation	126
6.5.4.1. Coimmunpräzipitation	128
6.5.4.2. λ -Phosphatase-Behandlung	128
6.5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	128
6.5.6. Färbung von SDS-Gelen	130
6.5.6.1. Coomassie-Färbung	130
6.5.6.2. Intensitätsmessungen mit ImageJ zur Konzentrationsbestimmung von Proteinbanden.....	130
6.5.7. Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen	130
6.6. Hefe-Zwei-Hybrid-System (<i>Yeast Two Hybrid</i> – Y2H)	131
6.7. Phosphatase-Assay zur Bestimmung der Cdc14-Aktivität.....	132
6.8. <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	133
7. Material	135
7.1. Hefestämmen	135
7.2. Medien.....	139
7.2.1. Bakterienmedium	139
7.2.2. Hefemedien	140
7.3. Puffer und Lösungen.....	143
7.4. Software und Makros	145
7.4.1. Verwendete Programme, Datenbanken und Internetressourcen	145
7.4.2. ImageJ-Makros	146
7.4.2.1 Movies von Einzelzellen: DIC – Cherry – GFP – merge (mit Rahmen)	146
7.4.2.2 Movies von Einzelzellen: DIC – Cherry – GFP – merge (mit Schleife und Speicherung) ..	148
7.4.2.3 Movies Übersicht (automatische Öffnung und Speicherung)	150
7.4.2.4 Abstandsmessung zweier punktförmiger Signale (z.B. Spindelpolkörper).....	152
8. Literaturverzeichnis	153
9. Anhang.....	159
9.1 Sequenzvergleich Net1-verwandter Proteine aus anderen Hefen.....	159
9.2 Ergänzungen zu den Ergebnissen	160
9.2.1 Lokalisation von Net1(1-110)-GFP und Net1(1-69)-GFP	160
9.2.2 Aggregatbildung von Net1(1-233) und Net1(1-196)	161
9.2.3 Lokalisation von Net1(234-455)-GFP.....	163
9.2.4 Wachstumstests von <i>NET1(1-1051)</i> -Stämmen.....	163
9.2.5 Tetradenanalysen von Net1-Verkürzungsstämmen mit Expression von C-terminalen <i>NET1</i> - Fragmenten	164

9.2.5.1 Expression von <i>NET1</i> (1052-1189)	164
9.2.5.2 Expression von <i>NET1</i> (929-1189)	165
9.2.6 Messsystem zur quantitativen, zeitlichen Bestimmung von DNA-Trennungsmutanten ...	165
9.3 Verzeichnisse	168
9.3.1 Nomenklatur, Abkürzungen und Einheiten	168
9.3.2 Abbildungsverzeichnis	172
10. Lebenslauf	174
11. Danksagung	175

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Protein Net1 bildet die Kernuntereinheit des nukleolären RENT-Komplexes, bestehend aus Net1, der Histon-Deacetylase Sir2 und der Proteinphosphatase Cdc14. Cdc14 stellt den Gegenspieler der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28 dar. Über seine Phosphatase-Aktivität moduliert Cdc14 den Phosphorylierungszustand von CDK-Substraten und ist am Abbau mitotischer Cycline am Ende der Mitose beteiligt. Cdc14 dephosphoryliert den CDK-Inhibitor Sic1 und seinen Transkriptionsfaktor Swi5, was zur Stabilisierung von Sic1 und zur Aktivierung der *SIC1*-Transkription führt. Desweiteren vermittelt Cdc14 die Stabilisierung der Anaphase-Spindel, die Kernpositionierung, die Trennung des rDNA-Locus und die Cytokinese. Die Aktivität von Cdc14 wird streng reguliert. Über weite Strecken des Zellteilungszyklus bis zur Metaphase bindet Net1 an die Phosphatase Cdc14 und verankert sie bis zum Metaphase-Anaphase-Übergang im Nukleolus. Net1 bindet hierbei mit seinem N-terminalen Anteil direkt am aktiven Zentrum der Phosphatase. Die Freisetzung von Cdc14 erfolgt über zwei regulatorische Netzwerke, FEAR und MEN.

Über Studien mit verkürzten Net1-Derivaten konnte gezeigt werden, dass ein kleiner Bereich von 196 Aminosäuren in der extremen, N-terminalen Region von Net1 hinreichend für die Lokalisation von Net1 im Nukleolus ist. Dieser Bereich enthält eine unter Net1-verwandten Proteinen wie Tof2 aus *S. cerevisiae* und Dnt1 aus *S. pombe* konservierte Region von ca. 75 Aminosäuren, die als *pfam10407*-Motiv bezeichnet wird. Die Vermutung, dass es sich bei dieser Region um den für die Cdc14-Bindung notwendigen Bereich handelt, konnte über Immunpräzipitationsstudien mit verkürzten Net1-Derivaten widerlegt werden. Das *pfam10407*-Motiv ist nicht notwendig für die Interaktion mit der Phosphatase. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Region von Net1 DNA-bindende Eigenschaften besitzt und zur Selbstinteraktion fähig ist.

Für die Interaktion mit der Phosphatase Cdc14 sind Bereiche zwischen den Aminosäuren 234-455 hinreichend und notwendig, wie Interaktionsstudien mittels Immunpräzipitation zeigten. Dieser Bereich ist zudem hinreichend, um die Phosphatase-Aktivität von Cdc14 zu inhibieren.

Die bislang wenig untersuchte, C-terminale Region von Net1 ist notwendig, um gesundes Zellwachstum zu gewährleisten. Eine Verkürzung um nur 138 Aminosäuren resultiert in einem starken Wachstumsdefekt. Im Gegenzug kann der Wachstumsdefekt von *net1Δ*-Stämmen durch die zusätzliche Expression des 138 Aminosäuren großen Fragments abgeschwächt werden. In Net1-Verkürzungsstämmen, in denen die Cdc14-Regulation gewährleistet ist, ist die Expression des kleinen Fragments in der Lage den Wachstumsdefekt vollständig zu supprimieren. Mittels Immunpräzipitation konnte eine Interaktion des kleinen C-terminalen Fragments mit der RNA-Polymerase I-Untereinheit Rpa43 nachgewiesen werden. Auffällig war hierbei die Erkenntnis, dass eine phosphorylierte Form des C-terminalen Fragments mit Rpa43 interagiert.

Zusammengefasst lässt sich das bisher von Net1 gezeichnete Bild um neue Funktionen erweitern. Erstmalig konnte gezeigt werden, dass Net1 direkt mit Nukleinsäuren interagiert. Dies eröffnet möglicherweise einen neuen Blick auf die Art und Weise der Lokalisation an der rDNA. Weiterhin konnte die Region der Cdc14-Bindung auf den Aminosäurebereich 234-455 eingegrenzt werden und dadurch gezeigt werden, dass das in Cdc14-bindenden Proteinen konservierte *pfam10407*-Motiv nicht die Binderegion für die Phosphatase darstellt. Die C-terminale Region von Net1 vermittelt über die Interaktion mit der RNA-Polymerase I den Wachstums-stimulierenden Effekt.

2. ABSTRACT

The protein Net1 is known as core subunit of the nucleolar RENT-complex comprised of Net1, the histone deacetylase Sir2 and the protein phosphatase Cdc14. Net1 plays an important role in regulating Cdc14 activity. Cdc14 antagonizes mitotic CDK activity by modulating the phosphorylation state of CDK substrates and stimulating cyclin destruction by phosphorylating the APC/C specificity factor Hct1. Cdc14 also dephosphorylates the CDK inhibitor Sic1 and its transcription factor Swi5, resulting in stabilization of Sic1 and Swi5-dependent activation of *SIC1*-transcription. Furthermore, Cdc14 regulates the stabilization of the mitotic spindle, positioning of the nucleus, separation of the rDNA and cytokinesis. Release of Cdc14 is mediated by two regulatory networks, FEAR and MEN. For most of the cell cycle up to metaphase Net1 binds to the protein phosphatase Cdc14 near its active center and inhibits the phosphatase activity by sequestering Cdc14 in the nucleolus.

Microscopic studies of truncated Net1-derivatives showed, that the first 196 amino acids of the N-terminal region in Net1 are sufficient to mediate its nucleolar localization. This region contains a motif of 75 amino acids, which is conserved in Net1-related proteins such as Tof2 in *S. cerevisiae* and Dnt1 in *S. pombe* and was termed *pfam10407*-motif. It was suggested, that the *pfam10407*-motif conveys Cdc14 binding in these proteins. Coimmunoprecipitation studies could show, that the *pfam10407*-motif is not necessary for binding of Cdc14. Instead, the N-terminal region of Net1 shows affinity to DNA and is able to associate with itself.

The region between amino acids 234-455 is necessary and sufficient for binding and inhibition of Cdc14 as shown by immunoprecipitation experiments and *in vitro* phosphatase assays.

The C-terminal part of Net1 is not well characterized. It is necessary for cell growth as indicated by a truncated version of Net1, where 138 amino acids of the C-terminal region were deleted. These cells show severe growth defects similar to *net1Δ* strains. Expression of a small fragment containing these 138 amino acids can ameliorate the growth defects of *net1Δ* mutants. When proper localization and regulation of Cdc14 is ensured the small fragment is able to fully suppress the growth defect. Immunoprecipitation of the small fragment revealed an interaction with a subunit of RNA polymerase I, Rpa43. Interestingly, only a posttranslationally modified and presumably phosphorylated version of the Net1-fragment interacted with Rpa43.

The model of Net1 functions could be extended by this work. Direct binding of Net1 to DNA substrates could be shown for the first time. This finding could influence the view on how Net1 localizes in the nucleolus and organizes nucleolar structure. Furthermore, the *pfam10407*-motif could be dismissed as the region necessary for Cdc14 binding and inhibition. This function is conveyed by a region between amino acids 234-455 of Net1. The C-terminal region of Net1 contributes to cell growth by binding to RNA polymerase I and stimulating its activity.

3. EINLEITUNG

3.1 Regulation der Mitose-Phase des Zellteilungszyklus

Für den korrekten Ablauf des Zellteilungszyklus ist ein komplexes Wechselspiel aus Proteinphosphorylierung, -ubiquitinierung und -degradation sowie die Umkehr dieser Prozesse durch Dephosphorylierung, Deubiquitinierung und Proteinsynthese notwendig (Primorac und Musacchio, 2013). Den zeitliche Ablauf der einzelnen Zellteilungszyklus-Phasen vermitteln die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs, *cyclin-dependent kinases*) (Morgan, 1997; Uhlmann 2011). Sie bestehen aus einer katalytischen Kinase-Untereinheit und einer regulatorischen Cyclin-Untereinheit, welche die Aktivität und Substratspezifität vermittelt. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stellt die CDK Cdc28 den Hauptregulator des Zellteilungszyklus dar. Cdc28 kann in Kombination mit den G1-Phase-Cyclinen Cln1-3, den S-Phase Cyclinen Clb5 und Clb6 sowie den mitotischen Cyclinen Clb1-4 vorliegen (Nasmyth 1996). Die Aktivität der CDK wird über zwei Mechanismen gesteuert, zum einen über die transkriptionelle Kontrolle der Cyclin-Untereinheiten und zum anderen über deren Ubiquitin-vermittelte Degradation am 26S Proteasom. Zwei E3-Ubiquitin-Ligasen vermitteln hierbei die Substratspezifität, der SCF-Komplex (Skip1/Cullin/F-Box) und der APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) (Chang und Barford, 2014). Die Ubiquitinierung der G1-Phase-Cycline und des CDK-Inhibitors Sic1 erfolgt über den SCF-Komplex, die der M-Phase-Cycline hauptsächlich über den APC/C mit den Co-Aktivatoren Cdc20 und Hct1 (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997). Wichtige Substrate des APC/C in der Mitose sind Pds1 (Securin), der Inhibitor der Separase Esp1, und Clb5. Die vorliegende Arbeit befasst sich schwerpunktmäßig mit Ereignissen in der Mitose-Phase des Zellteilungszyklus, dementsprechend soll auf die Regulation dieser Phase im weiteren Verlauf genauer eingegangen werden.

3.1.1 Aktivierung der Separase

Während der DNA-Replikation werden die Schwesterchromatiden miteinander über Proteinkomplexe (Cohäsin) verbunden (Hirano, 2015). Die Auflösung dieser Verbindung muss gewährleistet sein, damit die Chromatiden in der Anaphase voneinander getrennt werden können. Hierzu wird die Cohäsin-Untereinheit Scc1 durch die Protease Separase (Esp1) gespalten. Um die zeitliche Regulation zu gewährleisten, wird Esp1 durch einen Inhibitor namens Securin (Pds1) inaktiv gehalten. Erst wenn alle Kinetochore bipolar mit der Spindel verknüpft sind, markiert der APC/C-Cdc20 durch Ubiquitinierung Pds1 für den Abbau (Pines, 2011). Durch die Ubiquitin-vermittelte Degradation von Pds1 wird Esp1 aktiv und kann Scc1 spalten. Dieser Vorgang markiert den Beginn der Anaphase der Mitose.

3.1.2 Inaktivierung der PP2A und Aktivierung der Phosphatase Cdc14

Der Austritt aus der Mitose erfordert die Inaktivierung der mitotischen CDKs. Hierbei spielt die Proteinphosphatase Cdc14 eine wichtige Rolle, indem sie als Hauptantagonist der mitotischen CDK-Aktivität fungiert und den Phosphorylierungszustand vieler CDK-Substrate moduliert (Weiss, 2012). Darunter befindet sich unter anderem Hct1, der zweite Co-Aktivator des APC/C neben Cdc20. Hct1 wird durch die Dephosphorylierung aktiviert und kann an den APC/C binden. Desweiteren sorgt Cdc14 für die Akkumulation des CDK-Inhibitors Sic1. Cdc14 dephosphoryliert Sic1 und seinen Transkriptionsfaktor Swi5, was zum einen zur Stabilisierung von Sic1 und zum anderen zur verstärkten Transkription von *SIC1* führt (Visintin *et al.*, 1999). Wenn die Inaktivierung mitotischer CDKs nicht gewährleistet ist, arretieren die Zellen in der späten Anaphase/Telophase mit getrennten Kernen und elongierter Spindel. Die Überexpression von *CDC14* hingegen führt zu verfrühter CDK-Inaktivierung (Visintin *et al.*, 1998).

Die Aktivität von Cdc14 wird durch seine Zellzyklus-abhängige Assoziation mit seinem Inhibitor Net1 und die damit verbundene Lokalisation und Sequestrierung im Nukleolus gewährleistet. Während des überwiegenden Anteils des Zellteilungszyklus bis zum Beginn der Anaphase bindet Net1 an Cdc14 und inhibiert seine Phosphatase-Aktivität, indem es das aktive Zentrum der Phosphatase bedeckt (Traverso *et al.*, 2001). Da Net1 als Kernkomponente des RENT-Komplexes (vgl. 3.2.2) im Nukleolus an der rDNA lokalisiert, befindet sich auch Cdc14 die meiste Zeit im Nukleolus. Die Dissoziation von Net1 und Cdc14 wird durch Phosphorylierungsereignisse innerhalb der N-terminalen Region von Net1 gesteuert. Net1 liegt bis zur Anaphase aufgrund der Aktivität der Proteinphosphatase 2A (PP2A) mit ihrer regulatorischen Untereinheit Cdc55 in einem hypophosphorylierten Zustand vor. Sobald die Separase Esp1 durch die Ubiquitin-vermittelte Degradation von Securin (Pds1) aktiv wird, ist sie auch in der Lage PP2A-Cdc55 zu inaktivieren (Queralt *et al.*, 2006; Baro *et al.*, 2013). Durch das Fehlen der antagonisierenden Phosphatase-Aktivität der PP2A kommt es zu einer Hyperphosphorylierung von Net1 durch Clb-CDKs an den Consensus-Motiven S/T-P in der N-terminalen Region von Net1 (Azzam *et al.*, 2004). Auch die Polo-Kinase Cdc5 leistet hierbei einen Beitrag (Shou *et al.*, 2002; Yoshida und Toh-e, 2002). Zwei Proteinnetzwerke regulieren die Dissoziation von Cdc14 von seinem Inhibitor Net1 und die anschließende Freisetzung von Cdc14 in Zellkern und Cytoplasma: FEAR (*Cdc fourteen early anaphase release*) und MEN (*mitotic exit network*) (s. Abb. 3.1).

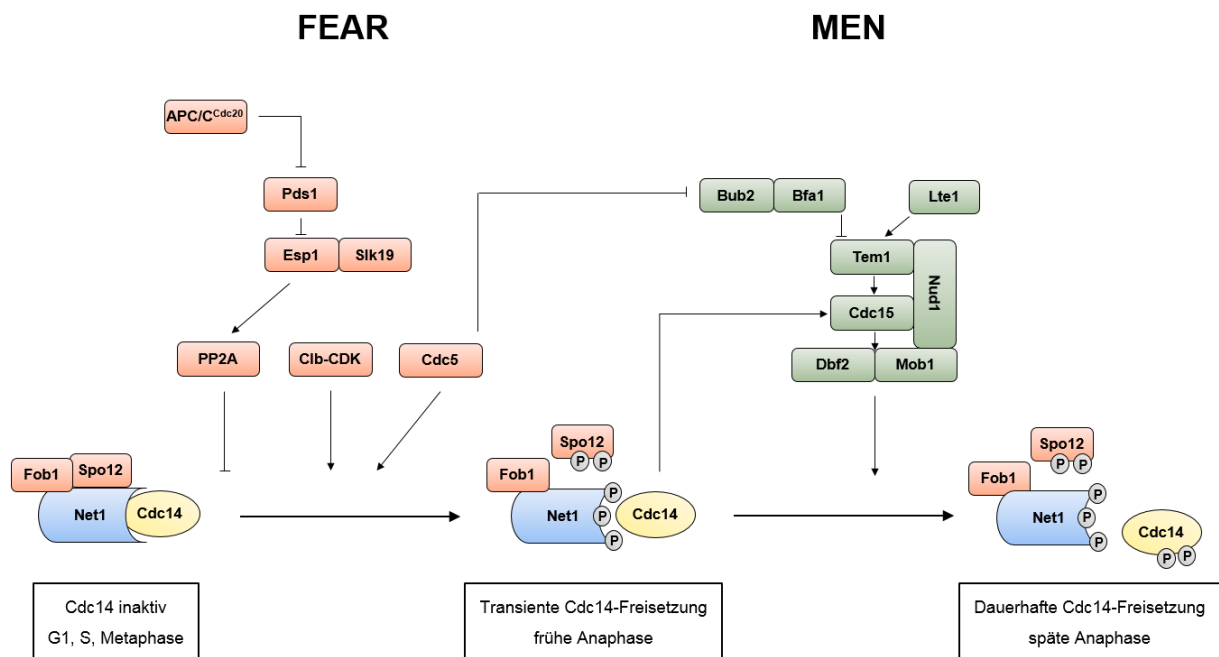


Abb. 3.1: Cdc14-Regulation über FEAR und MEN

Die Cdc14-Freisetzung während der frühen Anaphase wird durch das FEAR-Netzwerk vermittelt und resultiert in einem kurzen Puls an Cdc14-Aktivität. Die dauerhafte Freisetzung von Cdc14 beruht auf dem Einfluss des MEN und resultiert in einer längerfristigen Aktivität von Cdc14 und dem Austritt aus der Mitose.

Abbildung verändert nach: Rock und Amon (2009)

3.1.2.1 FEAR – *Cdc Fourteen Early Anaphase Release*

Das FEAR-Netzwerk besteht aus einer Vielzahl an Proteinen, darunter die Separase Esp1 mit ihrem Inhibitor Securin (Pds1), das Separase-bindende Protein Slk19, die Proteinphosphatase 2A (PP2A) mit ihrer regulatorischen Untereinheit Cdc55, die Polo-Kinase Cdc5, Spo12, Fob1 sowie CDKs mit den assoziierten Cyclinen Clb1 und Clb2 (Rock und Amon, 2009). Am Metaphase-Anaphase-Übergang liegt Net1 in hypophosphoryliertem Zustand vor und ist in der Lage Cdc14 stabil zu binden. Der Beginn der Anaphase wird markiert durch die APC/C-Cdc20-abhängige Degradation von Securin (Pds1), woraus eine Aktivierung des Separase (Esp1)/Slk19-Komplexes resultiert. Dieser Komplex vermindert über einen bislang noch nicht genau verstandenen Mechanismus die Aktivität der PP2A-Cdc55. Dies wiederum erlaubt die Phosphorylierung von Net1 durch die Aktivität der Clb-CDKs, welche ebenfalls Spo12 phosphorylieren. Unterstützt wird dies durch die Aktivität der Polo-Kinase Cdc5, einem Faktor, der sowohl im FEAR-Netzwerk als auch im MEN aktiv ist.

Die Aktivität des FEAR-Netzwerks ist nicht notwendig für den Austritt aus der Mitose, das durch FEAR transient in den Kern freigesetzte Cdc14 reguliert jedoch wichtige Aspekte der

Chromosomensegregation und wird benötigt für die Trennung des rDNA-Locus, die Regulation der Spindeldynamik und der korrekten Lokalisation von Spindelproteinen sowie für die Initiierung des MEN. Unterstützend wirkt hierbei ein Aktivator von Cdc14 im Nukleolus, das Net1-verwandte Protein Tof2 (Geil *et al.*, 2008).

3.1.2.2 MEN – *Mitotic Exit Network*

An der Spitze der MEN-Signalkaskade steht das Ras-ähnliche Protein Tem1, das durch die Bindung von GTP aktiviert und durch den GAP-Komplex (*GTPase activating protein*) Bub2-Bfa1 inhibiert wird (Seshan und Amon, 2004). Den zugehörigen GEF (*Guanine exchange factor*) stellt Lte1 dar, welches nur in der Tochterzelle lokalisiert. Über die Lokalisation von Lte1 in der Tochterzelle wird eine räumliche Regulation des MEN vermittelt: zu einer Aktivierung des MEN kann es erst dann kommen, wenn die GTPase Tem1, welche am Spindelpol lokalisiert, bei der Elongation des Zellkerns durch den Knospenhals in die Tochterzelle eintritt und so ein Kontakt mit Lte1 möglich wird. Cdc15 und der Proteinkomplex Dbf2/Mob1 stellen weitere Kinasen dar, die von einem *Scaffold*-Protein namens Nud1 an den Spindelpolkörpern verankert werden.

Das MEN ist essentiell für den Austritt aus der Mitose und das Einleiten der Cytokinese. Desweiteren ist das MEN verantwortlich für die Lokalisation von Cdc14 am Spindelpol der Tochterzelle (Yoshida und Toh-e, 2002).

3.1.3 Trennung der rDNA

Eine Besonderheit bei der Chromosomentrennung in der Mitose lässt sich bzgl. der Trennung des rDNA-Locus feststellen. Im Gegensatz zum restlichen Genom wird die Trennung der rDNA erst in der Anaphase eingeleitet, wenn eine erste Welle an Cdc14 über das FEAR-Netzwerk freigesetzt wird. Durch die hohe, transkriptionelle Aktivität des rDNA-Locus kommt es neben der Cohäsin-Beladung bei der Replikation zusätzlich zu Cohäsin-unabhängigen Verbindungen der Schwesterchromatiden (Machín *et al.*, 2006; Tomson *et al.*, 2006). Für die Trennung dieser Verbindungen wird die Aktivität von FEAR-aktiviertem Cdc14 sowie der heteropentamere Komplex Condensin benötigt (Lavoie *et al.*, 2004; Torres-Rosell *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Durch die Anlagerung von Condensin kann der rDNA-Locus hyperkompaktiert werden, so dass die Trennung des großen Chromosoms XII mit dem rDNA-Locus gewährleistet werden kann.

3.2 Der Nukleolus – Struktur und Aufgaben

Der Nukleolus wurde bereits in frühen Phasen der mikroskopischen Untersuchungen als Substruktur des Zellkerns identifiziert. In *S. cerevisiae* erscheint der Nukleolus oft als halbmondförmige oder sichelartige Struktur, die an den Zellkern angrenzt. Der Nukleolus nimmt etwa ein Drittel des Volumens des Zellkerns ein. Im Gegensatz zu den Nukleoli höherer Eukaryonten löst sich seine Struktur während der Mitose nicht auf, sondern wird entlang der mitotischen Spindel getrennt (Garcia und Pillus, 1999). Elektronenmikroskopische Untersuchungen in höheren Eukaryoten zeigten eine Unterteilung der nukleolären Struktur in drei Hauptkomponenten auf: fibrilläres Zentrum (FC – *fibrillar center*), dichte fibrilläre Komponente (DFC – *dense fibrillar component*) und Granuläre Komponente (GC – *granular component*) (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). Die rDNA-Wiederholungseinheiten und daran assoziierte Proteine bilden das FC, das DFC besteht aus den Primärtranskripten der rDNA und frühen Prozessierungsfaktoren. Die vorprozessierten rRNAs und spätere Prozessierungsfaktoren befinden sich in der GC, wo die Assemblierung der präribosomalen Untereinheiten stattfindet. Die Nukleoli höherer Eukaryoten zeigen in Abhängigkeit ihrer Aktivität und als Antwort auf externe Stimuli (Zellstress durch z.B. Hitzeschock, DNA-Schäden etc.) eine sehr dynamische Struktur und Größe. Aktive Nukleoli sind groß und ihre morphologischen Subkompartimente vermischen sich, während inaktive Nukleoli kleiner und kompakter sind und eine deutliche Trennung der einzelnen Subkompartimente aufweisen (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Boisvert *et al.*, 2007). In *S. cerevisiae* konnten analoge, morphologische Subkompartimente des Nukleolus nachgewiesen werden (Léger-Silvestre *et al.*, 1999). Die ribosomalen Gene lokalisierten auch hier im FC, RNA-Polymerase I und frühe Prozessierungsfaktoren hielten sich im DFC auf, wobei sich rRNA-Transkripte zum Teil über DFC und GC verteilen.

Der Nukleolus gilt als der Ort der rRNA-Synthese und Ausgangspunkt der Ribosomenbiogenese (Tschochner und Hurt, 2003). Desweiteren dient er als Depot für eine wichtige Komponente der Regulation des Mitose-Austritts, der Proteinphosphatase Cdc14. Aufgrund seiner besonderen Struktur und des repetitiven Charakters der rDNA-Wiederholungseinheiten unterliegt der Nukleolus einer besonderen Form des *Silencing*, bei dem die Histon-Deacetylase Sir2 eine wichtige Rolle spielt. Im weiteren Verlauf soll auf diese Charakteristika näher eingegangen werden.

3.2.1 Anordnung der rDNA

Die rDNA stellt das Kernstück des Nukleolus dar. Sie umfasst in *Saccharomyces cerevisiae* einen ca. 1,4 Mb großen Bereich und liegt in Form von 150 - 200 Wiederholungseinheiten (sog. *tandem repeats*) eines ca. 9,1 kB großen DNA-Bereichs vor. Beim Menschen sind die rDNA-Loci auf die fünf acrozentrischen Chromosomen 13,14,15,21 und 22 verteilt. Die rDNA-Cluster, an denen sich Nukleoli ausbilden können, werden auch als NORs (*nucleolar organizer regions*) bezeichnet (Boisvert *et al.*,

2007). Trotz des Vorhandenseins von zehn NORs in humanen, diploiden Zellen und somit potentiell zehn Nukleoli, bilden sich durch Vereinigung der einzelnen, nukleolären Strukturen nur zwischen einem und drei Nukleoli aus (McCann und Baserga, 2014).

In der Hefe befindet sich der einzige rDNA-Locus auf dem rechten Arm von Chromosom XII ca. 300 kB vom Centromer und ca. 600 kB vom rechten Telomer entfernt vor (Torres-Rosell *et al.*, 2004). Jede Wiederholungseinheit umfasst dabei Gene, die für die 5S, 18S, 5,8S und 25S rRNAs codieren, die durch die *Spacer*-Regionen ITS1/ITS2 (*internal transcribed spacer*) voneinander getrennt sind. Zwischen den einzelnen Wiederholungseinheiten befinden sich nicht-transkribierte Bereiche, die als NTS1 und NTS2 (*nontranscribed spacer*) bezeichnet werden. Innerhalb der NTS1-Region ist das *replication fork barrier*-Element (RFB) zu finden, welches die Bindestelle für das Protein Fob1 darstellt. NTS2 enthält den Replikationsursprung ARS (*autonomously replicating sequence*) und den Transkriptionsstart TIR (*transcription initiation region*), welcher als Promotorregion für die RNA Polymerase I fungiert. (vgl. Abb. 3.2).

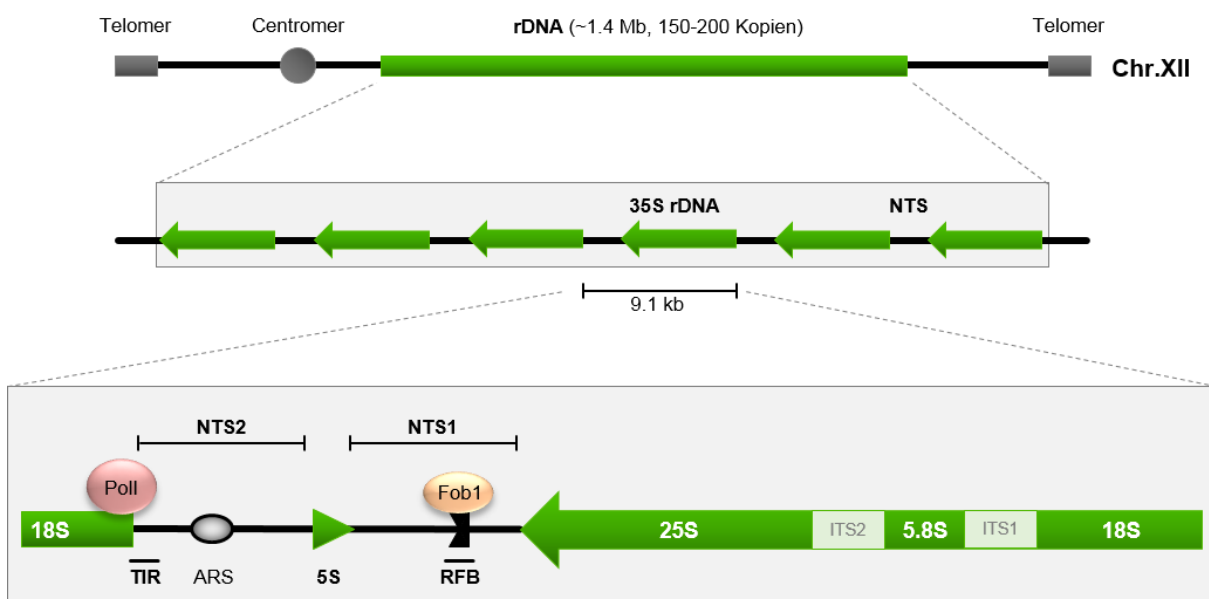


Abb. 3.2: Organisation der rDNA - Aufbau einer Wiederholungseinheit

Der rDNA-Locus befindet sich auf dem rechten Arm von Chromosom XII und liegt ca. 300 kB vom Centromer und ca. 600 kB vom rechten Telomer entfernt. Er besteht aus 150-200 Kopien eines etwa 9,1 kB großen DNA-Bereichs. Der codierende Bereich der 35S-rDNA wird von den beiden *external transcribed spacers* 5'-ETS und 3'-ETS flankiert, die codierenden Bereiche für die reife 18S, 5,8S und 25S-rRNA werden durch die *internal transcribed spacers* ITS1 und ITS2 voneinander getrennt.

Schema verändert nach Venema und Tollervey, 1999; Huang und Moazed, 2003; Kobayashi 2011

18S, 5,8S und 25S werden von der RNA-Polymerase I in Form eines 35S-Primärtranskripts transkribiert, welches durch die frühen Prozessierungsfaktoren Nop56 und Nsr1 weiter prozessiert wird (Fromont-Racine *et al.*, 2003; Tschochner und Hurt, 2003). Das 5S-Gen wird von der RNA-Polymerase III transkribiert. Die Transkription durch die RNA-Polymerase II wird aktiv durch das am rDNA-Locus stattfindende *Silencing* verhindert (vgl. 3.2.2.2).

3.2.2 Net1 und der RENT-Komplex

Net1 (auch Cfi1 oder Ecs5 genannt) ist ein 1189 Aminosäuren großes, nukleoläres Protein, das schon früh als wichtige Strukturkomponente des Nukleolus und Kernuntereinheit des RENT-Komplexes (*regulator of nucleolar silencing and telophase exit*) charakterisiert wurde. Weitere Komponenten des RENT-Komplexes sind die Histon-Deacetylase Sir2 und die Proteinphosphatase Cdc14. Über Net1 werden beide Proteine im Nukleolus an der rDNA verankert. Sir2 vermittelt dort das *Silencing* der rDNA (Straight *et al.*, 1999), während Cdc14 durch die Bindung an Net1 inaktiv gehalten wird bis es in der Anaphase durch die Aktivität des FEAR- und MEN-Netzwerkes in den Zellkern und das Cytoplasma freigesetzt wird (Visintin *et al.*, 1998; Shou *et al.*, 1999).

Der RENT-Komplex wird über seine Kernuntereinheit Net1 an die rDNA rekrutiert. Dies geschieht über zwei Interaktionspartner, zum einen das *replication fork barrier*-Protein Fob1 in der NTS1-Region und zum anderen über die RNA-Polymerase I in der Promotor-Region in NTS2, wobei sich der Bereich der Net1-Bindung bis in den codierenden Bereich der 35S rDNA hineinziehen kann (Huang und Moazed, 2003). Da Net1 keine der bisher charakterisierten DNA-Bindedomänen wie Leucin-Zipper, Zink-Finger oder Helix-Turn-Helix-Motiv enthält, wurde eine direkte DNA-Bindung für unwahrscheinlich befunden (Kasulke *et al.*, 2002) und stattdessen davon ausgegangen, dass die Interaktion von Net1 mit der rDNA indirekt über die beiden genannten Partner erfolgt. Früh wurde auch die Lokalisation von Net1 mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wobei sowohl die Immunfluoreszenz nach Epitopmarkierung als auch die Untersuchung lebender Zellen über die Fusionierung mit GFP zum Einsatz kamen. Beide Methoden zeigten eine Lokalisation von Net1 in einer räumlich eng begrenzten Subregion des Nukleolus, wobei das Net-Signal Perlen- oder Schnur-artig auftrat. Dies ähnelt dem Signal, das man bei einem Nachweis der rDNA durch FISH-Analysen erhält, wodurch geschlossen werden konnte, dass sich Net1 im rDNA-enhaltenden fibrillären Zentrum (FC) des Nukleolus aufhält (Guacci *et al.*, 1994; Straight *et al.*, 1999).

Die N-terminale Region von Net1 enthält eine unter den Ascomyceten konservierte Region von ca. 75 Aminosäuren Länge. Diese Sequenz findet sich ebenfalls in der N-terminalen Region von Tof2, einem Aktivator der Phosphatase Cdc14 im Nukleolus (Geil *et al.*, 2008). Auch das Net1-verwandte Protein Dnt1 aus der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* weist diese Sequenz auf (s. Abb. 3.3). Dnt1 fungiert möglicherweise als nukleolärer Inhibitor der Cdc14-verwandten Phosphatase Clp1 (Jin *et al.*,

2007), spielt aber auch eine Rolle bei der Regulation der CDK-Aktivität über die Beeinflussung der Wee1-Kinase (Yu *et al.*, 2013). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten wurde vermutet, dass die konservierte Sequenz in den N-Termini von Net1, Tof2 und Dnt1 an der Regulation der Phosphatase Cdc14 beteiligt sein könnte. Der Aminosäurebereich wurde als *pfam10407*-Motiv (s. Abb. 3.3) in die NCBI-Datenbank für konservierte Protein-Domänen unter dem Schlagwort „*Cdc14 phosphatase binding protein N-terminus*“ aufgenommen (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

```

S.cerevisiae Net1 69 RKFL LFTKPTNTLLN SDEI IDKCEKM VPSLQED E LSLQDNSGC LDPDFLVKDV FNVNNI VRILKNEID 143
S.cerevisiae Tof2 80 KKFLHFTDGDNTLLQLSNEI LTKFDRL VNFKESE E VSLQDRHGC LDSEFI IKDVFENDGV VLVILKDELD 154
S.pombe Dnt1 14 NQFM I LFDPS SSISL KEKVQETYSKLV F-FESN N RN IKNEESY DIPNEYLVGEI FPTNSK VIV - - - - 85

```

Abb. 3.3: Sequenzvergleich der Proteine Net1, Tof2 und Dnt1 – das *pfam10407*-Motiv

Die N-terminalen Regionen der Proteine Net1 (Aminosäuren 69-143), Tof2 (Aminosäuren 80-154) und Dnt1 (Aminosäuren 14-85) weisen eine konservierte Sequenz auf. Identische Aminosäuren sind rot, ähnliche Aminosäuren rosa dargestellt, Lücken wurden durch Striche gekennzeichnet.

Das Alignment wurde mit dem CLC Sequence Alignment Editor erstellt.

3.2.2.1 Net1 als nukleoläre Strukturkomponente

Die dreidimensionale Organisation des Zellkerns erfolgt nicht zufällig. Drei Strukturelemente sind hierbei wichtig: Die Centromere, Telomere und der Nukleolus (Taddei und Gasser, 2012). Die Centromere der 16 Hefechromosomen befinden sich hierbei in einem Cluster in der Nähe des Spindelpolkkörpers, die Telomere stellen ebenfalls in Clusterformation Kontakte zur Kernhülle her, so dass die Chromosomenarme vom Centromer in die Peripherie ausgestreckt vorliegen. Diese Anordnung wird als Rabl-ähnliche Konformation bezeichnet (Jin *et al.*, 2000). Eine Besonderheit stellt dabei der Nukleolus dar. Der rechte Arm von Chromosom XII, der den rDNA-Locus mit den 150-200 rDNA-Wiederholungseinheiten enthält, separiert sich vom Rest der Chromosomen und nimmt die bekannte, halbmondförmige Struktur in der Kernperipherie ein, wobei die Struktur gegenüber des Spindelpolkkörpers zu liegen kommt. Im Gegensatz zu den übrigen Chromosomen geht der rechte Arm von Chromosom XII keine Kontakte mit anderen Chromosomen ein. Lediglich der Anteil hinter dem rDNA-Locus stellt Kontakte zum langen Arm von Chromosom IV her (Duan *et al.*, 2010) (s. Abb. 3.4).

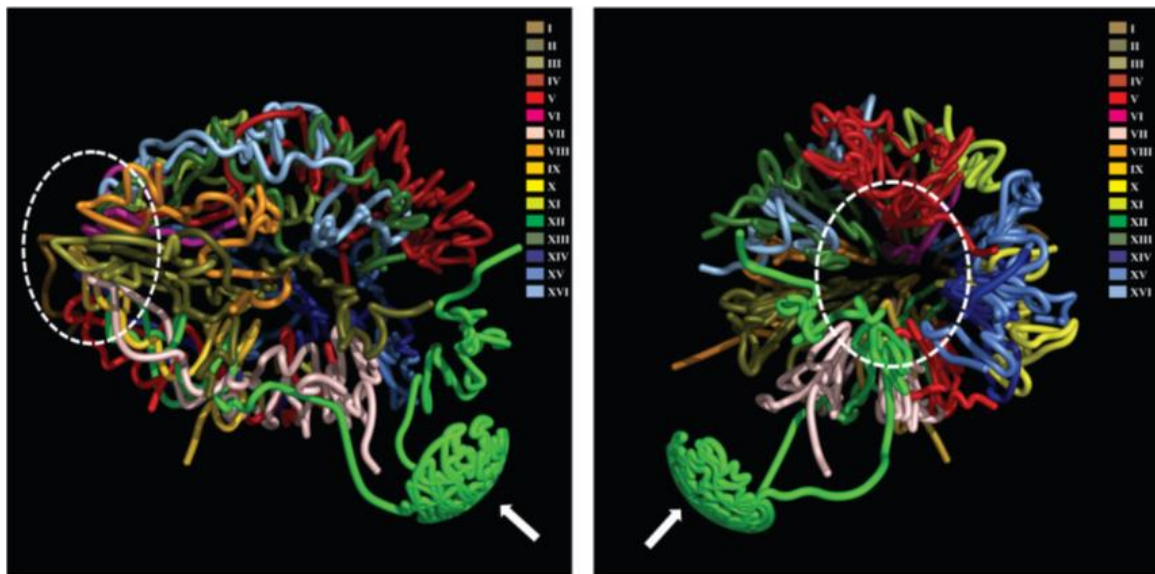


Abb. 3.4: Dreidimensionales Modell des Hefegenoms

Die 16 Chromosomen der Hefe liegen räumlich organisiert vor. An einem Pol des Zellkerns befindet sich der Centromer-Cluster (weiß gestricheltes Oval), am gegenüberliegenden Pol nimmt der rDNA-Locus auf dem langen Arm von Chromosom XII eine distinkte und vom Rest der Chromosomen getrennte Struktur ein (Nukleolus, weißer Pfeil). Der an den rDNA-Locus angrenzende Teil von Chromosom XII kann Kontakte zum langen Arm von Chromosom IV herstellen.

Abbildung aus Duan *et al.*, 2010

Einige experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass Net1 maßgeblich an der strukturellen Organisation des Nukleolus beteiligt ist (Shou *et al.*, 1999; Straight *et al.*, 1999). Eine Beeinträchtigung oder ein Fehlen von Net1 in *net1-1*- oder *net1Δ*-Stämmen geht einher mit der Fehllokalisierung weiterer, wichtiger Nukleoluskomponenten wie beispielsweise Cdc14, Sir2 und Nop1. Bei Nop1 handelt es sich um eine Histon-Glutamin-Methyltransferase und eine Komponente des SSU- (*small subunit*) Prozessosoms, welches für die Prozessierung der 18S-rRNA benötigt wird (Tollervey *et al.*, 1991). Der RENT-Komplex vermittelt über die Wechselwirkung mit dem Proteinkomplex Cohibin (bestehend aus Lrs4 und Csm1) einen Kontakt der rDNA mit dem CLIP-Komplex (bestehend aus Heh1 und Nur1), einem Bestandteil der inneren Kernmembran. Auf diese Weise kann die rDNA am Rand des Zellkerns an der inneren Kernmembran räumlich organisiert werden (Mekhail und Moazed, 2010).

3.2.2.2 Verankerung von Sir2 und Silencing

Eine der drei Untereinheiten des RENT-Komplexes und somit direkter Interaktionspartner von Net1 ist die NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylase Sir2 aus der Familie der Sirtuine. Sir-Proteine (*silent information regulator*) vermitteln wie der Name erkennen lässt das *Silencing* an drei bekannten Gen-Loci: an den inaktiven MAT-Loci HML und HMR, den Telomeren und der rDNA (Straight *et al.*, 1999; Kasulke *et al.*, 2002). *Silencing* beschreibt eine Form der Transkriptionsinaktivierung, bei der Regionen

eukaryotischer Chromosomen in eine für Transkription und Rekombination unzugängliche Chromatinstruktur konvertiert werden, das sog. Heterochromatin. Ausschlaggebend hierfür ist die Deacetylierung von Lysinresten in den aminoterminalen Schwänzen der Histone H3 und H4 durch NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylasen, woraus eine kompaktere und somit für Transkriptionsfaktoren unzugänglichere Struktur der Nukleosomen resultiert. Experimentell kann dies durch die Insertion von Markergenen in Regionen, die von *Silencing* betroffen sind, untersucht werden. Dabei ist die Expression dieser inserierten Markergene verringert (Guarente, 2000).

Silencing an der rDNA wird auch mit der Langlebigkeit der Zellen in Verbindung gebracht (Guarente, 2000). Dies entspringt der Beobachtung, dass in *sir2*-Mutanten die Frequenz von Rekombinationsereignissen am hochrepetitiven rDNA-Locus um den Faktor zehn erhöht ist. Produkte dieser Rekombinationsereignisse stellen die sogenannten ERCs (*extrachromosomal rDNA circles*) dar (Guarente und Sinclair, 1997). Diese kleinen, ringförmigen Konstrukte besitzen eine ARS (*autonomously replicating sequence*) und replizieren bevorzugt vor der restlichen, genomischen DNA. Mit der Zeit kommt es somit zu einer Akkumulation der ERCs und letztlich zur Seneszenz der Mutterzelle. Eine Funktion von Sir2 an der rDNA besteht also darin, durch Etablierung einer Heterochromatinstruktur das Ausbilden eines ersten ERC möglichst lange hinauszuzögern.

3.2.2.3 Inhibition und Verankerung von Cdc14 – die RENT-Kontroll-Hypothese

Die dritte Untereinheit des RENT-Komplexes ist die Phosphatase Cdc14. Net1 stellt ihren Inhibitor dar und sorgt dafür, dass die Phosphatase im Nukleolus inaktiv gehalten wird, bis ihre Aktivität in der Anaphase der Mitose benötigt wird, um die rDNA-Trennung zu unterstützen und den Austritt aus der Mitose einzuleiten (Weiss, 2012). Der Nukleolus als Region eignet sich aufgrund mehrerer Eigenschaften, um dort ein bestimmtes Protein durch Komplexierung zu inaktivieren (Visintin und Amon, 2000). Zum einen kann das Protein nach seiner Freisetzung sehr schnell seine Zielproteine im Zellkern und im Cytoplasma erreichen. Zum anderen können zusätzlich zu den Funktionen im Zellkern und Cytoplasma auch Teilfunktionen im Nukleolus selbst wahrgenommen werden. Der Nukleolus stellt also eine Plattform zur Verfügung, wo Proteine mit Funktion im Kern und Cytoplasma sicher und inaktiv aufbewahrt werden können, bis sie für ihre Funktion in der Zelle benötigt und dafür aktiviert und freigesetzt werden. Im vorliegenden Fall zwischen Net1 und Cdc14 wurde früh in der Literatur die RENT-Kontroll-Hypothese aufgestellt (Shou *et al.*, 1999): Während G1-, S- und der frühen M-Phase ist Cdc14 als Teil des RENT-Komplexes im Nukleolus sequestriert und dadurch inaktiviert. Im Lauf der Anaphase sorgt ein Signal über Tem1 für die Freisetzung von Cdc14 von seinem Inhibitor Net1. Cdc14 gelangt daraufhin in den Kern und in das Cytoplasma, wo es den Phosphorylierungszustand von Proteinen moduliert, die an der Proteolyse von Clb2 (Cdc14 dephosphoryliert Hct1) und der

Transkription von *SIC1* (Cdc14 dephosphoryliert Swi5) beteiligt sind. Der RENT-Komplex reassembliert, sobald die Clb-CDK-Aktivität gering und der Tem1-abhängige Signalweg abgeschaltet ist. Hierbei ist Cdc14 möglicherweise über eine negative Feedbackschleife beteiligt, indem es seinen eigenen Inhibitor Net1 dephosphoryliert. Der aktuelle Wissensstand erlaubt eine genauere Interpretation dieser Aussagen: Das Tem1-abhängige Signal stellt den heute als MEN (*mitotic exit network*) charakterisierten Signalweg dar (vgl. 3.1.3.2), wobei schon zuvor ein kleiner Anteil an Cdc14 durch einen zweiten Signalweg FEAR (vgl. 3.1.3.1) im Zellkern freigesetzt wurde. Zusätzlich zur Loslösung von seinem Inhibitor Net1, wird für den erfolgreichen Kernexport von Cdc14 auch die Phosphorylierung (und damit die Maskierung) der NLS in Cdc14 benötigt. Dies geschieht MEN-abhängig durch die Aktivität der Kinase Dbf1-Mob2 (Mohl *et al.*, 2009).

3.2.2.4 Aktivierung der RNA Polymerase I

Für die Transkription der 35S-prä-rRNA wird die Aktivität der RNA-Polymerase I benötigt (Woolford und Baserga, 2013). Dieses 590 kDa große Holoenzym besteht in *S. cerevisiae* aus 14 Untereinheiten. Zwölf dieser Untereinheiten finden sich entweder identisch oder in Form von Homologen in den RNA-Polymerasen II und III wieder, lediglich zwei Untereinheiten (Rpa34 und Rpa49) sind exklusiver Bestandteil der RNA-Polymerase I. Die entstehenden prä-rRNA-Transkripte repräsentieren ca. 60% der gesamten, zellulären RNA-Transkription. Durch eine Vielzahl an Prozessierungsfaktoren wird die 35S-prä-rRNA zum Teil cotranskriptionell in die reife 18S, 5.8S und 25S rRNA prozessiert. RNA-Polymerase-Enzyme besitzen keine intrinsische Fähigkeit Promotor-Sequenzen zu erkennen und sequenzspezifisch dort zu binden. Sie sind daher auf Transkriptionsfaktoren bei der Rekrutierung an den Promotor und der Bildung des PIC (*preinitiation complex*) angewiesen (Russell und Zomerdijs, 2006). An der Rekrutierung der RNA-Polymerase I an den Promotor sind vier Transkriptionsfaktoren bzw. -Komplexe beteiligt: **UAF** (*upstream activating factor*) bestehend aus Rrn5, Rrn9, Rrn10 und den Histonen H3 und H4, **TBP** (*TATA-binding protein*), **CF** (*core factor*) bestehend aus Rrn6, Rrn7 und Rrn11 sowie **Rrn3** (TIF-1A in Säugern). Ein Modell für den Poll-Transkriptionszyklus wurde u.a. von Aprikian *et al.* (2001) vorgeschlagen. Demzufolge beginnt der Zyklus mit der Formierung des PIC in zwei Schritten, der sequenzspezifischen und stabilen Bindung von UAF am Promotor und der Rekrutierung von Poll-Rrn3 und CF durch UAF. TBP wird hierbei ebenfalls benötigt. Nach der Transkriptionsinitiation verlassen CF, TBP und Poll-Rrn3 den Promotor, während UAF gebunden bleibt, um weitere Rekrutierungsrunden einleiten zu können. Interessanterweise sind nur ca. 2% aller RNA-Polymerase I-Enzyme aus dem Gesamtzellextrakt Transkriptions-kompetent und die Initiations-kompetenten Enzyme liegen im Komplex mit Rrn3 vor (Woolford und Baserga, 2013). Rrn3 interagiert sowohl mit der Rrn6-Untereinheit des CF als auch mit Rpa43 und könnte somit eine Brücke zwischen Poll und CF bilden, um

eine effektive Integration von PolII in den PIC zu bewerkstelligen (Aprikian *et al.*, 2001). Im Fall von RNA-Polymerase II wird TFIIB benötigt, um das Holoenzym an TBP zu binden. Auch die Initiation von RNA-Polymerase III benötigt ein TFIIB-Homolog. Für RNA-Polymerase III übernimmt Rrn7 die Rolle von TFIIB bei der PIC-Bildung (Blattner *et al.*, 2011).

Neben den bereits genannten Funktionen bei der Regulation der Mitose und Organisation der Nukleolusstruktur (vgl. 3.2.2.1-3) besitzt Net1 auch eine davon unabhängige Rolle als Stimulator der rRNA-Synthese (Shou *et al.*, 1999). Diese Funktion beruht auf einer direkten Interaktion zwischen Net1 und der RNA-Polymerase I. Gereinigtes Net1 ist in der Lage *in vitro* die Aktivität der RNA-Polymerase I zu stimulieren. Dabei reicht der Einsatz äquimolarer Mengen von Net1 und RNA-Polymerase I aus, um den stimulierenden Effekt zu erzielen. In *net1*-Mutanten hingegen ist die Syntheserate der rRNA verringert, somit kommt es zu einer geringeren Akkumulation von rRNA. Eine Ursache hierfür könnte die Delokalisation der RNA-Polymerase I-Untereinheit A190 in diesen Stämmen sein. Passend hierzu kann die Überexpression von *RRN3* den temperatursensitiven Wachstumsdefekt von *net1-1*-Mutanten supprimieren. Das von Shou *et al.* (1999) vorgeschlagene Modell sieht vor, dass Net1 daran beteiligt ist die RNA-Polymerase I an das rDNA-Template zu rekrutieren und dort aktiv zu halten.

4. ERGEBNISSE

Die folgende Arbeit befasst sich mit der Analyse der Struktur des nukleolären Proteins Net1 und mit der Fragestellung, wie Net1 seine Zielregion, den Nukleolus, im Zellkern finden und erkennen kann. Desweiteren wird die Frage untersucht, welche Regionen innerhalb des großen, 1189 Aminosäuren langen Proteins welche Aufgaben bei der Nukleolusorganisation und der Regulation der Anaphase übernehmen. Abschließend wird versucht etwas genauer auf eine bisher noch nicht sehr gut charakterisierte Funktion des Net1-Proteins bei der Stimulierung der Aktivität der RNA-Polymerase I einzugehen.

4.1 Funktionen der N-terminalen Region von Net1 – Lokalisation

Um zu gewährleisten, dass ein Protein in einer spezifischen Subregion des Zellkerns, dem Nukleolus, lokalisiert, müssen mehrere Voraussetzungen gegeben sein (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). Das Protein muss zunächst über eine Kernlokalisationssequenz (NLS - *nuclear localization sequence*) verfügen, um in den Zellkern importiert zu werden. Anschließend muss es in der Lage sein die Zielregion innerhalb des Kerns zu erkennen. Dies kann einerseits über spezifische Sequenzerkennung und DNA-Bindung an der rDNA erfolgen oder andererseits über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Faktoren, die ihrerseits spezifisch an die rDNA binden. Im Falle von Net1 wurde bisher davon ausgegangen, dass die nukleoläre Lokalisation zum einen über Wechselwirkung mit dem Protein Fob1 zustande kommt (Huang und Moazed, 2003). Fob1 bindet sequenzspezifisch direkt an die rDNA in der NTS1-Region im Bereich des *recombination hotspots* und des *replication fork barrier*-Elements und wird für deren Aktivität benötigt (Huang und Moazed, 2003). Eine weitere Möglichkeit für Net1 an die rDNA zu gelangen besteht in einer Interaktion mit der RNA Polymerase I. Net1 kann somit auch in Bereichen der rDNA lokalisieren, die der Promotor-Region entsprechen, und die sich in den 35S rRNA-codierenden Bereich erstrecken.

Die Grundvoraussetzung für eine nukleoläre Lokalisation stellt die Fähigkeit des Proteins dar in den Zellkern zu gelangen. Dies wird über gerichteten Kernimport über Transportproteine, die Importine, bewerkstelligt. Eine im Protein vorhandene Kernlokalisationssequenz (NLS) stellt dabei die Bindestelle für einen Vertreter der Importin-Familie dar. Untersucht man die Aminosäuresequenz von Net1 mit Hilfe bioinformatischer Programme hinsichtlich bekannter NLS-Strukturelemente, erhält man mehrere Treffer, die über die gesamte Länge des Proteins verteilt sind (s. Abb 4.1).

1	MYKLQVVLVP	PSLQATMPIQ	FGYGPTIAES	SQLLPNRTNM	AQSAGDASLQ
51	YANLRSANVS	FTPSYFNQSR	FRKFLLFTKP	TNTLLNLSDE	IIDKCEKMYP
101	SLQEDIEILS	LQDNSGCDLD	PDFLVKDVFN	VNNIVRVILK	NEIDLDDSDAP
151	VS LYKSVKRS	KLNNGSPQSV	QPQQQIPSSS	GVLRIAKKRP	PTGTTTTTTTI
201	RSATNGSMRV	STPLARQIYP	PPSSKIVSNN	SDEDEDIDGE	RSFLPPPTQP
251	QSPPIRISSG	IDAGKKIKSS	IVEEDIVSRS	ATVDPDKTKQ	QRLLSGTPIM
301	STMTPNRVTL	TGQRVVSEHA	HKNELVFSAS	ASSSSFANGG	TAAVTAQDIN
351	RKPPVTTPRI	TSGMLK IPEP	RISEIEKELK	EGPSSPASIL	PAKAAKIPMK
401	KPYLENGENY	ESDDSSSSSEN	QETPETEPHS	KASLQRSQSS	IADNNGSPVK
451	NSPLGDAMPH	NVHLAELPKA	SNTSITKSSN	GESWGKQQEH	QPPRKSSLET
501	IVEKKSQAEP	SGIVEPKRMT	NFLDDNQVRE	KEDTNDKLLK	KEILPTIPHN
551	DQPILASSDK	SNGTLKSLAG	KVSSNNNNASK	EDGTIINGTI	EDDGNNDDEV
601	DTTVRIVPQD	SDSSSFPKSD	LFKMIEGDDT	DLPQWFKGKN	SRTSGNSKNS
651	KPYTTVLNKD	IDNSKPDPRN	ILPQRTPRSA	AKRAAQLLAG	AKKNEVPQKS
701	TEDSSSAAST	DDESESGIET	DFSSDDDFKR	KNMSVPNNGP	KDISLHSLKG
751	SVVPVKDSKI	INKEVDEERN	DKRDSQKKA	VSESVTNSK	ISEQMAKSFY
801	PNSNKKQNEA	TKVETKPATQ	ASSFPVVGGS	PSVATKGTTS	FNEEGNRKNV
851	KTKAKNESAQ	IDRQQKETTS	RVADLKSANI	GGEDLNKKAE	GSKEPEKASA
901	NIQDANDKNN	SKEKEDSKSK	QVSQ KKLKMT	DHLKEGNVQL	PKPSANDKLG
951	DLKAKFTNSK	TLVPPGIISN	EKNSSSANDD	DSSSSGSSTE	DESSSSSSSS
1001	DEETSTSRKA	RRVVVNTPRE	PVRSSSKIEA	PSPSV NKKIN	ATPDKIPVTQ
1051	LMDMSSPPSV	KSKTT SNPSS	ILH DLPRKVR	PSLSSLSDLV	SRGIPDVKEK
1101	TSK SNEKSQT	KAPSSSDDES	SSSDSDSNSSS	DSVSDSSSDS	KSESDDSDSG
1151	DSSDDGKSFI	SAKSASAALG	KKKKPSGGFA	SLIKDFKKK*	

Abb. 4.1: Untersuchungen der Aminosäuresequenz von Net1 hinsichtlich NLS-ähnlicher Sequenzen

Die Aminosäuresequenz von Net1 wurde mit dem Programm NLSmapper (nls-mapper.iab.keio.ac.jp/) untersucht. Die orange unterlegten Sequenzen wurden hierbei als Treffer für mögliche NLS-Aktivität identifiziert. Der Score rangierte für die einzelnen Treffer zwischen 4.0 und 6.0, was auf eher schwach ausgeprägte NLS-Aktivität hinweisen würde (Kosugi *et al.*, 2009).

4.1.1 Net1(1-1189)-GFP lokalisiert im Nukleolus

Zur Visualisierung von Net1 während des Zellteilungszyklus wurden Stämme untersucht, die über PCR-vermittelte Epitopmarkierung Fusionsproteine aus Net1 der vollen Länge (1189 Aminosäuren) und C-terminalem GFP exprimierten. Durch homologe Rekombination am Genort wurde gewährleistet, dass die Expression auf physiologischem Level stattfand. Als Marker für den Nukleolus diente 3mCherry-fusioniertes Nop56, ein konserviertes, nukleoläres Protein, das als Komponente des Box C/D snoRNP-Komplexes an der Reifung der prä-rRNA beteiligt ist (Lafontaine und Tollervey, 2000).

Die Analyse heterozygot-diploider (s. Abb. 4.2a) und haploider Versuchsstämme (s. Abb. 4.2b) am Fluoreszenzmikroskop zeigte die zu erwartenden Lokalisationsmuster für nukleoläre Proteine. Auffallend war jedoch, dass das Net1-Signal im Gegensatz zu Nop56 den Nukleolus deutlich schärfer und enger begrenzt abbildet. Zudem wies das Net1-Signal keine homogene Verteilung innerhalb des Nukleolus auf, sondern schien sich ähnlich wie Perlen auf einer Kette in kleinen Regionen zu konzentrieren (s. Abb. 4.2a, Zeile 3). In frühen Phasen des Teilungszyklus lag Net1 als halbmondförmiges Signal vor, wobei sich gelegentlich ringförmige Strukturen herausbilden konnten.

Während der Anaphase elongiert der Nukleolus und die Schwesterchromatiden werden voneinander getrennt. In diploiden Zellen zeigte sich hierbei eine kurzfristige Trennung der homologen rDNA-Loci (überwiegend in der Mutterzelle), so dass meist drei, bisweilen aber auch vier separate nukleoläre Strukturen zu erkennen waren, die in der Regel Komma- oder Klammerförmig angeordnet waren (s. Abb. 4.2a, Zeilen 5 und 6).

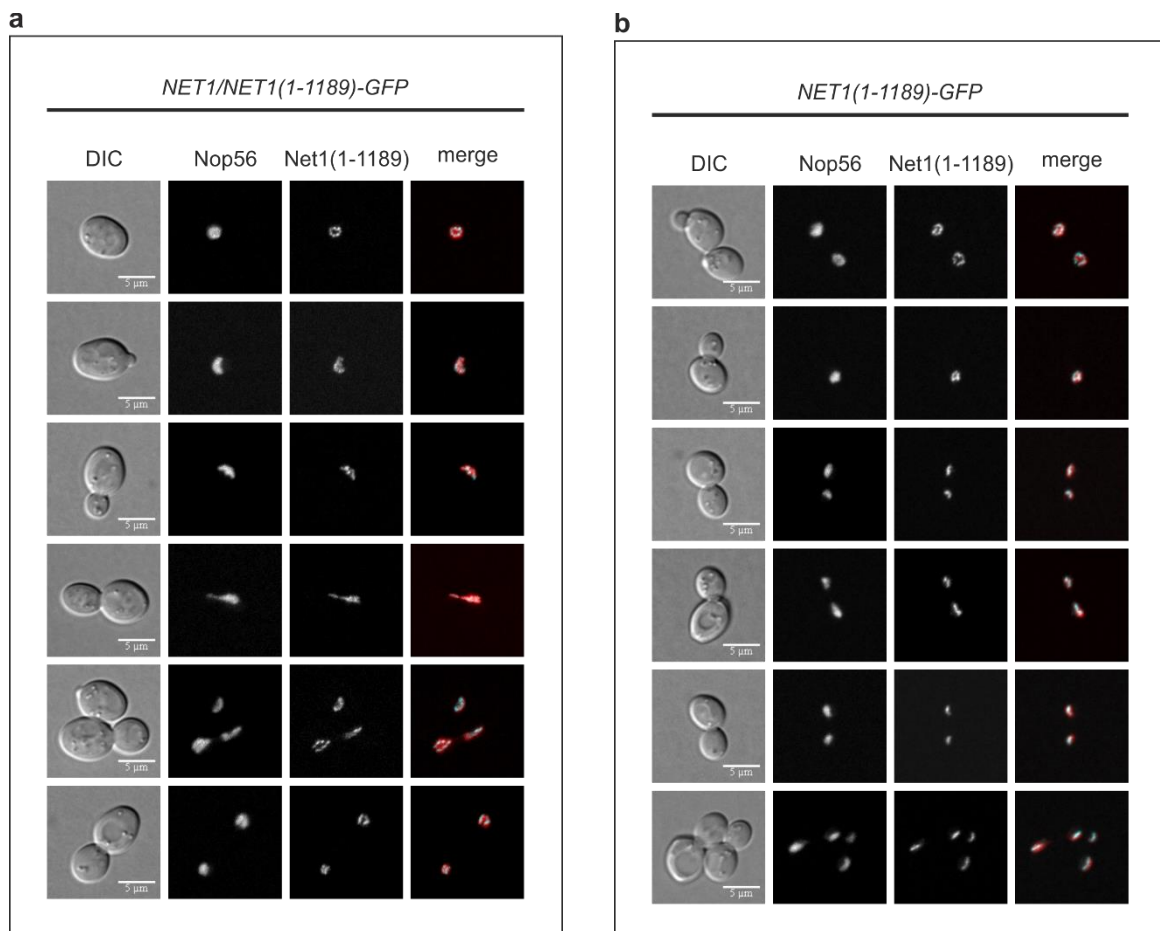


Abb. 4.2: Net1(1-1189)-GFP zeigt in der Fluoreszenzmikroskopie eine typische nukleoläre Lokalisation

Die Lokalisation von Net1(1-1189)-GFP wurde am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierzu wurden der diploide Stamm **a**, W13533 (*NET1/NET1(1-1189)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*) und ein haploider Nachkomme **b**, (*NET1(1-1189)-GFP-HIS3MX6 Nop56-3mCherry-URA3*) ausgewählt. Die erste Spalte zeigt die Zellmorphologie im Durchlichtkanal (DIC), in der zweiten Spalte ist der nukleoläre Comarker Nop56 gezeigt, Spalte 3 enthält das Net1-Signal und Spalte 4 zeigt beide Fluoreszenzkanäle überlagert (merge). Der Maßstabsbalken besitzt eine Länge von 5 µm.

Zur Bezeichnung der erstellten Net1-Konstrukte sei angemerkt, dass im weiteren Verlauf das Protein der vollen Länge als Net1(1-1189) bezeichnet wird. Net1-Verkürzungen werden entsprechend gekennzeichnet, z. B. Net1(1-455). Bei der Genschreibweise müsste korrekterweise die Angabe in Basenpaaren erfolgen, aufgrund der besseren Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit der Konstrukte wird dennoch die Aminosäure-Schreibweise beibehalten, also beispielsweise *NET1(1-455)*.

4.1.2 Die N-terminale Region von Net1 ist hinreichend für Nukleoluslokalisierung

Um einzugrenzen, welcher Bereich des Net1-Proteins hinreichend für den Kernimport und die Lokalisation im Nukleolus ist, wurde über PCR-vermittelte homologe Rekombination und Epitopmarkierung eine Serie C-terminaler Verkürzungen von Net1 hergestellt (s. Abb. 4.3). Es handelte sich hierbei um Verkürzungen, die am Genort vorgenommen wurden, wobei der C-terminale Anteil hinter der Verkürzungsstelle deletiert wurde. Die Verkürzungen Net1(1-1051), Net1(1-972), Net1(1-693), Net1(1-455), Net1(1-341) und Net1(1-233) wurden als Fusion mit GFP oder mit dem Flag12-Epitop hergestellt, um Analysen am Fluoreszenzmikroskop und im Western Blot zu ermöglichen.

In einem alternativen Ansatz wurden die codierenden Regionen der Verkürzungen Net1(1-341), Net1(1-233), Net1(1-196), Net1(1-147), Net1(1-110) und Net1(1-69) inklusive des *NET1*-Promotors in Vektoren für C-terminale GFP-Fusionierung kloniert. Nach Linearisierung im *LEU2*-Gen oder im *CYC1*-Terminator (*tCYC1*) wurde das entsprechende Konstrukt am *leu2*-Locus (W303) oder am *tCYC1* (S288c, BY4741) eines *NET1*-Wildtypstamms ins Genom integriert. Als *NET1*-Promotor galt hierbei die Region zwischen dem *upstream* liegenden Gen und dem *NET1*-Startcodon. Bei dieser Methode konnte es im Gegensatz zur endogenen Epitopmarkierung zu Mehrfachintegrationen kommen, welche sich auf das Expressionsniveau des jeweiligen Konstrukts auswirkten.

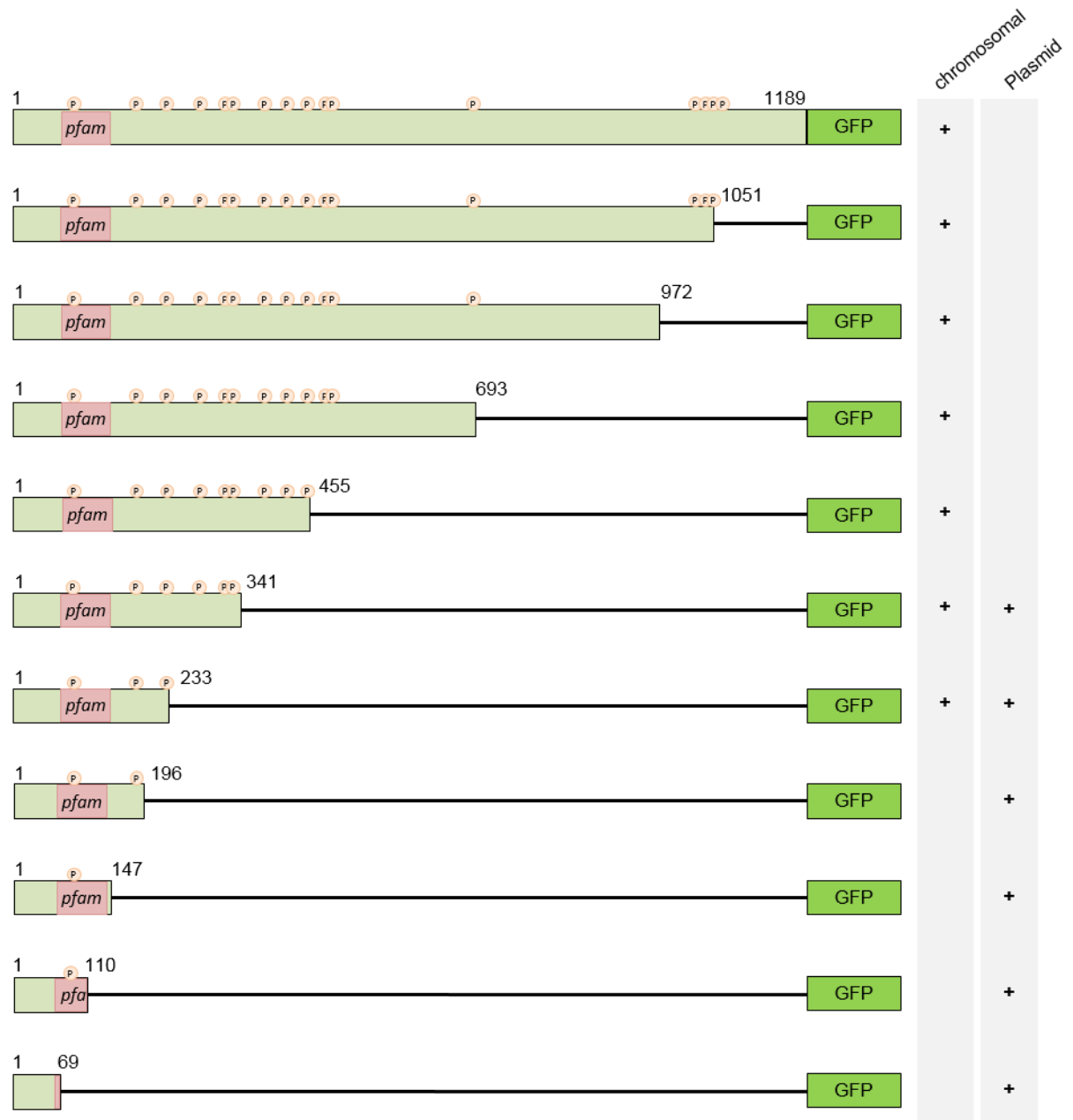
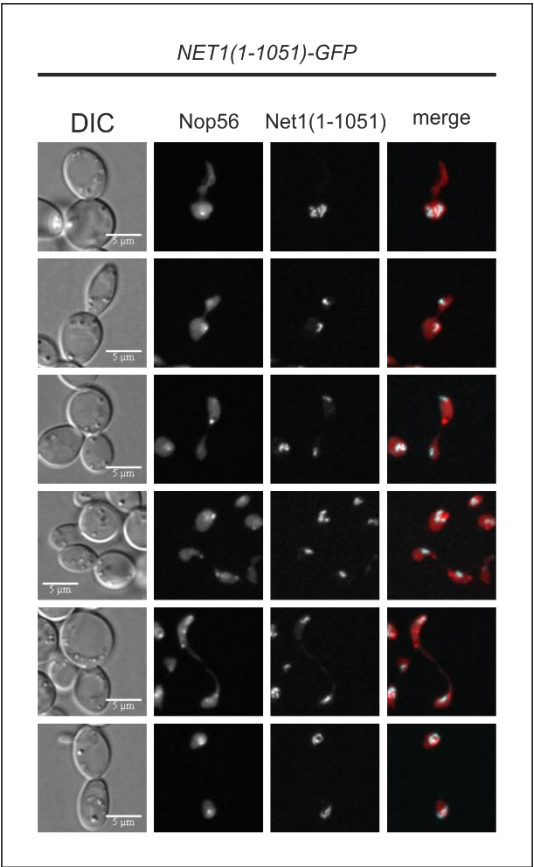
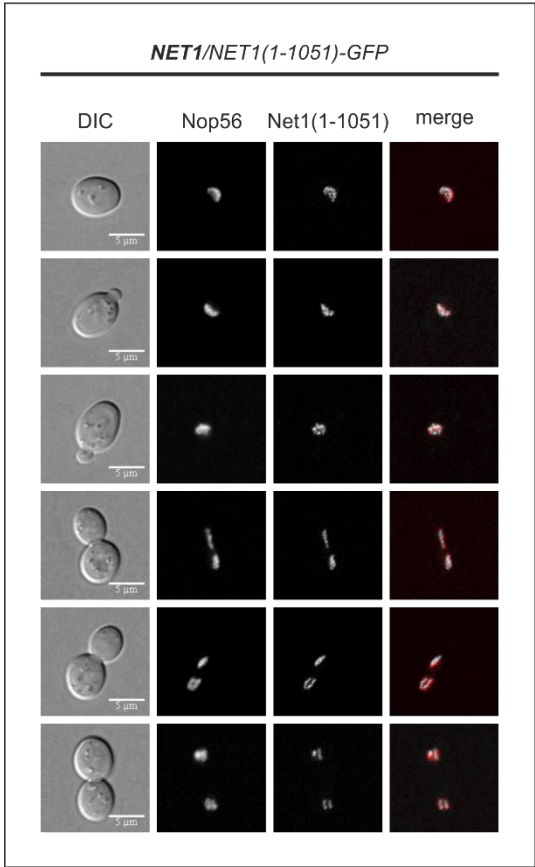


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der erstellten C-terminalen Verkürzungen von Net1

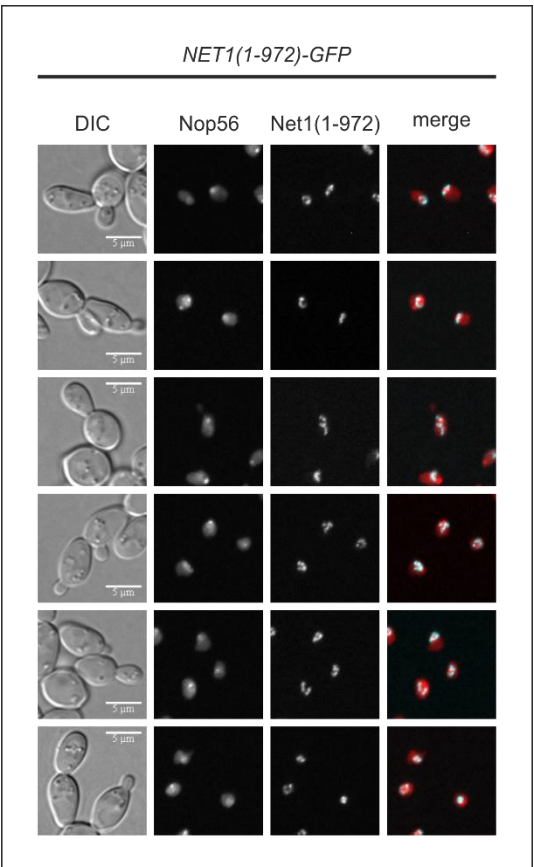
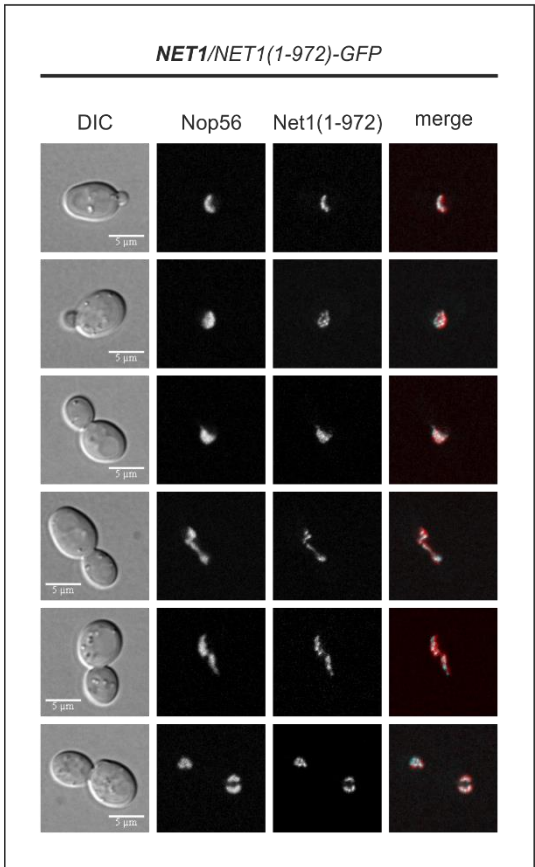
Ausgehend vom Protein der vollen Länge Net1(1-1189) wurden die Verkürzungen Net1(1-1051), Net1(1-972), Net1(1-693), Net1(1-455), Net1(1-341), Net1(1-233), Net1(1-196), Net1(1-147), Net1(1-110) und Net1(1-69) hergestellt und untersucht. Schematisch gezeigt sind die bekannten Phosphorylierungsstellen mit CDK-Consensus (P) sowie die konservierte Region des *pfam10407*-Motivs (*pfam*). Exemplarisch wurde die Fusion mit GFP gezeigt. Angegeben ist weiterhin, welche Konstrukte als Manipulation der endogenen *NET1*-Kopie (chromosomal) untersucht wurden und in welchen Fällen ein integratives Plasmid (Plasmid) mit dem entsprechenden Konstrukt unter Kontrolle des *NET1*-Promotors analysiert wurde.

Zunächst wurden die Stämme mit Verkürzung und Epitopmarkierung am endogenen *NET1*-Locus hinsichtlich der Lokalisation der verkürzten Net1-Derivate am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierfür wurden sowohl die heterozygot-diploiden Ausgangsstämme als auch die durch Sporulation und Tetradenanalyse entstandenen, haploiden Nachkommen dieser Stämme verwendet. Als Comarker für nukleoläre Lokalisation diente wiederum Nop56-3mCherry. Alle untersuchten Verkürzungen von Net1 wiesen nach wie vor nukleoläre Lokalisation auf. Lag zusätzlich zur verkürzten Version von Net1 auch das Wildtyp-Protein der vollen Länge vor (diploide Zellen), so wuchsen die Zellen gut und zeigten keinerlei Defekt hinsichtlich des Wachstums oder der Zellmorphologie. Wurde jedoch nur die verkürzte Version exprimiert (haploide Zellen), zeigte sich schon bei der geringsten Verkürzung Net1(1-1051) ein starker Wachstumsdefekt (vgl. 4.3.1). Besonders bei dieser Verkürzung nimmt das Nukleolussignal von Nop56 in Anaphase-Zellen oft eine S-förmige Struktur an (s. Abb. 4.4a, rechte Hälfte, Zeile 5). Eine weitere Auffälligkeit betraf die heterozygot-diploiden Zellen; in der späten Anaphase konnte häufig ein Aufspalten der homologen rDNA-Loci beobachtet werden, wobei eine parallele Anordnung der Chromatiden die Regel war (s. Abb. 4.4a, linke Hälfte, Zeile 6). Die Zellmorphologie war in haploiden Zellen deutlich im Vergleich zum Wildtyp verändert, es bildeten sich langgezogene Knospen, die sich oftmals nicht von der Mutterzelle trennten. Dies könnte auf einen Cytokinese-Defekt hindeuten, der möglicherweise durch eine Fehlregulation der Proteinphosphatase Cdc14 hervorgerufen wird. Die Struktur des Nukleolus (repräsentiert durch Nop56-3mCherry) zeigte eine Veränderung gegenüber den diploiden Zellen. In den Stämmen mit Derivaten von Net1(1-1051) und kürzer war die Halbmond-Form in haploiden Zellen seltener zu finden, es kam häufig zu einer Kompaktierung des Net1-Signals. Das Nop56-3mCherry-Signal war insgesamt deutlich breiter verteilt und es zeigten sich häufig punktförmige Aggregate innerhalb des sonst homogenen Signals. Mehrfach konnte beobachtet werden, dass das punktförmige Nop56-Aggregat von einer halbkreisförmigen Net1-Struktur umschlossen wurde (s. Abb. 4.4a, rechte Hälfte, Zeile 4). Es konnte jedoch auch beobachtet werden, dass das Nop56-Aggregat nicht mit der Lokalisation von Net1 korrelierte (s. Abb. 4.4a, rechte Hälfte, Zeile 3). Eine Nukleolus-ähnliche Struktur konnte für Net1 in allen Fällen nachgewiesen werden, bei keiner Verkürzung kam es zu einer gravierenden Fehllokalisation (s. Abb. 4.4b-f).

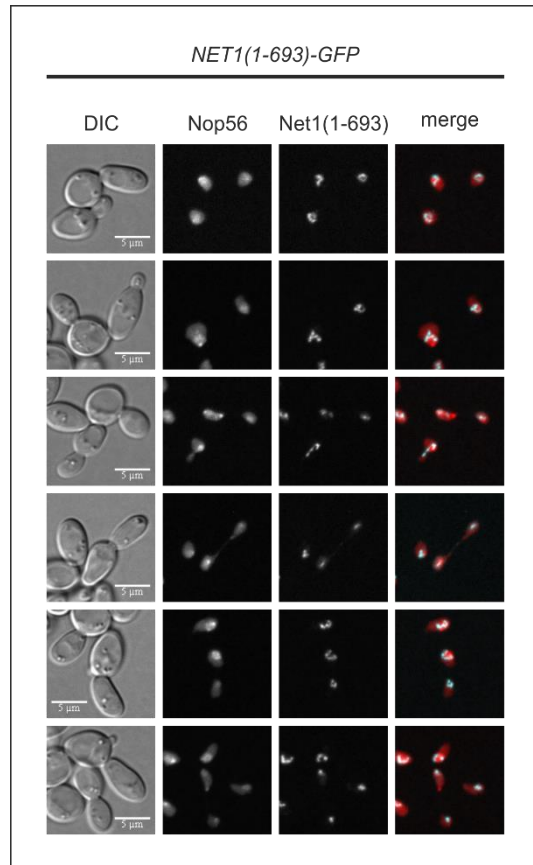
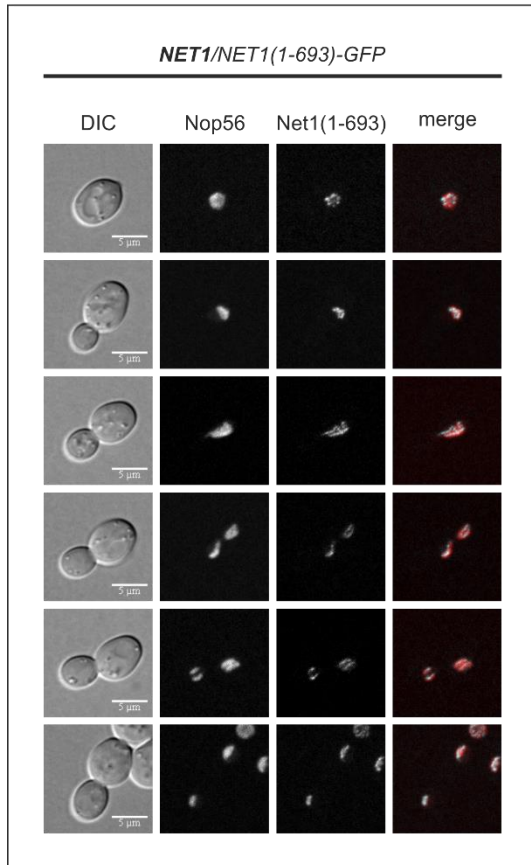
a



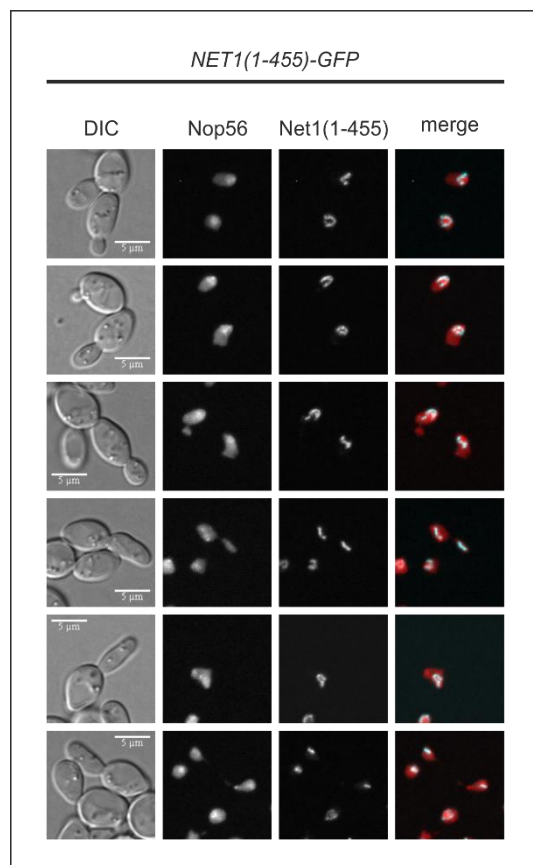
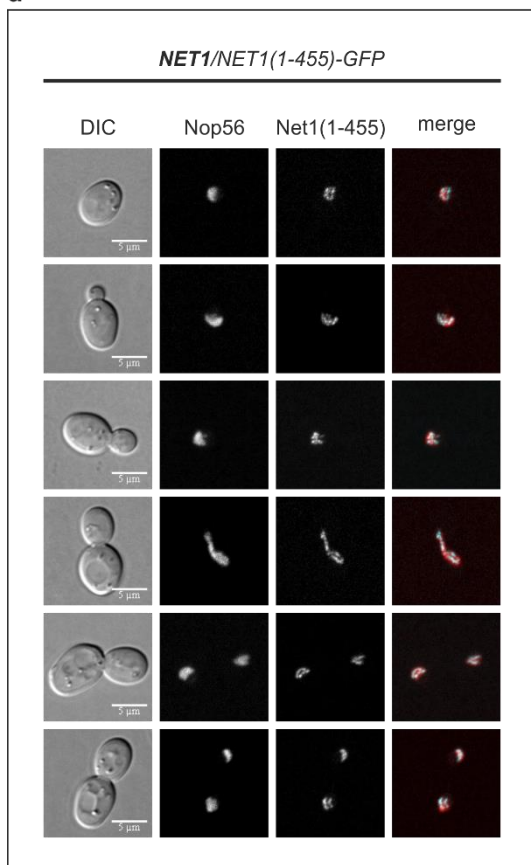
b



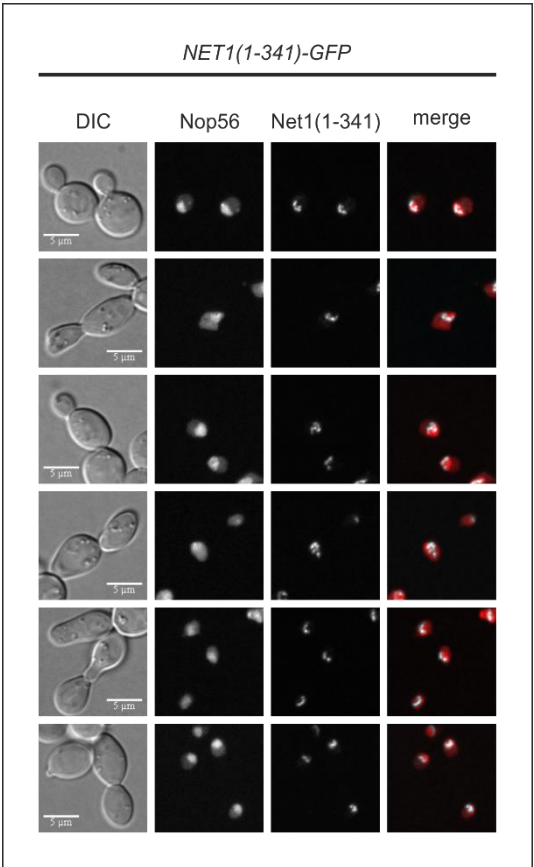
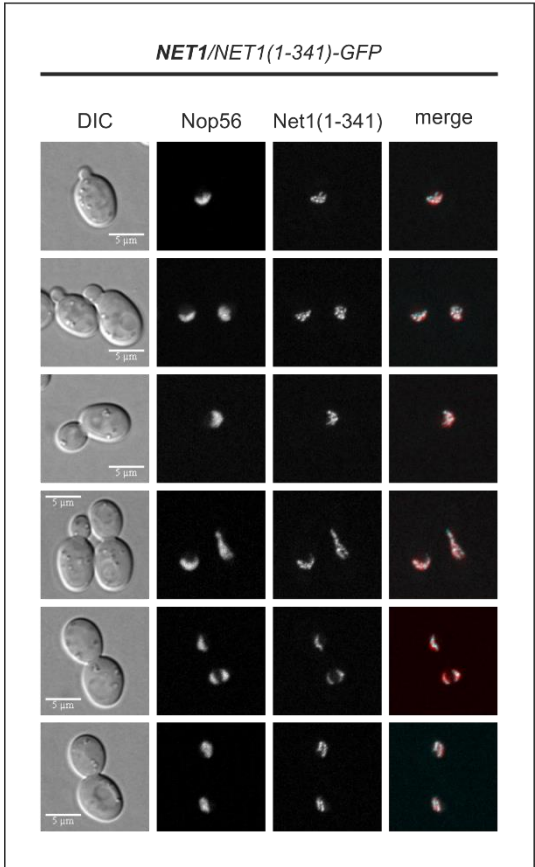
c



d



e



f

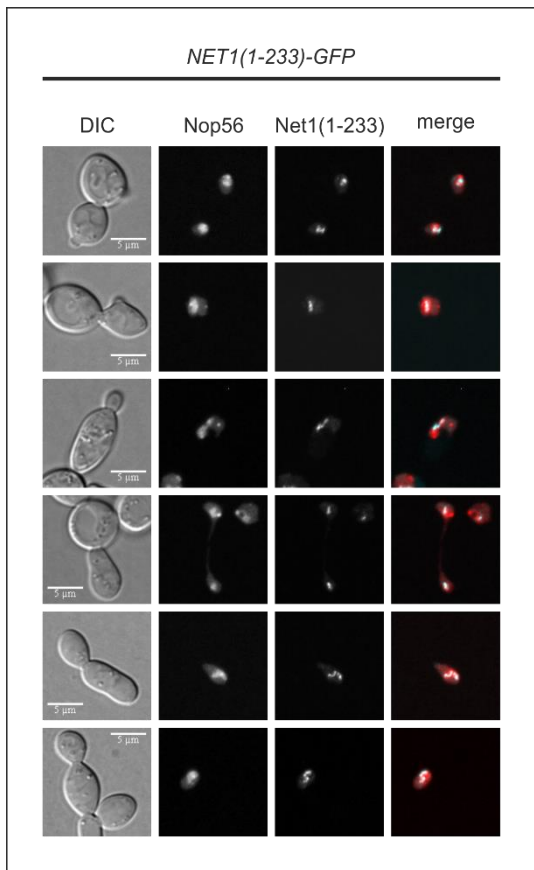
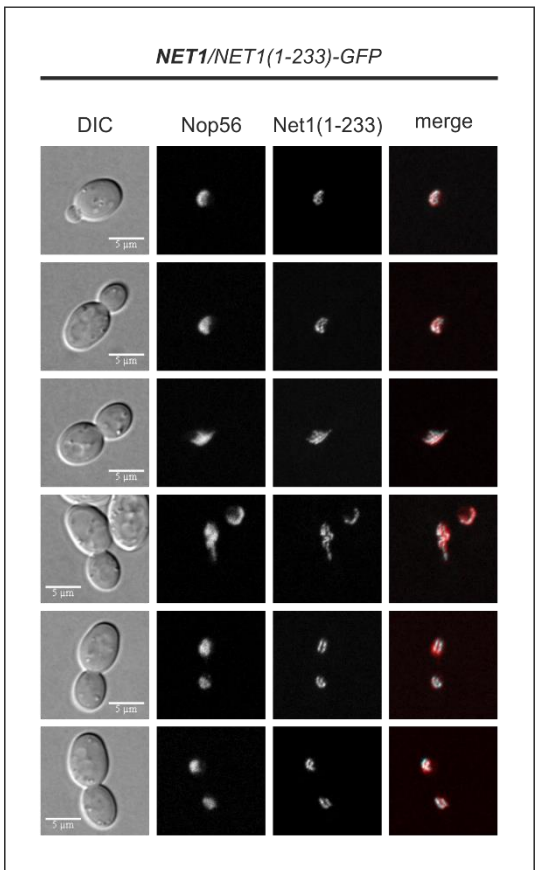


Abb. 4.4: C-terminal verkürzte Net1-Konstrukte lokalisieren in diploiden und haploiden Zellen im Nukleolus

Die Lokalisation der verkürzten Net1-GFP-Derivate am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierzu wurden die Stämme **a**, W13534 (*NET1/NET1(1-1051)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*), **b**, W13535 (*NET1/NET1(1-972)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*), **c**, W13536 (*NET1/NET1(1-693)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*), **d**, W13537 (*NET1/NET1(1-455)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*), **e**, W13538 (*NET1/NET1(1-341)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*) und **f**, W13539 (*NET1/NET1(1-233)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*) sowie je ein haploider Nachkomme, der aus der Sporulation und Tetradenanalyse hervorgegangen war, ausgewählt. In der Darstellung links sind jeweils die Aufnahmen der diploiden Ausgangsstämme, in der Darstellung rechts die entsprechenden haploiden Nachkommen aufgeführt. Die erste Spalte zeigt die Zellmorphologie im DIC-Kanal, die zweite und dritte Spalte die Fluoreszenzsignale und die vierte Spalte die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle (merge). Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 µm.

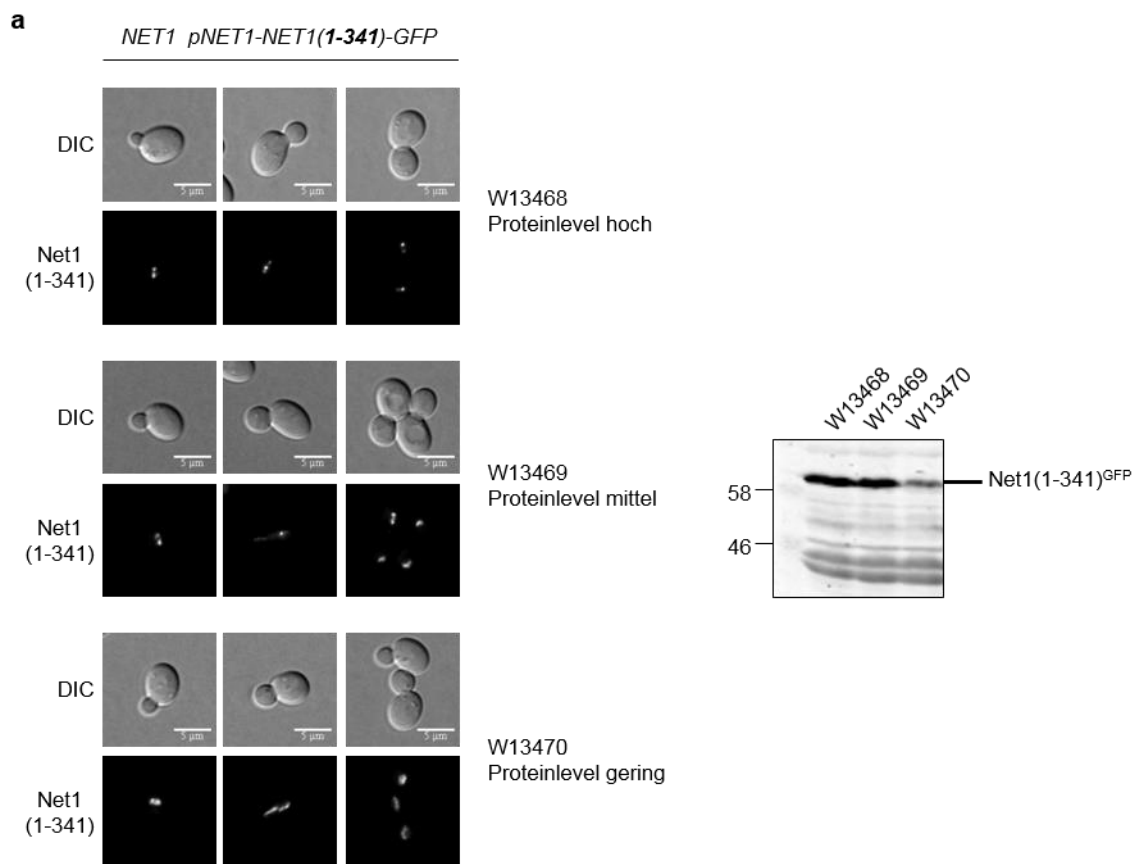
Trotz des starken Wachstumsdefekts der haploiden Stämme war eine nukleoläre Struktur nachweisbar, das Net1-Signal delokalisierte nicht, sondern war noch als kompakte Struktur vorhanden. Selbst das kürzeste Net1-Derivat Net1(1-233) ist in der Lage im Nukleolus zu lokalisieren. Die ersten 233 Aminosäuren der N-terminalen Region sind also hinreichend für den Import von Net1 in den Zellkern und die Lokalisation im Nukleolus.

4.1.3 Kurze N-terminale Net1-Fragmente zeigen Tendenz zur Aggregatbildung

Aufgrund des Wachstumsdefekts der haploiden Stämme wurde das in 4.1 beschriebene System etabliert, um die Lokalisation kurzer, N-terminaler Net1-Fragmente ohne Beeinträchtigung des Wachstums analysieren zu können. Hierzu wurden die zu untersuchenden N-terminalen Fragmente inklusive des *NET1*-Promotors in GFP-Vektoren kloniert, um nach Integration am gewünschten Selektionsmarker eine Expression des Fusionskonstrukts unter Kontrolle des endogenen Promotors zu erhalten. Das Expressionsniveau dieser Konstrukte konnte jedoch von der Integrationszahl des Plasmids im Genom beeinflusst werden. Die Verkürzungen Net1(1-341)-GFP, Net1(1-233)-GFP, Net1(1-196)-GFP, Net1(1-147)-GFP, Net1(1-110)-GFP und Net1(1-69)-GFP wurden auf diese Weise hergestellt und hinsichtlich ihres Expressionslevels im Western Blot mit Hilfe eines α-GFP-Antikörpers analysiert. Es konnten von den meisten Konstrukten Transformanten mit unterschiedlich hohen Expressionsmengen erhalten werden. Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden bei den Verkürzungen Net1(1-341), Net1(1-233), Net1(1-196) und Net1(1-147) jeweils drei Transformanten mit hohem, mittlerem und niedrigem Expressionslevel ausgewählt und auf ihre Lokalisation hin untersucht. Exemplarisch dargestellt sind die Verkürzungen Net1(1-341) und Net1(1-147) (s. Abb. 4.5). Von den Verkürzungen Net1(1-110) und Net1(1-69) wurden keine oder nur schwache Signale im Western Blot erhalten. Alle in der Fluoreszenzmikroskopie untersuchten Transformanten zeigten kein erkennbares nukleoläres Signal (s. Anhang 9.2.1). Da es sich hierbei bereits um sehr kleine Fragmente

im Vergleich zum großen GFP handelte, waren diese Net1-Derivate möglicherweise aufgrund von Proteinfehlfaltung instabil und wurden deshalb schnell degradiert. Sie wurden in weiteren Analysen nicht mehr verwendet.

Bei der Verkürzung Net1(1-341) war zu erkennen, dass die bei hohem Proteinlevel auftretende Aggregatbildung mit sinkendem Proteinniveau abnahm (s. Abb. 4.5a). Der höchste Proteingehalt, der durch Mehrfachintegrationen des Konstrukts im Genom zustande kam, resultierte in starker Aggregatbildung, so dass nur ein punktförmiges Signal zu erkennen war. Unter leichter Überexpression der Net1-Derivate war zusätzlich zu einem intensiven, punktförmigen Aggregat ein nukleoläres Signal zu erkennen. Das Aggregat befand sich dabei innerhalb der vermutlich nukleolären Struktur. Die Verkürzungen Net1(1-233) und Net1(1-196) verhielten sich in ähnlicher Weise (s. Anhang 9.2.2). Für die Verkürzung Net1(1-147) konnte dieses Verhalten nicht gezeigt werden. Unabhängig von der exprimierten Proteinmenge zeigte Net1(1-147) keine Aggregatbildung, sondern lokalisierte immer in einer eng begrenzten, vermutlich nukleolären Struktur mit einem zusätzlichen, geringen Anteil im Cytoplasma (s. Abb. 4.5b).



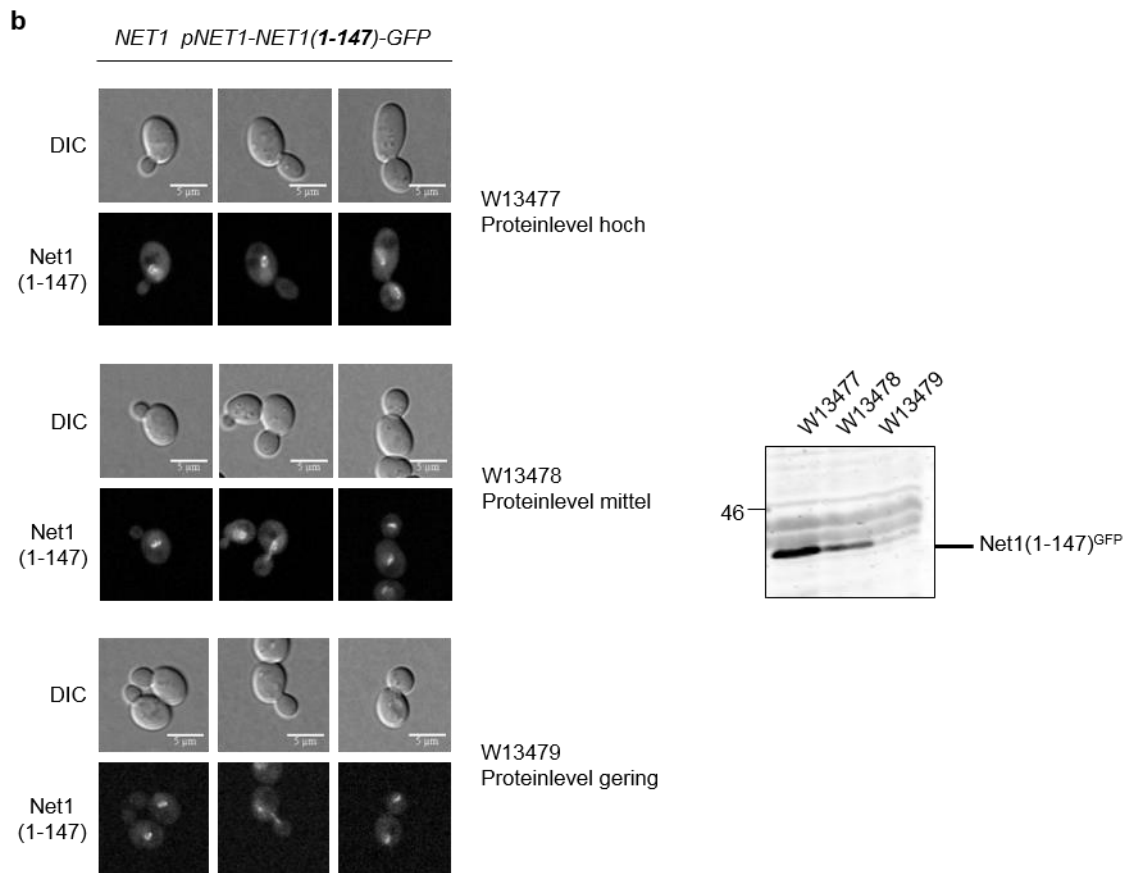


Abb. 4.5: Lokalisation von Net1(1-341)-GFP und Net1(1-147)-GFP in haploiden Zellen

Die Lokalisation von jeweils drei Transformanten mit unterschiedlichem Expressionsniveau der Fusionsproteine Net1(1-341)-GFP und Net1(1-147)-GFP wurde unter vergleichbaren Bedingungen am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zusätzlich wurde das Expressionsniveau im Western mit α -GFP-Antikörper analysiert. Die Stämme **a**, W13468 (hohes Expressionslevel), W13469 (mittleres Expressionslevel) und W13470 (niedriges Expressionslevel) (*NET1 tCYC1::pNET1-NET1(1-341)-GFP-tCYC1-LEU2*) wurden ausgewählt. Der Maßstabsbalken beträgt 5 μ m. Gezeigt sind in Reihe 1 jeder Einheit die Zellmorphologie (DIC) und in Reihe 2 das GFP-Fluoreszenzsignal, von oben nach unten nimmt dabei die Proteinmenge ab. Die Stämme **b**, W13477 (hohes Expressionslevel), W13478 (mittleres Expressionslevel) und W13479 (niedriges Expressionslevel) (*NET1 tCYC1::pNET1-NET1(1-147)-GFP-tCYC1-LEU2*) wurden unter vergleichbaren Bedingungen untersucht.

Eine Modellvorstellung könnte folgendermaßen aussehen: Das zusätzlich zur verkürzten Variante vorhandene Net1-Wildtypprotein ist in der Lage mit dem verkürzten Protein zu interagieren und die übliche Nukleoluslokalisation, die auf einem Netzwerk an Proteininteraktionen zwischen Net1 und seinen Partnern beruht, zu gewährleisten. Steigt die Menge des verkürzten Proteins gegenüber dem Wildtypprotein an, so interagieren Dosis-abhängig vermehrt die verkürzten Proteine miteinander. Diese lokalisieren nach wie vor im Nukleolus, sind aber aufgrund der Verkürzung nicht mehr in der Lage die anderen, für Wildtyp-Net1 üblichen Proteinwechselwirkungen einzugehen. Als Resultat zeigt sich ein kompaktiertes Net1-Signal innerhalb des Nukleolus. Interessanterweise konnte dieses

Verhalten für die Verkürzung Net1(1-147) nicht beobachtet werden. Net1 scheint also innerhalb der N-terminalen Region einen Bereich für Selbstinteraktion zu besitzen. Bei Fragmenten, die nur die ersten 147 Aminosäuren besitzen, ist die Selbstinteraktion jedoch stark eingeschränkt.

4.1.4 Net1 besitzt die Fähigkeit zur Selbstinteraktion

Eine mögliche Net1-Selbstinteraktion wurde bisher in der Literatur nicht näher analysiert, könnte aber einen Erklärungsansatz liefern, wie Net1 in der Lage ist die Nukleolusstruktur zu etablieren. Eine Modellvorstellung aus der Literatur erläutert die These der *hub*-Proteine näher (Emmott und Hiscox, 2009). Als *hub*-Proteine werden demnach Strukturkomponenten des Nukleolus bezeichnet, die durch ihre Proteingröße und -struktur eine große Oberfläche für Interaktionen mit multiplen Partnern zur Verfügung stellen und auf diese Weise als Bausteine für die Nukleolusassemblierung fungieren. Für eine solche Art der Organisation einer räumlichen Struktur wäre Net1 prädestiniert. Net1 stellt ein großes Protein mit 1189 Aminosäuren dar, so dass viele Bindungsstellen für die Interaktionspartner zur Verfügung stehen könnten. In einer *hub protein*-analogen Modellvorstellung könnte Net1 durch eine Art Quervernetzung über die Selbstinteraktion vieler Net1-Proteine in den einzelnen rDNA-Wiederholungseinheiten eine räumliche Basis-Struktur zur Verfügung stellen, an die die übrigen Net1-Interaktionspartner andocken könnten.

4.1.4.1 Net1(1-1189) interagiert mit sich selbst

Um einen ersten Eindruck über die vermutliche Selbstinteraktionsfähigkeit von Net1 zu gewinnen, wurde zunächst eine Coimmunpräzipitation in diploiden Zellen durchgeführt. Nach Anreicherung von Net1(1-1189)^{Flag12} mittels an Agarose-Beads gekoppelten α -Flag-Antikörper wurde im Western Blot die Copräzipitation von Net1^{Myc9} untersucht (s. Abb. 4.6). Nach der Präzipitation von Net1(1-1189)^{Flag12} war lediglich eine leichte Anreicherung im α -Flag-Western Blot zu erkennen. Das knapp 143 kDa große Net1-Protein war zudem anfällig für Degradation. Der α -Myc-Western Blot zeigte ein detektierbares Signal für Net1(1-1189)^{Myc9}, das über dem Signal der Negativkontrolle lag und somit für einen spezifischen Nachweis spricht.

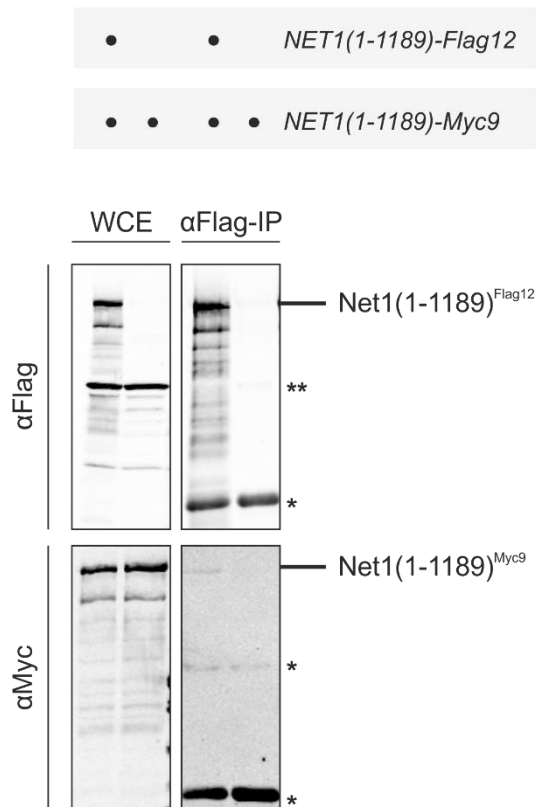


Abb. 4.6: Net1 zeigt in der Coimmunpräzipitation Selbstinteraktion

Die Interaktion von Net1^{Flag12} mit Net1^{Myc13} wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Hierzu wurde der Stamm W11397 (*NET1-Flag12-HIS3MX6/NET1-Myc9-TRP1(K.I.)*) ausgewählt. Als Negativkontrolle diente W9202 (*NET1-Myc9-TRP1(K.I.)*). Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysats (WCE) und nach der Präzipitation über Flag-gekoppelte Agarose-Beads mittels α-Flag- und α-Myc-Antikörper im Western Blot analysiert.

Errechnete Proteingrößen

Net1(1-1189) ^{Flag12} : 142,7 kDa	* IgG
Net1(1-1189) ^{Myc9} : 142,2 kDa	** α-Flag-Kreuzreaktion

Dem ersten Eindruck nach könnte Net1(1-1189) die Fähigkeit zur Selbstinteraktion besitzen. In einer Coimmunpräzipitation kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion der getesteten Proteine indirekt über weitere Partner zustande kommt. Desweiteren könnte aufgrund der vielen Protein-Wechselwirkungen, die das große Net1-Protein eingeht, die Selbstinteraktion nicht so intensiv in den Vordergrund treten. Nähere Aufschlüsse über den für die Selbstinteraktion benötigten Bereich in der N-terminalen Region von Net1 würde in diesem Zusammenhang eine Coimmunpräzipitation von Net1-Fragmenten, die nur die N-terminale Region umfassen, bringen.

4.1.4.2 Net1(1-455) und Net1(1-341) können über Interaktion mit Net1(1-1189) Sir2 präzipitieren

Ein weiterer Hinweis für eine mögliche Net1-Selbstinteraktion trat bei der Untersuchung der Proteinwechselwirkung zwischen Net1 und der Histon-Deacetylase Sir2 auf. Beide Proteine interagieren und bilden zusammen mit der Proteinphosphatase Cdc14 den RENT-Komplex (D'Amours und Amon, 2004). Cuperus *et al.* (2000) konnten zeigen, dass eine Region innerhalb von Net1 zwischen den Aminosäuren 566 – 801 hinreichend für die Wechselwirkung mit Sir2 ist. Dieser Befund wurde überprüft, indem eine Reihe von C-terminalen Net1-Verkürzungen mittels Coimmunpräzipitation auf ihre Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Sir2 untersucht wurde. Nach den Daten von Cuperus *et al.* (2000) sollten nur das Protein der vollen Länge Net1(1-1189) und die Verkürzung Net1(1-972) eine Interaktion mit Sir2 zeigen, da in beiden Konstrukten die für die Bindung von Sir2 erforderlichen Bereiche enthalten sind (Aminosäuren 566-801). Das Derivat Net1(1-693) enthält nur einen Teil der benötigten Sequenz und sollte deshalb verringert oder gar nicht an Sir2 binden. Net1(1-455) und Net1(1-341) enthalten die benötigten Sequenzen nicht und dürften nicht in der Lage sein Sir2 zu präzipitieren. Die Net1-Derivate wurden mittels α -Flag-Beads aus dem Gesamtlysat (WCE) präzipitiert, der Nachweis erfolgte über einen α -Myc-Antikörper (s. Abb. 4.7).

Wie erwartet zeigten die Konstrukte Net1(1-1189) und Net1(1-972) eine starke Interaktion mit Sir2. Interessanterweise war aber auch bei den Derivaten Net1(1-693), Net1(1-455) und Net1(1-341) eine Interaktion mit Sir2 nachweisbar, diese fiel jedoch deutlich schwächer aus als bei den beiden längeren Konstrukten. Da es sich um heterozygot-diploide Versuchsstämme handelte, könnte dieser Befund die Theorie der Net1-Selbstinteraktion unterstützen. Fragmente, die selbst keine für die Sir2-Interaktion benötigten Sequenzen enthalten, könnten an das Wildtypprotein Net1 binden, welches wiederum die entsprechenden Sequenzen zwischen den Aminosäuren 566-801 zur Verfügung stellt, um Sir2 präzipitieren zu können.

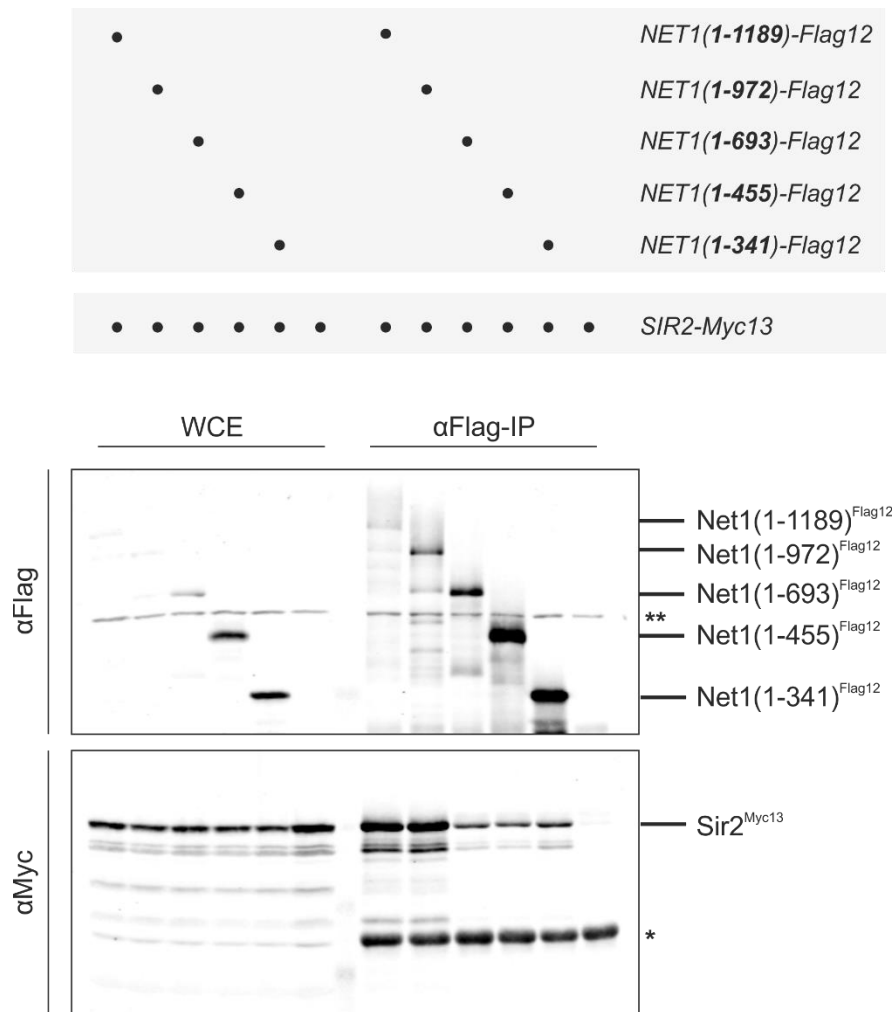


Abb. 4.7: Net1 interagiert mit Sir2

Die Interaktion von Net1^{Flag12} mit Sir2^{Myc13} wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Die Stämme W12571 (NET1/NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6), W12572 (NET1/NET1(1-972)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6), W12573 (NET1/NET1(1-693)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6), W12574 (NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6) und W12575 (NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6) wurden hierzu ausgewählt. Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysate (WCE) und nach der Präzipitation über Flag-Beads mittels α-Flag- und α-Myc-Antikörper im Western Blot analysiert.

Errechnete Proteingrößen

Net1(1-1189)^{Flag12}: 142,7 kDa

Net1(1-972)^{Flag12}: 120,1 kDa

Net1(1-693)^{Flag12}: 89,8 kDa

Net1(1-455)^{Flag12}: 63,7 kDa

Net1(1-341)^{Flag12}: 51,4 kDa

Sir2^{Myc13}: 83,8 kDa

* IgG

** α-Flag-Kreuzreaktion

4.1.4.3 Die Aggregatbildung N-terminaler Net1-Derivate korreliert mit der Proteinmenge

Einen weiteren Anhaltspunkt für die Net1-Selbstinteraktion lieferten die Mikroskopiedaten der N-terminalen Fragmente Net1(1-147)-GFP, Net1(1-196)-GFP und Net1(1-233)-GFP. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Net1(1-147)-GFP im Gegensatz zu den anderen untersuchten Verkürzungen bei erhöhter Proteinmenge nicht zur Aggregatbildung tendierte (vgl. Abb. 4.5). Längere Konstrukte wie Net1(1-196), Net1(1-233) und Net1(1-341) hingegen bildeten in Abhängigkeit der Proteinmenge verschieden stark ausgeprägte Aggregate. Je höher hierbei das Proteinniveau ausfiel, desto stärker trat die Aggregatbildung hervor. Um diesen Zusammenhang näher zu beleuchten, wurde das Konstrukt *pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1* näher untersucht. Durch die Inegration des Plasmids am *leu2*-Locus konnten durch die hierbei auftretenden Mehrfachintegrationen Transformanten erhalten werden, die unterschiedliche Expressionsniveaus des Konstrukts aufwiesen. Die Proteinmenge von fünf unabhängigen Transformanten wurde deshalb zunächst im Western Blot mittels α -GFP-Antikörper untersucht (s. Abb. 4.8a). Anschließend wurden die Transformanten hinsichtlich des Lokalisationsmusters der Net1(1-233)-GFP-Fusionsproteine am Fluoreszenzmikroskop analysiert (s. Abb. 4.8b).

Anhand der Western Blot-Analyse wurden die Proteinniveaus der Transformanten in fünf Kategorien eingeordnet. Jeweils ein Vertreter eines besonders niedrigen und eines besonders hohen Proteingehalts des Konstrukts sowie drei Vertreter mit leicht variablen, mittleren bis hohen Proteinmengen wurden im weiteren Verlauf am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Transformanten, die eine geringe Menge an Net1(1-233)-GFP exprimierten (Kategorie 1) wiesen dabei eine normale, nukleoläre Lokalisation des Konstrukts ohne Aggregatbildung auf. Bei Transformanten mit mittlerem Proteingehalt traten intensivere Aggregate innerhalb der normalen Nukleolusstruktur auf (Kategorie 2 und 3), während bei höherem und hohem Proteingehalt kaum eine normale Nukleolusstruktur nachzuweisen und der überwiegende Signalanteil in Aggregaten anzutreffen war (Kategorie 4 und 5). Es zeigte sich somit ein Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Ausprägung der Aggregatbildung. Wurde ein gewisser Proteingehalt überschritten, lokalisierte das untersuchte Fragment Net1(1-233)-GFP überwiegend als Aggregat und weniger in seiner normalen, nukleolären Struktur. Das noch vorhandene Wildtypprotein war also nicht mehr in der Lage in ausreichendem Maß an die große Menge an verkürztem Protein zu binden und hierüber die normale Lokalisation zu gewährleisten. Bei kleinen Fragmenten scheint also die Selbstinteraktion gegenüber der Lokalisation an der rDNA und den Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des Nukleolus zu überwiegen.

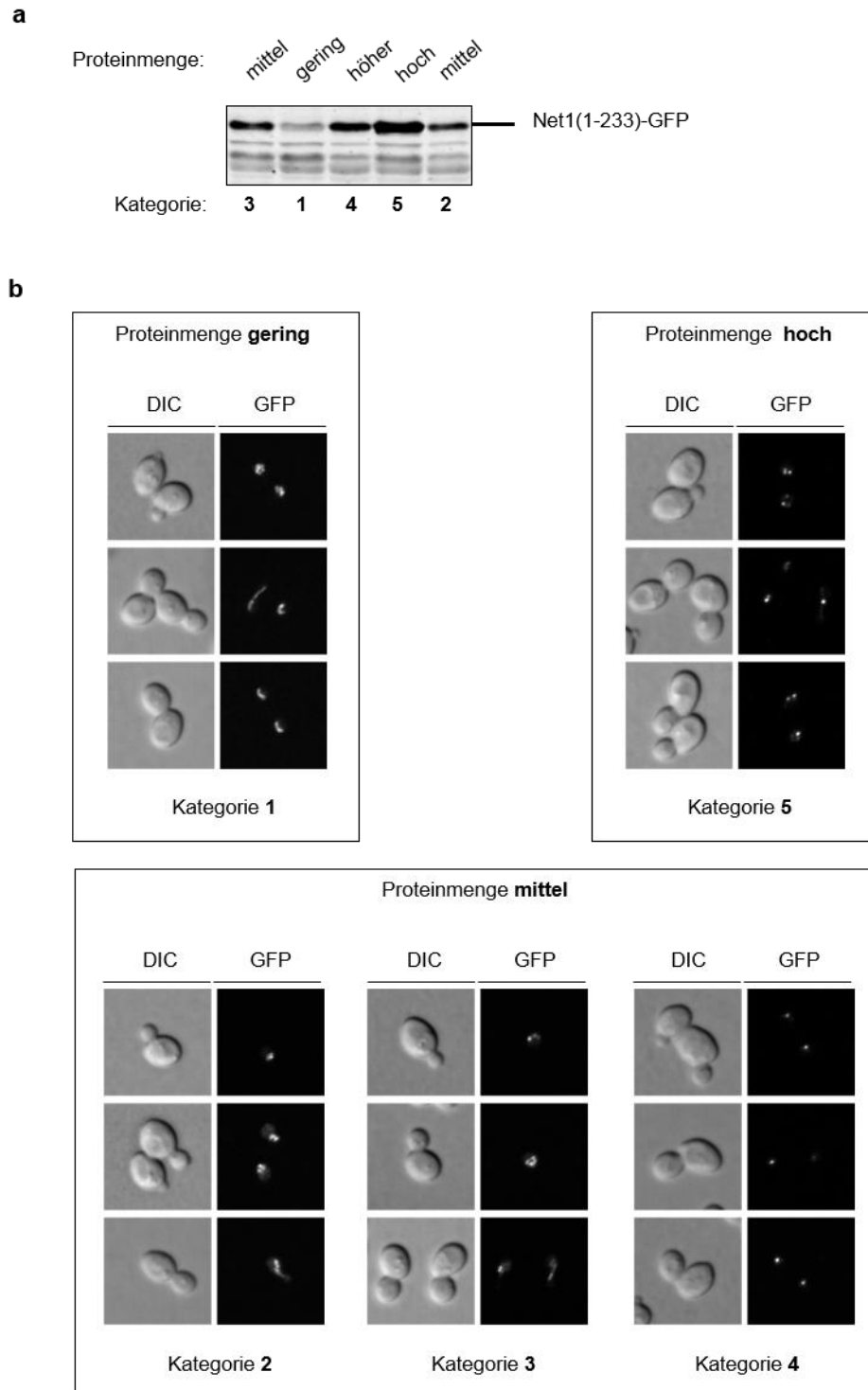


Abb. 4.8: Net1(1-233) bildet mit zunehmender Proteinmenge Aggregate

Fünf Transformanten des mit dem Konstrukt *pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1* transformierten Wildtypstamms K700 wurden hinsichtlich **a**, Proteinmenge im Western Blot und **b**, Lokalisationsmuster des GFP-Fusionsproteins untersucht. Es konnten drei Kategorien gebildet werden: niedriges, mittleres und hohes Proteinlevel. Der Proteinlevel beeinflusst die Aggregatbildung. Es sind jeweils die Zellmorphologie (DIC) und das Fluoreszenzsignal des GFP-Kanals gezeigt.

4.1.4.4 Net1-Aggregate lösen sich in der Anaphase auf

Es galt nun die Frage zu klären, ob es sich bei dieser Aggregatbildung tatsächlich um eine intrinsische Eigenschaft des Net1-Proteins handelt oder ob sie ein Artefakt von Überexpression und Protein-Fehlfaltung darstellt. Auch eine mögliche Interaktion der GFP-Anteile könnte die Aggregatbildung hervorrufen. Bei Zeitrafferaufnahmen des Fragments Net1(1-341)-GFP am Fluoreszenzmikroskop konnte festgestellt werden, dass sich die vorhandenen Aggregate zu einem bestimmten Zeitpunkt im Teilungszyklus, nämlich der Anaphase der Mitose, auflösten und zu Beginn des nächsten Zyklus wieder in Erscheinung traten (s. Abb. 4.9). Die Zellzyklusphasen konnten durch Colokalisation mit dem Kernmarker mCherry-NLS eingegrenzt werden.

Würde es sich um Artefakte von Überexpression und anderen unphysiologischen Effekten handeln, sollte sich kein Auflösen und Rekonstituieren der Strukturen in zeitlichem Zusammenhang mit bestimmten Phasen des Teilungszyklus ergeben. Da die Auflösung der punktförmigen Strukturen mit der Anaphase der Mitose zusammenfiel, handelt es sich mit gewisser Wahrscheinlichkeit nicht um solche Artefakte. Eine denkbare Ursache für die Aggregatauflösung in der Anaphase könnte die in diesem Stadium zunehmende Phosphorylierung von Net1 darstellen. Möglicherweise beeinflusst der Phosphorylierungszustand von Net1 nicht nur die Interaktion mit der Phosphatase Cdc14 sondern auch die Fähigkeit von Net1 zur Selbstinteraktion. Diese Theorie müsste in weiteren Experimenten wie beispielsweise Synchronexperimenten mit anschließender Untersuchung des Phosphorylierungszustands näher beleuchtet werden.

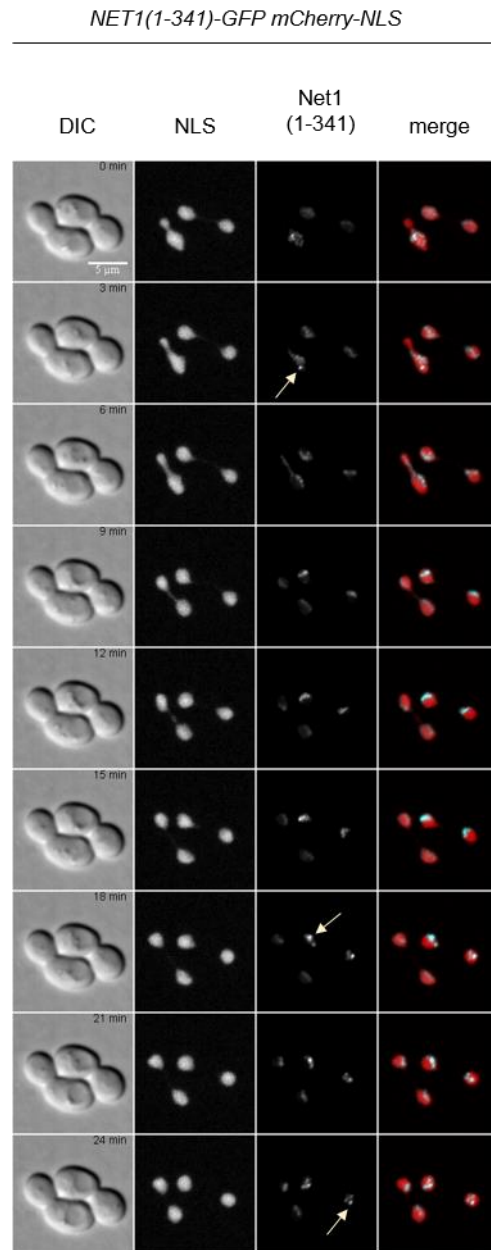


Abb. 4.9: Aggregate von Net1(1-341)-GFP lösen sich in der Anaphase auf und rekonstituieren anschließend

Die Aggregatbildung und -auflösung von Net1(1-341)-GFP wurde im Stamm W13215 (*leu2::pNET1-NET1(1-341)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) am Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Die erste Spalte jeder Einheit zeigt die Zellmorphologie im DIC-Kanal, Spalte 2 enthält das Fluoreszenzsignal des Kernmarkers mCherry-NLS, Spalte 3 zeigt das Fluoreszenzsignal von Net1(1-341)-GFP und Spalte 4 die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Der Zeitabstand der einzelnen Aufnahmen beträgt drei Minuten, die Länge des Maßstabsbalkens 5 μ m. Pfeile markieren das Auftreten charakteristischer Net1(1-341)-Aggregate.

4.1.4.5 Die N-terminale Region beeinflusst die Lokalisation von verkürzten Net1-Derivaten

Da die Lokalisation verkürzter Net1-Derivate durch das Vorhandensein des Wildtypproteins beeinflusst wird, war es nun von Interesse das Verhalten der verkürzten Net1-Derivate in Abwesenheit des Einflusses durch das Wildtypprotein zu testen. Eine Deletion von *NET1* führt jedoch zu einem starken Wachstumsdefekt und einer sehr kompakten Nukleolusstruktur. Als Alternative zur Deletion wurde deshalb ein Stamm verwendet, dessen *NET1*-Gen so manipuliert wurde, dass es ein N-terminal verkürztes Fragment Net1(234-1189) unter Kontrolle des *TEF1*-Promotors konstitutiv exprimiert. Arbeiten im Labor zeigten, dass dieses N-terminal verkürzte Net1-Derivat nicht exklusiv im Nukleolus lokalisiert, sondern über die gesamte Zelle verteilt ist. Eine mögliche Interaktion mit im Nukleolus lokalisierten Net1-Derivaten kann zwar nicht ausgeschlossen werden, sie sollte jedoch aufgrund der räumlichen Verteilung des Interaktionspartners stark eingeschränkt sein. In einem solchen Ausgangsstamm wurde die Lokalisation der integrierten und unter Kontrolle des *NET1*-Promotors exprimierten, N-terminalen Net1-Fragmente Net1(1-147)-GFP, Net1(1-196)-GFP und Net1(1-233)-GFP untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die verschiedenen Konstrukte in vergleichbarer Menge exprimiert wurden. Die gewählte Expressionsmenge begünstigte eine geringe Aggregatbildung, der Großteil des Signals wurde jedoch normal verteilt im Nukleolus erwartet. Als Kontrolle dienten ein Stamm, der vollständiges *NET1* unter Kontrolle des *TEF1*-Promotors exprimiert sowie ein Wildtypstamm mit unverändertem *NET1* (endogener Promotor). Alle Stämme wurden durch Sporulation und Tetradenanalyse ausgehend vom jeweiligen heterozygot-diploiden Ausgangsstamm hergestellt.

Die Lokalisation von Net1(1-147)-GFP im Nukleolus war - wie in vorherigen Experimenten bereits beobachtet (vgl. Abb. 4.5b) - durch die Verkürzung oder das C-terminale Epitop leicht beeinträchtigt (s. Abb. 4.10a). Ein großer Anteil des Signals lokalisierte jedoch als feine, halbmondförmige Struktur am Rand des durch den Kernmarker mCherry-NLS abgebildeten Zellkerns. Durch die Überexpression von *NET1* wurde dieser Signalanteil intensiver, nahm aber auch größeren Raum im Nukleolus ein (s. Abb. 4.10b). Wurde N-terminal verkürztes *NET1*(234-1189) überexprimiert, erschien die Lokalisation von Net1(1-147)-GFP etwas weniger angereichert im Nukleolus zu sein als bei Expression von *NET1* unter endogenen Bedingungen. Eine Aggregatbildung konnte nicht beobachtet werden (s. Abb. 4.10c).

Aufgrund des gewählten Expressionsniveaus bildete Net1(1-196)-GFP unter Expression von Wildtyp-*NET1* zusätzlich zur normalen Nukleolusstruktur leichte Aggregate (s. Abb. 4.11a). Bei Überexpression von *NET1* durch den *TEF1*-Promotor kam es zu einer deutlichen Verbreiterung des nukleolären Signals (s. Abb. 4.11b). Interessanterweise kondensierte bei Überexpression des verkürzten *NET1*(234-1189) das Signal von Net1(1-196)-GFP stark und erschien bei einer analogen Darstellung zu Net1(1-147)-GFP nur noch als Punkt. Durch die Darstellung derselben Daten mit einem Anteil von 0,1 gesättigten Pixeln zeigte sich ein geringer Anteil an Signal im Nukleolus (s. Abb. 4.11c).

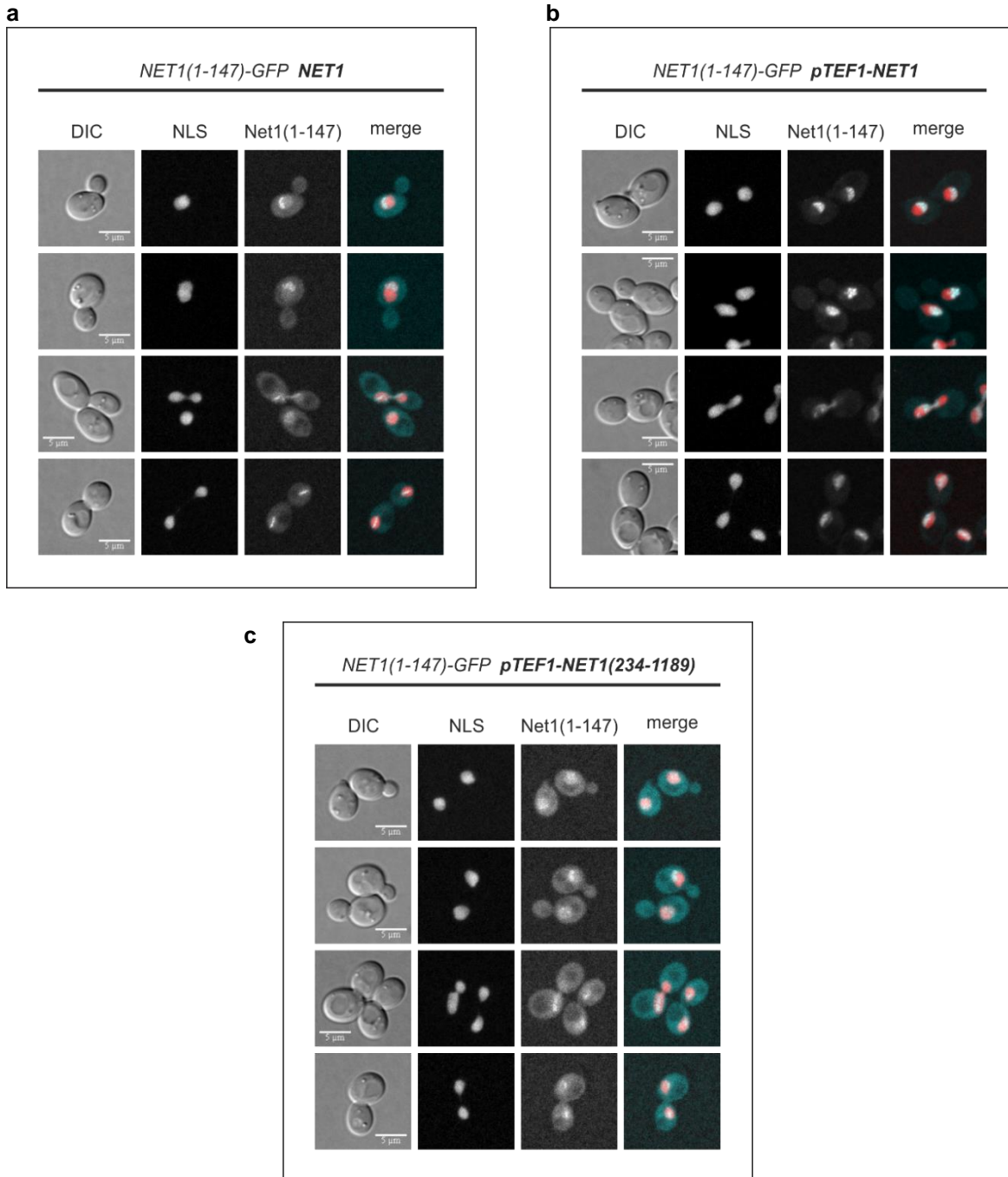


Abb. 4.10: Lokalisation von Net1(1-147)-GFP in Abhängigkeit von Net1(1-1189) und Net1(234-1189)

Die Lokalisation von Net1(1-147)-GFP wurde am Fluoreszenzmikroskop bei **a**, auf Wildtypniveau exprimiertem Net1(1-1189), **b**, vom *TEF1*-Promotor überexprimierten Net1(1-1189) und **c**, vom *TEF1*-Promotor überexprimierten, verkürzten Net1(234-1189) untersucht. Hierzu wurden die Stämme W13484 (*leu2::pNET1-NET1(1-147)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*), W13485 (*leu2::pNET1-NET1(1-147)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 net1::natNT2-pTEF1-NET1*) und W13486 (*leu2::pNET1-NET1(1-147)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 net1::natNT2-pTEF1-NET1(234-1189)*) ausgewählt. Die erste Spalte jeder Einheit zeigt die Zellmorphologie im DIC-Kanal, die Spalten 2 und 3 enthalten die Fluoreszenzsignale des Kernmarkers mCherry-NLS und von Net1(1-147)-GFP (0,02% gesättigte Pixel) und Spalte 4 die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 µm.

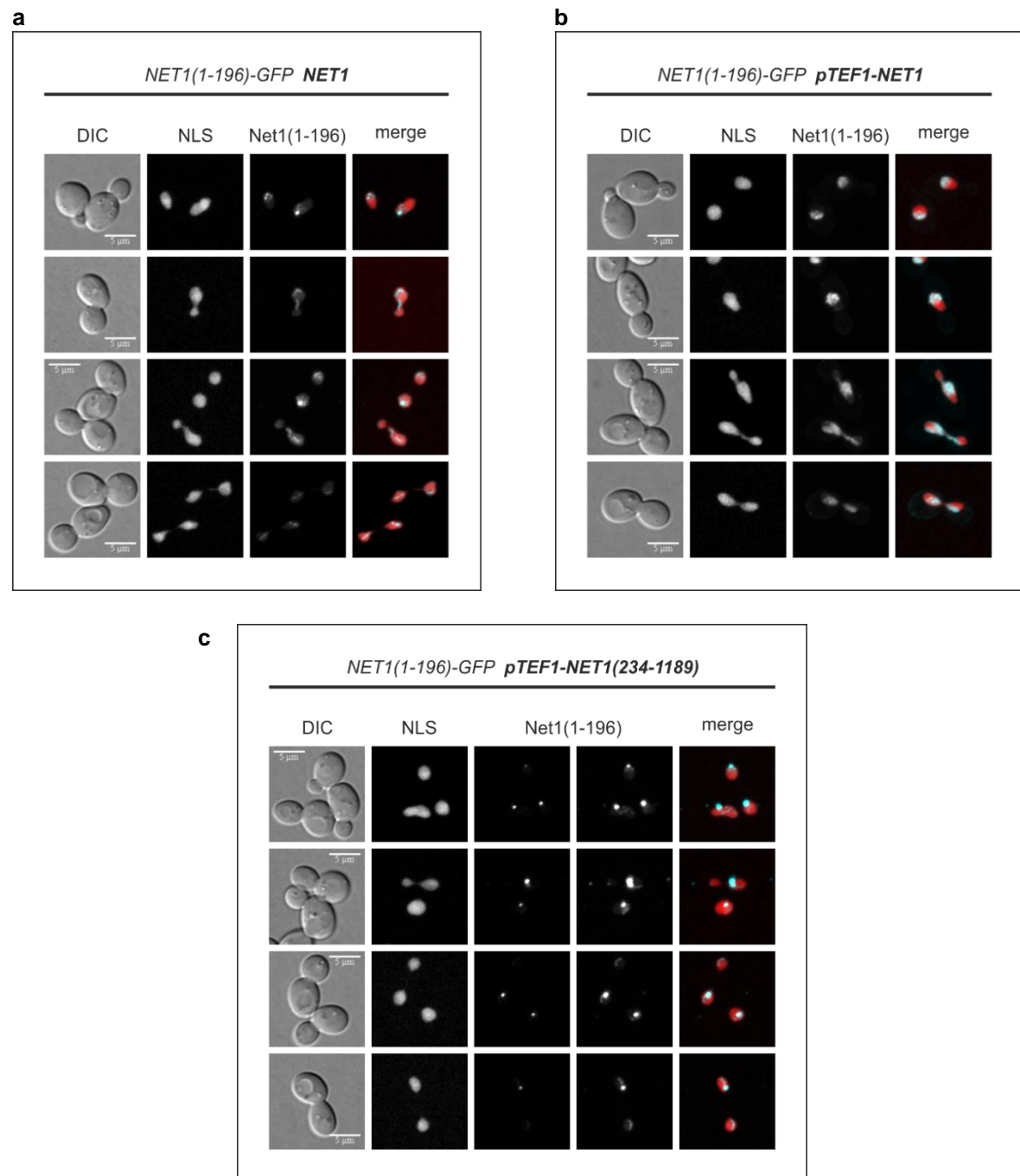


Abb. 4.11: Lokalisation von Net1(1-196)-GFP in Abhängigkeit von Net1(1-1189) und Net1(234-1189)

Die Lokalisation von Net1(1-196)-GFP wurde am Fluoreszenzmikroskop bei **a**, auf Wildtyplevel exprimiertem Net1(1-1189), **b**, vom *TEF1*-Promotor überexprimierten Net1(1-1189) und **c**, vom *TEF1*-Promotor überexprimierten, verkürzten Net1(234-1189) untersucht. In der ersten Spalte jeder Einheit ist die Zellmorphologie (DIC) dargestellt, Spalte 2 zeigt das Fluoreszenzsignal des Kernmarkers mCherry-NLS, Spalte 3 das Fluoreszenzsignal von Net1(1-196)-GFP (0,02 gesättigte Pixel) und Spalte 4 die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. In **c**, ist zusätzlich zu den Spalten 1 (DIC), 2 (Kernmarker) und 3 (Net1(1-196)-GFP) in Spalte 4 das Fluoreszenzsignal von Net1(1-196)-GFP mit einem Anteil von 0,1 gesättigten Pixeln dargestellt. Spalte 5 zeigt eine Überlagerung der Fluoreszenzkanäle aus Spalten 2 und 4. Die Stämme W13487 (*leu2::pNET1-NET1(1-196)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*), W13488 (*leu2::pNET1-NET1(1-196)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 net1::natNT2-pTEF1-NET1*) und W13489 (*leu2::pNET1-NET1(1-196)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 net1::natNT2-pTEF1-NET1(234-1189)*) wurden hierzu ausgewählt. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 μm .

Net1(1-233)-GFP wies bei zusätzlicher Expression von Wildtyp-*NET1* seine normale Lokalisation im Nukleolus auf. Vereinzelt traten leichte Aggregate auf (s. Abb. 4.12a). Wurde *NET1* vom TEF1-Promotor überexprimiert, trat wie bei den zuvor betrachteten Konstrukten eine Verbreiterung und Intensivierung des nukleolären Signals auf (s. Abb. 4.12b). Bei Überexpression des verkürzten *NET1*(234-1189) kompaktierte das Nukleolussignal und es waren mehr Aggregate festzustellen als bei Expression von *NET1* auf Wildtyplevel (s. Abb. 4.12c).

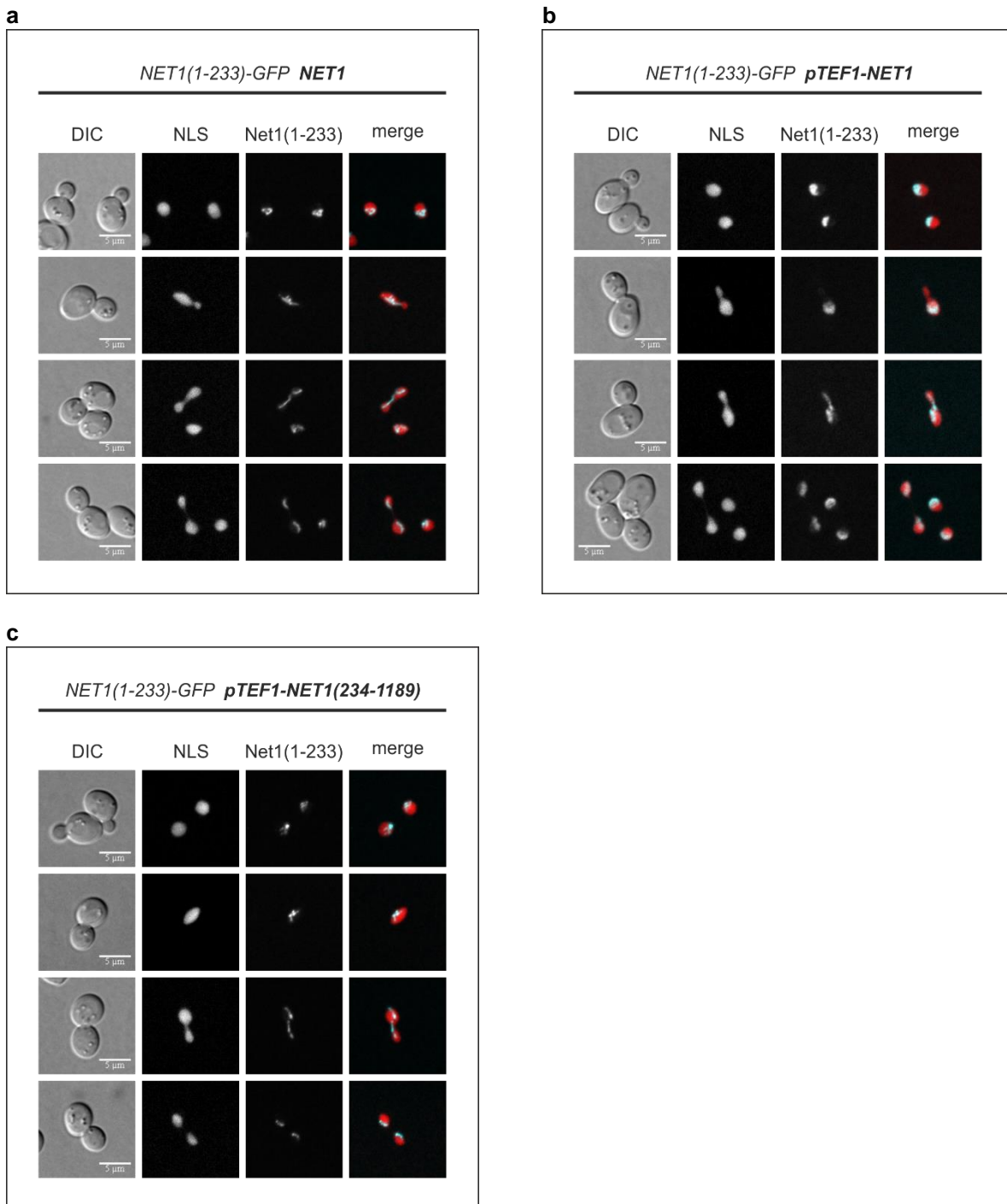


Abb. 4.12: Lokalisation von Net1(1-233)-GFP in Abhängigkeit von Net1(1-1189) und Net1(234-1189)

Die Lokalisation von Net1(1-233)-GFP wurde bei **a**, auf dem Wildtyplevel exprimierten Net1(1-1189), **b**, wird vom *TEF1*-Promotor überexprimierten Net1(1-1189) und **c**, vom *TEF1*-Promotor überexprimierten, verkürzten Net1(234-1189) am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Stämme W13680 (*leu2::pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*), W13681 (*leu2::pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 net1::natNT2-pTEF1-NET1*) und W13682 (*leu2::pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 net1::natNT2-pTEF1-NET1(234-1189)*) wurden hierzu ausgewählt. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 µm.

Die Lokalisation kurzer N-terminaler Net1-Fragmente hängt vom Vorhandensein des Wildtypproteins der vollen Länge Net1(1-1189) ab. Ersetzt man dieses Wildtypprotein durch ein fehllokalisiertes Derivat Net1(234-1189), tritt die Fähigkeit der Net1-Fragmente zur Selbstinteraktion stärker zu Tage. Dies resultiert bei erhöhten Proteinmengen in Aggregaten, die jedoch immer noch im Nukleolus lokalisiert sind. N-terminale Net1-Fragmente, welche die ersten 196 Aminosäuren umfassen, können somit eigenständig im Nukleolus lokalisieren und mit sich selbst oder anderen N-terminalen Net1-Bereichen interagieren. Bei einem Fragment, das nur die ersten 147 Aminosäuren beinhaltet, sind die Nukleoluslokalisation und die Fähigkeit zur Selbstinteraktion beeinträchtigt.

4.1.5 Proteinwechselwirkung mit Fob1

Um nun zu klären, worauf die Lokalisation der kurzen Net1-Derivate im Nukleolus beruht, wurde zunächst die aus der Literatur bekannte Interaktion mit dem nukleolären Protein Fob1 untersucht. In früheren Studien (Huang und Moazed, 2003) konnte gezeigt werden, dass Net1 an zwei Bereichen der rDNA besonders angereichert ist, zum einen in der RNA-Polymerase I-Promotorregion und dem rRNA-codierenden Bereich, zum anderen in der NTS1-Region im Bereich der Fob1-Bindestelle. Nach Deletion von *FOB1* war die Assoziation von Net1 mit der Promotorregion und dem codierenden Bereich unverändert, die Bindung an die NTS1-Region jedoch stark verringert. Dieses Verhalten würde implizieren, dass Net1 über eine Protein-Protein-Interaktion mit Fob1 an die NTS1-Region der rDNA rekrutiert wird.

4.1.5.1 Net1 zeigt keine Interaktion mit Fob1 in der Immunpräzipitation

Um diese Protein-Proteinwechselwirkung zu testen und möglicherweise die Region innerhalb von Net1 einzugrenzen, die für diese Wechselwirkung benötigt wird, wurde zunächst eine Coimmunpräzipitation von Fob1 mit C-terminal verkürzten Net1-Derivaten durchgeführt. Um den resultierenden Wachstumsdefekt dieser Verkürzungen zu umgehen, wurden heterozygot-diploide Stämme verwendet. Die Präzipitation der Net1-Derivate erfolgte über α -Flag-Beads (s. Abb. 4.13). Die Anreicherung der verkürzten Net1-Proteine gelang, es konnte jedoch kein spezifischer Nachweis von Fob1 als Copräzipitat erbracht werden. Die in allen Spuren nachweisbare Bande wies zwar die für Fob1^{Myc13} erwartete Größe auf, sie trat aber in ähnlicher Intensität auch in der Negativkontrolle auf, was auf eine unspezifische Bindung von Fob1^{Myc13} an die Flag-Beads hindeutet.

Als nächstes wurde versucht Fob1^{Myc13} mittels an Agarose-Beads gekoppelten α -Myc-Antikörper (9E10, gereinigt) zu präzipitieren und die drei ausgewählte Derivate Net1(1-1189)^{Flag12}, Net1(1-341)^{Flag12} und Net1(1-233)^{Flag12} als Copräzipitat nachzuweisen. Es wurden wiederum heterozygot-diploide Stämme verwendet (s. Abb. 4.14). Alle sichtbaren Copräzipitationsbanden traten in ähnlicher Intensität in den Banden der Negativkontrollen auf. Auch bei Präzipitation von Fob1 und Nachweis der Net1-Konstrukte konnte somit kein spezifischer Nachweis einer Interaktion erbracht werden.

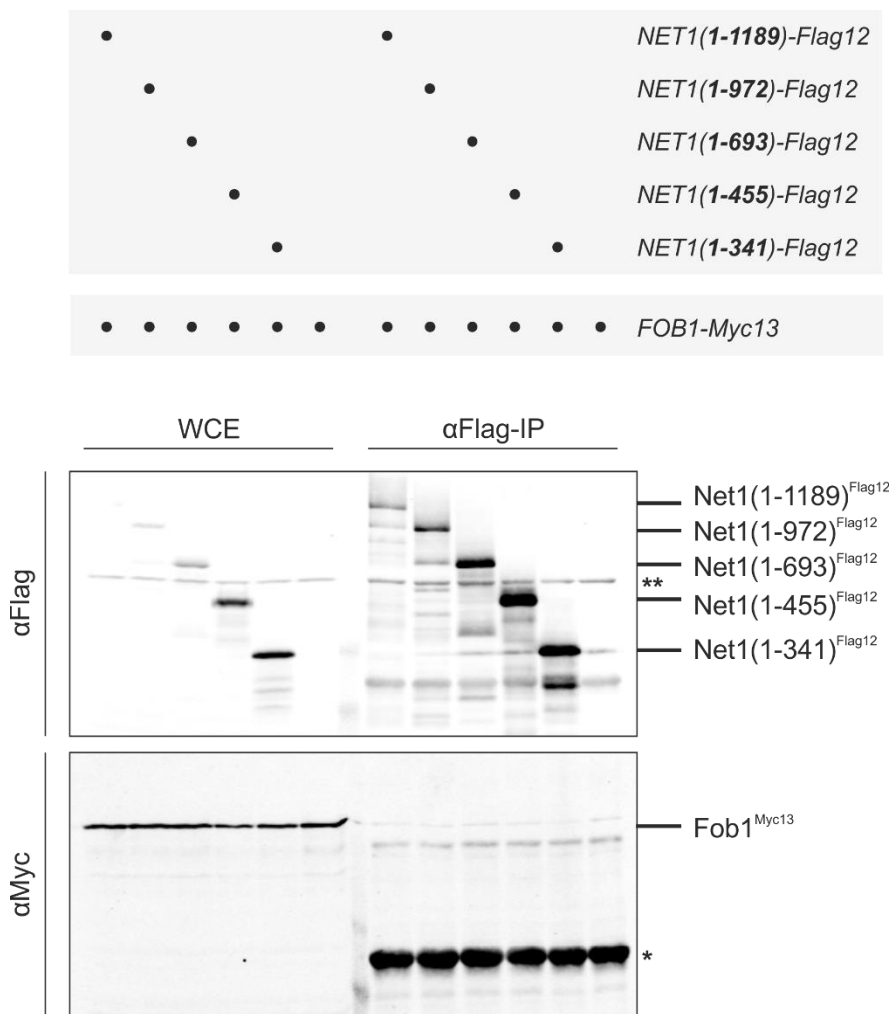


Abb. 4.13: Coimmunpräzipitation von Fob1 mit C-terminal verkürzten Net1-Derivaten

Die Interaktion der Net1^{Flag12}-Konstrukte mit Fob1^{Myc13} wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Die Proteinmengen wurden im Gesamtlisat (WCE) und nach der Präzipitation über Flag-Beads mittels α -Flag- und α -Myc-Antikörper im Western Blot analysiert. Hierzu wurden die Stämme W12576 (NET1/NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6), W12577 (NET1/NET1(1-972)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6), W12578 (NET1/NET1(1-693)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6), W12579 (NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6) und W12580 (NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6) ausgewählt. Als Negativkontrolle diente W10706 (FOB1-Myc13-kanMX6).

Errechnete Proteingrößen

Net1(1-1189) ^{Flag12} : 142,7 kDa	Fob1 ^{Myc13} : 85,8 kDa
Net1(1-972) ^{Flag12} : 120,1 kDa	
Net1(1-693) ^{Flag12} : 89,8 kDa	* IgG
Net1(1-455) ^{Flag12} : 63,7 kDa	** α -Flag-Kreuzreaktion
Net1(1-341) ^{Flag12} : 51,4 kDa	

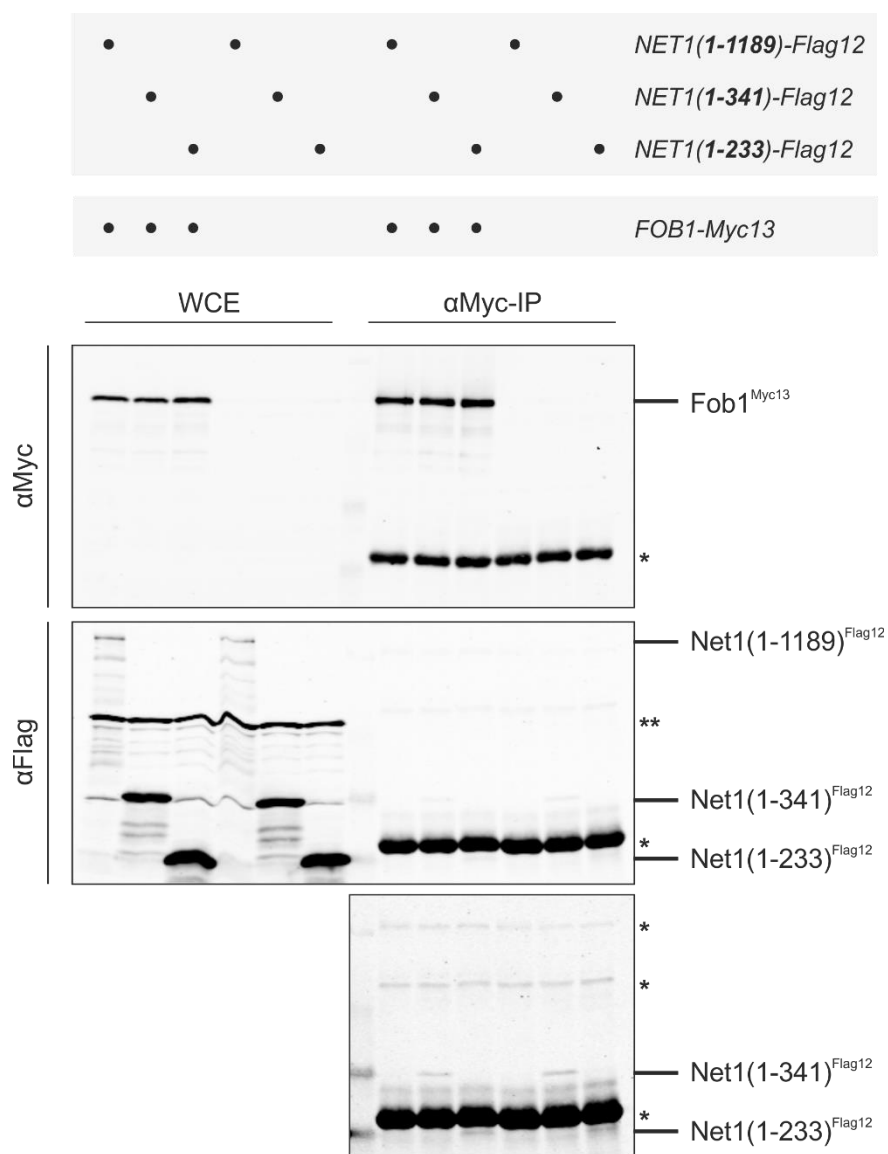


Abb. 4.14: Coimmunpräzipitation von C-terminal verkürzten Net1-Derivaten mit Fob1

Die Interaktion der Net1^{Flag12}-Konstrukte mit Fob1^{Myc13} wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Hierzu wurden die Stämme W13969 (*NET1/NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6*), W13970 (*NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6*) und W13971 (*NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6*) ausgewählt. Als Negativkontrollen dienten W13972 (*NET1/NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 ADE2/ade2*), W13973 (*NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 ADE2/ade2*) und W13974 (*NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 ADE2/ade2*). Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysate (WCE) und nach der Präzipitation über Myc-gekoppelte Agarose-Beads mittels α -Myc- und α -Flag-Antikörper im Western Blot analysiert. Die rechte Hälfte der α -Flag-Membran wurde zusätzlich mit höherer Intensität eingescannt.

Errechnete Proteingrößen

Net1(1-1189)^{Flag12}: 142,7 kDa

Net1(1-341)^{Flag12}: 51,4 kDa

Net1(1-233)^{Flag12}: 39,9 kDa

Fob1^{Myc13}: 85,8 kDa

* IgG

** α -Flag-Kreuzreaktion

4.1.5.2 Net1 zeigt keine Interaktion mit Fob1 im *yeast two hybrid*-Assay

Als letzte Alternative für einen direkten Nachweis der Interaktion von Fob1 und Net1 wurden die Derivate Net1(1-233), Net1(1-341) und Net1(1-455) ausgewählt und mittels des Hefe-zwei-Hybrid-Systems (*yeast two hybrid*, Y2H; vgl. 6.6) untersucht. Hierzu wurden die Net1-Konstrukte und Fob1 entweder an das DNA-Bindeprotein LexA (Bindedomäne, BD) oder an eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (Aktivierungsdomäne, AD) fusioniert. Im Falle einer Interaktion des getesteten Net1-Derivats mit Fob1 bilden die Fusionsproteine einen aktiven Transkriptionsfaktor. Die Aktivität des gebildeten Transkriptionsfaktors lässt sich im Reporterstamm W276 überprüfen. W276 enthält zum einen ein *lacZ*-Reportergen unter Kontrolle des *lexA*-Operators, eine Interaktion der Proteine lässt sich also über die resultierende β -Galaktosidase-Aktivität mit X-Gal als Substrat nachweisen. Zum anderen enthält W276 einen *LEU2*-Marker unter Kontrolle des *lexA*-Operators, eine Interaktion der Proteine kann also auch über einen Wachstumstest auf Selektivmediumsplatten ohne Leucin überprüft werden. Als Positivkontrolle diente die Selbstinteraktion von Cdc14, als Negativkontrollen und als Test für Autoaktivierung der Konstrukte wurden jeweils die entsprechende Kombinationen der Net1-Konstrukte mit den Leervektoren benutzt (s. Abb. 4.15).

Zwar zeigte sich bei den Fragmenten Net1(1-233) und Net1(1-341) vereinzelt eine leichte Blaufärbung, die Mehrzahl der getesteten Transformanten wies jedoch weder eine Blaufärbung im X-Gal-Assay noch Kolonien im Wachstumstest auf Platten ohne Leucin auf. Auch in der Y2H-Analyse konnte somit eine Interaktion von Fob1 mit Net1-Verkürzungen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

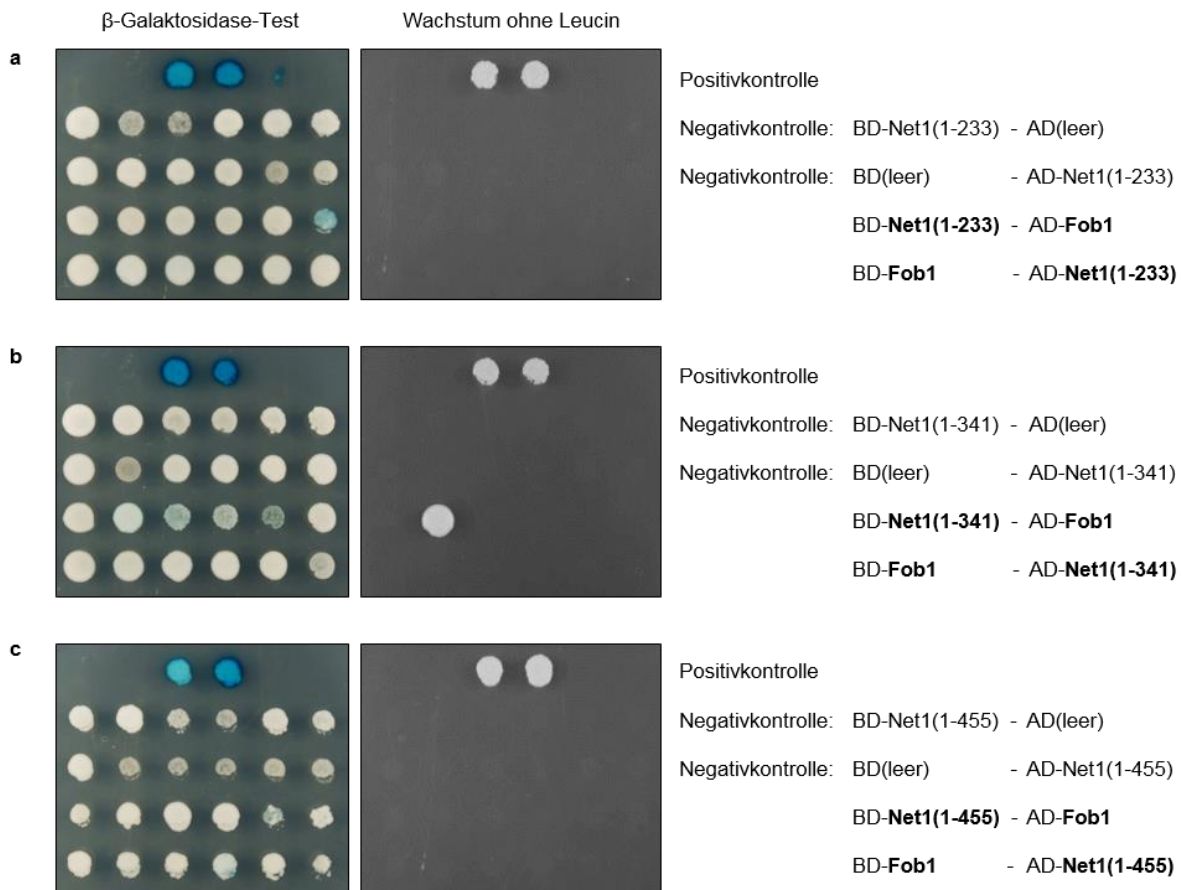


Abb. 4.15: Y2H-Analyse C-terminaler Net1-Derivate mit Fob1

Der Y2H-Reporterstamm W276 wurde mit den angegebenen Plasmidkombinationen transformiert. Als Positivkontrolle diente die Kombination AD-Cdc14(C283S) + BD-Cdc14(C283S) (pWS2752, pWS2753).

- a**, pWS4062 (BD-Net1(1-233)) und pJG4-5,
 pEG202 und pWS4063 (AD-Net1(1-233)),
 pWS4062 (BD-Net1(1-233)) und pWS4066 (AD-Fob1),
 pWS4060 (BD-Fob1) und pWS4063 (AD-Net1(1-233))
- b**, pWS4281 (BD-Net1(1-341)) und pJG4-5,
 pEG202 und pWS4284 (AD-Net1(1-341)),
 pWS4281 (BD-Net1(1-341)) und pWS4066 (AD-Fob1),
 pWS4060 (BD-Fob1) und pWS4284 (AD-Net1(1-341))
- c**, pWS4282 (BD-Net1(1-455)) und pJG4-5,
 pEG202 und pWS4285 (AD-Net1(1-455)),
 pWS4282 (BD-Net1(1-455)) und pWS4066 (AD-Fob1),
 pWS4060 (BD-Fob1) und pWS4285 (AD-Net1(1-455))

4.1.5.3 Fob1 beeinflusst die Lokalisation von Net1 nur geringfügig

Da die direkten Nachweise für eine Interaktion zwischen Fob1 und Net1 keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, wurde für weitere Analysen das Augenmerk auf die Lokalisationsmuster von Net1 und Net1-Verkürzungen in Abhängigkeit des Vorhandenseins oder der Abwesenheit von Fob1 gelegt. Wenn Fob1 wie in der Literatur beschrieben (Huang und Moazed, 2003) eine von zwei Möglichkeiten für die Bindung von Net1 an die rDNA darstellt, sollte die Lokalisation von Net1 durch eine Deletion von *FOB1* stark beeinträchtigt sein. Um dies zu überprüfen, wurde ein Stamm untersucht, dessen endogene Kopie von *NET1* mit GFP fusioniert war. Nach Deletion von *FOB1* wurde die Lokalisation von Net1(1-1189)-GFP über einen Zeitraum von 46 Minuten am Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Als Comarker für den Nukleolus diente Hmo1-3mCherry. Bei Hmo1 handelt es sich um ein DNA-bindendes Protein der HMG-Familie. Es bindet direkt an die rDNA und reguliert die Transkription ribosomaler Gene (Gadal *et al.*, 2002).

Net1(1-1189)-GFP zeigte im Wildtyp-Hintergrund (Fob1 vorhanden) die erwartete, charakteristische Nukleoluslokalisierung (s. Abb. 4.16a). Während der Anaphase war eine minimale Verbreiterung des nukleolären Signals zu erkennen, jedoch colokalisierte Net1 den ganzen Zeitraum über mit Hmo1 (Minute 24-36). Interessanterweise kam es bei fehlendem Fob1 nur zu einer geringfügigen Delokalisation von Net1 während der Anaphase, wobei auch Hmo1 hier ein etwas breiteres Signal aufwies (s. Abb. 4.16b, Minute 16-32). Kurz darauf zeigte Net1 wieder seine gewohnt enge Nukleoluslokalisierung.

Aufgrund der bei fehlendem Fob1 nur geringfügigen Delokalisation von Net1 in einer kurzen Phase des Zellteilungszyklus und der ansonsten unveränderten Lokalisation im Nukleolus, scheint Fob1 also nur einen Beitrag zur Lokalisation von Net1 zu leisten und nicht der alleinige Anker für Net1 an der rDNA zu sein. Net1 besitzt selbst bei fehlendem Fob1 die Fähigkeit in den Kern zu gelangen und in bestimmtem Maße die rDNA oder Komponenten des Nukleolus zu binden.

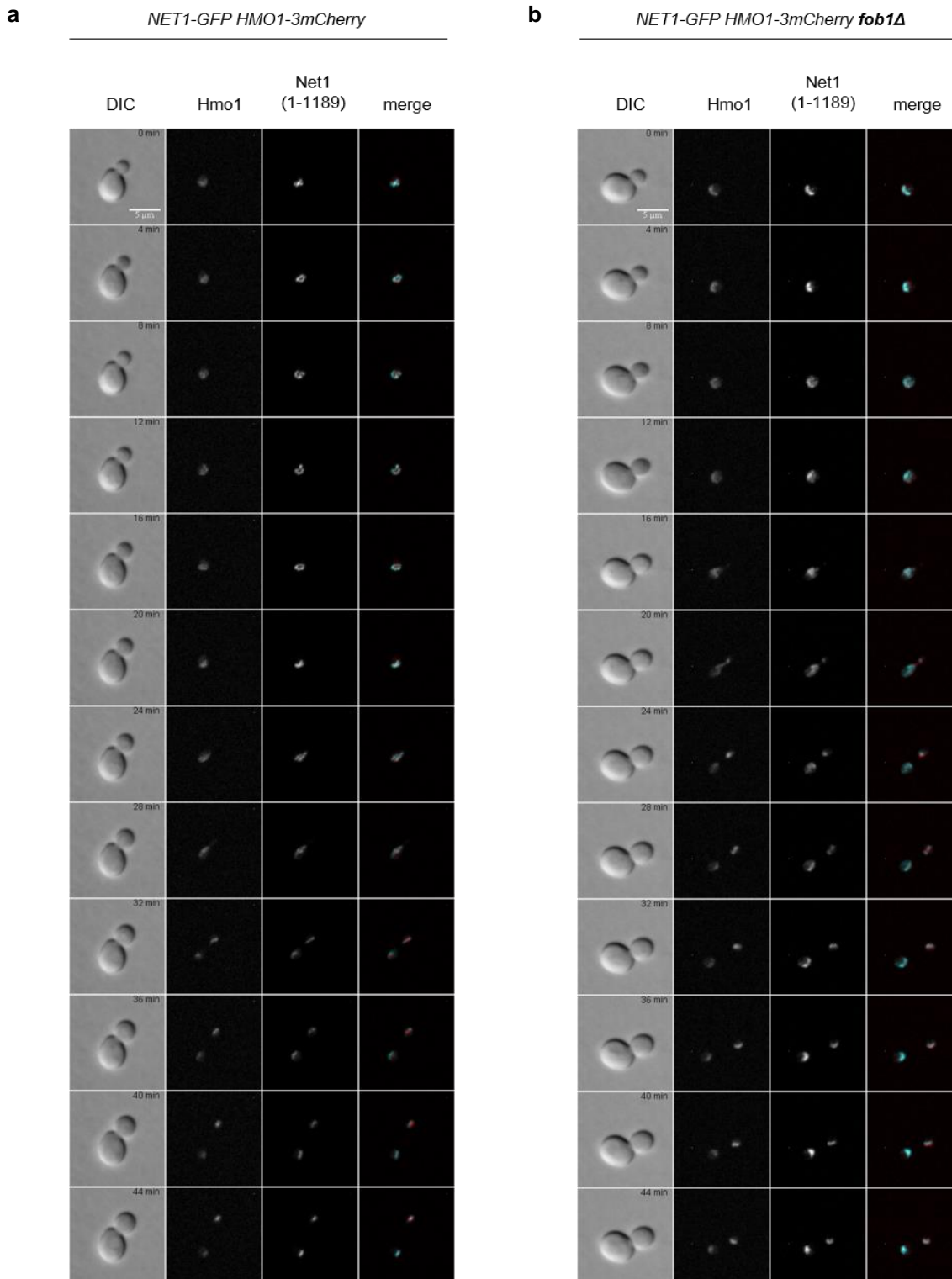
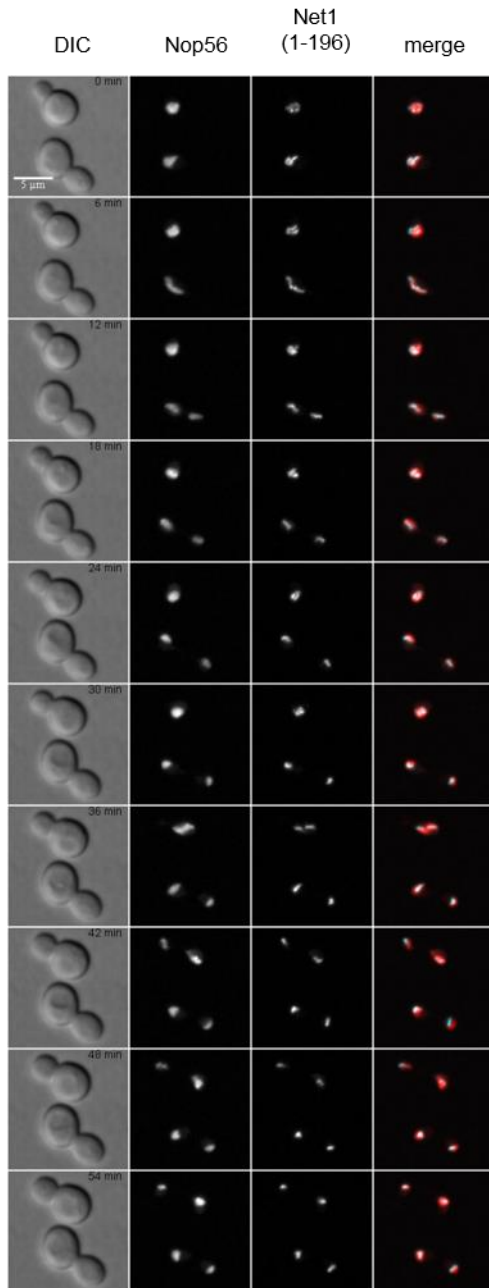
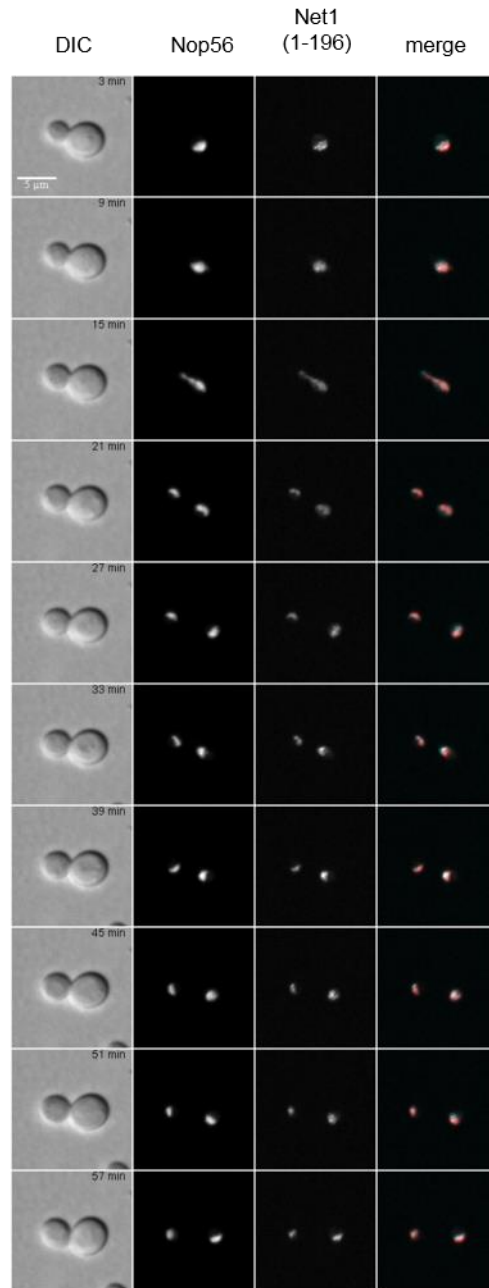


Abb. 4.16: Net1(1-1189)-GFP lokalisiert unabhängig von Fob1 im Nukleolus

Die Lokalisation von Net1(1-1189)-GFP wurde in Abhängigkeit des Vorhandenseins von Fob1 am Fluoreszenzmikroskop in den Stämmen **a**, W10700 (*NET1-GFP-HIS3MX6 HMO1-3mCherry-URA3*) und **b**, W10702 (*NET1-GFP-HIS3MX6 HMO1-3mCherry-URA3 fob1Δ::kanMX6*) untersucht. Die Abbildungen zeigen Montagen der Zeitrafferaufnahmen von Net1(1-1189)-GFP und Hmo1-3mCherry. Die Aufnahmen erfolgten im zweiminütigen Abstand, gezeigt ist jeder zweite Zeitwert. Die erste Spalte stellt die Zellmorphologie (DIC-Kanal) dar, die Spalten 2 und 3 enthalten die Fluoreszenzsignale von Hmo1-3mCherry und Net1(1-1189)-GFP, Spalte 4 die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 μ m.

Möglicherweise spielt bei der Lokalisation von Net1 im Nukleolus das Interaktionsnetzwerk des großen Net1-Proteins eine Rolle. Neben der beschriebenen Interaktion mit Fob1 interagiert Net1 u.a. auch mit Untereinheiten des SSU-Prozessosoms wie Utp17 (=Nan1) (Shou *et al.*, 1999) und Utp9 (Krogan *et al.*, 2006) sowie mit Untereinheiten der RNA-Polymerase I (Shou *et al.*, 2001; Huang und Moazed, 2003). Diese Interaktionen wurden bisher noch nicht genauer kartiert und Regionen im Net1-Protein zugeordnet. Um den Einfluss dieser Interaktionen auf die Lokalisation von Net1 auszuschließen und so den alleinigen Einfluss von Fob1 analysieren zu können, könnten Mehrfach-Deletionsstämme verwendet werden. Dies birgt allerdings die Gefahr von Wachstumsdefekten und daraus resultierend einer veränderten Nukleolusstruktur. Anstelle der Deletionsstämme wurde deshalb das kürzeste N-terminale Fragment von Net1 verwendet, das noch in der Lage war vollständig im Nukleolus zu lokalisieren: Net1(1-196). Durch seine geringe Größe kann das Fragment mit hoher Wahrscheinlichkeit nur noch wenige Interaktionen eingehen, so dass ein möglicher Einfluss von Fob1 auf die Lokalisation des Net1-Fragments deutlicher zu Tage treten könnte. Um den Wachstumsdefekt von Stämmen mit verkürztem *NET1* zu umgehen und eine normale Nukleolusstruktur zu gewährleisten, wurde das Konstrukt am *CYC1*-Terminator integriert (vgl. 4.1.2). Es wurde ein Transformant mit niedrigem Expressionslevel ausgewählt, so dass es zu keiner Aggregatbildung über Selbstinteraktion der Net1-Fragmente kommen konnte. Als Co-Marker für den Nukleolus diente Nop56-3mCherry. Die Lokalisation des Konstrukts wurde am Fluoreszenzmikroskop in Zeitrafferaufnahmen in dreiminütigem Abstand über 60 Minuten hinweg verfolgt (s. Abb. 4.17a).

Wie zuvor beim Net1-Protein der vollen Länge (vgl. Abb. 4.16) zeigte sich auch hier nur eine geringfügige Delokalisierung des Net1(1-196)-Signals nach der Deletion von *FOB1* (s. Abb. 4.17b, Minute 15-33). Auch das kleine N-terminale Fragment scheint also zum großen Teil in der Lage zu sein unabhängig von Fob1 im Nukleolus zu lokalisieren.

a*NET1(1-196)-GFP NOP56-3mCherry***b***NET1(1-196)-GFP NOP56-3mCherry fob1Δ***Abb. 4.17: Net1(1-196)-GFP lokalisiert unabhängig von Fob1 im Nukleolus**

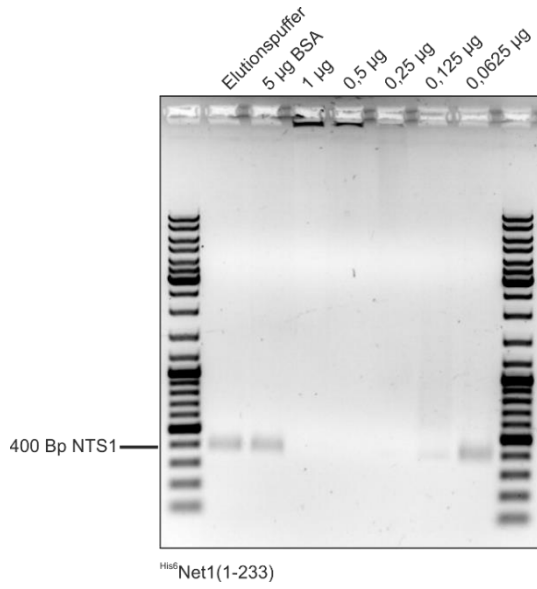
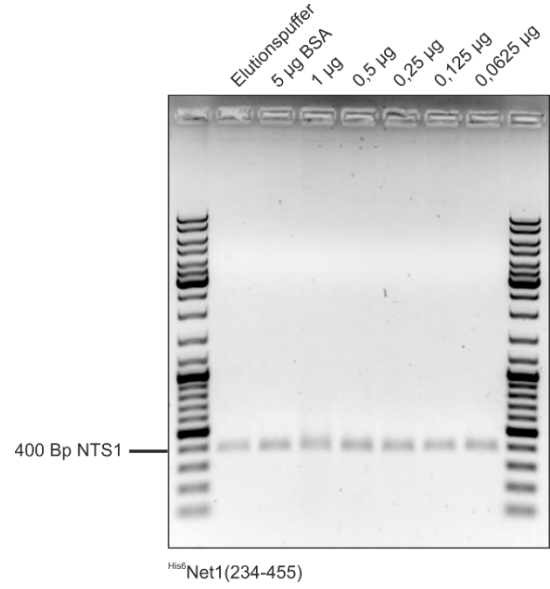
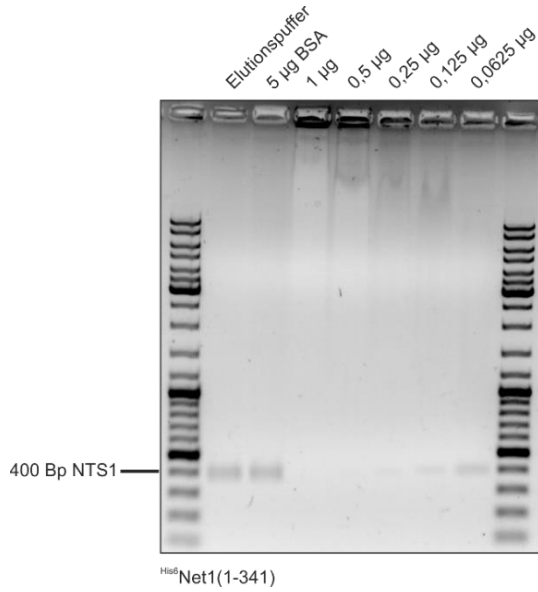
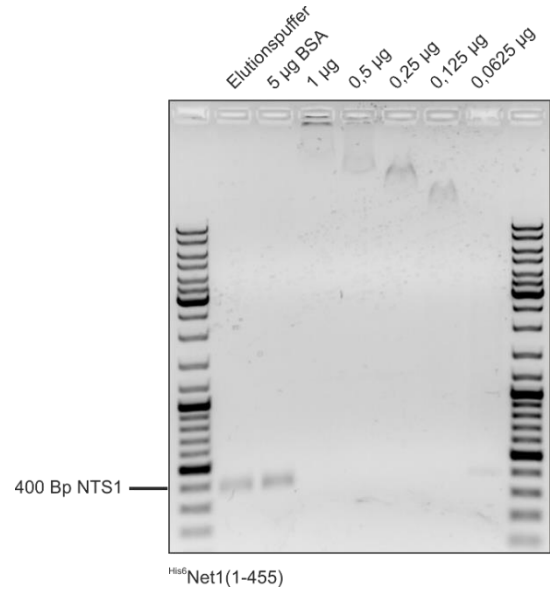
Die Lokalisation von Net1(1-196)-GFP wurde in Abhängigkeit des Vorhandenseins von Fob1 am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierzu wurden die Stämme **a**, W13499 (*tCYC1::pNET1-NET1(1-196)-GFP-tCYC1-LEU2 NOP56-3mCherry-URA3*) und **b**, W13500 (*tCYC1::pNET1-NET1(1-196)-GFP-tCYC1-LEU2 NOP56-3mCherry-URA3 fob1Δ::kanMX6*) ausgewählt. Die Abbildungen zeigen Montagen der Zeitrafferaufnahmen von Net1(1-196)-GFP und Nop56-3mCherry. Die Aufnahmen erfolgten im dreiminütigen Abstand, gezeigt ist jeder zweite Zeitwert. Die erste Spalte stellt die Zellmorphologie (DIC-Kanal) dar, die Spalten 2 und 3 enthalten die Fluoreszenzsignale von Nop56-3mCherry und Net1(1-196)-GFP, Spalte 4 die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle (merge). Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 µm.

4.1.6 Net1 besitzt Nukleinsäure-Bindefähigkeit

Dass Net1 auch in Abwesenheit von Fob1 in der Lage war überwiegend korrekt zu lokalisieren, war zunächst überraschend. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Möglichkeit, dass Net1 selbst in der Lage ist an Sequenzen der rDNA zu binden. Diese Eigenschaft würde Fob1 als Anker teilweise entbehrlich machen. Um eine mögliche DNA-Bindefähigkeit von Net1 nachzuweisen, wurden zunächst die Derivate ^{His6}Net1(1-233), ^{His6}Net1(234-455), ^{His6}Net1(1-341) und ^{His6}Net1(1-455) in *E. coli* BL21Codon+ exprimiert und anschließend über Ni-NTA-Säulenmaterial aufgereinigt (vgl. 6.5.1). Die gereinigten Proteine wurden sowohl für die folgenden EMSA-Analysen als auch für *in vitro*-Phosphatase-Assays (vgl. 4.2.2) eingesetzt. Ihr Laufverhalten in der SDS-PAGE und die Quantifizierung der Proteinmenge ist in Abschnitt 4.2.2 gezeigt (vgl. Abb. 4.24a).

4.1.6.1 Net1 bindet an DNA

Die gereinigten Proteine wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur DNA-Bindung mittels EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) untersucht (vgl. 6.8). Der EMSA beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von DNA-Fragmenten mit gebundenen Proteinen und nackter DNA im elektrischen Feld. Als DNA-Substrat wurden zwei je 400 Basenpaare lange PCR-Fragmente aus dem NTS1-Bereich und aus der codierenden Region (*RDN37*) der rDNA verwendet. Nach der Zugabe der gereinigten Proteine in unterschiedlichen Verdünnungen wurde das Laufverhalten der DNA mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Alle Net1-Fragmente, die die intakte N-terminale Region enthielten, zeigten DNA-Bindefähigkeit (s. Abb. 4.18a/c/d/e). Die eingesetzte DNA war nicht mehr auf Höhe der 400 Basenpaare-Standardbande nachzuweisen, sondern befand sich als hochmolekulare Bande entweder im oberen Viertel des Agarosegels oder in der Ladetasche. Wurde das Fragment Net1(234-455) zur DNA zugegeben, trat keine Bindung des Fragments an die DNA auf und es war die Bande auf Höhe der 400 Basenpaare-Standardbande zu sehen (s. Abb. 4.18b/f).

a**b****c****d**

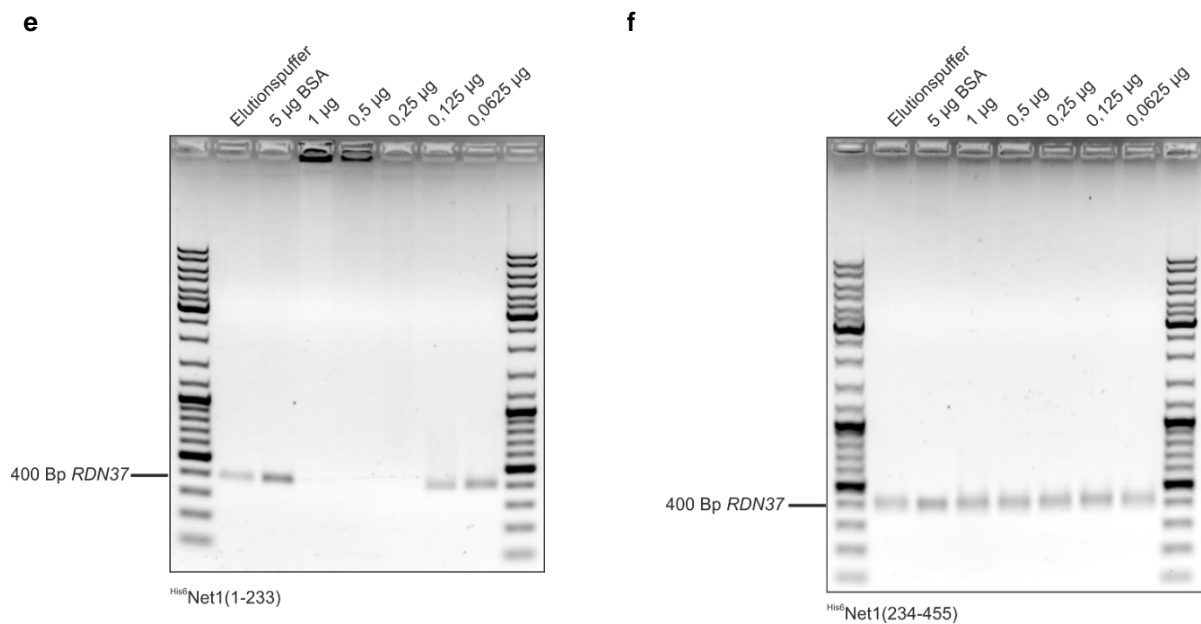


Abb. 4.18: Nur Net1-Fragmente mit intakter N-terminaler Region binden an DNA

Die Proteine ^{His6}Net1(1-233), ^{His6}Net1(234-455), ^{His6}Net1(1-341) und ^{His6}Net1(1-455) wurden mit 100 ng DNA gemischt und zur Analyse des Laufverhaltens auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Proteinmengen betrugen jeweils 1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg und 0,0625 µg. Als Kontrolle wurden jeweils Proben mit DNA und Elutionspuffer (250 mM Imidazol) bzw. mit DNA und 5 µg BSA aufgetragen.

- a, 400 Bp PCR-Produkt aus der NTS1-Region mit ^{His6}Net1(1-233)
- b, 400 Bp PCR-Produkt aus der NTS1-Region mit ^{His6}Net1(234-455)
- c, 400 Bp PCR-Produkt aus der NTS1-Region mit ^{His6}Net1(1-341)
- d, 400 Bp PCR-Produkt aus der NTS1-Region mit ^{His6}Net1(1-455)
- e, 400 Bp PCR-Produkt aus der *RDN37*-Region mit ^{His6}Net1(1-233)
- f, 400 Bp PCR-Produkt aus der *RDN37*-Region mit ^{His6}Net1(234-455)

Dieses Verhalten spricht dafür, dass Net1 nicht nur in der Lage ist DNA zu binden, sondern auch über Selbstinteraktion an der DNA größere Aggregate zu bilden. Diese Aggregate können so groß werden, dass die DNA aufgrund des Massenausschlusses nicht mehr in das Agarosegel einwandern kann und in der Auftragstasche verbleibt. Die DNA-Bindfähigkeit des Net1-Fragments hängt vom Vorhandensein der N-terminalen Region ab, das Fragment Net1(234-455) war nicht in der Lage die DNA zu binden. Die NTS1-Region ist für diesen Effekt nicht ausschlaggebend und wird nicht bevorzugt gegenüber der *RDN37*-Region gebunden.

4.1.6.2 Net1 bindet auch tRNA, bevorzugt jedoch DNA-Fragmente

Um zu überprüfen, ob Net1 prinzipiell auch in der Lage ist RNA zu binden, wurde der EMSA mit einem Substrat aus Gesamt-tRNA aus Hefe anstelle des DNA-Substrats wiederholt. Das Fragment mit intakter N-terminaler Region konnte auch die angebotene tRNA binden (s. Abb. 4.19a), während das Fragment ohne die N-terminale Region der ersten 233 Aminosäuren keine Bindung aufwies (s. Abb. 4.19b).

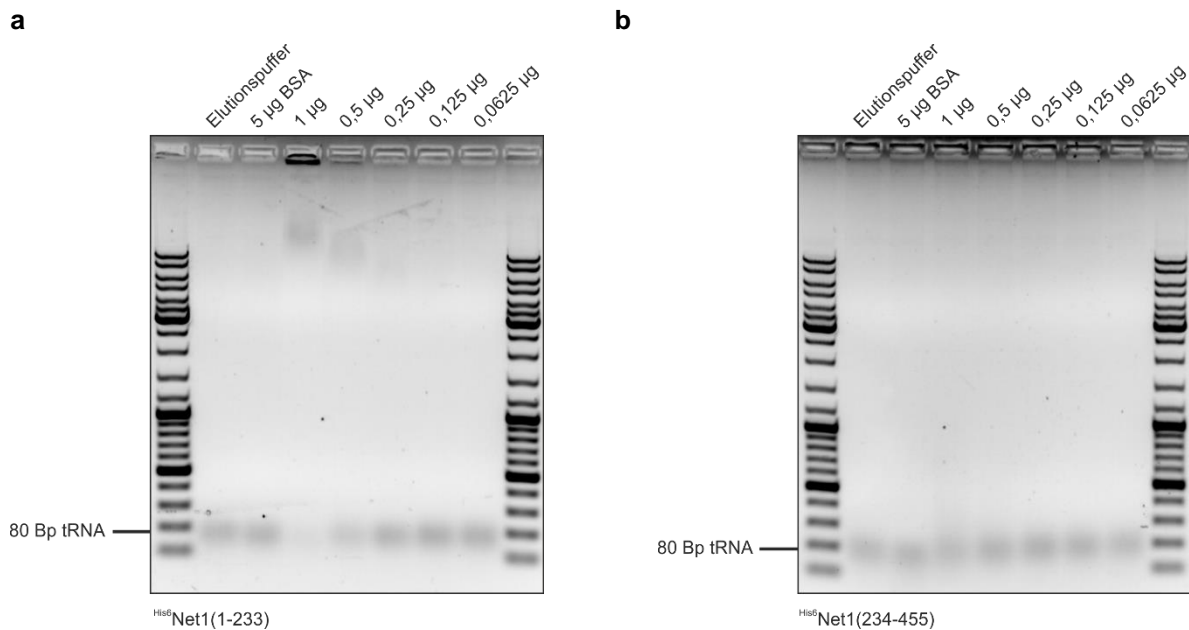


Abb. 4.19: Net1(1-233) bindet tRNA

a, 1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg, 0,0625 µg ^{His6}Net1(1-233) wurden mit 100 ng tRNA gemischt und zur Analyse des Laufverhaltens auf ein Agarosegel aufgetragen.

b, 1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg, 0,0625 µg ^{His6}Net1(234-455) wurden mit 100 ng tRNA gemischt und zur Analyse des Laufverhaltens auf ein Agarosegel aufgetragen.

Um zu testen, ob Net1 Präferenzen gegenüber einer Substratart zeigt, wurde anschließend ein Kompetitionstest zwischen DNA (400 Bp aus *RDN37*) und RNA (Gesamt-tRNA aus Hefe) durchgeführt. Hierbei wurden zunächst zu einer konstanten Konzentration von DNA und Net1(1-233) steigende Mengen tRNA zugegeben (s. Abb. 4.20a). Anschließend wurde das Bindeverhalten bei konstanter Protein- und tRNA-Konzentration und steigender DNA-Menge getestet (s. Abb. 4.20b). Zuletzt wurden konstante DNA- und t-RNA-Mengen mit abnehmenden Mengen an Protein versetzt (s. Abb. 4.20c). Als Kontrolle für das Laufverhalten von DNA und tRNA dienten die jeweiligen Ansätze ohne Proteinzugabe (s. Abb. 4.20d).

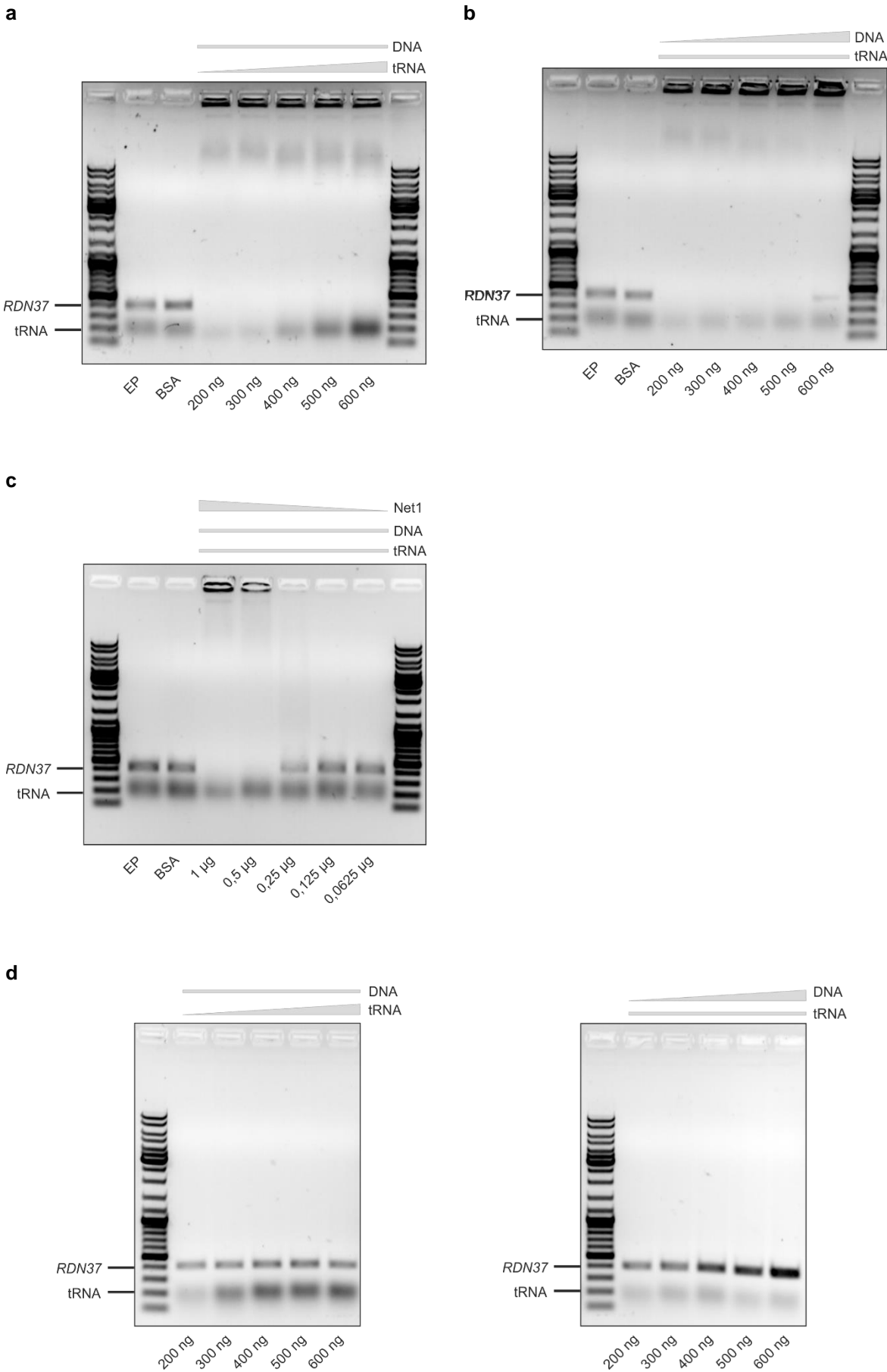


Abb. 4.20: Net1(1-233) bindet bevorzugt an DNA

- a**, 1 µg ^{His6}Net1(1-233) wurde mit 200 ng DNA aus *RDN37* (400 Bp) und steigenden Mengen tRNA (200 ng, 300 ng, 400 ng, 500 ng, 600 ng) gemischt und zur Analyse des Laufverhaltens auf ein Agarosegel aufgetragen.
- b**, 1 µg ^{His6}Net1(1-233) wurde mit 200 ng tRNA und steigenden Mengen DNA aus *RDN37* (200 ng, 300 ng, 400 ng, 500 ng, 600 ng) gemischt.
- c**, jeweils 200 ng DNA aus *RDN37* und tRNA wurden mit absteigenden Mengen ^{His6}Net1(1-233) (1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg, 0,0625 µg) gemischt.
- d**, Kontrollen aus entweder 200 ng DNA aus *RDN37* und 200-600 ng tRNA oder 200 ng tRNA und 200-600 ng DNA aus *RDN37*.
- Als zusätzliche Kontrolle wurden jeweils Proben mit DNA und Elutionspuffer (250 mM Imidazol) bzw. mit DNA und 5 µg BSA aufgetragen.

Net1(1-233) zeigt zusätzlich zu seiner Affinität für DNA auch die Fähigkeit an tRNA zu binden, jedoch bevorzugte das Net1-Fragment bei in gleicher Menge angebotener DNA und tRNA die DNA.

Für die Versuche wurde als Repräsentant für RNA ein Gemisch aller in Hefe vorkommenden tRNAs herangezogen. Es zeigte sich, dass das kürzeste N-terminale Fragment Net1(1-233) im Gegensatz zu Net1(234-455) prinzipiell in der Lage war auch an tRNA zu binden. Auch hier konnte wieder ein ähnliches Laufverhalten zur DNA beobachtet werden, die beobachteten Fragmente befanden sich entweder in der Ladetasche oder im oberen Viertel des Agarosegels. Wurden sowohl DNA als auch tRNA angeboten, zeigte Net1(1-233) eine Präferenz für die DNA-Fragmente. Bei einer eingesetzten Proteinmenge von 1 µg wurde die DNA vollständig in den oberen Teil des Gels geschifft, während ein Teil der tRNA zurückblieb. Selbst bei einem Überangebot von tRNA wurde das DNA-Fragment bevorzugt. Dies spricht in erster Näherung für eine höhere Affinität von Net1 zu DNA als zu RNA. Da das Gesamt-tRNA-Gemisch aufgrund seiner geringeren Anzahl an Basen im Vergleich zum DNA-Fragment mehr Moleküle enthielt, muss dieser Befund durch Vergleich von DNA- und RNA-Fragmenten gleicher Länge und somit vergleichbarer Konzentration bestätigt werden.

4.2 Funktionen der N-terminalen Region von Net1 – Regulation von Cdc14

Eine äußerst wichtige Funktion, die Net1 in der Literatur zugeschrieben wird, ist seine Zellzyklus-regulatorische Aufgabe als Inhibitor der Proteinphosphatase Cdc14. Cdc14 ist eine dualspezifische Phosphatase, deren Aktivität für wichtige Ereignisse in der Anaphase des Zellteilungszyklus benötigt wird. Dazu gehören unter anderem die rDNA-Segregation und der Austritt aus der Mitose durch Inaktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) sowie das Einleiten der Cytokinese (Rock und Amon, 2009). Die Aktivität von Cdc14 wird streng reguliert. Net1 bindet als Inhibitor direkt an Cdc14 und verankert die Phosphatase im Nukleolus. Erst zu Beginn der Anaphase wird diese Interaktion zunächst über das FEAR-Netzwerk aufgelockert. Cdc14 kann hierdurch in einer ersten Welle in den Zellkern freigesetzt werden, wo es vor allem die Chromosomenstruktur und -segregation, die Spindelstabilität/-kräfte und die Lokalisation bestimmter Proteine reguliert. In einer zweiten Welle erfolgt daraufhin über das MEN-Netzwerk die Freisetzung von Cdc14 ins Cytoplasma (D'Amours und Amon, 2004; Weiss, 2012).

Einen interessanten Bereich in der N-terminalen Region von Net1 stellt eine in Hefen stark konservierte Sequenz dar, die als *pfam10407*-Motiv definiert wurde. Diese Sequenz befindet sich zwischen den Aminosäuren 69-143 (vgl. 3.2.2). Da auch das Net1-verwandte nukleoläre Protein Tof2 (ein Aktivator der Proteinphosphatase Cdc14 im Nukleolus) und das zu Net1 homologe Protein Dnt1 aus *Schizosaccharomyces pombe* diese Sequenz beinhalten, ließe sich hier die Funktion der Cdc14-Bindung und somit der Regulation des Austritts aus der Mitose vermuten (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Die Freisetzung von Cdc14 erfordert als ersten Schritt das Lösen von seinem Inhibitor Net1. Die Protein-Wechselwirkung mit Net1 erfolgt im N-terminalen Bereich von Cdc14 (Aminosäuren 1-374), der C-terminale Anteil des Cdc14-Proteins (Aminosäuren 375-551) wird für die Bindung an Net1 nicht benötigt (Traverso *et al.*, 2001). Net1 bindet ebenfalls mit seinem N-terminalen Teil (Aminosäuren 1-600) an Cdc14, wobei Net1 nahe des aktiven Zentrums von Cdc14 bindet. Traverso *et al.* (2001) grenzten die Interaktionsdomäne innerhalb von Net1 auf die Aminosäuren 1-341 ein. Dieses kleine N-terminale Fragment ist noch in der Lage Cdc14 zu binden und seine Phosphataseaktivität zu inhibieren.

4.2.1 Net1(234-455) ist hinreichend und notwendig für die Interaktion mit Cdc14

In einem ersten Experiment wurden die erstellten Net1-Verkürzungen Net1(1-972), Net1(1-693), Net1(1-455) und Net1(1-341) mittels Coimmunpräzipitation hinsichtlich ihrer Cdc14-Interaktionsfähigkeit getestet. Hierzu wurden wegen des Wachstumsdefekts der Stämme mit verkürztem Net1 wie zuvor heterozygot-diploide Stämme verwendet. Als Positivkontrolle diente die Interaktion von Cdc14^{Myc13} mit dem Net1-Protein voller Länge (Net1(1-1189)^{Flag12} (s. Abb. 4.21). Die beiden Verkürzungen Net1(1-972) und Net1(1-693) konnten in vergleichbarem Maß an Cdc14 binden wie das Net1-Protein der vollen Länge Net1(1-1189). Auch das bereits sehr kleine Fragment Net1(1-455) zeigte eine ähnlich starke Interaktion mit Cdc14. Ein interessanter Unterschied hinsichtlich der Intensität der copräzipitierten Cdc14-Bande ergab sich jedoch bei Net1(1-341). Dieses Fragment wies eine deutlich schwächere Interaktion mit Cdc14 auf, die Intensität der copräzipitierten Cdc14-Bande betrug in diesem Fall nur ca. 25% der nachgewiesenen Bandenintensität (nach Abschätzung der Pixelintensität der Banden mit ImageJ), die bei Präzipitation der längeren Net1-Fragmente erhalten wurde. Ein geringes Maß an Cdc14 wurde unspezifisch über die Flag-Beads präzipitiert, alle nachgewiesenen Signale lagen jedoch über diesem Hintergrund.

Um diesen interessanten Befund zu vertiefen, wurde eine weitere Net1-Verkürzung hinzugezogen, Net1(1-233). Möglicherweise nimmt die Interaktionsfähigkeit hier noch weiter ab, so dass sich die Domäne innerhalb von Net1, die für die Bindung von Cdc14 notwendig ist, weiter eingrenzen ließe. Zu diesem Zweck wurde erneut ein Coimmunpräzipitationsexperiment durchgeführt (s. Abb. 4.22). Wie zuvor zeigte die Verkürzung Net1(1-341) wieder eine schlechtere Bindefähigkeit für Cdc14 als die längeren Konstrukte. Net1(1-233) zeigte nach erster Abschätzung keine Interaktion mit Cdc14, das Signal der copräzipitierten Bande befand sich nahe dem Hintergrundniveau der Negativkontrolle.

Die Daten der Coimmunpräzipitationen legen nahe, dass die Region Net1(1-341) wie von Traverso *et al.* (2001) beschrieben zwar grundsätzlich in der Lage ist Cdc14 zu binden, jedoch für die volle Interaktionsstärke auf Wildtypniveau Sequenzen hinter diesem Bereich benötigt werden. Das Ende der Cdc14-Interaktionsdomäne scheint im Bereich zwischen den Aminosäuren 341-455 zu liegen, möglicherweise wird aber nicht der gesamte Bereich für die Interaktion benötigt. Dem kürzeren Derivat Net1(1-233) scheinen die entscheidenden Sequenzen für die Bindung von Cdc14 zu fehlen, möglicherweise lässt sich also die Interaktionsdomäne weiter eingrenzen, indem das Fragment Net1(234-455) genauer analysiert wird.

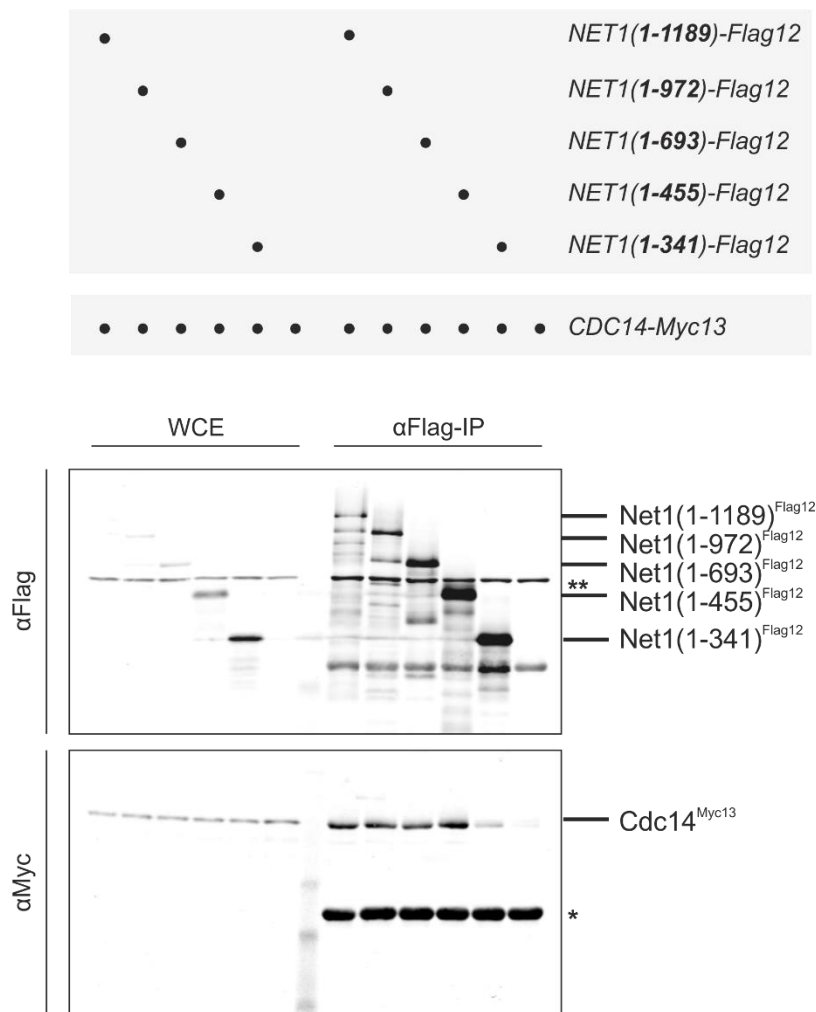


Abb. 4.21: Net1(1-341) bindet Cdc14 mit geringerer Affinität als Net1(1-455)

Die Interaktion von Net1^{Flag12}-Konstrukten mit Cdc14^{Myc13} wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Hierzu wurden die Stämme W12566 (*NET1/NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*), W12567 (*NET1/NET1(1-972)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*), W12568 (*NET1/NET1(1-693)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*), W12569 (*NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*) und W12570 (*NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*) ausgewählt. Als Negativkontrolle diente W11398 (*CDC14-Myc13-kanMX6*). Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysats (WCE) und nach der Präzipitation über Flag-Beads mittels α-Flag- und α-Myc-Antikörper im Western Blot analysiert.

Errechnete Proteingrößen

Net1(1-1189) ^{Flag12} : 142,7 kDa	Cdc14 ^{Myc13} : 82,4 kDa
Net1(1-972) ^{Flag12} : 120,1 kDa	
Net1(1-693) ^{Flag12} : 89,8 kDa	* IgG
Net1(1-455) ^{Flag12} : 63,7 kDa	** α-Flag-Kreuzreaktion
Net1(1-341) ^{Flag12} : 51,4 kDa	

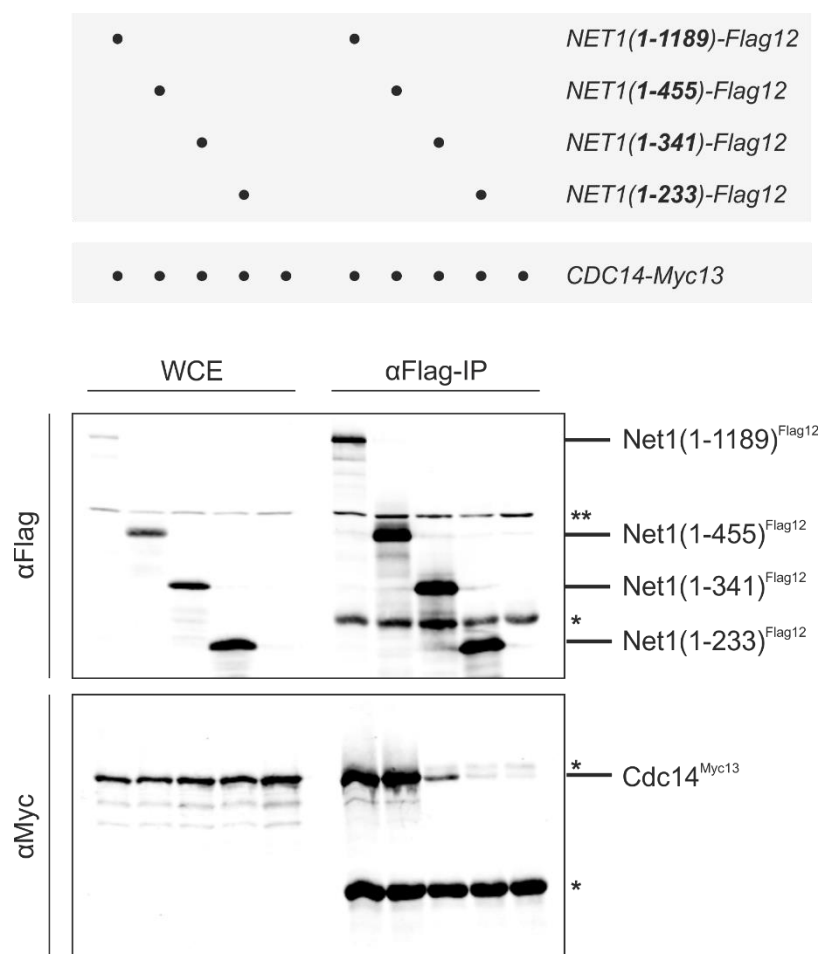


Abb. 4.22: Net1(1-233) bindet nicht an Cdc14

Die Interaktion von Net1^{Flag12}-Konstrukten mit Cdc14^{Myc13} wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Hierzu wurden die Stämme W12566 (NET1/NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6), W12569 (NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6), W12570 (NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6) und W13684 (NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6) ausgewählt. Als Negativkontrolle diente W13378 (CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6). Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysate (WCE) und nach der Präzipitation über Flag-Beads mittels α-Flag- und α-Myc-Antikörper im Western Blot analysiert.

Errechnete Proteingrößen

Net1(1-1189)^{Flag12}: 142,7 kDa

Net1(1-455)^{Flag12}: 63,7 kDa

Net1(1-341)^{Flag12}: 51,4 kDa

Net1(1-233)^{Flag12}: 39,9 kDa

Cdc14^{Myc13}: 82,4 kDa

* IgG

** α-Flag-Kreuzreaktion

Zur Analyse der Interaktionsfähigkeit des Fragments Net1(234-455) mit Cdc14 wurde das Konstrukt *NET1(234-455)-Flag3* sowie als Referenz die beiden Konstrukte *NET1(1-233)-Flag3*, und *NET1(1-455)-Flag3* in Vektoren mit induzierbarem *GAL1*-Promotor kloniert und am *ura3*-Locus ins Genom integriert. Da auf diese Weise Mehrfachintegrationen zustande kommen konnten, wurden Transformanten ausgewählt, die die einzelnen Konstrukte in vergleichbarer Proteinmenge exprimierten. Aufgrund des zusätzlich zum jeweiligen Konstrukt vorhandenen Wildtyp-Net1 trat kein Wachstumsdefekt auf, es konnte also mit haploiden Stämmen gearbeitet werden. Die Fähigkeit der Net1-Konstrukte zur Cdc14-Interaktion wurde wiederum mittels Coimmunpräzipitation überprüft (s. Abb. 4.23).

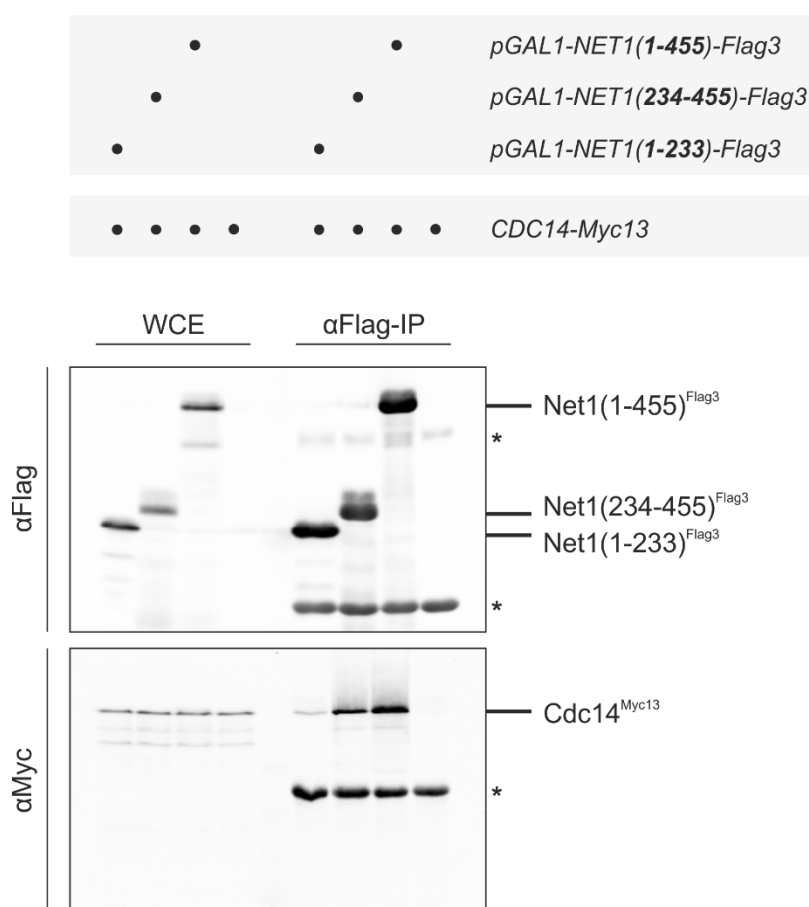


Abb. 4.23: Net1(234-455) bindet an Cdc14

Die Interaktion von Net1^{Flag3}-Konstrukten mit Cdc14^{Myc13} wurde nach zweistündiger Induktion des *GAL1*-Promotors mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Hierzu wurden die Stämme W13773 (*ura3::pGAL1-NET1(1-233)-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14-Myc13-kanMX6*), W13774 (*ura3::pGAL1-NET1(234-455)-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14-Myc13-kanMX6*) und W13775 (*ura3::pGAL1-NET1(1-455)-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14-Myc13-kanMX6*) wurden ausgewählt. Als Negativkontrolle diente W11398 (*CDC14-Myc13-kanMX6*). Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysate (WCE) und nach der Präzipitation über Flag-gekoppelte Agarose-Beads mittels α-Flag- und α-Myc-Antikörper im Western Blot analysiert.

Errechnete Proteingrößen

Net1(1-233) ^{Flag3} :	30,2 kDa	Cdc14 ^{Myc13} :	82,4 kDa
Net1(234-455) ^{Flag3} :	28,8 kDa	*	IgG
Net1(1-455) ^{Flag3} :	54,4 kDa	**	α-Flag-Kreuzreaktion

Im α -Flag-Nachweis war zu erkennen, dass Net1(1-233) und Net1(1-455) in ähnlicher Menge exprimiert wurden, die Proteinmenge von Net1(234-455) lag im Vergleich dazu etwas niedriger. Dennoch konnte zusammen mit Net1(234-455) eine zur Präzipitation über Net1(1-455) vergleichbare Menge Cdc14 copräzipitiert werden. Dies ist insofern etwas überraschend, als dass Net1(234-455) keine spezifische Nukleoluslokalisation aufweist, sondern über die gesamte Zelle verteilt vorliegt (siehe Anhang 9.2.3). Nichtsdestotrotz zeigte sich eine robuste Interaktion mit Cdc14. Möglicherweise handelt es sich hierbei um den cytoplasmatischen Anteil von Cdc14, der über MEN freigesetzt wurde. Synchronexperimente mit anschließender Coimmunpräzipitation könnten hierüber Aufschluss bringen, indem möglicherweise ein Unterschied in der Effizienz der Bindung zwischen Net1(234-455) und FEAR- bzw. MEN-freigesetztem Cdc14 zu Tage tritt. Net1(1-233) wies eine schwache Bande für copräzipitiertes Cdc14 auf, die über dem Hintergrundsignal der Negativkontrolle lag. In sehr geringem Maße ist also auch Net1(1-233) in der Lage an Cdc14 zu binden.

4.2.2 N-terminale Net1-Fragmente inhibieren die Cdc14-Aktivität

Die Bindung von Net1 an Cdc14 erfüllt im Zellzyklus eine wichtige regulatorische Funktion: Net1 wirkt als Inhibitor und hält Cdc14 bis zur Anaphase der Mitose im Nukleolus inaktiv. Traverso *et al.* (2001) postulieren, dass diese Inhibition durch Bindung von Net1 in der Nähe des aktiven Zentrums von Cdc14 stattfindet. Desweiteren wies das Fragment Net1(1-341) diese Fähigkeit zur Inhibition der Phosphatase-Aktivität auf (Traverso *et al.*, 2001). Um nun zu testen, ob das in der vorliegenden Arbeit identifizierte, kleinere Fragment Net1(234-455) ebenfalls diese Fähigkeit besitzt, wurden Phosphatase-Assays mit *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat durchgeführt. pNPP wird von Cdc14 zu *para*-Nitrophenol (pNP) dephosphoryliert. In Lösung tritt eine Gelbfärbung auf, so dass die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Menge an entstandenem pNP dient dabei als Maß für die Aktivität der Phosphatase Cdc14 (Taylor *et al.*, 1997) (vgl. 6.7.).

Für die Phosphatase-Assays wurden in *E. coli* exprimiertes ^{MBP}Cdc14 und die zuvor beschriebenen (vgl. 4.1.6. und 6.5.1.) Net1-Derivate ^{His6}Net1(1-233), ^{His6}Net1(234-455), ^{His6}Net1(1-341) und ^{His6}Net1(1-455) verwendet. Zunächst wurde in einem Vortest die spezifische Aktivität von ^{MBP}Cdc14 mit pNPP als Substrat ermittelt. Dies diente vor allem dazu eine geeignete Enzymmenge für die Inhibitionstests zu finden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Aktivität hoch genug war, um bei der späteren Zugabe der potentiellen Inhibitoren gut messbare Absorptionsunterschiede zu erhalten.

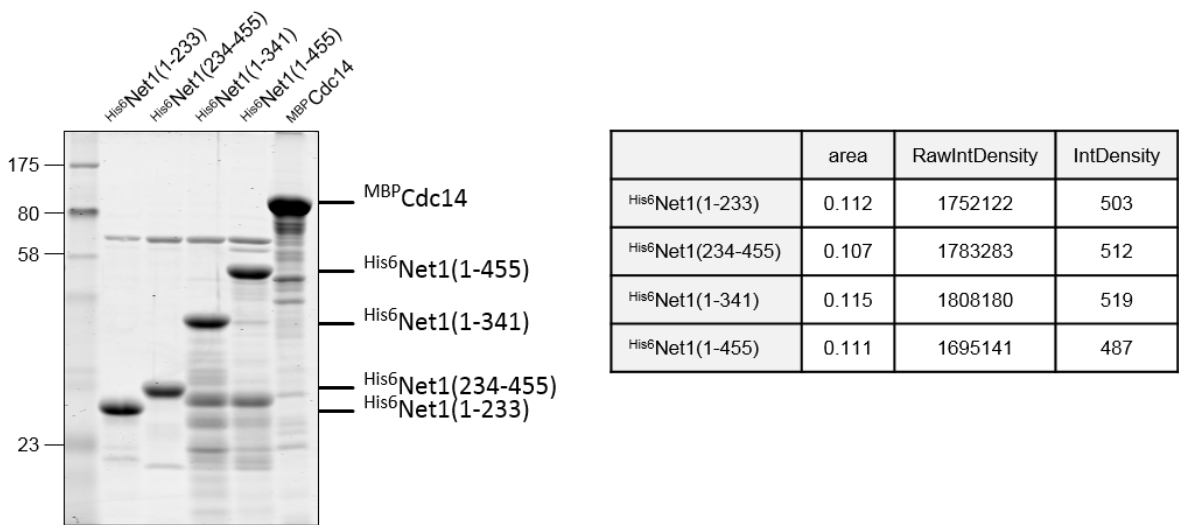
Die Konzentrationen der gereinigten Net1-Proteine wurden mittels BSA-Eichgerade und SDS-Gelelektrophorese bestimmt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml eingestellt und mittels SDS-PAGE und Berechnung der Pixelintensität der Signale mittels ImageJ (vgl. 6.5.6.2.) überprüft (s. Abb. 4.24a). Aus diesen Stammlösungen wurden die benötigten Volumina für die Assays entnommen. Um nun die Inhibitionsfähigkeit der einzelnen Net1-Konstrukte zu testen,

wurden konstante Mengen von Cdc14 mit steigenden Stoffmengen an potentielltem Inhibitor versetzt, das entstandene pNP photometrisch bestimmt und die Aktivität der Phosphatase berechnet. Die Wahl der Stoffmenge als Einheit ergab sich aus der Tatsache, dass die vier Net1-Derivate unterschiedliche Proteingrößen aufwiesen und somit nicht auf die Massenkonzentration als Einheit zurückgegriffen werden konnte. Für jedes Derivat wurde demnach die einzusetzende Stoffmenge anhand der Konzentration der Stammlösung in ein einzusetzendes Volumen umgerechnet.

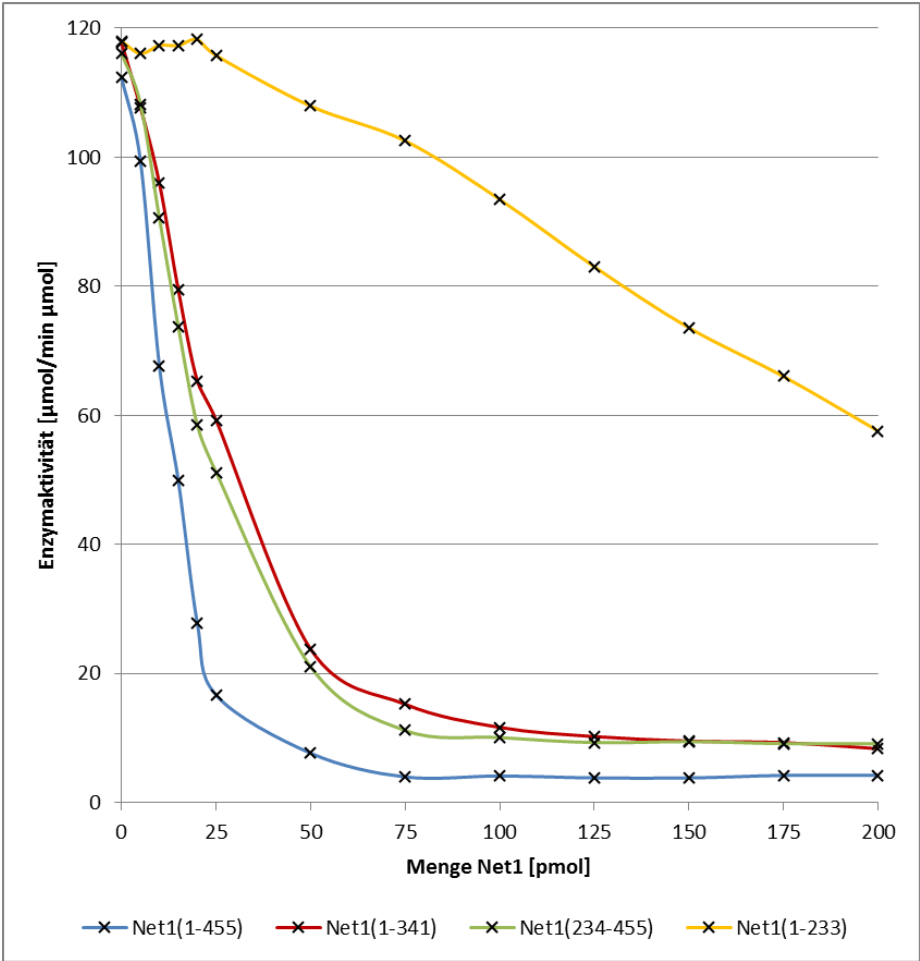
Die Auswertung ergab wie erwartet Net1(1-455) als besten Inhibitor der Phosphataseaktivität von Cdc14. Die berechnete Cdc14-Aktivität nahm stark ab und erreichte ihr Minimum bei einer Zugabe von 75 pmol Net1(1-455). Net1(234-455) zeigte eine minimal bessere Fähigkeit zu Inhibition als Net1(1-341), im Vergleich zu Net1(1-455) inhibierten beide Derivate Cdc14 jedoch deutlich schlechter. Das Minimum der Aktivität wurde bei 75 pmol Net1(234-455) erreicht, bei Net1(1-341) bei 100 pmol. Die verbleibende Restaktivität lag jedoch höher als bei Net1(1-455). Den schlechtesten Inhibitor stellte Net1(1-233) dar. Hier zeigte sich eine Abnahme der Cdc14-Aktivität erst bei einer Zugabe von 50 pmol oder mehr, die Abnahme verhielt sich hierbei fast linear, ein Minimum konnte im Assay nicht erreicht werden (s. Abb. 4.24b). Der Vergleich der Aktivitätswerte im Bereich von 0-100 pmol Inhibitor zeigt diesen Sachverhalt nach Normierung auf Net1(1-455) sehr gut (s. Abb. 4.24c). Die Ähnlichkeit im Inhibitionsverhalten zwischen Net1(234-455) und Net1(1-341) lässt sich ebenfalls sehr gut erkennen, indem die Stoffmenge des Inhibitors gegen die relative Aktivität der Phosphatase aufgetragen wird. Hierbei tritt auch der Unterschied zwischen Net1(1-233) und den übrigen Fragmenten besonders deutlich hervor (s. Abb. 4.24d).

Das Fragment Net1(234-455) ist also in der Lage Cdc14 sowohl zu binden als auch zu inhibieren. Die den Cdc14-bindenden Proteinen Net1, Tof2 und Dnt1 gemeinsame Aminosäureregion (*pfam10407*-Motiv) ist in diesem Fragment nicht enthalten und demzufolge wahrscheinlich nicht notwendig für die Bindung und Inhibition von Cdc14. Da das Fragment Net1(1-233) dennoch eine geringe Cdc14-Bindungs- und Inhibitionsfähigkeit aufweist, könnten möglicherweise Bereiche am C-terminalen Ende dieses Fragments noch einen Beitrag leisten. Dies müsste überprüft werden, indem die Bindungs- und Inhibitionsfähigkeit eines Fragments Net1(200-455) getestet wird. Würde dieses Fragment eine zu Net1(1-455) vergleichbare Inhibitionsfähigkeit aufweisen, könnte mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass das *pfam10407*-Motiv keinen Beitrag zur Cdc14-Interaktion und -Inhibition leistet.

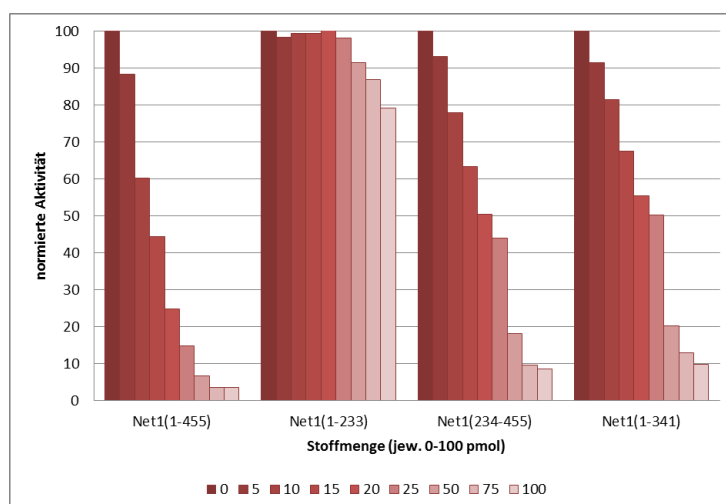
a



b



c



d

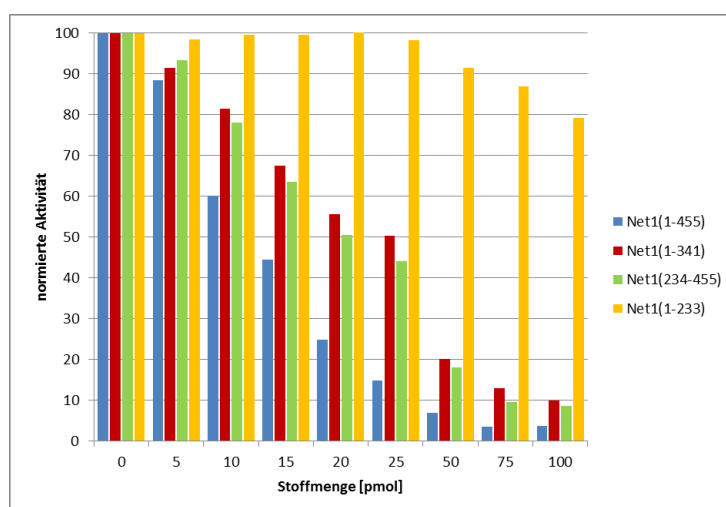


Abb. 4.24: Net1(234-455) inhibiert Cdc14 wie Net1(1-341)

a, Vergleich der in den Assays verwendeten Proteine

Zur Überprüfung der für die Assays eingestellten Stammlösungen wurde jeweils 1 µg der Net1-Derivate ^{His6}Net1(1-233), ^{His6}Net1(234-455), ^{His6}Net1(1-341) und ^{His6}Net1(1-455) und 2,5 µg ^{MBP}Cdc14 auf ein SDS-Gel aufgetragen, mit Coomassie gefärbt und die Intensität der Banden (*RawIntDensity*) mit ImageJ gemessen. *IntDensity* ergibt sich aus der Bandenintensität bezogen auf die Fläche des Signals (*area*).

b, Darstellung der Cdc14-Aktivität in Abhängigkeit der Menge an eingesetztem Inhibitor

5 µg Cdc14 (= 47,85 pmol) wurden mit 5 – 200 pmol ^{His6}Net1(1-233), ^{His6}Net1(234-455), ^{His6}Net1(1-341) oder ^{His6}Net1(1-455) versetzt. Die Enzymaktivität wurde berechnet und gegen die eingesetzte Menge an Inhibitor aufgetragen. Die Einheit der Aktivität setzt sich zusammen aus umgesetzten µmol Substrat pro Minute und eingesetzten µmol Inhibitor.

c, Darstellung der Aktivitätswerte sortiert nach den eingesetzten Inhibitoren

Hierbei wurden die Aktivitätswerte bei 0 pmol Net1 auf 100% normiert. Die eingesetzte Stoffmenge des Inhibitors in den angegebenen Schritten wurde gegen die errechnete Aktivität von Cdc14 aufgetragen. Dabei wurde für jeden Inhibitor eine eigene Kategorie gebildet und innerhalb dieser die Werte nach steigender, eingesetzter Stoffmenge des Inhibitors sortiert.

d, Direkter Vergleich der Inhibitionsfähigkeit der eingesetzten Inhibitoren

Alternative Darstellung der in c, aufgetragenen Werte. Als Kategorien wurden hier die eingesetzten Stoffmengen der Inhibitoren gewählt. Dadurch kann die relative Wirkung der Inhibitoren direkt verglichen werden.

4.2.3 Erfolgt die Regulation der Cdc14-Interaktion über Phosphorylierung?

Zu Beginn der Anaphase verringert FEAR die Interaktion zwischen Net1 und Cdc14, damit Cdc14 anschließend über MEN in den Kern und das Cytoplasma freigesetzt werden kann. Während des Zellteilungszyklus wird Net1 durch die Aktivität der Proteinphosphatase 2A (PP2A) in einem hypophosphorylierten Zustand gehalten. Erst zu Beginn der Anaphase, wenn Securin abgebaut und die Separase aktiv wird, kommt es zur Inaktivierung der regulatorischen Untereinheit von PP2A, Cdc55, über eine nicht-proteolytische Aktivität der Separase (Queralt *et al.*, 2006; Baro *et al.*, 2013). Somit kann Net1 an den CDK-Consensus-Stellen phosphoryliert werden. Dies führt zur ersten Freisetzung und Aktivierung von Cdc14 über das FEAR-Netzwerk. Als verantwortliche Phosphorylierungsstellen wurden sechs Positionen in der N-terminalen Region von Net1 vermutet. Diese Stellen befinden sich alle im Fragment Net1(1-341) und beinhalten die Positionen T62, S166, T212, S252, T297 und T304 (Azzam *et al.*, 2004). Da jedoch festgestellt wurde, dass Net1(1-341) weniger gut an Cdc14 binden kann als Net1(1-455), müssen möglicherweise noch weitere Phosphorylierungsstellen mit CDK-Consensus im Bereich zwischen den Aminosäure 341 bis 455 in Betracht gezogen werden. In Frage kommen die Positionen T357, S385, T423, S447 und S452. Unter Berücksichtigung des Ergebnisses, dass Net1(234-455) hinreichend für eine Bindung an Cdc14 ist, wurde dieses Fragment näher untersucht. Innerhalb dieses Aminosäurebereichs befinden sich fünf Phosphorylierungsstellen mit CDK-Consensus. Zwei dieser Positionen, S385 und S447, wurden ausgewählt, da bei beiden eine *in vivo*-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Li *et al.*, 2007, Bodenmiller *et al.*, 2010, Swaney *et al.*, 2013). Interessanterweise wird S447 *in vivo* von Cdc14 dephosphoryliert (Kao *et al.*, 2013) und könnte damit möglicherweise sogar eine Rolle bei der Re-Etablierung der Net1-Cdc14-Interaktion einnehmen. Um nun zu überprüfen, ob die Phosphorylierung an diesen Positionen Einfluss auf die Interaktion zwischen Net1 und Cdc14 nimmt, wurde ein Aminosäureautausch von Serin zu Aspartat vorgenommen.

Die mutagenisierten Fragmente *NET1(234-455)S385D*, *NET1(234-455)S447D* und die Doppelmutante *NET1(234-455)S385D S447D* wurden als Flag3-Fusionen in Plasmide mit *GAL1*-Promotor kloniert und am *ura3*-Locus ins Genom integriert. Nach Analyse der Expressionsmengen wurde ein Transformand je Konstrukt ausgewählt und auf die Fähigkeit zur Bindung von Cdc14 mittels Coimmunpräzipitation untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Transformanden ein vergleichbares Proteinniveau exprimierten. Sowohl die Einzelmutanten als auch die Doppelmutante waren immer noch in der Lage Cdc14 zu präzipitieren (s. Abb. 4.25).

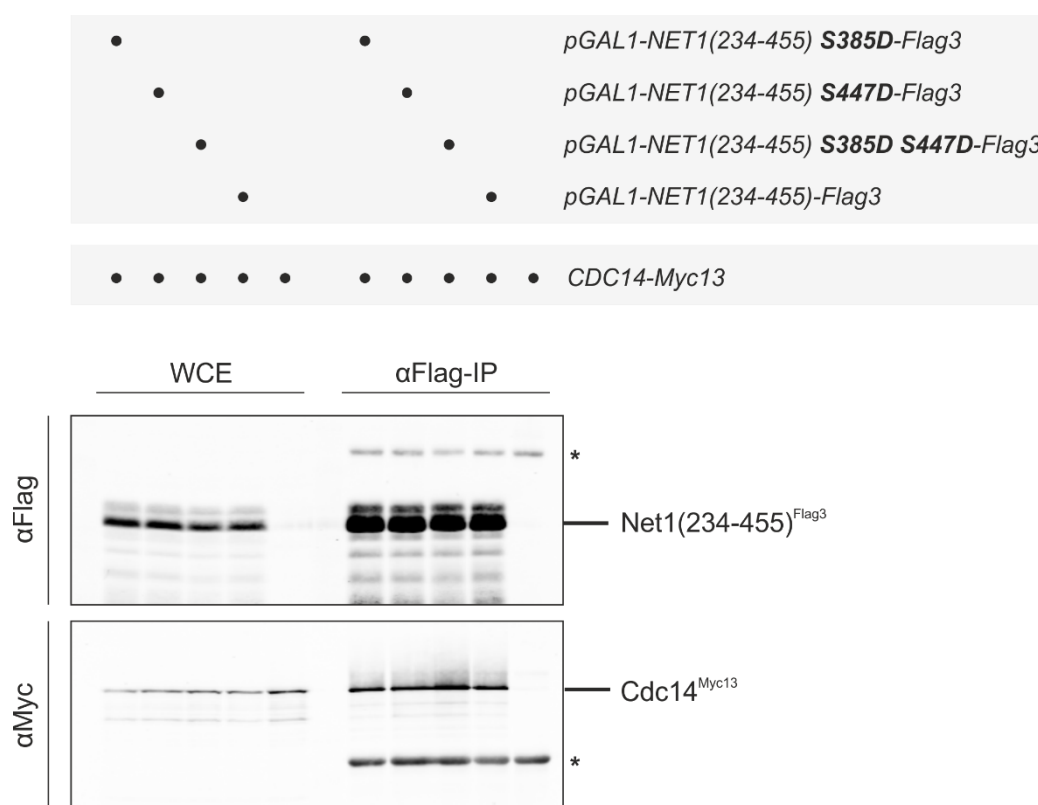


Abb. 4.25: Coimmunpräzipitation von Cdc14 mit mutierten Net1-Derivaten

Die Interaktion von *Net1(234-455)^{Flag3}*-Konstrukten mit *Cdc14^{Myc13}* wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Hierzu wurden die Stämme W13771 (*ura3/ura3::pGAL1-NET1(234-455)-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*), W13790 (*ura3/ura3::pGAL1-NET1(234-455)S387D-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*), W13792 (*ura3/ura3::pGAL1-NET1(234-455)S447-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*) und W13894 (*ura3/ura3::pGAL1-NET1(234-455)S385D S447D-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6*) ausgewählt. Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysat (WCE) und nach der Präzipitation über Flag-gekoppelte Agarose-Beads mittels α -Flag- und α -Myc-Antikörper im Western Blot analysiert.

Errechnete Proteingrößen

Net1(234-455)^{Flag3}: 28,8 kDa

Cdc14^{Myc13}: 82,4 kDa

* IgG

** α -Flag-Kreuzreaktion

Zunächst ließ sich kein Einfluss der Aminosäureaustausche S385D und S447D auf die Bindefähigkeit von *Net1* an *Cdc14* feststellen. Wären eine oder beide Phosphorylierungsstellen wichtig für die Abschwächung der Bindung und könnte der Aspartataustausch diese Phosphorylierung imitieren, sollte die Interaktion mit *Cdc14* in der CoIP schwächer ausfallen als in der Positivkontrolle *Net1(234-455)*. Auch der Einfluss des vorhandenen Wildtyp-*Net1*-Proteins über Selbstinteraktion und somit indirekte *Cdc14*-Bindung kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch kann *NET1* in dieser Stammkonfiguration nicht ohne Konsequenzen für das Wachstum entfernt werden.

In einem zweiten Schritt wurde das Wachstum der Stämme mit mutierten Net1-Derivaten unter Überexpression der Konstrukte näher untersucht. Aus vorhergehenden Experimenten war bereits bekannt, dass Net1(234-455) in haploiden Stämmen (nicht jedoch in Diploiden) bei Überexpression stark toxisch wirkt (Anna Mittermeier, 2013). Diese Tatsache alleine könnte ein weiterer Hinweis auf die Wirkung dieses Fragments als Inhibitor von Cdc14 sein. Bei Überexpression dieses Fragments wäre Cdc14 länger inaktiv und daraus resultierend käme es zum Anaphase-Arrest der Zellen. Dieser Arrest schien bei Überexpression der mutierten Konstrukte *NET1(234-455)S385D* und *NET1(234-455)S447D* abgeschwächt zu sein, wobei die Überexpression von *NET1(234-455)S447D* etwas weniger wachstumshemmend wirkte als die Überexpression von *NET1(234-455)S385D* (s. Abb. 4.26). Die Doppelmutante wies keinen wesentlichen Unterschied zur Einzelmutante *NET1(234-455)S447D* auf, was dafür spricht, dass sich die Effekte nicht additiv verhalten.

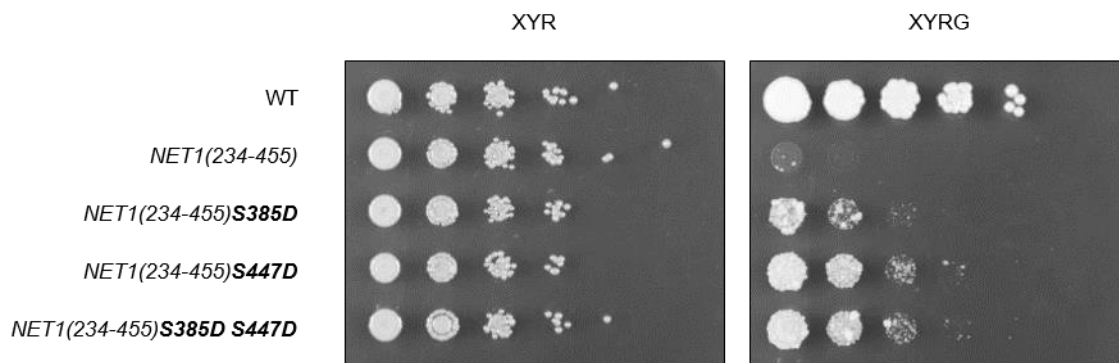


Abb. 4.26: Die Aminosäureaustausche S385D und S447D reduzieren die Toxizität von Net1(234-455)

Zum Vergleich der Auswirkung der Net1-Konstrukte auf das Zellwachstum wurden die Stämme W13768 (*ura3::pGAL1-NET1(234-455)-Flag3-tCYC1-URA3*), W13789 (*ura3::pGAL1-NET1(234-455)S385D-Flag3-tCYC1-URA3*), W13791 (*ura3::pGAL1-NET1(234-455)S447D-Flag3-tCYC1-URA3*) und W13893 (*ura3::pGAL1-NET1(234-455)S385D S447D-Flag3-tCYC1-URA3*) im Wachstumstest untersucht. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm K700. Die Stämme wurden in einer Verdünnungsreihe zur Kontrolle auf eine Vollmediumsplatte mit Raffinose gestempelt, die Überexpression der Konstrukte erfolgte auf Vollmediumsplatten mit Raffinose und Galaktose. Alle Platten wurden bei 25°C inkubiert.

Obwohl alle Konstrukte noch in der Lage sind Cdc14 zu binden, wirken die mutierten Konstrukte weniger toxisch im Zellzyklus als das nicht mutierte Fragment der gleichen Länge. Die Ursache könnte möglicherweise darin begründet liegen, dass diese Phosphorylierungsstellen nur einen Beitrag zur Lockerung der Net1-Cdc14-Interaktion liefern und weitere Phosphorylierungsstellen beteiligt sind, die in einer Studie ebenfalls mutiert werden müssten. Es liegen noch drei weitere, bisher nicht untersuchte CDK-Consensus-Stellen in diesem Fragment vor, die hierfür in Frage kämen. Zusätzlich enthält dieses Fragment noch drei CDK-Consensus-Stellen, die bereits von Azzam *et al.* (2004) untersucht wurden. Auch diese Positionen könnten einen Beitrag leisten und müssten nochmals miteinbezogen werden.

4.2.4 Der Aminosäurebereich 234-455 ist notwendig für die nukleoläre Lokalisation von Cdc14

Durch die Interaktion mit Net1 wird Cdc14 im Nukleolus verankert. Die Lokalisation von Cdc14 ähnelt der von Net1 während des Großteils des Zellzyklus. Cdc14 weist die typische halbmond- oder sichelförmige Nukleoluslokalisation auf. Während der Anaphase der Mitose jedoch wird Cdc14 in zwei Wellen zunächst in den Zellkern und kurz darauf ins Cytoplasma freigesetzt. Dies wird erkennbar durch eine Abschwächung des nukleolären Signals, zudem tritt Cdc14 leicht am Knospenhals und stärker am Spindelpol der zukünftigen Tochterzelle in Erscheinung. Gegen Ende der Mitose kehrt Cdc14 wieder in den Nukleolus zurück, wo es von Net1 erneut gebunden und inaktiviert wird (vgl. 3.1.2). Da Net1(234-455) in der Lage ist die Phosphatase-Aktivität zu inhibieren, selbst jedoch nicht spezifisch im Nukleolus lokalisiert (s. Anhang 9.2.3), ist nun zu klären, welche Region innerhalb von Net1 für die Lokalisation und Verankerung der Phosphatase notwendig ist. N-terminale Fragmente von Net1 lokalisieren im Nukleolus (vgl. 4.1.2). In diesen Stämmen, die ausschließlich das jeweilige endogen verkürzte Net1-Fragment *NET1(1-233)-Flag12*, *NET1(1-341)-Flag12* oder *NET1(1-455)-Flag12* exprimierten, wurde die Lokalisation von endogen GFP-markiertem Cdc14 am Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Als Comarker für den Nukleolus diente Nop56-3mCherry. Lag das vollständige Net1-Protein (1-1189) vor, zeigte sich die typische Lokalisation von Cdc14 zunächst sichelförmig im Nukleolus und dann in Abhängigkeit des betrachteten Zeitpunkts während der Mitose am Knospenhals und am Spindelpol der Tochterzelle (s. Abb. 4.27a). Interessanterweise war in Stämmen, die ausschließlich die Verkürzung Net1(1-233) exprimierten, die Cdc14-Lokalisation stark verändert (s. Abb. 4.27b). Cdc14 trat ausschließlich als punktförmiges Signal auf. Ob es sich hierbei um den Spindelpol handelt, müsste mittels Colokalisation eines Spindelpolmarkers wie z.B. Spc42-3mCherry überprüft werden. Das für Cdc14 sonst übliche, sichelförmige Nukleolussignal konnte nicht mehr nachgewiesen werden. In Stämmen mit verkürztem Net1(1-341) und Net1(1-455) ist trotz des Wachstumsdefekts die Lokalisation von Cdc14 ähnlich wie in Stämmen mit Net1(1-1189) (s. Abb. 4.27c/d). Viele der charakteristischen Lokalisationsmuster konnten festgestellt werden, beispielsweise das Delokalisieren aus dem Nukleolus in den Zellkern und in das Cytoplasma. Ebenso konnte die Lokalisation am Spindelpol der Tochterzelle festgestellt werden. Eine Lokalisation am Knospenhals wurde nicht detektiert, wobei dieses Stadium auch in Wildtypzellen nur selten dokumentiert werden konnte.

Offenbar fehlen dem Net1(1-233)-Konstrukt Sequenzen, die für die charakteristische Lokalisation von Cdc14 im Nukleolus über seine Interaktion mit Net1 notwendig sind. Da CoIP-Experimente gezeigt haben, dass dieses Konstrukt Cdc14 nur sehr schwach binden kann, könnte Cdc14 dauerhaft im Zellkern und Cytoplasma verfügbar sein. Um dies zu überprüfen, bedarf es weiterer Analysen.

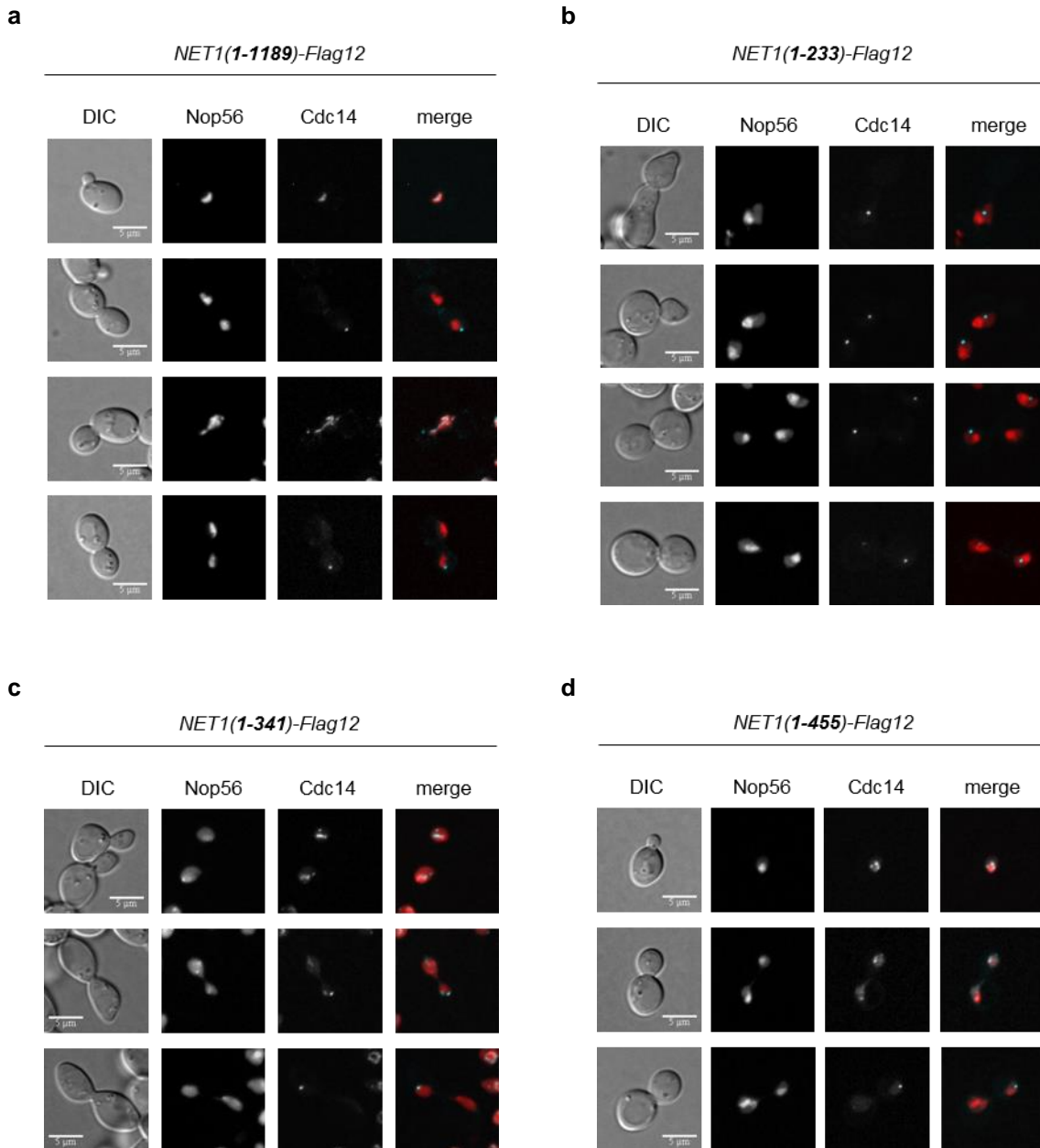


Abb. 4.27: Net1(1-341) ist hinreichend für die nukleoläre Lokalisation von Cdc14

Der Einfluss von Net1-Konstrukten auf die Lokalisation von Cdc14-GFP wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierzu wurden haploide Nachkommen der Stämme **a**, W13920 (*NET1/NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-GFP-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*), **b**, W13923 (*NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-GFP-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*), **c**, W13922 (*NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-GFP-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*) und **d**, W13921 (*NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-GFP-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*) ausgewählt. Die erste Spalte jeder Einheit zeigt die Zellmorphologie im DIC-Kanal, die zweite und dritte Spalte das Fluoreszenzsignal des Nukleolusmarkers Nop56-3mCherry bzw. von Cdc14-GFP und die vierte Spalte die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale. Der Maßstabsbalken beträgt 5 µm.

4.3 Funktion der C-terminalen Region von Net1 – Interaktion mit RNA-Polymerase I und Wachstumsstimulation

Das große Protein Net1 übernimmt wie beschrieben viele Funktionen in der Regulation der Mitose. Dazu gehört zum einen die Kontrolle des Austritts aus der Mitose über die Regulation der Aktivität von Cdc14 (Weiss, 2012). Net1 bindet hierzu direkt an Cdc14, wirkt als Inhibitor der Phosphataseaktivität und hält Cdc14 so lange im Nukleolus inaktiv bis es über das FEAR- und MEN-Netzwerk zur Freisetzung und Aktivierung von Cdc14 in der Anaphase der Mitose kommt (D'Amours und Amon, 2004). Eine weitere wichtige Rolle von Net1 beinhaltet die Vermittlung des nukleolären Silencing, indem Net1 an die Histon-Deacetylase Sir2 bindet und diese an die rDNA rekrutiert. Sir2 kann dort Heterochromatinstrukturen etablieren und auf diese Weise sowohl die Expression inserierter Markergene inhibieren als auch die Bildung extrachromosomaler rDNA-Ringe (ERCs, *extrachromosomal rDNA circles*) minimieren. Die Bildung von ERCs steht in Zusammenhang mit der Zellalterung (*aging*), so dass Sir2 und Net1 durch das Verhindern einer übermäßigen Bildung von ERCs einen wichtigen Beitrag zur Stabilität der rDNA und somit zur Gesundheit der Zelle leisten (Cuperus *et al.*, 2000). Diese Funktionen von Net1 konnten der N-terminalen Region (Cdc14-Bindung und Inhibition) bzw. der Proteinmitte (Sir2-Bindung) zugeordnet werden.

Eine weitere, äußerst wichtige Funktion übernimmt Net1 als Stimulator der RNA Polymerase I-Aktivität (Shou *et al.*, 2001). *net1*-Mutanten zeichnen sich durch Fehllokalisation von RNA-Polymerase I-Untereinheiten aus, sowie durch verminderte rRNA-Syntheserate und reduzierte rRNA-Akkumulation. Net1 ist in der Lage direkt mit RNA-Polymerase I zu interagieren. Außerdem stimuliert die Zugabe von gereinigtem Net1-Protein in etwa äquimolarem Verhältnis die Aktivität der Polymerase *in vitro*, und die Überexpression des PolI-Rekrutierungsfaktors Rrn3 ist in der Lage den Wachstumsdefekt von *net1Δ*-Stämmen zu supprimieren. Eine nähere Charakterisierung dieser Eigenschaften und eine mögliche Zuordnung zu einer Region innerhalb des Net1-Proteins wurde im Folgenden weiter analysiert.

4.3.1 C-terminale Verkürzung von Net1 beeinträchtigt das Wachstum

Bei der Herstellung und Kultivierung der C-terminalen Verkürzungsstämmen (vgl. 4.1) fiel sofort der gravierende Wachstumsdefekt auf, der all diese Stämme auszeichnet. Stämme, die heterozygot-diploid hinsichtlich der Net1-Verkürzung waren, wuchsen ähnlich gut wie Wildtyp. Haploide Nachkommen, die die verkürzte Net1-Form erbten, waren in ihrem Wachstum stark eingeschränkt. Dies zeigte sich zum einen in der Tetradenanalyse durch sehr kleine Kolonien (vgl. 4.3.2.), zum anderen bestätigte sich dies im Wachstumstest (s. Abb. 4.28). Hierzu wurden haploide Nachkommen aus der Tetradenanalyse in 1:10-Verdünnungsschritten auf Vollmediumsplatten gestempelt und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Verkürzungen Net1(1-1051), Net1(1-972), Net1(1-693), Net1(1-455) und Net1(1-341) ähnlich beeinträchtigt waren. Der Eindruck, dass die Verkürzung Net1(1-1051) ein etwas bessere Zellwachstum erlaubt, konnte durch den zusätzlichen Vergleich mehrerer Nachkommen in einem weiteren Wachstumstest nicht bestätigt werden (s. Anhang 9.2.4). Passend zu dieser Beobachtung wiesen die Stämme innerhalb der jeweiligen Verkürzungen häufig eine leichte Variabilität hinsichtlich der Koloniegröße in der Tetradenanalyse auf, wobei etwas größere Kolonien in der Tetradenanalyse mit etwas besserem Wachstum im Spotttest korrelierten. Auffälligerweise betraf dies nicht die Verkürzung Net1(1-233). Hier traten durchwegs winzige Kolonien in der Tetradenanalyse auf und auch das Wachstum im Spotttest deutete auf einen noch gravierenderen Wachstumsdefekt in diesen Stämmen hin.

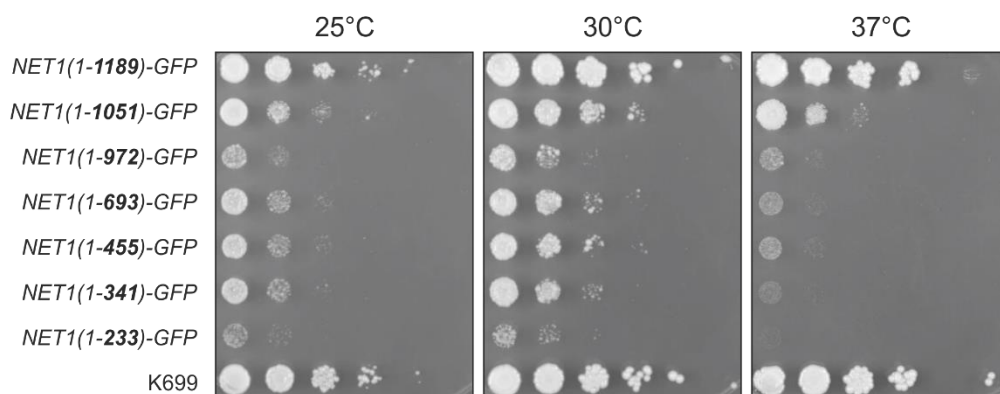


Abb. 4.28: Alle C-terminalen Net1-Verkürzungsstämmen weisen einen starken Wachstumsdefekt auf

Zur Veranschaulichung des Wachstumsdefekts C-terminaler Net1-Verkürzungsstämmen wurden haploide Nachkommen der Ausgangsstämme W13533 (*NET1/NET1(1-1189)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*), W13534 (*NET1/NET1(1-1051)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*), W13535 (*NET1/NET1(1-972)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*), W13536 (*NET1/NET1(1-693)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*), W13537 (*NET1/NET1(1-455)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*), W13538 (*NET1/NET1(1-341)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*) und W13539 (*NET1/NET1(1-233)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3*) auf XYD-Platten gespottet. Als Referenz diente der haploide Wildtypstamm K699.

4.3.2 Die C-terminale Verkürzung von Net1 um 138 Aminosäuren resultiert in einem Wachstumsdefekt

Manipulationen an der C-terminalen Region von Net1 führen zu einer starken Beeinträchtigung des Zellwachstums. Dies lässt sich zum einen anhand von Wachstumstests erkennen (vgl. 4.3.1, Abb. 4.28), zum anderen weisen die entsprechenden haploiden Nachkommen der heterozygot-diploiden Ausgangsstämme in allen betrachteten Fällen in der Tetradenanalyse sehr kleine Kolonien auf. Schon die Verkürzung um 138 Aminosäuren (Net1(1-1051)) bewirkte einen starken Wachstumsdefekt (s. Abb. 4.29a). Weitere Verkürzungen zeigten zunächst keine Verschlechterung des Wachstums (s. Abb. 4.29b-f). Erst bei der letzten Verkürzung auf 233 Aminosäuren kam es nochmals zu einem sichtbaren Effekt, die Nachkommen des heterozygot-diploiden Ausgangsstamms, die die Verkürzung erbten, waren kaum lebensfähig und ähnelten in ihrer Koloniegröße stark dem Aussehen von *net1Δ*-Nachkommen (s. Abb. 4.29g).

Die Morphologie der Zellen im Durchlichtmikroskop mit langgestreckten Knospen, die zum Teil die Cytokinese nicht abschließen bevor sie selbst Knospen bilden (vgl. 4.1.2), legte zunächst einen Cytokinesedefekt aufgrund von Cdc14-Fehlregulation nahe. Dies kann jedoch nicht den alleinigen Grund für den Wachstumsdefekt von Stämmen mit C-terminalen Net1-Verkürzungen darstellen, da die N-terminale Region bis zur Aminosäure 455 hinreichend für die Bindung und Inhibition von Cdc14 ist und auch die Lokalisation von Cdc14 in einem solchen Stamm korrekt erfolgt (vgl. 4.2). Der in *NET1(1-233)*-Stämmen zu Tage tretende, stärkere Wachstumsdefekt könnte darin begründet liegen, dass bei der Verkürzung Net1(1-233) zusätzlich zur Wachstumsstörung durch Manipulation der C-terminalen Region eine Fehlregulation und -lokalisation von Cdc14 hinzukommt. Beide Effekte zusammen scheinen einen verstärkten Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu nehmen.

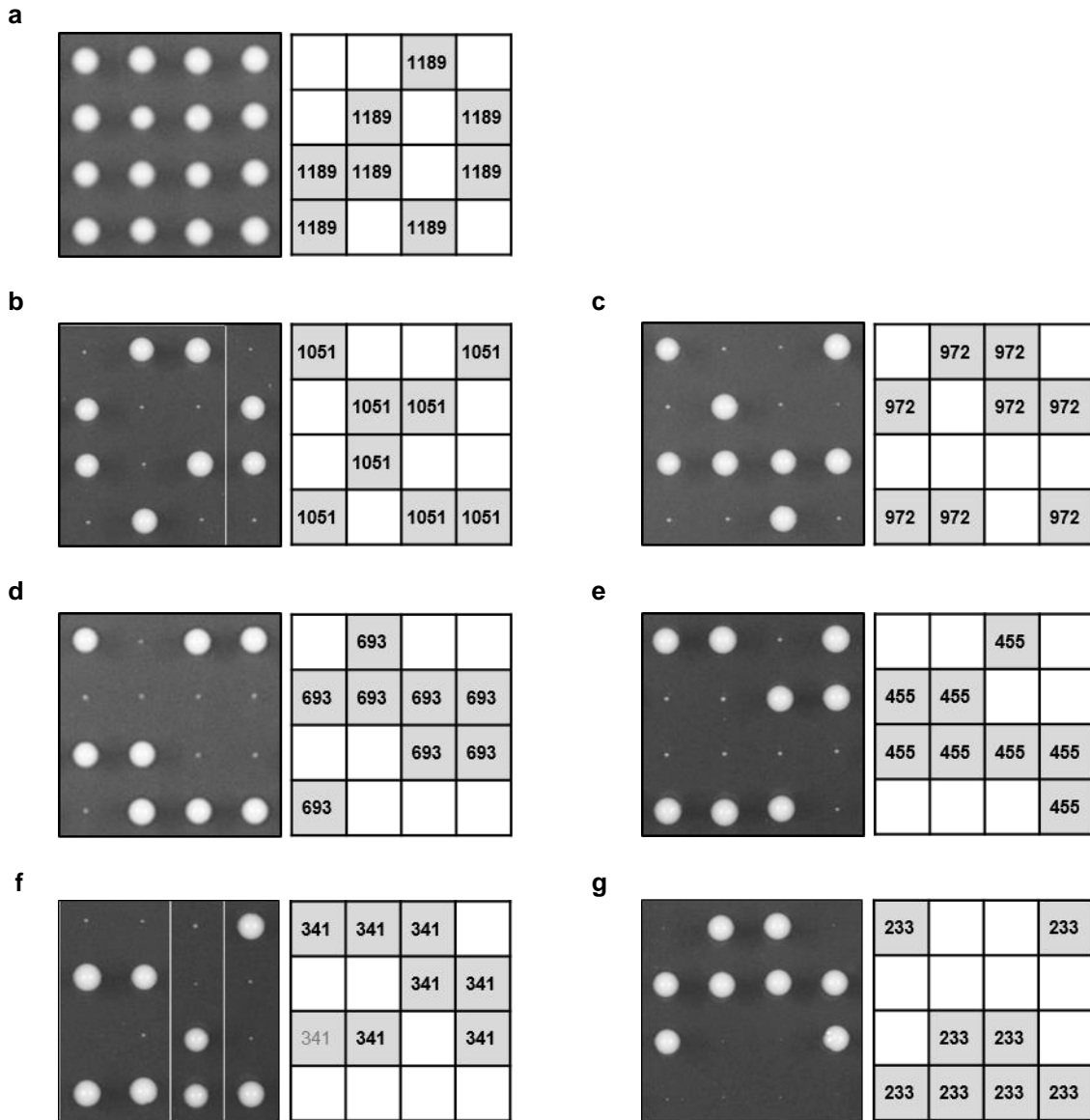


Abb. 4.29: Die C-terminale Verkürzung von Net1 bewirkt einen Wachstumsdefekt

Die Stämme **a**, W13533 (*NET1/NET1(1-1189)-GFP-HIS3MX6 NOP56-3mCherry-URA3*), **b**, W13534 (*NET1/NET1(1-1051)-GFP-HIS3MX6 NOP56-3mCherry-URA3*), **c**, W13535 (*NET1/NET1(1-972)-GFP-HIS3MX6 NOP56-3mCherry-URA3*), **d**, W13536 (*NET1/NET1(1-693)-GFP-HIS3MX6 NOP56-3mCherry-URA3*), **e**, W13536 (*NET1/NET1(1-455)-GFP-HIS3MX6 NOP56-3mCherry-URA3*), **f**, W13537 (*NET1/NET1(1-341)-GFP-HIS3MX6 NOP56-3mCherry-URA3*) und **g**, W13538 (*NET1/NET1(1-233)-GFP-HIS3MX6 NOP56-3mCherry-URA3*) wurden sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen. Jeweils vier Tetraden pro Ausgangsstamm wurden ausgewählt, die Auswertung des relevanten Genotyps ist jeweils schematisch gezeigt.

Abkürzungen:

1189: *NET1(1-1189)-GFP-HIS3MX6*

1051: *NET1(1-1051)-GFP-HIS3MX6*

693: *NET1(1-693)-GFP-HIS3MX6*

341: *NET1(1-341)-GFP-HIS3MX6*

972: *NET1(1-972)-GFP-HIS3MX6*

455: *NET1(1-455)-GFP-HIS3MX*

233: *NET1(1-233)-GFP-HIS3MX6*

4.3.3 Rettung des Wachstumsdefekts C-terminaler Net1-Verkürzungsstämmen

Um nun näher zu untersuchen, welche Eigenschaften die C-terminale Region von Net1 so unersetzlich für gesundes Zellwachstum machen, wurden zwei C-terminale Fragmente näher untersucht, die natürlicherweise mit Methionin beginnen und somit ein Startcodon enthalten. Es handelt sich hierbei um die Fragmente Net1(929-1189) (261 Aminosäuren) und Net1(1052-1189) (138 Aminosäuren). In einem ersten Schritt wurde analysiert, ob diese Fragmente in der Lage sind den Wachstumsdefekt von *net1Δ*-Stämmen zu retten. Hierzu wurden die Fragmente in Plasmide mit *TEF2*-Promotor kloniert und am *LEU2*-Locus ins Genom integriert. Durch Kreuzung mit einem *net1Δ*-Stamm wurden heterozygot-diploide Ausgangsstämme erhalten, die nach Sporulation einer Tetradenanalyse unterzogen wurden. Die durchgeführten Tetradenanalysen (s. Abb. 4.30a/b) und der Wachstumstest (s. Abb. 4.30c) zeigten, dass beide Konstrukte positiv auf das Wachstum von *net1Δ*-Zellen wirkten.

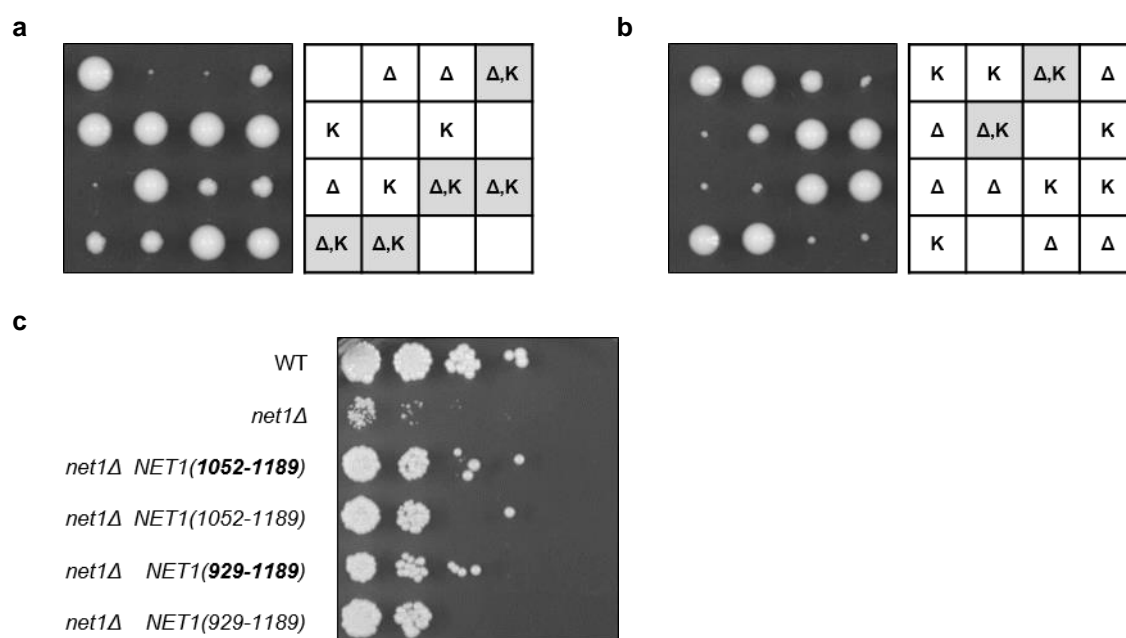


Abb. 4.30: C-terminale Fragmente von Net1 unterstützen das Wachstum von *net1Δ*-Stämmen

Die Stämme W12509 (*NET1/net1Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2*) und W12512 (*NET1/net1Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1(929-1189)-tCYC1-LEU2*) wurden sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen.

Jeweils vier Tetraden des Stamms **a**, W12509 bzw. **b**, W12512 wurden ausgewählt, die Auswertung des relevanten Genotyps ist jeweils schematisch gezeigt.

Abkürzungen:

Δ: *net1Δ::HIS3MX6*

K: *leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2* (W12509, **a**)

leu2::pTEF2-GFP-NET1(929-1189)-tCYC1-LEU2 (W12512, **b**)

Δ,K: *net1Δ::HIS3MX6 leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2* (W12509, **a**)

net1Δ::HIS3MX6 leu2::pTEF2-GFP-NET1(929-1189)-tCYC1-LEU2 (W12512, **b**)

c, Jeweils zwei haploide Nachkommen aus den Tetradenanalysen der Stämme W12509 und W12512 wurden ausgewählt und in einem Wachstumstest auf einer XYD-Vollmediumsplatte untersucht. Als Kontrollen dienten der haploide Wildtypstamm K699 sowie ein haploider *net1Δ*-Stamm.

Haploide Nachkommen, die die Deletion und das jeweilige Konstrukt erbten, konnten Kolonien formen, die in etwa die Hälfte der Wildtyp-Koloniegröße erreichten, während Nachkommen, die nur die Deletion erbten, nur sehr kleine Kolonien formen konnten. Die Überexpression beider C-terminalen Fragmente wirkt also wachstumsfördernd.

Die Vermutung liegt nahe, dass die fehlende Cdc14-Regulation in *NET1*-Deletionsstämmen einen Beitrag zum schlechten Wachstum der haploiden Nachkommen leistet. Um dies zu überprüfen, wurde statt *net1Δ*-Stämmen derjenige *Net1*-Verkürzungsstamm untersucht (vgl. 4.2.1 und 4.2.2), für den eine starke Interaktion mit Cdc14 und eine inhibitorische Wirkung auf die Phosphatase-Aktivität gezeigt werden konnte, *Net1*(1-455) (s. Abb. 4.31a). Als Kontrolle wurde das Fragment *Net1*(1-233) herangezogen, das nur geringe Cdc14-Interaktion und kaum inhibitorische Wirkung auf die Phosphatase-Aktivität aufwies (s. Abb. 4.31b). Die Auswirkung der Expression des kurzen, C-terminalen Fragments auf das Wachstum der *Net1*-Verkürzungsstämmen wurde wiederum mittels Tetradenanalysen untersucht.

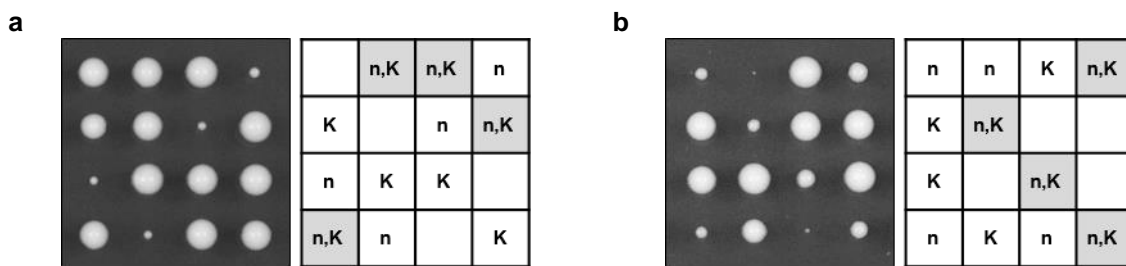


Abb. 4.31: *Net1*(1052-1189) rettet den Wachstumsdefekt von *NET1*(1-455)-Stämmen

Die Stämme **a**, W12533 (*NET1/NET1*(1-455)-*Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*) und **b**, W13761 (*NET1/NET1*(1-233)-*Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*) wurden sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen.

Jeweils vier Tetraden des Stamms W12533 bzw. W13761 wurden ausgewählt, die Auswertung des relevanten Genotyps ist jeweils schematisch gezeigt.

Abkürzungen:

n: *NET1*(1-455)-*Flag12-HIS3MX6* (W12533, **a**)

NET1(1-233)-*Flag12-HIS3MX6* (W13761, **b**)

K: *leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*

n,K: *NET1*(1-455)-*Flag12-HIS3MX6 leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2* (W12533, **a**)

NET1(1-233)-*Flag12-HIS3MX6 leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2* (W13761, **b**)

Der Stamm *NET1*(1-233) verhielt sich ähnlich einem *net1Δ*-Stamm, die Überexpression des kleinen C-terminalen Fragments *NET1*(1052-1189) unterstützte das Wachstum der haploiden Nachkommen, konnte jedoch den negativen Effekt, der durch das Fehlen der Cdc14-Regulation hervorgerufen wird, nicht vollständig kompensieren. Anders verhielt es sich bei dem Stamm *NET1*(1-455). Hier ist die Interaktion des *Net1*-Konstrukts mit Cdc14 vollständig gegeben und die Inhibition der Phosphatase-

Aktivität konnte gezeigt werden. Dennoch wiesen die haploiden Nachkommen einen starken Wachstumsdefekt auf. Da die Cdc14-Funktion in diesem Stamm gegeben ist, scheint der Defekt durch das Fehlen des C-terminalen Teiles von Net1 zustande zu kommen. Durch Überexpression des kleinen C-terminalen Fragments *NET1(1052-1189)* konnte dieser Wachstumsdefekt nahezu vollständig kompensiert werden und die von den haploiden Nachkommen gebildeten Kolonien erreichten eine ähnliche Größe wie Wildtypkolonien. Dieses Verhalten konnte auch für die Verkürzungen Net1(1-341), Net1(1-693), Net1(1-972) und Net1(1-1051) in Kombination mit dem kurzen C-terminalen Fragment Net1(1052-1189) und auch im Falle von Net1(1-455) in Kombination mit dem längeren C-terminalen Fragment Net1(929-1189) bestätigt werden (s. Anhang 9.2.5). Der kleine, 138 Aminosäuren umfassende C-terminale Teil des großen Net1-Proteins beinhaltet also die wachstumsunterstützende Funktion.

4.3.4 Lokalisation der C-terminalen Fragmente GFP-Net1(1052-1189) und GFP-Net1(929-1189)

Von Interesse war es nun, den Wirkungsort der kleinen C-terminalen Fragmente zu identifizieren, um möglicherweise Aufschluss darüber zu erhalten, in welche Prozesse das Fragment involviert sein könnte. Hierzu wurde die Lokalisation der mit GFP fusionierten Konstrukte im Fluoreszenzmikroskop unter Berücksichtigung verschiedener Comarker für Zellkern und Nukleolus untersucht. Um später die Abhängigkeit der Lokalisation der C-terminalen Fragmente von den nukleolären Faktoren Fob1 und Rpa12 untersuchen zu können (vgl. 4.3.5), wurde mit dem S288c-Stammhintergrund und der vorhandenen Deletionsmutanten-Sammlung von Euroscarf gearbeitet. Aufgrund der Deletion der Markergene in S288c-Stämmen (BY4741/BY4742) konnte bei der Stammkonstruktion jedoch nicht auf die bewährte Integration der zu untersuchenden Konstrukte am Markergenort zurückgegriffen werden. Stattdessen wurden die Plasmide mit den Konstrukten im enthaltenen *CYC1*-Terminator linearisiert und am *tCYC1*-Genort integriert. Auch hierbei konnte es zu Mehrfachintegrationen der Plasmide ins Genom kommen. Deshalb wurde darauf geachtet, dass beide Net1-Konstrukte in vergleichbarer Menge exprimiert wurden. Erwähnenswert ist hierbei, dass *CYC1* und *RPA12* auf Chromosom X nahezu direkt benachbart liegen, die Deletion von *RPA12* und die Integration des Konstrukts am *CYC1*-Genort werden also gekoppelt vererbt. Die Untersuchung von GFP-Net1(1052-1189) im Wildtyp-Hintergrund ergab eine Lokalisation überwiegend im Cytoplasma mit einer deutlichen Anreicherung im Nukleolus (s. Abb. 4.32a). GFP-Net1(929-1189) hingegen lokalisierte im Vergleich hierzu überwiegend im Zellkern und wies eine leichte Anreicherung des Signals im Nukleolus auf (s. Abb. 4.32b)

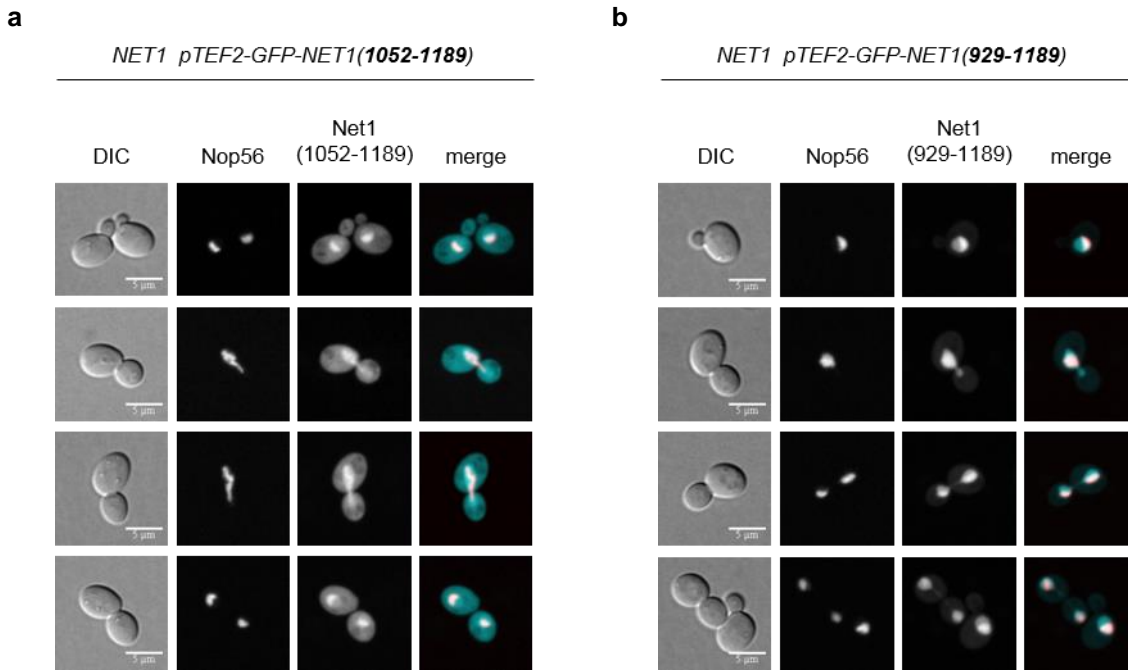


Abb. 4.32: Net1(929-1189) und Net1(1052-1189) zeigen eine leichte Anreicherung im Nukleolus

Die Lokalisation der C-terminalen Fragmente GFP-Net1(929-1189) und GFP-Net1(1052-1189) wurde am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierzu wurden haploide Nachkommen der Stämme **a**, W13067 (*tCYC1/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 FOB1/fob1Δ::kanMX4*) und **b**, W13070 (*tCYC1/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(929-1189)-tCYC1-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 FOB1/fob1Δ::kanMX4*) ausgewählt. Für die Analyse wurden Nachkommen herangezogen, die *FOB1* erben. Die erste Spalte zeigt die Zellmorphologie im Durchlichtkanal (DIC), in der zweiten Spalte ist der nukleoläre Comarker Nop56 gezeigt, Spalte 3 enthält das Net1-Signal und Spalte 4 zeigt beide Fluoreszenzkanäle überlagert (merge). Der Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 μm .

Beide Fragmente zeichnen sich durch einen Signalanteil im Nukleolus aus. GFP-Net1(1052-1189) zeigte trotz überwiegend cytoplasmatischer Lokalisation ein deutlich sichtbares Signal im Nukleolus. GFP-Net1(929-1189) lokalisierte überwiegend im Zellkern und zeigte zudem eine Anreicherung im Nukleolus. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied in der Lokalisation der beiden Fragmente wäre, dass das Fragment Net1(929-1189) eine effektivere NLS-Aktivität als das kürzere C-terminale Fragment besitzt. Nichtsdestotrotz scheinen die geringere NLS-Aktivität und der damit verbundene geringere Anteil von Net1(1052-1189) im Nukleolus auszureichen, um den Wachstumsdefekt abzumildern bzw. zu kompensieren.

4.3.5 Die Nukleoluslokalisierung der C-Terminalen Fragmente ist unabhängig von Fob1 und Rpa12

In einer nächsten Fragestellung galt es zu klären, von welchen nukleolären Faktoren die Lokalisation der beiden C-terminalen Fragmente abhängt oder beeinflusst wird. Wildtyp-Net1 kann laut Daten der Literatur über zwei Mechanismen an die rDNA gelangen, zum einen über eine Interaktion mit Fob1 und zum anderen über die Interaktion mit RNA-Polymerase I (Huang und Moazed, 2003). Beide Möglichkeiten wurden analysiert, indem zum einen Stämme untersucht wurden, die eine Deletion von *FOB1* trugen. RNA-Polymerase I andererseits ist ein Holoenzym bestehend aus 14 Untereinheiten, zehn dieser Untereinheiten werden von essentiellen Genen codiert. Lediglich Deletionsstämme für je eine der vier Untereinheiten Rpa49, Rpa34, Rpa14 und Rpa12 sind lebensfähig (Gadal *et al.*, 1997). Als Repräsentant wurde für diese Analyse ein *rpa12Δ*-Stamm ausgewählt. Die C-terminalen Fragmente wurden mit den entsprechenden Deletionsstämmen gekreuzt, haploide Nachkommen aus der Tetradenanalyse ausgewählt und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Lokalisation des kleinen Fragments Net1(1052-1189) zeigte sich unbeeinflusst von der Deletion von *FOB1* (s. Abb. 4.33a) und *RPA12* (s. Abb. 4.33b). Auch das größere Fragment Net1(929-1189) wies nach Deletion von *FOB1* (s. Abb. 4.33c) und *RPA12* (s. Abb. 4.33d) keine veränderte Lokalisation auf.

Weder die Deletion von *FOB1* noch die Deletion von *RPA12* beeinflussten die Lokalisation der C-terminalen Net1-Fragmente sichtbar. Die Signalintensität der GFP-Fusionen scheint zwar in *rpa12Δ* geringer zu sein als in *fob1Δ*, dies ist jedoch vermutlich auf die geringere Transkriptionsrate über RNA-PolI und daraus resultierend eine verringerte Ribosomenbiogenese und Translationsrate in diesen Stämmen zurückzuführen. *RPA12*-Deletionsstämme weisen zudem ein deutlich verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu Wildtyp- und *fob1Δ*-Stämmen auf. Beide C-terminalen Net1-Fragmente besitzen also die Möglichkeit unabhängig von der Interaktion mit Fob1 oder der RNA Polymerase I-Untereinheit Rpa12 in den Nukleolus zu gelangen. Beispielsweise könnten andere Polymerase-Untereinheiten den Interaktionspartner darstellen, der die Lokalisation der Net1-Fragmente unterstützt. Weiteren Aufschluss über die Abhängigkeit der Lokalisation der Net1-Fragmente könnte in diesem Zusammenhang u.a. eine *fob1Δ rpa12Δ*-Doppelmutante bringen.

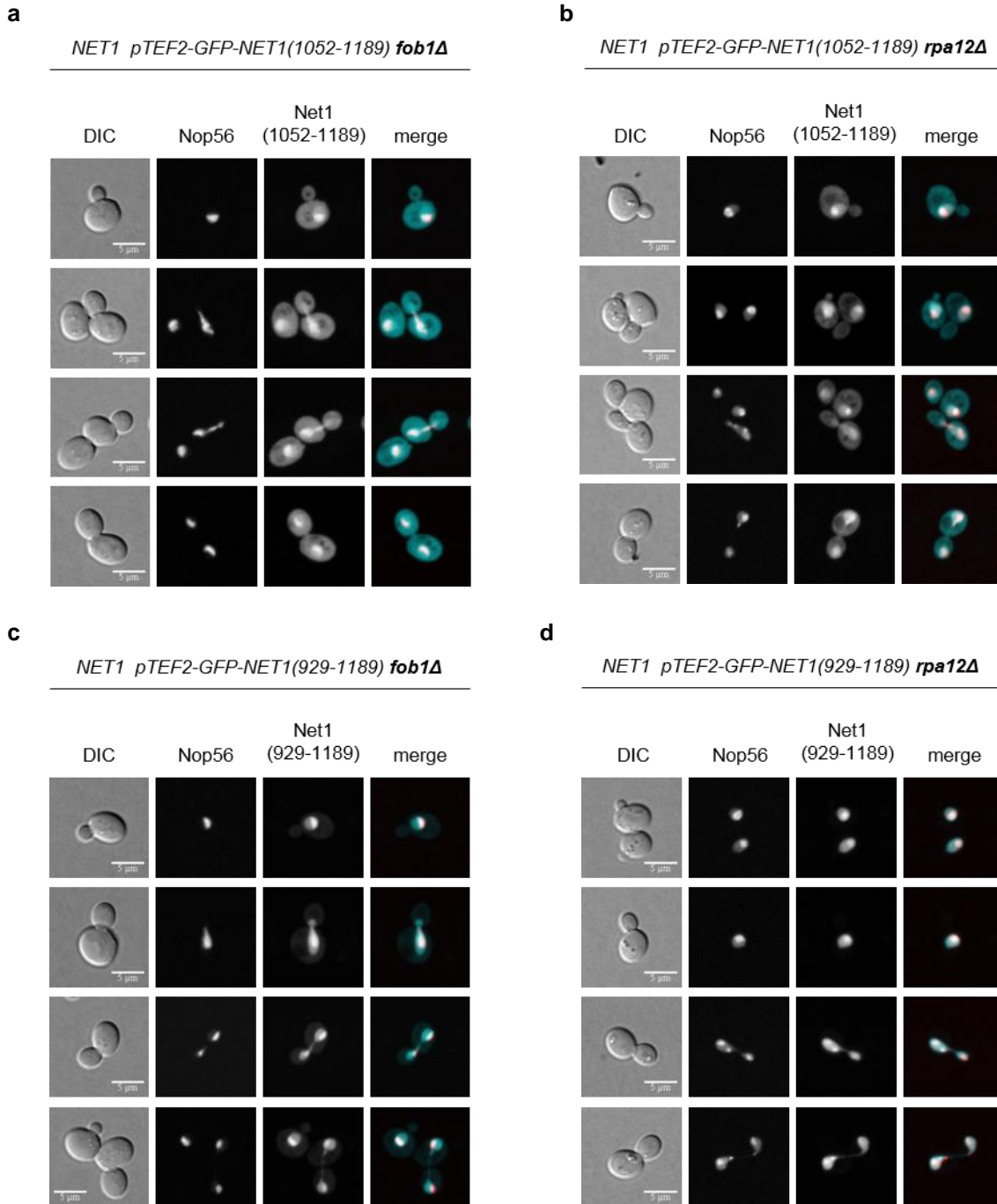


Abb. 4.33: Net1(929-1189) und Net1(1052-1189) lokalisieren unabhängig von *fob1Δ* und *rpa12Δ*

Die Lokalisation der Konstrukte GFP-Net1(929-1189) und GFP-Net1(1052-1189) wurde in Abhängigkeit von Fob1 und Rpa12 untersucht. Hierzu wurden haploide Nachkommen der Stämme **a**, W13067 (*tCYC1/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 FOB1/fob1Δ::kanMX4*), **b**, W13068 (*tCYC1/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 RPA12/rpa12Δ::kanMX4*), **c**, W13070 (*tCYC1/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(929-1189)-tCYC1-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 FOB1/fob1Δ::kanMX4*) und **d**, W13071 (*tCYC1/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 RPA12/rpa12Δ::kanMX4*) ausgewählt, die *fob1Δ* bzw. *rpa12Δ* erben. Die erste Spalte zeigt die Zellmorphologie im Durchlichtkanal (DIC), in der zweiten Spalte ist der nukleoläre Comarker Nop56 gezeigt, Spalte 3 enthält das Net1-GFP-Signal und Spalte 4 zeigt beide Fluoreszenzkanäle überlagert (merge). Der Länge des Maßstabsbalkens beträgt 5 μ m.

4.3.6 Interaktion des kleinsten C-terminalen Fragments mit RNA Polymerase I-Untereinheit

Rpa43

Eine mögliche Erklärung für den gravierenden Wachstumsdefekt C-terminaler Net1-Verkürzungsstämmen ist die Funktion von Net1 als Stimulator der RNA-Polymerase I-Aktivität. Hierfür könnte die C-terminale Region von Net1 wichtig sein, weshalb eine Überexpression der kleinen C-terminalen Fragmente den Wachstumsdefekt von *net1Δ*-Stämmen abmildern bzw. in C-terminalen Net1-Verkürzungsstämmen sogar retten kann. Einem solchen Modell liegt die physische Interaktion zwischen Net1 und der RNA Polymerase I zugrunde (Shou *et al.*, 1999). Um dies zu untersuchen, wurde eine Coimmunpräzipitation von Net1 mit der RNA-Polymerase I-Untereinheit Rpa43 versucht. Da es bei IP-Experimenten mit Polymerase-Untereinheiten zu großen Problemen beim spezifischen Nachweis kam, wurde ein alternativer Aufschlusspuffer mit 350 mM KCl (anstelle der sonst üblichen 150 mM NaCl) verwendet. Bei Präzipitation von Rpa43^{Myc13} ergab sich für Net1(1-1189)^{Flag12} ein detektierbares Signal im α -Flag-Nachweis (s. Abb. 4.34). Zusätzlich zur Bande des Net1-Proteins der vollen Länge konnte auch ein kleineres Fragment copräzipitiert werden, bei dem es sich aufgrund der C-terminalen Fusion des Flag12-Epitops um ein C-terminales Fragment von Net1 handeln sollte.

Die Detektion des degradierten Net1-Fragments als Copräzipitat von Rpa43 lieferte einen Hinweis darauf, dass die C-terminale Region von Net1 für die Interaktion mit der RNA-Polymerase I wichtig sein könnte. Da dieses Degradationsprodukt abzüglich des Flag12-Epitops ca. 16 kDa groß sein dürfte und das kleinste C-terminale Fragment Net1(1052-1189) ca. 14 kDa groß ist, wurde deshalb getestet, ob dieses Fragment mit Rpa43 interagiert. Zwei unabhängige Net1(1052-1189)-Transformanten wurden in der Coimmunpräzipitation mit der RNA Polymerase I-Untereinheit Rpa43 untersucht (s. Abb. 4.35).

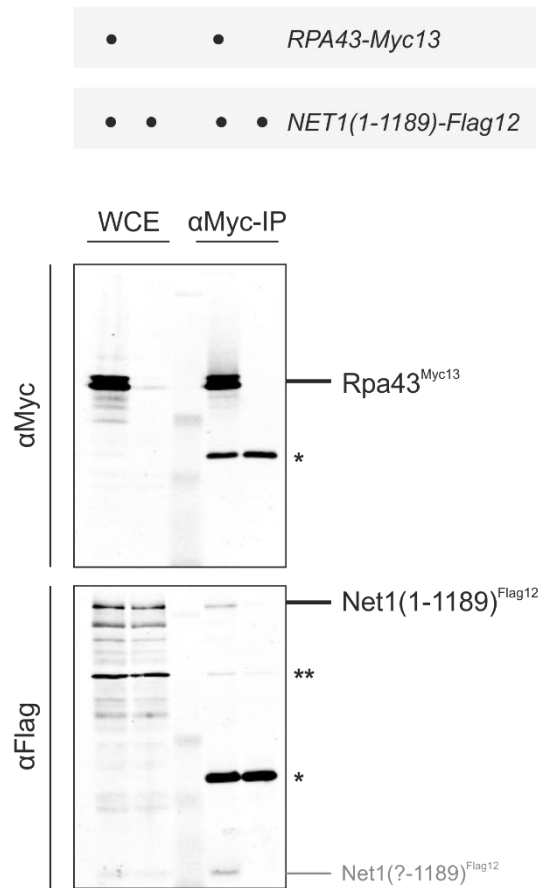


Abb. 4.34: Coimmunpräzipitation von Net1(1-1189) mit der RNA Polymerase I-Untereinheit Rpa43

Die Interaktion von Rpa43^{Myc13} mit Net1(1-1189)^{Flag12} wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Hierzu wurde der Stamm W11408 (*NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 RPA43-Myc13-kanMX6*) ausgewählt. Als Negativkontrolle diente W7178 (*NET1-Flag12-HIS3MX6*). Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysät (WCE) und nach der Präzipitation über Myc-gekoppelte Agarose-Beads mittels α-Myc- und α-Flag-Antikörper im Western Blot analysiert.

Errechnete Proteingrößen

Net1(1-1189)^{Flag12}: 142,7 kDa

Rpa43^{Myc13}: 56,7 kDa

* IgG

** α-Flag-Kreuzreaktion

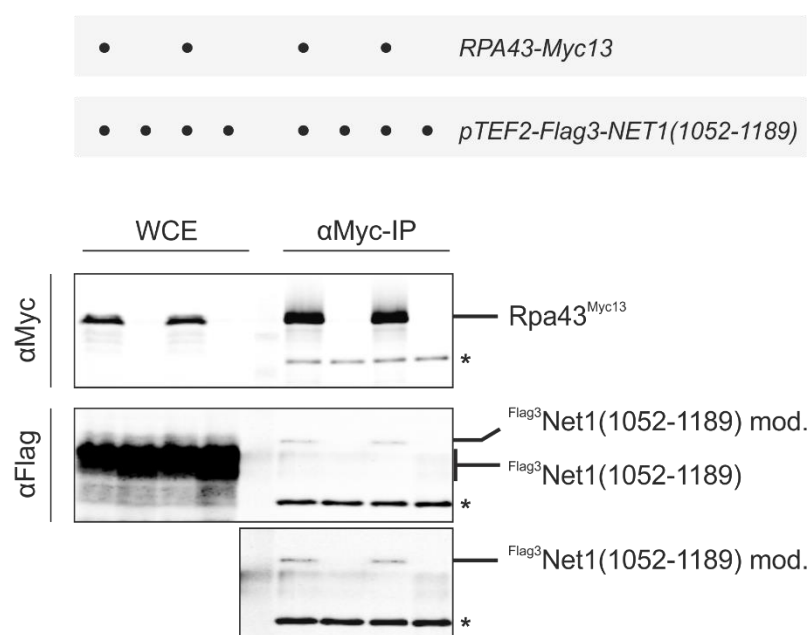


Abb. 4.35: Coimmunpräzipitation von Net1(1052-1189) mit der RNA Polymerase I-Untereinheit Rpa43

Die Interaktion von Rpa43^{Myc13} mit Flag³Net1(1052-1189) wurde mittels Coimmunpräzipitation analysiert. Hierzu wurden die Stämme W12902 und W12903 (*leu2/leu2::pTEF2-Flag3-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2 RPA43/RPA43-Myc13-kanMX6*) ausgewählt. Als Negativkontrolle dienten W13072 und W13073 (*leu2::pTEF2-Flag3-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2*). Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysat (WCE) und nach der Präzipitation über Myc-gekoppelte Agarose-Beads mittels α-Myc- und α-Flag-Antikörper im Western Blot analysiert. Die untere Membran entspricht der rechten Hälfte der in der Mitte gezeigten Membran, eingescannt mit höherer Laserintensität.

Errechnete Proteingrößen

Flag³Net1(1052-1189): 17,4 kDa

Rpa43^{Myc13}: 56,7 kDa

* IgG

Das auffällige Laufverhalten von Flag³Net1(1052-1189) im SDS-Gel deutet auf posttranslationale Modifikationen hin. Interessanterweise copräzipitiert nicht der Großteil von Flag³Net1(1052-1189) mit Rpa43^{Myc13}, sondern nur die im SDS-Gel am höchsten laufende, vermutlich modifizierte Form. Dieser Sachverhalt wurde anschließend näher analysiert.

4.3.7 Charakterisierung der posttranslationalen Modifikation von Net1(1052-1189)

Eine in der Zellzyklusregulation häufig vorkommende, posttranslationale Modifikation von Proteinen stellt die Phosphorylierung dar. Die C-terminale Region von Net1 ist reich an Serin-Resten, Phosphorylierungen an diesen Aminosäuren könnten das auffällige Laufverhalten dieses Fragments im SDS-Gel erklären. Um zu überprüfen, ob es sich bei der Modifikation von Net1(1052-1189) um Phosphorylierung handelt, wurde eine Behandlung mit der λ -Proteinphosphatase (λ -PPase) durchgeführt. Die Aktivität der λ -PPase ist gegen phosphorylierte Serin-, Threonin oder Tyrosin-Reste gerichtet. Aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamid-Gel kann anschließend die phosphorylierte Proteinform von der dephosphorylierten Form unterschieden werden. Flag3 Net1(1052-1189) wurde zunächst mittels Immunpräzipitation angereichert. Das IP-Material wurde aufgeteilt, ein Ansatz diente dabei als Negativkontrolle, drei weitere Ansätze wurden mit steigenden Konzentrationen λ -PPase behandelt (s. Abb. 4.36).

Das deutlich veränderte Laufverhalten nach der Behandlung mit λ -PPase legte nahe, dass es sich bei der posttranslationalen Modifikation von Net1(1052-1189) um Phosphorylierung handelt. Das unbehandelte Fragment lief im SDS-Gel in etwa auf Höhe der 30 kDa-Standardbande. Dies ist in Anbetracht des errechneten Molekulargewichts von 17,4 kDa für dieses Fragment besonders interessant. Nach der Behandlung mit λ -PPase entstanden zwei unterscheidbare Formen, wobei die langsamer laufende Form bei etwa 28 kDa wanderte und die schneller laufende Form sich im Bereich der leichten Kette des Antikörpers (ca. 25 kDa) bewegte.

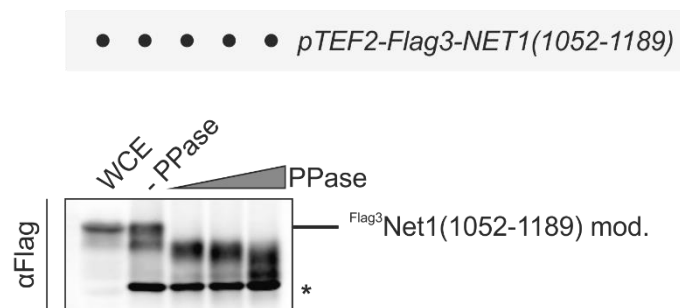


Abb. 4.36: Net1(1052-1189) ändert durch λ -PPase-Behandlung das Laufverhalten im SDS-Gel

Die Modifikation von Flag3 Net1(1052-1189) wurde mittels Immunpräzipitation über Flag-Beads und anschließende Behandlung des IP-Materials mit steigender λ -PPase-Konzentration untersucht. Hierzu wurde der Stamm W13491 (*leu2/leu2::pTEF2-Flag3-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2 ADE2/ade2*) ausgewählt. Das Laufverhalten der resultierenden Proteinformen wurde mittels SDS-PAGE und Nachweis im Western Blot mit α -Flag-Antikörper analysiert.

Errechnete Proteingröße:

Flag3 Net1(1052-1189): 17,4 kDa

* IgG

Da nur die modifizierte Form von Net1(1052-1189) mit der RNA-Polymerase-Untereinheit Rpa43 interagiert, könnte diese Modifikation bei der Regulation der Polymerase-Aktivität eine Rolle spielen. Ein bekannter Signalweg *in vivo* ist in diesem Zusammenhang die TOR (*Target of Rapamycin*) - Signaltransduktionskaskade, mit der die Zellen auf Nährstoffmangel oder Zellstress reagieren können (Loewith und Hall, 2011). Zentraler Bestandteil des Signalwegs sind die beiden Gene *TOR1* und *TOR2*. Verlust der TOR-Funktion (z.B. durch Deletion der *TOR*-Gene) oder Behandlung der Zellen mit Rapamycin führt zum Zellzyklusarrest und Eintritt in einen Ruhezustand, der G0-Phase. Als Folge sinken u.a. die Syntheserate von 5S- und 35S-rRNA sowie die tRNA-Produktion. Dies resultiert in einer Herabregulation der Proteinbiosynthese, wodurch ein Mangel an ribosomalen Proteinen und Prozessierungsfaktoren entsteht, was sich letztlich in einem negativen *feedback loop* auf die Ribosomenbiogenese auswirkt. RNA Polymerase I dissoziiert von der rDNA ab. Ein weiterer Aspekt der TOR-Inhibition durch Rapamycin ist die Fehllokalisation der Polokinase Cdc5, wodurch es über Stabilisierung von Swe5 zur Inaktivierung von Cdc28 kommt. Die Folge ist eine fehlende Phosphorylierung von Net1 und somit eine verzögerte Freisetzung von Cdc14.

TOR wirkt also in vielfältiger Weise auf das Geschehen im Nukleolus. Um nun einen möglichen Einfluss von TOR auf die Interaktion von Rpa43 und Net1 über dessen Modifikation zu untersuchen, wurden wachsende Zellen mit Rapamycin inkubiert und anschließend die Modifikation von Net1 (Laufverhalten im SDS-Gel; s. Abb. 4.37a) und die Interaktion mit Rpa43 mittels Coimmunpräzipitation untersucht (s. Abb. 4.37b).

Das Laufverhalten von ^{Flag3}Net1(1052-1189) zeigte kaum einen Unterschied zwischen dem 0-Wert und der Probe nach 60-minütiger Rapamycin-Behandlung. Die Inhibition des TOR-Signalwegs scheint also keinen oder nur geringen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad des kleinen C-terminalen Fragments zu nehmen. Auch die Fähigkeit zur Interaktion mit der RNA Polymerase I-Untereinheit Rpa43 erscheint unbeeinflusst von der Rapamycin-Behandlung. Die modifizierte Version des C-terminalen Net1-Fragments bindet nach 60-minütiger Rapamycin-Inkubation in ähnlich starker Weise an Rpa43 wie vor der Behandlung. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl die Modifikation als auch die Interaktion mit RNA-Polymerase I nicht durch den TOR-Signalweg beeinflusst und reguliert wird. Ein anderer möglicher Schluss ist, dass nicht die Phosphorylierung, sondern eine andere Art der Modifikation, den ausschlaggebenden Faktor für die Interaktion von Net1 und Rpa43 darstellt. Eine hierfür in Frage kommende Modifikation stellt die Methylierung dar. Methylierung findet überwiegend an Lysin-Resten statt. Die C-terminale Region von Net1 weist einige *patches* von aufeinander folgenden Lysinen auf. Zudem konnte in Y2H-Screens von Adelheid Weissgerber gezeigt werden, dass das C-terminale Net1-Fragment mit Rkm1, einer Methyltransferase, interagiert. Diese Interaktion war stark nachweisbar und konnte mehrfach reproduziert werden. Eine weitere Charakterisierung dieser Interaktion müsste mittels Coimmunpräzipitation und weitergehenden Experimenten erfolgen.

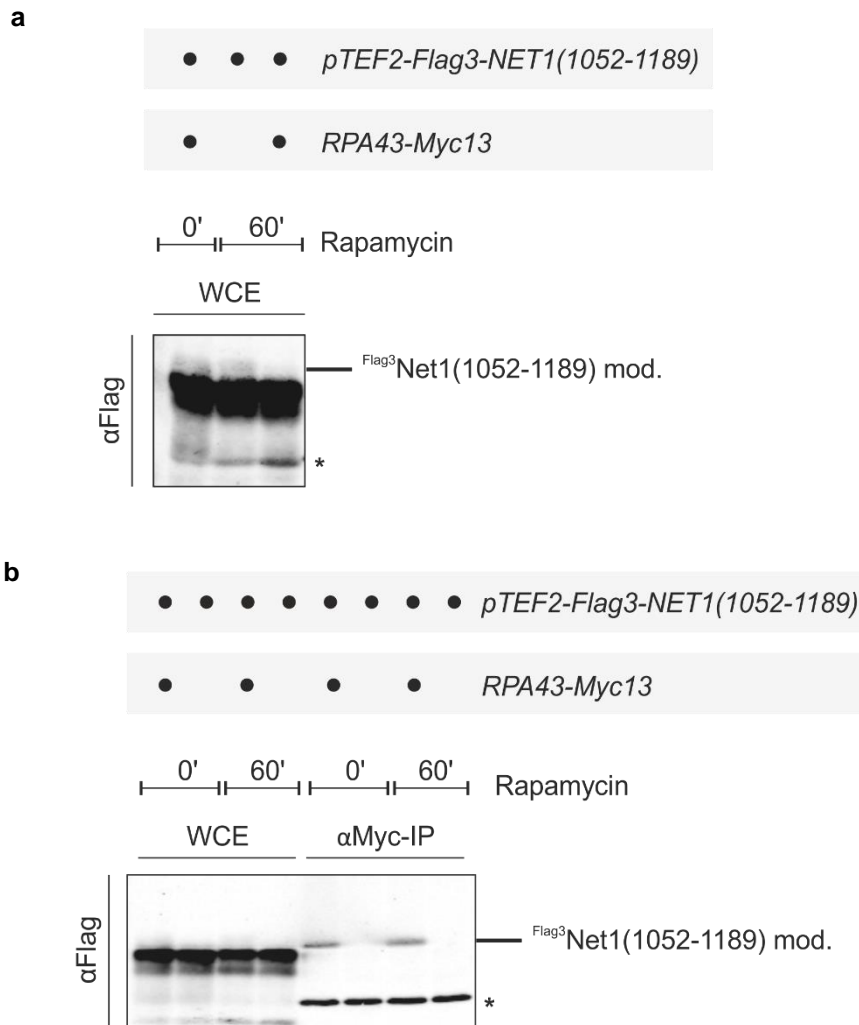


Abb. 4.37: Coimmunpräzipitation von Net1(1052-1189) mit Rpa43 nach Rapamycin-Behandlung

Die Interaktion von Rpa43^{Myc13} mit Flag³Net1(1052-1189) wurde nach 60-minütiger Inkubation mit Rapamycin mittels Coimmunpräzipitation untersucht. Hierzu wurde der Stamm W12903 (*leu2/leu2::pTEF2-Flag3-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2 RPA43/RPA43-Myc13-kanMX6*) ausgewählt. Als Negativkontrolle diente W13491 (*leu2/leu2::pTEF2-Flag3-NET1(1052-1189)-tCYC1-LEU2 ADE2/ade2*).

a, Laufverhalten von Flag³Net1(1052-1189) im SDS-Gel nach 0 min und 60 min Rapamycin-Inkubation

b, Coimmunpräzipitation mit Rpa43^{Myc13}. Die Proteinmengen wurden im Gesamtlysats (WCE) und nach der Präzipitation über Myc-gekoppelte Agarose-Beads mittels α -Flag-Antikörper im Western Blot analysiert.

Errechnete Proteingrößen:

Flag³Net1(1052-1189): 17,4 kDa

Rpa43^{Myc13}: 56,7 kDa

* IgG

5. DISKUSSION

Die erhaltenen Erkenntnisse können schematisch zusammengefasst werden (s. Abb. 5.1). Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Region von Net1 hinreichend für Nukleoluslokalisation ist. Das kleine N-terminale Fragment Net1(1-147) zeigt noch partielle Lokalisation im Nukleolus (vgl. 4.5b). Zusätzlich befinden sich in der N-terminalen Region Sequenzen für Selbstinteraktion und DNA-Bindung: Ein Fragment Net1(1-196) zeigt im Fluoreszenzmikroskop eine Tendenz zur Aggregatbildung in Abhängigkeit der Proteinmenge (vgl. Abb. 4.11). Das Protein der vollen Länge wies bei Analysen mittels Coimmunpräzipitation Selbstinteraktion auf (vgl. Abb. 4.6). Für die DNA-Bindung wird ebenfalls die N-terminale Region benötigt. Das Fragment Net1(1-233) war in der Lage DNA und RNA zu binden (vgl. Abb. 4.18a/e; Abb. 4.19a), während das Fragment Net1(234-455) diesen Effekt nicht zeigte (vgl. Abb. 4.18b/f; 4.19b).

Coimmunpräzipitation von Net1-Fragmenten mit Cdc14 zeigten, dass das *pfam10407*-Motiv nicht notwendig für Cdc14-Bindung ist (vgl. Abb. 4.22). Hierfür ist die Region im Bereich der Aminosäuren 234-455 hinreichend (vgl. Abb. 4.23). Dieses Fragment ist zudem hinreichend, um die Phosphatase-Aktivität von Cdc14 zu inhibieren (vgl. Abb. 4.24b-d).

Zusätzlich zu seiner Cdc14-regulierenden Funktion übernimmt Net1 eine wichtige Aufgabe bei der Unterstützung des Wachstums. So führen Manipulationen an der C-terminalen Region von Net1 zu einem gravierenden Wachstumsdefekt. Bereits das Fehlen der letzten 138 Aminosäuren bewirkt diesen Effekt (vgl. Abb. 4.28 und 4.29). Umgekehrt kann die Expression dieses kleinen, C-terminalen Fragments den Wachstumsdefekt von *NET1(1-233)*- und *net1Δ*-Stämmen abmildern (vgl. Abb. 4.30a, Abb. 4.30b). Eine vollständige Suppression tritt auf, wenn zusätzlich die Cdc14-Regulation durch Expression eines Net1-Fragments mit intakter N-terminaler Region gewährleistet ist (vgl. Abb. 4.31a). Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist möglicherweise die Interaktion von Net1 mit der RNA-Polymerase I (vgl. Abb. 4.34). Diese Interaktion wird über den C-terminalen Bereich der letzten 138 Aminosäuren vermittelt, wobei vor allem die modifizierte Variante mit der RNA-Polymerase I-Untereinheit Rpa43 interagiert (vgl. Abb. 4.35 und 4.37). Die Modifikation des C-terminalen Fragments Net1(1052-1189) besteht dabei zu großen Teilen aus Phosphorylierung (vgl. Abb. 4.36).

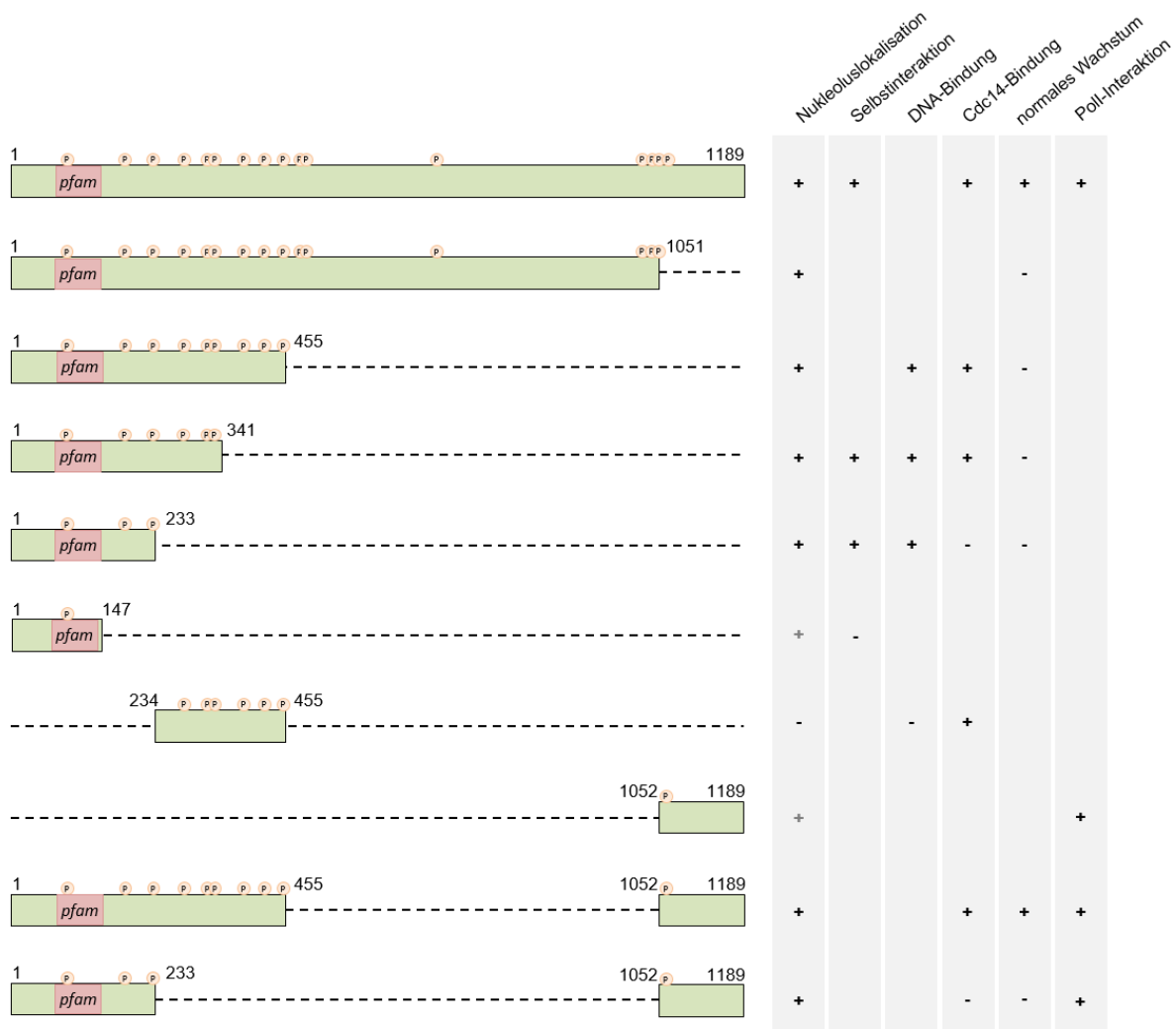


Abb. 5.1: Zusammenfassende, schematische Darstellung einiger wichtiger Ergebnisse

Ausgewählte Konstrukte und die in diesem Zusammenhang erhaltenen Erkenntnisse sind schematisch dargestellt. Die Konstrukte Net1(1-1189), Net1(1-1051), Net1(1-455), Net1(1-341), Net1(1-233), Net1(234-455) und Net1(1052-1189) wurden ausgewählt und hinsichtlich der Kategorien Nukleoluslokalisation, Selbstinteraktionsfähigkeit, DNA-Bindung sowie Cdc14-Bindung und -Inhibition betrachtet. Zusätzlich wurde das Zellwachstum untersucht sowie die Interaktion mit der RNA-Polymerase I-Untereinheit Rpa43. Ebenfalls untersucht wurde die Kombination der Konstrukte Net1(1-455) bzw. Net1(1-233) mit dem C-terminalen Fragment Net1(1052-1189). Experimentelle Befunde sind **fett** gedruckt. Die partielle Lokalisation von Net1(1-147) und Net1(1052-1189) im Nukleolus ist **grau** markiert.

5.1 Die Rolle des *pfam10407*-Motivs

Die N-terminalen Bereiche von Net1, dem Net1-Orthologen aus der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*, Dnt1, und dem Net1-verwandten Protein Tof2 sowie eine Reihe anderer Net1-ähnlicher Proteine aus verwandten Hefen (*Saccharomyces arboricola*, *Candida glabrata*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossipii*) enthalten eine konservierte Sequenz von etwa 64 Aminosäuren (vgl. Anhang 9.1). Diesen Proteinen ist eine Fähigkeit gemeinsam: Alle sind in der Lage Cdc14 (bzw. das entsprechende Orthologe) zu binden. Net1 und Dnt1 inhibieren dabei die Phosphatase-Aktivität, während Tof2 als Aktivator der Phosphatase im Nukleolus wirkt (Geil *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Gemeinsamkeit wurde vermutet, dass es sich bei der konservierten Sequenz um einen Bereich handeln könnte, der für die Funktion der Cdc14-Bindung und Regulation wichtig ist. Desweiteren werden die Proteine für das rDNA-Silencing und beim Cytokinese-Checkpoint benötigt. Der Aminosäurebereich wurde als *pfam10407*-Motiv in die NCBI-Datenbank für konservierte Protein-Domänen unter dem Schlagwort „*Cdc14 phosphatase binding protein N-terminus*“ aufgenommen (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

5.1.1 Das *pfam10407*-Motiv ist nicht notwendig für Cdc14-Bindung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten nun, dass die Region des *pfam10407*-Motivs im Bereich der Aminosäuren 69-143 des Net1-Proteins nicht benötigt wird, um eine Bindung an die Phosphatase Cdc14 zu gewährleisten. Eine verkürzte Version von Net1, die nur die ersten 233 Aminosäuren beinhaltet, zeigte trotz Anwesenheit des *pfam10407*-Motivs keine Interaktion mit Cdc14 (vgl. 4.2.1, Abb. 4.22). Das Fragment Net1(234-455) hingegen, in dem die Sequenz des *pfam10407*-Motivs nicht enthalten ist, war dazu in ähnlichem Ausmaß in der Lage wie das Fragment Net1(1-455), welches die vollständige, N-terminale Region enthält. Für die Bindung von Net1 an Cdc14 ist das *pfam10407*-Motiv also nicht notwendig. Diese Erkenntnis ist umso überraschender, da diese Region allen Cdc14-bindenden Orthologen innerhalb der Ascomyceten gemeinsam ist. Daraus ließe sich die Vermutung ableiten, dass es sich bei der konservierten Sequenz um die Bindestelle für die zu inhibierende Phosphatase handelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass dies nicht der Fall ist. Anhaltspunkte für die Frage, welche Funktion dieser Region stattdessen zukommt, sollen im weiteren Verlauf dargestellt werden.

5.1.2 Kernlokalisierung und NLS

Betrachtet man die in dieser Arbeit hergestellten Net1-Konstrukte näher, so stellt man fest, dass für eine korrekte subzelluläre Lokalisation von Net1 die intakte, N-terminale Region unverzichtbar ist. Alle untersuchten, C-terminal verkürzten Net1-Konstrukte lokalisierten exklusiv im Nukleolus, lediglich bei Net1(1-147) zeigte sich neben der Nukleoluslokalisierung ein leichter Hintergrund im Cytoplasma (vgl. 4.1.2, Abb. 4.5). Experimente im Labor haben gezeigt, dass im Gegensatz dazu Konstrukte, die eine N-terminale Epitopmarkierung enthalten, nicht mehr exklusiv im Nukleolus lokalisieren, sondern im Kern verteilt sind und nur eine leichte Anreicherung im Nukleolus zeigen. Jenes Konstrukt Net1(234-455), welches in der Lage war Cdc14 zu binden, zeigt sich in Lokalisationsstudien über die komplette Zelle verteilt, wobei keine Anreicherung im Zellkern oder Nukleolus festzustellen ist (vgl. 9.2.3). In der N-terminale Region von Net1 befinden sich also offenbar Sequenzen, die notwendig für die korrekte Lokalisation von Net1 im Nukleolus sind.

Betrachtet man ein Alignment der beiden verwandten Proteine Net1 und Tof2 aus *S. cerevisiae* näher, so zeigt sich die große Ähnlichkeit der N-Termini beider Proteine mit 30% identischen und 53% ähnlichen Aminosäuren. Neben dem bereits erwähnten *pfam10407*-Motiv im Bereich der Aminosäuren 69-143 befinden sich weitere, hoch übereinstimmende Sequenz im extremen N-terminalen Bereich von Net1 zwischen den Aminosäuren 1-12 und hinter dem *pfam10407*-Motiv zwischen den Aminosäuren 209-214 (s. Abb. 5.2).

Net1	1	MYKLQVVLVPPS-----LQATMPIQFGYGPTIAESSQLLPNRTNMAQSAGDASLQYAN	53
		M++LQ+VLVPPS L+A + P + + ++ + ++ + + ++	
Tof2	4	MWRLQIVLVPPSAQDIITFLEARLNTTPQSVSPMVQYNEDIITHNNSINNCSDPSPSPSS	63
Net1	54	LRSANVSFTPSYFNQ-SRFRKFLFLFTKPTNTLLNLSDEIIDKCEKMYPSLQEDIEILSLQ	112
		S + + + N S +KFL FT NTLL LS+EI+ K +++YP+ +E IEI+SLQ	
Tof2	64	QNSIQSNRSSDFINYL SNCKKFLHFTDGDNTLLQLSNEILTKFDRLYPNFKESIEIVSLQ	123
Net1	113	DNSGCDLDPDFLVKDVFNVNIVRVILKNEIDLDDAPVSLYKSVKRSKLNNGSP--QSV	170
		D GCDLD +F++KDVF + +V VILK+E+D + +SL + ++ + + P +S+	
Tof2	124	DRHGCDLDSEFIKDVFEVDGVVLVILKDELDWSRNQHISLLQLARQRRRQDNKPSTKSI	183
Net1	171	QPQQQIPSSSGVLRIAKKRPTGTTTTTTIRSATNGSMRVSTPLARQIYP	220
		+++ S L + +++++ RVSTPL +I P	
Tof2	184	VTEKRKKISKEDLSSIPNPKDTMHLIAKSSLKNNFINKSRVSTPLMNEILP	233

Abb. 5.2: Alignment der N-Termini von Net1 (AS 1-220) und Tof2 (AS 4-233)

Die ersten 233 Aminosäuren des Net1-Proteins wurden als Query-Sequenz für ein Alignment über das Tool BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benutzt. Die Abbildung zeigt das Alignment mit Tof2, hochkonservierte Bereiche sind grün unterlegt, die resultierende Consensus-Sequenz ist hellgrün markiert.

Da Tof2 ebenso wie Net1 exklusiv im Nukleolus lokalisiert, könnten diese konservierten Sequenzen auch hier zur Lokalisation benötigt werden. Nukleoluslokalisierung ist laut Consens in der Literatur (Emmott und Hiscox, 2009) das Resultat eines Zusammenspiels von Kernlokalisierung über eine oder

mehrere Kernlokalisationssequenzen (NLS) und Interaktion mit der rDNA. Letzteres kann dabei direkt über Sequenz-spezifische Bindung an die DNA oder indirekt über eine Proteinwechselwirkung mit einem rDNA-bindenden Protein stattfinden. Auch eine Erkennung von RNA-Transkripten oder RNA-Prozessierungsfaktoren wäre denkbar. Im Falle von Net1 und Tof2 deuten die Lokalisationsdaten aufgrund ihrer sehr feinen und eng begrenzten Struktur auf eine sehr nahe Assoziation mit der rDNA hin. Faktoren, die an das RNA-Transkript binden, lokalisieren in der Regel etwas breiter verteilt und weisen eine homogenere Konsistenz auf (s. z.B. Nop56). Der N-terminale Bereich von Net1 weist bei bioinformatischer Untersuchung (vgl. 4.1, Abb. 4.1) zwei NLS auf, wobei sich eine der beiden Sequenzen (70- RFRKFLLFTKPTNTLLNLSDEIIDKCEKMY -99) am Beginn des konservierten *pfam10704*-Motivs befindet. Beide NLS werden mit Scores von 4.1 bzw. 5.0 (auf einer Skala von 1 bis 10) geführt, was nicht für eine exklusive Lokalisation im Kern sondern für eine zusätzliche, teilweise Lokalisation im Cytoplasma stehen würde (Kosugi *et al.*, 2009). Net1 wies bei intakter, N-terminaler Region in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen keine Signalanteile im Cytoplasma auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Protein effektiv in den Zellkern transportiert werden und dort mit hoher Affinität sein Ziel im Nukleolus binden kann (vgl. 4.1.2, Abb. 4.4). Erst bei einer Verkürzung auf 147 Aminosäuren konnte eine Beeinträchtigung der Lokalisation festgestellt werden. Zwar wurde der Nukleolus immer noch scharf abgebildet, die Signalintensität war trotz vergleichbarer Proteinmenge jedoch geringer als bei längeren Konstrukten. Ein Teil des Signals konnte im Cytoplasma nachgewiesen werden (vgl. 4.1.3, Abb. 4.5). Diesem Konstrukt fehlt eine der beiden vorhergesagten NLS (AS 153-163, monopartit, Score 4.1), die zweite NLS innerhalb des *pfam10407*-Motivs ist vorhanden, könnte jedoch durch die Manipulation beeinträchtigt sein (Proteinfehlfaltung und/oder sterische Behinderung durch die GFP-Fusion). Ob es sich vor allem bei der Sequenz innerhalb des *pfam10407*-Motivs also tatsächlich um eine funktionale NLS handelt, müsste weiter experimentell untersucht werden.

5.1.3 DNA-Bindung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Region von Net1 die zweite wichtige Bedingung für nukleoläre Lokalisation, die Interaktion mit der rDNA, erfüllt. Net1(1-233) ist in der Lage direkt an Sequenzen der rDNA zu binden. Dies gilt in ähnlicher Weise auch für die N-terminale Region von Tof2 (Edmaier, 2015). Die intakte, N-terminale Region war hierbei notwendig für die Bindung von Net1 an die angebotenen DNA-Fragmente, das Fragment Net1(234-455) zeigte keine Bindung an die DNA. Die DNA-Bindung erfolgte sequenzunabhängig, da sowohl ein DNA-Fragment aus der NTS1-Region als auch eines aus der codierenden Region in gleichem Maße gebunden wurden (vgl. 4.1.6, Abb. 4.18). Zusätzlich zeigte Net1(1-233) auch eine gewisse Affinität für RNA, wobei jedoch bei gleichzeitigem Angebot von tRNA und DNA die DNA bevorzugt wurde (vgl. 4.1.6, Abb. 4.19 und 4.20). In weiteren Experimenten müsste diese Erkenntnis nun genauer charakterisiert werden.

Beispielsweise bleibt zu klären, welche Subregion in der N-terminalen Region von Net1 genau für die DNA-Bindung nötig ist. Da das *pfam10407*-Motiv eine konservierte Sequenz in den N-Termini von Net1 und Tof2 darstellt und beide Proteine ihre Fähigkeit zur DNA-Bindung unter Beweis gestellt haben, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem *pfam10407*-Motiv möglicherweise um eine DNA-Bindedomäne handeln könnte. Da über Sequenzvergleiche der N-terminalen Regionen von Net1 und Tof2 mit bekannten DNA-Bindeproteinen keine Ähnlichkeit zu einem der bisher bekannten DNA-Bindemotive wie Leucin-Zipper, Zink-Finger oder Helix-Turn-Helix-Motiv nachgewiesen werden konnte, handelt es sich bei dem *pfam10407*-Motiv möglicherweise um eine neuartige DNA-Bindedomäne. Weitere Aufschlüsse würde hier auch eine Aufklärung der Proteinstruktur der N-terminalen Region von Net1 liefern. Mittels röntgenkristallographischer Untersuchungen eines kleinen N-terminalen Fragments mit gebundener DNA könnte die verantwortliche Domäne in Net1 aufgeklärt werden.

5.1.4 Net1-Selbstinteraktion

Eine interessante Strukturähnlichkeit fällt auf, wenn man die N-terminale Region von Net1 mit dem Sekundärstruktur-Analyseprogramm HHpred untersucht (Söding, 2005). HHpred analysiert anhand von multiplen Sequenzalignments über das Hidden Markov-Modell die Ähnlichkeit von Sekundärstrukturen. Auf diese Weise treten oft funktionale Ähnlichkeiten von Proteinbereichen oder Domänen zu Tage, die sich nicht direkt in der Aminosäureabfolge widerspiegeln und somit über Analysetools wie BLAST, die sich nur auf Ähnlichkeiten in der Primärstruktur beziehen, nicht festgestellt werden können. HHpred sagt für den Bereich Net1(80-142) eine strukturelle Ähnlichkeit zu Par-3 vorher. Par-3 ist Bestandteil des eukaryotischen Par-3/Par-6-Kinase-Komplexes und stellt ein multimodulares Scaffold-Protein dar, das an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt ist (Zhang *et al.*, 2013). Die N-terminale Domäne von Par-3 zeigt die Fähigkeit zur Selbstinteraktion und Ausbildung Filament-artiger Strukturen. Die Interaktion der Par-3-N-Termini findet dabei über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Vorder- bzw. Rückseite zweier N-terminaler Bereiche statt. Zwei basische Bereiche (B1 und B2) stellen dabei die Vorderseite der Interaktionsfläche dar, die Rückseite besteht aus zwei sauren Bereichen (A1 und A2) (s. Abb. 5.3). Vor allem die Interaktionsfläche A2/B2 (in Par-3 bestehend aus den Aminosäuren R33/K36 einerseits und D60/D62/D63 andererseits, findet sich in Net1 in großer Ähnlichkeit hinsichtlich Aminosäurekonfiguration und Abstand der Aminosäuren zueinander wieder (R33/K36 entspricht K94/K97 und D62/D63 entspricht D120/D122; D63 hingegen würde F123 in Net1 entsprechen). Die etwas komplexer aufgebaute, zweite Interaktionsfläche ist in Net1 etwas schwerer zu identifizieren. Hier finden sich nur zwei Aminosäuren in identischer Weise wieder, einige weitere weisen physikalische Ähnlichkeiten auf (L59/V68 entspricht L119/V128, D70/K72 ähnelt N130/N132 in Net1). Mit einiger Wahrscheinlichkeit lässt sich die Net1-

Selbstinteraktionsfähigkeit auf diese elektrostatischen Wechselwirkungen zurückführen. Punktmutationen innerhalb der Interaktionsflächen sollten demnach zu einer Verminderung oder Auflösung der Net1-Selbstinteraktion führen, was sich negativ auf die Aggregatbildung der kleinen Net1-Fragmente in der Fluoreszenzmikroskopie auswirken sollte. Auch das Laufverhalten im EMSA sollte dadurch beeinflusst sein, da es nicht mehr zu den extrem hochmolekularen Verbindungen kommen sollte und somit die gebundenen DNA-Fragmente in das Agarosegel eintreten können sollten.

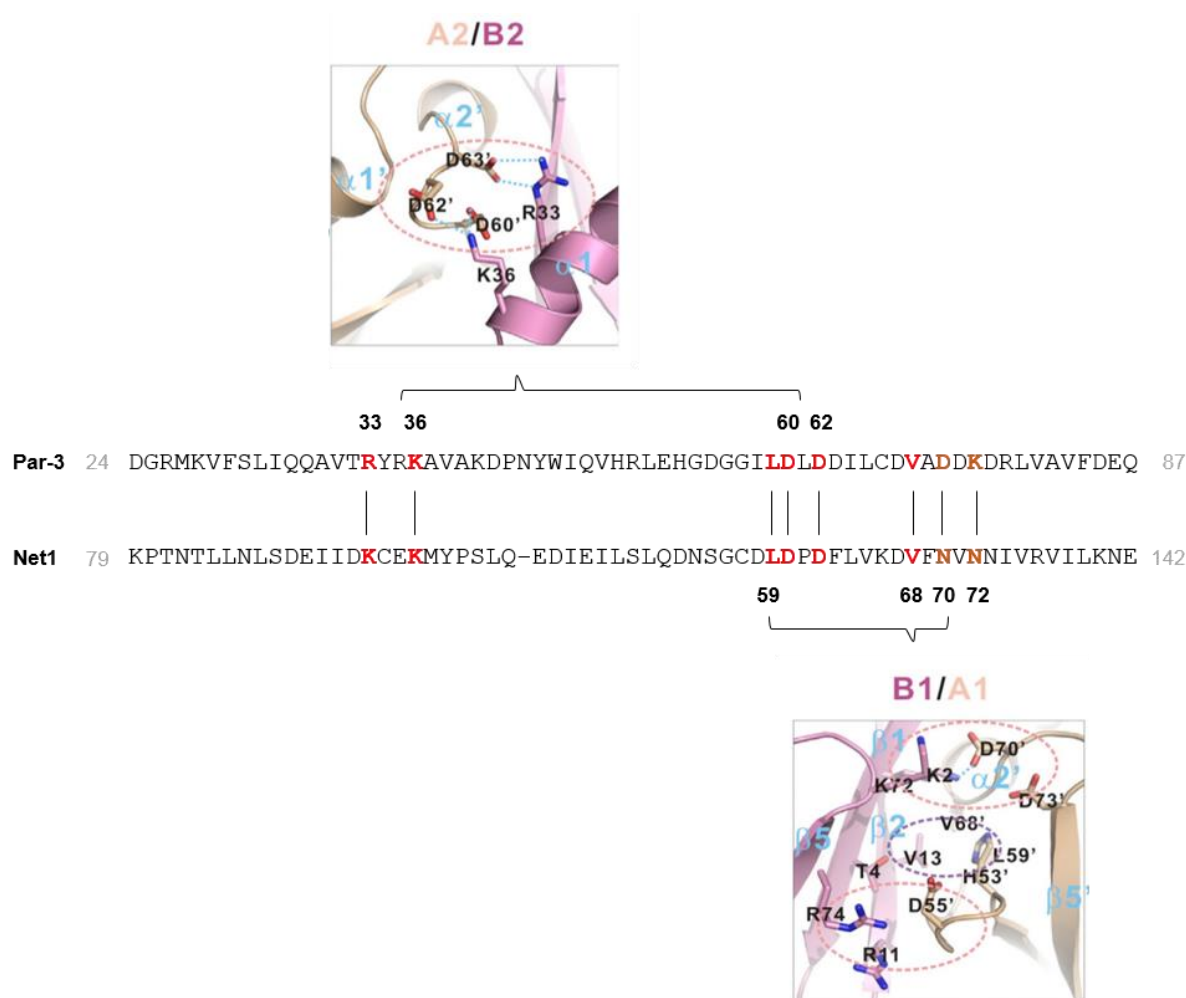


Abb. 5.3: Strukturähnlichkeit der N-Termini von Net1 und Par-3

Schematische Darstellung der beiden Interaktionsflächen A2/B2 und B1/A1 und deren Ähnlichkeit in Par-3 und Net1. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die entsprechenden Aminosäuren in Par-3. Die Interaktionsfläche A2/B2 setzt sich aus den Aminosäuren R33, K36, D60, D62 und D63 zusammen. Diese finden sich fast identisch in Net1 wieder (K94, K97, D120, D122). Die zweite Interaktionsfläche B1/A1 ist komplexer aufgebaut und findet sich in Net1 nicht vollständig wieder. Sehr ähnlich sind hierbei die Aminosäuren L59, V68, D70 und K72, die als L119, V128, N130 und N132 in Net1 vorhanden sind.

Abbildung verändert nach Zhang *et al.*, 2013

Das Sequenzalignement wurde erstellt mit HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>).

Eine interessante Interpretation eröffnet sich durch die Möglichkeit, dass Net1 als eine Art *hub protein* des Nukleolus fungieren könnte (Emmott und Hiscox, 2009). *Hub*-Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl mit Proteinen als auch mit Nukleinsäuren komplexe Interaktionen eingehen und so als Bausteine fungieren, über die die nukleoläre Struktur aufgebaut wird. Das große Net1-Protein wäre für eine solche Rolle prädestiniert, da es eine große Fläche für Interaktionspartner zur Verfügung stellt. Durch die in dieser Arbeit gezeigte Nukleinsäure-Bindefähigkeit wäre ein weiterer Aspekt gegeben. Diese Interpretation stünde in Zusammenhang mit der Beschreibung von Net1 als wichtiger Strukturkomponente des Nukleolus (Shou *et al.*, 1999). Bei einem Fehlen von Net1 kommt es zu keiner geordneten Ausbildung der Nukleolusstruktur und entscheidende Faktoren wie RNA-Polymerase I und viele rRNA-Prozessierungsfaktoren (z.B. Nop1) lokalisieren nicht mehr korrekt.

5.2 Cdc14-Bindung und Zellzyklusregulation

Zellen, deren Cdc14-Funktion gestört ist, arretieren in der späten Anaphase mit hoher CDK-Aktivität (Visintin *et al.*, 1998). Cdc14 ist u.a. dafür zuständig die mitotischen CDKs zu inaktivieren, indem es die von den mitotischen CDKs katalysierten Phosphorylierungsereignisse rückgängig macht (Weiss, 2012). Die Regulation des Zellzyklus erfolgt also in einem Wechselspiel zwischen den Aktivitäten der CDKs und den entgegenwirkenden Phosphatasen (Uhlmann, 2011). Cdc14 dephosphoryliert eine Vielzahl von Substraten, darunter beispielsweise Cdh1, welches dadurch aktiv werden und den APC/C binden kann. Auch Sic1 und sein Transkriptionsfaktor Swi5 stellen Cdc14-Substrate dar. Dephosphorylierung von Sic1 führt zur Stabilisierung dieses CDK-Inhibitors und somit zu seiner Akkumulation. Nach der Dephosphorylierung von Swi5 gelangt dieses in den Kern und forciert u.a. die *SIC1*-Transkription. Weitere Cdc14-Zielproteine sind Clb-CDK-Substrate sowie Substrate der Polokinase Cdc5 und der Aurora B-Kinase Ipl1 (Wurzenberger und Gerlich, 2011). Die umfassende Umkehrung der mitotischen Phosphorylierungsereignisse sorgt für einen raschen Austritt aus der Mitose (Amon, 2008).

5.2.1 Net1(234-455) ist hinreichend und notwendig für die Bindung und Inhibition von Cdc14

Um zu gewährleisten, dass Cdc14 erst zum richtigen Zeitpunkt in der Anaphase aktiv werden und den Austritt aus der Mitose einleiten kann, wird es während des übrigen Zellteilungszyklus über seinen kompetitiven Inhibitor Net1 gebunden und im Nukleolus inaktiv gehalten (Shou *et al.*, 1999). In vorhergegangenen Studien wurde dabei die benötigte Region innerhalb von Net1 zunächst auf den N-terminalen Bereich der ersten 600 Aminosäuren eingegrenzt (Traverso *et al.*, 2001). Net1(1-600) stellt einen kompetitiven Inhibitor der Cdc14-Aktivität mit einer K_i von 3 nM dar. Durch

Kompetitionsanalysen mit Natriumwolframat, das nachweislich an die aktiven Zentren von Phosphatasen bindet, konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Natriumwolframat konzentrationsabhängig eine Bindung von Net1(1-600) verhindert. Daraus konnte geschlossen werden, dass Net1(1-600) am aktiven Zentrum von Cdc14 bindet (Traverso *et al.*, 2001). Bei der Analyse von Net1-Verkürzungen wurde von Traverso *et al.* (2001) festgestellt, dass das kleinste getestete Fragment Net1(1-341) die benötigten Sequenzen zur Bindung und Inhibition von Cdc14 enthielt. Obwohl Net1(1-341) in der Lage war Cdc14 zu binden und zu inhibieren, wurde eine etwas geringere Affinität von Net1(1-341) gegenüber Cdc14 festgestellt als bei Net1(1-600).

In dieser Arbeit wurde nun versucht genauer auf die Interaktion zwischen Net1 und Cdc14 einzugehen und möglicherweise die für die Interaktion benötigte Region innerhalb von Net1 weiter einzugrenzen. Zunächst konnte in Immunpräzipitationsstudien mit N-terminalen Net1-Fragmenten bestätigt werden, dass Net1(1-341) in der Lage ist Cdc14 zu binden. Überraschenderweise trat jedoch beim Vergleich zwischen Net1(1-341) und dem etwas längeren Fragment Net1(1-455) ein deutlicher Unterschied in der Menge des präzipitierten Cdc14 zu Tage (vgl. 4.2.1, Abb. 4.21). Net1(1-341) präzipitierte deutlich weniger Cdc14 als Net1(1-455), was darauf hindeutete, dass Net1(1-341) nicht -wie bisher angenommen- alle notwendigen Sequenzen zur Bindung von Cdc14 beinhaltet. Ein noch kürzeres Net1-Fragment der ersten 233 Aminosäuren zeigte kaum Bindung an Cdc14 (vgl. 4.2.1, Abb. 4.22). In Kombination legte dies den Schluss nahe, dass die für die Cdc14-Bindung notwendigen Sequenzen im Bereich der Aminosäuren 234-455 liegen müssen. Diese Vermutung konnte durch Analyse des Fragments Net1(234-455) in Immunpräzipitationsstudien mit Cdc14 bestätigt werden. Net1(234-455) konnte in ähnlichem Ausmaß an Cdc14 binden wie das vollständige, N-terminale Fragment Net1(1-455) (vgl. 4.2.1, Abb. 4.23). Dieses Ergebnis modifiziert die Daten von Traverso *et al.* (2001) dahingehend, dass Net1(1-341) zwar einen Teil der für die Cdc14-Bindung benötigten Sequenzen enthält, sich jedoch hinter Aminosäure 341 noch weitere wichtige Sequenzen befinden, die für die vollständige Bindung von Cdc14 notwendig sind. Die intakte, N-terminale Region wird für diese Interaktion nicht benötigt, was insofern überraschend war, als dass gerade der N-terminale Bereich bzw. das darin enthaltene *pfam10407*-Motiv bisher als Cdc14-Bindungsdomäne vermutet wurde.

5.2.2 Net1(234-455) wirkt als Inhibitor der Phosphatase-Aktivität von Cdc14

Um die Phosphatase-Aktivität von Cdc14 *in vitro* zu bestimmen, wurde als Substrat *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) verwendet (Taylor *et al.*, 1997). Wurden N-terminale Fragmente von Net1 zusätzlich in den Test eingesetzt, nahm die Cdc14-Aktivität gegenüber pNPP ab, die Net1-Fragmente wirkten also inhibitorisch auf die Cdc14-Phosphatase-Aktivität. Dies liegt in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten (Shou *et al.*, 1999, Traverso *et al.*, 2001, Geil *et al.*, 2008). Eine neue Erkenntnis konnte dahingehend gewonnen werden, dass nicht wie bisher vermutet die

extreme, N-terminale Region mit dem konservierten *pfam10407*-Motiv für diese inhibitorische Funktion benötigt wird, sondern ein Fragment Net1(234-455) hinreichend für diese Inhibition ist (vgl. 4.2.2, Abb. 4.24). Das N-terminale Fragment Net1(1-233), das die vollständige *pfam10407* enthält, wirkte erst bei höheren, eingesetzten Mengen als schwacher Inhibitor der Cdc14-Aktivität, was darauf hindeuten könnte, dass zwar Sequenzen innerhalb dieses Fragments zur Inhibition beitragen, die Mehrheit der benötigten Sequenzen jedoch im Fragment Net1(234-455) liegt. Das Fragment Net1(1-341), welches bisher als dasjenige Fragment charakterisiert wurde, das noch vollständig in der Lage ist Cdc14 zu inhibieren (Traverso *et al.*, 2001), zeigte in diesen Tests eine Inhibitionsfähigkeit, die dem Niveau von Net1(234-455) entsprach. Beide Fragmente blieben hinter der Inhibitionsfähigkeit von Net1(1-455) zurück. Dieses Verhalten würde die Theorie unterstützen, dass für die volle Inhibitionsfähigkeit von Net1 auch Sequenzen aus dem vorderen, N-terminalen Bereich benötigt werden. Es wären mehrere Modelle hierbei denkbar. Zum einen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass das *pfam10407*-Motiv einen Beitrag zur Cdc14-Inhibition leistet. Zwar ist bei einem Verlust dieser Sequenz (= Fragment 234-455) die physikalische Interaktion von Net1 mit Cdc14 unbeeinflusst (vgl. 4.2.1, Abb. 4.23), die Cdc14-Inhibitionsfähigkeit dieses Fragments ist jedoch im Gegensatz zu einem Fragment mit der vollständigen, N-terminalen Region etwas verringert (vgl. 4.2.2, Abb. 4.24). Möglicherweise ist hierbei jedoch nicht das *pfam10407*-Motiv (Position 68-143) entscheidend. Stattdessen könnten Sequenzen, die sich etwa im Bereich der Aminosäuren 200-233 befinden, zur Interaktion und Inhibition beitragen. Indiz hierfür wäre der Befund, dass Net1(1-233) sowohl physikalisch nur sehr schwach mit Cdc14 interagiert als auch die Phosphatase-Aktivität nur schlecht inhibieren kann. Möglicherweise wäre ein Fragment Net1(200-455) in der Lage die vollständige Interaktions- und Inhibitionsstärke des Fragments Net1(1-455) zu erreichen. In diesem Fall könnte ein direkter Beitrag des *pfam10407*-Motivs auf die Cdc14-Interaktion und -Inhibition mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Zum anderen wäre denkbar, dass der Einfluss des *pfam10407*-Motivs in diesem Zusammenhang von indirekter Natur ist. Cdc14 ist in der Zelle gegenüber Net1 im Überschuss vorhanden, ca. 8500 Cdc14-Moleküle stehen etwa 1600 Net1-Molekülen gegenüber (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Da ein etwa äquimolarer Einsatz von Net1(1-455) die Cdc14-Aktivität maximal inhibieren kann (vgl. 4.2.2, Abb. 4.24b), muss es einen Mechanismus geben, der das zahlenmäßige Ungleichgewicht zwischen Inhibitor und Zielprotein ausgleichen kann. Wenn ein Teil des *pfam10407*-Motivs über elektrostatische Wechselwirkungen ähnlich zum Par-3-Modell die Selbstinteraktion von Net1-Proteinen vermittelt, könnte dies notwendig sein, damit Net1 sein volles inhibitorisches Potential entfalten kann.

5.2.3 Freisetzung von Cdc14 durch Phosphorylierung von Net1

Die Regulation der Anaphase und des Austritts aus der Mitose erfolgt über die Lokalisation und Aktivität der Phosphatase Cdc14 (Visintin *et al.*, 1998). Cdc14 wird durch Bindung seines Inhibitors Net1 im Nukleolus inaktiv gehalten (Shou *et al.*, 1999). Am Metaphase-Anaphase-Übergang wird durch die Aktivität des APC/C der Abbau von Securin und somit die Aktivierung der Separase vermittelt. Separase wiederum induziert über eine nicht-proteolytische Aktivität im Rahmen des FEAR-Netzwerks die erste Freisetzungswelle von Cdc14. Dies geschieht dadurch, dass die Separase über einen bisher nicht genau charakterisierten Mechanismus die Aktivität der Proteinphosphatase 2A (PP2A) herunterreguliert. Beteiligt hierbei ist die regulatorische Untereinheit der PP2A, Cdc55 (Queralt *et al.*, 2006). Durch die resultierende, verminderte Aktivität der PP2A kann die Hypophosphorylierung von Net1 nicht mehr aufrechterhalten werden. Durch den in der Mitose vorhandenen, hohen Spiegel an CDK-Aktivität kommt es zu Phosphorylierungsereignissen an den CDK-Consensussequenzen innerhalb von Net1 (Amon, 2004) sowie zu sekundären Phosphorylierungsereignissen vermittelt durch die Polo-Kinase Cdc5 (Shou *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Phosphorylierungen ist die Bindungsfähigkeit von Net1 an Cdc14 geschwächt, so dass es zu einem sukzessiven Loslösen von Cdc14 von seinem Inhibitor Net1 kommen kann (Azzam *et al.*, 2004, Amon 2004).

Auch in der Vergangenheit wurde bereits versucht die für die Auflösung der Net1-Cdc14-Interaktion relevanten Phosphorylierungsstellen zu charakterisieren. Hierbei beschränkte man sich zunächst auf das von Traverso *et al.* (2001) beschriebene, N-terminale Fragment Net1(1-600), welches hinreichend für die Bindung und Inhibition von Cdc14 war. In diesem Fragment wurden 13 Serine zu Alanin ausgetauscht (Net1-13m). Das mutierte Protein Net1-13m zeigte die übliche, nukleoläre Lokalisation und war auch in der Lage, Cdc14 im Nukleolus anzureichern. Die Freisetzung von Cdc14 in der Anaphase war jedoch beeinträchtigt (Azzam *et al.*, 2004). Um nun genauer einzugrenzen, welche Mutationen genau diesen Phänotyp hervorriefen, wurde das kleinere, von Traverso *et al.* (2001) als Cdc14-bindend und -inhibierend identifizierte Fragment Net1(1-341) herangezogen. Dieses kleinere Fragment enthält nur noch sechs der zuvor getesteten 13 CDK-Consensus-Stellen. Die Analyse von Net1(1-341)-Konstrukten mit drei mutierten CDK-Consensus-Stellen (Net1-3Cdk) zeigte ebenso wie die Mutation aller vorhandenen CDK-Consensus-Stellen (Net1-6Cdk) einen zur Net1-13m-Variante vergleichbaren Phänotyp. Die Freisetzung von Cdc14 war in diesen Stämmen um ca. zehn Minuten verzögert. Als Maß hierfür diente das Noch-Vorhandensein von Cdc14 in nukleolären Strukturen relativ zum Erreichen der maximalen Anaphase-Spindelausdehnung (Azzam *et al.*, 2004). Betrachtet man dieses Ergebnis kritisch, so muss man feststellen, dass zwar die Freisetzung von Cdc14 leicht verzögert war, jedoch trotzdem in zum Wildtyp vergleichbaren Umfang erfolgte, d.h. der prozentuale Anteil an Zellen mit freigesetztem Cdc14 war vergleichbar zwischen Wildtyp und Net1-6Cdk. Möglicherweise sind also an der Interaktion mit Cdc14 noch weitere CDK-Consensus-Stellen beteiligt, deren Mutation

erst einen deutlichen Phänotyp, nämlich dauerhafte Freisetzung von Cdc14, zeigen würde. Zusammen mit der Erkenntnis aus dieser Arbeit, dass für die volle Interaktionsstärke mit Cdc14 noch Sequenzen hinter Net1(1-341) benötigt werden (vgl. 4.2.1, Abb. 4.21) und dass ein N- und C-terminal verkürztes Fragment Net(234-455) hinreichend für Bindung und Inhibition der Phosphatase ist (vgl. 4.2.1, Abb. 4.23; 4.2.2, Abb. 4.24b) stellt sich die Frage, ob Phosphorylierungsstellen hinter Aminosäure 341 und vor Aminosäure 455 zusätzlich in Frage kämen. Auch wäre denkbar, dass die Mutation bestimmter Phosphorylierungsstellen im Fragment Net1(234-455) sozusagen als kleinster gemeinsamer Nenner entscheidend wäre. Dieser Frage wurde nachgegangen, indem zwei der fünf in Frage kommenden Phosphorylierungsstellen untersucht wurden. Entgegen der Studien von Azzam *et al.* (2004) wurde nicht die Mutation Serin → Alanin untersucht, was in einer verstärkten Affinität von Net1 für Cdc14 resultieren sollte. Vielmehr wurde versucht eine dauerhafte Phosphorylierung von Net1 an der ausgewählten Position zu imitieren, indem das Serin zu Aspartat mutiert wurde. Dies sollte in einer verminderten Affinität von Net1 für Cdc14 resultieren, falls die untersuchte Stelle tatsächlich für die Interaktion der beiden Proteine relevant wäre. In diesem Fall sollte es zu einer verminderten Bindung von Net1 an Cdc14 kommen, was durch Immunpräzipitation überprüft wurde. Als wahrscheinlichste Kandidaten wurden die beiden Stellen mit CDK-Consensus, S385 und S447, ausgewählt, deren *in vivo*-Phosphorylierung bereits gezeigt wurde (Li *et al.*, 2007, Bodenmiller *et al.*, 2010, Swaney *et al.*, 2013). S447 weist hierbei mit der Sequenz SPVK sogar den vollständigen CDK-Consensus SP-(X)-K (Enserink und Kolodner, 2010) auf und wird von Cdc14 dephosphoryliert (Kao *et al.*, 2013). Somit könnte diese Stelle bei zwei Prozessen eine Rolle spielen, zum einen bei der Auflösung der Net1-Cdc14-Interaktion und somit der Inhibition, zum anderen bei der Wiederherstellung dieser inhibitorischen Interaktion nach der Freisetzung der Phosphatase ins Cytoplasma. Über diesen Mechanismus könnte Cdc14 möglicherweise also seine eigene Rückkehr in den Nukleolus und damit seine Inhibition fördern.

In der Immunpräzipitation zeigten beide Einzelmутanten Net1(234-455)S385D und Net1(234-455)S447D eine zum unmutierten Fragment Net1(234-455) vergleichbare Affinität gegenüber Cdc14. Auch die Doppelmутante Net1(234-455)S385D S447D wies keine abgeschwächte Bindung an Cdc14 auf (vgl. 4.2.3, Abb. 4.25). Hierfür wären zwei Erklärungsansätze denkbar. Zum einen ist nicht gewährleistet, dass die Serin zu Aspartat-Mutation tatsächlich die Phosphorylierung an dieser Stelle in ausreichendem Maß imitiert, so dass die Interaktion des mutierten Konstrukts mit Cdc14 ausreichend abgeschwächt wird, um in der Immunpräzipitation identifizierbar zu sein. Zum anderen sind möglicherweise die beiden, ausgewählten Phosphorylierungsstellen nicht die für die Aufhebung der Net1-Cdc14-Interaktion relevanten Positionen. Dass es sich bei S447 zumindest um eine an der Regulation der Cdc14-Aktivität beteiligte Stelle handelt, kann aus der Analyse der Toxizität der überexprimierten Konstrukte abgeleitet werden. Die Mutation von S447 zu Aspartat resultierte in einer geringeren, toxischen Wirkung des Konstrukts auf das Wachstum der Zellen (vgl. 4.2.3, Abb.

4.26). In weiteren Studien sollte nun die Mutation von S447 mit der Mutation weiterer CDK-Conensus-Stellen im Fragment Net1(234-455) kombiniert werden, um mögliche Beiträge dieser Positionen zur Net1-Cdc14-Interaktion und deren Auflösung zu untersuchen. Falls auch hierbei keine auffälligen Veränderungen im Bindeverhalten von Net1 an Cdc14 feststellbar wären, könnte eine Kombination mit der Net1-6Cdk-Mutante angestrebt werden. In Anbetracht der Erkenntnis, dass Net1(1-233) kaum in der Lage ist Cdc14 zu binden (vgl. 4.2.1, Abb. 4.23), wären bei einer Kombination der Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeit von Azzam *et al.* (2004) die Positionen S252, T297 und T304 von besonderem Interesse. Möglicherweise ließe sich auf diese Weise ein kleiner Aminosäureabschnitt innerhalb von Net1 charakterisieren, der alle für die Interaktion und Inhibition von Cdc14 notwendigen Eigenschaften beinhaltet.

5.3 Wachstums-Stimulation

Neben seinen Aufgaben in der Organisation der Nukleolusstruktur und der Regulation der Cdc14-Aktivität und somit des Austritts aus der Mitose, wurde Net1 noch eine weitere wichtige Funktion zugeschrieben: die Stimulation der Aktivität der RNA-Polymerase I. Zunächst war aufgefallen, dass *net1Δ*-Stämme bei 37°C nicht lebensfähig waren (Shou *et al.*, 2001). Dies könnte mehrere Ursachen haben, in Frage kommen eine möglicherweise gestörte Mitose aufgrund von Cdc14-Fehlregulation, eine anomale Nukleolusstruktur aufgrund des Fehlens der wichtigen Strukturkomponente Net1 oder eine weitere, bislang unbekannte Funktion von Net1. Aufschluss hierbei brachte die Analyse dominanter *CDC14*-Allele, die in Abwesenheit von *CDC15* und *TEM1* einen Austritt aus der Mitose bewirken konnten, ohne dass hierbei die nukleoläre Struktur oder die Aktivität von RNA PolI beeinträchtigt waren. So konnte geschlossen werden, dass die PolI-Stimulationsfunktion von Net1 unabhängig von seiner Rolle in der Strukturorganisation des Nukleolus und der Cdc14-Regulation sein könnte.

Weitere Evidenz lieferte der Screen einer ARS/CEN-Genbank nach Genen, welche die Temperatursensitivität von *net1*-Mutanten retten konnten. Als interessanter Treffer konnte das Gen *RRN3* identifiziert werden, welches für einen Transkriptionsaktivator für RNA Polymerase I codiert (Shou *et al.*, 2001). Hierzu passte die Beobachtung, dass in *net1-1*-Mutanten der Level von produzierten rRNA-Transkripten gegenüber Wildtyp-Zellen (normiert auf Aktin-mRNA) um ~40% reduziert war. Die Ursache hierfür lag in der veränderten Transkriptionsrate der RNA-Polymerase I in den *net1*-Mutanten. Durch den Nachweis der direkten Interaktion von Net1 mit RNA-Polymerase I-Untereinheiten mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie konnte der Zusammenhang zwischen Net1 und RNA-Polymerase I weiter bekräftigt werden. Dass die direkte Interaktion von Net1

mit dem Polymerase-Holoenzym entscheiden ist, zeigten *in vitro*-Transkriptionsexperimente. Der Einsatz von gereinigtem Net1 in etwa äquimolarem Verhältnis zur RNA-Polymerase I stimulierte die Produktion von RNA-Transkripten um den Faktor vier. Zusammengenommen ergaben diese Beobachtungen folgendes Modell: Net1 besitzt unabhängig von seiner Fähigkeit die Cdc14-Aktivität und den Austritt aus der Mitose zu regulieren die Aufgabe, zur Stimulation der RNA-Polymerase I-Aktivität beizutragen. Dies könnte dadurch bewerkstelligt werden, dass Net1 direkt an das Polymerase-Holoenzym bindet und dieses an das rDNA-Template rekrutiert (Shou *et al.*, 2001). Weiteren Aufschluss darüber, wie genau Net1 dies bewerkstelligt und welche Region innerhalb von Net1 hierfür benötigt wird, könnten Daten dieser Arbeit liefern.

5.3.1 Wachstumsdefekt bei Entfernung der C-terminalen Region von Net1

Der auffällig starke Wachstumsdefekt von *net1Δ*-Stämmen setzt sich vermutlich aus zwei Subkategorien zusammen. Durch das Fehlen des Cdc14-Inhibitors ist keine Zellzyklus-koordinierte Regulation der Phosphatase-Aktivität gewährleistet. Die dauerhafte Freisetzung des aktiven Cdc14 bewirkt Fehlregulationen beim Ablauf des Zellzyklus und dem Austritt aus der Mitose (Stegmeier *et al.*, 2004). Der für die Cdc14-Regulation wichtige Bereich innerhalb von Net1 konnte in dieser Arbeit auf die N-terminale Region von Net1 innerhalb der ersten 455 Aminosäuren beschränkt werden. Stämme, die solche *NET1*-Verkürzungen exprimieren, bei denen die Cdc14-Regulation gewährleistet ist, weisen dennoch einen gravierenden Wachstumsdefekt auf. Dieser Defekt tritt schon auf, wenn nur 138 Aminosäuren der C-terminalen Region entfernt werden (vgl. 4.3.1, Abb. 4.28 und 4.3.2, Abb. 4.29b). Dieser kleine Bereich der Aminosäuren 1052-1189 in der extremen, C-terminalen Region von Net1 scheint also eine wichtige Funktion auszuüben, deren Fehlen sich in einer starken Einschränkung des Zellwachstums bemerkbar macht. Eine nähere Charakterisierung dieses C-terminalen Bereiches lieferte interessante Befunde. Eine konstitutive Expression des C-terminalen Bereiches *NET1*(1052-1189) konnte den Wachstumsdefekt von *net1Δ*-Stämmen abmildern und den Wachstumsdefekt von C-terminalen Verkürzungsstämmen, bei denen die Cdc14-Funktion gegeben war, vollständig retten (vgl. 4.3.3, Abb. 4.30 und Abb. 4.31). Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass die Wachstumsfördernde Funktion von Net1 in dessen C-terminalen Bereich lokalisiert ist.

5.3.2 Der C-terminale Bereich von Net1 interagiert mit RNA-Polymerase I

Durch die Datenlage in der Literatur (Shou *et al.*, 1999, Shou *et al.*, 2001), lag es nahe zu vermuten, dass die C-terminale Region von Net1 die Stimulation des Wachstums über eine Förderung der RNA-Polymerase I-Aktivität vermittelt. Dies konnte durch den Nachweis der Interaktion des C-terminalen Bereichs von Net1(1052-1189) mit der RNA-Polymerase I-Untereinheit Rpa43 bekräftigt werden (vgl.

4.3.6, Abb. 4.35). Als besonders interessant erwies sich hierbei die Erkenntnis, dass eine posttranslational-modifizierte Form von Net1(1052-1189) mit der Polymerase-Untereinheit Rpa43 interagiert. Assays mit λ -Phosphatase zeigten, dass es sich bei dieser Modifikation zu großen Teilen um Phosphorylierungen handelt. In der Tat enthält der in Frage kommende C-terminale Bereich von Net1 sechs Serine, die *in vivo* in phosphorylierter Form vorliegen (Swaney *et al.*, 2013). S1056 weist dabei eine CDK-Consensus-Sequenz auf und CDK1/Clb2 konnte als Modifikator dieser Stelle gezeigt werden (Holt *et al.*, 2009). Möglicherweise unterliegt also die Interaktion der C-terminalen Region von Net1 mit der RNA-Polymerase I und somit die Stimulation der Polymerase-Aktivität einer Zellzyklus-abhängigen Regulation. Dies sollte in Synchronexperimenten näher untersucht werden, um weiteren Aufschluss über die genaue Art und Weise der Interaktion zwischen Net1(1052-1189) und Rpa43 zu gewinnen.

5.3.3 Net1 und die Stimulation der RNA-Polymerase I-Aktivität

Die bisher beschriebene (Shou *et al.*, 2001) Interaktion zwischen Net1 und der RNA-Polymerase I konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit weiter charakterisiert werden. Zum einen konnte die Region innerhalb von Net1 auf den C-terminalen Bereich der Aminosäuren 1052-1189 eingegrenzt werden. Dieser Bereich ist hinreichend für die Interaktion mit der Untereinheit Rpa43 und vermittelt die wachstumsfördernde Funktion von Net1. Zum anderen ist diese Region hinreichend, um den Wachstumsdefekt von *net1Δ*-Stämmen abzumildern und den Wachstumsdefekt von Stämmen mit C-terminaler Verkürzung von *NET1* (mit gegebener Cdc14-Regulation) zu retten. Ungeklärt bleibt weiterhin die Frage, wie genau die Rolle von Net1 im Kontext der Stimulation der RNA-Polymerase I-Aktivität gestaltet ist. Aufgrund seiner gezeigten, DNA-bindenden Eigenschaft wäre ein Modell durchaus denkbar, in dem Net1 das rDNA-Template bindet und auf diese Weise das Polymerase-Holoenzym an die DNA rekrutiert und dort aktiv hält. Eine mögliche Zellzyklus-abhängige Regulation über Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse könnte hierbei eine Rolle spielen.

Eine weitere Möglichkeit für Net1 bei der Stimulation der RNA-Polymerase I-Stimulierung besteht im Zusammenhang mit dem RNA-Polymerase I-Rekrutierungsfaktor Rrn3 (Blattner *et al.*, 2011). Rrn3 bildet Homodimere, bindet an RNA-Polymerase I jedoch als Monomer. Die Bindestelle liegt auf der Rückseite des Polymerase-Komplexes gegenüber der Untereinheit Rpa43. Die Rrn3-Struktur enthält 10 HEAT-repeats, welche für Protein-Wechselwirkungen benötigt werden, sowie einen konservierten Serin-patch an der Oberfläche. Während des normalen Zellwachstums ist der Serin-patch dephosphoryliert und die Bindung von Rrn3 an PolI gewährleistet. Dies führt zu stabiler Rekrutierung der Polymerase an die rDNA und zur Transkription. Stress-abhängig kann der Serin-patch phosphoryliert werden, um die PolI-Aktivierung abzuschalten. In humanem TIF-IA werden ebenfalls Serin-Reste innerhalb eines solchen patches phosphoryliert, was für einen konservierten Mechanismus

zur Regulation der Rrn3-Poli-Interaktion spricht. Die entsprechenden Serinreste in Hefe-Rrn3 konnten jedoch nicht identifiziert werden. Auch Phosphorylierungen außerhalb des Serin-patches, in der C-terminalen Region von TIF-IA, spielen bei der Transkriptionsaktivierung eine Rolle. Die Phosphorylierung beeinflusst ebenfalls die Interaktion mit dem humanen Core Factor (Blattner et al., 2011). Es ließe sich spekulieren, ob möglicherweise die im Hefe-Rrn3 fehlende, C-terminale Region durch die C-terminale Region von Net1 funktional ersetzt werden kann. Ein Fehlen der C-terminalen Net1-Region resultiert wie gezeigt in einem starken Wachstumsdefekt, eine Deletion von *NET1* kann aber durch Überexpression von *RRN3* kompensiert werden (Shou et al., 2001).

5.4 Modell der Net1-Funktionen

Anhand der gesammelten Daten ist es möglich, das 1189 Aminosäuren lange Net1-Protein in Domänen zu unterteilen, die unterschiedliche Aufgaben übernehmen (s. Abb. 5.4).

Die innerhalb der Hefen konservierte N-terminale Region beinhaltet Bereiche, die für die Lokalisation im Nukleolus notwendig sind. Dieser Bereich lässt sich auf die ersten ca. 200 Aminosäuren eingrenzen und enthält eine Region, die als *pfam10407*-Motiv gekennzeichnet wurde. N-terminale Fragmente, welche die ersten 196 Aminosäuren umfassen, lokalisieren exklusiv im Nukleolus. Die konservierte Region des *pfam10407*-Motivs könnte in diesem Zusammenhang die Kernlokalisation von Net1 vermitteln. Innerhalb dieser Region wird eine schwache NLS vorhergesagt. Da N-terminale Fragmente von 233 Aminosäuren Länge in der Lage sind, DNA- und RNA-Fragmente zu binden, stellt das *pfam10407*-Motiv möglicherweise auch eine neuartige DNA-Bindedomäne dar. Eine dritte Möglichkeit besteht in der Vermittlung der Selbstinteraktionsfähigkeit. Diese Vermutung gründet sich auf Sekundärstrukturanalysen, mit deren Hilfe eine Strukturverwandtschaft zum N-terminalen Bereich des Scaffold-Proteins Par-3 nachgewiesen werden konnte. In Par-3 stellt die zu Net1 ähnliche Sequenz einen Teil der Interaktionsflächen dar, über die mittels elektrostatischer Wechselwirkungen zwei Par-3-N-Termini „Bauch an Rücken“ miteinander interagieren können. Welche dieser drei Möglichkeiten tatsächlich von dem *pfam10407*-Motiv vermittelt wird, muss in weiteren Studien näher untersucht werden. Interessant ist jedoch, dass mit großer Wahrscheinlichkeit die in der Literatur implizierte Funktion des *pfam10407*-Motivs in der Cdc14-Bindung und -Inhibition nicht von dieser Region übernommen wird. Hierfür konnte eine angrenzende Region zwischen den Aminosäuren 234 bis 455 ermittelt werden. Fragmente, die diesen Bereich umfassen, sind sowohl in der Lage *in vivo* mit Cdc14 zu interagieren als auch in *in vitro*-Assays die Cdc14-Phosphatase-Aktivität zu inhibieren. Die Freisetzung von Cdc14 von seinem Inhibitor Net1 erfolgt in der Anaphase der Mitose über von FEAR und MEN gesteuerte Phosphorylierungsereignisse in der N-terminalen Region von Net1. In weiteren

Untersuchungen müssen die im Fragment Net1(234-455) vorhandenen Phosphorylierungsstellen mit CDK-Consensus hinsichtlich ihres Einflusses auf die Net1-Cdc14-Interaktion untersucht werden. Die beiden bereits getesteten Stellen S385 und S447 zeigen zwar einen Einfluss auf diese Interaktion, sind jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit nicht allein für deren Aufhebung verantwortlich.

In der Proteinmitte im Bereich der Aminosäuren 566 bis 801 befindet sich die Region, die für die Interaktion mit der Histon-Deacetylase Sir2 notwendig ist (Cuperus *et al.*, 2000). Dies konnte in Immunpräzipitationsexperimenten bestätigt werden (vgl. 4.1.4, Abb. 4.7).

Die Rolle der C-terminalen Region von Net1 war bisher wenig untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von nur 138 Aminosäuren zu stark beeinträchtigtem Zellwachstum führt. Im Gegenzug kann die Expression dieses kleinen C-terminalen Bereichs den Wachstumsdefekt von *net1Δ*-Stämmen abmildern. Dieser Wachstumsdefekt gründet sich vermutlich auf zwei Aspekte, fehlende Cdc14-Regulation und fehlende RNA Poll-Stimulation. In Net1-Stämmen mit C-terminalen Verkürzungen bis Aminosäure 455 liegt eine korrekte Bindung (vgl. 4.2.1, Abb. 4.21), Lokalisation (vgl. 4.2.4, Abb. 4.27d) und Inhibition (vgl. 4.2.2, Abb. 4.24) von Cdc14 vor. Durch zusätzliche Expression des C-terminalen Net1-Fragments kann der Wachstumsdefekt dieser Stämme vollständig gerettet werden. Die posttranslational modifizierte Version des C-terminalen Fragments interagiert mit der RNA-Poll-Untereinheit Rpa43, so dass die Möglichkeit besteht, dass hierin ein wichtiger regulatorischer Mechanismus zur Stimulation der RNA-Polymerase I-Aktivität liegt.

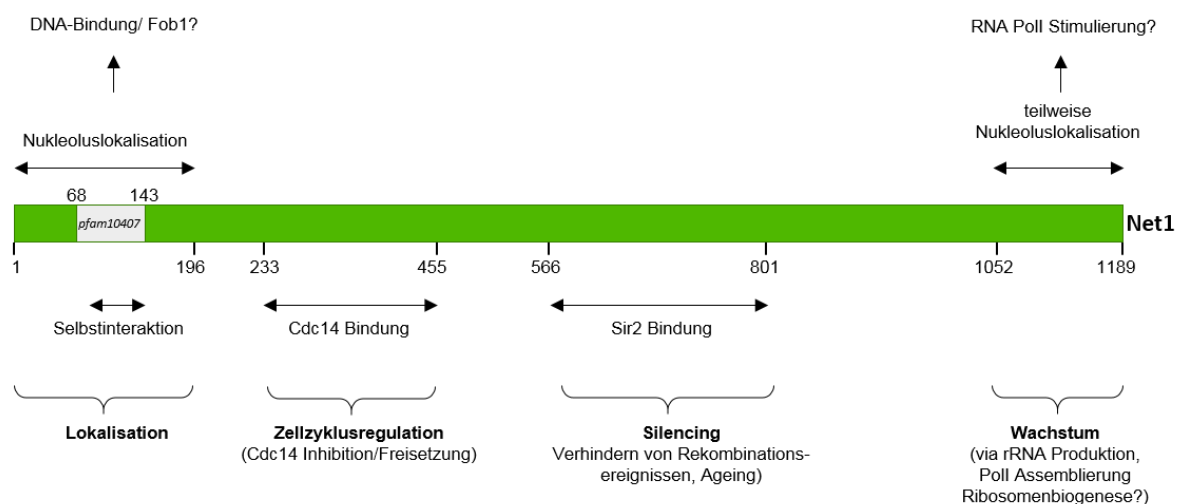


Abb. 5.4: Modell der Net1-Funktionen

Schematische Darstellung der verschiedenen, charakterisierten Domänen innerhalb des Net1-Proteins und deren möglicher Funktionen. In der N-terminalen Region befinden sich Sequenzen, die die Lokalisation im Nukleolus und die DNA-Bindefähigkeit sowie die Fähigkeit zur Selbstinteraktion vermitteln. Die benachbarte Region ist an der Zellzyklusregulation über die Bindung und Inhibition der Proteinphosphatase Cdc14 beteiligt. Die Proteinmitte stellt die Binderegion für die Histon-Deacetylase Sir2 dar. Der C-terminale Bereich interagiert mit der RNA Polymerase I und stimuliert das Wachstum.

6. METHODEN

6.1. Arbeiten mit Bakterien

Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte im *E. coli* Stamm DH5 α . Für die Expression von Hefegenen wurde der *E. coli* Stamm BL21Codon+ verwendet.

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

BL21Codon+ *ompT hsdSB*(r_B^+ , m_B^-) *gal dcm* (DE3) *pLysS* (CamR)

6.1.1. Kultivierung von Bakterien (*E. coli*)

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme DH5 α und BL21Codon+ erfolgte bei 37°C in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agar-Platten. Zur Selektion Plasmid-enthaltender Zellen wurden dem Medium 100 μ g/ml Ampicillin zugegeben. Zum Test von DH5 α -Zellen auf α -Komplementation wurden auf die LB-Agar-Platte zusätzlich 100 μ M X-Gal und 400 μ M IPTG ausplattiert.

Bei der Kultivierung von BL21Codon+ wurde dem LB-Medium zusätzlich Chloramphenicol zugesetzt (Flüssigmedium: 50 μ g/ml; Agarplatten: 34 μ g/ml). Für die Expression von 6xHis- oder MBP-Fusionsproteinen wurde BL21Codon+ über Nacht in LB-Flüssigmedium mit Ampicillin und Chloramphenicol (LB_{Amp, Chl}) angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen zu 0,1 OD in frisches LB_{Amp, Chl} überimpft und für zwei Stunden bei 20°-23°C geschüttelt. Anschließend wurde zur Induktion des *rha*-Promotors 0,2 % Rhamnose zugegeben und die Kultur bis zum nächsten Tag weiter inkubiert.

6.1.2. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

100 μ l elektrokompenter *E. coli* DH5 α - oder BL21Codon+ -Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 100 μ l sterilem H₂O verdünnt. 100 μ l der Zellsuspension wurden möglichst luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt und mit 0,5 – 1 μ l der zu transformierenden Plasmidlösung oder 2 μ l eines Ligationsansatzes versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm, einem Widerstand von 200 Ω , einer Kapazität von 25 μ F und einer Kondensatorspannung von 2,5 kV. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2. Arbeiten mit Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den Stammhintergründen W303 und S288c gearbeitet. Die verwendeten Stämme sind unter Abschnitt 6.4 aufgeführt.

6.2.1. Kultivierung von Hefestämmen

Die Kultivierung von Hefestämmen erfolgte in der Regel bei 25-30°C in XY-Vollmedium mit 2% Glukose als Kohlenstoffquelle. Zur Selektion auf die Markergene *ADE2*, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* oder *URA3* wurde synthetisches Minimalmedium (SD) verwendet, wobei dem Medium die entsprechenden Aminosäuren nicht zugesetzt wurden. Je nach Experimenttyp wurde statt Glukose (D) als Kohlenstoffquelle 2% Galaktose (G), 2% Raffinose (R), eine Kombination aus 2% Galaktose und 1% Raffinose (RG), 2% Saccharose (S) oder eine Kombination aus 2% Saccharose und 2% Galaktose (SG) verwendet.

In Experimenten wurde immer mit exponentiell wachsenden Hefekulturen gearbeitet. Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur angezogen, aus der am Vorabend des Experiments die Hauptkultur so angeimpft wurde, dass die OD₆₀₀ der Kultur am nächsten Morgen ca. 0,5 – 1,0 betrug.

6.2.2. Kontrolle der Genexpression durch regulierbare Promotoren

Zur gezielten Expression von Genen wurde der induzierbare *pGAL1*-Promotor verwendet. Entsprechende Stämme wurden bei 25°C in XY-Vollmedium mit 2% Raffinose angezogen. Die Expression wurde durch Zugabe von 2% Galaktose für 2-3 Stunden bei 25°C induziert.

6.2.3. Wachstumstests mittels Verdünnungsreihen

Die zu untersuchenden Stämme wurden in geeignetem Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Dann wurde jeweils 1 OD Zellen geerntet, in 1 ml sterilem H₂O resuspendiert und 200 µl der Zellsuspension in das erste Well einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Ausgehend davon erfolgten fünf 1:10-Verdünnungsschritte in sterilem H₂O. Mit einem Metallstempel wurden anschließend die Suspensionen auf geeignete XY-Agarplatten gestempelt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 2-3 Tage inkubiert. Das Wachstum wurde mittels Digitalkamera dokumentiert.

6.2.4. Kreuzung haploider Hefestämmen

Haploide Hefezellen mit unterschiedlichem Paarungstyp (MATa bzw. MATα) sind in der Lage zu einer diploiden Zygote zu verschmelzen. Zur gezielten Kreuzung zweier haploider Hefestämmen wurden geringe Mengen Zellmaterial mit einem Zahnstocher auf einer XYD-Agarplatte übereinander

gestrichen oder je 5 µl einer Zellsuspension übereinander getropft. Die Zellen wurden über Nacht bei 25°C oder 30°C inkubiert. Zur Selektion der diploiden Zellen wurden Auxotrophie- bzw. Resistenzmarker benutzt. Hierzu wurden die Zellen mittels Verdünnungsausstrich auf entsprechenden SD-Selektivplatten (Auxotrophiemarker) oder Platten mit G418 (Resistenzmarker) aufgebracht und für 2-4 Tage bei 25°C oder 30°C inkubiert.

6.2.5. Sporulation diploider Hefestämme und Tetradenanalyse

Sowohl haploide als auch diploide Zellen durchlaufen unter günstigen Wachstumsbedingungen einen mitotischen Zellteilungszyklus. Im Gegensatz zu haploiden Zellen sind jedoch diploide Zellen in der Lage bei Nährstoffmangel meiotische Teilungen einzuleiten und so widerstandsfähige Sporen als Dauerstadien zu bilden. Hierbei entstehen aus einer diploiden Zelle vier haploide Sporen (Tetrade), die von einer festen Hülle, dem Ascus, umgeben sind. Treten günstigere Nährstoffbedingungen auf, können diese Sporen auskeimen und wieder in mitotische Teilungszyklen eintreten.

Um die Sporulation einzuleiten, wurden diploide Hefestämme zunächst für mindestens acht Stunden bei 30°C (bzw. maximal 16 Stunden bei 25°C) in 2 ml nährstoffreichem Prä-Sporulationsmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (2000 Upm, 2 min) und einmal in 2 ml Prä-Sporulationsmedium gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 2 ml nährstoffarmen Sporulationsmedium aufgenommen und je nach Stammhintergrund drei Tage (W303) oder fünf Tage (S288c) bei 25°C inkubiert. Der Sporulationsgrad wurde am Lichtmikroskop überprüft. Zum Verdau des Ascus wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Novozym-Lösung (möglichst frisch) versetzt und bei Raumtemperatur 20-25 Minuten inkubiert. Dann wurden 15 µl aus der oberen Phase der Lösung entnommen und auf eine XYD-Agarplatte aufgebracht. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die vier Sporen einer Tetrade aufgenommen, voneinander getrennt und an Hand eines Rasters abgelegt. Die Agarplatte wurde bei Raumtemperatur, 25°C oder 30°C inkubiert bis die einzelnen Sporen zu Kolonien herangewachsen waren.

Anschließend wurde der Genotyp der aus den Sporen hervorgegangenen Kolonien mittels Markertest auf Auxotrophie- oder Resistenzmarker analysiert. Hierzu wurde etwas Zellmaterial jeder Kolonie in 150 µl sterilem H₂O in einer Mikrotiterplatte resuspendiert und mit einem Metallstempel auf entsprechende Selektivplatten oder Platten mit G418 gestempelt. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur, 25°C oder 30°C wurde das Wachstum ausgewertet und so der Genotyp der Sporen bestimmt.

6.2.6. Transformation von Hefezellen mittels Lithiumacetat-Methode

Hefezellen sind in der Lage nach Behandlung mit Alkali-Ionen (z.B. Lithiumacetat) DNA aufzunehmen (Gietz und Woods, 2002). Zur Transformation der Hefezellen wurde eine Übernachtskultur in 5 ml XYD-Vollmedium bei 25°C angezogen, am nächsten Morgen 1:20 in XYD-Vollmedium verdünnt und für 3 - 4 Stunden bei 25°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 1,0 inkubiert. Pro Transformationsansatz wurde 1 OD Zellen geerntet (2000 Upm, 2 min), in 1,5 ml sterilem H₂O und danach in 1 ml TE/LiAc gewaschen (6000 Upm, 2 min). Das Zellpellet wurde in 50 µl TE/LiAc aufgenommen.

Transformationsansatz:

50 µl	Zellsuspension
5 µl	Heringssperma-DNA (5 min bei 100°C, anschließend auf Eis gehalten)
10 - 15 µl	lineare DNA (Restriktionsverdau oder PCR-Produkt)
oder 0,5 - 1 µl	Plasmidlösung (ARS/CEN- oder 2µ-Plasmide)
300 µl	PEG/LiAc

Der Transformationsansatz wurde durch mehrmaliges Vortexen gemischt, für 20 min bei RT gerollert und anschließend für 15 min bei 42°C im Heizblock inkubiert. Dann wurden die Zellen kurz abzentrifugiert. Für die Selektion durch Auxotrophie-Marker wurden die Zellen in 200 µl sterilem H₂O aufgenommen und auf entsprechende Selektivmediumsplatten ausplattiert. Zur Selektion auf Resistenzmarker wurde das Zellpellet in 5 ml XYD-Vollmedium überführt und zur phänotypischen Expression für 1,5 – 3 Stunden bei 30°C gerollert. Anschließend wurde die Kultur geerntet (2000 Upm, 2 min), das Pellet in 200 µl H₂O aufgenommen und auf Platten mit G418 ausplattiert. Die Platten wurden für 2-4 Tage bei 25°C oder 30°C inkubiert.

6.2.7. Konservierung von Hefestämmen

Zur Konservierung wurden die Hefestämmen in 5 ml frischem XYD-Vollmedium über Nacht bei 25°C oder 30°C angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen geerntet (2000 Upm, 2 min), das Zellpellet in 750 µl 15% Glycerin aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

6.3. Mikroskopie von lebenden Zellen

6.3.1. Aufbereitung der Zellen

Für mikroskopische Aufnahmen wurde immer mit exponentiell wachsenden Hefekulturen gearbeitet. Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur bei 25°C angezogen, aus der am Vorabend des Experiments die Hauptkultur so angeimpft wurde, dass die OD₆₀₀ der Kultur am nächsten Morgen ca. 0,2 – 1,0 betrug.

Aus dieser Kultur wurden 3 OD Zellen geerntet und in 1 ml sterilem H₂O resuspendiert. 5 µl dieser Zellsuspension wurden auf ein langes Deckglas (60 x 22 mm) aufgebracht und mit einem SD++ Agarblöckchen und einem kleinen Deckglas (16 x 16 mm) bedeckt.

Zusammensetzung des Agars:

20% Glukose	2 ml
10x YNB	2 ml
10x Drop Out ++	2 ml
0,75% Agarose (aufgekocht)	14 ml

Die Mischung wurde am Vortag des Experiments hergestellt, in eine Petrischale gegossen und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

6.3.2. Aufnahmen am Cellobserver SD

Die Mikroskopie wurde am inversen Mikroskop Zeiss Axio Cellobserver SD mit dem Spinning Disk System durchgeführt. Der Raum wurde auf 22°C temperiert. Zur Anregung der Fluoreszenz dienten zwei Laser mit 488 nm Anregungswellenlänge (100 mW) und 561 nm Anregungswellenlänge (40 mW). Alle Aufnahmen wurden mit einem 63x PlanApochromat-Objektiv durchgeführt. Die Detektion erfolgte über eine Axiocam MRm Rev3 (1388x1040 Pixel).

Filmaufnahmen:	Dauer	45 – 75 min	
	Intervall	2 min oder 3 min	
	Z-Stapel	10 Ebenen, Abstand 0,5 µm	
	Belichtungszeit	200 ms	
	Laserintensitäten	Net1-GFP	12% (488 nm) (volle Länge und C-term. Verkürzungen)
Stapelaufnahmen:	Z-Stapel	Nop56-3mCherry	30% (561 nm)
		mCherry-NLS	25% (561 nm)
		Spc42-3mCherry	55% (561 nm)
		Belichtungszeit	200 ms
		Laserintensitäten	Net1-GFP 12% (488 nm) (volle Länge und C-term. Verkürzungen)
		Cdc14-GFP	20% (488 nm)
		Nop56-3mCherry	35% (561 nm)
		mCherry-NLS	30% (561 nm)

6.3.3. Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung und Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ. Zur Darstellung der Fluoreszenzkanäle wurden die zehn aufgenommenen Z-Ebenen mit der Einstellung „Maximum Intensity“ projiziert und der Kontrast mit der Einstellung „Min/Max“ eingestellt. Bildrauschen, bei dem es sich nicht um Signal handelte (Hintergrund), wurde durch manuelle Einstellung reguliert. Bei Bedarf wurden die Signale mit einem Anteil von 0,02 bzw. 0,3 gesättigten Pixeln dargestellt. Für den DIC-Kanal wurde aus den zehn aufgenommenen Ebenen die schärfste Ebene ausgewählt.

Zur Bearbeitung der Filmaufnahmen wurde ein ImageJ-Makro verwendet (s. Anhang 7.4.2) und die entsprechenden Kanäle mit Zeitstempel und Beschriftungen versehen. Anschließend wurden die Filme als TIF-Datei (unkomprimiert) abgespeichert.

Montagen ausgewählter Zeitpunkte wurden ebenfalls mit ImageJ erstellt und als TIF-Datei (unkomprimiert) abgespeichert.

6.4. Genetische und molekularbiologische Methoden

6.4.1. DNA-Isolation

6.4.1.1. Präparation von High Copy Plasmiden aus *E. coli*: Kochlysate-Methode

Zur schnellen und einfachen Isolation von High Copy Plasmiden aus *E. coli* kam die Kochlysate-Methode zum Einsatz (Berghammer und Auer, 1993). Hierfür wurde eine Übernacht-Kultur mit einer Einzelkolonie transformierter Zellen bei 37°C angezogen. 2 ml der Kultur wurden geerntet (13200 Upm, 3 min) und das Pellet in 40 µl Easy Prep-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden für 1 min im Heizblock bei 100°C inkubiert und anschließend sofort für 1 min auf Eis gehalten. Nach dem abschließenden Zentrifugationsschritt (13200 Upm, 15 min) befand sich die gewünschte Plasmid-DNA im Überstand. Dieser wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt. Zur Analyse der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese und Restriktionsverdau wurden 3 - 5 µl eingesetzt.

6.4.1.2. Säulenreinigung von Plasmiden aus *E. coli*: MINI- und MIDI-Preps

Um Plasmid-DNA in höheren Reinheitsgraden und Volumina zu erhalten, wurden Säulenreinigungsverfahren eingesetzt. Zur Reinigung von Plasmiden für Sequenzierungsreaktionen wurde das NucleoSpin-Kit (MINI, Macherey und Nagel) verwendet. Ausgehend von 4 ml Volumen einer bei 37°C angezogenen Übernacht-Kultur erfolgte die Reinigung nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl H₂O eluiert. Zur Aufbewahrung der Plasmid-DNA in der Plasmidsammlung wurden entweder zwei Elutionen des NucleoSpin-Kits vereinigt oder eine größere Präparation von

Plasmid-DNA mit dem GenElute-Kit (MIDI, Sigma) durchgeführt. Hierzu wurde die Reinigung ausgehend von 80 ml einer bei 37°C angezogenen Übernacht-Kultur nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte in 750 µl Elutionspuffer.

6.4.1.3. Isolation genomischer DNA aus Hefe

Um die DNA aus Zellkernen der Hefe zu isolieren, muss zunächst die Zellwand mechanisch zerstört werden, bevor die Zellen durch Detergenzien lysiert werden. Anschließend kann die DNA durch Fällung mit Ethanol präzipitiert werden (Fujimura und Sakuma, 1993). Die mit dieser Methode isolierte DNA wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR eingesetzt.

Hefezellen wurden über Nacht in XYD-Vollmedium bei 30°C angezogen. Die Kultur wurde geerntet (2000 Upm, 2 min), das Pellet in 1 ml H₂O resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl Glasperlen überführt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt. Anschließend wurden 100 µl Tris/EDTA/SDS (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 20 mM EDTA; 10 mg/ml SDS) zugegeben und die Zellen bei 4°C für 5 min in der Retsch-Mühle (maximale Leistung) aufgeschlossen. Dann wurden 500 µl Tris/EDTA/SDS zugegeben und die Probe bei 70°C im Heizblock für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 5 M Kaliumacetat wurde die Probe 10 min auf Eis gehalten und dann in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert (13200 Upm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100% Ethanol gemischt. Die ausgefällte DNA wurde abzentrifugiert (13200 Upm, 1 min), der Überstand entfernt und das Pellet bei offenem Deckel getrocknet. Das Pellet wurde in 300 µl 1x TE resuspendiert, mit 5 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 65°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt, abzentrifugiert (13200 Upm, 1 min) und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das Pellet vollständig bei offenem Deckel getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in 50 µl 1x TE gelöst (evtl. bei 65°C im Heizblock). Zur Überprüfung wurden 2 µl der Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen.

6.4.1.4. Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen

Die Konzentration und Reinheit der Plasmidpräparation wurde am Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Hierzu wurden 3 µl Plasmidlösung mit 97 µl sterilem H₂O gemischt und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Als Referenz dienten 100 µl steriles H₂O. Über die Verunreinigung der Plasmidlösung mit Proteinen konnte mittels der Extinktion bei 280 nm rückgeschlossen werden, indem der Quotient E_{260}/E_{280} gebildet wurde. Bei sauberen Präparationen beträgt der Quotient ~ 1,8, Werte darunter deuten auf Verunreinigungen hin.

6.4.2. PCR

Mit der Methode der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) können DNA-Fragmente *in vitro* vervielfältigt werden (Mullis et al., 1986). Der zu amplifizierende DNA-Bereich wird durch die Bindung kurzer, einzelsträngiger Oligonukleotide (sog. Primer) festgelegt, die komplementär zu den Enden der Zielsequenz sind. Für präparative Anwendungen (Klonierungen 7.4.2.1, Epitopmarkierung 7.4.2.2 und gerichtete Mutagenese 7.4.2.3) wurde die KOD-Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis* verwendet, da sie eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*) besitzt und bei diesen Anwendungen auf eine geringe Fehlerrate Wert gelegt wird. Für analytische Zwecke wurde dagegen die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* benutzt, da hierbei das Augenmerk lediglich auf der Größe des erhaltenen PCR-Produkts lag (7.4.2.4 MAT-PCR).

6.4.2.1. PCR für Klonierungen

Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten, die bei Klonierungen Einsatz fanden, wurden über die verwendeten Primer Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingeführt. Als Matrize wurden entweder 0,5 µl genomische DNA aus Hefe oder 1 µl Plasmid-DNA (evtl. 1:5 vorverdünnt) in die Reaktion eingesetzt. Wurde als Matrize genomische Hefe-DNA benutzt, wurde eine verdünnte KOD-Polymerase-Lösung eingesetzt, in allen anderen Fällen die konzentrierte Stammlösung.

Ansatz:

10x KOD-Puffer	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
<i>forward</i> -Primer (10 mM)	3 µl
<i>reverse</i> -Primer (10mM)	3 µl
DNA-Matrize	0,5 µl oder 1 µl
KOD-Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Temperaturprofil:

Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	40 sek	
Annealing	t _A	20 sek	25 Zyklen
Elongation	72°C	t _E	
Amplifikation	72°C	10 min	

Die verwendete Annealing-Temperatur t_A wurde 2°C unter der Schmelztemperatur der Primer gewählt, die Elongationszeit t_E richtete sich nach der Größe des erwarteten Amplifikats, wobei je 1000 Basenpaare 30 Sekunden veranschlagt wurden.

Vor der Weiterverwendung wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Hierbei wurden immer vier identische PCR-Ansätze vereinigt, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Die Elution erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer.

6.4.2.2. PCR für Epitopmarkierungen und Deletionen durch homologe Rekombination

Um Hefegene zu deletieren, mit einem Epitop zu versehen oder einen Promotor- oder Markeraustausch durchzuführen, kann das pFA6a (Longtine *et al.*, 1998) und seine Erweiterung pFALink (Sheff *et al.*, 2004) eingesetzt werden. Die verwendeten Primer zeichnen sich durch eine 45-50 Basen lange Sequenz am 5'-Ende aus, die homolog zur gewünschten Zielsequenz (Integrationsort) im Hefegenom ist. Das 3'-Ende der Primer besteht aus 18-20 Basen, die homolog zum pFA-Plasmid sind, das als Matrize dient. Für PCR-Ansatz und Temperaturprofil s. 7.4.2.1. Als Matrize wurde 1 µl einer 1:5 vorverdünnten Lösung des pFA-Plasmids eingesetzt. Als Annealingtemperatur wurde 54°C gewählt. In der Regel wurden vier Ansätze vereinigt, um eine größere Ausbeute nach der Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit zu erhalten. Die Elution erfolgte in 30 µl Elutionspuffer.

6.4.2.3. PCR für ortsspezifische Mutagenese

Ziel ist die Einführung einer spezifischen Mutation im gewünschten Hefegen. Hierfür wurde ein komplementäres Primerpaar mit einer Gesamtlänge von ca. 50 Basen verwendet, welches mittig die Mutation trägt und in den umgebenden Bereichen homolog zur Zielsequenz ist. Als Matrize wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Bei dieser Methode wird das gesamte Plasmid amplifiziert, wobei die Mutation über die Primer eingeführt wird.

Ansatz:

10x KOD-Puffer	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	3 µl
dNTP-MIX (2 mM)	5 µl
<i>forward</i> -Primer (10 mM)	3 µl
<i>reverse</i> -Primer (10mM)	3 µl
DNA-Matrize	1 µl
KOD-Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Temperaturprofil:

Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	40 sek	
Annealing	50°C	20 sek	15 Zyklen
Elongation	72°C	1 min/ 1000 BP	
Amplifikation	72°C	10 min	

Nach der Amplifikation erhält man ein Gemisch aus mutagenisiertem PCR-Produkt und Ausgangsmatrize. Um die Ausgangsmatrize zu entfernen, kann die *dam*-Methylierung benutzt werden. Da die Matrize aus *E. coli* DH5 α isoliert wurde, trägt sie eine Methylierung am Adenin in der Sequenz 5'-GATC-3'. Diese Konfiguration dient als Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *DpnI*. Die methylierte Matrize kann durch Restriktionsverdau mit *DpnI* geschnitten werden, das unmethylierte PCR-Produkt hingegen nicht. Vor der Transformation von DH5 α mit dem PCR-Produkt (s. 7.1.2) wurde deshalb ein *DpnI*-Verdau durchgeführt (s. 7.4.3).

6.4.2.4. Analyse des Paarungstyps (MAT-PCR)

Um den Paarungstyp eines Hefestamms zu untersuchen, kann der *MAT*-Locus (*mating type*) auf Chromosom III mittels PCR analysiert werden (Huxley et al., 1990). Dabei wird ein Gemisch aus drei verschiedenen Primern benutzt. Ein Primer bindet außerhalb des *MAT*-Locus (WS826), ein Primer bindet spezifisch innerhalb der *MAT α* -Sequenz (WS828) und der dritte Primer bindet spezifisch innerhalb der *MAT α* -Sequenz (WS827). Durch die Wahl dieser Primer entstehen je nach Paarungstyp des Hefestamms unterschiedlich große PCR-Produkte (544 Basenpaare *MAT α* , 404 Basenpaare *MAT α* , beide Produkte bei diploiden Zellen), wodurch eine eindeutige Bestimmung des Paarungstyps möglich ist.

Wenig Zellmaterial des zu untersuchenden Hefestamms wurde in 5 μ l H₂O in einem PCR-Tube resuspendiert. Anschließend wurde der PCR-Ansatz zugegeben.

Ansatz:

10x Kol.puffer (incl. 15 mM MgCl ₂)	2,5 μ l
dNTP-Mix (2 mM)	2,5 μ l
Primer-Mix (WS826/827/828) (jew. 10 μ M)	3 μ l
Taq-Polymerase	0,3 μ l
H ₂ O	ad 20 μ l

Temperaturprofil:

Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	1 min	
Annealing	55°C	1 min	35 Zyklen
Elongation	72°C	40 sek	
Amplifikation	72°C	3 min	

Zur Analyse des PCR-Produkts wurden 15 µl auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

6.4.3. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzen. Dies wurde zum einen benutzt, um bei Klonierungen im Vektor und Insert zueinander kompatible Enden zu erzeugen, zum anderen wurde Plasmid-DNA vor der Hefetransformation linearisiert.

Ansatz:

DNA	1 µg Plasmid oder 10 µl gereinigtes PCR-Produkt
10x Restriktionspuffer (NEB)	2 µl
Enzym(e)	5 – 10 U
H ₂ O	ad 20 µl

Restriktionspuffer und Inkubationstemperatur wurden gemäß der Herstellerangaben (NEB) gewählt. Der Ansatz wurde für mindestens 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden zur Analyse 2 µl des Restriktionsverdaus auf ein Agarosegel aufgetragen.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit besteht bei der Überprüfung von Klonierungen, da durch die definierte DNA-Sequenz des Plasmids und der für den Testverdau ausgewählten Restriktionsenzyme spezifische DNA-Fragmente erwartet werden, deren Erhalt durch Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese bestätigt wurde.

Ansatz:

DNA	1 µg Plasmid
10x Restriktionspuffer	1 µl
Enzym(e)	1 – 5 U
H ₂ O	ad 10 µl

Zur Analyse wurde der komplette Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen.

6.4.4. Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten. Hierzu bedient man sich der Tatsache, dass DNA als Poly-Anion im elektrischen Feld zur Anode wandert. Dies geschieht in Abhängigkeit der Größe des DNA-Fragments, so dass kleinere Fragmente im elektrischen Feld bei konstanter Spannung schneller wandern als größere Fragmente (Ausubel et al., 2005). Um die DNA-Fragmente im Gel zu visualisieren, wurde Ethidiumbromid benutzt, welches im Abstand von 10 Basenpaaren in die DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert.

Üblicherweise wurde 1% Agarose in 40 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt möglichst luftblasenfrei in eine Gießvorrichtung gegossen, wobei durch Einsetzen eines Kammes Taschen für die Probenaufnahme ausgespart wurden. Nach dem Erkalten wurde das Gel auf einem Schlitten in die Probenkammer mit 1x TAE als Laufpuffer überführt. Die zu analysierende DNA-Lösung wurde mit 10x Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Als Größenstandard dienten 5 µl GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 80 V für 45 – 60 min. Anschließend wurde das Bandenmuster unter UV-Licht dokumentiert.

6.4.5. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe aus Agarosegelen zu isolieren, wurde die entsprechende Bande aus dem Gel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben extrahiert. Die Elution erfolgte in 30 µl Elutionspuffer.

6.4.6. Ligation

DNA-Fragmente, die nach einem Restriktionsverdau kompatible Enden aufweisen, können durch den Einsatz von Ligasen miteinander verbunden werden. Hierfür wurde ein fünffacher Überschuss des Inserts im Vergleich zum Vektor eingesetzt. Die relativen Mengen von Vektor und Insert wurden anhand der Intensitätsunterschiede im Agarosegel und der Größe der DNA-Fragmente abgeschätzt. Der Ligationsansatz wurde mindestens 3 h, meist jedoch über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Ansatz:

Vektor-DNA	1 µl
Insert-DNA	max. 5 µl
10x T4-Ligasepuffer (incl. ATP)	1 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

6.4.7. Sequenzierung

Sequenzierungen dienten zur Kontrolle der bei PCR-Reaktionen erhaltenen Amplifikate. Hierzu wurden die PCR-Produkte zunächst in den Sequenziervektor pBluescriptIIKS+ (Stratagene) kloniert und in *E. coli* DH5 α amplifiziert. Nach der Plasmidisolation (s. 7.4.1.2 MINI), wurde die Konzentration der DNA-Lösung bestimmt. Als Primer für die Sequenzierreaktion diente WS84 oder WS85.

Ansatz:

Plasmid-DNA	600 – 700 ng
Primer (10 μ M)	2 μ l
H ₂ O	ad 7 μ l

Die Sequenzierung wurde von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm BioEdit Sequence Alignment Editor.

6.5. Proteinanalytische Methoden

6.5.1. Zellaufschluss und Reinigung von Proteinen aus *E. coli*

6.5.1.1. Testexpression

Zur Bestimmung des Expressionslevels von Transformanden des *E. coli* Stamms BL21Codon+ wurde zuerst eine Testexpression durchgeführt. Hierzu wurden je vier Transformanden in 5 ml LB_{Amp, Chl} in einer Übernachtskultur bei 25°C angezogen. Am nächsten Morgen wurden 2 OD Zellen geerntet, in 75 μ l His- oder MBP-Waschpuffer resuspendiert und mit 75 μ l 2xLSB für 15 min bei 100°C aufgekocht. Zur restlichen Kultur wurden 0,2% Rhamnose zur Induktion des *rha*-Promotors zugegeben. Nach vier Stunden bei 25°C wurden erneut 2 OD Zellen geerntet, resuspendiert und aufgekocht. Jeweils 10 μ l Überstand wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Dadurch konnte das Bandenmuster der induzierten und nicht-induzierten Proben verglichen und die Transformanden mit dem höchsten Expressionslevel ausgewählt werden.

6.5.1.2. Zellaufschluss mittels French Press

Die bei der Testexpression ausgewählten BL21Codon+ -Transformanden wurden in 50 ml LB_{Amp, Chl} über Nacht bei 37°C angezogen, am nächsten Morgen zu 0,1 OD in 1 l LB_{Amp, Chl} verdünnt und bei 20 - 22°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Expression mit 0,2% Rhamnose induziert und die Kultur über Nacht bei 20 – 22°C weiter inkubiert.

Die Kultur wurde vollständig in GSA-Zentrifugenbechern geerntet (4000 Upm, 10 min, 4°C) und in 25 ml H₂O je Zentrifugenbecher resuspendiert. Der Inhalt von je zwei Zentrifugenbechern wurde in einer

50 ml-Falconröhre vereinigt, die Zellen wurden pelletiert (4000 Upm, 10 min) und bei -70°C eingefroren.

Zur Reinigung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 20 ml kaltem His- oder MBP- Waschpuffer (je nach Reinigung) gründlich resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mit der French Press in der großen Zelle (drei Durchgänge). Anschließend wurde das Lysat in SS34-Röhrchen zentrifugiert (15000 Upm, 15 min, 4°C) und der Überstand mit einer 60 ml-Spritze und einem Celluloseacetat-Filter filtriert. 50 µl Lysat wurden mit 50 µl 2xLSB versetzt und für 15 min bei 100°C aufgeköcht.

6.5.1.3. Reinigung von 6xHis-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von ^{His6}Net(1-455), ^{His6}Net(1-341), ^{His6}Net(1-233) und ^{His6}Net(234-455) wurden Lysate aus je 500 ml LB_{Amp, Chl}-Kulturvolumen hergestellt (s. 7.5.1.2). Je Ansatz wurden 3 ml *His Affinity Purification*-Säulenmaterial (Sigma) zunächst mit 20 ml H₂O, dann mit 20 ml His-Waschpuffer gewaschen (2000 Upm, 2 min) und anschließend mit dem kompletten Lysat gemischt. Die Proben wurden 24h bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 20 ml His-Waschpuffer (2000 Upm, 2 min), der Bradford-Schnelltest zeigte dann keine Blaufärbung mehr an. Die Proben wurden anschließend mit 1 ml His-Elutionspuffer (250 mM Imidazol) versetzt, das Säulenmaterial gleichmäßig auf zwei 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und kurz abzentrifugiert (13200 Upm, 12 sek). Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt. Dies wurde so lange fortgesetzt bis der Bradford-Schnelltest keine Blaufärbung mehr zeigte. Die Elutionsfraktion mit dem höchsten Proteingehalt wurde ausgewählt und die Proteinkonzentration mittels BSA-Eichgerade (0,1 – 1,0 mg/ml BSA) und Bradford-Test bestimmt.

6.5.1.4. Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Die Reinigung von ^{MBP}Cdc14 erfolgte analog zur Reinigung der ^{His6}Net-Fragmente, jedoch wurden hier 2 ml Amylose-Resin mit 20 ml H₂O und 20 ml MBP-Waschpuffer gewaschen und dem Lysat zugesetzt. Die Waschschrte wurden mit MBP-Waschpuffer durchgeführt, die Elution erfolgte mit MBP-Elutionspuffer (10 mM Maltose, 1 mM DTT).

6.5.2. Proteinlysate aus Hefe

Hefezellen wurden unter Verwendung von Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. Hierzu wurden 10 OD Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur geerntet (2000 Upm, 2 min), in 1 ml kaltem H₂O resuspendiert und in ein Schraubdeckelgefäß mit 100 µl Glasperlen überführt. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert (13200 Upm, 15 sek) und der Überstand möglichst vollständig entfernt. Bei Bedarf

wurden die Zellen bei -70°C eingefroren. Eingefrorene Proben wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 120 µl Aufschlusspuffer (Puffer 3 mit 60 mM β -Glycerolphosphat) erfolgte der Aufschluss der Zellen für 5 min in der Retschmühle (4°C, maximale Frequenz). Anschließend wurden die Proben in der Kühlzentrifuge zentrifugiert (13200 Upm, 5 min, 4°C). 50 µl Überstand wurden mit 50 µl 2xLSB versetzt und für 15 min bei 100°C aufgeköcht. Zusätzlich wurden 5 µl Überstand zur Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test entnommen. Die aufgeköchten Proteinlysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

6.5.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

6.5.3.1. Bradford-Test

Der Bradford-Test dient zum quantitativen Nachweis von Proteinen in Lösungen. Er beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximums des an die Proteine gebundenen Farbstoffs Coomassie-Blau. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt.

Hierfür wurden 5 µl Proteinlysate zunächst 1:10 in H₂O in einem Reaktionsgefäß verdünnt. 5 µl dieser Verdünnung wurden in einer Küvette mit 495 µl H₂O gemischt und mit 500 µl Bradford-Reagenz versetzt. Als Referenz wurden 500 µl H₂O mit 500 µl Bradford-Reagenz gemischt. Alle Ansätze wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm („OD₅₉₅“) am Photometer gemessen. Nach der Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen wurde der Kehrwert der gemessenen OD₅₉₅ benutzt, um vergleichbare Proteinmengen für die SDS-Gelelektrophorese oder die Immunpräzipitation einzusetzen. Bei der Herstellung von Lysaten aus BL21Codon+ wurde zur Bestimmung der erhaltenen Proteinkonzentration eine BSA-Eichgerade erstellt. Hierzu wurden BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml ausgehend von einer 10 mg/ml Stammlösung (NEB 100x BSA) hergestellt und im Bradford-Test gemessen.

6.5.3.2. Bradford-Schnelltest zur Verfolgung von Proteinreinigungen

Der Bradford-Schnelltest wurde verwendet, um während des Verlaufs der Proteinreinigung aus E. coli BL21Codon+ verfolgen zu können, in welchen Wasch- oder Elutionsfraktionen Proteingehalt nachweisbar ist. Hierzu wurden in den Wells einer Mikrotiterplatte je 100 µl Bradford-Reagenz vorgelegt und mit 5 µl der zu testenden Fraktion versetzt. Die Intensität der resultierenden Blaufärbung gab Aufschluss über den relativen Proteingehalt der getesteten Fraktion.

6.5.4. Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) können gezielt Proteine aus einem Gesamtzellextrakt (WCE - *whole cell extract*) gereinigt werden. Hierzu wird ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch gegen das

zu präzipitierende Protein oder gegen ein mit diesem Protein fusioniertes Epitop gerichtet ist. Die schwere Kette des genutzten Antikörpers kann von Protein A aus *Staphylococcus aureus* gebunden werden. Durch Kopplung von Protein A an eine Agarose-Matrix ist es möglich das gewünschte Protein durch Sedimentation zu präzipitieren. Diese Methode kann benutzt werden, um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren (Co-Immunpräzipitation, Co-IP s. 7.5.4.1) oder posttranslationale Modifikationen zu analysieren (z.B. Phosphorylierung durch Behandlung mit λ -Phosphatase, s. 7.5.4.2). 100 OD Zellen einer exponentiell wachsenden Hefekultur (OD_{600} 0,5 – 1,0) wurden geerntet (2000 Upm, 2 min) und mit 5 ml kaltem H_2O gewaschen. Gegebenenfalls wurden die Zellen bei $-70^\circ C$ eingefroren. Eingefrorene Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Um die Degradation der Proteine durch Proteasen möglichst gering zu halten, wurde stets auf Eis und in vorgekühlten Geräten gearbeitet. Das Zellpellet wurde in 480 μl kaltem Aufschlusspuffer (Puffer 3 mit 60 mM β -Glycerolphosphat) resuspendiert und auf vier Schraubdeckelgefäße mit je 100 μl Glasperlen gleichmäßig aufgeteilt. Der Aufschluss erfolgte bei $4^\circ C$ für 5 min in der Retschmühle (maximale Frequenz). Anschließend wurden die Proben in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert (13200 Upm, 10 min, $4^\circ C$), die Überstände zusammengehöriger Proben in einem frischen Reaktionsgefäß vereinigt und erneut abzentrifugiert (13200 Upm, 15 min, $4^\circ C$). 5 μl Überstand wurden in den Bradford-Test eingesetzt, um die Proteinkonzentration zu bestimmen. 50 μl Überstand wurden mit 50 μl 2xLSB versetzt, für 15 min bei $100^\circ C$ aufgekocht und anschließend bei $-20^\circ C$ aufbewahrt (=WCE). Für die IP wurden anhand der gemessenen OD_{595} gleiche Proteinmengen (100 – 200 OD_{595}) in 420 μl Aufschlusspuffer eingestellt (z.B. $150/\text{gemessene } OD_{595} = \text{einzusetzendes Volumen in } \mu l$). Zu den Ansätzen wurde anschließend ein geeigneter Antikörper zugegeben, z. B. 80 μl 9E10 (α -Myc), 5 μl 9E10 gereinigt (α -Myc) oder 80 μl 1:100 vorverdünnter M2 (α -Flag). Die Proben wurden für 2 h bei $4^\circ C$ inkubiert. 50 μl Protein A-Agarose je Ansatz wurden zweimal mit je 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen, in Aufschlusspuffer aufgenommen und auf die Ansätze verteilt. Die Proben wurden für 2 h bei $4^\circ C$ gerollert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert (13200 Upm, 10 sek), der Überstand abgenommen und die Proben je nach Anwendung weiterverarbeitet.

Zur Präzipitation von Proteinen mit dem Flag-Epitop wurden zum Teil α -Flag-Beads (Sigma) verwendet. Hierbei wurden die Zellen wie beschrieben aufgeschlossen und der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Für die IP wurden anhand der gemessenen OD_{595} gleiche Proteinmengen (100 – 200 OD_{595}) in 450 μl Aufschlusspuffer eingestellt. 50 μl α -Flag-Beads je Ansatz wurden zweimal mit je 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen, in Aufschlusspuffer aufgenommen und auf die Ansätze verteilt. Die Proben wurden bei $4^\circ C$ für 3 – 4 h gerollert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert (13200 Upm, 10 sek), der Überstand abgenommen und die Proben je nach Anwendung weiterverarbeitet.

6.5.4.1. Coimmunpräzipitation

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde die präzipitierte Protein A-Agarose dreimal mit je 500 µl Aufschlusspuffer gewaschen. Dabei wurde jeweils ein kleines Volumen Puffer als Überstand belassen und erst nach dem letzten Waschschriff mit einer Hamilton-Spritze vollständig entfernt. Das Präzipitat wurde in 35 µl 1x LSB aufgenommen und für 10 – 15 min bei 100°C unter häufigem, vorsichtigem Resuspendieren aufgeköcht. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot. Hierfür wurden gleiche Mengen der Gesamtzellextrakte (WCE), 5 µl Überstand des Präzipitats zur Überprüfung der Präzipitation (IP) und 10 µl Überstand des Präzipitats zum Nachweis des Interaktionspartners (Co-IP) nebeneinander auf ein SDS-Gel aufgetragen.

6.5.4.2. λ-Phosphatase-Behandlung

Die in der IP präzipitierte Protein A-Agarose wurde zunächst zweimal mit je 1 ml Puffer 3 (ohne β-Glycerolphosphat) und einmal mit 1 ml λ-Phosphatase-Puffer gewaschen. Für den letzten Waschschriff wurde die Probe möglichst gleichmäßig auf zwei Ansätze verteilt, abzentrifugiert (13200 Upm, 10 sek) und der Überstand vollständig mit der Hamilton-Spritze entfernt. Zu einem Ansatz wurden 50 µl λ-Phosphatase-Puffer (Kontrolle), zum anderen Ansatz 49 µl λ-Phosphatase-Puffer und 1 µl λ-Phosphatase (400 U/µl) zugegeben. Beide Ansätze wurden für 1 h bei 30°C im Heizblock inkubiert und dabei gelegentlich durch Antippen resuspendiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (13200 Upm, 10 sek) und zweimal mit je 500 µl λ-Phosphatase-Puffer gewaschen. Dabei wurde etwas Puffer als Überstand belassen und erst nach dem zweiten Waschschriff vollständig mit der Hamilton-Spritze entfernt. Zuletzt wurde das Präzipitat in 45 µl 1x LSB aufgenommen, für 10 – 15 min bei 100°C aufgeköcht und dabei regelmäßig durch Antippen resuspendiert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

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

Bei dieser Methode werden denaturierte Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt (Ausubel *et al.*, 2005). Durch die stöchiometrische Anlagerung von negativ geladenen SDS-Molekülen wandern Proteine im elektrischen Feld zur Anode, wobei kleinere Proteine im Polyacrylamid-Gel schneller wandern als größere Proteine. Das verwendete Polyacrylamid-Gel setzt sich aus zwei Abschnitten zusammen (Sammelgel und Trenngel), die sich bezüglich der Polyacrylamid-Konzentration und des pH-Werts unterscheiden. Die Proben durchlaufen zunächst das Sammelgel, wobei sie konzentriert werden, so dass die Proteine anschließend nach dem Übertritt der Proben in das Trenngel in distinkten Banden nach Größe aufgetrennt werden können.

Ansatz:

Trenngel		9%	12%
	H ₂ O	2,6 ml	
	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,5 ml	
	Acrylamid-Mix	1,8 ml	
	10% SDS	60 µl	
	10% APS	36,5 µl	
	TEMED	3,65 µl	
Sammelgel			
	H ₂ O	1,5 ml	
	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	625 µl	
	Acrylamid-Mix	335 µl	
	10% SDS	25 µl	
	10% APS	25 µl	
	TEMED	2,5 µl	

Als Acrylamid-Mix wurde eine 30% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung mit einem Verhältnis von 37,5 : 1 verwendet. APS und TEMED wurden unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben, um die Polymerisation zu starten. Zunächst wurde das Trenngel zwischen mit Gummi abgedichtete Glasplatten gegossen und dabei ca. 6 cm hoch eingefüllt. Das Trenngel wurde mit 1 ml Isopropanol überschichten, um Luftblasen zu entfernen und das Austrocknen des Gels zu verhindern. Nach ca. 20 min wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel eingefüllt. Dabei wurde ein Kamm zur Aussparung von Taschen für die spätere Probenauftragung luftblasenfrei eingesetzt. Gegossene Gele wurden entweder sofort verwendet oder in feuchtes Küchenpapier eingeschlagen und in einer Plastiktüte im Kühlschrank maximal drei Tage bis zur Verwendung aufbewahrt.

Bei der Auftragung von Proteinlysaten aus Hefe wurde darauf geachtet, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Dazu wurde das Ergebnis des Bradford-Tests benutzt, wobei das aufzutragende Volumen in µl als Kehrwert der OD₅₉₅ berechnet wurde („Auftragen von 1 OD₅₉₅“). Die Auftragsmenge wurde zwischen 1,0 – 3 OD₅₉₅ variiert. Als Größenstandard diente der ColourPlus Proteinmarker (NEB). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 20 – 25 mA pro Gel mit 1x Turbo-LRB als Laufpuffer. Der Lauf wurde gestoppt, sobald die blaue Lauffront des Ladepuffers (LSB) das Gel verlassen hatte. Das Sammelgel wurde verworfen und nur das Trenngel zur weiteren Analyse entweder mit Coomassie gefärbt oder mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und durch spezifischen Antikörper-Nachweis analysiert.

6.5.6. Färbung von SDS-Gelen

6.5.6.1. Coomassie-Färbung

Die Färbung von SDS-Gelen nach der Gelelektrophorese wurde benutzt, um bei Testexpressionen induzierte und nicht-induzierte Proben zu vergleichen, um bei Proteinreinigungen die Reinheit der Fraktionen zu beurteilen und um mittels BSA-Eichgerade und Intensitätsmessung der Signale den Proteingehalt ausgewählter Banden quantitativ zu bestimmen.

Hierzu wurde das Trenngel in eine Plastikschaale überführt und dreimal für 5 min mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 15 min mit ca. 10 ml Coomassie-Lösung geschwenkt und erneut mindestens dreimal für 5 min mit H₂O gewaschen. Zur Dokumentation wurde das gefärbte Gel je nach Verwendung entweder am Computer oder am LI-COR Odyssey (680 nm-Kanal, Focus-Offset 0,5 µm bei Einstellung „Proteingel“) eingescannt.

6.5.6.2. Intensitätsmessungen mit ImageJ zur Konzentrationsbestimmung von Proteinbanden

Um bei Proteinreinigungen den Proteingehalt ausgewählter Banden quantitativ zu bestimmen, wurde eine BSA-Eichgerade erstellt, wobei 0,1 µg, 0,25 µg, 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg, 4,0 µg und 6,0 µg BSA ausgehend von einer 10 mg/ml BSA-Lösung (NEB 100x BSA) aufgetragen wurden. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Trenngel mit Coomassie gefärbt und am LI-COR Odyssey eingescannt (680 nm-Kanal, Focus-Offset 0,5 µm bei Einstellung „Proteingel“). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Laserintensität so gewählt wurde, dass keine gesättigten Pixel auftraten. Zur Messung der Pixelintensitäten ausgewählter Banden wurde das Programm ImageJ benutzt. Die Intensitäten (*RawIntegratedDensity*) der BSA-Banden und der zu bestimmenden Proteinbanden aus den Elutionsfraktionen wurden gemessen und anhand der aufgetragenen BSA-Menge auf Konzentrationsangaben rückgerechnet. Diese wurden anschließend benutzt, um die Elutionsfraktionen auf gleiche Konzentrationen einzustellen.

6.5.7. Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Beim Western Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zunächst durch Anlegung einer konstanten Spannung in einer Blotting Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend können einzelne Proteine spezifisch über Antikörper, die gegen sie oder ein mit ihnen fusioniertes Epitop gerichtet sind, nachgewiesen werden.

Auf die Anode der Blotting-Apparatur wurde zuerst ein in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier (GB005) gelegt. Die Nitrocellulose-Membran wurde zuerst in Wasser getränkt, dann in Transferpuffer geschwenkt und auf das Whatman-Papier gelegt. Darauf folgte das in Wasser gewaschenen SDS-Gel

und zum Schluss wiederum ein in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier. Mit einem Trigalski-Spatel wurden Luftblasen entfernt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 40 mA je Gel für 70 min. Befand sich nur ein Gel in der Apparatur, wurde der Transfer bei 60 mA für 90 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit ca. 10 ml PonceauS-Lösung überschichtet, für 5 min auf der Wippe geschwenkt und so lange mit Wasser gewaschen bis die Banden gut sichtbar waren. Die Färbung wurde durch Einscannen dokumentiert, um die gleichmäßige Beladung des Gels und die Qualität der Proteinlysate begutachten zu können. Dann wurde die Membran in eine Plastikschiene überführt und mit 10 ml Milchpulverlösung (5% Magermilchpulver in TBS-T) für 1 h auf der Wippe inkubiert, um die Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und dadurch unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. Die Milchpulverlösung wurde entfernt, der primäre Antikörper in einer geeigneten Verdünnung in 10 ml Milchpulverlösung zugegeben und über Nacht bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 min bei Raumtemperatur mit jeweils 10 ml TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper in einer 1:15000-Verdünnung in 10 ml Milchpulverlösung zugegeben und für mindestens 2 h bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Es kamen sekundäre Antikörper zum Einsatz, die an ein Fluorophor gekoppelt waren (LI-COR). Die Anregung der Fluorophore erfolgte am LI-COR Odyssey Imager, die Fluoreszenz wurde bei 700 bzw. 800 nm detektiert. Die Auswertung erfolgte entweder mit der LI-COR Odyssey Software oder mit ImageJ.

6.6. Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast Two Hybrid* – Y2H)

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine weitere Methode, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu analysieren (Ausubel *et al.*, 2005). Hierbei macht man sich zu Nutze, dass Transkriptionsfaktoren meist aus zwei Domänen bestehen, wobei eine Domäne die DNA-Bindung vermittelt, während die andere Domäne als Transkriptionsaktivator fungiert. Im Y2H wird nun eines der zu untersuchenden Proteine an die DNA-Bindedomäne, das andere an die Transkriptionsaktivationsdomäne fusioniert. Nur wenn die beiden Proteine miteinander interagieren, kommt es zur Ausbildung eines funktionalen Komplexes aus DNA-Bindedomäne und Transkriptionsaktivationsdomäne, welcher dann als Transkriptionsaktivator wirken kann. Dies lässt sich über die Aktivierung geeigneter Reportergene visualisieren.

Das Y2H-System wurde verwendet, um die Interaktion von N-terminalen Net1-Fragmenten mit Fob1 zu testen. Hierfür wurden von den Vektoren pEG202 (LexA-Bindedomäne, 2µ, *HIS3*) und pJG4-5 (Transkriptionsaktivationsdomäne, 2µ, *TRP1*) abgeleitete Plasmide verwendet. Als Reporterstamm diente W276. Dieser Stamm enthält zwei Reportergene unter Kontrolle des *lexA*-Operators, zum einen

ein funktionales β -Galaktosidase-Gen (*ura3-52::lexAop-lacZ-URA3*) und zum anderen ein Markergen für Leucin-Prototrophie (*leu2::lexAop-LEU2*). Die resultierende Aktivität der β -Galaktosidase kann durch den Einsatz chromogener Substrate (X-Gal) nachgewiesen werden. X-Gal (5-Brom-4chlor-3-indoxyl- β D-galactopyranosid) wird von der β -Galaktosidase gespalten, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Die Expression des *LEU2*-Markers kann durch Test des Wachstums auf Selektivplatten ohne Leucin visualisiert werden.

Der Reporterstamm W276 wurde mit geeigneten Kombinationen von pEG202- und pJG4-5-Derivaten co-transformiert. Die Transformanden wurden auf SD-His-Trp-Platten selektiert. Sechs Transformanden je zu testender Kombination wurden in 150 μ l H₂O in einer Mikrotiterplatte resuspendiert und auf SD-His-Trp (Vorratsplatte), SRG-His-Trp und SSG-His-Trp (Testplatten für den X-Gal-Assay) sowie SRG-His-Trp-Leu und SSG-His-Trp-Leu (Testplatten für den Wachstumstest) gestempelt. Die Platten wurden für 2 – 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Platten für den X-Gal-Assay wurden anschließend mit X-Gal-Agar überschichtet (Rupp, 2002) und für 6 h bei 30°C inkubiert.

Ansatz:

1% Agar (aufgekocht, kurz abgekühlt)	5 ml
1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0	5 ml
DMFA	600 μ l
10% SDS	100 μ l
X-Gal (20 mg/ml in DMFA)	100 μ l

Zur Intensivierung der Blaufärbung wurden die Platten anschließend über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die Färbung der Platten sowie die Platten für den Wachstumstest wurden fotografisch dokumentiert.

6.7. Phosphatase-Assay zur Bestimmung der Cdc14-Aktivität

Die Phosphatase-Aktivität von Cdc14 kann in vitro mit *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat analysiert werden (Taylor *et al.*, 1997). Para-Nitrophenylphosphat wird durch die Dephosphorylierung zu einem gelben Produkt (*para*-Nitrophenol) umgesetzt, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Zunächst wurde die spezifische Aktivität von gereinigtem ^{MBP}Cdc14 bestimmt. Hierzu wurden steigende Mengen an ^{MBP}Cdc14 (1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 7,5 μ g, 10 μ g und 20 μ g) mit 20 mM pNPP für 15 min bei 30°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 0,25 M NaOH abgestoppt und die Absorption bei 405 nm am Photometer bestimmt. Die Enzymaktivität berechnete sich folgendermaßen:

$$A_{\text{Cdc14}} = \frac{OD_{405} \cdot V}{\varepsilon_{\text{pNP}} \cdot d \cdot t \cdot n_{\text{Cdc14}}} \quad \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \mu\text{mol}} \right]$$

OD_{405}	gemessene Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$
V	Reaktionsvolumen (1 ml)
ε_{pNP}	molarer Extinktionskoeffizient von para-Nitrophenol bei 405 nm ($1,74 \cdot 10^4 \frac{1}{\text{M} \cdot \text{cm}}$)
D	Dicke der Küvette (1 cm)
t	Inkubationszeit (15 min)
n_{Cdc14}	eingesetzte Stoffmenge des Enzyms ($n_{\text{Cdc14}} = \frac{m_{\text{Cdc14}}}{M_{\text{Cdc14}}}$; $M_{\text{Cdc14}} = 104,5 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$)

Um die Inhibitionsfähigkeit der gereinigten Net1-Fragmente $^{\text{His6}}\text{Net1}(1-455)$, $^{\text{His6}}\text{Net1}(1-341)$, $^{\text{His6}}\text{Net1}(1-233)$ und $^{\text{His6}}\text{Net1}(234-455)$ auf die Cdc14-Aktivität zu testen, wurden $5 \mu\text{g}^{\text{MBP}}\text{Cdc14}$ (= 47,85 pmol) mit steigenden Stoffmengen an potentiellm Inhibitor versetzt (5 – 200 pmol) und die Aktivität von Cdc14 wie oben beschrieben bestimmt.

6.8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) ist eine Methode zum Nachweis von Protein-DNA- oder Protein-RNA-Interaktion (Ausubel *et al.*, 2005). Dabei wird das gereinigte Protein mit einem DNA-Fragment bekannter Länge und Sequenz inkubiert. Die Probe wird auf ein Agarose-Gel aufgetragen und das Laufverhalten des DNA-Fragments im elektrischen Feld analysiert. Interagiert das Protein mit dem DNA-Fragment, kommt es zu einer Veränderung des Laufverhaltens, das DNA-Fragment wandert im Gel langsamer (sog. *band shift*) als ein ungebundenes Fragment.

Um die DNA-Bindefähigkeit der gereinigten Net1-Fragmente $^{\text{His6}}\text{Net1}(1-455)$, $^{\text{His6}}\text{Net1}(1-341)$, $^{\text{His6}}\text{Net1}(1-233)$ und $^{\text{His6}}\text{Net1}(234-455)$ an Bereiche der rDNA zu analysieren, wurden steigende Mengen an Protein (0,0625 μg – 1 μg) mit 100 ng DNA inkubiert und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Es wurden zwei rDNA-Abschnitte getestet, zum einen ein 400 Basenpaare langes Fragment aus der NTS1-Region, zum anderen ein 400 Basenpaare langes Fragment aus der kodierenden Region (*RDN37*).

Zur Analyse der RNA-Bindefähigkeit der Net1-Fragmente wurden steigende Mengen an Protein (0,0625 µg – 1 µg) mit 100 ng tRNA (Mix aus 80 Bp t-RNAs) inkubiert und auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Für die Kompetitionsanalyse zwischen DNA- und RNA-Bindung wurden steigende Mengen an ^{His6}Net1(1-233) (0,0625 µg – 1 µg) mit 100 ng DNA (*RDN37*) und 100 ng tRNA-Mix inkubiert und auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

7. MATERIAL

7.1. Hefestämme

Name	MAT	Relevanter Genotyp	Quelle
K699	a	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3, ssd1delta?, can1-100, [psi+], ho</i>	Sammlung
K700	α	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3, ssd1delta?, can1-100, [psi+], ho</i>	Sammlung
W276	α	<i>his3, trp1, ura3-52::URA3-lexA-op-lacZ, leu2::pLEU2-lexA-op</i>	Sammlung
W7178		<i>NET1-Flag12-HIS3MX6</i>	Sammlung
W9202	a	<i>NET1-Myc9-TRP1(K.I.) bar1delta::natMX4</i>	Sammlung
W10700	a	<i>NET1-GFP-HIS3MX6 HMO1-3mCherry-URA3</i>	diese Arbeit
W10702	a	<i>NET1-GFP-HIS3MX6 HMO1-3mCherry-URA3 fob1delta::kanMX6</i>	diese Arbeit
W10706	a	<i>FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W11397	a/α	<i>NET1-Flag12-HIS3MX6 NET1-Myc9-TRP1 (K.I.) BAR1/bar1delta::natMX4</i>	diese Arbeit
W11398	a	<i>CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W11402	a	<i>SIR2-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W11408	a	<i>NET1-Flag12-HIS3MX6 RPA43-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12509	a/α	<i>NET1/net1delta::HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC-LEU2</i>	diese Arbeit
W12512	a/α	<i>NET1/net1delta::HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC-LEU2</i>	diese Arbeit
W12533	a/α	<i>NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-tCYC-LEU2</i>	diese Arbeit
W12566	a/α	<i>NET1/NET1-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12567	a/α	<i>NET1/NET1(1-972)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12568	a/α	<i>NET1/NET1(1-693)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12569	a/α	<i>NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit

W12570	a/α	<i>NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12571	a/α	<i>NET1/NET1-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12572	a/α	<i>NET1/NET1(1-972)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12573	a/α	<i>NET1/NET1(1-693)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12574	a/α	<i>NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12575	a/α	<i>NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 SIR2/SIR2-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12576	a/α	<i>NET1/NET1-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12577	a/α	<i>NET1/NET1(1-972)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12578	a/α	<i>NET1/NET1(1-693)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12579	a/α	<i>NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12580	a/α	<i>NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12902	a/α	<i>leu2/leu2::pTEF2-Flag3-NET1(1052-1189)-tCYC-LEU2 RPA43/RPA43-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W12903	a/α	<i>leu2/leu2::pTEF2-Flag3-NET1(1052-1189)-tCYC-LEU2 RPA43/RPA43-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13067	a/α	<i>tCYC/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(MDM)-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 FOB1/fob1delta::kanMX6</i>	diese Arbeit
W13068	a/α	<i>tCYC/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(MDM)-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 RPA12/rpa12delta::kanMX6</i>	diese Arbeit
W13070	a/α	<i>tCYC/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(MTD)-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 FOB1/fob1delta::kanMX6</i>	diese Arbeit
W13071	a/α	<i>tCYC/tCYC1::pTEF2-GFP-NET1(MTD)-LEU2 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 RPA12/rpa12delta::kanMX6</i>	diese Arbeit
W13072	α	<i>leu2::pTEF2-Flag3-NET1(MDM)-tCYC-LEU2</i>	diese Arbeit
W13073	α	<i>leu2::pTEF2-Flag3-NET1(MDM)-tCYC-LEU2</i>	diese Arbeit
W13215		<i>leu2::pNET1-NET1(1-341)-GFP-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5-(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	Sammlung
W13468	a	<i>tCYC1::pNET1-NET1(1-341)-GFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit

W13469	a	<i>tCYC1::pNET1-NET1(1-341)-GFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit
W13470	a	<i>tCYC1::pNET1-NET1(1-341)-GFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit
W13477	a	<i>tCYC1::pNET1-NET1(1-147)-GFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit
W13478	a	<i>tCYC1::pNET1-NET1(1-147)-GFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit
W13479	a	<i>tCYC1::pNET1-NET1(1-147)-GFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit
W13484	a	<i>leu2::pNET1-NET1(1-147)-GFP-TCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	diese Arbeit
W13485	α	<i>NatNT2-pTEF1-NET1 leu2::pNET1-NET1(1-147)-GFP-TCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	diese Arbeit
W13486	α	<i>NatNT2-pTEF1-NET1(234-1189) leu2::pNET1-NET1(1-147)-GFP-TCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	diese Arbeit
W13487	α	<i>leu2::pNET1-NET1(1-196)-GFP-TCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	diese Arbeit
W13488	α	<i>NatNT2-pTEF1-NET1 leu2::pNET1-NET1(1-196)-GFP-TCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	diese Arbeit
W13489	a	<i>NatNT2-pTEF1-NET1(234-1189) leu2::pNET1-NET1(1-196)-GFP-TCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	diese Arbeit
W13491	a/α	<i>leu2/leu2::pTEF2-Flag3-NET1(1052-1189)-tCYC-LEU2 ADE2/ade2</i>	diese Arbeit
W13499	a	<i>tCYC1::pNET1-NET1(1-196)-GFP-tCYC1-LEU2 NOP56-3mCherry-URA3</i>	diese Arbeit
W13500	a	<i>tCYC1::pNET1-NET1(1-196)-GFP-tCYC1-LEU2 NOP56-3mCherry-URA3 fob1delta::kanMX6</i>	diese Arbeit
W13533	a/α	<i>NET1/NET1-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 ADE2/ade2</i>	diese Arbeit
W13534	a/α	<i>NET1/NET1(1-1051)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3</i>	diese Arbeit
W13535	a/α	<i>NET1/NET1(1-972)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3</i>	diese Arbeit
W13536	a/α	<i>NET1/NET1(1-693)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3</i>	diese Arbeit
W13537	a/α	<i>NET1/NET1(1-455)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3</i>	diese Arbeit
W13538	a/α	<i>NET1/NET1(1-341)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3</i>	diese Arbeit

W13539	a/α	<i>NET1/NET1(1-233)-GFP-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3</i>	diese Arbeit
W13680	a	<i>leu2::pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	diese Arbeit
W13681	α	<i>leu2::pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1 natNT2-pTEF1-NET1</i>	diese Arbeit
W13682	a	<i>leu2::pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1 natNT2-pTEF1-NET1(234-1189)</i>	diese Arbeit
W13684	a/α	<i>NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX4</i>	diese Arbeit
W13761	a/α	<i>NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-LEU2</i>	diese Arbeit
W13768	α	<i>ura3::pGAL1-NET1(234-455)-Flag3-tCYC1-URA3</i>	Sammlung
W13771	a/α	<i>ura3/ura3::pGAL1-NET1(234-455)-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13773	a	<i>ura3::pGAL1-NET1(1-233)-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13774	α	<i>ura3::pGAL1-NET1(234-455)-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13775	a	<i>ura3::pGAL1-NET1(1-455)-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13789	α	<i>ura3::pGAL1-NET1(234-455)-Flag3-tCYC1-URA3</i>	Sammlung
W13790	a/α	<i>ura3/ura3::pGAL1-NET1(234-455)S385D-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	Sammlung
W13791	α	<i>ura3::pGAL1-NET1(234-455)-Flag3-tCYC1-URA3</i>	Sammlung
W13792	a/α	<i>ura3/ura3::pGAL1-NET1(234-455)S447D-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	Sammlung
W13794	α	<i>ura3::pGAL1-Myc3-NET1(234-455)-YEGFP-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1</i>	Sammlung
W13893	α	<i>ura3::pGAL1-NET1(234-455)S385D S447D-Flag3-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit
W13894	a/α	<i>ura3/ura3::pGAL1-NET1(234-455)S385D S447D-Flag3-tCYC1-URA3 CDC14/CDC14-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13920	a/α	<i>NET1/NET1(1-1189)-Flag12-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 CDC14/CDC14-GFP-LEU2</i>	diese Arbeit

W13921	a/α	<i>NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 CDC14/CDC14-GFP-LEU2</i>	diese Arbeit
W13922	a/α	<i>NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 CDC14/CDC14-GFP-LEU2</i>	diese Arbeit
W13923	a/α	<i>NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 NOP56/NOP56-3mCherry-URA3 CDC14/CDC14-GFP-LEU2</i>	diese Arbeit
W13969	a/α	<i>NET1/NET1-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13970	a/α	<i>NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13971	a/α	<i>NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 FOB1/FOB1-Myc13-kanMX6</i>	diese Arbeit
W13972	a/α	<i>NET1/NET1-Flag12-HIS3MX6 ADE2/ade2</i>	diese Arbeit
W13973	a/α	<i>NET1/NET1(1-341)-Flag12-HIS3MX6 ADE2/ade2</i>	diese Arbeit
W13974	a/α	<i>NET1/NET1(1-233)-Flag12-HIS3MX6 ADE2/ade2</i>	diese Arbeit

7.2. Medien

7.2.1. Bakterienmedium

LB-Medium	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	NaOH	0,3 mM

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 1,7 % Agar zugesetzt. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml in 50% Ethanol, Endkonzentration 100 µg/ml) oder Chloramphenicol (Stammlösung 50 mg/ml in Ethanol, Endkonzentration 50 µg/ml in Flüssigmedium bzw. 34 µg/ml in Platten) zugegeben.

7.2.2. Hefemedien

XY-Vollmedium	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 (nach dem Autoklavieren)	20 g/l
Selektivmedium	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	100 ml/l
	10x Drop Out -5	100 ml/l
	Zucker	20 g/l
	Adenin	50 mg/l
	Histidin	50 mg/l
	Leucin	100 mg/l
	Tryptophan	100 mg/l
	Uracil	50 mg/l

Folgende Zucker wurden verwendet (autoklavierte Stammlösungen): 20% Glukose, 20% Galaktose, 10% Raffinose, 10% Saccharose. Zur Herstellung von Mediumsplatten wurden dem Flüssigmedium 1,7% Agar (w/v) zugesetzt.

Zur Selektion auf Auxotrophiemarker wurde Selektivmedium ohne die entsprechenden Aminosäuren oder Basen verwendet. Zur Bezeichnung der Medien wurden folgende Abkürzungen gewählt: Ade (A)= Adenin, His (H) = Histidin, Trp (T) = Tryptophan, Leu (L) = Leucin, Ura (U) = Uracil.

Zur Selektion über die G418-Resistenz wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 500 µg/ml (W303) und 200 µg/ml (S288c).

<i>live cell imaging</i>	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	100 ml/l
Mikroskopie-Agar	10x Drop Out ++	100 ml/l
	Glukose	20 g/l
Präsporulationsmedium (sterilfiltriert)	Bacto Pepton	3 g/l
	Bacto Yeast Extract	8 g/l
	Glukose	100 g/l
	Adeninsulfat	50 mg/l
Sporulationsmedium (sterilfiltriert)	Bacto Yeast Extract	1 g/l
	Glukose	0,5 g/l
	Kaliumacetat	10 g/l
	10x Drop Out ++	10 ml/l

Verwendete Stammlösungen zur Herstellung von Hefemedien:

Adenin	Adeninsulfat	5 g/l
Histidin		5 g/l
Tryptophan		10 g/l
Leucin		10 g/l
Uracil		2,5 g/l

10x Drop Out -5	Alanin	0,5 g/l
	Arginin	0,5 g/l
	Asparagin	0,5 g/l
	Aspartat	1,0 g/l
	Cystein	0,5 g/l
	Glutamin	0,5 g/l
	Glutamat	1,0 g/l
	Glycin	0,5 g/l
	(myo-)Inositol	0,5 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Lysin	0,5 g/l
	Methionin	0,5 g/l
	p-Aminobenzoessäure	0,05 g/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Prolin	0,5 g/l
	Serin	1,0 g/l
	Threonin	1,0 g/l
	Tyrosin	0,5 g/l
	Valin	1,0 g/l
10x Drop Out ++	10x Drop Out -5 mit:	
	Adenin	0,5 g/l
	Histidin	0,5 g/l
	Tryptophan	1,0 g/l
	Leucin	1,0 g/l
	Uracil	0,5 g/l
G418	G418-Sulfat	200 mg/ml
20% Glukose	Glukose-Monohydrat	20 g/l
20% Galaktose	Galaktose	20 g/l
10% Raffinose	Raffinose	10 g/l
10% Saccharose	Saccharose	10 g/l
10x YNB	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
	Ammoniumsulfat	50 g/l

7.3. Puffer und Lösungen

EasyPrep-Puffer	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	150 mg/ml
	Lysozym	2 mg/ml
	RNAse A	0,2 mg/ml
	BSA	0,1 mg/ml
His-Waschpuffer	Natriumphosphatpuffer pH 8,0	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
His-Elutionspuffer	Natriumphosphatpuffer pH 8,0	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
λ-Phosphatasepuffer	HEPES pH 7,5	50 mM
	MnCl	2 mM
	DTT	5 mM
2x LSB (Laemmli sample buffer)	Tris/HCl pH 6,8	120 mM
	SDS	40 mg/ml
	Glycerin	200 mg/ml
	Bromphenolblau	400 µg/ml
	β-Mercaptoethanol	100 µl/ml
10x DNA-Ladepuffer (10x LP)	Glycerin	50%
	EDTA	1 mM
	Tris/HCl pH 7,8	10 mM
	Bromphenolblau	2,5 mg/ml
	Xylencyanol	2,5 mg/ml
MBP-Waschpuffer	Tris/HCl pH 7,4	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM

MBP-Elutionspuffer	Tris/HCl pH 7,4	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Maltose	10 mM
Novozym-Medium	Sorbitol	1 mM
	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	50 mM
	Novozym	2 mg/ml
pNPP-Puffer	Imidazol pH 6,9	50 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	pNPP	20 mM
PEG/LiAc	10x TE	100 µl/ml
	1M LiAc pH 7,5	100 µl/ml
	50% Polyethylenglykol 3350	800 µl/ml
Ponceau S	Ponceau S	10 mg/ml
	Eisessig	50 ml/l
Puffer 3	NaCl	150 mM
	Tris/HCl pH 7,5	50 mM
	NaF	50 mM
	EDTA	5 mM
	Igepal CA-630	0,1 %
	β-Glycerolphosphat (optional)	60 mM
50x TAE	Tris-Base	2 mM
	EDTA	50 mM
	pH 8,0 mit Eisessig einstellen	
10x TBS	Tris-Base	200 mM
	NaCl	1,37 M
	pH 7,6 mit HCl einstellen	

TBS-T	10x TBS 10% Tween20	100 ml/l 10 ml/l
10x TE	Tris/HCl pH 7,5 EDTA	100 mM 10 mM
TE/LiAc	10x TE 1 M LiAc pH 7,5	100 µl/ml 100 µl/ml
TE/EDTA/SDS (zur Präparation genomischer DNA aus Hefe)	Tris/HCl pH 7,5 EDTA SDS	50 mM 20 mM 10 mg/ml
Transferpuffer	Glycin Tris-Base SDS Methanol	2,9 g/l 5,8 g/l 0,37 g/l 100 ml/l
10x Turbo-LRB	Glycin Tris-Base	9,46 M 250 mM

7.4. Software und Makros

7.4.1. Verwendete Programme, Datenbanken und Internetressourcen

Axio Vision LE Rel. 4.8.1	Carl Zeiss Vision
BioEdit Sequence Alignment Editor	Tom Hall Ibis Biosciences
BLAST	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CLC Sequence Alignment Editor	CLCbio/Qiagen
Clone Manager 6	Sci Ed Central
Corel Draw Graphics Suite X4 & X6	Corel Corporation
EndNote v7	Thomson ISI ResearchSoft
GIMP 2.8	Spencer Kimball, Peter Mattis
HHpred	toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation
NCBI-Datenbanken	www.ncbi.nlm.nih.gov
NLS-mapper	nls-mapper.iab.keio.ac.jp/
ImageJ	Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH

Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
<i>Saccharomyces</i> Genome Database (SGD)	www.yeastgenome.org
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Database	www.pombase.org
Ulead PhotoImpact X3	Corel Corporation

7.4.2. ImageJ-Makros

7.4.2.1 Movies von Einzelzellen: DIC – Cherry – GFP – merge (mit Rahmen)

```

t=x;
z=x;
red="xxx-3mCherry";
green="xxx-GFP";

////////////////////////////////////

getDimensions(w, h, c, s, f);
w2=w+2;
h2=h+2;

selectWindow("d");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
setMinAndMax(0, 65000);
run("RGB Color");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
run("Colors...", "foreground=black background=white selection=white");
run("Time Stamper", "starting=0 interval=t x=10 y=15 font=12 decimal=0 anti-aliased
or=min");

selectWindow("r");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
setMinAndMax(0, 65000);
run("RGB Color");
run("Colors...", "foreground=white background=white selection=white");
run("Event Stamper", "text="+red+" starting=1 end=s x=10 y=15 font=12");
run("Duplicate...", "title=rr duplicate range=1-s");
run("Colors...", "foreground=red background=white selection=white");
run("Event Stamper", "text="+red+" starting=1 end=s x=10 y=15 font=12");

selectWindow("g");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
setMinAndMax(0, 65000);
run("RGB Color");
run("Duplicate...", "title=gg duplicate range=1-s");
selectWindow("g");
run("Colors...", "foreground=white background=white selection=white");
run("Event Stamper", "text="+green+" starting=1 end=s x=10 y=15 font=12");
selectWindow("gg");
run("Colors...", "foreground=green background=white selection=white");
run("Event Stamper", "text="+green+" starting=1 end=s x=10 y=30 font=12");

```

```
run("Merge Channels...", "red=rr green=gg blue=*None* gray=*None* keep");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
rename("RGB");
selectWindow("d");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
selectWindow("r");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
selectWindow("rr");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
selectWindow("g");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
selectWindow("gg");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
run("Stack Combiner", "stack1=d stack2=r");
run("Stack Combiner", "stack1=g stack2=RGB");
run("Duplicate...", "title=00 duplicate range=1-s");
run("Stack Combiner", "stack1=[Combined Stacks] stack2=00");
```

7.4.2.2 Movies von Einzelzellen: DIC – Cherry – GFP – merge (mit Schleife und Speicherung)

```

t=x;
z=x;
red="xxx-3mCherry";
green="xxx-GFP";
Film="xxx_";
a="d.tif";
b="r.tif";
d="g.tif";

////////////////////////////////////

for (i=1;i<3;i+=1)
{
getDimensions(w, h, c, s, f);
w2=w+2;
h2=h+2;

selectWindow(i+a);
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
    setMinAndMax(0, 65000);
    run("RGB Color");
    run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
    run("Colors...", "foreground=black background=white selection=white");
    run("Time Stamper", "starting=0 interval=t x=10 y=15 font=12 decimal=0 anti-aliased
or=min");
    rename("d");

selectWindow(i+b);
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
    setMinAndMax(0, 65000);
    run("RGB Color");
    run("Colors...", "foreground=white background=white selection=white");
    run("Event Stamper", "text="+red+" starting=1 end=s x=10 y=15 font=12");
    rename("r");
    run("Duplicate...", "title=rr duplicate range=1-s");
    run("Colors...", "foreground=red background=white selection=white");
    run("Event Stamper", "text="+red+" starting=1 end=s x=10 y=15 font=12");

selectWindow(i+d);
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
    setMinAndMax(0, 65000);
    run("RGB Color");
    rename("g");
    run("Duplicate...", "title=gg duplicate range=1-s");
    selectWindow("g");
    run("Colors...", "foreground=white background=white selection=white");
    run("Event Stamper", "text="+green+" starting=1 end=s x=10 y=15 font=12");
    selectWindow("gg");
    run("Colors...", "foreground=green background=white selection=white");
    run("Event Stamper", "text="+green+" starting=1 end=s x=10 y=30 font=12");

```

```
run("Merge Channels...", "red=rr green=gg blue=*None* gray=*None* create");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
rename("RGB");
selectWindow("d");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
selectWindow("r");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
selectWindow("g");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
run("Stack Combiner", "stack1=d stack2=r");
rename("links");
run("Stack Combiner", "stack1=g stack2=RGB");
rename("rechts");
run("Stack Combiner", "stack1=links stack2=rechts");
rename(Film+i);
saveAs("Tiff");
close();
}
```

7.4.2.3 Movies Übersicht (automatische Öffnung und Speicherung)

```

dir1="2012-10-23"
dir2="2012-10-23 W12219-0009.tif_Files"
dir3="Auswertung"
dir4="2012-10-23 W12219-0009"
dir5="Projektionen"
name="2012-10-23 W12219-0009"

t=x;
z=x;
red="xxx-3m-Cherry";
green="xxx-GFP";

////////////////////////////////////

run("Image Sequence...", "open=[D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir2+"\\\\" number=1801 starting=1
increment=1 scale=100 file=c01.tif or=[] sort");
saveAs("Tiff", "D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir3+"\\\\"+dir4+"\\\\"+name+"_DIC.tif");
run("Grouped Stack Projector", "group=z projection=[Average Intensity]");
saveAs("Tiff", "D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir3+"\\\\"+dir4+"\\\\"+dir5+"\\\\"+name+"_DIC-project.tif");
rename("DIC");
run("Image Sequence...", "open=[D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir2+"\\\\" number=1801 starting=1
increment=1 scale=100 file=c02.tif or=[] sort");
saveAs("Tiff", "D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir3+"\\\\"+dir4+"\\\\"+name+"_Cherry.tif");
run("Grouped Stack Projector", "group=z projection=[Max Intensity]");
saveAs("Tiff", "D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir3+"\\\\"+dir4+"\\\\"+dir5+"\\\\"+name+"_Cherry-project.tif");
rename("Cherry");
run("Image Sequence...", "open=[D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir2+"\\\\" number=1801 starting=1
increment=1 scale=100 file=c03.tif or=[] sort");
saveAs("Tiff", "D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir3+"\\\\"+dir4+"\\\\"+name+"_GFP.tif");
run("Grouped Stack Projector", "group=z projection=[Max Intensity]");
saveAs("Tiff", "D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir3+"\\\\"+dir4+"\\\\"+dir5+"\\\\"+name+"_GFP-project.tif");
rename("GFP");

getDimensions(w, h, c, s, f);
w2=w+5;
h2=h+5;

selectWindow("DIC");
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
    setMinAndMax(0, 65000);
    run("RGB Color");
    run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
    run("Colors...", "foreground=white background=white selection=white");
    run("Time Stamper", "starting=0 interval=t x=10 y=50 font=40 decimal=0 anti-aliased
or=min");
    run("Duplicate...", "title=01 duplicate range=1-s");

selectWindow("Cherry");
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
    setMinAndMax(0, 65000);
    run("RGB Color");

```

```
run("Colors...", "foreground=red background=white selection=white");
run("Event Stamper", "text="+red+" starting=1 end="+s+" x=10 y=50 font=42");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
run("Duplicate...", "title=02 duplicate range=1-s");

selectWindow("GFP");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.01 normalize normalize_all use");
setMinAndMax(0, 65000);
run("RGB Color");
run("Colors...", "foreground=green background=white selection=white");
run("Duplicate...", "title=03 duplicate range=1-s");
run("Duplicate...", "title=03a duplicate range=1-s");
run("Event Stamper", "text="+green+" starting=1 end="+s+" x=10 y=50 font=42");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");
selectWindow("03");
run("Event Stamper", "text="+green+" starting=1 end="+s+" x=10 y=100 font=42");
run("Canvas Size...", "width=w2 height=h2 position=Center");

run("Merge Channels...", "red=02 green=03 blue=*None* gray=*None* keep");
saveAs("Tiff", "D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir3+"\\\\"+dir4+"\\\\"+name+"_merge.tif");
rename("RGB");
run("Stack Combiner", "stack1=01 stack2=02");
run("Stack Combiner", "stack1=03a stack2=RGB");
run("Duplicate...", "title=05 duplicate range=1-s");
run("Combine...", "stack1=[Combined Stacks] stack2=05 combine");
saveAs("Tiff", "D:\\Kathi\\"+dir1+"\\\\"+dir3+"\\\\"+dir4+"\\\\"+name+"_Combined Stacks.tif");
```

7.4.2.4 Abstandsmessung zweier punktförmiger Signale (z.B. Spindelpolkkörper)

```

z=nResults;
for (n=0; n<z; n++)
{
l=getResult("XM",n);
List.set(n,l);
m=getResult("YM",n);
r=n+1000;
List.set(r,m);
}
z=nResults;
for (n=0; n<z; n++)
{
x1=List.get(n);
x1=parseFloat(x1);
r=n+1000;
y1=List.get(r);
y1=parseFloat(y1);
n=n+1;
r=n+1000;
x2=List.get(n);
x2=parseFloat(x2);
u=n+1000;
y2=List.get(r);
y2=parseFloat(y2);
c = sqrt( (y2-y1)*(y2-y1) + (x2-x1)*(x2-x1) );
w=n+2000;
List.set(w,c);
}
f = "[Distances]";
run("Table...", "name="+f+" width=500 height=600");
print(f, "\\Headings:n\tX1\tY1\tX2\tY2\tDistance(pixel)\tDistance(um)");
for (n=0; n<z; n++)
{
x1=List.get(n);
x1=parseFloat(x1);
r=n+1000;
y1=List.get(r);
y1=parseFloat(y1);
n=n+1;
r=n+1000;
x2=List.get(n);
x2=parseFloat(x2);
u=n+1000;
y2=List.get(r);
y2=parseFloat(y2);
w=n+2000;
c=List.get(w);
cp=parseFloat(c);
d=(cp*102/1000);
print(f, n + "\t" + x1 + "\t" + y1 + "\t" + x2 + "\t" + y2 + "\t" + c + "\t" + d);
}

```


8. LITERATURVERZEICHNIS

- Amon, A. (2008). "A decade of Cdc14 -a personal perspective." *Febs J* **275**(23): 5774-84.
- Aprikian, P., B. Moorefield, et al. (2001). "New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle." *Mol Cell Biol* **21**(15): 4847-55.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (2005). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Azzam, R., S. L. Chen, et al. (2004). "Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus." *Science* **305**(5683): 516-9.
- Baro, B., J. A. Rodriguez-Rodriguez, et al. (2013). "Dual Regulation of the mitotic exit network (MEN) by PP2A-Cdc55 phosphatase." *PLoS Genet* **9**(12): e1003966.
- Berghammer, H. and B. Auer (1993). ""Easypreps": fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in E. coli." *Biotechniques* **14**: 524-528.
- Blattner, C., S. Jennebach, et al. (2011). "Molecular basis of Rrn3-regulated RNA polymerase I initiation and cell growth." *Genes Dev* **25**(19): 2093-105.
- Bodenmiller, B. and R. Aebersold (2010). "Quantitative analysis of protein phosphorylation on a system-wide scale by mass spectrometry-based proteomics." *Methods Enzymol* **470**: 317-34.
- Bodenmiller, B., D. Campbell, et al. (2008). "PhosphoPep- a database of protein phosphorylation sites in model organisms." *Nat Biotechnol* **26**(12): 1339-40.
- Bodenmiller, B., S. Wanka, et al. (2010). "Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast." *Sci Signal* **3**(153): rs4.
- Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, et al. (2007). "The multifunctional nucleolus." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 574-85.
- Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares, et al. (2000). "To be or not to be in the nucleolus." *Nat Cell Biol* **2**(6): E107-12.
- Chang, L. and D. Barford (2014). "Insights into the anaphase-promoting complex: a molecular machine that regulates mitosis." *Curr Opin Struct Biol* **29**: 1-9.
- Clemente-Blanco, A., M. Mayan-Santos, et al. (2009). "Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase." *Nature* **458**(7235): 219-22.
- Cuperus, G., R. Shafaatian, et al. (2000). "Locus specificity determinants in the multifunctional yeast silencing protein Sir2." *Embo J* **19**(11): 2641-51.
- D'Amours, D. and A. Amon (2004). "At the interface between signaling and executing anaphase- Cdc14 and the FEAR network." *Genes Dev* **18**(21): 2581-95.
- D'Amours, D., F. Stegmeier, et al. (2004). "Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA." *Cell* **117**(4): 455-69.

- Duan, Z., M. Andronescu, et al. (2010). "A three-dimensional model of the yeast genome." Nature **465**(7296): 363-7.
- Edmaier, M. (2015). Nukleoluslokalisierung und DNA-Wechselwirkung der Hefepoteine Net1 und Tof2. Lehrstuhl für Genetik, Universität Regensburg.
- Emmott, E. and J. A. Hiscox (2009). "Nucleolar targeting: the hub of the matter." EMBO Rep **10**(3): 231-8.
- Enserink, J. M. and R. D. Kolodner (2010). "An overview of Cdk1-controlled targets and processes." Cell Div **5**: 11.
- Fromont-Racine, M., B. Senger, et al. (2003). "Ribosome assembly in eukaryotes." Gene **313**: 17-42.
- Fujimura, H. and Y. Sakuma (1993). "Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts." Biotechniques **14**: 538-540.
- Gadal, O., S. Mariotte-Labarre, et al. (1997). "A34.5, a nonessential component of yeast RNA polymerase I, cooperates with subunit A14 and DNA topoisomerase I to produce a functional rRNA synthesis machine." Mol Cell Biol **17**(4): 1787-95.
- Garcia, S. N. and L. Pillus (1999). "Net results of nucleolar dynamics." Cell **97**(7): 825-8.
- Geil, C., M. Schwab, et al. (2008). "A nucleolus-localized activator of Cdc14 phosphatase supports rDNA segregation in yeast mitosis." Curr Biol **18**(13): 1001-5.
- Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, et al. (2003). "Global analysis of protein expression in yeast." Nature **425**(6959): 737-41.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.
- Guacci, V., E. Hogan, et al. (1994). "Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast." J Cell Biol **125**(3): 517-30.
- Guarente, L. (2000). "Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging." Genes Dev **14**(9): 1021-6.
- Hirano, T. (2015). "Chromosome Dynamics during Mitosis." Cold Spring Harb Perspect Biol.
- Holt, L. J., B. B. Tuch, et al. (2009). "Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution." Science **325**(5948): 1682-6.
- Huang, J. and D. Moazed (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**(17): 2162-76.
- Huxley, C., E. D. Green, et al. (1990). "Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR." Trends Genet **6**(8): 236.
- Jin, Q. W., J. Fuchs, et al. (2000). "Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization." J Cell Sci **113** (Pt 11): 1903-12.

- Jin, Q. W., S. Ray, et al. (2007). "The nucleolar Net1/Cfi1-related protein Dnt1 antagonizes the septation initiation network in fission yeast." Mol Biol Cell **18**(8): 2924-34.
- Kao, L., Y. T. Wang, et al. (2013). "Global analysis of cdc14 dephosphorylation sites reveals essential regulatory role in mitosis and cytokinesis." Mol Cell Proteomics **13**(2): 594-605.
- Kasulke, D., S. Seitz, et al. (2002). "A role for the *Saccharomyces cerevisiae* RENT complex protein Net1 in HMR silencing." Genetics **161**(4): 1411-23.
- 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**(8): 1395-403.
- Kosugi, S., M. Hasebe, et al. (2009). "Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha." J Biol Chem **284**(1): 478-85.
- Kosugi, S., M. Hasebe, et al. (2009). "Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(25): 10171-6.
- Krogan, N. J., G. Cagney, et al. (2006). "Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Nature **440**(7084): 637-43.
- Lafontaine, D. L. and D. Tollervy (2000). "Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs." Mol Cell Biol **20**(8): 2650-9.
- Lavoie, B. D., E. Hogan, et al. (2004). "In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding." Genes Dev **18**(1): 76-87.
- Leger-Silvestre, I., S. Trumtel, et al. (1999). "Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Chromosoma **108**(2): 103-13.
- Li, X., S. A. Gerber, et al. (2007). "Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*." J Proteome Res **6**(3): 1190-7.
- Loewith, R. (2011). "A brief history of TOR." Biochem Soc Trans **39**(2): 437-42.
- Loewith, R. and M. N. Hall (2011). "Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control." Genetics **189**(4): 1177-201.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, et al. (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **14**(10): 953-61.
- Machin, F., J. Torres-Rosell, et al. (2006). "Transcription of ribosomal genes can cause nondisjunction." J Cell Biol **173**(6): 893-903.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, et al. (2005). "CDD: a Conserved Domain Database for protein classification." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D192-6.
- Marchler-Bauer, A., M. K. Derbyshire, et al. (2015). "CDD: NCBI's conserved domain database." Nucleic Acids Res **43**(Database issue): D222-6.
- McCann, K. L. and S. J. Baserga (2014). "Driving nucleolar assembly." Genes Dev **28**(3): 211-3.
- Mekhail, K. and D. Moazed (2010). "The nuclear envelope in genome organization, expression and

stability." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(5): 317-28.

Mittermeier, A. (2013). Analyse der Proteinwechselwirkungen des Nukleolusproteins Net1 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Lehrstuhl für Genetik, Universität Regensburg.

Mohl, D. A., M. J. Huddleston, et al. (2009). "Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis." J Cell Biol **184**(4): 527-39.

Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annual Reviews of Cell & Developmental Biology **13**: 261-291.

Morgan, D. O. (2007). The Cell Cycle - Principles of Control, New Science Press Ltd.

Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51**(1): 263-73.

Nasmyth, K. (1996). "At the heart of the budding yeast cell cycle." Trends Genet **12**(10): 405-12.

Pines, J. (2011). "Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(7): 427-38.

Primorac, I. and A. Musacchio (2013). "Panta rhei: the APC/C at steady state." J Cell Biol **201**(2): 177-89.

Queralt, E., C. Lehane, et al. (2006). "Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast." Cell **125**(4): 719-32.

Rock, J. M. and A. Amon (2009). "The FEAR network." Curr Biol **19**(23): R1063-8.

Russell, J. and J. C. Zomerdijs (2006). "The RNA polymerase I transcription machinery." Biochem Soc Symp(73): 203-16.

Schwab, M., A. S. Lutum, et al. (1997). "Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis." Cell **90**(4): 683-93.

Seshan, A. and A. Amon (2004). "Linked for life: temporal and spatial coordination of late mitotic events." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 41-8.

Sheff, M. A. and K. S. Thorn (2004). "Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **21**(8): 661-70.

Shou, W., R. Azzam, et al. (2002). "Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex." BMC Mol Biol **3**: 3.

Shou, W., K. M. Sakamoto, et al. (2001). "Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit." Mol Cell **8**(1): 45-55.

Shou, W., J. H. Seol, et al. (1999). "Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex." Cell **97**(2): 233-44.

Sinclair, D. A. and L. Guarente (1997). "Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast." Cell **91**(7): 1033-42.

- Soding, J. (2005). "Protein homology detection by HMM-HMM comparison." *Bioinformatics* **21**(7): 951-60.
- Soding, J., A. Biegert, et al. (2005). "The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction." *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue): W244-8.
- Stegmeier, F. and A. Amon (2004). "Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation." *Annu Rev Genet* **38**: 203-32.
- Straight, A. F., W. Shou, et al. (1999). "Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity." *Cell* **97**(2): 245-56.
- Swaney, D. L., P. Beltrao, et al. (2013). "Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation." *Nat Methods* **10**(7): 676-82.
- Taddei, A. and S. M. Gasser (2012). "Structure and function in the budding yeast nucleus." *Genetics* **192**(1): 107-29.
- Taylor, G. S., Y. Liu, et al. (1997). "The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression." *J Biol Chem* **272**(38): 24054-63.
- Tollervey, D., H. Lehtonen, et al. (1991). "The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast." *Embo J* **10**(3): 573-83.
- Tomson, B. N., D. D'Amours, et al. (2006). "Ribosomal DNA transcription-dependent processes interfere with chromosome segregation." *Mol Cell Biol* **26**(16): 6239-47.
- Torres-Rosell, J., F. Machin, et al. (2004). "Nucleolar segregation lags behind the rest of the genome and requires Cdc14p activation by the FEAR network." *Cell Cycle* **3**(4): 496-502.
- Traverso, E. E., C. Baskerville, et al. (2001). "Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast." *J Biol Chem* **276**(24): 21924-31.
- Tschochner, H. and E. Hurt (2003). "Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm." *Trends Cell Biol* **13**(5): 255-63.
- Uhlmann, F., C. Bouchoux, et al. (2011). "A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**(1584): 3572-83.
- Venema, J. and D. Tollervey (1999). "Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Annu Rev Genet* **33**: 261-311.
- Visintin, R. and A. Amon (2000). "The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks." *Curr Opin Cell Biol* **12**(3): 372-7.
- Visintin, R., K. Craig, et al. (1998). "The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation." *Mol Cell* **2**(6): 709-18.
- Visintin, R., E. S. Hwang, et al. (1999). "Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus." *Nature* **398**(6730): 818-23.

- Visintin, R., S. Prinz, et al. (1997). "CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis." Science **278**(5337): 460-3.
- Wang, B. D., D. Eyre, et al. (2005). "Condensin binding at distinct and specific chromosomal sites in the *Saccharomyces cerevisiae* genome." Mol Cell Biol **25**(16): 7216-25.
- Weiss, E. L. (2012). "Mitotic exit and separation of mother and daughter cells." Genetics **192**(4): 1165-202.
- Woolford, J. L., Jr. and S. J. Baserga (2013). "Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **195**(3): 643-81.
- Wurzenberger, C. and D. W. Gerlich (2011). "Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 469-82.
- Yoshida, S., K. Asakawa, et al. (2002). "Mitotic exit network controls the localization of Cdc14 to the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Biol **12**(11): 944-50.
- Yoshida, S. and A. Toh-e (2002). "Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus." Biochem Biophys Res Commun **294**(3): 687-91.
- Yu, Z. Y., M. T. Zhang, et al. (2013). "Fission yeast nucleolar protein Dnt1 regulates G2/M transition and cytokinesis by downregulating Wee1 kinase." J Cell Sci **126**(Pt 21): 4995-5004.
- Zhang, Y., W. Wang, et al. (2013). "Structural insights into the intrinsic self-assembly of Par-3 N-terminal domain." Structure **21**(6): 997-1006.

9. ANHANG

9.1 Sequenzvergleich Net1-verwandter Proteine aus anderen Hefen

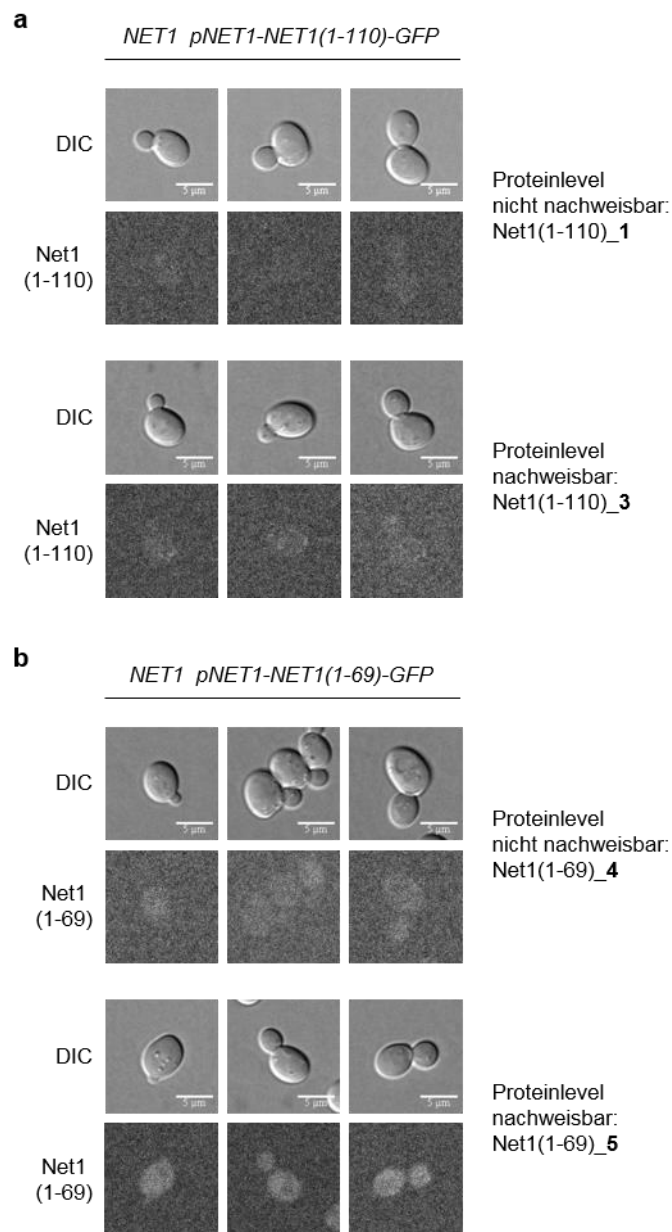
[S.c.]	MYKLOVVLVPPSLQA---TMPIQFGYPTIAE-----	29
[S.a.]	MYKLOVVLVPPSLQAATATTTPIQFGYPTIAE-----	33
[C.g.]	MYKLOVVLVPPSIQNNNF--SLNINYQANNSIAD-----	33
[V.p.]	MYKLOVVLVPPSAIVGQOI---DQFNNTIPNSLPYNLPSIQNEAINNNYQNDVSPLGIN	57
[K.l.]	MYKLOVVLVPPAGANRSFN-----F--GLPSVS-----	25
[A.g.]	MYKLOVVLVPPSIETELPV-----V--GLPAGS-----	26
	*:****:*:* .	
[S.c.]	-----SSQLLPN-----RTNM-AQSAGDASLQYANLR-----	55
[S.a.]	-----SSQLLPN-----RTSI-AQSAGDASLQYANLR-----	59
[C.g.]	-----QSQQLPN-----KVNG-----TFNNTFNGQ-----	53
[V.p.]	QQQLNGFILQQSQKPLRN-----HQQIESFKTGDSNMQNNNNNNNDNDNNT	104
[K.l.]	-SESSQFILPVQQQVLQQGGNAPQLANNIPAQNGIGAL---DPNVS-----	67
[A.g.]	-LDNSGFAQ-----GHAQPISTSSIA--GGRGEFSSGIGNTS-----	60
	.	
[S.c.]	-----SANV-----SFTPSYFNQSRFRKFLFTKPTNTLLNLSDEI	91
[S.a.]	-----SANV-----SFSPSFFNQTRFKKFLFTKPTNTLLNLSDEI	95
[C.g.]	-----SQPDSSIFPVLTRSNSLLTPNYAQRSMKKFLHFTKANNTLLDLSDEI	102
[V.p.]	HTNNNTSMNMNTNNNDNTNISYYQNGNI AKRLYLTPSNCKKFLFTKPNNNLLEISEEI	164
[K.l.]	-----TNTAY---LSSFMTSHITRPKLKFLFTKPTNTLYQLSQEI	106
[A.g.]	-----ANAVY---LSGLVGAHIRRARGRKFLHFTKPTNSLYELADEI	99
	. :*** ** .*. * :*:**	
[S.c.]	IDKCEKMYPSLQEDIEILSLQDNSGCDLDPDFLVKDVFNVNNTVRVILKNEIDLDDSDAP-	150
[S.a.]	VEKCEKMYPSLQEDIEILSLQDNSGCDLDPDFLIKDVFNISNIVKVLKNEIDLDDSDAP-	154
[C.g.]	NDKCKAMYPSEADLDLISLQDNSGCDLDPDFVVKDVFNVDNIVRVILNDELDISETIP-	161
[V.p.]	LKCEKLYPNLQNEIEIVSLRNIDDCLDLPDFLVKDVFDIDNTVKVLKNEIDLHQS---	221
[K.l.]	LKCNKIYPNLSTELEIDTLQDVDECDLDPDFVVKDVFNVYNTVRVILRNDVDLESNPDR	166
[A.g.]	VEKCAKMYPLAEPEIVTLQDVNECDLDPDFVVKDVFNMDNTVRVLLRNDLDEAAGD--	157
	** : ** * : : * :*: . *****:****: * *:*:*. :*: *	
[S.c.]	VSLYKSVKSKLNNNGSPQSVQPPQQIPSSSGVLRIAKKRPPPTGTT-----TTTIRSA	203
[S.a.]	VSLYRSVKSKLNNNGSPHLVQAQQQIS--SSGVLRIAKKRSPTATVAAGATTGPGAIRSA	213
[C.g.]	VSSYRSIKRRRLNPESLADSKDQSDFGVESQSIKVVKKRGSTSN-----VIKQ	210
[V.p.]	NSLYKSVKRRINENNQ-----LNGSLNISKRRHASEL-----KKNLT	259
[K.l.]	QESLYSKRRKLNNNGNSQQNTSTG-ATLDQPPVTVAKRR-----PQAL	207
[A.g.]	-RTIY-MKKRKLNTGAAGVPAAGG-S-VQAAVLNVAKK-----RASI	195
	*: : * :	
[S.c.]	TNGSMRVSTPLARQIYPPSSKIVSN-NSDD-----EEDIGERSFLPPPTQPOSPPIRI	257
[S.a.]	TNGSMRISTPLARQIYPPSSKIMSN-NSDD-----EDEVGERSFLPPPTQPOSPPIRI	267
[C.g.]	SNINGRISTPLARQLYPPSAIFEPQ--N-----SDDEEVADRSFLPPPIQPOSPPIRI	261
[V.p.]	NNNTVRISTPLARQIYPPFNQRQSN--NSDD--ELGVDDELDRSFLPPFNQPOSPPIRI	314
[K.l.]	KNSALRISTPLARQIYPPSQRNPKQVNSDYEEDEYGDDEIGDKSILPPPTVPOSPPIRI	267
[A.g.]	KTSALRVSTPLANQIYPPETTK--QVNSDFE-----DDVDADKSILPPP-PPOSPPIRI	246
	.. *:*****:*** * :*: :*:*** * *****	
[S.c.]	SSGIDAG-KKIKSSIVEEDIVRSATVDPDKTKOORLLSGTPIMS---TMTPNRVTLTGQ	313
[S.a.]	SSGIDTG-KKIKSSIVEEDIVRSSETVDPDKSKOORLLSGTPVMS---TMTPNRVTLTGQ	323
[C.g.]	SSGIDTNVRKITSRIGEDTVRSATVDPDKSKOORLLSGTPVMS---TMTPNRVTLTGQ	318
[V.p.]	SSGIENY-KKIKS-LVEEDTVRSSETVDPDKSKOORIFSGTPIRQ--SVTPNRVYLTGQ	369
[K.l.]	SSSIAQKRLKI---NGSEDTVSKSETVDPDKAKOORLPSGTPMKPMNVIEIPNRPGFLAM	324
[A.g.]	SSGMDQKRINM---N--DNAVSKSETVDPDKSKOORLPSGTPMRPVSMVETPNRVSLTGP	301
	.: : : :*: ***:****: ****: ****: .	
[S.c.]	RVVSEHAHKNEL----VFSASAS-SSSFANGGTAAVTAQDINRKPPVTPRITSGMLKIP	368
[S.a.]	RVVSEQVHKNEL----VFSASASSSSSFANAGATIVTAQDSNRKPPVTPRITSGMLRIP	379
[C.g.]	RVISEQRENDSV-----LFTNHRHINEPSHSRRITSGMLQIP	355
[V.p.]	RVVSDNGYQNFKEKTSIFAPNNRS---LSVSVKPTV-FSSKIDNIVMSSFRIGSGMLTIP	425
[K.l.]	PQQAQ--HL-----LRINSTPVVTNKRITSGMLRIP	353
[A.g.]	TVLSESTVS-----QKSTATPIITNIRITSGMLRIP	332
	: : . ** **** *	
[S.c.]	EPRISEIEKELKEGPSSPAS-ILPAKAAKIPMKKPYLENGENYESDDSSS---SENQETP	424
[S.a.]	EPRISEIEKELKEGPSSPAS-ILPAKAAKIPMKKPYLENGENYESDDSSS---SENQETP	435
[C.g.]	EPKIAEMKELKEGPSSPST-ILPPIPDKIPMKKPIETERYYESDSET---ESNSG--	409
[V.p.]	EPKILEVEKELHEGPSSPST-LLPQKGNRIPMKKPYLMEDTDFADNNSSS---EEQASE-	480
[K.l.]	EPRISEMRTMHGELSSPAAGLEPKSAKIPMKKQYIPDEHDSSESSE---GEFTEDKEGV	410
[A.g.]	EPRLSEVEKELKEGPSPAVD-LPARPSRIPMKKPYNPSMQQDEDLSSSSSTEDNVPVAV	391
	.: *: * : : * :*: ** :*** : . . : :	

Abb. 9.1: Sequenzvergleich Net1-verwandter Proteine

Das Alignment der N-terminalen Bereiche der Net1-Homologen aus *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.), *Saccharomyces arboricola* (S.a.), *Candida glabrata* (C.g.), *Vanderwaltozyma polyspora* (V.p.), *Kluyveromyces lactis* (K.l.) und *Ashbya gossypii* (A.g.) wurde mit ClustalOmega erstellt. Die Konservierung der Sequenz ist zum einen durch die Clustal-Bewertung unter der Sequenz angegeben (* identisch, : sehr ähnlich, . ähnlich), zum anderen durch die farbliche Unterlegung (A identisch, A 5 von 6 Positionen identisch, A 4 von 6 Positionen identisch)

9.2 Ergänzungen zu den Ergebnissen

9.2.1 Lokalisation von Net1(1-110)-GFP und Net1(1-69)-GFP



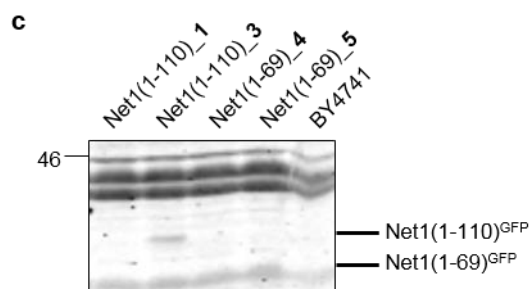
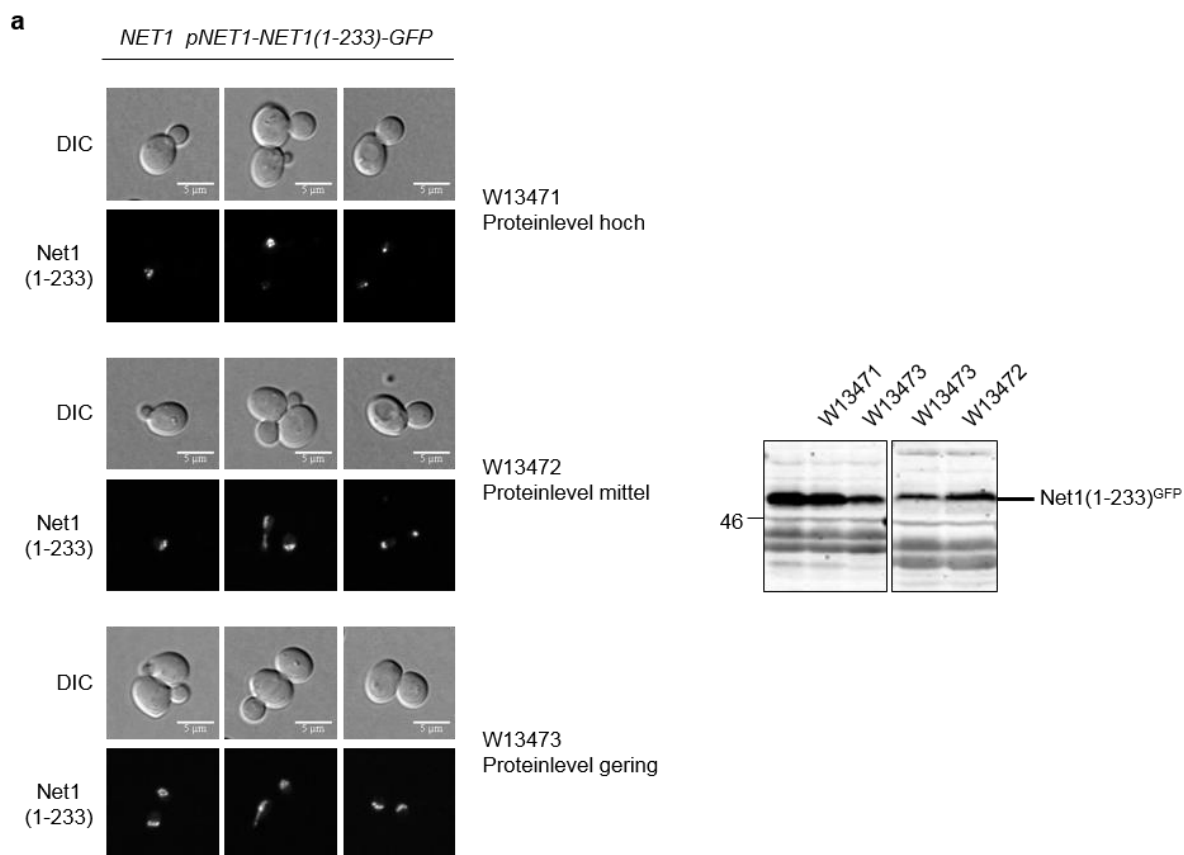


Abb. 9.2: Lokalisation von Net1(1-110)-GFP und Net1(1-69)-GFP und Vergleich der Proteinmenge

Zwei Transformanten von **a**, *NET1 tCYC1::pNET1-NET1(1-110)-GFP-tCYC1-LEU2* und **b**, *NET1 tCYC1::pNET1-NET1(1-69)-GFP-tCYC1-LEU2* wurden unter identischen Bedingungen am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der Maßstabsbalken beträgt 5 μ m. Gezeigt sind in Reihe 1 jeder Einheit die Zellmorphologie (DIC) und in Reihe 2 das GFP-Fluoreszenzsignal, in der oberen Hälfte jeder Abbildung sind Zellen eines Transformanten mit nicht nachweisbarem Proteinlevel abgebildet, in der unteren Hälfte war im Western Blot Protein nachweisbar.

c, Die in der Mikroskopie verwendeten Stämme wurden hinsichtlich ihres Proteingehalts mit α -GFP-Antikörper im Western Blot untersucht.

9.2.2 Aggregatbildung von Net1(1-233) und Net1(1-196)



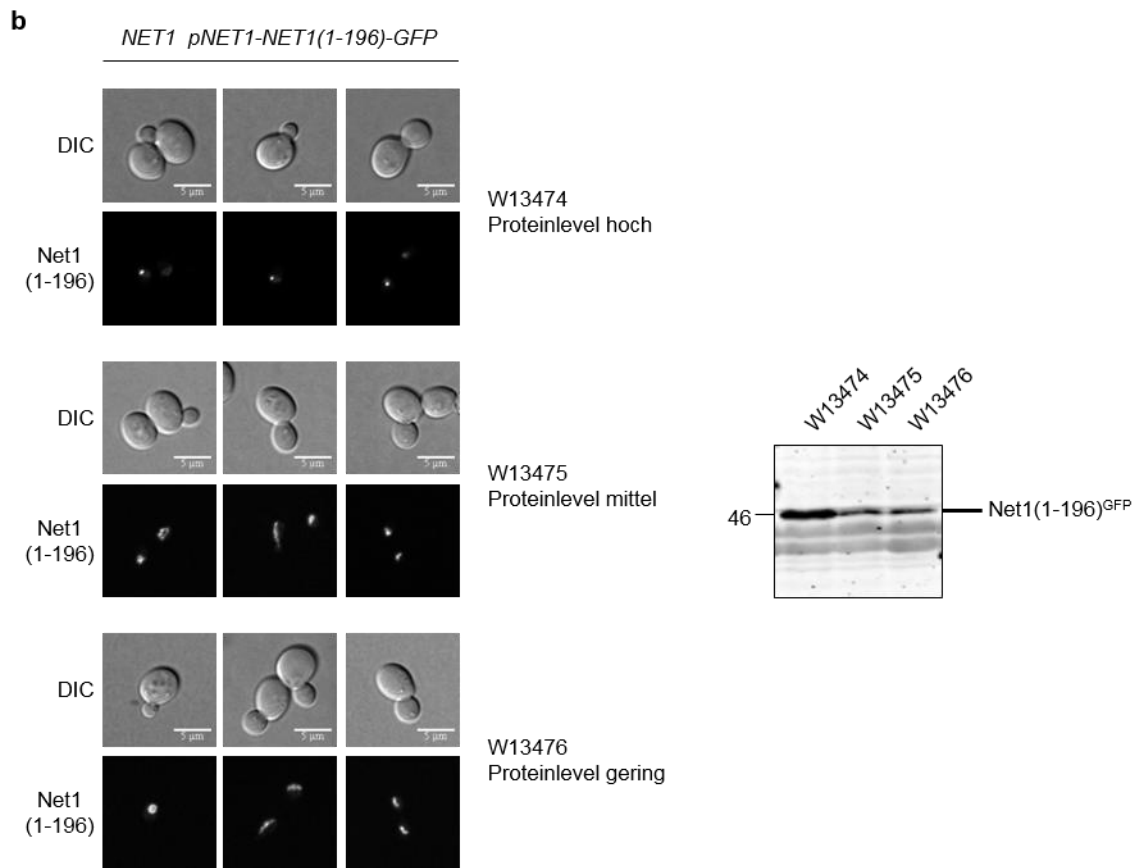


Abb. 9.3: Lokalisation von Net1(1-233)-GFP und Net1(1-196)-GFP in haploiden Zellen

a, Die Stämme W13471 (hohes Expressionslevel), W13472 (mittleres Expressionslevel) und W13473 (niedriges Expressionslevel) (*NET1 tCYC1::pNET1-NET1(1-233)-GFP-tCYC1-LEU2*) wurden unter identischen Bedingungen am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der Maßstabsbalken beträgt 5 µm. Gezeigt sind in Reihe 1 jeder Einheit die Zellmorphologie (DIC) und in Reihe 2 das GFP-Fluoreszenzsignal, von oben nach unten nimmt dabei die Proteinmenge ab. Die in der Mikroskopie verwendeten Stämme wurden zusätzlich hinsichtlich ihres Proteingehalts im Western Blot mit α-GFP-Antikörper untersucht.

b, Die Stämme W13473 (hohes Expressionslevel), W13474 (mittleres Expressionslevel) und W13475 (niedriges Expressionslevel) (*NET1 tCYC1::pNET1-NET1(1-196)-GFP-tCYC1-LEU2*) wurden unter denselben Bedingungen am Fluoreszenzmikroskop und im Western Blot untersucht.

9.2.3 Lokalisation von Net1(234-455)-GFP

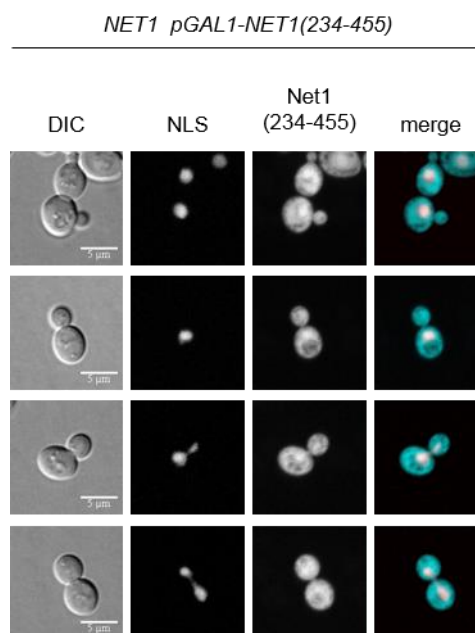


Abb. 9.4: Lokalisation von Net1(234-455)-GFP

Der Stamme W13794 (*ura3::pGAL1-Myc3-NET1(234-455)-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-SWI5(S/A)-Myc13-tCYC1-TRP1*) wurde nach zweistündiger Induktion des *GAL1*-Promotors am konfokalen Mikroskop untersucht. Gezeigt sind in Spalte 1 die Zellmorphologie (DIC), in Spalte 2 und 3 die Fluoreszenzsignale des Kernmarker mCherry-NLS und von Net1(234-455)-GFP und in Spalte 4 die Überlagerung der Fluoreszenzsignale (merge). Der Maßstabsbalken beträgt 5 μ m.

9.2.4 Wachstumstests von *NET1(1-1051)*-Stämmen

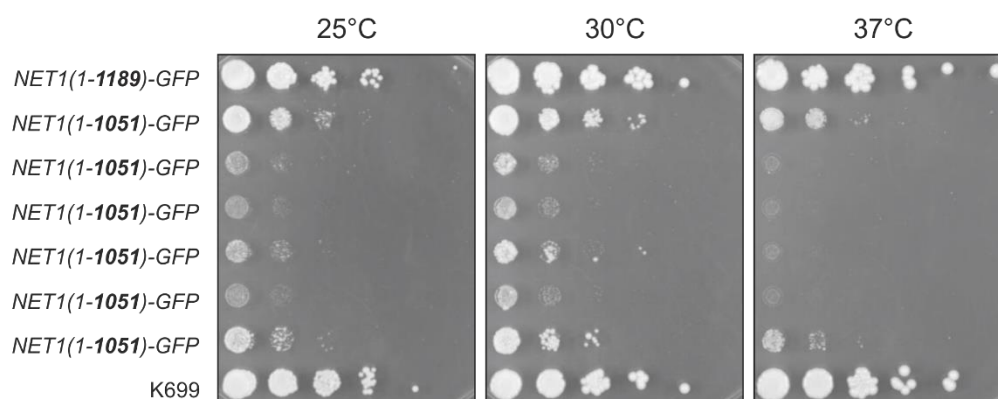


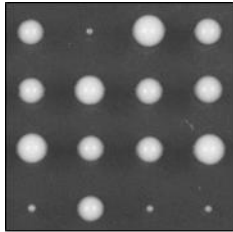
Abb. 9.5: Wachstumstests zum Vergleich haploider *NET1(1-1051)-GFP*-Nachkommen

Sechs haploide Nachkommen aus der Tetradenanalyse des diploiden Ausgangsstamms W13534 (*NET1/NET1(1-1051)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*) wurden auf XYD-Platten gespottet. Als Referenz dienten ein haploider Nachkomme des diploiden Ausgangsstamms W13533 (*NET1/NET1(1-1189)-GFP-HIS3MX6 NOP56/Nop56-3mCherry-URA3*) sowie der haploide Wildtypstamm K699.

9.2.5 Tetradenanalysen von Net1-Verkürzungsstämmen mit Expression von C-terminalen *NET1*-Fragmenten

9.2.5.1 Expression von *NET1*(1052-1189)

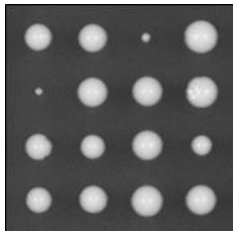
a



n,K	n		n,K
K		K	K
	n,K	n,K	
n	K	n	n

n: *NET1*(1-341)-*Flag12-HIS3MX6*K: *leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*n,K: *NET1*(1-341)-*Flag12-HIS3MX6*
leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*

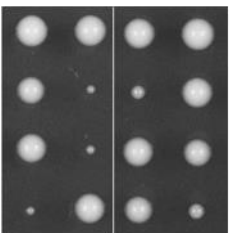
b



	n,K	n	K
n		n,K	
n,K	n,K		n
K		K	n,K

n: *NET1*(1-693)-*Flag12-HIS3MX6*K: *leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*n,K: *NET1*(1-693)-*Flag12-HIS3MX6*
leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*

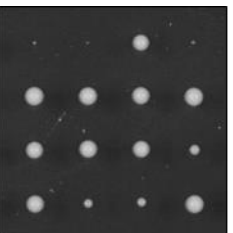
c



	K	K	K
n,K	n	n	n,K
K	n	n,K	
n	K		n

n: *NET1*(1-972)-*Flag12-HIS3MX6*K: *leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*n,K: *NET1*(1-972)-*Flag12-HIS3MX6*
leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*

d



n	n		n
		K	K
n,K	n,K	n,K	n
K	n	n	K

n: *NET1*(1-1051)-*Flag12-HIS3MX6*K: *leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*n,K: *NET1*(1-1051)-*Flag12-HIS3MX6*
leu2::pTEF2-GFP-NET1(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*

Abb. 9.6: *Net1*(1052-1189) rettet den Wachstumsdefekt von Stämmen mit C-terminal verkürztem *NET1*

Die Stämme **a**, *NET1*/*NET1*(1-341)-*Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*, **b**, W12539 (*NET1*/*NET1*(1-693)-*Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*), **c**, *NET1*/*NET1*(1-972)-*Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2* und **d**, W13762 (*NET1*/*NET1*(1-1051)-*Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1*(1052-1189)-*tCYC1-LEU2*) wurden sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen.

Jeweils vier Tetraden pro Stamm wurden ausgewählt, die Auswertung des relevanten Genotyps ist jeweils schematisch gezeigt.

9.2.5.2 Expression von *NET1(929-1189)*

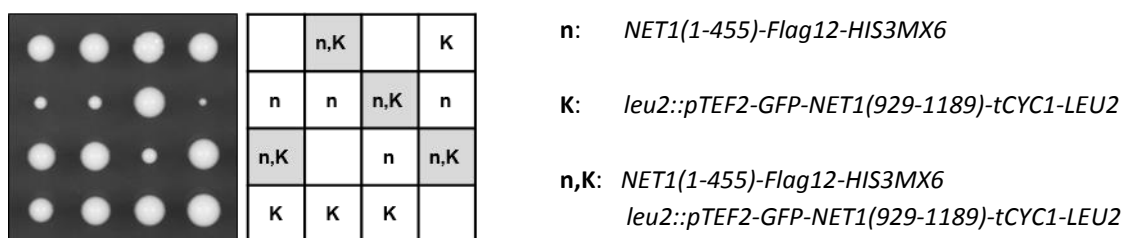


Abb. 9.7: Net1(929-1189) rettet den Wachstumsdefekt von *NET1(1-455)*-Stämmen

Der Stamm W12535 *NET1/NET1(1-455)-Flag12-HIS3MX6 leu2/leu2::pTEF2-GFP-NET1(929-1189)-tCYC1-LEU2* wurde sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen.

Jeweils vier Tetraden wurden ausgewählt, die Auswertung des relevanten Genotyps ist jeweils schematisch gezeigt.

9.2.6 Messsystem zur quantitativen, zeitlichen Bestimmung von DNA-Trennungsmutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System etabliert, um den zeitlichen Ablauf der Chromosomentrennung in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mittels eines mikroskopischen Verfahrens qualitativ und quantitativ zu erfassen. Ziel war es, Mutanten, bei denen der Ablauf der Chromosomentrennung gestört ist oder verzögert abläuft, im Vergleich zum Wildtyp einordnen zu können. Ein Protein der Spindelpolkkörper (SPK), Spc42, wurde mittels homologer Rekombination mit 3mCherry fusioniert und somit als Marker für die Lokalisation der SPK während des Zellteilungszyklus benutzt. Die SPK dienen aufgrund ihrer Funktion als Mikrotubuli-Organisationszentren als Endpunkte der mitotischen Spindel. Da Hefen eine Endomitose vollziehen, bei der die Kernhülle intakt bleibt, und die SPK integraler Bestandteil der Kernhülle sind, kann der zunehmende Abstand der SPK als Maß für das Voranschreiten der Chromosomentrennung verwendet werden.

Hierzu wurden Zeitrafferaufnahmen in zweiminütigem Abstand am konfokalen Mikroskop erstellt und das Bildmaterial hinsichtlich des zeitlichen und räumlichen Ablaufs der Trennung der SPK ausgewertet (s. Abb. 9.8). Mit dem Programm ImageJ wurde für jeden Zeitwert das Massezentrum (*center of mass*) der SPK-Signale bestimmt und als Punktkoordinaten in eine Tabelle eingetragen (s. Abb. 9.8a). Anschließend wurde der Abstand zwischen den Mittelpunkten der SPK-Signale über den Hypotenususatz (Satz des Pythagoras) berechnet (s. Abb. 9.8b):

$$a^2 + b^2 = c^2$$

mit $a^2 = |X_2 - X_1|$ und $b^2 = |Y_2 - Y_1|$ ergibt sich:

$$c = \sqrt{a^2 + b^2} = \sqrt{|X_2 - X_1| + |Y_2 - Y_1|}$$

a

	File	Edit	Font	Results
	Area	XM	YM	Slice
1	13	66.489	68.484	1
2	15	69.794	80.048	1
3	11	66.873	68.449	2
4	15	67.842	81.325	2
5	9	67.101	66.252	3
6	12	66.072	80.840	3
7	9	67.203	64.827	4
8	15	66.009	79.332	4
9	13	67.174	62.198	5
10	20	64.185	76.345	5
11	9	65.278	65.256	6
12	19	63.449	79.973	6

b

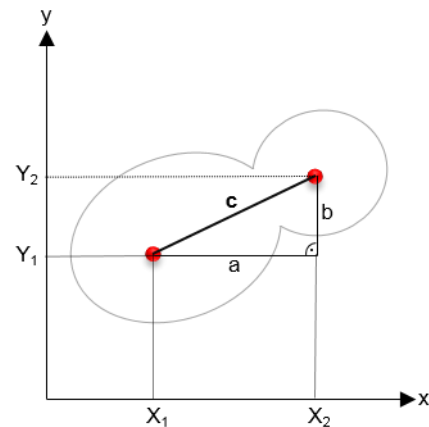


Abb. 9.8: Schematische Darstellung des Messsystems

a, Die Lage der Spindelpolkkörper (rote Punkte) kann mit einem Koordinatensystem bestimmt werden. X_1/Y_1 stellt die Koordinate des SPK der Mutter und X_2/Y_2 die des SPK der Tochterzelle dar. Der Abstand der SPK zueinander lässt sich aus den Koordinaten der SPK bestimmen, indem die Länge der Strecke c (Hypotenuse) aus den Längen der Strecken a und b über den Pythagoras-Satz errechnet wird.

b, Exemplarischer Datensatz in ImageJ. XM stellt die X-Koordinate und YM die Y-Koordinate des SPK-Mittelpunkts dar. Slice kennzeichnet den vermessenen Zeitwert.

Die erhaltenen Werte wurden anhand des verwendeten Objektivs und der Auflösung des Kamerasensors in μm umgerechnet. Die Berechnung erfolgte automatisiert über ein Makro (vgl. 7.4.2.4). Abschließend wurden die erhobenen Daten in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen. In einer Montage der Chromosomentrennung einer Wildtypzelle ist der zunehmende Abstand der beiden Spindelpolkkörper zu sehen. Als zweites Fluoreszenzsignal ist hier Net1-GFP zu sehen (s. Abb. 9.9a). Nach Auswertung der Daten konnte ein Profil für den Verlauf der Chromosomentrennung einer WT-Zelle erstellt werden (s. Abb. 9.9b). Die Trennung der Chromosomen beginnt mit einem Abstand der SPK von $1,7 \mu\text{m}$ in Minute 14 des Films und dauert ca. 20 Minuten. Der finale Abstand der SPK beträgt $6,4 \mu\text{m}$. Auch die Dynamik der Trennung und Verzögerungen durch das Spindelkontrollsystem können auf diese Weise detektiert werden, da sie sich als Plateau im Diagramm niederschlagen. Auf diese Weise kann auch die Verzögerung der rDNA-Trennung in Mutanten wie *tof2Δ* beobachtet und quantifiziert werden.

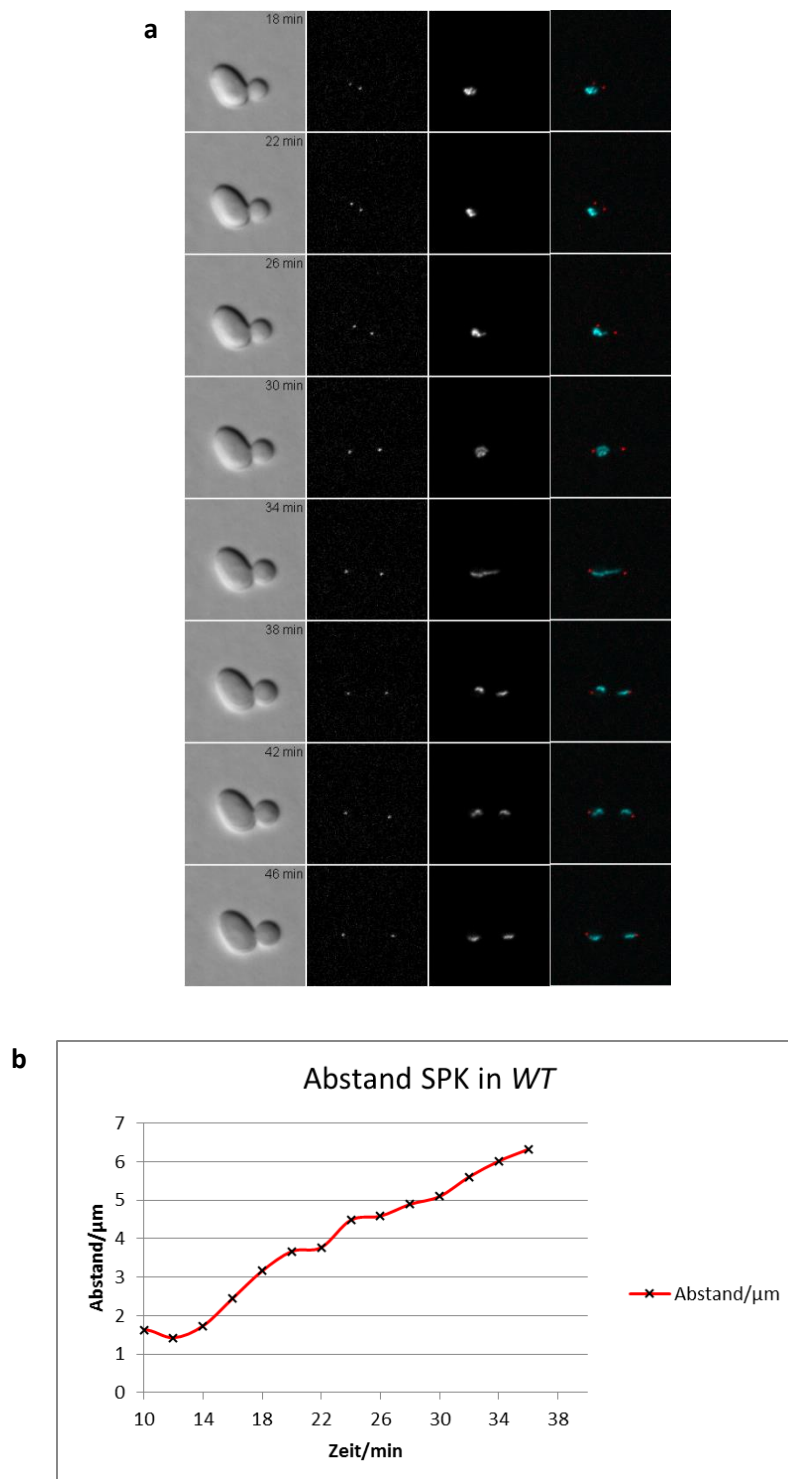


Abb. 9.9: Auswertung der SPK-Abstände während der Mitose in einer Wildtypzelle

a, Zeitrafferaufnahme des Stamms W10134 (*NET1-GFP-HIS3MX6 SPC42-3mCherry-URA3*) und Montage von DIC-Kanal, der beiden Fluoreszenzkanäle (SPK und Net1) sowie eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (merge). Der Zeitabstand zwischen den Aufnahmen beträgt 2 Minuten, gezeigt ist jeder zweite Zeitwert ab Minute 18. Der Maßstabsbalken beträgt 5 μm .

b, Grafische Auswertung der berechneten SPK-Abstände (in μm) in Abhängigkeit vom Zeitwert der Aufnahme, beginnend bei Minute zehn.

9.3 Verzeichnisse

9.3.1 Nomenklatur, Abkürzungen und Einheiten

Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur. Eine Ausnahme stellt die Schreibweise bei Verkürzung von NET1 dar. Hier wird wegen der besseren Verständlichkeit die Aminosäureschreibweise verwendet, auch wenn die Situation im Genom beschrieben wird.

Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen und *kursiv* markiert, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder nicht gebräuchlich ist.

Es wurden folgende Einheiten und Präfixe verwendet:

Ω	Ohm	M	Mega (10 ⁶)
°C	Grad Celsius	k	Kilo (10 ³)
A	Ampere	c	Centi (10 ⁻²)
d	Tage	m	Milli (10 ⁻³)
F	Farad	μ	Mikro (10 ⁻⁶)
g	Gramm	n	Nano (10 ⁻⁹)
h	Stunden		
l	Liter		
M	Molar (mol/l)		
m	Meter		
min	Minuten		
sek	Sekunden		
V	Volt		

Bei der Zentrifugation wurden die Umdrehungen pro Minute (Upm) abgegeben. Die Angabe des Molekulargewichts von Proteinen erfolgte in Kilodalton (kDa), die der Enzymaktivität in Units (U).

Aminosäuren und Nukleotide wurden nach den internationalen Regeln abgekürzt, bei Selektivmedien (vgl. 7.2.2) wurden die Abkürzungen A=Adenin, H=Histidin, L=Leucin, T=Tryptophan und U=Uracil verwendet.

Alle weiteren Abkürzungen sind im Folgenden in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt:

A

α-	anti- (bei Antikörpern)
Abb.	Abbildung
AD	Transkriptionsaktivierungsdomäne
amp	Ampicillin
APC/C	<i>anaphase promoting complex/cyclosome</i> (Ubiquitin-Ligase)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure

B

Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin

C

CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
chl	Chloramphenicol
CoIP	Coimmunpräzipitation
C-terminal	carboxy-terminal

D

D	Glucose (Dextrose)
DIC	Differentialinterferenzkontrast (<i>differential interference contrast</i>)
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

E

ε	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol

F

FEAR	<i>Cdc fourteen early anaphase release</i>
Flag	Flag-Epitop
F-Primer	<i>forward</i> -Primer

G

G	Galaktose
G418	Geneticin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein (<i>GTPase activating protein</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat

H

His6	6x Histidin
I	
IP	Immunpräzipitation
K	
kb	Kilobasen
KOD-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermococcus kodakaraensis</i>
L	
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
M	
MBP	Maltosebindeprotein
mCherry	monomeres Cherry (Fluoreszenzprotein)
MEN	<i>Mitotic Exit Network</i>
Myc	c-myc-Epitop
N	
N-terminal	amino-terminal
Nat	Nourseothricin
O	
OD	Optische Dichte
P	
<i>p</i>	Promotor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
R	
R	Raffinose
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNA PolI	RNA-Polymerase I
RNA PolIII	RNA-Polymerase III
Rnase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
R-Primer	<i>reverse</i> Primer

S

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SCF	Skp1-Cullin-F-Box (Ubiquitin-Ligase)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPB	Spindelpolkörper (<i>spindle pole body</i>)

T

<i>t</i>	Terminator
<i>t</i>	Zeit
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOR	<i>target of rapamycin</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA

U

UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute

W

WCE	Gesamtzellextrakt (<i>whole cell extract</i>)
WT	Wildtyp

X

X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid
XY	Hefe-Vollmedium

Y

Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid (<i>yeast two hybrid</i>)
-----	--

9.3.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
3.1	Cdc14-Regulation über FEAR und MEN	15
3.2	Organisation der rDNA - Aufbau einer Wiederholungseinheit	18
3.3	Sequenzvergleich der Proteine Net1, Tof2 und Dnt1 – das <i>pfam10407</i> -Motiv	20
3.4	Dreidimensionales Modell des Hefegenoms	21
4.1	Untersuchungen der Aminosäuresequenz von Net1 hinsichtlich NLS-ähnlicher Sequenzen	26
4.2	Net1(1-1189)-GFP zeigt in der Fluoreszenzmikroskopie eine typische nukleoläre Lokalisation	27
4.3	Schematische Darstellung der erstellten C-terminalen Verkürzungen von Net1	29
4.4	C-terminal verkürzte Net1-Konstrukte lokalisieren in diploiden und haploiden Zellen im Nukleolus	31-34
4.5	Lokalisation von Net1(1-341)-GFP und Net1(1-147)-GFP in haploiden Zellen	35-36
4.6	Net1 zeigt in der Coimmunpräzipitation Selbstinteraktion	38
4.7	Net1 interagiert mit Sir2	40
4.8	Net1(1-233) bildet mit zunehmender Proteinmenge Aggregate	42
4.9	Aggregate von Net1(1-341)-GFP lösen sich in der Anaphase auf und rekonstituieren anschließend	44
4.10	Lokalisation von Net1(1-147)-GFP in Abhängigkeit von Net1(1-1189) und Net1(234-1189)	46
4.11	Lokalisation von Net1(1-196)-GFP in Abhängigkeit von Net1(1-1189) und Net1(234-1189)	47
4.12	Lokalisation von Net1(1-233)-GFP in Abhängigkeit von Net1(1-1189) und Net1(234-1189)	48-49
4.13	Coimmunpräzipitation von Fob1 mit C-terminal verkürzten Net1-Derivaten	51
4.14	Coimmunpräzipitation von C-terminal verkürzten Net1-Derivaten mit Fob1	52
4.15	Y2H-Analyse C-terminaler Net1-Derivate mit Fob1	54
4.16	Net1(1-1189)-GFP lokalisiert unabhängig von Fob1 im Nukleolus	56
4.17	Net1(1-196)-GFP lokalisiert unabhängig von Fob1 im Nukleolus	58
4.18	Nur Net1-Fragmente mit intakter N-terminaler Region binden an DNA	60-61
4.19	Net1(1-233) bindet tRNA	62
4.20	Net1(1-233) bindet bevorzugt an DNA	63-64
4.21	Net1(1-341) bindet Cdc14 mit geringerer Affinität als Net1(1-455)	67
4.22	Net1(1-233) bindet nicht an Cdc14	68
4.23	Net1(234-455) bindet an Cdc14	69
4.24	Net1(234-455) inhibiert Cdc14 wie Net1(1-341)	72-73
4.25	Coimmunpräzipitation von Cdc14 mit mutierten Net1-Derivaten	75
4.26	Die Aminosäureaustausche S385D und S447D reduzieren die Toxizität von Net1(234-455)	76
4.27	Net1(1-341) ist hinreichend für die nukleoläre Lokalisation von Cdc14	78
4.28	Alle C-terminalen Net1-Verkürzungsstämmen weisen einen starken Wachstumsdefekt auf	80
4.29	Die C-terminale Verkürzung von Net1 bewirkt einen Wachstumsdefekt	82
4.30	C-terminale Fragmente von Net1 unterstützen das Wachstum von <i>net1Δ</i> -Stämmen	83
4.31	Net1(1052-1189) rettet den Wachstumsdefekt von <i>NET1(1-455)</i> -Stämmen	84
4.32	Net1(929-1189) und Net1(1052-1189) zeigen eine leichte Anreicherung im Nukleolus	86
4.33	Net1(929-1189) und Net1(1052-1189) lokalisieren unabhängig von <i>fob1Δ</i> und <i>rpa12Δ</i>	88
4.34	Coimmunpräzipitation von Net1(1-1189) mit der RNA Polymerase I-Untereinheit Rpa43	90
4.35	Coimmunpräzipitation von Net1(1052-1189) mit der RNA Polymerase I-Untereinheit Rpa43	91

4.36	Net1(1052-1189) ändert durch λ -PPase-Behandlung das Laufverhalten im SDS-Gel	92
4.37	Coimmunpräzipitation von Net1(1052-1189) mit Rpa43 nach Rapamycin-Behandlung	94
5.1	Zusammenfassende, schematische Darstellung einiger wichtiger Ergebnisse	96
5.2	Alignment der N-Termini von Net1 (AS 1-220) und Tof2 (AS 4-233)	98
5.3	Strukturähnlichkeit der N-Termini von Net1 und Par-3	101
5.4	Modell der Net1-Funktionen	111
9.1	Sequenzvergleich Net1-verwandter Proteine	159-160
9.2	Lokalisation von Net1(1-110)-GFP und Net1(1-69)-GFP und Vergleich der Proteinmenge	160-161
9.3	Lokalisation von Net1(1-233)-GFP und Net1(1-196)-GFP in haploiden Zellen	161-162
9.4	Lokalisation von Net1(234-455)-GFP	163
9.5	Wachstumstests zum Vergleich haploider <i>NET1(1-1051)-GFP</i> -Nachkommen	163
9.6	Net1(1052-1189) rettet den Wachstumsdefekt von Stämmen mit C-terminal verkürztem <i>NET1</i>	164
9.7	Net1(929-1189) rettet den Wachstumsdefekt von <i>NET1(1-455)</i> -Stämmen	165
9.8	Schematische Darstellung des Messsystems	166
9.9	Auswertung der SPK-Abstände während der Mitose in einer Wildtypzelle	167

10. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Katharina Hannig
Geboren am: 07.07.1984 in Regensburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Schierlinger Straße 7, 93107 Thalmassing OT Obersanding

Schulbildung

09/91 - 07/95 Grundschule Thalmassing
09/95 - 06/04 Albrecht-Altdorfer-Gymnasium Regensburg
25.06.2004 Abschluss: Abitur, Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/04 – 06/10 Studium der Diplom-Biologie, Universität Regensburg
21.06.2010 Abschluss: Diplom-Biologin
06/09 – 06/10 Diplomarbeit, Universität Regensburg, Lehrstuhl für Genetik,
Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Titel: Studien zur mitotischen rDNA-Trennung in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

08/10 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Genetik, Prof. Dr. Wolfgang Seufert, Universität Regensburg

Promotion

09/10 – 04/15 Universität Regensburg, Lehrstuhl für Genetik, Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Titel: Net1 – Ein modular aufgebautes und multifunktionales Protein im Nukleolus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

11. DANKSAGUNG

Non est ad astra mollis e terris via.

(Seneca)

Ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen hätte diese Arbeit nie das Licht der Welt erblickt. Bei ihnen möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. **Wolfgang Seufert** für die Möglichkeit unter seiner hervorragenden Betreuung diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Die anregenden Diskussionen und sein scharfer Blick für die Feinheiten und Nuancen unserer wissenschaftlichen Arbeit waren stets ein wertvoller und hilfreicher Beitrag.

Ein besonderer Dank geht an mein Mentorenteam:

PD Dr. **Achim Griesenbeck**, der voller Elan und Motivation das Thema voranbrachte, immer für motivierende Diskussionen zur Verfügung stand und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen Dank für die Begutachtung meiner Arbeit.

Prof. Dr. **Frank Sprenger**, der immer bei Anliegen, Fragen und Problemen rund um die Mikroskopie und ImageJ-Auswertung eine Lösung parat hatte und mit handgeschriebenen Auswertungsmakros zu Hilfe eilte.

Den Mitwirkenden der Prüfungskommission, Prof. Dr. Herbert Tschochner und Prof. Dr. Stephan Schneuwly möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Liebe Lehrstuhlmitglieder, liebe Ehemalige,

euch allen möchte ich ganz besonders danken, dass ihr immer für eine tolle Atmosphäre im Labor und Büro gesorgt habt und man nie Bedenken haben musste, wenn man Hilfe benötigt hat. Dieses Miteinander zeichnet eine wirklich gute Arbeitsgemeinschaft aus!

Ein besonderer Dank geht hierbei an mein „erweitertes“ Büro: **Martina Frank**, **Angelika Perzmaier** und **Sabine Weinzierl**, danke für die vielen Diskussionen und Gespräche, die Kuchen und Süßigkeiten, die Büchertauschbörse und die Aktivitäten innerhalb und außerhalb der Uni.

Danke auch an meine Büromitstreiter **Andrea Brücher**, **Philipp Girke** und **Nina Weber** für das Philosophieren über Gott, die Welt und die Wissenschaft, und auch für die aufmunternden Worte, wenn mal wieder Weltuntergangsszenario herrschte.

Lieben Dank an **Lea Arnold** und **Sebastian Höckner**, die Mitstreiter der mittäglichen Kaffeerunde, die das ein oder andere Mal hervorragende Ideen und Lösungsansätze hervorbrachte. Ihr habt mich immer unterstützt und aufgemuntert.

Dr. **Wolfgang Mages**, **Antje Machetanz-Morokane** und **Adelheid Weissgerber**, danke für die Unterstützung im Labor und auch außerhalb.

Ein Dankeschön geht auch an alle Praktikanten und Bacheloranden, die am Net1-Thema mitgewirkt haben.

Zum Schluss geht ein riesiges Dankeschön an die wichtigsten Menschen in meinem Leben: meine Familie, meine Eltern und an Sebastian. Ohne eure Unterstützung und den Rückhalt, den ihr mir vorbehaltlos immer und überall gebt, wäre dies alles nicht möglich gewesen. Vielen, vielen Dank!