

Charakterisierung der Zellzyklusfunktion von *rca1*
(*regulator of cyclin A*) in *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Ruth Grosskortenhaus

aus Köln

Köln 2001

Berichterstatter:

Prof. Dr. Maria Leptin

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

19. Februar 2002

Für meine Mutter

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Genetik im Labor von Herrn Priv.-Doz. Frank Sprenger durchgeführt. Ihm möchte ich vor allem dafür danken, dass er jederzeit ansprechbar und hilfsbereit war. Auch für den gewährten Freiraum im wissenschaftlichen Arbeiten und die kritische Auseinandersetzung danke ich ihm.

Frau Prof. Dr. Maria Leptin und Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth danke ich für die Übernahme der Gutachten.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Leptin und Klein für ein angenehmes Etagen- und Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Sprenger Labors Axel Dienemann, Edan Foley, Tina Schulze und Markus Kaspar. An die gegenseitige Unterstützung im Kampf mit den Höhen und Tiefen (Ihr wisst hoffentlich welche Tiefen ich meine!) des Laboralltags werde ich immer gerne zurückdenken. Der Humor und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft in diesem Labor haben ein mehr als angenehmes Arbeitsklima geschaffen.

Thomas und Susanne danke ich für das Korrekturlesen und ihr stetes Interesse an dem Fortschreiten meiner Arbeit.

Zum guten Schluss möchte ich mich ganz besonders bei Stefan bedanken, der mir durch seine fast grenzenlose Geduld oft weitergeholfen hat.

Inhalt

1. Einleitung	8
1.1 Der eukaryotische Zellzyklus.....	8
1.2 Der Zellzyklus in <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.3 Die Cyclin-abhängigen Kinasen.....	12
1.4 Die Regulation der Cyclin-abhängigen Kinasen.....	13
1.5 Cyclin A ist das einzig essentielle mitotische Cyclin in <i>Drosophila</i>	18
1.6 <i>rca1</i> ist ein potentieller Regulator von Cyclin A	20
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Geräte, Computer und Software.....	22
2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien.....	23
2.1.4 Antikörper	26
2.1.5 Fliegenstämme	28
2.1.6 Oligonukleotide.....	31
2.1.7 Bakterienstämme.....	32
2.1.8 Verwendete Vektoren.....	32
2.1.9 Hergestellte Plasmide.....	32
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	34
2.2.1.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.4 Quantifizierung von DNA und RNA	35
2.2.1.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	35
2.2.1.6 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten.....	35
2.2.1.7 Dephosphorylierung von Vektorenden	36
2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese	36
2.2.1.9 Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen.....	36
2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.2.1.11 Sequenzierung von DNA-Konstrukten	36
2.2.1.12 Präparation genomischer DNA von Fliegen	37
2.2.1.14 Herstellung DIG-markierter DNA Sonden	38
2.2.1.15 Herstellung DIG-markierter RNA Sonden.....	38
2.2.1.16 In vitro mRNA-Synthese.....	38
2.2.2 Biochemische Methoden.....	38
2.2.2.1 Herstellung von GST-Fusionsproteinen.....	38
2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.2.2.4 Coomassie Färbung.....	39
2.2.2.5 In vitro Translation mit Retic	39
2.2.2.6 Western-Blot Analyse	40
2.2.2.7 Ponceau S-Färbung	40
2.2.2.8 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen aus <i>Drosophila</i> Embryonen	40
2.2.2.9 Herstellung von Embryo-Extrakten	40
2.2.2.10 Proteinabbau-Experimente mit Embryo-Extrakten.....	40
2.2.3 <i>Drosophila</i> Methoden	41
2.2.3.1 Fliegenzucht	41

2.2.4	Histologische Methoden.....	41
2.2.4.1	Fixierung von Embryonen.....	41
2.2.4.2	Taxol-Fixierung.....	41
2.2.4.3	Methanol-Fixierung.....	41
2.2.4.4	Antikörperfärbungen an Embryonen.....	42
2.2.4.5	Hybridisierung mit DNA oder RNA Sonden (Tautz and Pfeifle, 1989).....	42
2.2.4.5	Fluoreszente RNA <i>in situ</i> Hybridisierung mit Tyramid Signal Amplification ...	43
2.2.4.6	Antikörperfärbungen an Imaginalscheiben	44
2.2.5	Injektionen.....	44
2.2.5.1	Herstellung transgener Fliegen.....	44
2.2.5.2	mRNA Injektionen in Embryonen	44
2.3	Expressions-Systeme in <i>Drosophila</i>	44
2.3.1	Das UAS / GAL4-System	44
2.3.2	Herstellung von Klonen mittels FLP / FRT vermittelter mitotischer Rekombination	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	<i>rca1</i> Allele.....	46
3.2	<i>rca1</i> Mutanten arretieren in der G2-Phase des Zyklus 16.....	46
3.3	Das <i>rca1</i> Expressionsmuster	47
3.4	Die Analyse der Aminosäuresequenz von Rca1	51
3.5	Das räumliche Cyclin A Expressionsmuster ist unverändert in <i>rca1</i> Mutanten	52
3.6	Die mitotischen Cycline A und B werden in <i>rca1</i> Mutanten vorzeitig abgebaut	53
3.7	Cyclin A Überexpression kann die Mitose 16 in <i>rca1</i> Mutanten wieder herstellen	58
3.8	Die Funktion von Rca1 wird auch in der späteren Entwicklung benötigt.....	62
3.9	Die Überexpression von Rca1	64
3.10	Die Überexpression von Rca1 und Cyclin A verhindert die Mitose.....	71
3.11	Rca1 kann den Effekt der Überexpression von Fizzy-related aufheben	72
3.12	<i>fzr</i> ist epistatisch über <i>rca1</i>	74
3.13	Cyclin E Überexpression kann die Mitose 16 in <i>rca1</i> Mutanten wieder herstellen.....	76
3.14	<i>rca1</i> ; <i>CycA</i> Doppelmутanten arretieren vor der Mitose 15	77
3.15	Rca1 und Fzr interagieren auch biochemisch	79
3.16	Emil, ein mögliches Homolog von Rca1 in Vertebraten?.....	81
4.	Diskussion	82
4.1	Die Expression von Rca1	82
4.2	Proteinmotive in Rca1	83
4.3	Der <i>rca1</i> Phänotyp	84
4.4	Der <i>rca1</i> Phänotyp basiert allein auf einem Mangel an Cyclin A	85
4.5	Rca1 verhindert den Cyclin A Abbau im Kern	86
4.6	Rca1 ist ein genereller Faktor in der Zellzyklusregulation	88
4.7	Rca1 ist ein spezifischer Inhibitor von Fizzy-related.....	89
4.8	Rca1 wird im Embryo und den Imaginalscheiben unterschiedlich reguliert	91
4.9	Die gleichzeitige Überexpression von Rca1 und Cyclin A verhindert die Mitose	92
4.10	Fzr kann durch Phosphorylierung und durch Rca1 reguliert werden.....	93
4.11	Ein Modell der Rca1 Funktion und Regulation	94
4.12	Mögliche Rca1 Homologe in Vertebraten	96
4.13	Weiterführende Arbeiten.....	98
5.	Literatur.....	100
6.	Zusammenfassung.....	109
7.	Abstract	110
8.	Lebenslauf.....	111
9.	Erklärung.....	112

1. Einleitung

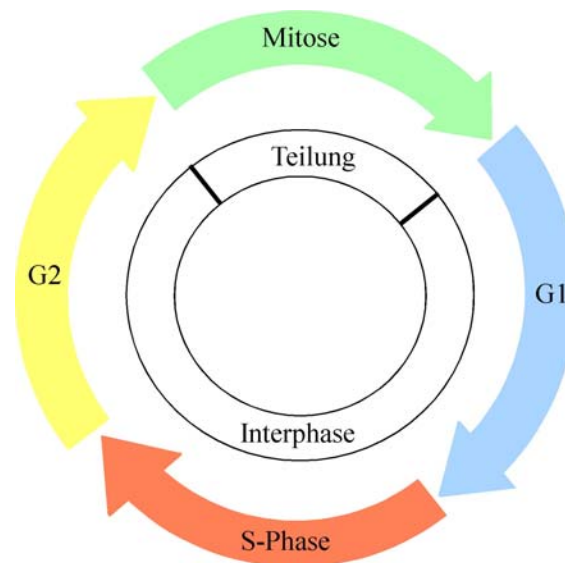
1.1 Der eukaryotische Zellzyklus

Die Fähigkeit zur Zellteilung ist eine fundamentale Eigenschaft lebender Organismen. Wenn sich eine eukaryotische Zelle teilt, durchläuft sie eine festgelegte Sequenz, die man Zellzyklus nennt. Zuerst vergrößert die Zelle ihre Masse, dann werden die Chromosomen verdoppelt und schließlich während der Mitose auf die zwei entstehenden Tochterzellen verteilt.

Der Zellzyklus wird auf mehreren Ebenen kontrolliert. Zum einen gibt es Regulationsmechanismen, die Größenzunahme und Zellteilung koordinieren. Würden Zellen ihre Masse und Größe auch nur geringfügig schneller verdoppeln als es ihrer Teilungsgeschwindigkeit entspricht, so nähmen sie mit jedem Zyklus an Größe zu. Wenn sie ihre Masse hingegen langsamer verdoppeln würden, müssten sie schrumpfen. Da aber die meisten Zelltypen über viele Generationen hinweg ihre durchschnittliche Größe beibehalten, muss es einen Mechanismus geben, der Teilung und Wachstum miteinander koppelt. Zum anderen wird die Einhaltung der Reihenfolge der Prozesse während des Zellzyklus genau kontrolliert. Für eine Zelle ist es zum Beispiel lebenswichtig, dass die Mitose erst dann eingeleitet wird, wenn die DNA vollständig repliziert ist, damit jede Tochterzelle einen kompletten Chromosomensatz erhält. Und schließlich muss der Zellzyklus mit Entwicklungsvorgängen wie der Morphogenese und Differenzierung koordiniert werden, da solche Vorgänge und die Zellteilung sich häufig gegenseitig ausschließen. Die Bedeutung der Regulationsmechanismen wird besonders offensichtlich, wenn diese gestört sind. Auf die Dauer führt unkontrollierte Zellteilung unweigerlich zum Absterben des gesamten Organismus, da entweder zu wenig Zellen gebildet werden oder Tumore durch ungehemmte Teilungen entstehen.

Eukaryoten von der Hefe bis zum Menschen haben ähnliche Zellteilungszyklen. Ein Standardzellzyklus wird in genau definierte Phasen unterteilt (Abb. 1.1 A). Während der Mitose teilt sich die Zelle, und zwei neue Zellen entstehen. Die Zeit zwischen zwei Mitosen wird als Interphase bezeichnet. Eine wichtige Voraussetzung für die Teilung ist die Verdopplung des gesamten Genoms der Zelle. Die Replikation der DNA erfolgt in einem definierten Zeitraum während der Interphase, der als S-Phase (Synthese-) bezeichnet wird. Zwei sogenannte Gap-Phasen (Gap = Lücke) trennen S-Phase und Mitose. In der ersten Gap-Phase (G1), vor der DNA Replikation, erfolgt die Synthese von Faktoren, die für die S-Phase benötigt werden. Den Abschnitt unmittelbar vor der Mitose bezeichnet man als G2-Phase. In

A



B

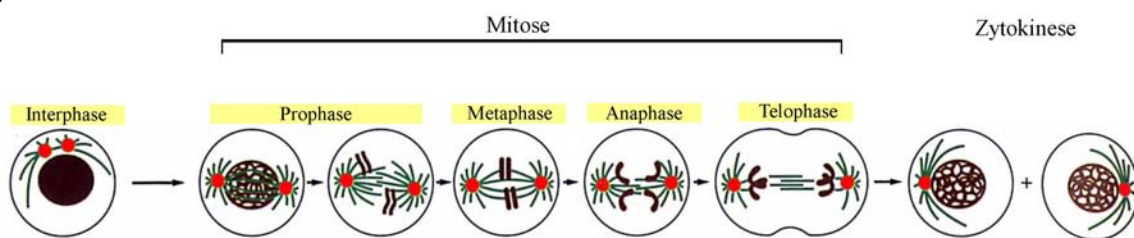


Abb. 1.1 Ein eukaryotischer Standardzellzyklus

(A) Ein typischer eukaryotischer Zellzyklus besteht aus vier Phasen; der Mitose, in der die chromosomale DNA auf die Tochterzellen aufgeteilt wird, der S-Phase, in der DNA Replikation stattfindet und zwei sogenannten Gap-Phasen (G1 und G2). Die drei letztgenannten werden zusammen auch als Interphase bezeichnet, d.h. als Abschnitt zwischen zwei Mitosen.

(B) Die Mitose wird ebenfalls noch mal in vier Phasen unterteilt. In der Prophase kondensieren die Chromosomen, die Kernmembran löst sich auf und die Spindel bindet an die DNA. In der Metaphase reihen sich die kondensierten Chromosomen im Spindelzentrum auf und bilden die sogenannte Metaphasenplatte. Die Bindung zwischen den Schwesterchromatiden wird in der Anaphase aufgelöst, und die Chromatiden werden durch die mitotische Spindel zu entgegengesetzten Polen gezogen. Danach dekondensiert die DNA wieder, und eine neue Kernmembran wird gebildet (Telophase). Durch die anschließende Zytokinese entstehen zwei neue Zellen.

dieser Zeit nimmt die Zelle weiter an Masse zu und bereitet sich auf den Eintritt in die Mitose vor. Die Mitose ist der spektakulärste sichtbare Teil des Zellzyklus. Aufgrund der DNA Morphologie wird sie in vier Phasen unterteilt (Abb. 1.1 B). In der Interphase liegt die DNA in dekondensierter Form vor. Der Eintritt in die Mitose wird durch die Kondensation der Chromosomen eingeleitet und wird als Prophase bezeichnet. In dieser Phase wird auch die Kernmembran aufgelöst, und die Chromosomen bekommen Kontakt mit dem Spindelapparat. In der Metaphase reihen sich die stark kondensierten Chromosomen in der sogenannten

Metaphasenplatte im Spindelzentrum auf. Diese Konfiguration wird durch die Kräfte der mitotischen Spindel und durch den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden aufrechterhalten. Die Proteine, die für den Zusammenhalt von Schwesterchromatiden verantwortlich sind, nennt man Cohesine (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997). Diese Proteinfamilie wurde besonders gut in der Bierhefe *S. cerevisiae* untersucht. Der Komplex bildet sich entlang der gesamten Chromosomenarme. Für den Eintritt in die Anaphase wird der Cohesin Komplex durch Proteolyse zerstört, so dass die Schwesterchromatiden in entgegengesetzte Richtungen, d.h. zu den Spindelpolen gezogen werden können. In höheren Eukaryoten wird der größte Teil der Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden schon während der Prophase aufgelöst (Waizenegger et al., 2000). Nur der Zusammenhalt an den Kinetochoren wird erst beim Eintritt in die Anaphase aufgelöst.

In der letzten Phase der Mitose, der Telophase, dekondensiert die DNA wieder, und es bildet sich eine neue Kernmembran um jeden Chromatidensatz. Schließlich trennt die Plasmamembran die beiden neu entstandenen Kerne und das sie umgebende Zytoplasma in zwei Zellen.

1.2 Der Zellzyklus in *Drosophila melanogaster*

Während der Entwicklung eines Organismus kann es zu Abweichungen von dem oben beschriebenen Standardzellzyklus kommen. Die Zellzyklusabläufe werden der Dynamik der Entwicklung angepasst bzw. von ihr reguliert und sind deshalb in Geschwindigkeit und Zusammensetzung der einzelnen Phasen unterschiedlich. Während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* kann man drei Varianten des Zellzyklus beobachten (Edgar et al., 1994). Die ersten zehn Teilungen sind schnelle, synchrone Kernteilungen, die in einem gemeinsamen Zytoplasma stattfinden. Diese Zyklen bestehen nur aus S-Phase und Mitose und sind mit einer Dauer von acht bis zehn Minuten die schnellsten bekannten Teilungen in Eukaryoten (Edgar und Lehner, 1996). Die Kerne befinden sich am Anfang noch im Inneren des Embryos, wandern aber nach der siebten Teilung an die Peripherie. Die zurückbleibenden Kerne bilden die sogenannten Dotterkerne. Diese durchlaufen insgesamt nur zehn Teilungen und werden schließlich zu polyploiden Dotterzellen. Im Laufe der zehnten Teilung erreichen die anderen Kerne die Peripherie und bilden ein einschichtiges, syncytiales Blastoderm. Am posterioren Pol formen sich zu diesem Zeitpunkt als erste Zellen die Polzellen. Die folgenden vier Teilungen (10-13) sind zwar länger, bestehen aber immer noch nur aus S-Phase und Mitose. Diese Kernteilungen sind metasynchron. Das bedeutet, die Mitose beginnt zuerst an den Polen des Embryos und breitet sich dann zum Äquator hin aus.

Die erste G2-Phase tritt im Zyklus 14 auf. Gleichzeitig erfolgt auch die Zellularisierung des Embryos. Aus dem syncytialen Blastoderm wird das zelluläre Blastoderm, ein einschichtiges Epithel aus ca. 6000 Zellen. Während die ersten dreizehn Kernteilungen ausschliesslich von maternal bereitgestellten Komponenten gesteuert wurden, sind alle nachfolgenden Teilungen nun von zygotischer Transkription abhängig (Edgar et al., 1994b). Das führt zur Einführung der ersten G2-Phase im Zellzyklus 14. Die Zellteilungsgeschwindigkeit verringert sich, und dies wird auch für die Teilungen 15 und 16 beibehalten (Edgar und O'Farrell, 1990). Unmittelbar nach der Zellularisierung beginnt die Gastrulation. Die Zellteilungen im Embryo verlaufen nun nicht mehr synchron bzw. metasynchron, sondern erfolgen in einem komplexen räumlichen und zeitlichen Muster aus 25 Bereichen, den sogenannten mitotischen Domänen (Foe, 1989). Das bedeutet, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt immer eine bestimmte Gruppe an Zellen in die Mitose eintritt. Nach der Mitose 16 treten die meisten Zellen in die erste G1-Phase der Embryogenese ein, eine Ausnahme sind u. a. die Zellen des sich entwickelnden Nervensystems. Die Zellen der Epidermis und der inneren Organe durchlaufen nun mehrere S-Phasen ohne dazwischenliegende Mitosen, sogenannte Endozyklen, und werden polyploid. Die Zellproliferation setzt erst wieder nach der Embryogenese ein. Zellen, aus denen später die adulte Fliege entsteht, werden als Imaginalscheiben beiseite gelegt und teilen sich erst mit dem Beginn der larvalen Entwicklung wieder.

Die drei oben beschriebenen Zellteilungsvarianten während der Embryogenese von *Drosophila* zeigen, wie der Zellzyklus den unterschiedlichen Bedürfnissen während der Entwicklung angepasst werden kann. Die ersten dreizehn Teilungen bestehen nur aus Mitose und S-Phase und ermöglichen so eine rasche Entwicklung des Embryos. Durch die Einführung einer G2-Phase im Zyklus 14 können die Teilungen mit den morphogenetischen Veränderungen und den Musterbildungsprozessen im Embryo koordiniert werden. Die Endozyklen, die am Ende der Embryogenese beginnen und auch in vielen Geweben der Larve zu finden sind, ermöglichen den Zellen, ihre Masse zu vermehren. Diese Zyklen werden nur durch das Nahrungsangebot der Larve reguliert (Britton und Edgar, 1998). All diese Beispiele verdeutlichen, wie die unterschiedlichen Entwicklungsstufen den Zellzyklus bestimmen können. Wie wird jedoch der Phasenübergang innerhalb eines Zellzyklus reguliert?

1.3 Die Cyclin-abhängigen Kinasen

Der Übergang zwischen den einzelnen Phasen eines Zellzyklus wird durch eine Klasse von konservierten Serin / Threonin Kinasen, den Cyclin-abhängigen Kinasen (Cyclin dependent kinase = Cdk), reguliert (Nasmyth und Nurse, 1981). Wie der Name schon sagt, brauchen diese Kinasen für ihre Aktivierung u. a. eine spezifische regulatorische Untereinheit, ein Cyclin (Cyc) (Fisher, 1997). Die periodische Bildung, Aktivierung und Dissoziation von verschiedenen Cyclin / Cdk Komplexen steuert den Zellzyklus. Niedere Eukaryoten wie die Bier- und Spaltheffen besitzen nur eine Cyclin-abhängige Kinase, Cdc28, bzw. Cdc2 (Beach et al., 1982), wohingegen in höheren Eukaryoten mehrere Cdk Homologe existieren. Diese Homologe haben sich während der Evolution für bestimmte Zellzyklusstadien spezialisiert. Der einleitende Schritt in einem Zellzyklus in Metazoen wird von einem Komplex aus Cdk4 und / oder Cdk6 und Cyclin D (CycD) katalysiert (Matsushime et al., 1994). Es wird angenommen, dass die CycD / Cdk Komplexe das Bindeglied zwischen dem Zellzyklus und extrazellulären Signalen darstellen und so z.B. auf Mitogen-Stimulation reagieren, indem sie eine Zellteilung einleiten (Sherr et al., 1994). Der aktive CycD / Cdk Komplex phosphoryliert als Antwort auf solche Signale sogenannte Taschenproteine wie das Retinoblastomprotein (Rb) (Sherr, 1994; Sherr und Roberts, 1999). Hyperphosphoryliertes Rb ist nicht mehr in der Lage den Transkriptionsfaktor E2F zu inhibieren (Kato et al., 1993). E2F wird für die Transkription einer großen Zahl von Faktoren benötigt, die am G1⇒S Übergang beteiligt sind wie z.B. die Ribonukleotidreductase und Cyclin E (CycE) (Dyson, 1998). Auch der Komplex aus Cyclin-abhängiger Kinase 2 (Cdk2) und CycE phosphoryliert Rb und verstärkt somit die Aktivierung von E2F. *Drosophila* besitzt mit Cdk4 nur ein Cdk4 / 6 Homolog (Sauer et al., 1996). Dies bindet ebenfalls an CycD und kann so Rb phosphorylieren, was darauf hindeutet, dass die Funktion von Cdk4 während der Evolution konserviert wurde. Erstaunlicherweise ist die Aktivität des CycD / Cdk4 Komplexes in *Drosophila* nicht essentiell für den Zellzyklus (Datar et al., 2000; Meyer et al., 2000). *Cdk4* Mutanten sind lebensfähig, zeigen allerdings eine Verlängerung aller Zellzyklusphasen. Die Überexpression von CycD / Cdk4 verkürzt hingegen alle Phasen und nicht nur den Aufenthalt der Zelle in G1. Die Hauptaufgabe des CycD / Cdk4 Komplexes in *Drosophila* scheint deshalb in erster Linie die Kontrolle des Zellwachstums (Zunahme an Masse) zu sein. Ob er auch als Sensor für extrazelluläre Signale den Zellzyklus mit der Außenwelt verbindet, muss erst noch gezeigt werden.

Für den Verlauf der S-Phase, also der DNA Replikation, wird in höheren Eukaryoten die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (Cdk2) benötigt, während die Mitose durch die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (Cdk1) bestimmt wird. Cdk1 assoziiert mit den

mitotischen Cyclinen A und B (CycA und CycB), während Cdk2 einen Komplex mit CycE bildet. In Säugerzellen wird ein Komplex aus Cdk2 und CycA ebenfalls für die S-Phase benötigt (Pagano et al., 1992). Der Anteil der verschiedenen Cdks und Cycline an der S-Phase und der Mitose wurde in *Drosophila* schon sehr detailliert untersucht. Für die DNA Replikation wird der CycE / Cdk2 Komplex benötigt (Duronio und O'Farrell, 1995; Duronio et al., 1995; Knoblich et al., 1994), während der Eintritt und der Verlauf der Mitose von Cdk1 abhängt. Es gibt in *Drosophila* drei mitotische Cycline, CycA, CycB und CycB3, und jedes von ihnen wird im Komplex mit Cdk1 für bestimmte Ereignisse während der Mitose benötigt (Jacobs et al., 1998; Knoblich und Lehner, 1993; Lehner und O'Farrell, 1990). Erstaunlicherweise sind nur *CycA* Mutanten mit einem lethalen Phänotyp assoziiert, während homozygote *CycB* oder *CycB3* Mutanten lebensfähig sind (Jacobs et al., 1998; Lehner und O'Farrell, 1989). Dies zeigt, dass nur CycA essentiell für den Zellzyklus ist. Zusätzlich spielt der CycA / Cdk1 Komplex auch eine Rolle während der S-Phase, scheint jedoch hier nicht unbedingt benötigt zu werden (Sprenger et al., 1997).

1.4 Die Regulation der Cyclin-abhängigen Kinasen

Die Aktivität der Cdks wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert:

1. durch Phosphorylierung,
2. durch Assoziation mit inhibitorischen Proteinen, sogenannten Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CKI),
3. durch die Assoziation mit dem entsprechenden Cyclin.

1.4.1 Phosphorylierung

Die Aktivität der Cyc / Cdk Komplexe wird durch spezifische Phosphorylierungen an konservierten Tyrosin und Threonin Resten beeinflusst. Nach der Bildung des Cyc / Cdk Komplexes muss die Cdk Einheit noch an einem bestimmten Threoninrest (T161) phosphoryliert werden, um vollständig aktiv zu sein. T161 gehört zu einem Strukturelement der Kinase, dem sogenannten T-Loop, das normalerweise das aktive Zentrum der Kinase blockiert (Morgan, 1996). Durch die Phosphorylierung wird das aktive Zentrum für die Substrate zugänglich. Diese Phosphorylierung wird von den Cdk aktivierenden Kinasen (CAK) katalysiert (Solomon et al., 1992). Die CAK der Bierhefe, CIV, ist eine monomerische, gut charakterisierte Kinase (Kaldis et al., 1996; Thuret et al., 1996). In höheren Eukaryoten ist erst wenig über diese Art der Kinasen bekannt. In *Drosophila* kann ein heterotrimerer Komplex aus Cdk7 / CycH / Mat1 diese Phosphorylierung in vitro

durchführen. *Cdk7* Mutanten sind letal und weisen zahlreiche Zellzyklusdefekte auf (Devault et al., 1995; Fesquet et al., 1997; Fisher und Morgan, 1994; Larochelle et al., 1998). Da der *Cdk7 / CycH / Mat1* Komplex jedoch auch noch in anderen grundlegenden Prozessen eine Rolle spielt, ist nicht klar, ob diese Zellzyklusdefekte direkt auf den Verlust der CAK Aktivität zurückzuführen sind (Roy et al., 1994; Serizawa et al., 1995). Außerdem ist noch nicht eindeutig geklärt, ob *Cdk7* Cdk's auch in vivo aktivieren kann.

Die Cdk's können jedoch nicht nur durch Phosphorylierung aktiviert, sondern auch inhibiert werden. Dies geschieht an konservierten Threonin- und Tyrosinresten (T14 und Y15) durch die Kinasen Wee und Myt (Campbell et al., 1995; Morgan, 1996; Mueller et al., 1995). Diese inhibitorische Phosphorylierung wird durch die Phosphatase *Cdc25* wieder rückgängig gemacht (Russell und Nurse, 1986). In *Drosophila* tritt diese inhibitorische Phosphorylierung das erste Mal im Zellzyklus 14 auf und bewirkt die Einführung der G2-Phase. Der Eintritt in die Mitose hängt dann von der zygotischen Expression des *Cdc25* Homologs *string* (*stg*) ab, das die inhibitorische Phosphorylierung an *Cdk1* beseitigt (Edgar and O'Farrell, 1990). Die Expression von *string* unterliegt der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren, die auch die Musterbildung im Embryo steuern (Lehman et al., 1999). Durch das komplexe Muster dieser Transkriptionsfaktoren wird *String* nicht homogen im Embryo exprimiert sondern in zeitlich und räumlich abgegrenzten Domänen, in denen es dann die Mitose induziert. So entstehen die mitotischen Domänen (Edgar et al., 1994b). Es existieren zwei *Cdc25* Homologe in *Drosophila*, *string* und *twine* (*twe*), wobei *twine* nur in der Keimbahn exprimiert wird.

1.4.2 Cdk Inhibitoren (CKIs)

Ein weiterer konservierter Mechanismus zur Regulation von Cdk's ist ihre Inhibition durch die sogenannten Cdk Inhibitoren (CKI) (Peter und Herskowitz, 1994; Sherr and Roberts, 1999; Sherr und Roberts, 1995). Diese Proteine sind schon in einer Reihe von Organismen untersucht worden und funktionieren, indem sie an die Kinase, das Cyclin oder an den Komplex aus beiden binden. In Säugerzellen gibt es zwei Familien von CKIs. Die CKIs der INK4 Familie inhibieren spezifisch *CycD* im Komplex mit *Cdk4* und *Cdk6* (Serrano et al., 1995). Die Mitglieder der KIP / CIP Familie sind spezifische Inhibitoren der S-Phasen Cycline (Toyoshima und Hunter, 1994). Interessanterweise ist noch kein CKI in Säugerzellen identifiziert worden, der spezifisch die mit mitotischen Cyclinen assoziierte Kinaseaktivität inhibiert. In Bier- und Spalthefe sind dies die Faktoren *Sic1* und *Rum1* (Correa-Bordes und Nurse, 1995; Mendenhall, 1993). In *Drosophila* existieren keine CKIs der INK4 Familie. Das einzige bekannte Gen, das für einen CKI der KIP / CIP Familie codiert, ist *dacapo*. *Dacapo*

bindet und inhibiert den CycE / Cdk2 Komplex (de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996). Es wird für die Einführung der G1-Phase im Zyklus 17 der Embryogenese, aber auch in der späteren Entwicklung benötigt. Zusätzlich gibt es in *Drosophila* einen CKI, der spezifisch mitotische Kinaseaktivität inhibiert, Roughex (Rux) (Gonczy et al., 1994; Thomas et al., 1994). Rux kann an die mitotischen Cyclinen A und B binden und die mit ihnen assoziierte Cdk1 Aktivität inhibieren. Zusätzlich kann es auch die eigentliche Aktivierung von Cdk1 verhindern (Foley et al., 1999; Foley und Sprenger, 2001). Es ist gezeigt worden, dass die Funktion von *rux* während der Mitose und in der G1-Phase eine Rolle spielt. In *rux* Mutanten kommt es zu einer Verzögerung des Übergangs von Meta- zu Anaphase durch eine länger anhaltende CycA / Cdk1 Aktivität (Foley and Sprenger, 2001). Außerdem wird die Funktion von *rux* für die Einführung und Aufrechterhaltung der G1-Phase u.a. im sich entwickelnden Auge benötigt (Thomas et al., 1994). Es gewährleistet, dass die Inaktivierung von Cdk1 nach dem Austritt aus der Mitose aufrechterhalten wird. Dies ist notwendig, um einen vorzeitigen Eintritt in die S-Phase zu verhindern.

1.4.3 Cycline

Die dritte Regulationsmöglichkeit der Cdks besteht in der Verfügbarkeit der jeweiligen Cycline. Abgesehen von den oben beschriebenen Phosphorylierungen benötigt eine Zelle eine bestimmte Menge an mitotischen Cyclinen, um in die Mitose eintreten zu können. So wird z.B. in *Drosophila* die Länge der Zyklen 8-13, in denen es noch keine inhibitorische Phosphorylierung von Cdk1 gibt, nur von der Akkumulationsgeschwindigkeit der mitotischen Cycline bestimmt (Edgar et al., 1994).

Damit eine Zelle auch wieder aus der Mitose austreten kann, müssen diese Cycline abgebaut werden. Der Abbau geschieht durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse (Murray, 1995). Eine wichtige Komponente in diesem Prozess ist der "Anaphase Promoting Complex" (APC). Dies ist eine E3 Ubiquitin Ligase, die Proteine für den Ubiquitin abhängigen Abbau durch das Proteasom markiert und damit u.a. den Austritt aus der Mitose ermöglicht (Morgan, 1999; Zachariae und Nasmyth, 1999). Der APC und viele seiner Substrate sind während des gesamten Zellzyklus in der Zelle vorhanden, dennoch ist seine Aktivität auf die Mitose und die G1-Phase beschränkt. Das wird durch die zellzyklusabhängige Assoziation des APCs mit zwei Regulatoren, Cdc20 und Cdh1, gewährleistet (Inbal et al., 1999; Kramer et al., 2000; Visintin et al., 1997; Yamaguchi et al., 1997). Cdc20 und Cdh1 besitzen die mehrfache Wiederholung eines sogenannten WD40 Proteinmotivs, und Homologe dieser Faktoren sind schon in mehreren Organismen identifiziert worden. Cdc20 und Cdh1 sind ihre Namen in

Hefe und Säugerzellen. In *Drosophila* kodieren die Gene *fizzy* (*fzy*) und *fizzy-related* (*fzr*) für diese zwei Faktoren (Dawson et al., 1993; Dawson et al., 1995; Sigrist und Lehner, 1997). Die Bindung von Cdc20 und Cdh1 an den APC wird unterschiedlich reguliert. Der Komplex aus APC und Cdc20 ist nur während der Mitose in der Zelle zu finden, und seine Aktivität leitet den Übergang von der Meta- in die Anaphase ein. Für die Bindung an Cdc20 muss mindestens eine Untereinheit des APCs phosphoryliert werden (Kramer et al., 2000; Shteinberg et al., 1999). Hierfür werden verschiedene mitotische Kinasen verantwortlich gemacht. Die Abhängigkeit der Bindung von Cdc20 an den APC von dieser mitotischen Phosphorylierung gewährleistet, dass der Komplex nur während der Mitose aktiv ist. Zusätzlich wird seine Aktivität in der Mitose noch durch den Spindelkontrollpunkt eingeschränkt (Amon, 1999). Dieses System erkennt die Anwesenheit von Kinetochoren, die nicht mit der mitotischen Spindel verknüpft sind. Bis diese Verknüpfung erfolgt, dienen die Kinetochoren als Sammelpunkt für aktives Mad2 Protein. Dies bindet an Cdc20 und inhibiert solange die mit ihm assoziierte APC Aktivität, bis alle Kinetochoren mit dem Spindelapparat verbunden sind (Fang et al., 1998; Fang et al., 1999; Shah und Cleveland, 2000).

Cdh1 bindet erst am Ende der Mitose an den APC, und diese Bindung bleibt auch während der G1-Phase bestehen. Die Bildung dieses Komplexes hängt vom Cdh1-Phosphorylierungsstatus ab, denn nur unphosphoryliertes Cdh1 ist in der Lage, den APC zu aktivieren (Kotani et al., 1999; Kramer et al., 2000; Zachariae et al., 1998). Es wird angenommen, dass Cdh1 sowohl von Cdk1 als auch von Cdk2 phosphoryliert wird. Das bedeutet, dass es nur in Phasen geringer Cdk Aktivität an den APC binden und ihn aktivieren kann (Blanco et al., 2000; Jaspersen et al., 1999; Listovsky et al., 2000; Sorensen et al., 2001; Zachariae et al., 1998). Dies ist am Ende der Mitose der Fall, wenn durch den Abbau der mitotischen Cycline die Cdk1 Aktivität abnimmt und in der G1-Phase. Allerdings ist auch in der G2-Phase nur geringe Cdk Aktivität zu finden. Wie die Cdh1 assoziierte APC Aktivität in dieser Phase reguliert wird ist bisher wenig untersucht.

In *Drosophila* gibt es drei mitotische Cycline, CycA, CycB und CycB3. Alle drei sind während der Interphase stabil und werden im Verlauf der Mitose abgebaut (Abb. 1.2). Dieser Abbau wird auch in der G1-Phase aufrechterhalten. Für den Abbau der Cycline während der Mitose wird das Protein Fzy (das Cdc20 Homolog in *Drosophila*) benötigt. Die Substrate des APC-Fzy Komplexes zeichnen sich durch ein neun Aminosäuren langes Motiv, die sogenannte "destruction box" (db), aus (Glotzer et al., 1991). Die Deletion dieses Motivs in CycB und CycB3 verhindert den mitotischen Abbau dieser Cycline (Sigrist et al., 1995). CycA besitzt zwei Aminosäureabschnitte, die Ähnlichkeit mit dem db-Motiv haben. Eine Deletion beider

Sequenzabschnitte hat jedoch keine Auswirkung auf den mitotischen Abbau von CycA (Jacobs et al., 2001; Kaspar et al., 2001). Ein drittes noch nicht näher charakterisiertes Element im N-Terminus von CycA scheint essentiell für den Abbau zu sein (Kaspar et al., 2001). Der Mechanismus, der CycA für den mitotischen Abbau markiert ist somit noch nicht bekannt. Es ist allerdings klar, dass dieser Mechanismus von Fzy abhängig ist, denn in *fzy* Mutanten sind alle mitotischen Cycline stabil. Die mutanten Embryonen bleiben in der Metaphase der Mitose 16 stecken, da zu diesem Zeitpunkt der maternale Vorrat an Fzy Protein aufgebraucht ist (Dawson et al., 1993; Sigrist et al., 1995). Für die Aufrechterhaltung des Abbaus der mitotischen Cycline während der G1-Phase wird der APC-Fzy Komplex benötigt. Fzy ist das *Drosophila* Homolog von Cdh1.

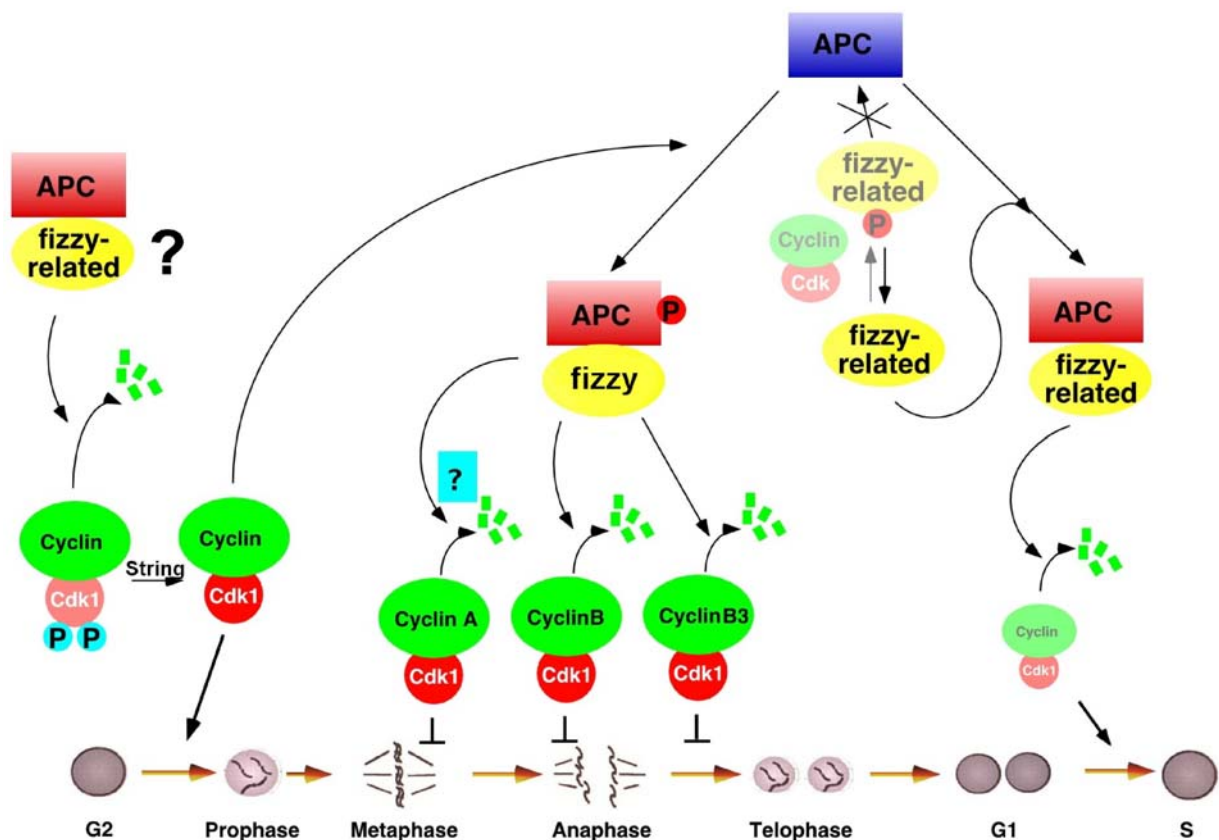


Abb. 1.2 Modell des Cyclinabbaus in *Drosophila*

Für den Eintritt in die Mitose muss der Cyc / Cdk1 Komplex durch die Phosphatase String aktiviert werden. Ein Substrat des aktiven Cyc / Cdk1 Komplexes ist der APC. Nur mitotisch phosphorylierter APC kann an seinen Co-Faktor Fzy binden. APC-Fzy leitet dann die Ubiquitin vermittelte Proteolyse der Cycline ein. Der zweite Regulator des APCs, Fzy, ist ebenfalls ein Substrat des Cyc / Cdk1 Komplexes. Die Phosphorylierung hindert Fzy daran den APC zu aktivieren. Im Verlauf der Mitose verringert sich die Cdk1 Aktivität durch den Abbau der Cycline. In dieser Situation kann unphosphoryliertes Fzy angesammelt werden, das schließlich ebenfalls den APC aktiviert. Während APC-Fzy nur in der Mitose aktiv ist, hält der APC-Fzy Komplex den Abbau der Cycline am Ende der Mitose und in G1 aufrecht. Wie die Fzy assoziierte APC Aktivität in der G2-Phase, in der ebenso wie in G1 keine oder nur geringe Cdk Aktivität vorhanden ist, reguliert wird, ist kaum untersucht.

In *fzr* Mutanten kann die G1-Phase im Zyklus 17 nicht etabliert werden, da die mitotischen Cycline nach der Mitose 16 wieder re-akkumulieren. Das bewirkt, dass die Zellen einen zusätzlichen Zellzyklus durchlaufen, sich also ein siebzehntes Mal teilen (Sigrist and Lehner, 1997). Studien in anderen Organismen haben gezeigt, dass die Substratspezifität des APC-Cdh1 Komplexes nicht von der Anwesenheit einer *db* abhängt. Die Substrate dieses Komplexes zeichnen sich durch eine sogenannte KEN-Box aus, wobei KEN die Aminosäuren und deren Reihenfolge im Protein bezeichnet (Lysin (K), Glutaminsäure (E), Asparagin (N)) (Pfleger und Kirschner, 2000).

Ein weiterer Mechanismus, Zellzykluskomponenten abzubauen, beruht ebenfalls auf dem Prinzip der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse durch das Proteasom. An diesem Prozess ist eine andere Ubiquitin Ligase beteiligt, der sogenannte SCF-Komplex. SCF steht für die Grundkomponenten dieses Proteinkomplexes: Skip1, Cullin und F-Box Protein (Bai et al., 1996). Im Gegensatz zum APC ist der SCF während des gesamten Zellzyklus aktiv, und der Abbau seiner Substrate, die keine besondere Erkennungssequenz aufweisen, wird durch deren Verfügbarkeit und Phosphorylierungsstatus reguliert. Die Substratspezifität wird durch das jeweilige F-Box Protein im Komplex vermittelt (Feldman et al., 1997; Skowyra et al., 1997). Während die mitotischen Cycline durch APC vermittelte Ubiquitilierung abgebaut werden, ist CycE ein Substrat des SCF-Komplexes (Koepp et al., 2001).

1.5 Cyclin A ist das einzig essentielle mitotische Cyclin in *Drosophila*

Wie schon erwähnt, existieren in *Drosophila* drei mitotische Cycline (A, B und B3), die an Cdk1 binden und verschiedene Prozesse der Mitose regulieren. Es wird angenommen, dass CycA an der Regulation früher mitotischer Ereignisse wie der Kondensation der Chromosomen und der Auflösung der Kernmembran beteiligt ist, während CycB für Prozesse in der Metaphase benötigt wird. CycB3 spielt erst in der Anaphase eine Rolle. Alle drei Cycline werden im Verlauf der Mitose abgebaut. Dieser Abbau erfolgt nach einem spezifischen zeitlichen Muster, wobei CycA in der Metaphase, CycB beim Übergang in die Anaphase und CycB3 in der Anaphase abgebaut wird (Sigrist et al., 1995). Der Abbau der Cycline ist essentiell für den Austritt aus der Mitose, was anhand stabiler Deletionskonstrukte gezeigt werden konnte (Sigrist et al., 1995). Dabei blockiert stabiles CycA die Mitose in der Metaphase, CycB in der frühen Anaphase und CycB3 in der späten Anaphase. Es besteht somit ein Zusammenhang zwischen den Zeitpunkten, in denen die Mitose blockiert wurde und den Zeiten, in denen die Cycline normalerweise abgebaut werden. Wie dieser zeitlich unterschiedliche Abbau reguliert wird, ist bislang noch nicht bekannt.

Obwohl die drei mitotischen Cycline teils unterschiedliche teils überlappende Aufgaben während der Mitose haben, ist nur CycA essentiell für die Zellteilung. Homozygote *CycB* und *CycB3* Mutanten sind lebensfähig, allerdings sind *CycB3* Weibchen steril (Jacobs et al., 1998). *CycA* mutante Embryonen durchlaufen die ersten 15 Teilungen, arretieren dann aber in der G2-Phase des Zellzyklus 16, da zu diesem Zeitpunkt der maternale Vorrat an CycA RNA und Protein aufgebraucht ist. CycA muss also eine einzigartige Funktion besitzen, die nicht von den B-Klasse Cyclinen übernommen werden kann. Die Embryonen sterben schließlich durch einen Mangel an Zellen (Lehner and O'Farrell, 1989). Zusätzlich zeigen diese Mutanten auch Defekte in der Spezifizierung einiger Zellschicksale im sich entwickelnden Nervensystem (Lear et al., 1999; Wai et al., 1999).

Eine weitere Besonderheit von CycA ist seine Fähigkeit, DNA Replikation zu induzieren. Wird CycA in der G1-Phase exprimiert, führt dies zu einem vorzeitigen Eintritt der Zellen in die S-Phase (Sprenger et al., 1997). Ein Beispiel dafür sind auch die *fzr* Mutanten, die nach der Mitose 16 eine G1-Phase nicht etablieren können und stattdessen einen weiteren Zellzyklus durchlaufen, was hauptsächlich an der Re-akkumulation von CycA liegt (Sigrist and Lehner, 1997; Sprenger et al., 1997). CycA Abbau muss also während der Mitose initiiert und auch in der G1-Phase aufrechterhalten werden. Welche Motive in CycA für den Abbau verantwortlich sind und von welchen Faktoren diese erkannt werden, ist, im Gegensatz zu CycB und CycB3, immer noch nicht eindeutig geklärt (siehe Abschnitt 1.4.3). Die Tatsache, dass CycA S-Phase induzieren kann und in einem normalen Zyklus während der S-Phase stabil ist, führte zu der Vermutung, dass CycA während der DNA Replikation eventuell sogar benötigt wird. In *CycA* Mutanten kann die S-Phase 16 mittels BrdU Markierung sichtbar gemacht werden, allerdings fehlen Marker, um ihre Vollständigkeit zu überprüfen (Lehner and O'Farrell, 1989). Das Ausbleiben der Mitose 16 in den mutanten Embryonen könnte somit eine Konsequenz einer unvollkommenen S-Phase sein. Diese fehlerhafte Replikation würde von einem Kontrollmechanismus erkannt, der daraufhin den Eintritt in die Mitose verhindert. Der G2 Arrest der Mutanten wäre somit ein eher sekundärer Effekt, der primäre Defekt läge in der Durchführung der S-Phase. Es gibt erste Hinweise, dass die fehlende Mitose in *CycA* Mutanten eine direkte Konsequenz des CycA Mangels und nicht einer unvollständigen Replikation ist; allerdings ist dieser Punkt noch nicht vollständig geklärt (Jacobs et al., 2001). Ein weiterer interessanter Aspekt ist die subzelluläre Lokalisierung der mitotischen Cycline. Während der Interphase befinden sich CycA und CycB im Zytoplasma, akkumulieren zu Beginn der Prophase im Kern und sind nach der Auflösung der Kernmembran in der ganzen Zelle zu finden (Huang und Raff, 1999; Lehner and O'Farrell,

1989). Während der Metaphase erfolgt schließlich der Abbau von CycA. CycB3 befindet sich bis zur Auflösung der Kernmembran im Kern. Welche Bedeutung diese Dynamik der CycA Lokalisierung für seine Funktion hat, ist ebenfalls noch nicht klar.

1.6 *rca1* ist ein potentieller Regulator von Cyclin A

Das Gen *rca1* (*regulator of cyclin A*) wurde 1997 in einem Screen als dominanter Suppressor des Augenphänotyps von *rux* Mutanten identifiziert (Dong et al., 1997). Wie schon im Abschnitt 1.4.2 erwähnt, ist Rux ein Inhibitor mitotischer Kinaseaktivität. In *rux* Mutanten kann während der Augenentwicklung die CycA / Cdk1 Aktivität nicht ausreichend unterdrückt werden. Dies führt in einigen Zellen der Augenimaginalscheibe zu einem vorzeitigen G1⇒S Übergang und in der ausgewachsenen Fliege zu einem "rauen Augenphänotyp" (Thomas et al., 1994). Die Reduktion der *rca1* Gendosis um 50% kann diesen Phänotyp unterdrücken, ebenso wie die 50% ige Reduktion der *CycA* Dosis (Dong et al., 1997). Die Überexpression von *rca1* im sich entwickelnden Auge beschleunigt dagegen den G1⇒S Übergang und führt schließlich zu einem "rauen Augenphänotyp" (Dong et al., 1997). Den gleichen Effekt hat die Überexpression von *CycA* im Auge. In den Augenimaginalscheiben, in denen *rca1* überexprimiert wurde, fand man eine leichte Akkumulation von CycA Protein (Dong et al., 1997). Interessanterweise konnte der Effekt, der durch *rca1* Überexpression entsteht, durch Reduktion der *CycA* Gendosis unterdrückt werden. Der umgekehrte Fall ist jedoch nicht zu beobachten (Dong et al., 1997). Dies ist ein erster Hinweis, dass *rca1* möglicherweise stromaufwärts von *CycA* funktioniert. Die größte Gemeinsamkeit von *rca1* und *CycA* ist jedoch der mutante Phänotyp. *rca1* homozygote Mutanten sind embryonal letal und arretieren wie *CycA* Mutanten in der G2-Phase des Zellzyklus 16 (Dong et al., 1997; Lehner and O'Farrell, 1989). Daher stammt auch der Name des Gens; *regulator of Cyclin A* (*rca1*). Dong et al. konnten jedoch in den *rca1* homozygoten Embryonen keine Änderung der CycA Konzentration feststellen.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Drosophila melanogaster besitzt drei mitotische Cycline, die überlappende und unterschiedliche Funktionen während der Mitose besitzen. CycA scheint jedoch eine besondere Rolle während der Zellteilung zu spielen. So ist es als einziges Cyclin essentiell für die Mitose. Zusätzlich kann es, im Gegensatz zu CycB und B3, DNA-Replikation induzieren. Obwohl diese Sonderrolle von CycA in den obengenannten Prozessen (siehe auch Abschnitt 1.5) schon lange bekannt ist, herrscht immer noch Unklarheit über die Regulationsmechanismen. Worin besteht die einzigartige Funktion von CycA? Welches sind seine Substrate? Wie und von welchen Faktoren wird sein Abbau reguliert?

Das Gen *rca1* zeigt einen ähnlichen mutanten Phänotyp wie die *CycA* homozygoten Embryonen. Das legt die Vermutung nahe, dass Rca1 direkt an der Regulation von CycA beteiligt ist. Die schon veröffentlichten Daten weisen sogar darauf hin, dass Rca1 möglicherweise einen Einfluss auf die CycA Stabilität hat.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, auf welche Weise Rca1 an der CycA Regulation teilnimmt. Es wäre möglich, dass Rca1 Einfluss auf die CycA Stabilität hat, wie die veröffentlichten Daten von Dong et al. vermuten lassen. Allerdings könnte die von ihnen beobachtete Akkumulation von CycA (siehe Abschnitt 1.6) auch ein indirekter Effekt sein. Durch die Überexpression von Rca1 wird der G1 \Rightarrow S Übergang induziert. In der S-Phase ist CycA jedoch, im Gegensatz zur G1-Phase, stabil.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass CycA direkt mit Rca1 assoziiert ist und es als eine Art Co-Aktivator benötigt. Schließlich wäre denkbar, dass Rca1 einen Inhibitor von CycA, wie z.B. Rux inhibiert.

Die Aufklärung der Funktion von *rca1* kann deshalb, wie diese verschiedenen Denkansätze zeigen, zur Klärung der CycA Regulation beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Verbrauchskemikalien wurden, soweit erhältlich, in der Qualität pro analysis (p.A.) und wenn nicht anders erwähnt von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich (Steinheim), Amersham (Braunschweig), Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biozym (Hameln), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Gibco / BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen).

Die verwendeten Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

Boehringer (Mannheim), Gibco / BRL (Eggenstein), NEB (Schwalbach / Taunus).

2.1.1.2 Besondere Chemikalien und Reaktionssets

DNA-Gel-Extraktions-Kit (EasyPure)	Biozym (Oldendorf)
DIG- Markierungs-Kit	Boehringer (Mannheim)
Diaminobenzidin	Sigma (Deisenhofen)
Expand High Fidelity PCR-System	Roche
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia
Hoechst	Sigma
Kaninchen Retikulocyten Lysat (Retic)	Promega
Normal Goat Serum (NGS)	Dianova
Plasmid Midi Prep Kit	Quiagen (Hilden)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Protein G Sepharose	Pharmacia
Proteinase K Lösung	Quiagen (Hilden)
PCR Purification Kit	Quiagen (Hilden)
SP6-RNA-Polymerase Message Kit	Ambion
TSA Cyanine 5	NEN Life Science Products
Vectashield Einbettungsmedium	Vector-Laboratories
Vectastain-ABC Kit	Vector-Laboratories

2.1.2 Geräte, Computer und Software

Es wurden Apple Macintosh Computer mit folgenden Programmen verwendet:

Adobe Photoshop (Adobe Systems), Canvas (Deneba Systems), IPLab Spectrum (Signal Analytics), Microsoft Word (Microsoft Corp.).

Verwendete Mikroskope und Kameras:

Axiophot und Axioplan (Zeiss, Oberkochen), ProgRes 3008 digitale Kamera, Fluoreszenzbilder wurden an einem Axiovert 10 (Zeiss) mit einer Quantix CCD Kamera (Photometrics).oder an einem konfokalen Mikroskop (Leica) aufgenommen.

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Ampicillin	50mg / ml in 70% Ethanol
APS	10% in H ₂ O
Auftrags-Puffer (DNA)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
BCIP-Lösung	10mg / ml 5-Bromo-4-Chloro- Indolylphosphat in Dimethylformamid
Coomassie Färbelösung	0.25% Coomassie brilliant blue, R250 50% Methanol 10% Eisessig
DAB-Stocklösung	1mg / ml Diaminobenzidin in PBS
DNA Extraktionspuffer (für genomische DNA)	100mM Tris-HCL, pH 9,0 100mM EDTA 1% SDS
Entfärbe-Lösung (für Proteingele)	10% Eisessig 30% Ethanol
GST-Bindungs-Puffer	500µl 50%ige Glutathion Sepharose 4B pro 25ml 15mM DTT 0,1% Tween-20
GST-Elutions-Puffer	10mM Glutathion (reduz.) 50mM Tris, pH 8,0 250mM KCl 2mM DTT
GST-Suspensions-Puffer	500µl 0,5M PMSF 2µg / ml Leupeptin 2µg / ml Pepstatin A 2µg / ml Chymostatin 2µg / ml Aprotinin 1X PBS
GST-Wasch-Puffer	100mM NaCl 10mM Tris, pH8,0 1mM EDTA 500µl 0,5M PMSF 2µg / ml Leupeptin 2µg / ml Pepstatin A 2µg / ml Chymostatin 2µg / ml Aprotinin

Homogenisierungs-Puffer (Embryonen)	<p>10mM Tris, pH 7,5 80mM K-β-Glycerophosphat, pH 7.3 20mM EGTA, pH 8,0 15mM MgCl 10% Glycerol kurz vor Gebrauch: 1mM Benzamidin 2mM Na₃VO₄ 1mM DTT 25µg / ml Aprotinin 25µg / ml Leupeptin 0,5mM PMSF</p>
Hybridisierungs-Puffer (<i>in situ</i>)	<p>50% Formamid 25% 20X SSC 100µg / ml tRNA 100µg / ml ssDNA 50µg / ml Heparin (in 4X SSC) 0.001% Tween-20 in H₂O</p>
Immunpräzipitations-Puffer	<p>10mM Tris, pH 7,5 80mM K-β-Glycerophosphat, pH 7.3 20mM EGTA, pH 8,0 15mM MgCl 10% Glycerol 0,2% NP40 vor Gebrauch: 0,5mM DTT 2mM Na₃VO₄ 1:100 Verdünnung des Protease Inhibitor Cocktails</p>
<i>in situ</i> -Färbelösung	<p>100mM NaCl 50mM MgCl₂ 100mM Tris, pH 9,5 0,1% Tween-20 in H₂O</p>
Laemmli-Puffer (4X)	<p>8% SDS 400mM DTT 240mM Tris, pH6,8 0,004% Bromphenolblau 40% Glycerol</p>
Laufpuffer für SDS-Polyacrylamid-Gele (10L,10X)	<p>300g Tris 1440g Glycin 1L 10% SDS</p>
LB-Medium (1L)	<p>10g Bacto Trypton 5g Bacto Yeast Extrakt 10g NaCl (für Platten: 15g Agar)</p>

Mini-Prep-Puffer	P1: 50mM Glucose 25mM Tris, pH 8,0 10mM EDTA 100µg / ml RNase 5mg / ml Lysozym Lysis Puffer: 200mM NaOH 1%SDS Neutralisations-Puffer: 3M KAc, pH 5,5
NBT-Lösung	10mg / ml Nitro-Blau-Tetrazolium in 70% Dimethylformamid
Paraformaldehyd (4%) (PFA)	4% (w/v) PFA in 1X PBS
PBS	130mM NaCl 2,7mM KCl 7mM Na ₂ HPO ₄ 3mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	0,1% Tween-20 in PBS
Ponceau S (10X)	2g Ponceau S 30g Trichloressigsäure 30g Sulfosalicylsäure
Ringer-Lösung (<i>Drosophila</i>)	182mM KCl 46mM NaCl 3mM CaCl ₂ 10mM Tris pH 7,2, filtrieren und autoklavieren
RNase Stocklösung	10mg / ml in H ₂ O, zur Inaktivierung von DNAsen 10 min kochen
20X SSC	3M NaCl 0,3M Na-Citrat
4X Sammelgel-Puffer (500ml)	30,3g Tris 20ml 10% SDS pH 6,8
Transfer-Puffer (für Western-Blots, 1L)	5,82g Tris 2,93g Glycin 3,75 ml 10% SDS 200ml Methanol
4X Trenngel-Puffer (1L)	181,7g Tris 4ml 10% SDS pH 8,8

SDS-Polyacrylamid-Minigele (Trenngel)

	8,5%	10%	12,5%
H ₂ O	3,5ml	3,1ml	2,5ml
30% Acrylamid	2,0ml	2,4ml	3,0ml
4X Trenngel-Puffer	1,9ml	1,9ml	1,9ml
10% APS	112µl	112µl	112µl
TEMED	5µl	5µl	5µl

SDS-Polyacrylamid-Minigele (Sammelgel)

H ₂ O	1,1ml
30% Acrylamid	350µl
4X Sammelgel-Puffer	500µl
10% APS	28µl
TEMED	5µl

TAE

40mM Tris-acetat
1mM EDTA

TE

10mM Tris, pH 8,0
1mM EDTA

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper gegen	Herkunft	Verdünnung	Herkunft
β-Galactosidase	Kaninchen	Embryonen: 1:1000	Cappel
Cyclin A	Kaninchen	Embryonen: 1:500 Western: 1:3000	Frank Sprenger
Cyclin B (F2F4)	Maus	Embryonen: 1:2	Frank Sprenger
Cyclin E	Kaninchen	Embryonen: 1:500	Helena Richardson
DIG		Embryonen: 1:1000	Boehringer Mannheim
Fizzy	Kaninchen	Western: 1:500	Jordan Raff
Fizzy-related	Kaninchen	Western: 1:500	Jordan Raff
HA (12CA5)	Maus	IP: 4µl a 2,5mg / ml	Boehringer
HA	Ratte	Embryonen: 1:100 Western: 1:2000	Boehringer Mannheim

Phospho Histon 3	Kaninchen	Embryonen: 1:500	Upstate Biotechnologies
Phospho-tyrosin (4G10)	Maus	Embryonen: 1:50	Deborah Morrison
Rca1	Ratte	Embryonen: 1:100 Western: 1:1000	eigene Herstellung (Eurogentec)
ruv	Ratte	Embryonen: 1:100	Frank Sprenger
Tubulin	Maus	Embryonen: 1:500 Western: 1:10000	Amersham Life Science

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	gekoppelt mit	Verdünnung	Herkunft
Goat-anti-Kaninchen	Alexa 488	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Kaninchen	Biotin	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Kaninchen	HRP	Western: 1:3000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Goat-anti-Kaninchen	Texas-Red	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Kaninchen	Cy5	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Maus	Alexa 488	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Maus	Biotin	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Maus	HRP	Western: 1:3000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Goat-anti-Maus	Rhodamin-RedX	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Ratte	Alexa 488	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Ratte	Biotin	Embryonen: 1:500	Dianova
Goat-anti-Ratte	HRP	Western: 1:3000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

2.1.5 Fliegenstämme

Als Wildtyp-Stamm wurden entweder Oregon R oder w^{1118} verwendet. Alle verwendeten Marker sind bei Lindsey und Zimm (Lindsley und Zimm, 1992) beschrieben.

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
T-AD-224.2	HA-cycA / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	Axel Dienemann
T-AD-224.4	IF / CyO-wg-LacZ; HA-cycA / TM6b	Axel Dienemann
T-AD-245.3	IF / CyO-wg-LacZ; HA-cycB / TM6b	Axel Dienemann
T-AD-225.2	IF / CyO-wg-LacZ; HA-NLS-cycA / TM6b	Axel Dienemann
T-AD-021	IF / CyO-wg-LacZ; cycA ^{C8} / TM3-Ubx-LacZ	Axel Dienemann
T-L-613	pin / CyO-Kr-GFP	Maria Leptin
F-142	CycE / CyO	Frank Sprenger
F-228	rca1 ^P / CyO	Bloomington
F-230 (fzr)	Df(1)bi-D3 w+	Bloomington
F-232	IF / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	T. Klein
F-271	rux ³ ; pin / CyO-wg-LacZ	Frank Sprenger
T-K-0005	Sco,FRT 40A neo / CyO	Thomas Klein
T-K-1148	hs-FLP; FRT 40A 2xGFP	Thomas Klein
TF-086	sev-Gal4 / CyO	Frank Sprenger
TF-179	UAS-rux / CyO	Frank Sprenger
TF-313	prd-Gal4 / TM3-ftz-LacZ	Frank Sprenger
TF-353 (rca1 ³)	rca1 ^(3.25.1) cn bw / CyO-ftz-LacZ	L. Zipursky
TF-354 (rca1 ²)	rca1 ^(2.14.1) cn bw / CyO-ftz-LacZ	L. Zipursky
TF-360	rca1 ^P / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Kreuzung (F-232 x F-228)
TF-361	fzr / FM7-ftz-LacZ;	eigene Kreuzung (F-230 x)
TF-371	cycE / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Kreuzung (F-232 x F142)

TF-372	UAS-fzr #730, 3Chr.	C.Lehner
TF-373	UAS-fzr #733, 2.Chr.	C.Lehner
TF-374	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Kreuzung (F-232 x TF-354)
TF-375	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; cycA ^{C8} / TM6b	eigene Kreuzung (TF-374 x T-AD-021)
TF-376	UAS-HA-rca1; UAS-fzr / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-382 x TF-373)
TF-378	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; prd-Gal4 / TM6b	eigene Kreuzung (TF-374 x TF-395)
TF-379	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-rca1	eigene Kreuzung (TF-374 x TF-384)
TF-380	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-cycA	eigene Kreuzung (TF-374 x T-AD-224.4)
TF-382	UAS-HA-rca1; IF/ CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Herstellung (pRG029)
TF-383	UAS-HA-rca1 / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Herstellung (pRG029)
TF-384	IF / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-rca1 / TM6b	eigene Herstellung (pRG029)
TF-385	rux ³ ; rca1 ² / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-387 x F-271)
TF-386	UAS-HA-cycA / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-rca1 / TM6b	eigene Kreuzung (TF-384 x T-AD-224.2)
TF-387	rca1 ² / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-354 x F-232)
TF-389	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; cycA ^{C8} / TM3-Ubx-LacZ	eigene Kreuzung (TF-374 x T-AD-021)
TF-390	sev-Gal4 / CyO-GFP	eigene Kreuzung (TF-086 x TL-613)
TF-391	UAS-HA-rca1; UAS-rux / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-382 x TF-179)
TF-393	UAS-rux / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Kreuzung (TF-179 x F-232)

TF-394	UAS-fzr / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Kreuzung (TF-373 x F-232)
TF-395	IF / CyO-wg-LacZ; prd-Gal4 / TM6b	eigene Kreuzung (TF-313 x F-232)
TF-396	rca1-GFP; IF / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Herstellung (pRG035)
TF-397	rca1-GFP / CyO-wg-LacZ; MKRS / TM6b	eigene Herstellung (pRG035)
TF-398	IF / CyO-wg-LacZ; rca1-GFP / TM6b	eigene Herstellung (pRG035)
TF-399	UAS-HA-rca1; IF / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-rca1 / TM6b	eigene Kreuzung (TF-382 x TF-384)
TF-401	rux ³ ; UAS-HA-rca1 / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-383 x F-271)
TF-402	fzr / FM7-ftz-LacZ; IF / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-361 x F-232)
TF-403	rux ⁸ / FM7-ftz-LacZ; IF / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (F-108 x F-232)
TF-404	fzr / FM7-ftz-LacZ; UAS-HA-rca1 / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-402 x TF-383)
TF-405	UAS-HA-cycA / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-CycA / TM6b	eigene Kreuzung (T-AD-224.2 x T-AD-244.4)
TF-407	UAS-fzr-myc (I, II; III)	eigene Herstellung (pRG042)
TF-408	IF / CyO-wg-LacZ; UAS-CycE / TM6b	eigene Kreuzung (F-232 x TF-325)
TF-409	IF / CyO-wg-LacZ; UAS-fzr / TM6b	eigene Kreuzung (F-232 x TF-372)
TF-410	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; rca1-GFP / TM6b	eigene Kreuzung (TF-374 x TF-398)
TF-411	fzr / FM7-ftz-LacZ; rca1 ² / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-374 x TF-402)
TF-412	rux ⁸ / FM7-ftz-LacZ; rca1 ² / CyO-wg-LacZ	eigene Kreuzung (TF-374 x TF-403)
TF-413	FRT 40A rca1 ² / CyO-wg-LacZ	eigene Herstellung (TF-387 x TK-0005)

TF-414	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; UAS-fzr / TM6b	eigene Kreuzung (TF-374 x TF-409)
TF-415	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; UAS-CycE / TM6b	eigene Kreuzung (TF-374 x TF-408)
TF-417	UAS-HA-rca1; UAS-HA-CycA / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-cycA / TM6b	eigene Kreuzung (TF-405 x TF-382)
	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-NLS-CycA / TM6b	eigene Kreuzung (TF-374 x T-AD-225.2)
	rca1 ² / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-CycB / TM6b	eigene Kreuzung (TF-374 x T-AD-245.3)
	UAS-HA-rca1; UAS-HA-CycA / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-rca1 / TM6b	eigene Kreuzung (TF-399 x T-AD-224.2)
	UAS-HA-rca1; UAS-HA-CycA / CyO-wg-LacZ; UAS-HA-CycB / TM6b	eigene Kreuzung (TF-417 x T-AD-245.3, TF-382)

2.1.6 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
Rca1B (C0-125)	TCG GGA TCC ATG AGC GCC TAT TAT CGG
Rca1X (C0-126)	ATG TCT AGA CTA AAA ACA GAG CCG CTT GAG
Rca1E (C0-127)	ATG GAA TTC CTA AAA ACA GAG CCG CTT GAG
Rca1AB (C0-161)	TAA GGT ACC GGA TCC ATG AGC GCC TAT TAT CGG
DNLS.R (C0-162)	GTG TTT GTC GAC TCG CTT GGG CAG
DNLS.S (C0-163)	TCC AAA GTC GAC CTC TTT CCC CAC ATA G
Rca1.1 (C0-166)	GAT GAA CGA GTC TGG CTA CAC ATC
Rca1.2 (C0-167)	CCA AGC GAC GCA AGA AAC ACT TTC
Rca1.3 (C0-168)	CTA ATG GAC TCG GGC AAC TCG AGC ATC
Rca1.4 (C0-169)	CTA ACC AAA GAG AAT CCT CAC CTG CC
Rca1.5 (C0-170)	CCT ATT GGA CGT ACA ACC AGC ACA TTC
Rca1.Eco (C0-171)	TCG GAA TTC ATG AGC GCC TAT TAT CGG
rca1.3 ^{Bam} (C0-175)	ATA GGA TCC AAA ACA GAG CCG CTT GAG
Afl3rca1 (C0-225)	CGG TCA ACA TGT CCG CCT ATT ATC GG
FZRB (C0-216)	GCG GGA TCC ATG TTT AGT CCC GAG TAC
FZRX (C0-217)	GAG TTA TCT AGA TTA TCT GAT ATT GGC
FZRE (C0-218)	GAG TTA GAA TTC TTA TCT GAT ATT GGC
BamFZR (C0-219)	GTT ATT GGG ATC CTC TGA TAT TGG CAA AC
FZR1	GCC TAC TCC TGC CTA CTG AAG AAC
FZR2	GTC GAC TGG TCG TCG CAG AAC GTA C
FZR3	GAT CAT ACA GCG GGA TAC GAG AAC G
FZR4	CAT GCA GTG CGT GGACAC GGG CTC G
EmiB (C0-226)	CCT GGA TCC ATG ATG TGC GGA TTT GC
EmiX (C0-227)	AAT TCT AGA CTA TAA CCT CCG TAA ATT CTG
EmiI	GAA ACA GAC CGG AAA GTT TCA G

Emi2	GTC ATC AGT GTG AGC ACA ACA TGG
Emi3	GCT AAA CAT GAC CCT TGC CTT CAT C

Alle Oligonukleotide wurden in H₂O als Stocklösung auf 200pmol / µl eingestellt. Arbeitslösungen wurden auf 20pmol / µl oder 1pmol / µl eingestellt.

2.1.7 Bakterienstämme

Für alle Klonierungen wurde der Bakterienstamm DH5α verwendet. Der Genotyp dieses Stammes ist in (Sambrook et al., 1989) und bei Stratagene beschrieben.

GST-Fusionsproteine wurden im *Escherichia coli* Stamm C43 produziert (Miroux und Walker, 1996).

2.1.8 Verwendete Vektoren

Für Klonierungen wurden die Grundgerüste folgender Vektoren verwendet:

pBluescript II SK(+), pBluescript II KS (+) (beide Stratagene), pGEX-2T (Pharmacia), pSP64, pUAST (Brand und Perrimon, 1993).

Als Helferplasmid für P-Element-Transformation: pUChsΔ2-3 (Mullins et al., 1989).

2.1.9 Hergestellte Plasmide

Name / Inhalt	Herstellung	Verwendungszweck
RG026 <i>HA-rcal</i> in SP64	PCR: Matrize OT073 (Frank Sprenger), Primer Rca1B und Rca1X x EF018 (E.Foley) BamH I / Xba I	<i>in vitro</i> Transkription
RG027 <i>GST-rcal</i> in pGEX 2	PCR: Matrize OT073 (Frank Sprenger), Primer Rca1B und Rca1E x GV006 (F.Sprenger) BamH I / EcoR I	Herstellung eines GST-Fusionsproteins
RG028 <i>HA-rcal</i> in pBS	RG026 BamH I / Xba I x AD-188 (A. Dienemann) BamH I / Xba I	Zwischenschritt für RG029
RG029 <i>UAS-HA-rcal</i>	RG028 Asp718 / Xba I x SF 812 (F.Sprenger) Asp718 / Xba I	Herstellung transgener Fliegen
RG030.1 <i>rcal</i> 3' von NLS in pBS	PCR: Matrize OT073 (Frank Sprenger), Primer DNLS.S und Rca1X x AD-188 Sal I / Xba I	Zwischenprodukt bei der Herstellung für ein NLS Deletionskonstrukt von <i>rcal</i>
RG030.2 ΔNLS <i>rcal</i> in pBS	PCR: Matrize OT073 (Frank Sprenger), Primer Rca1AB und DNLS.R x RG030.1 Asp718 / Xba I	Zwischenprodukt bei der Herstellung für ein NLS Deletionskonstrukt von <i>rcal</i>
RG030.3 HA-ΔNLS <i>rcal</i> in SP64	RG030.2 BamH I / Xba I x EF018 Bam H I / Xba I	NLS Deletionskonstrukt von <i>rcal</i> zur <i>in vitro</i> Transkription

RG031 <i>rca1</i> in SP64	RG026 Nco / BamH I, Klenow, Religation	<i>in vitro</i> Transkription
RG032 HA- Δ NLS <i>rca1</i> in pBS	RG030.3 BamH I / Xba I x AD-188 BamH I / Xba I	
RG033 Δ 384 <i>rca1</i>	RG030.3 BssH II / Sal I, Klenow, Religation	<i>in vitro</i> Transkription
RG034 <i>rca1-GFP</i> in pBS	PCR: Matrize OT073, Primer Rca1Eco und <i>rca1</i> .3'Bam x OT115 (F.Sprenger) EcoR I / BamH I	Zwischenschritt für RG035
RG035 Ubiq- <i>rca1-GFP</i>	RG034 Asp718 / Not I x AD 274 (A.Dienemann) Asp718 / Not I	Herstellung transgener Fliegen
RG036 <i>rca1</i> in pBS	RG026 BamH I / Xba I x pBS KS BamH I / Xba I	<i>in vitro</i> Transkription
RG037 HA- <i>fzr</i> in SP64	PCR: Matrize <i>fzr</i> in pNB40 (C. Lehner), Primer FZR B und FZR X x EF018 BamH I / Xba I	<i>in vitro</i> Transkription
RG038 <i>GST-fzr</i> in pGEX 2	PCR: Matrize <i>fzr</i> in pNB40, Primer FZR B und FZR E x GV006 BamH I / EcoR I	Herstellung eines GST-Fusionsproteins
RG039 <i>fzr-6-myc</i> in pBS	PCR: Matrize <i>fzr</i> in pNB40, Primer FZR B und Bam FZR x pBS KS 6xmyc BamH I	Zwischenschritt für RG042
RG040 <i>GST-fzr</i> in SP64	RG037 BamH I / Xba I x EF015 (E.Foley) BamH I / Xba I	<i>in vitro</i> Transkription
RG041 <i>GST-rca1</i> in SP64	RG026 BamH I / Xba I x EF015 BamH I / Xba I	<i>in vitro</i> Transkription
RG042 UAS- <i>fzr-myc</i>	RG039 Kpn I / Xba I x RG029 Kpn I / Xba I	Herstellung transgener Fliegen

RG043 <i>rca1</i> in SP64	PCR: Matrize OT073, Primer Afl3 <i>rca1</i> und <i>Rca1X</i> x EF018 Nco I / Xba I	<i>in vitro</i> Transkription
RG044 <i>HA-h-Emi1</i> in SP64	myc-h-Emi1 in pCS2 (P.Jackson) Nco I / Xba I x x EF035 Nco I / Xba I	<i>in vitro</i> Transkription
RG045 <i>HA-x-Emi1</i> in SP64	PCR: Matrize HA-X-Emi1pCNA3 (Peter Jackson), Primer EmiB und EmiX x EF018 BamH I / Xba I	<i>in vitro</i> Transkription

Alle Konstrukte wurden sequenziert.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Plasmide wurden durch Elektroporation in Bakterien transformiert. Als transformationskompetente Bakterien wurde der *E.coli*-Stamm *DH5 α* verwendet. Die Herstellung erfolgte nach folgendem Verfahren:

- Animpfen von 1L LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur im Verhältnis 100:1
- Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1
- 15-20 min auf Eis kühlen
- 15 min bei 4°C und 4000 rpm in einem GSA-Rotor zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1L kaltem bidestillierten Wasser lösen
- erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 0,5L kaltem bidestillierten Wasser lösen
- erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 20ml 10% Glycerin / H₂O lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 2-3ml 10% Glycerin / H₂O lösen
- Suspension in 40 μ l Aliquots aufteilen und in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Lagerung bei -70°C

Für die Transformation wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, mit 0,5-2 μ l der gewünschten Plasmid-DNA gemischt und in auf Eis gekühlte 0,2cm Elektroporationsküvetten überführt. Die Küvette wurde in einen Gene PulserTM (Biorad) gestellt und es wurde für 4-5ms eine Feldstärke von 12,5kV / cm angelegt (Geräteeinstellung: Kapazität 25 μ F; Spannung 2,5kV; Widerstand 200 Ω). Anschließend wurde die Küvette schnell entnommen, 1ml LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Schließlich wurde ein geeignetes Volumen auf selektive Agarplatten (LB-Agarplatten mit 100 μ g Ampicillin / ml) ausplattiert und bei 37°C über Nacht (ü.N.) inkubiert.

2.2.1.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen analytischen Charakterisierung von Plasmiden in transformierten Bakterien wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Animpfen einer einzelnen Bakterienkolonie von einer Platte in ca. 2ml LB / Amp-Medium (50µg / ml)
- Inkubation in einem Roller oder Schüttler bei 37°C ü.N.
- Bakterienkultur bei 4000 rpm für 10 min in Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet in 100µl P1-Puffer lösen
- 200µl Lysis-Puffer hinzugeben, mischen (nicht vortexen!), 5 min stehen lassen
- 150µl Neutralisations-Puffer hinzugeben, mischen, 5 min stehen lassen
- 30 min bei 14000 rpm in Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführen
- Fällern der DNA durch Zugabe von 1ml 100% Ethanol, mischen
- 15 min bei 14000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet mit 70% Ethanol waschen und trocknen
- Pellet in 20-50µl H₂O lösen
- Charakterisierung der DNA durch geeignete Restriktionsanalyse
- DNA kann direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden

2.2.1.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer DNA-Mengen für präparative Zwecke wurde das Plasmid Midi Prep Kit der Firma Qiagen verwendet, wobei entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen wurde.

2.2.1.4 Quantifizierung von DNA und RNA

In der Regel wurde die DNA-Menge durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt, wobei eine 1 kb-Leiter von Gibco / BRL mit bekannter Konzentration als Referenz diente.

Für eine genauere Quantifizierung wurde eine photometrische Bestimmung vorgenommen. Dazu wurden geeignete Verdünnungen in Wasser hergestellt und deren Extinktion bei $\lambda=260\text{nm}$ gemessen. Für eine Schichtdicke von 1cm gilt hier:

Doppelsträngige DNA: 1 OD=50µg

Einzelsträngige DNA oder RNA: 1 OD=40µg

Zur Überprüfung der Sauberkeit wurde auch die Extinktion bei $\lambda=280\text{nm}$ gemessen und ein Quotient gebildet. Hier gilt für DNA bzw. RNA guter Reinheit: OD 260nm/280nm = 1.8-2.

2.2.1.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Analytische Restriktionsverdau zur Charakterisierung von Plasmid-DNA wurden in der Regel in Endvolumina von 20µl durchgeführt, präparative Restriktionsverdau in Endvolumina von 50-200µl. Die Inkubation erfolgte für 1-2 Stunden (h) oder ü.N. bei für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur- und Pufferbedingungen (beides laut Herstellerangaben).

2.2.1.6 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten

Während die meisten Klonierungsschritte über kohäsive Enden („sticky ends“) erfolgten, war es manchmal notwendig, die Enden von zu ligierenden DNA-Fragmenten durch eine Auffüllreaktion kompatibel zu machen („blunt ends“). Hierzu wurde das „Klenow-Fragment“ der Polymerase I aus E.coli verwendet, welches die Fähigkeit besitzt, die komplementären Nukleosidtriphosphate (dNTPs) an 5'-überhängenden Enden einzufügen. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 30µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- DNA Substrat
- 0,5mM dNTPs
- 1x Klenow-Puffer
- 1U Klenow-Enzym
- Inkubation: 15 min bei 25°C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA auf eine Endkonzentration von 10mM gestoppt. Anschliessend wurde das Enzym durch eine 10 minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert und die DNA mit Hilfe des PCR Purification-Kits (Quiagen) gereinigt.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von Vektorenden

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektorenden zur Vermeidung von Religation erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). 1U Enzym wurde dem Restriktionsansatz direkt zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Phosphatase 15 min bei 70°C inaktiviert und die DNA mit Hilfe des PCR Purification-Kits (Quiagen) gereinigt.

2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) in 0.8-1.5% TAE-Agarosegelen bei einer Feldstärke von ca.10V/cm aufgetrennt. Pro 100ml Gelvolumen wurden 5µl einer Ethidiumbromidlösung (10mg / ml) zugegeben. Mit einem UV-Transluminator ($\lambda=312\text{nm}$) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht, über Videokamera und das Bioprint DS-System (Froebel Labor-Technik, Software Amibios von American Megatrends) fotografiert und das Bild über einen Mitsubishi Video Copy Processor-Thermodrucker ausgegeben werden.

Die Grössenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte über Vergleich der Laufstrecken mit Fragmenten bekannter Länge (1 kb-Leiter von Gibco / BRL).

2.2.1.9 Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen

DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in 0,8-1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden mit Hilfe einer sauberen Rasierklinge auf einem UV-Tisch ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des EasyPure DNA-Extraktionskits der Firma Biozym entsprechend der Herstellerangaben eluiert.

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten durch das Enzym T4-DNA-Ligase (NEB). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 10-15µl durchgeführt. Es wurden 100-200ng geschnittene und mit CIP behandelte Vektoren eingesetzt. Die zu klonierenden Restriktionsfragmente wurden in einem dreifachen molaren (sticky ends) bzw. zehnfachen molaren (blunt ends) Überschuß hinzugegeben. Die Reaktionen wurden bei 18°C ü.N. unter den empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt.

2.2.1.11 Sequenzierung von DNA-Konstrukten

Die Sequenzierung von DNA-Konstrukten wurde entweder mit Standardprimern (T3, T7, SP6) oder mit, für das jeweilige Konstrukt, spezifischen Primern durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das DNA-Sequenzierungskit Big Dye Terminator Cycle Sequencing der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet. Als automatischer Sequenzierer stand das Modell ABI 3.77 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems zur Verfügung.

Die Verarbeitung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Lasergene / DNASTAR-Biocomputing Software der Firma DNASTAR, INC., Madison Wisconsin.

Ansatz für die Sequenzreaktion:

1µg Plasmid DNA (100-500ng PCR Fragment)
 2-5pmol Primer
 4µl Big Dye Lösung
 mit H₂O auf 20µl auffüllen

PCR-Programm:

1. 96°C für 5 min
2. 96°C für 30 sec
3. 50°C für 15 sec
4. 60°C für 4 min

Der Reaktionszyklus von Schritt 2 bis 4 wurde 25 mal durchgeführt.

Nach der Sequenzreaktion wurden 100µl H₂O zu den Ansätzen gegeben und die DNA mit 10µl 3M NaAc (pH 5.5) und 300µl 100% Ethanol gefällt. Es folgte ein Waschschriff mit 70%Ethanol und die Trocknung des DNA Pellets. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.1.12 Präparation genomischer DNA von Fliegen

20-50 Fliegen wurden in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß in insgesamt 500µl Homogenisations-Puffer mit einem Mikropistill homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 30 min auf 70°C erhitzt, danach mit 70µl 8M Kaliumacetat versetzt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Phenol / Chloroform- und eine Chloroform Extraktion. Die DNA in der wässrigen Phase wurde nach Zugabe von 2 Volumen 100% Ethanol und 5 minütiger Inkubation durch Zentrifugation gefällt. Das DNA Pellet wurde in 100µl H₂O resuspendiert und mit der gleichen Menge an 5M LiCl versetzt. tRNA und Protein Reste wurden durch erneute Zentrifugation gefällt. Die genomische DNA im Überstand wurde mit 1 / 10 Volumen 3M NaAc pH 5,5 und 2,5 Volumina 100% Ethanol durch Zentrifugation gefällt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE, pH 8,0 resuspendiert.

2.2.1.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standardamplifizierungen für Klonierungen wurden in einem Endvolumen von 50µl durchgeführt. Um Fehler während der PCR-Reaktion zu minimieren wurde der Expand High Fidelity PCR-Kit (Roche), eine hohe Konzentration an Matrizen-DNA und wenig Reaktionszyklen verwendet.

Ansatz: 1µg DNA

15pmol Primer 1
 15pmol Primer 2
 1µl dNTPs (10mM)
 5µl Puffer mit MgCl
 1U TAQ-Polymerase
 auf 50µl mit H₂O auffüllen

PCR-Programm:

initiale Denaturierung 3 min bei 95°C, Denaturierung 30 sec bei 95°C, Anlagerung der Primer 30 sec bei 3-5°C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer, Extension 72°C bei einer Dauer von 1 min pro 1kb der gewünschten Fragmentlänge. Es wurden 10 Reaktionszyklen durchgeführt.

PCR-Reaktionen auf genomischer DNA wurden in einem Endvolumen von 25µl und mit 30 Reaktionszyklen durchgeführt.

2.2.1.14 Herstellung DIG-markierter DNA Sonden

Digoxigenin-dUTP markierte Sonden werden für den *in situ* mRNA Nachweis in Embryonen eingesetzt (Tautz und Pfeifle, 1989).

DNA Sonden wurden durch das “random primed DNA-labeling“ Verfahren mit einem Reaktionsset der Firma Boehringer hergestellt.

100ng eines zuvor gereinigten DNA Fragments werden in 15µl Wasser durch zehn minütige Inkubation bei 100°C denaturiert und anschliessend auf Eis abgekühlt. Zur DNA werden 2µl dNTP-Mix, 2µl Hexanukleotid-Mix und 1µl Klenow-Enzym gegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Am nächsten Tag wird nochmals 1µl Klenow hinzugegeben, und die Inkubation für eine Stunde bei 37°C fortgeführt. Die DNA-Fällung erfolgt durch Zugabe von 2,5µl 4M LiCl, 1µl Glycin (10mg / ml) und 75µl 100% Ethanol, einer 60 minütigen Inkubation bei -20°C und einer 15 minütigen Zentrifugation. Das DNA Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10µl TE resuspendiert. Für die *in situ* Hybridisierung wird 1µl eingesetzt.

2.2.1.15 Herstellung DIG-markierter RNA Sonden

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- zur Herstellung von Gegenstrang („antisense“-)Sonden den Vektor im 5'-Bereich des als Matrize dienenden cDNA-Fragmentes mit einem geeigneten Enzym linearisieren
- der linearisierte Vektor wurde mit Hilfe des PCR Purification Kits der Firma Qiagen gereinigt
- die Markierung erfolgt für 2h bei 37°C in folgendem Reaktionsansatz:
 - xµl linearisierter Vektor (x µl sollen 1µg Vektor enthalten)
 - 2µl 10 x Transkriptionspuffer
 - 2µl DIG-RNA labeling mix (10X)
 - 2µl RNA Polymerase (T3, T7 oder SP6)
 - auf 20µl mit RNase freiem H₂O auffüllen

Durch Zugabe von 2µl 0,2M EDTA wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt und 2µl des Ansatzes auf einem Agarosegel aufgetragen um die RNA-Synthese zu überprüfen. Je nach Konzentration wurde der Ansatz dann auf 50-100µl mit RNase freiem H₂O aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Für die *in situ* Hybridisierung wird 0.1µl-1µl eingesetzt.

2.2.1.16 In vitro mRNA-Synthese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SP6-RNA-Polymerase Message Kit der Firma Ambion verwendet. Pro Reaktion wurden 1µg linearisierte DNA verwendet und gemäss den Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Zunächst wurde das zu exprimierende Konstrukt in C43 Zellen transformiert. Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 50ml LB / Amp (50µg / ml) Übernachtskultur bei 37°C angeimpft und mit 10ml davon am nächsten Tag eine 500ml Kultur bei Raumtemperatur angesetzt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 2mM) induziert. Nach weiteren 5h Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (10min, 5000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 25ml kaltem GST-Wasch-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden erneut

abzentrifugiert (10 min, 10000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet diesmal in 25ml kaltem GST-Suspensions-Puffer resuspendiert. Diese Lösung wurde auf Eis sechs mal für 2 min sonifiziert (Duty cycle 40, Output control 4) und danach KCl (Endkonzentration: 250mM), DTT (Endkonzentration: 15mM) und Triton X-100 (Endkonzentration: 1%) zugegeben. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf einem Schüttler bei 4°C. Hiernach wurde die Lösung erneut zentrifugiert (10 min, 10000 rpm, 4°C) und der Überstand, in dem sich das zu reinigende Protein befindet, in ein neues Gefäß überführt. Pro 25ml Überstand wurden 500µl GST-Bindungs-Puffer zugegeben und diese Mischung bei 4°C für 1,5h auf einer Wippe inkubiert, um die Bindung des GST-Fusionsproteins an die GST-Sepharose zu erlauben. Die Suspension wurde für 5 min bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Die Sepharose wurde anschliessend drei mal mit 25ml kaltem PBS / 15mM DTT gewaschen. Die Sepharose wurde nach dem letzten Waschschrift mit 500µl Laemmli-Puffer versetzt und bei -70°C eingefroren.

Für die Antikörperproduktion wurde die Sepharose / Laemmli Mischung für 10 min aufgeköcht und zur Konzentrationsbestimmung verschiedene Mengen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Insgesamt 300µg des GST-Fusionsproteins in Laemmli wurde in einem 9% SDS-Gel von den Abbauprodukten getrennt, in dem das Gelstück mit dem gewünschten Protein ausgeschnitten wurde. Das im Gel befindliche Protein wurde im Gelstück dann für die Immunisierung zu Eurogentec (Belgien) geschickt.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bio-Rad Protein Micro Assay Kit bestimmt, oder durch Vergleich mit bekannten Mengen BSA auf einem SDS-Gel.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden in einem 0,75mm dicken Polyacrylamid-Gel in einem diskontinuierlichen SDS-Puffersystem (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Hierzu wurde das Mini-Protean 2 System von BioRad verwendet. Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und für mindestens 5 min aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke bei einer Anfangsspannung von 100V. Relative Molekülmassen wurden mit Hilfe von vorgefärbten Proteinstandards bestimmt (BioRad).

2.2.2.4 Coomassie Färbung

Proteingele wurden in ca. 5 Volumen Coomassie Färbelösung für mindestens 60 min bei RT inkubiert. Anschliessend mit Entfärbelösung entfärbt und fixiert und auf Whatman 3MM Papier getrocknet.

2.2.2.5 In vitro Translation mit Retic

Die folgenden Angaben gelten für ein Translationsvolumen von 50µl:

Retic	35µl
Aminosäure-Mix 1	2,5µl
Aminosäure-Mix 2	2,5µl
RNAsin (40U / µl)	0,5µl
mRNA	2,0µl
H ₂ O	7,5µl

Die relativen Proportionen jeder einzelnen Komponente des Ansatzes wurden für jedes andere Translationsvolumen beibehalten. Die Reaktion wurde bei 30°C für 1,5h inkubiert.

2.2.2.6 Western-Blot Analyse

Zum immunologischen Nachweis von in SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) transferiert. Hierzu wurde der Trans-Blot Semi-Dry von BioRad benutzt. Der Transfer erfolgte bei 5 mA / cm² bei einer Dauer von 30 min. Die Membran wurde anschliessend in 5% Milchpulver in PBT für 1h bei RT blockiert und danach mit dem primären Antikörper (ebenfalls in 5% Milchpulver / PBT) ü.N. bei 4°C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBT für jeweils 15 min bei RT und danach die Inkubation der Membran mit dem sekundären HRP gekoppelten Antikörper für 2h bei RT. Die Membran wurde hiernach wieder 3 mal für 15 min mit PBT gewaschen. Die Proteine wurden mit Hilfe des ECL-Protocols von Amersham nachgewiesen.

2.2.2.7 Ponceau S-Färbung

Die Membran wurden für 5-10 min in 1X Ponceau S bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend mit destilliertem Wasser solange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Die Membran wurden danach entweder auf Whatman 3MM Papier getrocknet und aufbewahrt oder direkt für immunologische Nachweise verwendet.

2.2.2.8 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen aus *Drosophila* Embryonen

6-8h alte *Drosophila* Embryonen wurden von Apfelsaftagarplatten direkt in Eppendorf-Gefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ca. 0,5ml Embryonen wurden in 1ml Immunpräzipitations-Puffer auf Eis homogenisiert. Die Immunpräzipitation wurde in einem Endvolumen von 300µl bestehend aus Embryonenhomogenisat, 20µl Protein G-Sepharose-Gemisch und Antikörper durchgeführt. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 4°C. Die Protein G-Sepharose wurde abzentrifugiert (2min, 2000rpm, 4°C, in einer Heraeus-Kühlzentrifuge) und drei mal für 10 min bei 4°C mit Immunpräzipitations-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrte wurde die Flüssigkeit vollständig abgenommen, die Sepharose in 20µl Laemmli-Puffer resuspendiert und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.2.9 Herstellung von Embryo-Extrakten

6-8h alte *Drosophila* Embryonen wurden von Apfelsaftagarplatten direkt in Eppendorf-Gefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 0,75ml Embryonen wurden in einem Glashomogenisator in 1ml Homogenisierung-Puffer auf Eis homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 20 min bei 4°C und 14000 rpm in einer Heraeus Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Interphase wurde in 50µl Aliquots aufgeteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.2.10 Proteinabbau-Experimente mit Embryo-Extrakten

Für ein Proteinabbau-Experiment wurde folgender Ansatz gewählt:

25µl Embryonen-Extrakt

2mM ATP

15mM MgCl₂

mit H₂O auf 40µl auffüllen

Wurde dem Ansatz ein Inhibitor, in vitro translatiertes Protein oder ein anderer Embryonen-Extrakt zugesetzt verringerte sich dementsprechend die Menge an H₂O. Der Kontrolle, ohne Inhibitor, in vitro translatiertes Protein oder Extrakt wurde immer die entsprechende Menge Lösungsmittel, Retic, bzw. Puffer zugesetzt.

Für den 0 Wert wurde dem Ansatz vor der Inkubation 7µl entnommen und mit 5µl Laemmli-Puffer vermischt. Der Ansatz wurde dann bei 25°C inkubiert und jeweils nach 15, 45 und 70 min eine Probe von 7µl entnommen und mit Laemmli-Puffer vermischt. Diese Proben wurden dann durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.2.3 *Drosophila* Methoden

2.2.3.1 Fliegenzucht

Die Fliegen werden in unterschiedlich grossen Kunststoffgefäßen gehalten, in denen sich Fliegenfutter befindet. Die Gefäße werden mit Schaumstoffstopfen und Watte verschlossen. Die Fliegen wurden bei Temperaturen zwischen 18°C und 25°C gehalten, und je nach Temperatur alle 2-4 Wochen auf frisches Futter gesetzt.

Detaillierte Beschreibungen zur Fliegenzucht, Herstellung des Fliegenfutters und anderen praktischen Anleitungen finden sich bei Roberts (1986) und (Ashburner, 1989). Zur Sammlung von Embryonen wurde wie bei (Wieschaus und Nüsslein-Volhard, 1986) beschrieben vorgegangen.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Fixierung von Embryonen

Die Fixierung von Embryonen für Antikörperfärbungen und *in situ* Hybridisierung erfolgte an der Phasengrenze zwischen 3,7% Formaldehyd und Heptan. Es wurde wie folgt vorgegangen: Die Embryonen werden auf Apfelsaftagarplatten mit einer Hypochloridlösung (ca. 6% aktives Chlor) dechorioniert, auf Siebe abgossen und mit destilliertem Wasser gründlich gewaschen. Dann werden sie in ein 2,0ml Eppendorf-Gefäß überführt, das 1ml Heptan, 900µl PBS und 100µl 37% Formaldehyd enthält, und für 15 min (für Antikörperfärbungen), bzw. 30 min (für *in situ* Hybridisierungen) bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die wässrige (untere) Phase entnommen und nach Zugabe von 1ml Methanol wird zur Entfernung der Vitellinmembran ca. 1 min gevortext. Die Embryonen ohne Vitellinmembran sinken zum Boden und werden mehrmals mit Methanol gewaschen. Fixierte Embryonen können in Methanol bei –20°C gelagert werden.

2.2.4.2 Taxol-Fixierung

Um während des Fixierungsprozesses die Mikrotubuli nicht zu zerstören, sollten die Embryonen mit einer höheren Formaldehydkonzentration und zusätzlich mit Taxol fixiert werden. Die Embryonen werden wie oben beschrieben dechorioniert, gesammelt und gewaschen. Dann werden sie in ein 2,0ml Eppendorf-Gefäß überführt, das 1ml Heptan enthält. Zu den Embryonen in Heptan wird dann eine Lösung aus 323µl 37% Formaldehyd (Endkonzentration: 12%), 676µl PBS und 1µl 10mM Taxol gegeben. Die Embryonen werden in dieser Mischung für 10 min bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. Die Entfernung der Vitellinmembran und die weiteren Waschschrte erfolgen wie oben beschrieben.

2.2.4.3 Methanol-Fixierung

Zur Verwendung von fixierten Embryonen für SDS-Page und Western Blot Analyse müssen diese ohne Formaldehyd fixiert werden. Die Embryonen werden wie oben beschrieben dechorioniert, gesammelt und gewaschen. Dann werden sie in ein 2,0ml Eppendorf-Gefäß überführt, das 1ml Heptan und 1ml Methanol enthält und für 15-20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Fixierte Embryonen sinken zu Boden und werden anschliessend mehrmals mit Methanol gewaschen. Die Lagerung bei –20°C erfolgt ebenfalls in Methanol.

2.2.4.4 Antikörperfärbungen an Embryonen

Embryonen sollten bei allen Schritten in der Lösung in Bewegung sein.

- Rehydrierung der fixierten Embryonen durch 5x schnelles Waschen mit PBT
- 30 min Inkubation mit 10% NGS in PBT
- Inkubation mit dem primären Antikörper in 5% NGS in PBT für 2h bei RT oder ü.N. bei 4°C
- Abnehmen des primären Antikörpers
- 5x schnelles Waschen mit PBT
- 3x 15min waschen mit PBT
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper in 5% NGS in PBT für 2h bei Raumtemperatur; soll später die DNA mit Propidiumiodid angefärbt werden bei diesem Schritt RNase dazugeben (Endkonzentration: 0.4µg / µl).
- Abnehmen des sekundären Antikörpers
- 5x schnelles Waschen mit PBT
- DNA-Färbung mit Hoechst: 1:13000 Verdünnung in PBT, 4 min bei RT
- DNA-Färbung mit Propidiumiodid: 1:1000 Verdünnung einer 1mg / ml Lösung in PBT, 4 min bei RT
- 3x 15 min waschen mit PBT
- wurden Fluoreszenz gekoppelte sekundäre Antikörper benutzt: Einbettung der Embryonen in Vectashield Einbettungsmedium auf einem Objektträger
- wurde ein biotinylierter sekundärer Antikörper verwendet: 30 min Inkubation in 500µl ABC-Mix bei RT (30 min vor der Inkubation je 5µl der A und B Komponente des ABC-Mixes in PBS verdünnen)
- 5x schnelles Waschen mit PBT
- 3x 15min waschen mit PBT
- Embryonen in eine Mikrottestplatte überführen
- PBT absaugen und 200µl Substrat-Mix (160µl PBS, 40µl DAB) hinzugeben und Farbreaktion durch Zugabe von 2µl 0,3% H₂O₂ starten
- Farbreaktion stoppen durch Zugabe von PBT
- auf diese Weise gefärbte Embryonen werden anschließend durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert, kurz mit trockenem Aceton gewaschen und schließlich in einem 1:1 Aceton Araldit-Gemisch in kleine Plastischälchen zum Sortieren übertragen
- in diesem Gemisch können sie nach Verdampfen des Acetons auch auf Objektträger übertragen und fotografiert werden.

2.2.4.5 Hybridisierung mit DNA oder RNA Sonden (Tautz and Pfeifle, 1989)

- Rehydrierung der fixierten Embryonen durch 5x schnelles Waschen mit PBT
- Refixierung der Embryonen in 3,7% Formaldehyd in PBT für 20 min bei RT
- 10x schnelles Waschen mit PBT
- Inkubation der Embryonen mit Proteinase K (1:1600 Verdünnung der Proteinase K Lösung von Quiagen in PBT) für 8 min bei RT
- Embryonen auf Eis absinken lassen
- Überstand vollständig abnehmen
- restliches Enzym durch Zugabe von 1ml Glycin (2mg / ml) inaktivieren
- 10x schnelles Waschen mit PBT
- Refixierung der Embryonen in 3,7% Formaldehyd in PBT für 20 min bei RT
- 10x schnelles Waschen mit PBT
- Embryonen mit einer 1:1 Mischung PBT:Hybridisierungs-Puffer waschen
- 200µl Hybridisierungs-Puffer zu den Embryonen geben

- im Hybridisierungs-Puffer können die Embryonen bei -20°C gelagert werden oder direkt weiter verwendet werden
- 1-4h Vorhybridisierung bei 48°C (DNA-Sonden) bzw. 55°C (RNA-Sonden)
- Denaturierung der DNA-Sonde ($1\mu\text{l}$ in $100\mu\text{l}$ Hybridisierungs-Puffer) durch 5 minütiges Aufkochen, abkühlen auf Eis
- Denaturierung der RNA-Sonde ($0,1-1\mu\text{l}$ in $100\mu\text{l}$ Hybridisierungs-Puffer) durch 5 minütige Inkubation bei 80°C , abkühlen auf Eis
- denaturierte Sonde zu den Embryonen geben
- Hybridisierung ü.N. bei 48°C bzw. 55°C
- Sonde abnehmen (Lagerung bei -20°C , kann nach erneuter Denaturierung wieder verwendet werden)
- Embryonen 20 min bei 48°C / 55°C in $100\mu\text{l}$ Hybridisierungs-Puffer inkubieren
- Embryonen 20 min bei 48°C / 55°C in $100\mu\text{l}$ Hybridisierungs-Puffer + $100\mu\text{l}$ PBT inkubieren
- Embryonen 4x 15 min in PBT bei RT waschen
- Inkubation mit Antikörper gegen DIG (Endverdünnung: 1:1000 in PBT) 1h bei Raumtemperatur
- 3x 15 min mit PBT waschen
- Embryonen in Färbepuffer waschen
- Embryonen in Mikrottestplatte überführen
- $200\mu\text{l}$ Färbelösung ($200\mu\text{l}$ Färbepuffer, $2\mu\text{l}$ NBT, $2\mu\text{l}$ BCIP) zugeben
- Farbreaktion mit PBT abstoppen
- Embryonen können, wie oben beschrieben, in Araldit eingebettet und fotografiert werden

2.2.4.5 Fluoreszente RNA *in situ* Hybridisierung mit Tyramid Signal Amplification

Für dieses Protokoll (TSA, NEN) können für Antikörperfärbungen fixierte Embryonen verwendet werden. Proteinase K Verdau ist nicht nötig.

- Embryonen wurden, wie oben beschrieben, rehydriert und einmal refixiert
- 5x 5 min in PBT waschen
- 10 min in PBT : Hybridisierungspuffer (1:1) waschen
- 10 min in Hybridisierungspuffer waschen
- Vorhybridisierung für mindestens eine Stunde in Hybridisierungspuffer bei 55°C
- Hybridisierung wie oben beschrieben
- Sonde abnehmen
- Embryonen 30 min in Hybridisierungspuffer bei 55°C waschen
- Embryonen 30 min in PBT : Hybridisierungspuffer (1:1) bei 55°C waschen
- 4x 30 min bei Raumtemperatur in PBT waschen
- Inkubation mit anti-DIG-Peroxidase gekoppeltem Antikörper (Boehringer Mannheim) für mindestens eine Stunde bei RT
- 3x 20 mit PBT waschen
- Inkubation der Embryonen mit der TSA-Lösung ($2\mu\text{l}$ Tyramid Stock Lösung in $100\mu\text{l}$ Amplification Lösung) für 5 min bei RT
- Reaktion stoppen durch 5x waschen mit PBT
- die Embryonen können nun für eine Antikörperfärbung weiter verwendet werden oder in Vectashield Einbettungsmedium auf einen Objektträger übertragen werden.

2.2.4.6 Antikörperfärbungen an Imaginalscheiben

- Imaginalscheiben wurden in *Drosophila* Ringer-Lösung für höchstens 1h präpariert und in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt
- 30 min in 4% Paraformaldehyd bei RT fixieren
- 3x 10 min in 0,3% PBT waschen
- 30 min in 10% NGS in 0,3% PBT blockieren (Blockierung kann auch für ein paar Tage bei 4°C stattfinden)
- Inkubation mit primärem Antikörper in 5% NGS in 0,3% PBT für mindestens 2h bei RT oder ü.N. bei 4°C
- 3x 20 min mit 0,3% PBT waschen
- Inkubation mit sekundärem Antikörper in 5% NGS in 0,3% PBT für 2h bei RT
- weiter wie bei Antikörperfärbung an Embryonen

2.2.5 Injektionen

2.2.5.1 Herstellung transgener Fliegen

Transgene Fliegen wurden durch Mikroinjektion von DNA in Embryonen nach der von Spradling und Rubin publizierten Methode hergestellt (Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982). Die DNA wurde in *white* Mutanten injiziert. Die Konzentration des P-Elementvektors betrug 400ng / μ l, die des Transposase Vektors 100ng / μ l in H₂O. Die möglichen Transformanten wurden durch Kreuzungen mit dem Doppelbalancer-Stamm auf chromosomale Insertionen überprüft.

2.2.5.2 mRNA Injektionen in Embryonen

- 1h alte Embryonen dechorionieren wie oben beschrieben
- Embryonen auf einem Agarblöckchen aufreihen (30-45min)
- Embryonen in einem Exikator mit Silikagel für ca. 12min trocknen lassen
- Embryonen mit 10S Voltalef-Öl überschichten
- die mRNS sollte kurz vor der Zellularisierung injiziert werden
- nach der Injektion Embryonen 2h bei RT altern lassen
- Fixierung in 6% Formaldehyd / Heptan für 20 min bei RT
- Embryonen auf ein Sieb pipettieren
- mehrmals mit Heptan und danach mit PBS waschen
- Embryonen auf doppelseitiges Klebeband überführen
- in eine Petrischale kleben und mit PBS überschichten
- Embryonen mit einer Kanüle oder Präpariernadel devitellinisieren
- in ein Eppendorf-Gefäß übertragen
- weiter wie bei Antikörperfärbungen

2.3 Expressions-Systeme in *Drosophila*

2.3.1 Das UAS / GAL4-System

Das UAS / GAL4 System erlaubt die ektopische Expression von Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Gewebe (Brand and Perrimon, 1993). Das System besteht aus Aktivator- und einer Effektor-Komponente. Der Aktivator ist der Hefe Transkriptionsfaktor GAL4. Dieser kann in einer Fliege unter ausgewählten regulatorischen Sequenzen der Fliege exprimiert werden. Die Expression von GAL4 allein hat keine

Auswirkungen, da GAL4 nicht als Aktivator für *Drosophila* Gene fungieren kann. Um die Transkription zu aktivieren benötigt GAL4 eine bestimmte DNA Sequenz, sogenannte "Upstream Activating Sequences" (UAS) Sequenzen. Um ein bestimmtes Gen unter GAL4 Kontrolle zu exprimieren bringt man es hinter fünf hintereinandergeschaltete GAL4 Bindungssequenzen in eine Fliege (Effektorstamm). Diese cis Elemente führen ohne GAL4 nicht zur Expression des nachgeschalteten Gens. Nach Kreuzung von Aktivator- und Effektor-Stamm, kommt es in dem Teil der Nachkommenschaft, der beide Komponenten trägt, zur ektopischen Expression des Zielgens. Die regulatorische Sequenz vor dem Aktivator bestimmt Zeitpunkt und Gewebe dieser Expression.

In dieser Arbeit wurden als Aktivatorstämme *prd-GAL4*, *arm-GAL4*, *da-GAL4*, *scl-GAL4* und *sev-GAL4* verwendet.

2.3.2 Herstellung von Klonen mittels FLP / FRT vermittelter mitotischer Rekombination

Die klonale Analyse wurde mit Hilfe des FLP / FRT Systems durchgeführt (Xu und Rubin, 1993). Das System besteht aus zwei Komponenten: einer Rekombinase, der FLPase (FLP) und einer spezifischen Sequenz, FRT genannt, an der die FLPase die Rekombination vornimmt. Voraussetzung für ein solches Rekombinationsereignis ist das Vorhandensein von zwei getrennten FRT Sequenzen; zwischen diesen kann das Enzym die Rekombination vermitteln. Sitzen die FRT Sequenzen in der Nähe des Centromers zweier homologer Chromosomen, so werden bei Anwesenheit der FLPase diese Chromosomenarme mit hoher Frequenz ausgetauscht. Tragen die Chromosomenarme verschiedene Allele eines Gens, so entstehen nach der Teilung Tochterzellen, die für die entsprechenden Allele homozygot sind. Diese Zellen teilen sich weiter und bilden einen Klon im jeweiligen Gewebe der Fliege. Ist das Chromosom mit einer zell-autonomen Markermutation versehen, so können die Klone identifiziert und der Phänotyp des zu testenden Allels analysiert werden. Mit dieser Methode lassen sich die Auswirkungen von embryonal lethalen Mutationen auch in späteren Entwicklungsstadien analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde das FRT 40A Chromosom verwendet. Als FLPase Quellen wurde entweder ein *scalloped-GAL4 / UAS-FLP* oder ein *hs-FLP* -Stamm benutzt. Der Hitzeschock erfolgte für 30 min bei 37°C im Wasserbad. Klone konnten durch die Abwesenheit von GFP identifiziert werden.

3. Ergebnisse

3.1 *rca1* Allele

Das Gen *rca1* liegt auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms im Locus 27B4-C1. Die Fliegenstämme und cDNA für die Analyse seiner Funktion wurden von L. Zipursky zur Verfügung gestellt. Abgesehen vom Wildtyp-Allel, sind noch drei weitere *rca1* Allele erhältlich, die alle homozygot letal sind. *rca1^{P1}* besitzt eine P-Element Insertion im 5' Bereich, 42 Basenpaare vor dem ATG (Dong et al., 1997). Es ist das schwächste der drei Allele, da hin und wieder homozygote *rca1^{P1}* Fliegen schlüpfen. *rca1²* und *rca1³* sind nicht charakterisiert. Die Analyse des mutanten Phänotyps von *rca1* wurde mit der heteroallelischen Kombination *rca1² / rca1³* durchgeführt; alle anderen Experimente mit *rca1²*.

3.2 *rca1* Mutanten arretieren in der G2-Phase des Zyklus 16

Der *rca1* Phänotyp ist in Abbildung 3.1 (Abb. 3.1) dargestellt. In homozygoten *rca1* Embryonen verläuft die Embryogenese bis zum Stadium 11, wenn der Keimstreif völlig ausgestreckt ist, wie in Wildtyp-Embryonen (WT) (Stadien nach (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997)). Während der ersten 15 Teilungen sind keine Defekte festzustellen und auch die S-Phase 16 findet noch statt. Allerdings bilden sich zu der Zeit, in der normalerweise die Mitose 16 ablaufen würde, keine mitotischen Spindeln (Dong et al., 1997). *rca1* homozygote Embryonen arretieren in der G2 Phase des Zyklus 16, was die folgenden morphogenetischen Prozesse jedoch nicht beeinflusst. Als Folge dieses Arrests besitzen die Embryonen 50% weniger Zellen als ein WT-Embryo im gleichen Alter (vergleiche 3.1 B und E). Die DNA ist dekondensiert, was zeigt, dass die Zellen nicht in einem mitotischen Stadium arretiert sind (3.1 F). BrdU Markierungsexperimente von Dong et al. haben zusätzlich gezeigt, dass DNA-Replikation auch nach dem Arrest in der G2-Phase 16 noch stattfinden kann. Alle hier aufgeführten Merkmale sind auch in homozygoten *CycA* Embryonen zu beobachten (Lehner and O'Farrell, 1989).

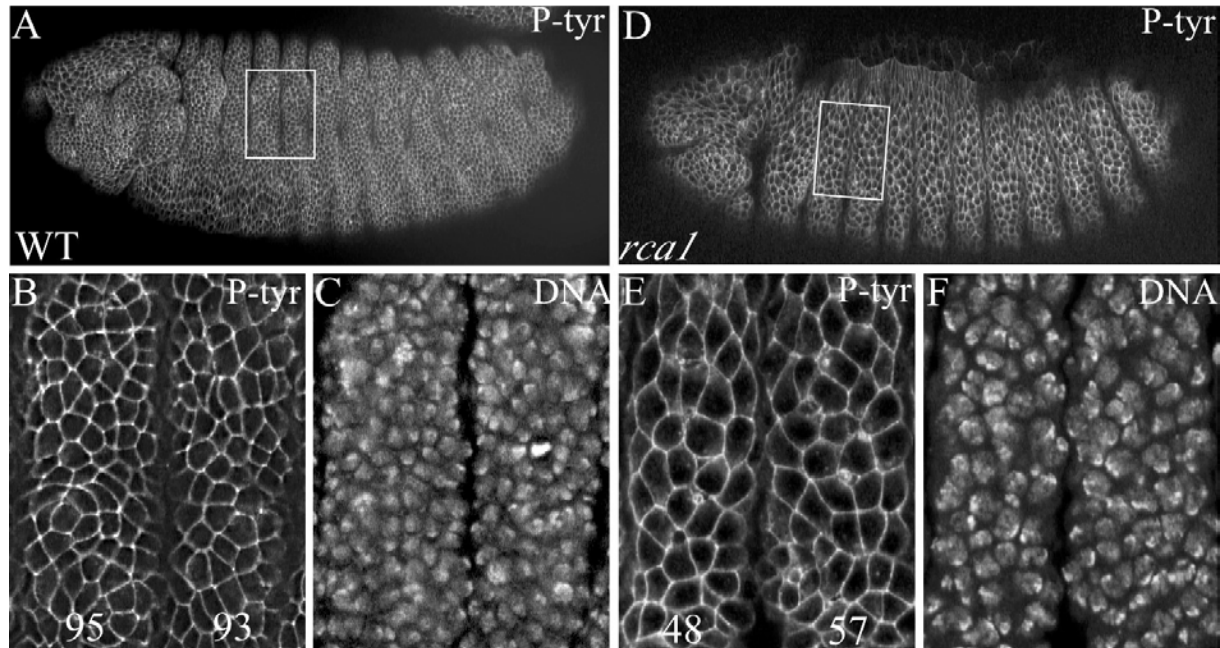


Abb. 3.1 *rcal* Mutanten arretieren im Zellzyklus 16

WT (A-C) und *rcal* homozygote Embryonen (D-F) im Stadium 13. Die Embryonen wurden mit einem Antikörper gegen Phospho-Tyrosin (P-tyr, A, B, D und E) gefärbt, um die Zellmembran sichtbar zu machen. C und F zeigen Propidiumiodidfärbungen (PPI) der DNA. *rcal* Mutanten haben in einem definierte Bereich etwa 50% weniger epidermale Zellen als ein WT-Embryo (vergleiche B und E). Die Mitose 16 wurde also nicht nur verzögert, sondern ganz ausgelassen. Die DNA ist dekondensiert (C und F).

Anterior ist immer links und dorsal oben. Die eingezeichneten Boxen kennzeichnen die vergrößerten Regionen. Zahlen beziehen sich auf die Zellanzahl in der gekennzeichneten Region.

3.3 Das *rcal* Expressionsmuster

In situ Hybridisierung mit einer RNA Sonde zeigt, dass *rcal* während eines Großteils der Embryogenese exprimiert wird (Abb. 3.2). In sehr jungen Embryonen, die kurz vor Vollendung der Zellularisierung stehen, erkennt man *Rcal* RNA ubiquitär, was auf einen maternalen Anteil hindeutet (Abb. 3.2 A und Dong et al., 1997). Im weiteren Verlauf der Embryogenese ist *rcal* ebenfalls im ganzen Embryo exprimiert. Ab dem Stadium 9 ist eine höhere Transkriptkonzentration im Mesoderm und in den Anlagen des anterioren und posterioren Mitteldarms zu erkennen (Abb. 3.2 C). Zusätzlich hierzu, zeigen sich im Stadium 11 mehrere kleine Bereiche erhöhter Expression in der Epidermis (Sterne in Abb. 3.2 E), die aber im Stadium 12, wie auch die Expression im Mesoderm, nicht mehr zu erkennen sind (Abb. 3.2 F). Dafür sind die Transkripte im anterioren und posterioren Mitteldarm und in geringerer Konzentration auch im sich entwickelnden zentralen Nervensystem weiterhin gut nachweisbar (Abb. 3.2 F). In sehr alten Embryonen, bei denen sich die Epidermis dorsal schon geschlossen hat, erkennt man nur noch Färbung in den Anlagen der Speicheldrüsen

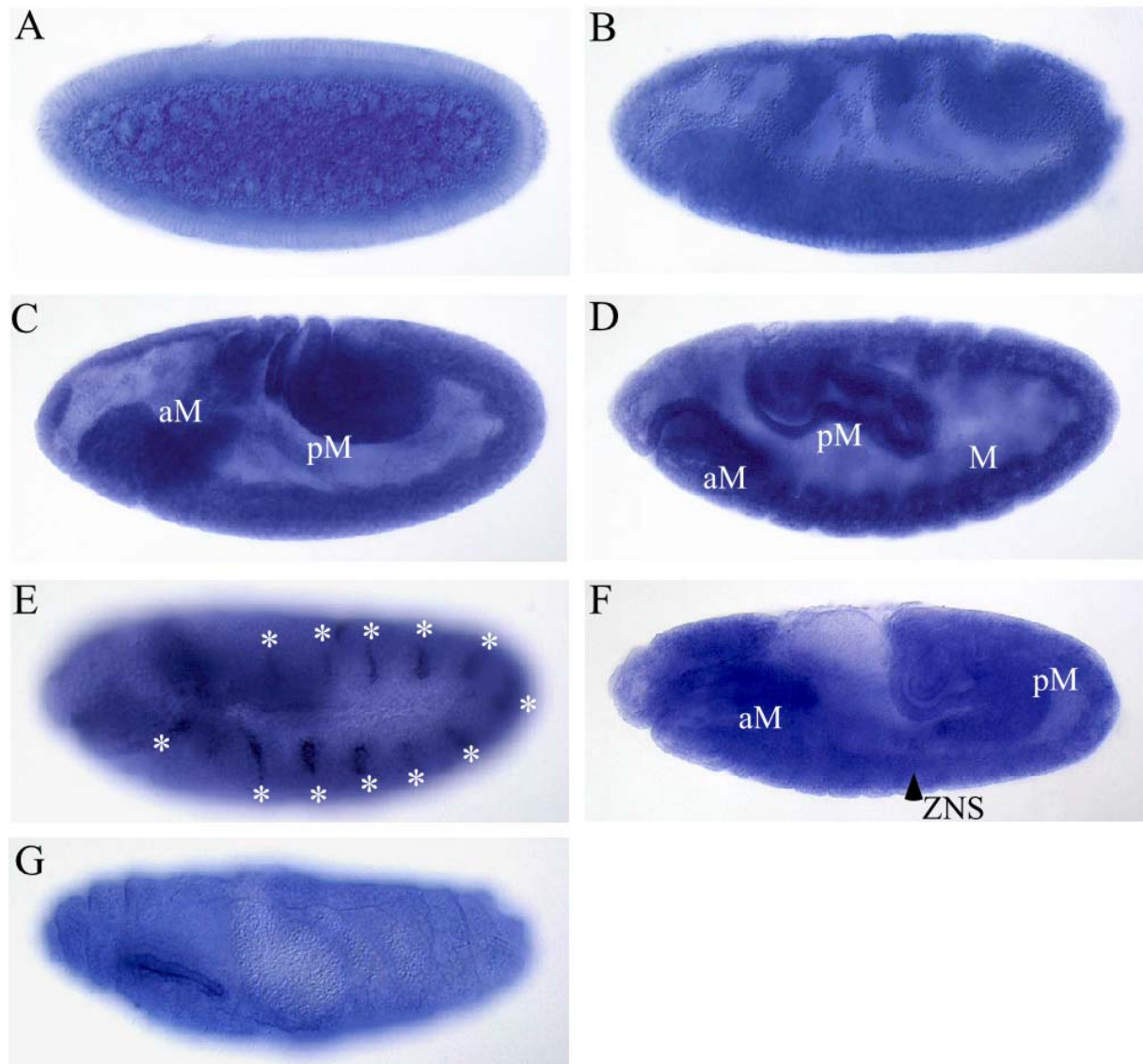


Abb. 3.2 Das *rcal* Expressionsmuster während der Embryogenese

in situ Hybridisierungen mit einer *Rcal* RNA Sonde in WT-Embryonen (A-G). (A) In sehr jungen Embryonen (Stadium 4) ist *Rcal* mRNA nur im Dotter zu erkennen. (B) Im Stadium 7 ist *rcal* überall exprimiert. Während der Stadien 9 und 10 (C und D) ist eine höhere Transkriptkonzentration im Mesoderm (M) und in den Anlagen des anterioren (aM) und posterioren Mitteldarms (pM) zu erkennen. Zusätzlich hierzu, zeigen sich im Stadium 11 elf kleine Bereiche erhöhter Expression in der Epidermis (Sterne E), die aber im Stadium 12, wie auch die Expression im Mesoderm, nicht mehr zu erkennen sind (F). Dafür sind die Transkripte im anterioren und posterioren Mitteldarm und in geringerer Konzentration auch im sich entwickelnden zentralen Nervensystem (ZNS) weiterhin gut nachweisbar (F). In sehr alten Embryonen, bei denen sich die Epidermis dorsal schon geschlossen hat, erkennt man nur noch Färbung in den Anlagen der Speicheldrüsen (G).

(Abb. 3.2 G). Dieses Expressionsmuster zeigt, dass *rcal* in allen proliferierenden Geweben exprimiert wird. Abbildung 3.3 zeigt zum Vergleich das Expressionsmuster von *CycA*, das dem von *rcal* stark ähnelt. *CycA* ist im Stadium 11 jedoch stärker in der Epidermis exprimiert als *rcal* (Abb. 3.3 E) und später auch deutlicher im sich entwickelnden zentralen Nervensystem (Abb. 3.3 G und H).

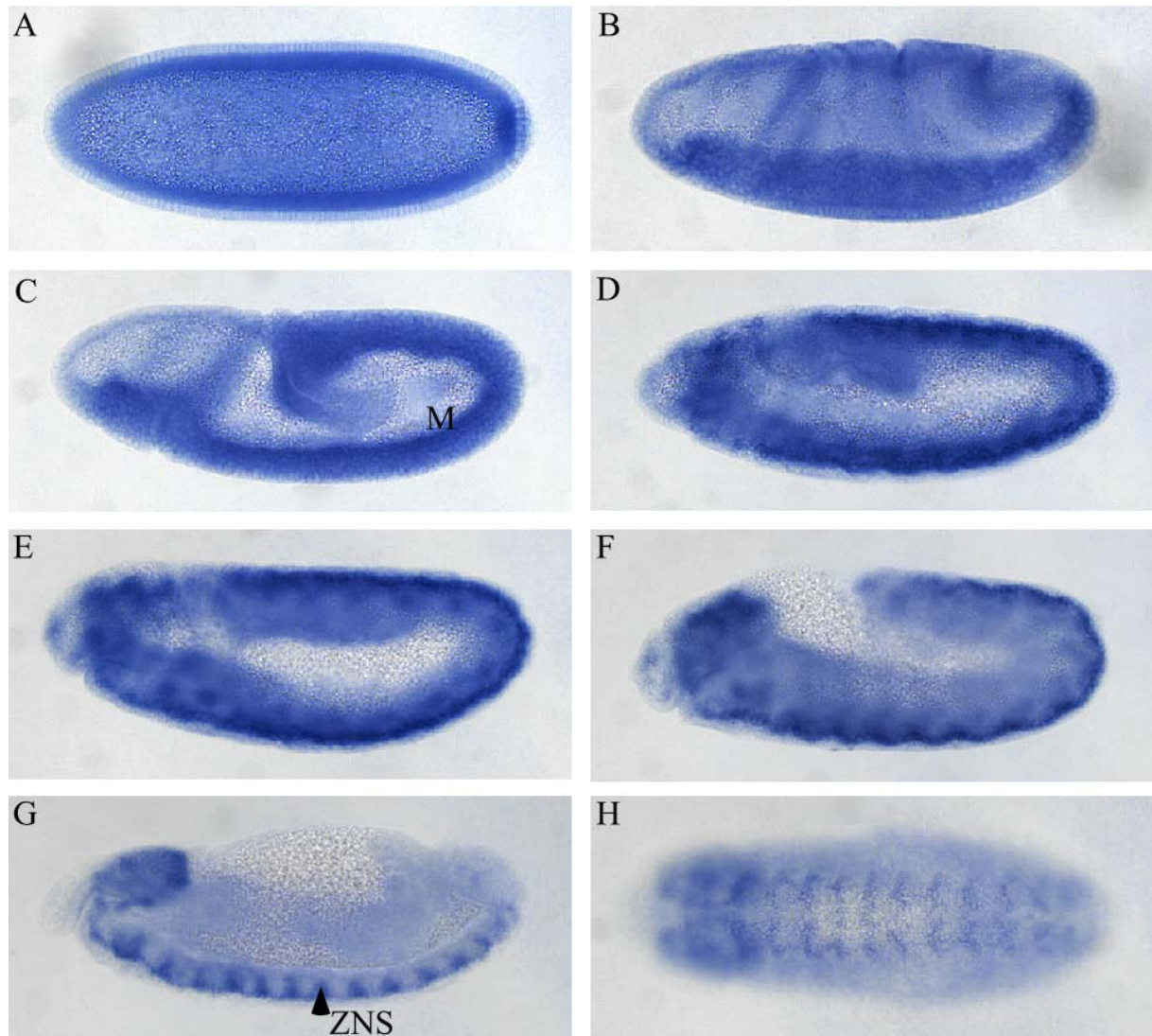


Abb. 3.3 Das *CycA* Expressionsmuster während der Embryogenese *in situ* Hybridisierung mit einer *CycA* RNA Sonde in WT-Embryonen (A-H). Im Stadium 4 (A) ist nur maternale mRNA im Dotter zu erkennen. Im Stadium 7 (B) ist *CycA* im ganzen Embryo exprimiert. Während der Stadien 9 (C), 10 (D) und 11 (E) erkennt man eine erhöhte Transkriptkonzentration im Mesoderm (M), die im Stadium 12 (F) wieder abnimmt. In älteren Embryonen (Stadium 13, G und H) ist nur noch Expression im zentralen Nervensystem (ZNS) zu sehen.

Ob das Transkriptionsmuster von *rca1* auch die Expression des Proteins widerspiegelt, ist nicht feststellbar. Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Antikörper gegen ein Glutathion-S-Transferase-Rca1 (GST-Rca1) Fusionsprotein hergestellt, der jedoch nur überexprimiertes Rca1 in Embryonen erkennt (siehe Abb. 3.11), nicht jedoch das endogene Protein. Das ist wahrscheinlich auf die relativ niedrige Expression des Proteins zurückzuführen (siehe Abb. 3.4 B). Auf Western Blots detektiert der Antikörper eine Bande der erwarteten Größe (47kD) in einer *in vitro* Translation von *Rca1* mRNA mit Retikulocytenlysate (Retic). Diese Bande ist nicht im Retic vorhanden (Abb. 3.4 A Spur 1 und 2). Eine Bande gleicher Größe ist auch in

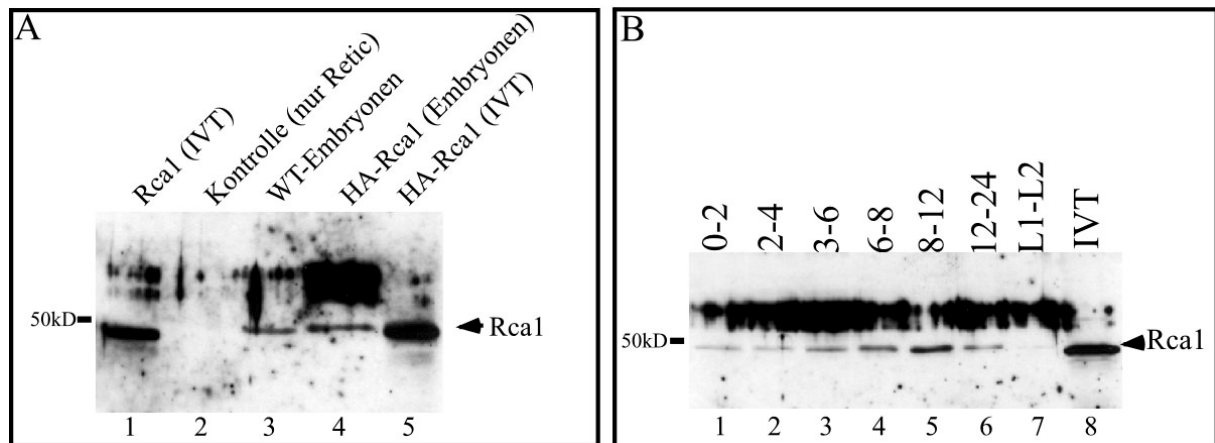


Abb. 3.4 Das Rca1 Expressionsprofil während der Embryogenese

(A) Charakterisierung des Rca1 Antikörpers. Der Antikörper erkennt eine Bande der richtigen Größe (47kD) in einer Rca1 *in vitro* Translation (IVT, Spur 1), aber nicht in einer Kontrolltranslation (Spur 2). Eine Bande der gleichen Größe ist auch in einem Extrakt von drei bis sechs Stunden alten WT-Embryonen zu erkennen (Spur 3). Ebenso detektiert der Antikörper HA-Rca1 aus Embryonen (Spur 4). Diese Bande läuft durch die zusätzlichen Aminosäuren der HA-Markierung etwas oberhalb der WT-Bande. Spur 5 zeigt zum Vergleich *in vitro* translatiertes HA-Rca1.

(B) Rca1 wird während der gesamten Embryogenese exprimiert. In jeder Spur des Western Blots wurden zehn Embryonen eines bestimmten Alters aufgetragen (Spur 1-6, Altersangabe in Stunden über den einzelnen Spuren), bzw. fünf Larven im ersten und zweiten Larvenstadium (Spur 7). Spur 8 zeigt zum Vergleich *in vitro* translatiertes Rca1.

WT-Embryonen zu erkennen (Abb. 3.4 A, Spur 3). Außerdem erkennt der Antikörper eine Bande der richtigen Größe in einem Extrakt von Embryonen, die Haemagglutinin markiertes Rca1 (HA-Rca1) überexprimieren (Abb. 3.4 A, Spur 4). Zum Vergleich wurde in Spur 5 *in vitro* translatiertes HA-Rca1 aufgetragen. Mit Hilfe dieses Antikörpers, wurde das Rca1 Expressionsprofil während der Embryogenese analysiert (Abb. 3.4 B). In 0-2 Stunden alten Embryonen ist eine schwache Bande der entsprechenden Größe zu erkennen, die den maternalen Anteil des Proteins zeigt (Abb. 3.4 B, Spur 1). Eine höhere Expression ist in 2-12 Stunden alten Embryonen zu sehen (Abb. 3.4 B, Spur 2-6). In 12-24 Stunden alten Embryonen nimmt die Expression wieder ab und ist in Larven im ersten Larvenstadium nicht mehr zu erkennen (Abb. 3.4 B, Spur 7 und 8). Zum Vergleich wurde in Spur 9 *in vitro* translatiertes Rca1 aufgetragen. Dieses Proteinprofil stimmt mit dem in Abbildung 3.2 gezeigten Transkriptionsprofil überein und unterstützt die Beobachtung, dass Rca1 in proliferierenden Zellen benötigt wird.

3.4 Die Analyse der Aminosäuresequenz von Rca1

Um einen Anhaltspunkt für eine mögliche Funktion von Rca1 zu erhalten, wurde die Proteinsequenz durch Vergleich mit Proteinen in einer Datenbank (<http://www.isrec.isb-sib.ch>) auf konservierte, funktionale Domänen hin untersucht (Abb. 3.5). Rca1 besitzt eine zweiteilige Kernlokalisierungssequenz (bipartite nuclear localisation sequence = bpNLS, rot) und eine mögliche F-Box (grün) in seiner N-terminalen Hälfte. Rca1-Antikörperfärbungen im späteren Teil dieser Arbeit zeigen, dass Rca1 in der Tat im Kern lokalisiert ist. Eine F-Box wurde zum ersten Mal als Proteinmotiv in Cyclin F beschrieben, das für die Bindung an das Protein Skp1 benötigt wird (Bai et al., 1996). Ein solches Motiv findet sich in einer Reihe von ansonsten wenig konservierten Proteinen, und fungiert als Verbindung zwischen dem SCF-Komplex und seinen Substraten. Die F-Box stellt hierbei die Verbindung zu dem Komplex her, während der Rest des F-Box Proteins für die Substraterkennung zuständig ist (Skowyra et al., 1997).

```

1  MSAYYRRAALRKKSPSRGSSFELEMNESGYTSFLALHNSTAETPFLEDAEGENCRNASN
61  TTTFFRGLNTPSGHQEQDLYWGKPYPRTPQPKKFSAEPEPFSMTPRLQDEHSLPKRRKKH
121 FQSPHSSPKKSKKLLFPHIEEPPKNRFYGGVEKLDIVAKLAQWQPALQCILRHVGAHTLD
181 VMTKVSPA WKQAVYRSQRDLERLQNHRLKLNLTKENPHVPKRCSHVPKANHTVPLQTSNH
241 SSLANSAASLMDSGNSSIHLMDVDAGRVLREQTQRVKCPRCGRGSRVFISEAAKCGENLL
301 SQTLPIGRTTSTFPCMTGPPLKRFLSLDLDEVRTSPQGPYPNFAECTSVICQFRFCVNCL
361 CKSHPGERCLVTELDTPSKLMMPRERLTPPQRAQNRDPKTRKNSLKRLLCF

```

bp NLS Konsensus: (R / K)2--X10--(R / K)3

F-Box Konsensus: hPxp1hxp1hph1xxxxphxhpx1spxxxphtthptxxxxhxtx
Rca1: **QP--ALQCILRHVGA-HTLDVMTKVSP---AWQAVYRS--QRDLER**

C6HC Konsensus: CxxxxCx(14-30)C(1-4)CxxxxCxxCxxxxHxxxxC

KEN KEN-Box

Abb. 3.5 Proteinmotiv in Rca1

Rca1 besteht aus 411 Aminosäuren. Diese primäre Sequenz enthält eine zweiteilige Kernlokalisierungssequenz (rot) und eine Region, die eine 65% ige Ähnlichkeit zu einer F-Box aufweist (grün) in der N-terminalen Hälfte. In der Mitte des Proteins befindet sich eine KEN-Box (schwarzer Kasten) und im C-terminalen Bereich eine Region mit einem charakteristischen Cysteinmotiv (gelb). Die Konsensussequenz C(4x)C(14-30x)C(1-4x)C(4x)C(2x)C(4x)H(4x)C für dieses Motiv ist, außer dem ersten C(4x), vollständig in Rca1 zu finden.

Hervorgehobene Aminosäuren in der Rca1 Sequenz stimmen mit der Konsensussequenz überein. Die Konsensussequenzen für die einzelnen Motive sind unter der Rca1 Aminosäuresequenz angegeben. und wurden der isrec.isb-sib.ch Datenbank entnommen. Großbuchstaben in diesen Sequenzen, zeigen die invariablen Aminosäuren an. Kleinbuchstaben stehen für die Art der jeweiligen Aminosäure an einer bestimmten Position (h=hydrophob, l=aliphatisch, p=polar, t=turnlike). Ein x steht für eine beliebige Aminosäure.

Im C-terminalen Bereich befindet sich ein Abschnitt, der durch den charakteristischen Abstand seiner Cysteine Ähnlichkeit zu einem neu beschriebenen Motiv aufweist (gelb). Diese möglicherweise Zinc bindende Region könnte sowohl an Protein-DNA als auch in Protein-Protein Interaktionen beteiligt sein (van der Reijden et al., 1999). Zusätzlich findet man in der Mitte des Proteins die Aminosäureabfolge KEN (schwarze Box). Diese sogenannte KEN-Box findet man in Proteinen, die durch den APC-Fzr Komplex abgebaut werden (Pfleger and Kirschner, 2000). Die Analyse der konservierten Domänen in Rca1 gibt somit wenig Aufschluss über eine mögliche Funktion des Proteins.

3.5 Das räumliche Cyclin A Expressionsmuster ist unverändert in *rca1* Mutanten

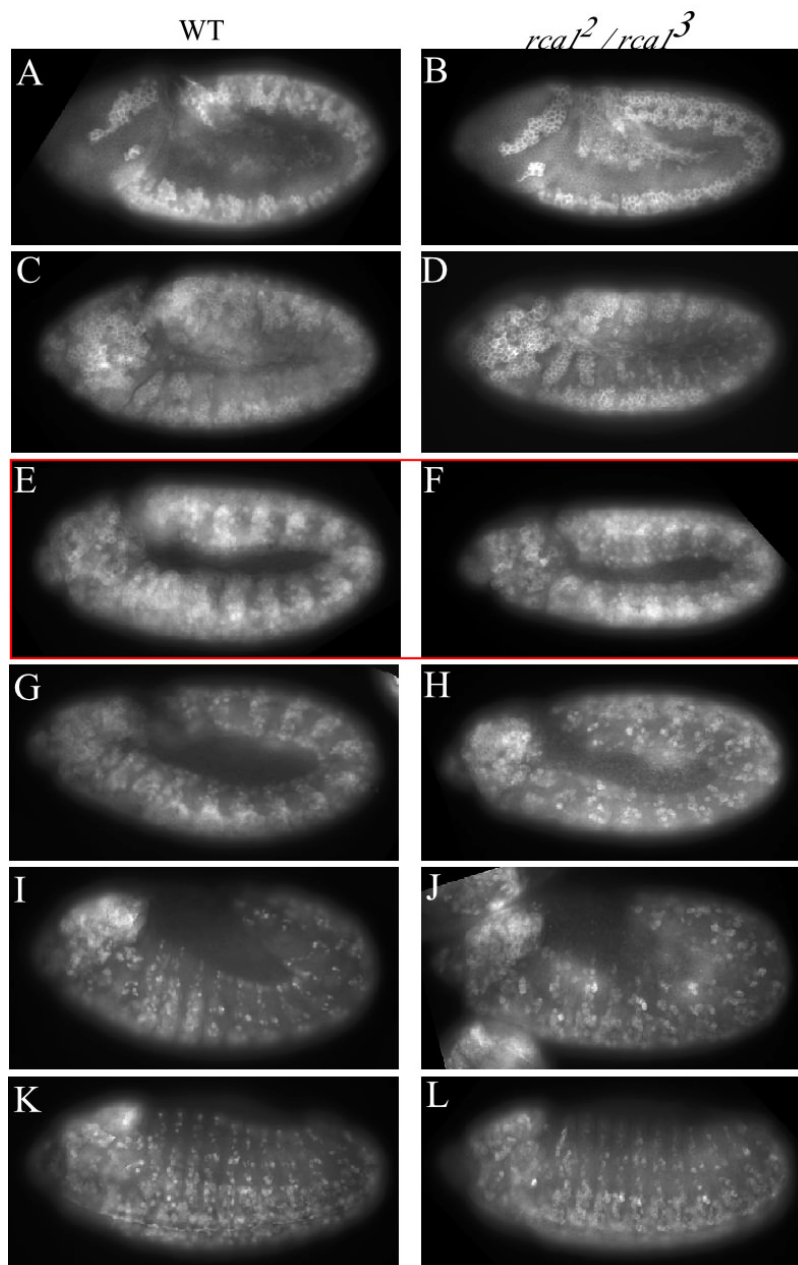


Abb. 3.6 Das räumliche CycA Expressionmuster in *rca1* homozygoten Embryonen WT (A, Stadium 9; C, Stadium 10; E, Stadium 11; G, frühes Stadium 12; I, spätes Stadium 12; k, Stadium 13) und *rca1* Embryonen im gleichen Alter (B, D, F, H, J, L) wurden mit einem Antikörper gegen CycA gefärbt. In den Mutanten ist bis zum Stadium 11 kein Unterschied im CycA Muster zu erkennen.

Da *rca1* und *CycA* mutante Embryonen den gleichen Phänotyp aufweisen, wurde das räumliche *CycA* Expressionsmuster, also die Anordnung der *CycA* Expressionsdomänen, in *rca1* homozygoten Embryonen untersucht. Einen Unterschied in der Expression des Transkripts war nicht festzustellen (kein Bild). Abbildung 3.6 zeigt einen Vergleich des *CycA* Proteinmusters von WT und *rca1* Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Im Wildtyp spiegelt das *CycA* Abbaumuster die mitotischen Domänen wieder. Das ist auch in den *rca1* Embryonen in allen gezeigten Stadien zu beobachten. Auch im Stadium 11, wenn die Zellen im Wildtyp die Mitose 16 durchlaufen, ist dieses Abbaumuster zu erkennen (Abb. 3.6 E und F). Das generelle, räumliche *CycA* Expressionsmuster ist also unverändert in *rca1* Mutanten. Qualitativ unterscheiden sich das *CycA* Muster in den Mutanten also nicht von dem in WT-Embryonen.

3.6 Die mitotischen Cyclin A und B werden in *rca1* Mutanten vorzeitig abgebaut

Als nächstes wurden die *CycA* Expressionslevel untersucht, um festzustellen, ob ein quantitativer Unterschied im *CycA* Expressionsmuster zwischen WT- und *rca1* Embryonen besteht. Der Defekt in *rca1* Mutanten tritt erst im Zyklus 16 auf, deshalb wurden die *CycA* Proteinlevel von WT und *rca1* Embryonen im Stadium 11 mit einem konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 3.7). Dong et al. konnten in *rca1* homozygoten Embryonen keinen Unterschied in der Cyclin A Konzentration feststellen. Abbildung 3.7 zeigt aber, dass die Cyclin A Konzentration in den *rca1* Mutanten, kurz bevor im WT normalerweise die Mitose 16 stattfinden würde, eindeutig reduziert ist (Abb. 3.7 D und F). Im Wildtyp erscheint die Cyclin A Expression zu diesem Zeitpunkt in einem segmentalen Muster und man kann deutlich Zellen mit hoher und niedriger *CycA* Konzentration unterscheiden (Abb. 3.7 C). Erstere befinden sich noch in der G2-Phase des Zyklus 16, wohingegen die Zellen mit wenig Cyclin A schon in die G1-Phase 17 eingetreten sind. In den *rca1* Embryonen findet man nur eine gleichmäßig niedrige Cyclin A Konzentration, und dieses restliche Protein befindet sich fast ausschliesslich im Zytoplasma (Abb. 3.7 F). Die Zellen sind jedoch noch nicht in der G1-Phase 17, da sie die gleiche Zellgröße aufweisen, wie die G2 Zellen im Wildtyp (vergleiche Abb. 3.7 C und F). Zusätzlich sind in der DNA Färbung des mutanten Embryos nur äußerst selten Zellen in der Mitose zu sehen (der Pfeil in Abb. 3.7 E und F markiert eine Zelle in der Telophase). Diese erste Analyse zeigt, dass die Cyclin A Konzentration in den *rca1* Embryonen stark reduziert ist und zwar, bevor die Zellen in die Mitose 16 eintreten würden.

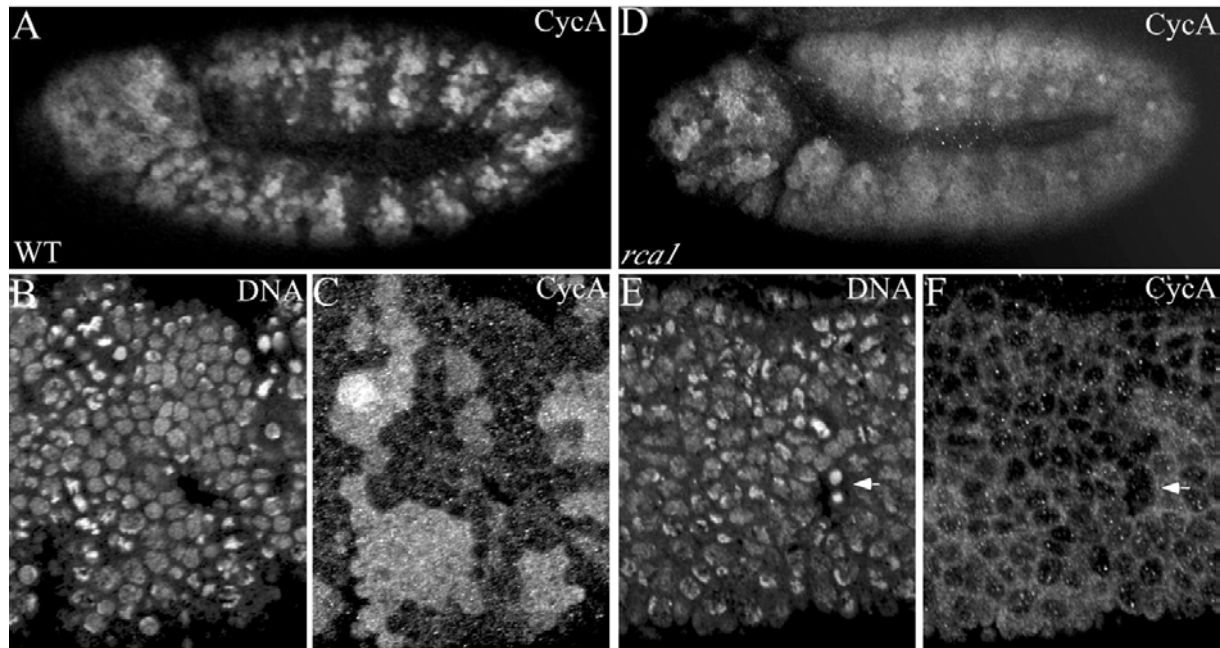


Abb. 3.7 CycA verschwindet vorzeitig in *rcal* Mutanten

WT (A-C) und *rcal* homozygote Embryonen (D-F) wurden im Stadium 11 fixiert und für CycA (A, C, D, F) und DNA (B und E) gefärbt. Im Wildtyp erscheint die Cyclin A Expression zu diesem Zeitpunkt in einem segmentalen Muster und man kann deutlich Zellen mit hoher (G2 Zellen im Zyklus 16) und niedriger CycA Konzentration unterscheiden (G1 Zellen im Zyklus 17, C). Zusätzlich lassen sich mitotische Zellen anhand ihrer DNA Konfiguration erkennen. In *rcal* Mutanten ist nur eine einheitlich, schwache CycA Färbung zu erkennen (F) und die Zellgröße ist vergleichbar mit der, der G2 Zellen im WT. Sich teilende Zellen sind nur sehr selten zu beobachten (Pfeil in E und F markiert eine Telophasenzelle).

Um den genaueren Zeitpunkt zu bestimmen, an dem sich die CycA Menge in den *rcal* Mutanten verringert, wurden Embryonen untersucht, die nur in jedem zweiten Segment Rca1 exprimieren. Für diesen Zweck wurde ein Haemagglutinin (HA) markiertes *rcal* unter UAS Kontrolle (Upstream Activating Sequence) hergestellt (UAS-HA-*rcal*). Expression des Konstruktes mit Hilfe einer *paired-Gal4* (*prd-Gal4*) Aktivatorlinie im *rcal* mutanten Hintergrund resultiert in Embryonen, die nur in jedem zweiten Segment HA-Rca1 exprimieren. In diesen Embryonen kann man nun Zellen gleichen Alters, mit und ohne Rca1 vergleichen. HA-Rca1 wurde mittels eines HA-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 3.8 A). Bei höhere Vergrößerung (Abb. 3.8 B) ist zu erkennen, dass HA-Rca1 im Kern lokalisiert ist, wie es die Kernlokalisierungssequenz schon vermuten ließ. Die Antikörperfärbung gegen phosphoryliertes Histon 3 (PH3), das nur in mitotischen Zellen nachweisbar ist, zeigt, dass die sich teilenden Zellen auf die HA-Rca1 exprimierenden Segmente beschränkt sind. HA markiertes Rca1 ist also in der Lage, die Mitose 16 in den *rcal* Mutanten wiederherzustellen (Abb. 3.8 C und D). Dass diese Mitose auch vollständig durchlaufen wird lässt sich an Embryonen im Stadium 13 erkennen.

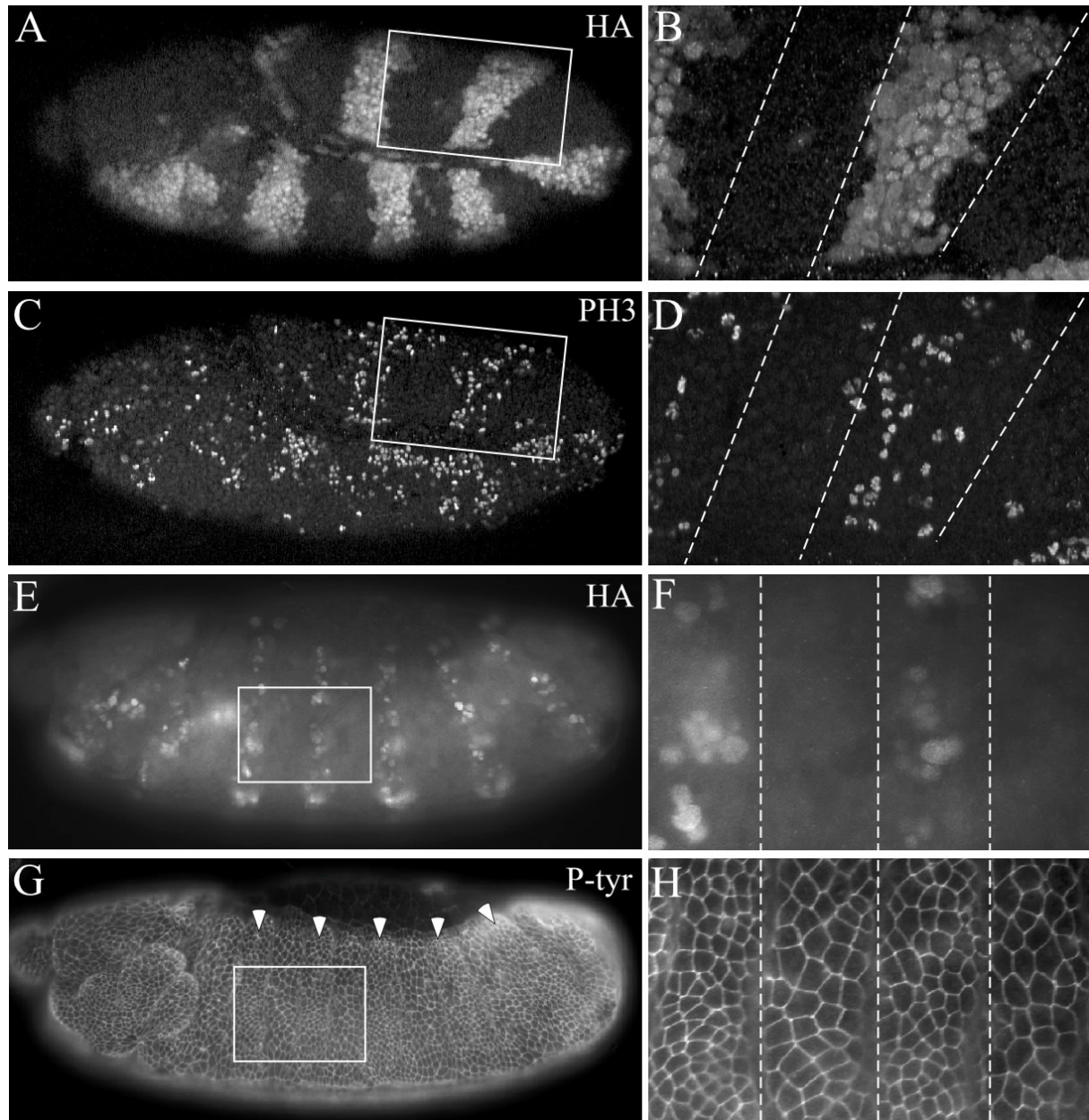


Abb. 3.8 HA-Rca1 kann die Mitose 16 in *rca1* Mutanten wiederherstellen

(A-H) *rca1* Mutanten, die *HA-rca1*, aktiviert durch *prd-Gal4*, in jedem zweiten Segment exprimieren. Im Stadium 11 ist schon eine starke HA-Rca1 Expression zu erkennen (HA-Antikörperfärbung in A und B). Man sieht, dass die mitotischen Zellen, markiert mit Hilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Histon 3 (PH3, C und D), auf die Segmente beschränkt sind, die das Transgen exprimieren. In älteren Embryonen des gleichen Genotyps (Stadium 13, E-H) ist zu beobachten, dass die HA-Rca1 exprimierenden Segmente (weiße Pfeilköpfe in G) eine höhere Zelldichte aufweisen als die benachbarten Segmente (H).

Die gestrichelten Linien markieren immer die Grenzen zwischen *prd-Gal4* exprimierenden und nicht-exprimierenden Segmenten.

Die Segmente die HA-Rca1 exprimieren, beinhalten fast doppelt so viele Zellen wie die benachbarten, nicht-exprimierenden Segmente (Abb. 3.8 F und H). HA-Rca1 kann also den

mitotischen Phänotyp *rcal* homozygoter Embryonen retten. Die Funktion von Rcal wird demnach nicht von der HA-Markierung beeinflusst.

In Embryonen mit dem oben erwähnten Genotyp wurden nun die mitotischen Cycline A und B im Stadium 11 untersucht. In den HA-Rcal exprimierenden Segmenten ist die Konzentration beider Cycline hoch (Abb. 3.9 A-F). Im Gegensatz dazu sind in den nicht-exprimierenden Segmenten nur geringe CycA und B Mengen vorhanden. In etwas jüngeren Embryonen des gleichen Genotyps konnten diese Unterschiede nicht festgestellt werden, und beide Cycline akkumulierten am Beginn der Interphase 16 normal (Abb. 3.10 A-D, kein Bild für CycB). Die Verringerung der CycA und B Konzentration wird also durch einen verfrühten Abbau beider Cycline in der späten Interphase 16 hervorgerufen. Die verbleibenden Proteinmengen sind nicht ausreichend, um die Mitose 16 zu induzieren.

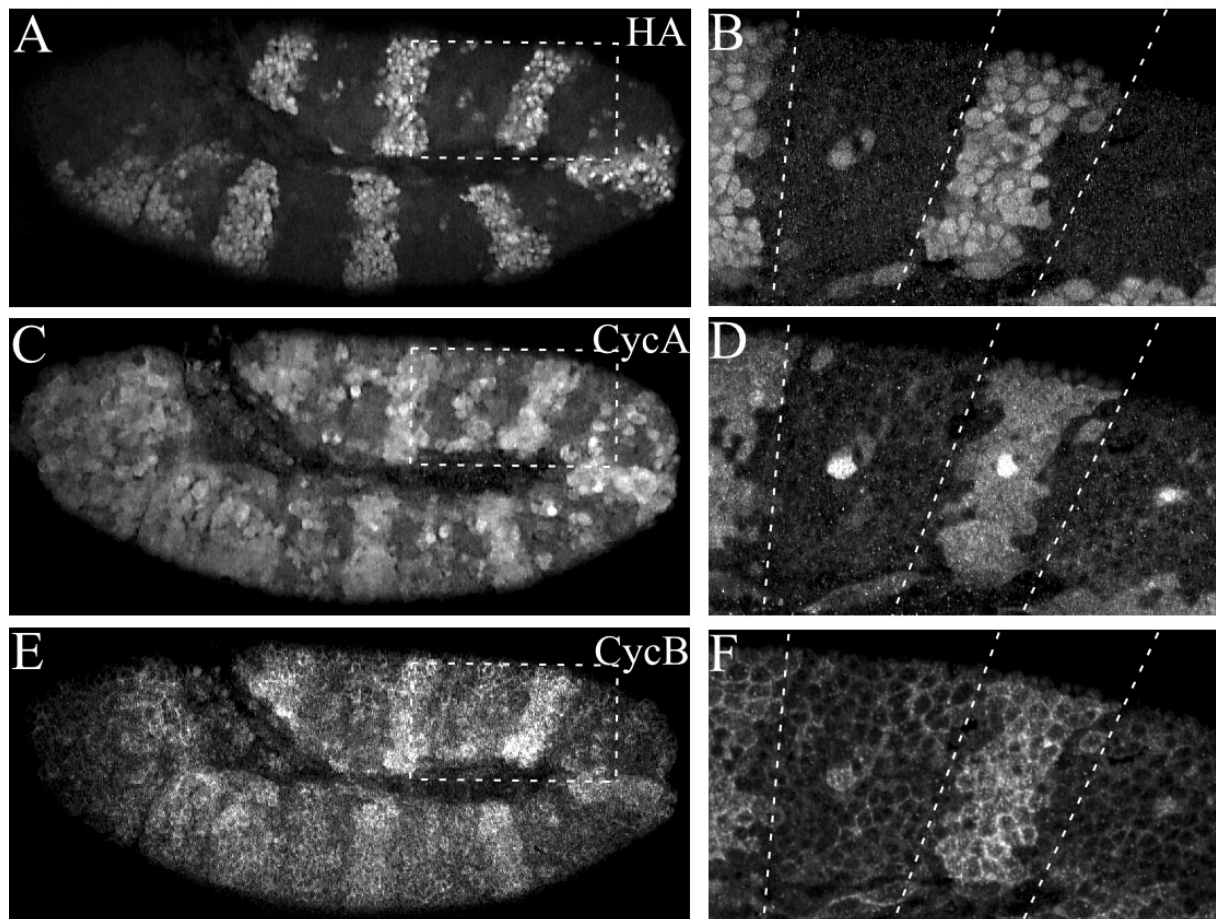


Abb. 3.9 CycA und CycB werden in *rcal* Mutanten vorzeitig abgebaut

(A-F) *rcal* Mutanten im Stadium 11, die *HA-rcal*, aktiviert durch *prd-Gal4*, in jedem zweiten Segment exprimieren. Die Embryonen wurden für HA (A und B), CycA (C und D) und CycB (E und F) gefärbt. Man erkennt in den Segmenten, die kein HA-Rcal exprimieren, weniger CycA und CycB als in den HA-Rcal exprimierenden Segmenten.

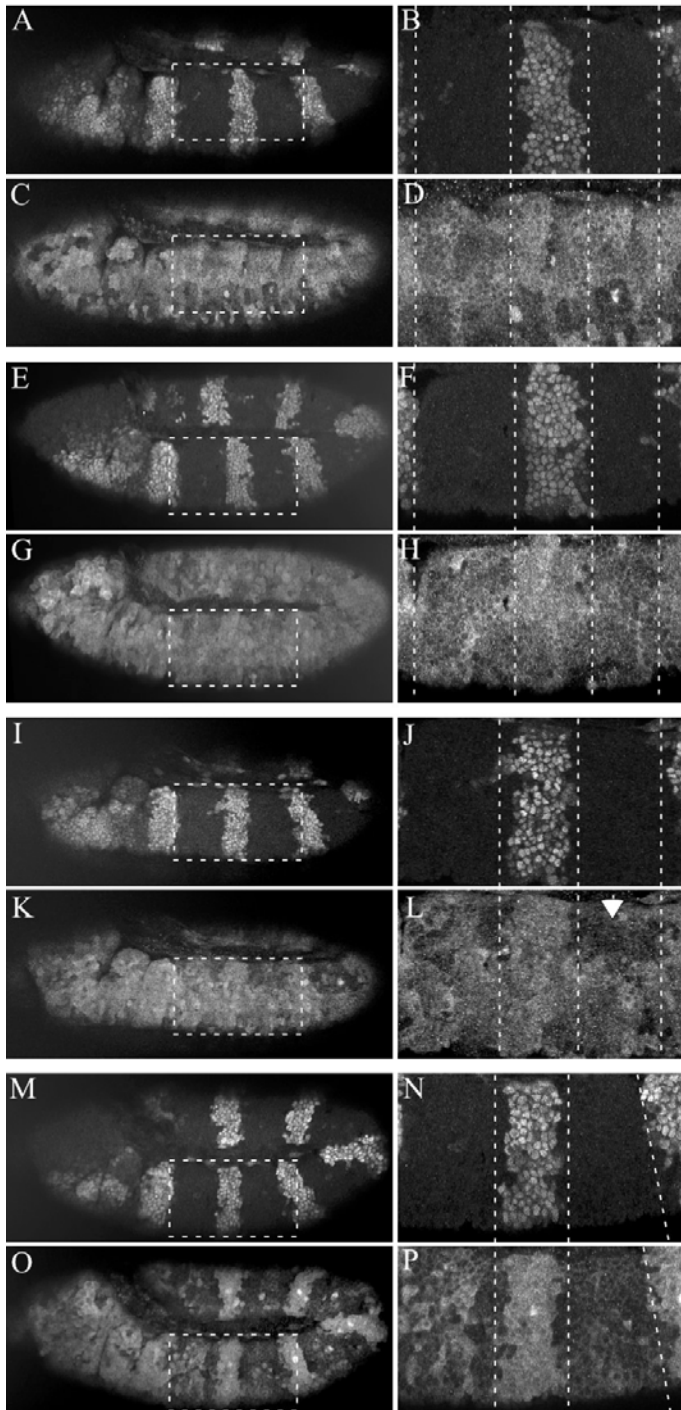


Abb. 3.10 Die CycA Akkumulation in der frühen Interphase 16 ist unverändert in *rcal* Mutanten

(A-P) *rcal* Mutanten, die *HA-rcal*, aktiviert durch *prd-Gal4*, in jedem zweiten Segment exprimieren. Die Embryonen wurden für Rca1 (A, B, E, F, I, J, M, N) und CycA (C, D, G, H, K, L, O, P) gefärbt. Im frühen Stadium 11, wenn HA-Rca1 schon stark exprimiert wird (A und B), ist kein Unterschied in der CycA Konzentration benachbarter Segmenten zu erkennen (C und D). Erst in einem etwas älteren Embryo erkennt man eine leichte Abnahme der CycA Level in den Segmenten, die kein HA-Rca1 exprimieren (G und H). Dieser Effekt wird mit zunehmendem Alter der Embryonen deutlicher (K, L, O, P). In den Zellen der dorsalen Epidermis verschwindet CycA schneller als in den ventralen (Pfeilkopf in L). Das spiegelt den normale Zeitunterschied in der Entwicklung der dorsalen und ventralen Zellen wider. Die dorsalen Zellen treten immer etwas früher als die ventralen in die Mitose ein.

Um jedoch ausschließen zu können, dass die Überexpression von HA-Rca1 das Abbauverhalten von CycA beeinflusst, wurde das *UAS-HA-rcal* Konstrukt in jedem zweiten Segment eines WT Embryos exprimiert. Abbildung 3.11 zeigt, dass sich die CycA Konzentration und der Verlauf des Zellzyklus in benachbarten Segmenten nicht unterscheiden. HA-Rca1 Expression führt also nicht zur Stabilisation von CycA. Das CycA Abbauverhalten während der Mitose wird ebenfalls nicht beeinflusst. Normalerweise ist CycA

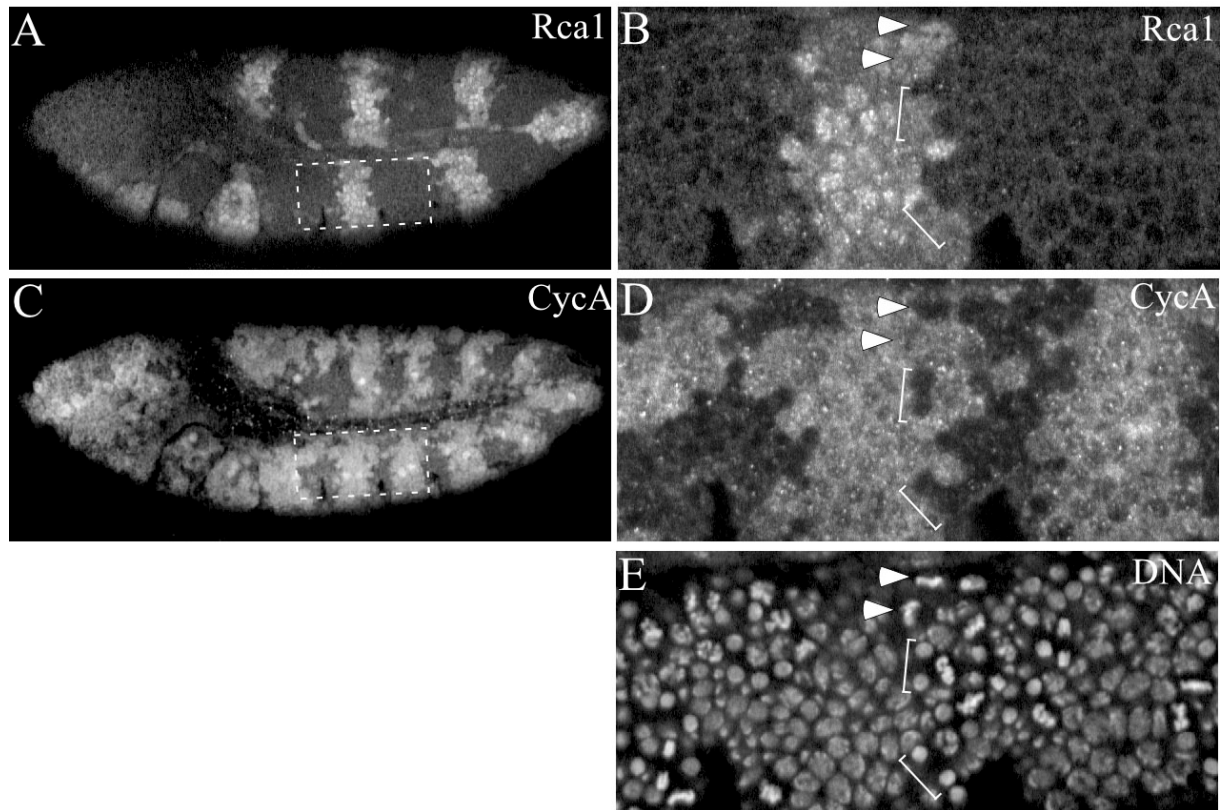


Abb. 3.11 Die Überexpression von HA-Rca1 beeinflusst den Zellzyklusverlauf nicht. Ein WT-Embryonen im Stadium 11, der *HA-rca1*, aktiviert durch *prd-Gal4*, in jedem zweiten Segment exprimiert (Rca1 Antikörperfärbung in A und B). Die CycA (C und D) und DNA (E) Färbung des gleichen Embryos zeigt keine Unterschiede im CycA Abbauverhalten oder im Zellzyklusverlauf benachbarter Segmente. Die Pfeilköpfe in B, D und E markieren Metaphasezellen. Die dorsale Zelle hat CycA bereits abgebaut, während in der ventralen noch CycA vorhanden ist. Die Klammern markieren Telophasenzelle, in denen CycA schon vollständig abgebaut wurde.

während der Interphase stabil und wird im Verlauf der Metaphase abgebaut (Lehner and O'Farrell, 1989). In den HA-Rca1 exprimierenden Segmenten findet man sowohl CycA positive als auch CycA negative Metaphasezellen (Pfeilköpfe in Abb. 3.11 C-E). In den Zellen, die sich in der Telophase befinden, ist CycA bereits vollständig abgebaut (Klammern in Abb. 3.11 C-E). Die Überexpression von Rca1 beeinflusst demnach weder den Zellzyklusverlauf, noch den CycA Abbau.

3.7 Cyclin A Überexpression kann die Mitose 16 in *rca1* Mutanten wieder herstellen

In den *rca1* Mutanten ist, wie oben gezeigt, ein verfrühter Abbau der mitotischen Cycline A und B und ein Fehlen der Mitose 16 zu beobachten. Da CycA das einzige essentielle mitotische Cyclin in *Drosophila* ist, wäre mit seiner Abwesenheit der Ausfall der Mitose 16 schon zu erklären. Andererseits ist es möglich, dass weitere, für die Mitose wichtige, Faktoren in den Mutanten fehlen. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde zusätzliches CycA in den

rcal Embryonen exprimiert. Hierfür wurde ein UAS-*HA-CycA* Konstrukt mit der *prd*-Gal4 Linie in *rcal* Mutanten aktiviert (Abb. 3.12). Die Expression von HA-CycA im WT hat keine Auswirkungen auf den Zellzyklus. Das Konstrukt ist aber in der Lage, den mutanten *CycA* Phänotyp zu retten (unveröffentlichte Daten von Axel Dienemann). In den *rcal* homozygoten Embryonen beinhalten die HA-CycA exprimierenden Segmente mehr Zellen als die benachbarten Segmente (Abb. 3.12 B und D). Durch eine Erhöhung der *CycA* Dosis ist es also möglich, die Mitose 16 in den *rcal* mutanten Embryonen wiederherzustellen. Im Gegensatz dazu ist die Erhöhung der *CycB* Dosis nicht ausreichend, um die Mitose 16 in den Mutanten wiederherzustellen (Abb. 3.13).

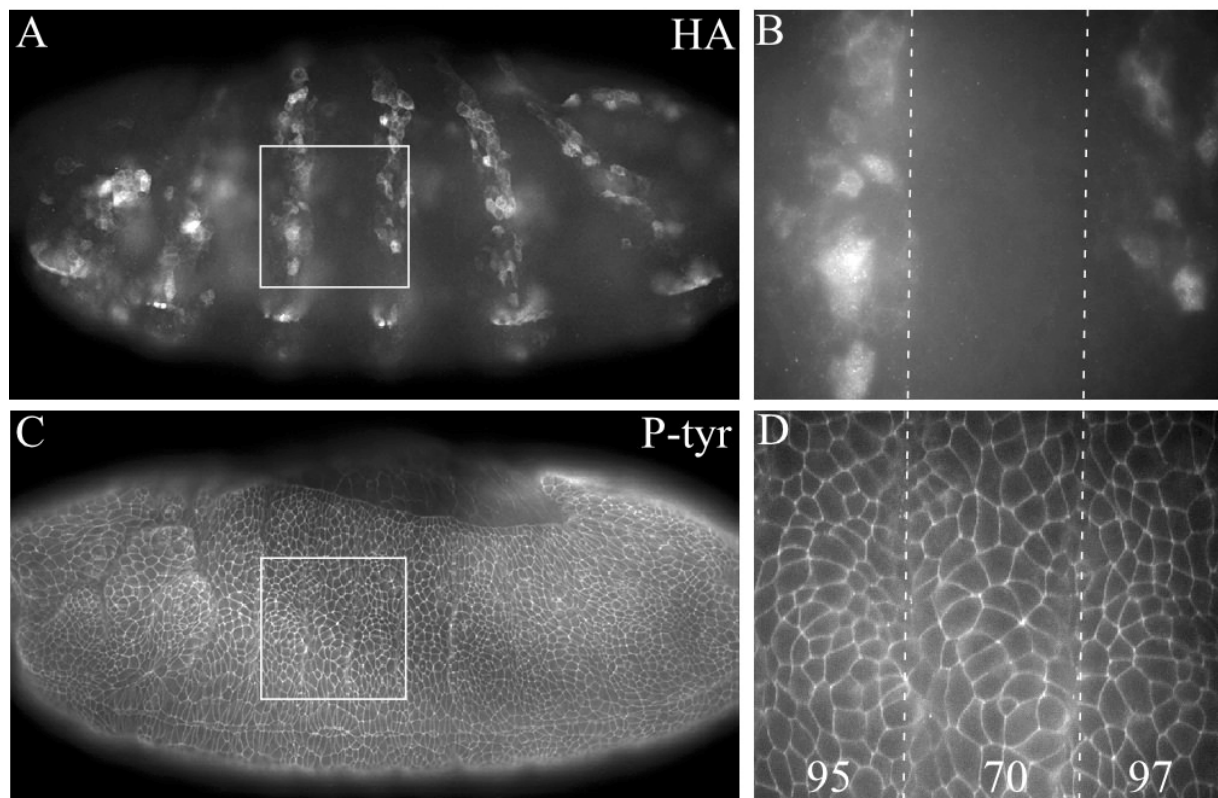


Abb. 3.12 Die Überexpression von *CycA* kann die Mitose 16 in *rcal* Mutanten wiederherstellen (A-D) *rcal* Mutante im Stadium 13, die *HA-CycA*, aktiviert durch *prd*-Gal4, in jedem zweiten Segment exprimiert. Der Embryo wurde mit einem HA- (A und B) und einem P-tyr Antikörper (C und D) gefärbt. Die Zelldichte in den Segmenten, die *HA-CycA* exprimieren, ist größer als in den benachbarten Segmenten (D).

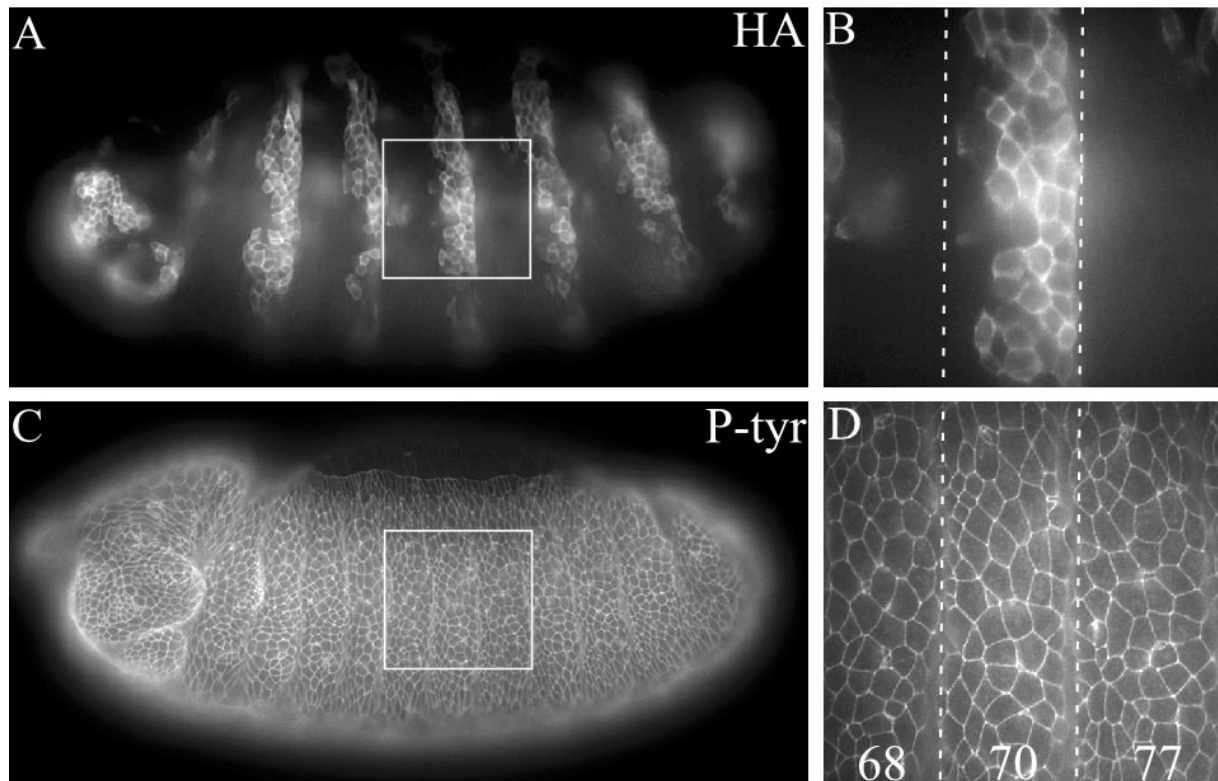


Abb. 3.13 CycB ist nicht in der Lage die Mitose 16 in *rcal* Mutanten wieder herzustellen (A-D) *rcal* Mutante im Stadium 13, die *HA-CycB*, aktiviert durch *prd-Gal4*, in jedem zweiten Segment exprimiert. Der Embryo wurde mit einem HA- (A und B) und einem P-tyr Antikörper (C und D) gefärbt. Die Zelldichte in den Segmenten, die *HA-CycB* exprimieren, unterscheidet sich nicht von der benachbarter Segmente (D).

Das verbleibende CycA in den *rcal* mutanten Embryonen ist hauptsächlich im Zytoplasma zu finden (Abb. 3.7 F). Da Rca1 im Kern lokalisiert ist, legt diese Beobachtung die Vermutung nahe, dass es besonders dort den Abbau von CycA verhindert. Ein ausschließlich im Kern lokalisiertes CycA würde dann eventuell zu einer schlechteren Rettung der Mitose 16 in *rcal* Mutanten führen als WT-CycA. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde- erneut mittels des UAS / Gal4 Systems- *HA-NLS-CycA* in jedem zweiten Segment in *rcal* homozygoten Embryonen exprimiert (Abb. 3.14). Die Expression von NLS-CycA ist, ebenso wie die von wildtypischem CycA, in der Lage, den mutanten *CycA* Phänotyp zu unterdrücken (unveröffentlichte Daten von Axel Dienemann). In homozygoten *rcal* Embryonen führt die Expression dieses konstitutiv im Kern lokalisierten Proteins zur Rettung der Mitose 16 (Abb. 3.14 D und H). Die Zellzahlen im Stadium 13 zeigen, dass die NLS-Version die Mitose 16 sogar effektiver wieder herstellen kann als *HA-CycA* (vergleiche auch mit Abb. 3.12 D). Interessanterweise ist von der NLS-Version in diesem späten Stadium aber nur noch sehr wenig Protein vorhanden, das ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 3.14 B,

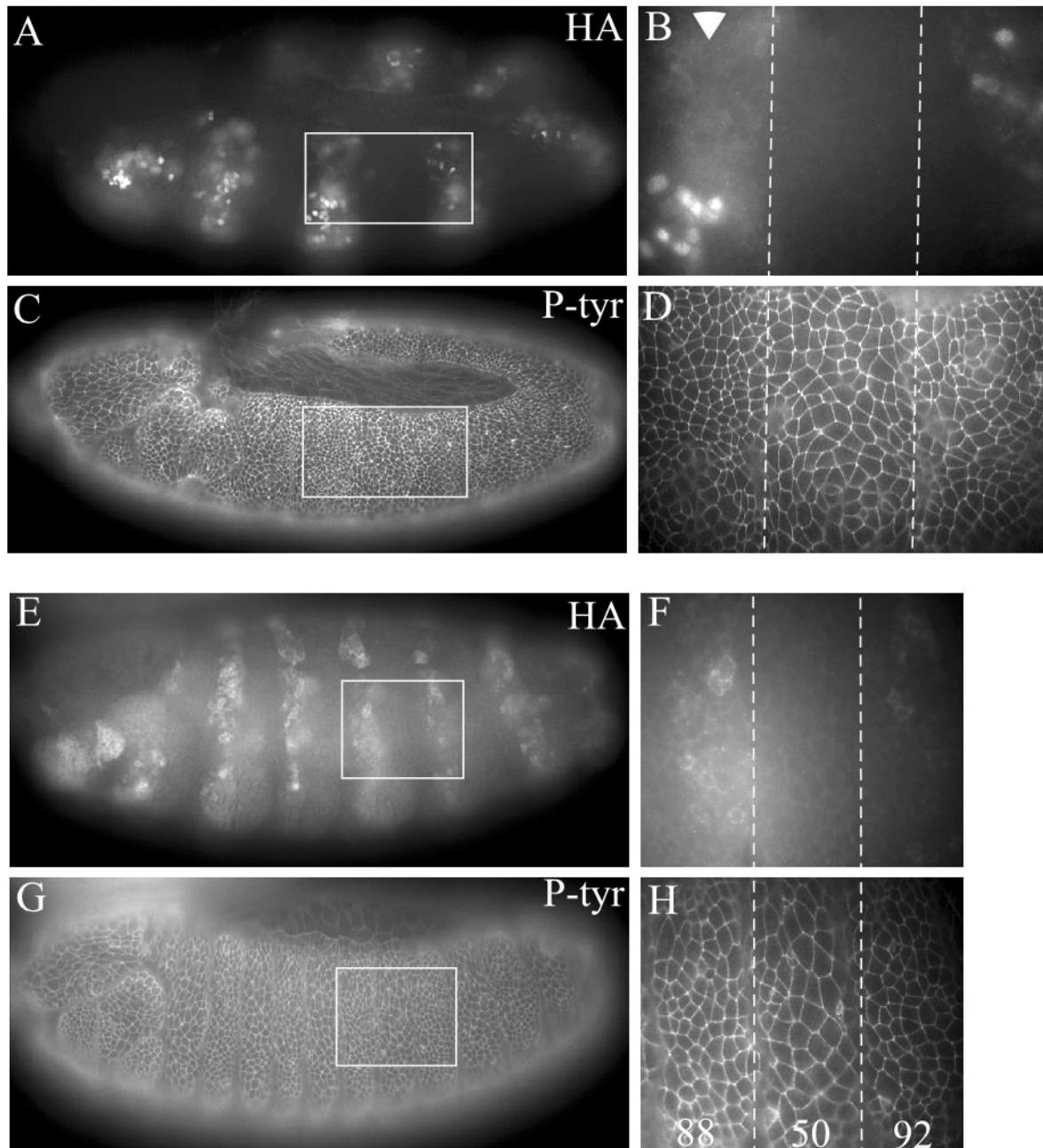


Abb. 3.14 NLS-CycA kann ebenfalls die Mitose 16 in *rcal* Mutanten wieder herstellen (A-H) *rcal* Mutanten, die *HA-NLS-CycA*, aktiviert durch *prd-Gal4*, in jedem zweiten Segment exprimieren. Im Stadium 11 ist die HA-NLS-CycA Expression noch gut zu erkennen. Allerdings zeigen mehr oder wenige nur noch die Zellen der ventralen Epidermis die Kernlokalisierung dieser CycA Version (HA-Färbung in A und B). In dorsalen Regionen ist weniger und hauptsächlich zytoplasmatisches CycA zu sehen (Pfeilkopf in B). Die P-tyr Färbung dieses Embryonen (C und D) zeigt, dass diese dorsalen Zellen die Mitose 16 schon durchlaufen haben. Sie befinden sich schon in der G1-Phase des Zellzyklus 17. In älteren Embryonen des gleichen Genotyps wird deutlich, dass HA-NLS-CycA exprimierende Segmente fast doppelt so viele Zellen wie die benachbarten Segmente enthalten (H). Die HA-Färbung dieses Embryos lässt erkennen, dass in diesem Stadium, trotz der NLS Sequenz des Transgens, nur noch zytoplasmatisches HA-NLS-CycA zu finden ist (F).

vergleiche auch mit 3.12 B). In Embryonen im frühen Stadium 11 oder jünger, ist das NLS-CycA jedoch in hoher Konzentration nur im Kern vorhanden (keine Bild und 3.14 B). Es scheint also ab einem bestimmten Zeitpunkt sehr stark abgebaut zu werden.

3.8 Die Funktion von *Rca1* wird auch in der späteren Entwicklung benötigt

Die Defekte in den *rca1* Mutanten treten im Stadium 11, kurz vor der Einführung der ersten G1-Phase im Embryo, auf. Um zu untersuchen, ob die Funktion von *Rca1* nur zu diesem Zeitpunkt oder auch in der späteren Entwicklung benötigt wird, wurden *rca1* mutante Zellen in Imaginalscheiben induziert. Eine Standardmethode dafür ist die FLP / FRT vermittelte mitotische Rekombination ((Xu and Rubin, 1993), siehe auch Abschnitt 2.3.2). In *rca1* heterozygoten Larven (*FRT40A, rca1 / FRT40A, 2xGFP*) wurde die Flipase mittels Hitzeschock induziert. Homozygote *rca1* Zellen, erkennbar am Fehlen des GFP Markers, wurden anschließend in Flügelimaginalscheiben von Larven im dritten Larvenstadium analysiert. Die induzierten *rca1* Klone (GFP negativ) waren immer kleiner als die dazugehörigen Schwesterklone (GFP homozygot). In Abbildung 3.15 C sind zwei solcher Klone mit Pfeilköpfen markiert und ihre Schwesterklone mit einer weißen gestrichelten Linie umrandet. In Kontrollexperimenten, besaßen die GFP negative Klone, ohne die *rca1* Mutation, immer die gleiche Größe, wie ihre Schwesterklone (Abb. 3.16). *rca1* Klone haben folglich einen Wachstumsnachteil gegenüber den WT Zellen. Die Tatsache das Klone zu finden sind verdeutlicht andererseits, dass *rca1* mutante Zellen sich noch einige Male teilen können, bevor sie die Proliferation einstellen. Es waren auch GFP homozygote Klone ohne dazugehörige *rca1* Klone zu finden (Abb. 3.15 C, schwarz gestrichelte Linie). In diesem Fall haben also die WT-Zellen die *rca1* mutanten Zellen sogar ganz verdrängt. CycA Antikörperfärbungen an solchen Imaginalscheiben zeigen, dass in den mutanten Zellen weniger CycA als in den WT Zellen vorhanden ist (Abb. 3.15 E, F und H). Außerdem erscheinen die Zellen in den *rca1* Klonen größer als die sie umgebenden Zellen. Interessanterweise sind die Kerne der mutanten Zellen vergrößert und besitzen mehr DNA als benachbarte WT Zellen (Abb. 3.15 F und I). Diese Merkmale findet man auch in Zellen, die ihre DNA mehr als einmal und ohne dazwischen liegende Mitose repliziert haben. Solche Zellzyklen werden als Endozyklen bezeichnet. Der Verlust von *rca1* führt also zur Umwandlung von einem mitotischen Zellzyklus in eine Endozyklus.

Dieses Experiment zeigt außerdem, dass *rca1* nicht nur während der Embryogenese benötigt wird, sondern generell in sich teilenden Zellen.

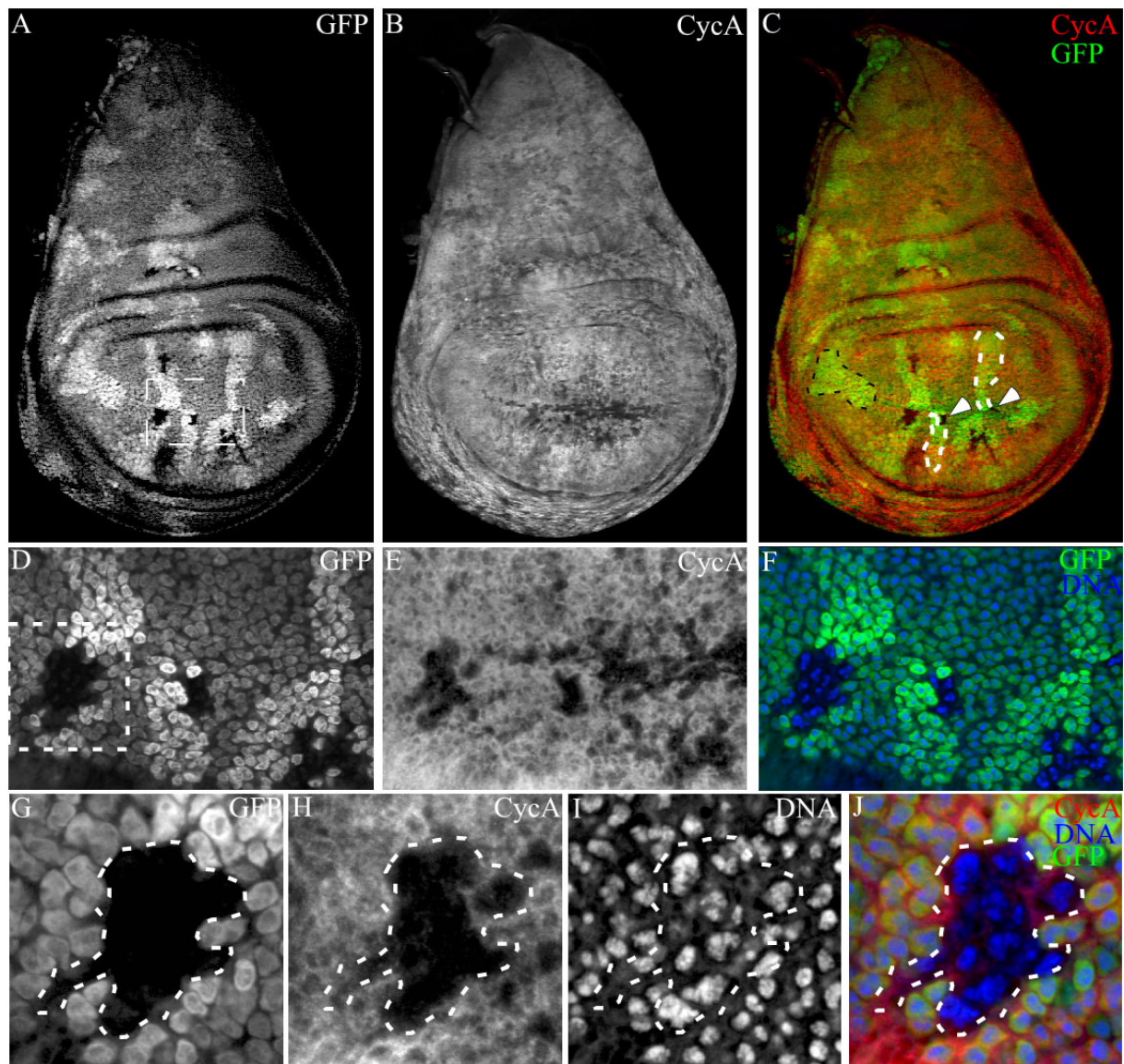


Abb. 3.15 Die Funktion von Rca1 wird auch in der späteren Entwicklung benötigt (A-J) Flügelimaginalscheiben mit *rca1* mutanten Klonen, die durch FLP / FRT vermittelte Rekombination induziert wurden. Die FLP Rekombinase befand sich unter der Kontrolle eines Hitzeschockpromotors. Die Klone wurden 48 Stunden nach Eiablage induziert und 120 Stunden nach Eiablage analysiert. *rca1*^{-/-} Klone zeigen keine GFP-, die dazugehörigen Schwesterklone dagegen eine starke GFP- Fluoreszenz (A, D und G). Die GFP negativen Klone (Pfeilköpfe in C) sind kleiner als die dazugehörigen Schwesterklone (gestrichelte, weiße Linie in C). Manche GFP positiven Klone haben keine GFP-negativen (*rca1*^{-/-}) Schwesterklone mehr (schwarze, gestrichelte Linie in C). CycA Färbung der gleichen Imaginalscheibe (B, E und H) zeigt, dass die *rca1*^{-/-} Klone weniger CycA besitzen als die sie umgebenden WT-Zellen (E und H). Die Klone enthalten aber mehr DNA als die benachbarten Zellen (I und J).

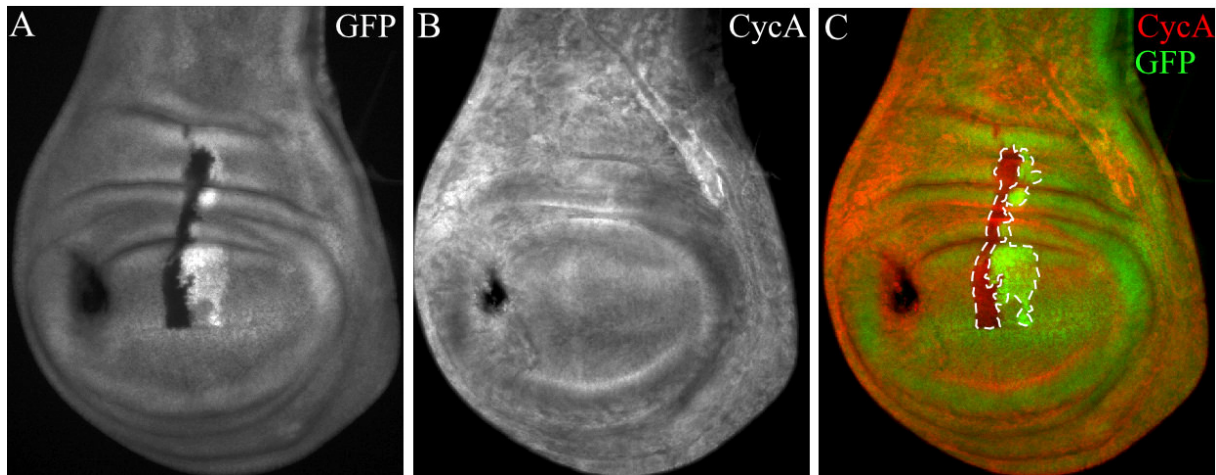


Abb. 3.16 GFP-negative Kontrollklone

(A-C) WT-Flügelimaginalscheibe mit einem GFP-negativen Klon, dessen Zellen ansonsten aber wildtypisch sind, und dem dazugehörigen Schwesterklon (gestrichelte, weiße Linien in C). Beide Klone sind gleich groß und zeigen keinen Unterschied in der CycA Konzentration (B). Die Scheibe wurde während der Präparation leicht beschädigt (dunkler Fleck links in A-C).

3.9 Die Überexpression von Rca1

Wie schon in Abb. 3.11 gezeigt, hat die Überexpression von HA-Rca1 im Stadium 11 der Embryogenese keinen Einfluss auf den Zellzyklusverlauf oder die Dynamik des CycA Abbaus. In dem oben beschriebenen Experiment wurde als Aktivatorlinie der *prd*-Gal4 Stamm benutzt. Diese Linie exprimiert Gal4 allerdings nur in den Stadien 10-13 (ab Zellzyklus 15), mit der stärksten Expression im Stadium 11 (Zellzyklus 16). Um auch in früheren Stadien die Auswirkungen der Rca1 Überexpression zu untersuchen, wurde in syncytielle Embryonen *Rca1* mRNA injiziert. Nach einer zweistündigen Erholungsphase der Embryonen wurde auch hier die CycA Expression und der Zellzyklusverlauf analysiert. Abbildung 3.17 zeigt, dass selbst in Regionen mit hoher Rca1 Konzentration keine Abnormalität im CycA Abbaumuster zu erkennen ist (vergleiche auch mit Abb. 3.6 A).

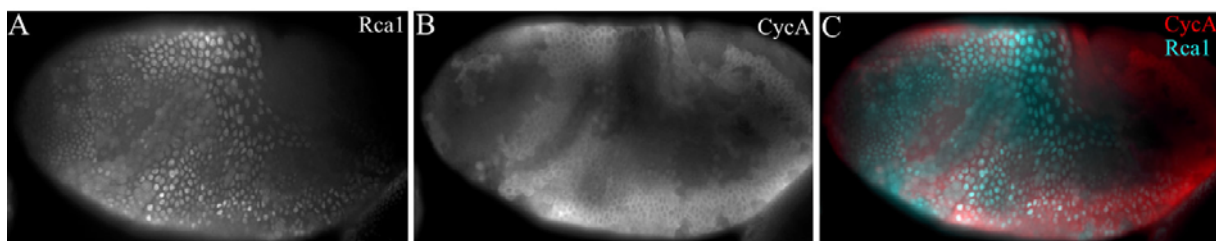


Abb. 3.17 Rca1 Überexpression während der frühen Embryogenese hat keinen Auswirkungen auf die CycA Stabilität

(A-C) WT-Embryonen im Stadium 8, in die vor der Zellularisierung *Rca1* mRNA injiziert wurde. Wie in der Rca1-Färbung (A) zu erkennen ist, wurde die RNA hauptsächlich in der vorderen Hälfte des Embryos translatiert. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf den CycA Abbau (B). C zeigt eine Überlagerung der Bilder A und B, mit CycA in rot und Rca1 in blau.

In Abbildung 3.18 ist zu sehen, dass das gleiche auch auf den Zellzyklus zutrifft. Selbst in Anwesenheit großer Mengen Rca1 findet man Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien (Abb. 3.18 C-E). Gleichzeitig zeigt sich hier, dass Rca1 zu diesem Zeitpunkt in allen Zellzyklusstadien stabil ist. Zum gleichen Ergebnis führten auch Experimente, in denen das UAS-*HA-rca1* Konstrukt mit einer maternalen Gal4 Linie aktiviert wurde (kein Bild).

Um herauszufinden, ob die ubiquitäre Expression von HA-Rca1 über einen längeren Entwicklungszeitraum eine Auswirkung auf die oben genannten Aspekte hat, wurde der UAS-*HA-rca1* Stamm mit einem *armadillo*-Gal4 (*arm*-Gal4) Stamm gekreuzt. Diese Aktivatorlinie ist in allen embryonalen Geweben und den Imaginalscheiben exprimiert (Sanson et al., 1996).

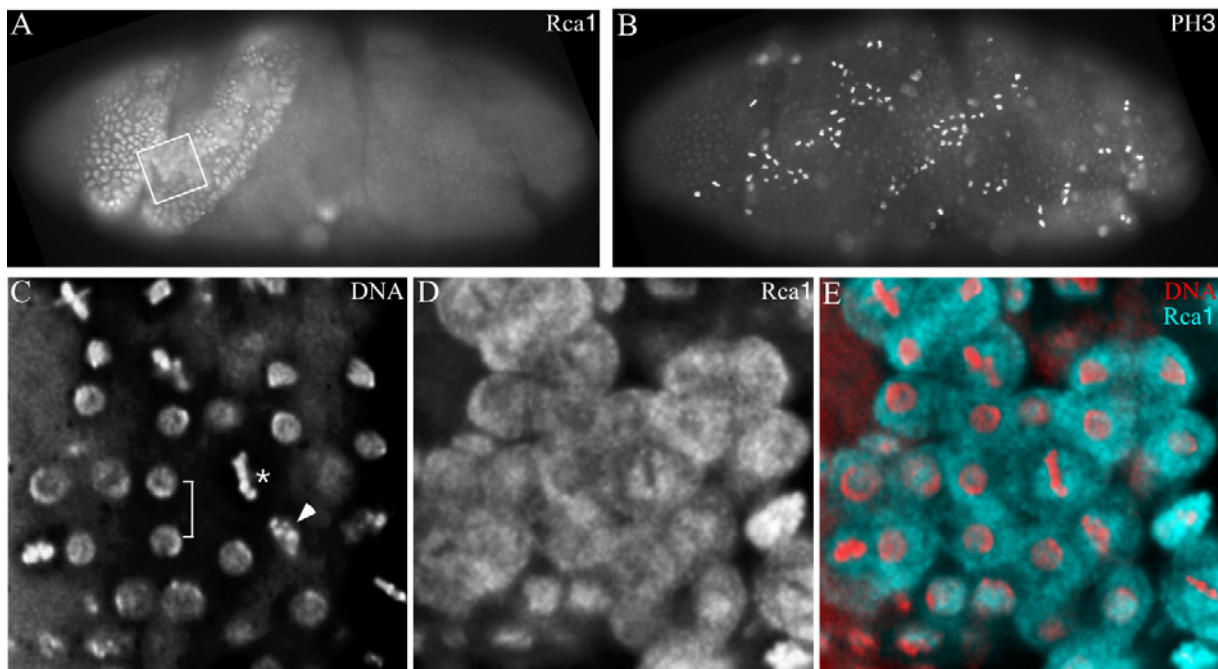


Abb. 3.18 Rca1 Überexpression während der frühen Embryogenese hat keine Auswirkungen auf den Zellzyklusverlauf

(A-E) WT-Embryonen im Stadium 8, in die vor der Zellularisierung *Rca1* mRNA injiziert wurde. Die *Rca1* mRNA wurde nur in einem anterioren Abschnitt des Embryos translatiert (Rca1-Färbung in A). Die DNA-Färbung in C zeigt, dass selbst in Bereichen mit hoher Rca1 Konzentration Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien zu finden sind (der Pfeilkopf markiert eine Zelle in der Prophase, der Stern eine Zelle in der Metaphase und die Klammer eine Telophasenzelle). Während all dieser mitotischen Stadien ist Rca1 stabil (D). E zeigt eine Überlagerung der Bilder C und D mit DNA in rot und Rca1 in blau. Der gezeigte Embryo wurde durch die Fixierung und anschließende manuelle Devittellenisierung leicht beschädigt.

Die stärkste und gleichmäßigste Expression findet man im Stadium 10, wenn die meisten Zellen im Zellzyklus 15 sind (Abb. 3.19 A). Der Ablauf des Proliferationsprogramms, wie auch das CycA Expressionsmuster ist jedoch unverändert (Abb. 3.19 B). Auch hier konnte ein Abbau von HA-Rca1 während eines bestimmten Zellzyklusstadiums nicht festgestellt werden. Die ersten Anzeichen einer HA-Rca1 Proteolyse sind in Embryonen im Stadium 11 zu erkennen (Abb. 3.19 C). Dieses Abbaumuster gleicht dem von CycA (Abb. 3.19 C-F). Im Stadium 13, wenn die epidermalen Zellen alle die G1 Phase des Zyklus 17 erreicht haben, sind Rca1 und CycA kaum noch vorhanden (Abb. 3.19 G und H).

Um den Rca1 Abbau näher zu untersuchen wurde eine Region in einem Embryo untersucht, der sich im Zellzyklus 16 befindet (Abb. 3.19 I-K). Auf der rechten Seite dieser Region befinden sich Zellen in verschiedenen mitotischen Stadien (Abb. 3.19 J). In allen Zellen ist noch HA-Rca1 vorhanden (Abb. 3.19 I), wohingegen CycA in einigen schon abgebaut wurde (Abb. 3.19 K). Die gestrichelte, weiße Linie in Abbildung 3.19 I-K markiert eine Gruppe von Zellen, deren DNA dekondensiert ist und die kleiner als die mitotischen Zellen rechts daneben sind (Abb. 3.19 I und J). Diese Zellen haben demnach die Mitose 16 schon durchlaufen und befinden sich in der G1-Phase des Zellzyklus 17. In diesen Zellen ist nur noch wenig CycA zu erkennen (Abb. 3.19 K), Rca1 ist allerdings noch in einigen vorhanden (Abb. 3.19 I).

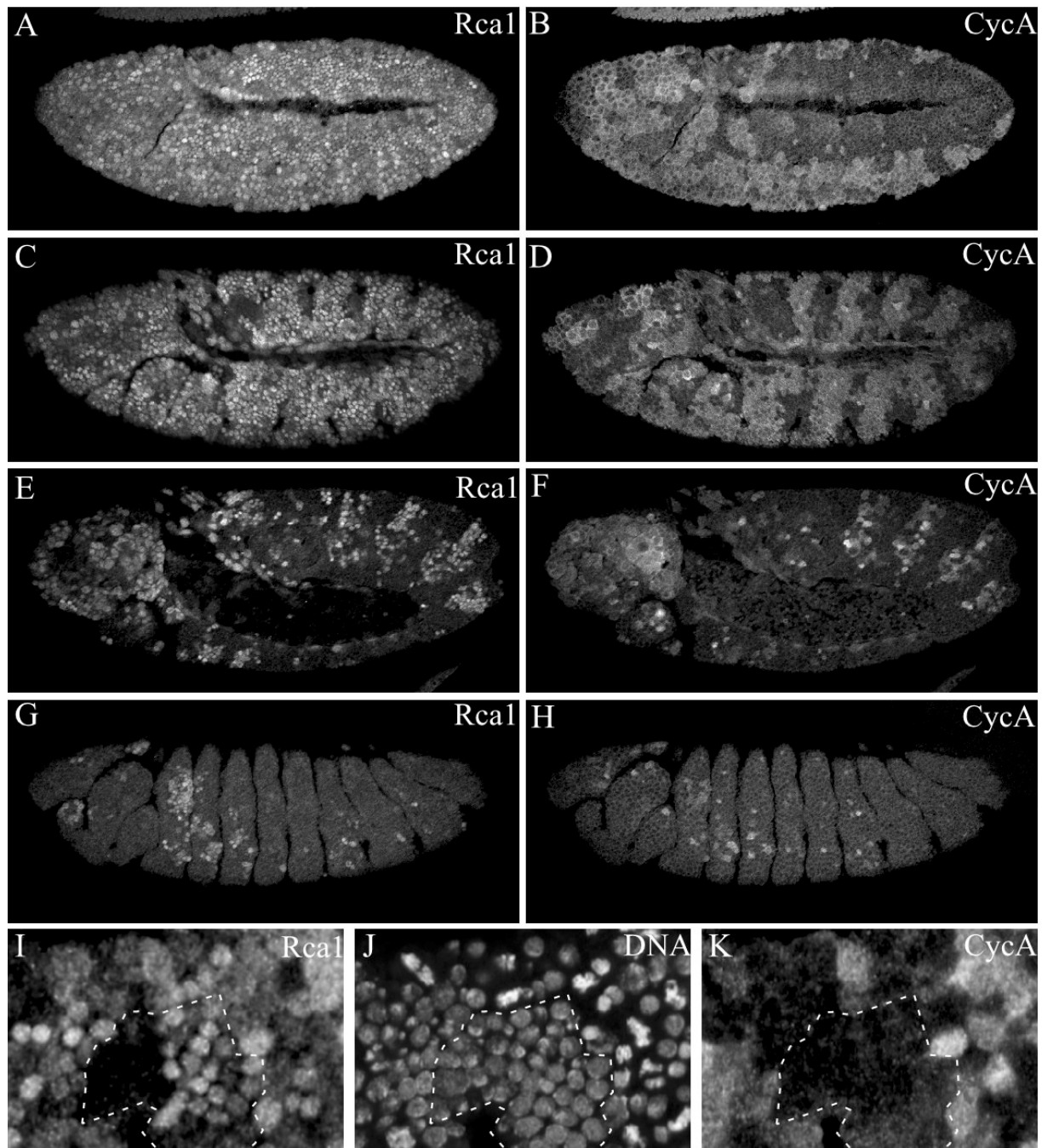


Abb. 3.19 Die ubiquitäre Überexpression von HA-Rca1 hat keinen Effekt während der Embryogenese (A-K) WT-Embryonen, die *HA-rca1* unter *arm-Gal4* Kontrolle überexprimieren. Die stärkste und gleichmäßigste Rca1 Expression findet man im Zyklus 15 (Stadium 10, A). Die CycA Expression wird davon nicht beeinflusst (B). Ab dem Zyklus 16 ist Rca1 Abbau zu beobachten (C und E). Dieses Abbaumuster ähnelt dem von CycA (D und F). Im Stadium 13 ist in den epidermalen Zellen kein Rca1 und CycA mehr zu erkennen. Die beiden Proteine sind nur noch in Zellen des sich entwickelnden Nervensystems zu sehen (G und H).

I-K zeigt eine Vergrößerung einer Region aus einem Embryo im Zyklus 16. Auf der rechten Seite sind Zellen in verschiedenen mitotischen Stadien zu erkennen (J). Rca1 ist in allen diesen Zellen vorhanden (I). Die gestrichelte, weiße Linie markiert einen Bereich bestehend aus G1 Zellen im Zyklus 17 (I-K). In allen diesen Zelle ist nur noch wenig CycA vorhanden (K), aber Rca1 ist in einem Teil der Zellen noch gut zu erkennen (I).

Das gleiche Rca1 Abbaumuster ist in einem WT-Embryo zu erkennen der ein Rca1-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des Ubiquitin Promotors exprimiert (Abb. 3.20). Ab dem Stadium 13 ist dieses Fusionsprotein nur noch in Zellen des sich entwickelnden Nervensystems (Abb. 3.20 H) und in endoreduplizierenden Geweben wie den Speicheldrüsen zu finden (kein Bild). Die Rca1-GFP Expression hat keine Auswirkungen auf die

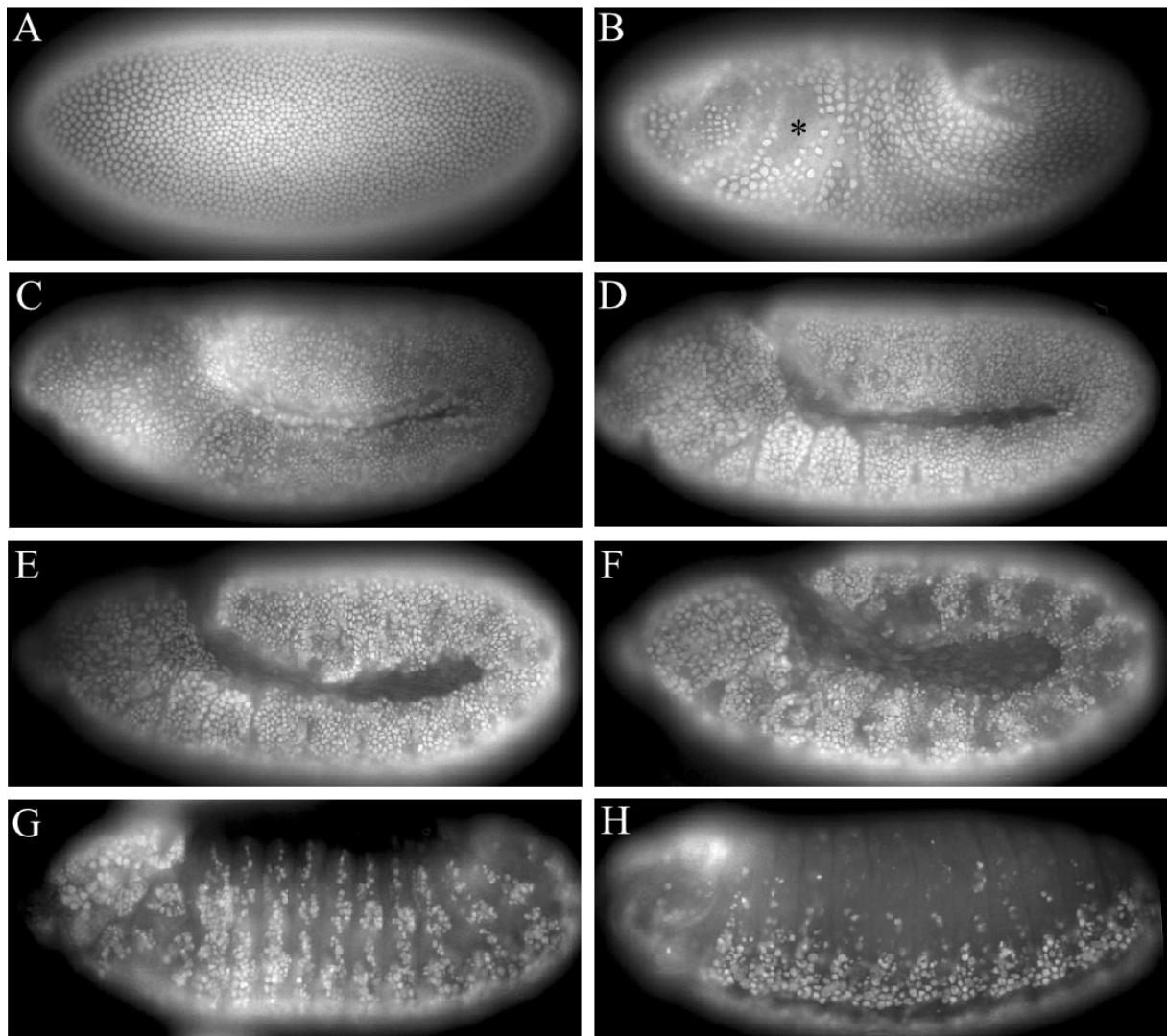


Abb. 3.20 Die Expression eines Rca1-GFP Fusionsproteins unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors

(A-H) WT-Embryonen, die *rca1-GFP* unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors exprimieren. Die Embryonen wurden in verschiedenen Stadien fixiert und mit einem GFP-Antikörper gefärbt. Das Rca1-GFP Fusionsprotein ist schon in jungen Embryonen stark und gleichmäßig exprimiert (A, Stadium 3). Es zeigt eine eindeutige Kernlokalisierung und ist nur während der Mitose in der gesamten Zelle verteilt (B, Stadium 8, der Stern markiert die mitotische Domäne 5). Die ubiquitäre Expression dieses Konstruktes ist auch im Stadium 10 (C) und 11 (D) zu beobachten. Allerdings werden im späteren Stadium 11 einige Bereiche sichtbar, in denen Rca1-GFP nicht mehr vorhanden ist (E). Das wird früh im Stadium 12 deutlicher (F), wenn die Rca1-GFP Expression in einem segmentalen Muster erscheint. Im frühen Stadium 13 ist das Fusionsprotein noch in vielen Zellen des sich entwickelnden peripheren und zentralen Nervensystems zu beobachten (G). Im späteren Verlauf dieses Stadiums beschränkt sich die Expression hauptsächlich auf das zentrale Nervensystem (H).

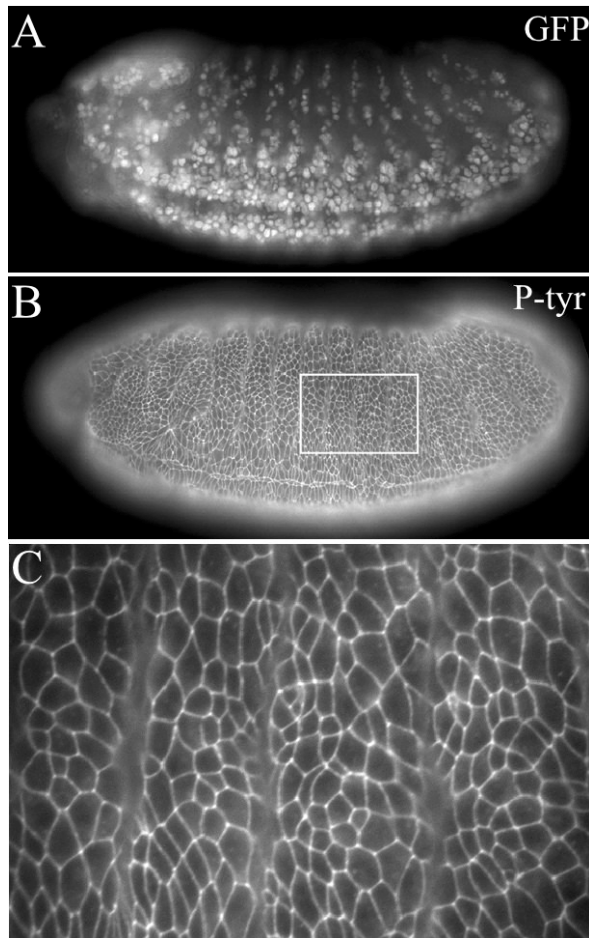


Abb. 3.21 Rca1-GFP ist nur begrenzt in der Lage die Mitose 16 in *rcal* Mutanten wieder herzustellen

(A-C) *rcal* homozygoter Embryo im Stadium 13, der *rcal-GFP* unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors exprimiert. Der Embryo wurde für GFP (A) und P-tyr (B und C) gefärbt.

Die meisten Zellen der Epidermis haben eine Größe, die typisch für die Zellgröße in *rcal* Mutanten ist. Nur vereinzelt sind kleinere Zellen zu erkennen, deren Größe vergleichbar mit WT-Zellen in diesem Stadium ist (C).

Entwicklung der Embryonen, Larven oder Puppen. Diese Rca1 Version ist allerdings nur sehr begrenzt in der Lage die Mitose 16 in *rcal* homozygoten Embryonen wieder herzustellen (Abb. 3.21, vergleiche auch mit Abb. 3.1 E).

Die Rca1 Überexpression während der Embryogenese hat also weder Auswirkungen auf den Zellzyklus, noch auf die Stabilität von CycA. Rca1 selber wird nicht während der Mitose abgebaut, sondern verschwindet allmählich in G1 Zellen.

Die Embryonen in denen HA-Rca1 mittels der *arm-Gal4* Linie exprimiert wurde, entwickelten sich bis ins Puppenstadium normal. Adulte Fliegen schlüpfen jedoch nicht (Daten nicht gezeigt). Kreuzungen zwischen dem UAS-*HA-rcal* und einem *engrailed-Gal4* (*en-Gal4*) Stamm enthielten geschlüpfte Fliegen. Diese Aktivatorlinie wird ebenfalls während der gesamten Entwicklung exprimiert, allerdings immer nur in Teilen einzelner Gewebe. Die Fliegen aus dieser Kreuzung zeigten eine Reihe verschiedener Phänotypen.

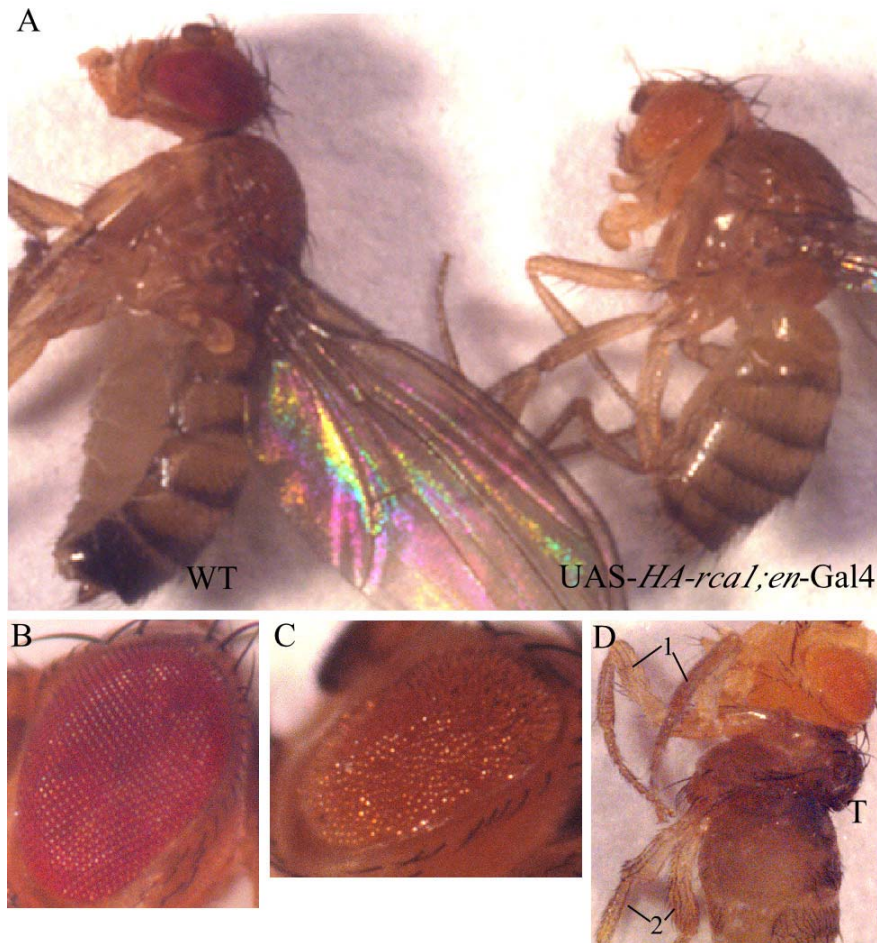


Abb. 3.22 *en-Gal4* vermittelt Überexpression von *HA-rca1* führt zu einem mutanten Phänotyp in adulten Fliegen

(A-D) Fliegen, die *HA-rca1* unter *en-Gal4* Kontrolle während ihrer gesamten Entwicklung exprimieren, zeigen verschiedene mutante Phänotypen. Alle Fliegen sind kleiner als WT-Fliegen im gleichen Alter (A). Zusätzlich zeigen die meisten mutante Phänotypen, die auf Defekte während der Imaginalscheibenentwicklung hindeuten, wie z. B. raue Augen, (C, zum Vergleich zeigt B ein WT-Auge), das Fehlen eines Beinpaars und großer Teile des Thorax (T) (D).

Alle Fliegen waren kleiner als WT Fliegen des gleichen Alters (Abb. 3.22 A). Viele zeigten zusätzlich einen rauen Augen Phänotyp (vergleiche B und C in Abb. 3.22). Bei einigen Fliegen fehlten außerdem Teile des Thorax. Abbildung 3.22 D zeigt einen extremen Phänotyp dieser letzten Kategorie. Während *Rca1* Überexpression also keine Auswirkungen in der Embryogenese hat, kann es die weitere Entwicklung durchaus stören.

3.10 Die Überexpression von Rca1 und Cyclin A verhindert die Mitose

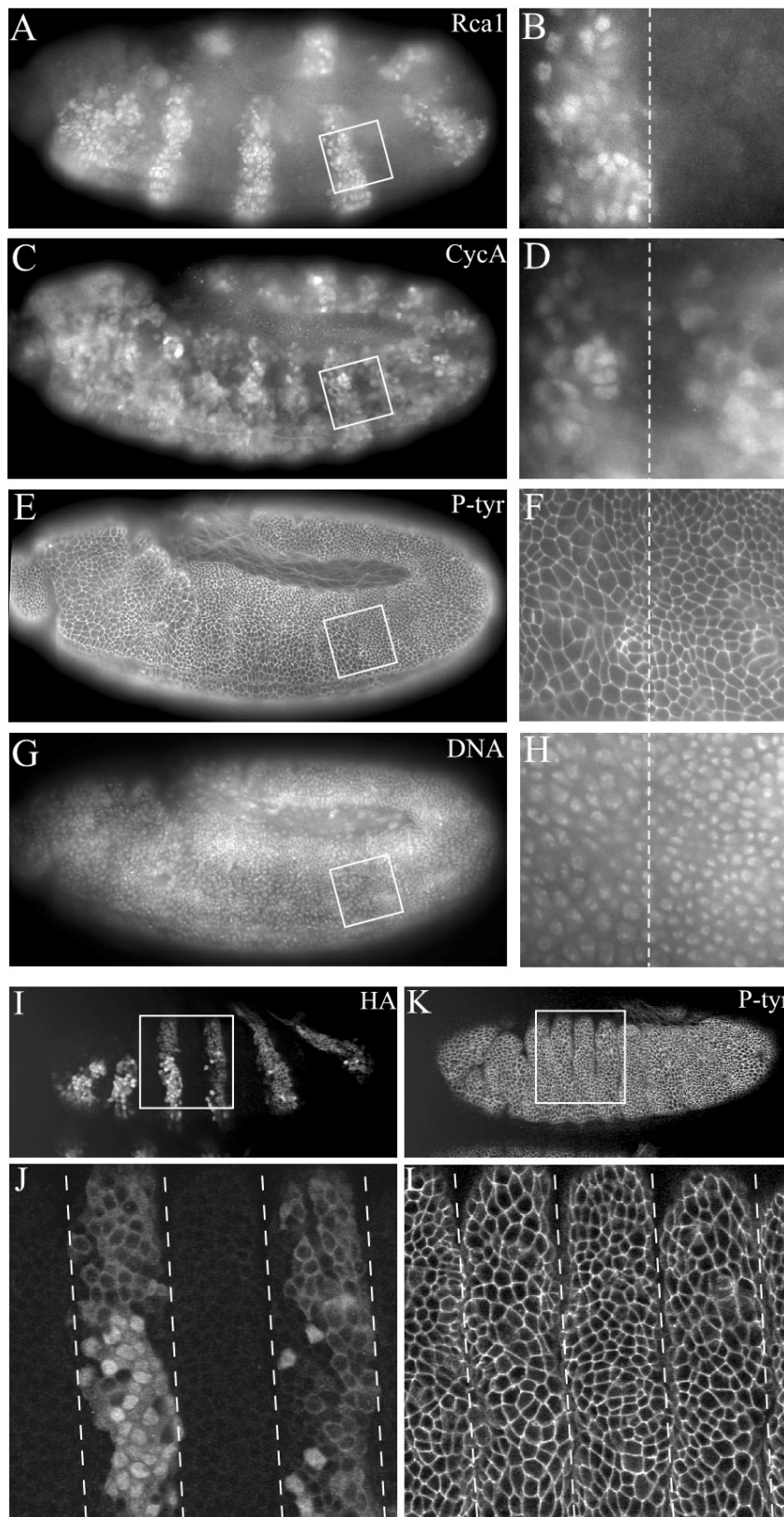


Abb. 3.23 Die Überexpression von HA-Rca1 und HA-CycA führt zu einem Ausfall der Mitose 16 (A-L) WT-Embryonen, die *HA-rca1* und *HA-CycA* unter *prd-Gal4* kontrollieren. Die Embryonen wurden entweder für Rca1 und CycA (A-D) oder für HA (I und J) gefärbt, um die Expression beider Konstrukte zu verfolgen. Die P-tyr- (E, F, K, L) und DNA-Färbungen (G und H) lassen die Zelldichte erkennen. Schon im frühen Stadium 12 (A-H) kann man sehen, dass die Zellen, die Rca1 und CycA überexprimieren (B und D) die Mitose 16 nicht durchlaufen haben (F und H). Die DNA ist dekontensiert, was zeigt, dass die Zellen nicht in einem mitotischen Stadium arretiert sind. Der Unterschied in der Zelldichte wird im Stadium 13 noch deutlicher (L). Die zytoplasmatische HA-Färbung in I und J stellt die HA-CycA- und die Kernfärbung die HA-Rca1 Expression dar.

Wie schon in den oberen Abschnitten erwähnt hat sowohl die Überexpression von HA-Rca1 als auch die von HA-CycA im WT keine Auswirkungen auf den Zellzyklus. Werden aber beide Transgene zusammen unter *prd*-Gal4 Kontrolle exprimiert, führt das ebenfalls zu einem Ausfall der Mitose 16 in den entsprechenden Zellen. Dieser Phänotyp ist nicht vollkommen penetrant, was heißt, dass einige Embryonen die Überexpression beider Proteine tolerieren können und die Mitose 16 durchlaufen. In den Embryonen, in denen das nicht der Fall ist, kann man den Arrest schon kurz nach dem die nicht-exprimierenden Zellen die Mitose durchlaufen haben, erkennen (Abb. 3.23 A-H). An der DNA-Konfiguration, der arretierten Zellen kann man kein spezifisches mitotisches Stadium feststellen (Abb. 3.23 G und H). Im Stadium 13 wird die unterschiedliche Zelldichte zwischen benachbarten Segmenten besonders deutlich (Abb. 3.23 I-L).

Die Co-Expression von Rca1 und CycA kann also die Mitose 16 verhindern.

3.11 Rca1 kann den Effekt der Überexpression von Fizzy-related aufheben

Der vorzeitige Abbau der mitotischen Cycline in den *rca1* Mutanten wird in der späten Interphase 16 initiiert, kurz bevor die Zellen normalerweise in die Mitose eintreten würden. Im WT sind die Cycline jedoch während der Interphase stabil und werden erst im Verlauf der Mitose abgebaut (Edgar et al., 1994). Der CycA Abbau beginnt in der Metaphase und wird bis in die G1-Phase aufrechterhalten (Lehner and O'Farrell, 1989). Die Mechanismen hierfür sind noch wenig untersucht. Genetische Untersuchungen zeigen allerdings, dass die zwei Co-Faktoren des APCs, Fizzy (Fzy) und Fizzy-related (Fzr), für diesen Abbau benötigt werden. *fzy* wird während der gesamten Embryogenese exprimiert, wohingegen erhöhte *fzr* Expression erst im Stadium 11 festzustellen ist. In *fzy* Mutanten arretieren die ektodermalen Zellen in der Metaphase des Zellzyklus 16, mit einer großen Menge an CycA (Dawson et al., 1995; Sigrist et al., 1995). *fzr* Mutanten sind nicht in der Lage den Cyclin Abbau während der G1-Phase aufrecht zu erhalten und durchlaufen deshalb einen zusätzlichen siebzehnten Zellzyklus (Sigrist and Lehner, 1997). Die Überexpression von *fzy* hat keine Auswirkungen auf den Zellzyklus oder die Cyclin Stabilität ((Sigrist and Lehner, 1997) und eigene Beobachtungen).

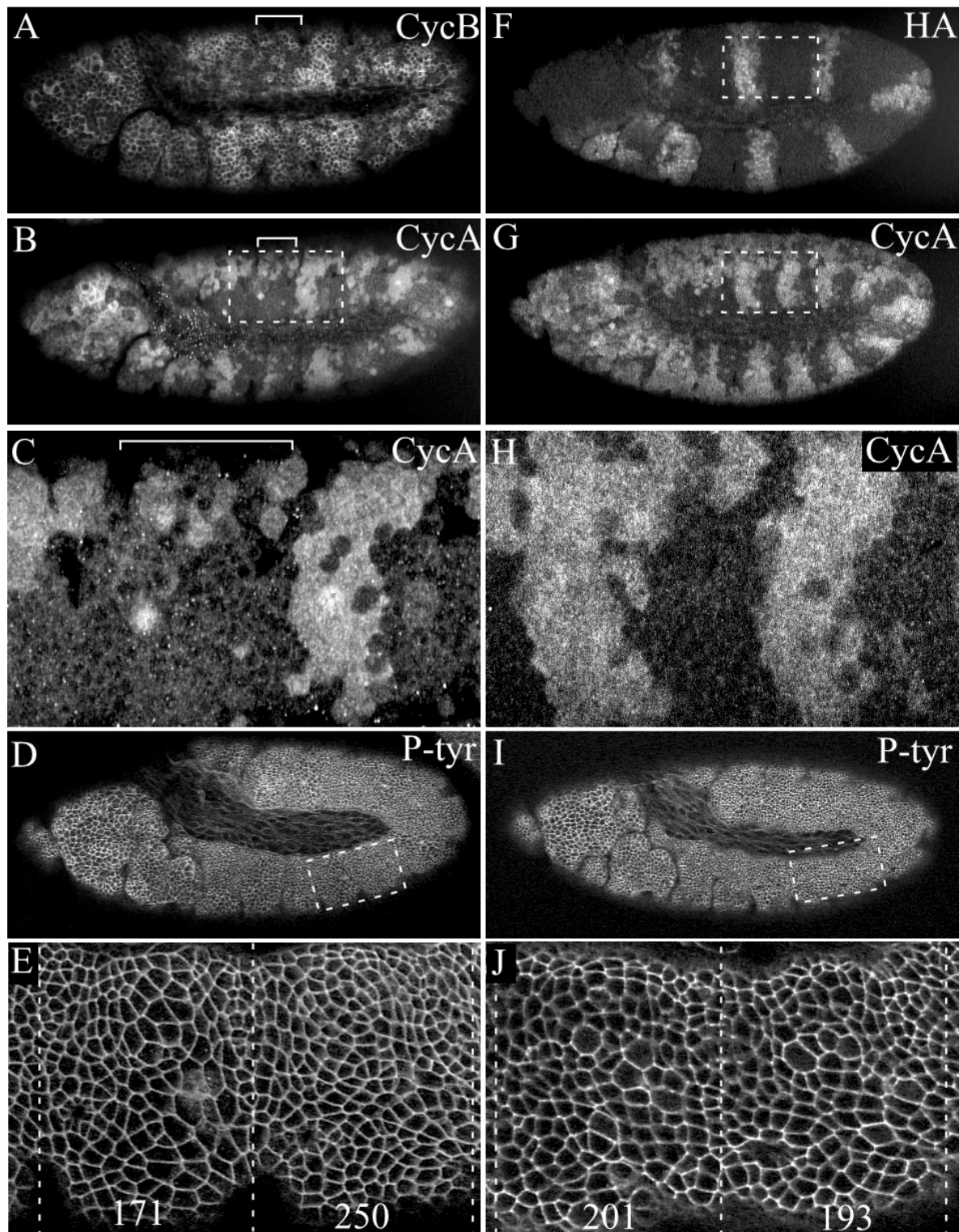


Abb. 3.24 HA-Rca1 kann den Effekt der Überexpression von Fizzy-related aufheben

(A-E) WT-Embryonen, in denen *fzr* mittels der *prd-Gal4* Linie überexprimiert wurde. Die Klammer markiert ein Segment in dem Fzr überexprimiert wird. Im Stadium 11 kann ein vorzeitiger Abbau von CycB (A) und CycA (C und D) in den Segmenten, die Fzr überexprimieren, beobachtet werden. Das führt dazu, dass die meisten Zellen in diesen Segmenten die Mitose 16 nicht durchlaufen können (Stadium 12, D und E).

(F-J) In Embryonen, die *HA-rcal* und *fzr* unter *prd-Gal4* Kontrolle überexprimieren (HA-Färbung in F markiert die exprimierenden Segmente), ist kein vorzeitiger CycA Abbau zu beobachten (G und H). Im Stadium 12 weisen alle Segmente ähnliche Zellzahlen auf (J).

Dagegen führt die Überexpression von *fzr* zu einem vorzeitigen Abbau der mitotischen Cycline (Sigrist and Lehner, 1997). Die Überexpression von *fzr* unter der Kontrolle der *prd-Gal4* Aktivatorlinie resultiert in einem vorzeitigen Abbau der Cycline A und B in der G2-Phase des Zellzyklus 16 (Abb. 3.25 A-C). Dadurch können die Zellen nicht in die Mitose 16 eintreten und in den entsprechenden Segmenten sind weniger Zellen zu erkennen als in den benachbarten (Abb. 3.24 D und E). Dieser Phänotyp erinnert sehr stark an den *rcal* mutanten Phänotyp (vergleiche Abb. 3.24 B mit Abb. 3.9 C). Deshalb wurde untersucht, ob die zusätzliche Expression von HA-Rca1 in der Lage ist, diesen Effekt von Fzr zu unterdrücken. Zu diesem Zweck wurden *HA-rcal* und *fzr* mittels des *prd-Gal4* Stammes co-exprimiert (Abb. 3.24 F-J). In solchen Embryonen ist kein vorzeitiger Abbau von CycA zu erkennen, stattdessen sieht das Expressionsmuster wieder wildtypisch aus (Abb. 3.24 G und H). In etwas älteren Embryonen weisen alle Segmente ähnliche Zellzahlen auf. Die Mitose 16 konnte also ablaufen (Abb. 3.24 I und J). Die Überexpression von Rca1 kann demnach den Effekt der Fzr Überexpression aufheben.

3.12 *fzr* ist epistatisch über *rcal*

Fzr ist eine regulatorische Untereinheit des APCs. Deshalb kann das oben beschriebene Ergebnis in zweierlei Hinsicht interpretiert werden. Es könnte bedeuten, dass Rca1 in der Lage ist, spezifisch Fzr zu inhibieren oder aber den APC an sich. In Abwesenheit von Rca1 würde dann entweder die Fzr assoziierte APC Aktivität oder der durch andere Faktoren aktivierte APC zum vorzeitigen Abbau der mitotischen Cycline führen. Um zwischen diesen zwei Möglichkeiten unterscheiden zu können wurden *fzr; rcal* Doppelmutanten hergestellt und analysiert. Sollte Rca1 nur auf den APC, unabhängig von Fzr, wirken, würde man in diesen Mutanten den *rcal* Phänotyp erwarten. Inhibiert Rca1 normalerweise jedoch nur die Fzr assoziierte APC Aktivität, müssten die Doppelmutanten in der Lage sein, die Mitose 16 zu durchlaufen, da Fzr nicht vorhanden ist. Für dieses Experiment wurde die einzige zur Verfügung stehende *fzr* Mutation benutzt. Der Fliegenstamm Df(1)bi-D3 weist eine Deletion auf, die nicht nur *fzr*, sondern auch das Gen *hindsight* betrifft. Dieses Gen wird für das Zurückziehen des Keimstreifes benötigt, hat aber keine Funktion in der Zellzyklusregulation (Frank und Rushlow, 1996; Sigrist and Lehner, 1997). Abbildung 3.26 zeigt den Vergleich der Zelldichten zwischen WT, *rcal*, *fzr* und *fzr;rcal* Mutanten zu einem Zeitpunkt an dem die epidermalen Zellen im WT die Mitose 16 schon durchlaufen haben. In diesem Stadium haben auch die *fzr* Mutanten die Mitose 16 beendet und somit ist die Zelldichte vergleichbar mit der im WT Embryo (Abb. 3.25 G-I). Im Gegensatz dazu weisen die *rcal* Embryonen weniger

Zellen auf, da sie die Mitose nicht durchlaufen konnten (Abb. 3.25 D-F). Die *fzr;rcal* Doppelmutanten zeigen jedoch eine ähnliche Zelldichte wie der WT Embryo; diese Embryonen konnten also die Mitose 16 ausführen. In der *fzr;rcal* Doppelmutante wird der *rcal* Phänotyp demnach unterdrückt, was bedeutet, dass der vorzeitige Cyclinabbau in *rcal* Embryonen von *fzr* abhängt.

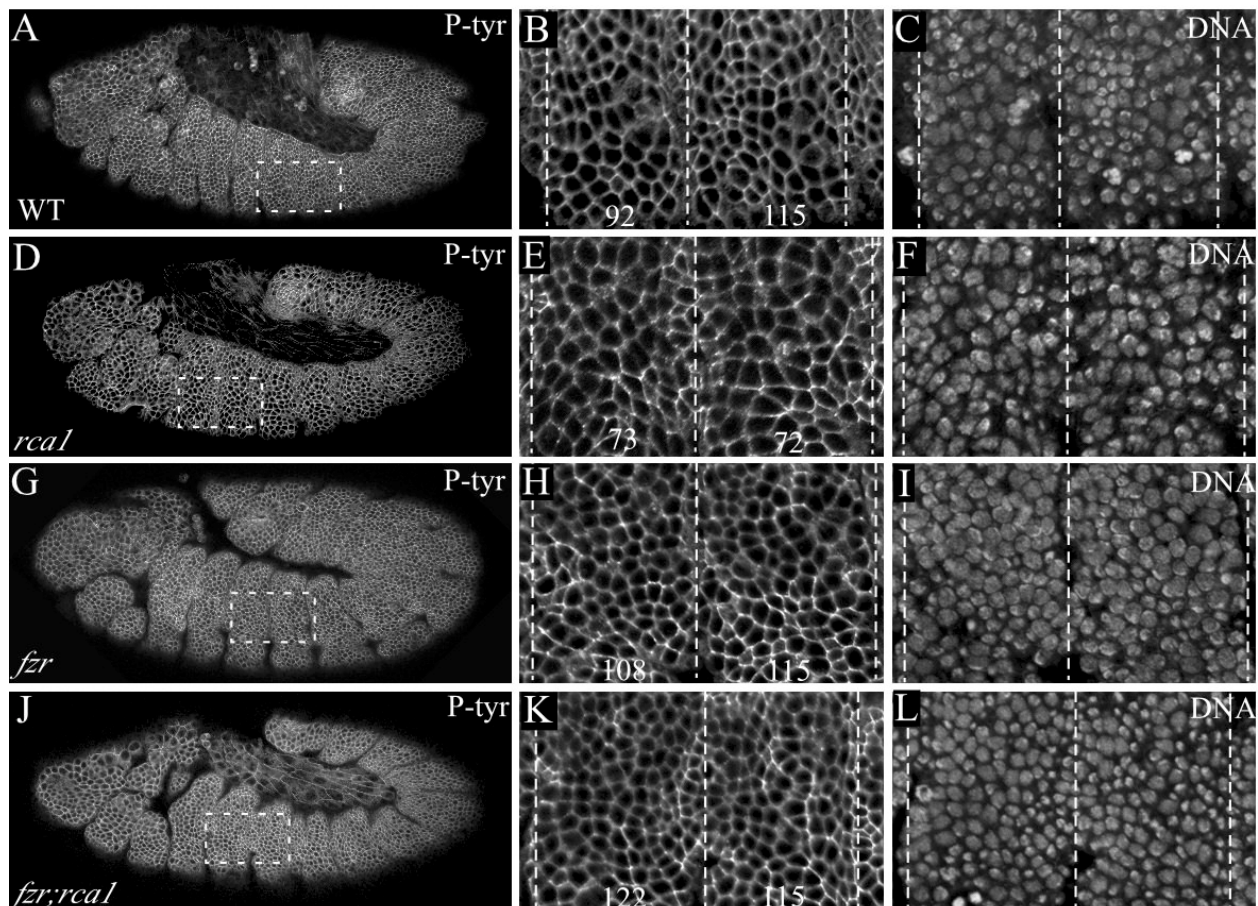


Abb. 3.25 *fzr* ist epistatisch über *rcal*

(A-J) Ein Vergleich der Zelldichten von WT (A-C), *rcal* (D-F), *fzr* (G-I) und *fzr;rcal* (J-L) Mutanten im Stadium 12. In allen Embryonen wurde die Zellmembran (P-tyr) und die DNA gefärbt. Zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen der Epidermis im WT die Mitose 16 durchlaufen und befinden sich in der G1-Phase des Zyklus 17. Es sind keine mitotischen DNA Konfigurationen zu erkennen (C). Die *fzr* Mutante zeigt eine ähnliche Zelldichte wie der WT-Embryo (H). Die *rcal* Mutante weist weniger Zellen auf, da hier die Mitose 16 nicht stattgefunden hat (E). Die Zelldichte der *fzr;rcal* Doppelmutante gleicht wieder der des WT-Embryos, die Mitose 16 konnte also ablaufen.

3.13 Cyclin E Überexpression kann die Mitose 16 in *rca1* Mutanten wieder herstellen.

Es ist bekannt, dass die Aktivität von Cdh1 (Fzr Homolog) durch Phosphorylierung negativ reguliert werden kann (siehe auch Abschnitt 1.4.3). Sowohl Cdk1 als auch Cdk2 können dabei eine Rolle spielen (Blanco et al., 2000; Jaspersen et al., 1999; Listovsky et al., 2000; Sorensen et al., 2000; Zachariae et al., 1998). In *Drosophila* ist Cyclin E, und damit CycE / Cdk2 Aktivität, bis zum Zellzyklus 16 ständig in den Zellen vorhanden. Seine Expression wird erst in der Interphase des sechzehnten Zellzyklus eingestellt, um den Zellen den Eintritt in die G1-Phase zu ermöglichen (Duronio and O'Farrell, 1995; Knoblich et al., 1994; Richardson et al., 1995). Das Verschwinden der CycE / Cdk2 Aktivität zu diesem Zeitpunkt ist essentiell für die Einführung der G1-Phase, denn die ektopische Expression von CycE lässt die Zellen direkt wieder in die S-Phase eintreten (Duronio and O'Farrell, 1995; Knoblich et al., 1994). Die Verminderung der CycE / Cdk2 Aktivität geschieht durch die Aussetzung der *CycE* Transkription und die erstmalige Expression des Cdk2 spezifischen Inhibitors *dacapo* (*dap*) (de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996) (siehe auch Abschnitt 1.4.2). Fzr kann also in der G2-Phase 16 nicht durch CycE / Cdk2 vermittelte Phosphorylierung inhibiert werden. Allerdings kann eine Überexpression von CycE zu diesem Zeitpunkt den Effekt der Fzr Überexpression aufheben (Sigrist and Lehner, 1997). Deshalb wurde untersucht, ob eine solche Überexpression von CycE auch die Mitose 16 in *rca1* homozygoten Embryonen wieder herstellen kann. Hierfür wurde CycE, mittels der *prd*-Gal4 Linie, in *rca1* Mutanten exprimiert. Abbildung 3.26 zeigt, dass die Segmente, in denen CycE überexprimiert wurde, mehr Zellen beinhalten als die benachbarten. CycE Überexpression ist also in der Lage, den *rca1* Phänotyp zu unterdrücken.

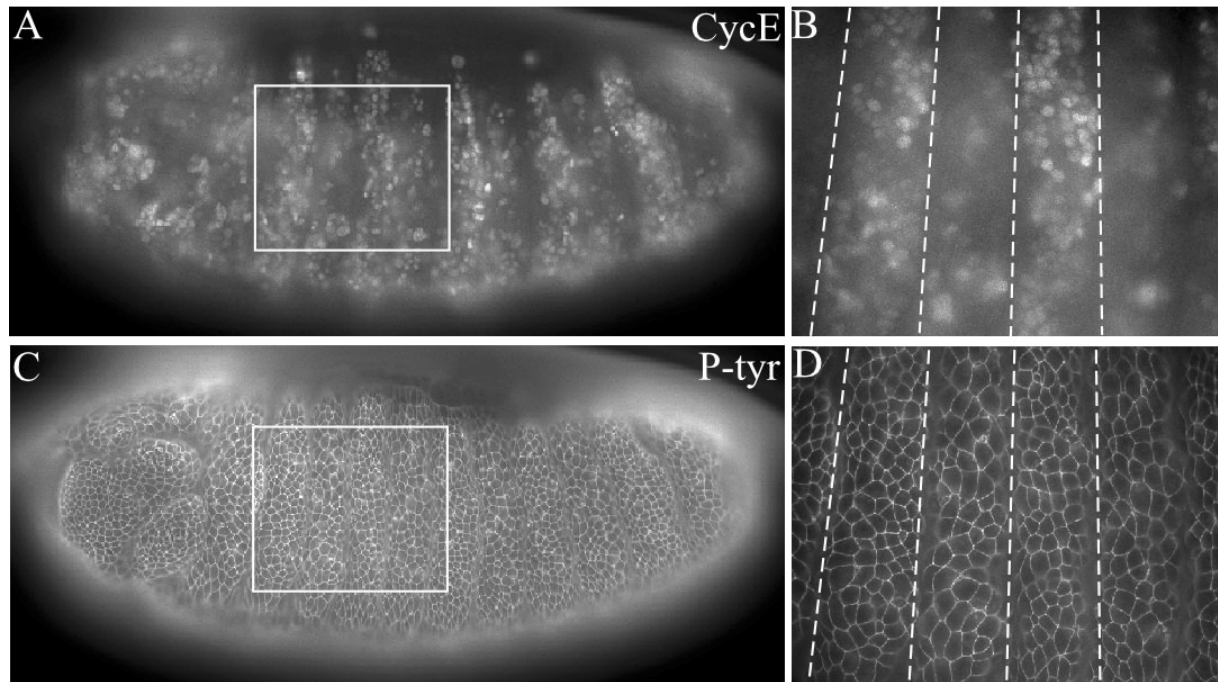


Abb. 3.26 Cyclin E Überexpression kann die Mitose 16 in *rcal* Mutanten wieder herstellen (A-D) *rcal* homozygote Embryonen im Stadium 13, die *CycE* unter *prd*-Gal4 Kontrolle überexprimieren. Die Färbung mit einem CycE-Antikörper zeigt sowohl das endogene als auch das überexprimierte Protein (A und B). Die P-tyr-Färbung des gleichen Embryos lässt eine höhere Zelldichte in den CycE überexprimierenden, als in den benachbarten Segmenten erkennen.

3.14 *rcal*;*CycA* Doppelmutanten arretieren vor der Mitose 15

Es scheinen also mindestens zwei Mechanismen zu existieren, die die Fzr assoziierte APC Aktivität während der G2-Phase kontrollieren. Dass diese zwei Wege wenn überhaupt nur partiell redundant sind, zeigt die Analyse der *rcal*;*CycA* Doppelmutante. In *CycA* homozygoten Embryonen ist schon während der fünfzehnten Mitose nur noch sehr wenig *CycA* vorhanden. Trotzdem wird diese Mitose noch vollendet und die Embryonen arretieren, wie die *rcal* Mutanten, in der G2-Phase 16 (Lehner and O'Farrell, 1989). Beide Mutanten weisen also die gleiche Zelldichte auf, haben aber weniger Zellen als WT Embryonen (Abb. 3.27 A-F). Interessanterweise haben die *rcal*;*CycA* Embryonen noch weniger Zellen als die beiden Einzelmutanten (Abb. 3.27 G und H). Die Doppelmutanten stellen die Zellteilung also schon vor der Mitose 15 ein. Das bedeutet, dass obwohl im Zyklus 15 CycE / Cdk2 Aktivität noch vorhanden ist, diese nicht ausreicht, um in Abwesenheit von *rcal*, den Abbau von einer schon verringerten *CycA* Menge zu verhindern.

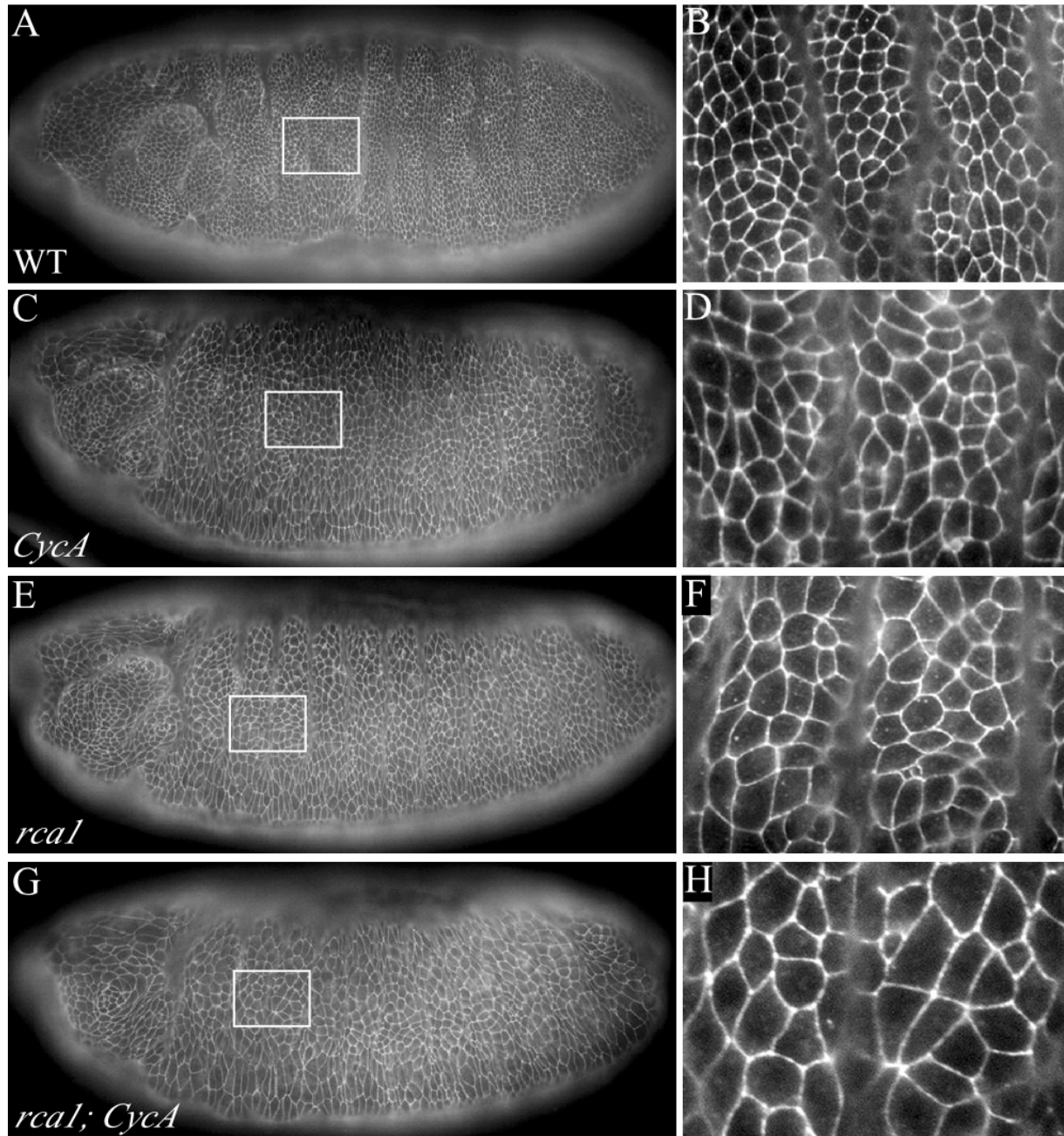


Abb. 3.27 *rcal;CycA* Doppelmutanten arretieren in Zellzyklus 15

(A-H) Ein Vergleich der Zelldichten von WT (A und B), *CycA* (C und D), *rcal* (E und F) und *rcal;CycA* (G und H) Mutanten im Stadium 13. Alle Embryonen wurden mit dem P-tyr Antikörper gefärbt. Die Zelldichte in *CycA* (D) und *rcal* Mutanten (F) ist vergleichbar, aber geringer im Vergleich zum WT-Embryo (B), da beide Mutanten die Mitose 16 nicht durchlaufen können. Die Zelldichte in der *rcal;CycA* Doppelmutante ist geringer als in den beiden Einzelmutanten (H), was zeigt, dass die Doppelmutante auch die Mitose 15 ausgelassen hat.

3.15 Rca1 und Fzr interagieren auch biochemisch

Die oben aufgeführten genetischen Daten deuten auf eine Interaktion zwischen Rca1 und Fzr hin. Um zu überprüfen, ob auch ein physikalischer Komplex aus beiden nachweisbar ist, wurden Co-Immunopräzipitations-Experimente durchgeführt. Aus sechs bis acht Stunden alten Embryonen, die HA-Rca1 unter *arm*-Gal4 Kontrolle überexprimieren, wurde ein Extrakt hergestellt. Aus diesem Extrakt konnte HA-Rca1, mit einem HA-Antikörper, immunpräzipitiert werden (Abb.3.28 A, Spur 2). Kontrollpräzipitationen zeigen, dass diese Immunpräzipitation spezifisch ist (Abb. 3.28 A, Spur 3 und 4). Diese HA-Rca1 Immunpräzipitation wurde nun auf co-präzipitierenden Faktoren hin untersucht. Getestet wurden CycA, Fzy, Fzr und Cdc27, eine Untereinheit, des APCs. CycA und Fzy konnten in den Präzipitationen nicht nachgewiesen werden (kein Bild). Abbildung 3.28 B Spur 2 zeigt aber, dass sowohl Cdc27, als auch Fzr mit HA-Rca1 immunpräzipitieren. Beide Proteinen tauchen nicht in den Kontrollpräzipitationen auf (Abb. 3.28 B, Spur 3 und 4). Der Komplex aus Rca1 und Fzr konnte auch *in vitro* nachgewiesen werden. Für dieses Experiment wurden HA-Fzr und Rca1 in Retic *in vitro* translatiert und beide Ansätze gemischt. HA-Fzr wurde mittels des HA-Antikörpers immunpräzipitiert (Abb. 3.28 C, Spur2). Die Western Blot Analyse dieser Immunpräzipitation mit dem Rca1-Antikörper ergab, dass auch in dieser Situation Rca1 mit Fzr co-präzipitiert (Abb. 3.28 D, Spur 2). Rca1 kann also einen Komplex mit Fzr und einer Untereinheit des APCs bilden.

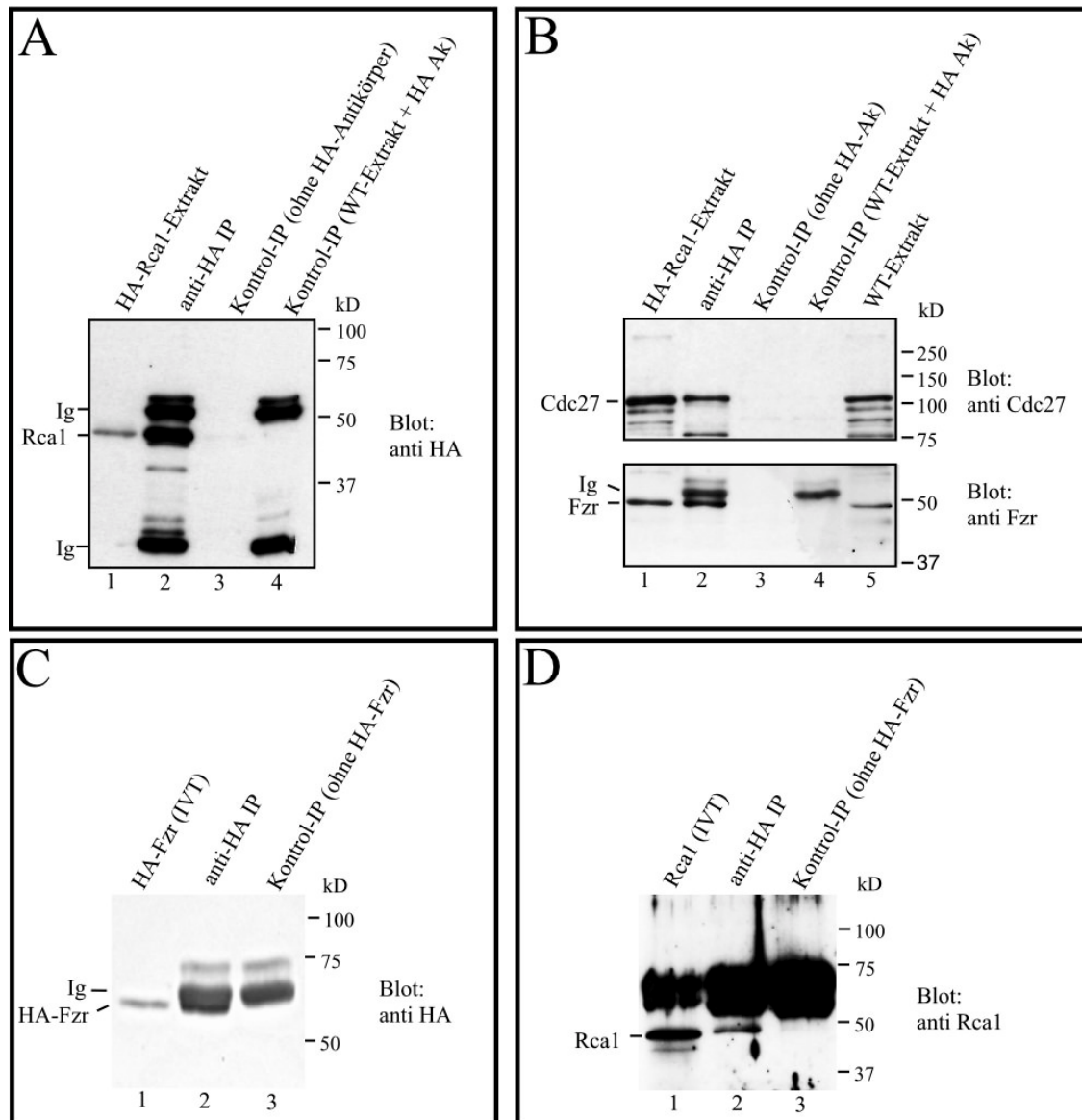


Abb. 3.28 Rca1 interagiert auch biochemisch mit Fzr und Cdc27

(A) Immunpräzipitation von HA-Rca1 aus sechs bis acht Stunden alten Embryonen des Genotyps *UAS-HA-rcal; arm-Gal4*. Die Embryonen wurden homogenisiert (HA-Rca1 Extrakt, Spur 1) und aus diesem Extrakt HA-Rca1 mit einem HA-Antikörper immunpräzipitiert (Spur 2). Kontrollpräzipitationen ohne HA-Antikörper (Spur 3) oder mit einem Extrakt aus WT-Embryonen (WT-Extrakt, Spur 4) wiesen kein HA-Rca1 auf.

(B) Fzr und Cdc27 co-präzipitieren mit HA-Rca1. HA-Rca1 wurde wie in A präzipitiert. Der Western Blot wurde dann mit einem Cdc27 Antikörper (oberer Teil des Blots) oder einem Antikörper gegen Fzr inkubiert. Beide Proteine sind im Ausgangsextrakt vorhanden (Spur 1) und co-präzipitieren mit HA-Rca1 (Spur 2). In den Kontrollpräzipitationen sind sie nicht vorhanden (Spur 3 und 4), aber im WT-Extrakt nachweisbar (Spur 5).

(C) Immunpräzipitation von *in vitro* translatiertem HA-Fzr. Gleiche Mengen *in vitro* translatiertes HA-Fzr und Rca1 wurden gemischt und für 20 Minuten inkubiert. Aus diesem Gemisch wurde HA-Fzr mittels des HA-Antikörpers immunpräzipitiert (Spur 2). Die Kontrolle ohne HA-Antikörper zeigt, dass HA-Fzr nicht unspezifisch präzipitiert (Spur 3). Zum Vergleich zeigt Spur 1 *in vitro* translatiertes HA-Fzr.

(D) Rca1 und Fzr interagieren *in vitro*.

HA-Fzr wurde wie in C präzipitiert und der Western Blot dann mit einem Rca1 Antikörper inkubiert. Rca1 co-präzipitiert mit HA-Fzr (Spur 2), ist aber in der Kontrolle nicht zu sehen (Spur 3). Spur 1 zeigt zum Vergleich *in vitro* translatiertes Rca1.

3.16 Emi1, ein mögliches Homolog von Rca1 in Vertebraten?

Gegen Ende dieser Arbeit wurden mögliche Homologe von *rca1* aus Frosch, Maus und Mensch beschrieben (Reimann et al., 2001). Das Froschprotein mit dem Namen Emi1 (early mitotic inhibitor 1) ist zu 18% identisch mit Rca1 (26% Ähnlichkeit).

Um einen ersten Eindruck zu bekommen, ob Emi1 sich in *Drosophila* ähnlich wie Rca1 verhält, wurde *HA-Emi1* mRNA (Frosch und Mensch) in syncytielle Embryonen injiziert. Die HA Markierung beeinträchtigt die Funktionalität des Proteins nicht. In den injizierten Embryonen wurde die Expression des Proteins mit HA Antikörpern nachgewiesen. Beide Proteine, das aus Frosch und das menschliche, zeigten das gleiche Ergebnis. In Abbildung 3.29 kann man ein dynamisches HA-Emi1 (menschliche) Muster erkennen. Dieses Muster ist identisch mit dem Expressions- bzw. Abbaumuster von CycA. HA-Emi1 wird also während der Mitose abgebaut. Die PH3 Färbung zeigt, dass diese simulierte Überexpression von HA-Emi1 keinen Einfluss auf den Zellzyklusverlauf hat (Abb. 3.29 B, D und F). Emi1 verhält sich in *Drosophila* also anders als Rca1, das in einem ähnlichen Experiment stabil ist.

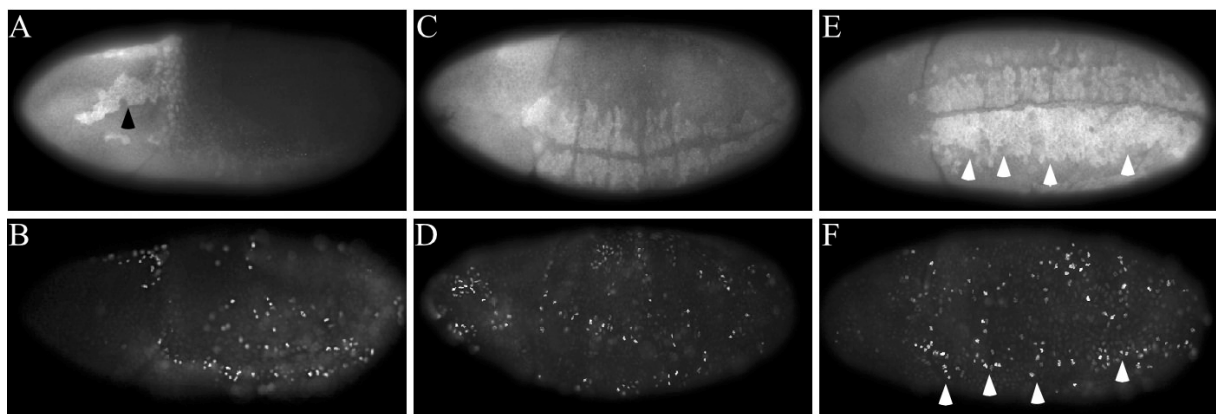


Abb. 3.29 Das menschliche Emi1 wird in *Drosophila* während der Mitose abgebaut

WT-Embryonen im Stadium 8 (A und B) und 9 (C-F) in die vor der Zellularisierung mRNA des menschlichen Emi1 (HA markiert) injiziert wurde. Die HA-Antikörperfärbung (A, C und E) zeigen, dass das HA-Emi1-Abbaumuster die mitotischen Domänen widerspiegelt. Emi1 wird also im Laufe der Mitose abgebaut, ist aber ansonsten stabil. Der Pfeilkopf in A markiert die Domäne B, deren Zellen sich nicht mehr teilen. HA-Emi1 ist in dieser Zellgruppe in hoher Konzentration vorhanden. Pfeilköpfe in E und F markieren Zellgruppen, die zur mitotischen Domäne N gehören. In diesen Zellen ist HA-Emi1 schon abgebaut worden. Die PH3 Färbungen in B-F zeigen, dass der Zellzyklusverlauf durch HA-Emi1 nicht beeinflusst wird

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Gens *rcal* in der Regulation der Zellteilung untersucht. *rcal* homozygote Embryonen besitzen den gleichen Phänotyp wie *CycA* Mutanten. Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen, dass Rca1 ein wichtiger Faktor in einem bisher noch nicht beschriebenen Regulationsmechanismus ist, der den Eintritt in die Mitose gewährleistet. Durch die Analyse von *rcal* konnten außerdem neue Erkenntnisse über die Regulation von CycA, des einzig essentiellen, mitotischen Cyclins in *Drosophila melanogaster*, gewonnen werden.

4.1 Die Expression von Rca1

Die Analyse des *Rca1* Transkriptionsmuster zeigt, dass *Rca1* RNA in allen proliferierenden Geweben vorhanden ist. Diese Beobachtung stimmt mit der von Dong et al. überein. Um auch die Verteilung des Proteins untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Antikörper gegen ein GST-Rca1 Fusionsprotein hergestellt. Der Antikörper konnte jedoch das endogene Rca1 im Embryo nicht detektieren. Das ist vermutlich auf dessen geringe Expressionslevel zurückzuführen, denn überexprimiertes Rca1 konnte mittels des Antikörpers im Embryo sichtbar gemacht werden. Auf Western Blots von embryonalen WT-Extrakten detektierte der Antikörper jedoch eine Bande der erwarteten Größe. Die Bande zeigte das gleiche Laufverhalten wie *in vitro* translatiertes Rca1. Obwohl der endgültige Nachweis fehlt, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit davon ausgegangen, dass diese Bande endogenes Rca1 darstellt. Um einen Eindruck der Rca1 Expression während der Embryogenese zu bekommen, wurde diese durch Western Blot Analyse über einen bestimmten Entwicklungszeitraum verfolgt. Dieses Experiment ergab, dass das Rca1 Protein, wie auch seine RNA, schon in sehr jungen Embryonen in geringen Mengen vorhanden ist. Da die Embryonen zu diesem Zeitpunkt transkriptionell inaktiv sind, stellt dieser Rca1 Anteil die maternale Komponente dar. Höhere Konzentrationen von Rca1 waren in den Entwicklungsstadien zu erkennen, in denen Zellproliferation zu beobachten ist. In alten Embryonen teilen sich nur noch wenige Zellen, und zu diesem Zeitpunkt waren auch nur geringe Mengen an Rca1 nachweisbar. Das Expressionsprofil von Rca1 spiegelt also das Proliferationsprofil während der Embryogenese wider.

Mit Hilfe des Rca1 Antikörpers wurden auch die verschiedenen *rcal* Allele auf ihre Rca1 Expression hin untersucht (Daten nicht gezeigt). Ein Unterschied im Transkriptionsmuster war nicht festzustellen. In einer Western Blot Analyse konnte in allen drei Stämmen die im

WT auftretende Bande detektiert werden. Die Mutationen in den verschiedenen *rca1* Allelen beeinflussen demnach nicht die Größe des Proteins. Durch Sequenzierung der verschiedenen Allele könnte die Art der Mutationen festgestellt werden. Zusätzlich würde eine Western Blot Analyse eines Stammes, dem das *rca1* Gen ganz fehlt, endgültig zeigen, ob die vom Antikörper erkannte Bande wirklich endogenes Rca1 ist. Beides konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.2 Proteinmotive in Rca1

Um einen Anhaltspunkt für eine mögliche Funktion von Rca1 zu erhalten, wurde die primäre Aminosäuresequenz durch Vergleich mit Proteinen in einer Datenbank auf konservierte, funktionale Domänen hin untersucht (Abb. 3.5). Rca1 besitzt eine zweiteilige Kernlokalisierungssequenz, und Rca1-Antikörperfärbungen im weiteren Verlauf der Arbeit zeigten, dass Rca1 in der Tat im Kern lokalisiert ist. Im Anschluss an die Kernlokalisierungssequenz befindet sich eine Region, die Ähnlichkeit zu einer F-Box aufweist. Die F-Box wurde zum ersten Mal als Proteinmotiv in Cyclin F beschrieben, das für die Bindung an das Protein Skp1 benötigt wird (Bai et al., 1996). Ein solches Motiv findet sich in einer Reihe von ansonsten wenig konservierten Proteinen, und fungiert als Verbindung zwischen dem SCF-Komplex und dessen Substraten. Der SCF-Komplex ist, wie der APC, eine Ubiquitinligase, die den Ubiquitin abhängigen Proteinabbau durch das Proteasom vermittelt. Die F-Box stellt hierbei die Verbindung zu dem Komplex her, während der Rest des F-Box Proteins für die Substraterkennung zuständig ist (Skowyra et al., 1997). Die Ähnlichkeit zwischen der möglichen F-Box Region in Rca1 und der F-Box Konsensussequenz ist allerdings sehr gering, denn sie beruht nur auf den Eigenschaften der Aminosäuren in dieser Region. Deshalb ist eine Rolle von Rca1 als klassisches F-Box Protein eher unwahrscheinlich. Die weiter unten diskutierten Ergebnisse bestätigen diese Vermutung. In der Mitte von Rca1 findet man die Aminosäureabfolge Lysin (K), Glutaminsäure (E) und Asparagin (N). Diese sogenannte KEN-Box findet man in Proteinen, die durch den APC-Fzr Komplex abgebaut werden (Pfleger and Kirschner, 2000). Da die Aktivität dieses Komplexes sich nur auf bestimmte Zellzyklusstadien beschränkt, ist der Rca1 Abbau möglicherweise auch an den Zellzyklusverlauf gekoppelt. Ob Rca1 wirklich durch den APC-Fzr Komplex abgebaut wird, müssen weiterführende Experimente zeigen (siehe Abschnitt 4.13). Der cysteinreiche Abschnitt am C-Terminus des Proteins stellt eine neue Art einer Zink bindenden Region dar. Die Konsensussequenz C(4x)C(14-30x)C(1-4x)C(4x)C(2x)C(4x)H(4x)C ist außer dem ersten C(4x) vollständig in Rca1 zu finden. Dieses neu beschriebene Motiv könnte

sowohl an Protein-DNA- als auch in Protein-Protein Interaktionen beteiligt sein. Funktionelle Studien zu diesem Proteinmotiv gibt es jedoch noch nicht (van der Reijden et al., 1999).

Die Analyse der konservierten Domänen in Rca1 gibt somit wenig Aufschluss über eine mögliche Funktion des Proteins.

4.3 Der *rca1* Phänotyp

Homozygote *rca1* Embryonen besitzen den gleichen mutanten Phänotyp wie *CycA* Mutanten. In beiden Mutanten findet die Mitose 16 in epidermalen Zellen nicht statt. Interessanterweise werden nachfolgenden S-Phasen dadurch nicht beeinflusst. Trotz der fehlenden Mitose findet in einer Gruppe von epidermalen Zellen, die normalerweise noch eine siebzehnte Teilung durchläuft, die DNA-Replikation zum richtigen Zeitpunkt statt (Dong et al., 1997; Sauer et al., 1995). Auch in Zellen des sich entwickelnden Nervensystems, die sich im WT noch mehrmals teilen, sind S-Phasen zu beobachten. Die Tatsache, dass die mutanten Phänotypen in diesen genannten Aspekten übereinstimmen, zeigt, dass beide Faktoren in einem gemeinsamen Prozess arbeiten müssen. Drei Möglichkeiten für eine Rolle von Rca1 sind dabei denkbar:

1. Rca1 aktiviert *CycA* direkt, z. B. als eine Art Co-Faktor.
2. Rca1 inhibiert einen *CycA* Inhibitor, z.B. Rux.
3. Rca1 stabilisiert *CycA*, bzw. verhindert dessen Abbau.

Gegen die erste Möglichkeit spricht, dass *CycA* Überexpression in der Lage ist, die Mitose 16 in *rca1* Mutanten wieder herzustellen. Somit kann Rca1 kein essentieller Co-Faktor von *CycA* sein.

Verschiedene Experimente wurden durchgeführt um zu testen, ob Rca1 ein Inhibitor von Rux sein könnte (Daten nicht gezeigt). *rca1* wurde in einem Screen als dominanter Suppressor des rauen Augenphänotyps von *rux* Mutanten isoliert (Dong et al., 1997). Beide Faktoren interagieren also genetisch. Rux agiert als CKI und kann *CycA* / Cdk1 Aktivität inhibieren. Diese Funktion trägt zum Austritt aus der Mitose und der Aufrechterhaltung der G1-Phase bei. Rca1 könnte ein Inhibitor von Rux sein, der gewährleistet, dass die Inhibition von *CycA* assoziierter Kinaseaktivität durch Rux nur während der Mitose und der G1-Phase vorhanden ist. In *rca1* Mutanten würde Rux Cdk1 Aktivität zu früh inhibieren und so die Zellen daran hindern, in die Mitose einzutreten. Durch *rux* Überexpression, z. B. unter *prd*-Gal4 Kontrolle, kann man ebenfalls diesen Effekt erzielen. Die Zellen werden durch Rux daran gehindert, in die Mitose 16 einzutreten (Foley et al., 1999). Rux Überexpression kopiert also den *rca1* Phänotyp. Dieser Effekt kann allerdings durch gleichzeitige Überexpression von Rca1 nicht

aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zeigt die Analyse der *rux,rcal* Doppelmutante, dass *rcal* epistatisch über *rux* ist. Die Beseitigung von Rux im *rcal* mutanten Hintergrund führt also nicht zur Wiederherstellung der Mitose 16. All diese Daten sprechen gegen eine Funktion von Rca1 als Inhibitor von Rux.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für die dritte Möglichkeit. Die Proteinmengen der mitotischen Cycline A und B sind in *rcal* Mutanten während der späten Interphase 16 verringert. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den veröffentlichten Daten von Dong et al, in denen keine Veränderung der CycA Mengen im Embryo beobachtet wurde. Der vorzeitige Abbau der mitotischen Cycline war jedoch im direkten Vergleich zwischen einem WT und einem *rcal* homozygoten Embryo schwer zu erkennen. Durch die Herstellung von *rcal* homozygoten Embryonen, die sowohl Rca1 exprimierende als auch nicht-exprimierende Segmente enthalten, konnte dieser Defekt jedoch eindeutig festgestellt werden. Die verringerte Menge der mitotischen Cycline wird nicht durch einen Defekt in der Transkription oder Translation hervorgerufen, denn die Akkumulation in der frühen Interphase 16 war unverändert. Da die mitotischen Cycline normalerweise während der gesamten Interphase in zellularisierten Embryonen stabil sind (Edgar et al., 1994), können die geringeren Level in *rcal* Mutanten nur auf einen verfrühten Abbau, wahrscheinlich in der späten Interphase 16, zurückzuführen sein. Die verbleibenden Proteinmengen sind nicht ausreichend, um den Eintritt in die Mitose zu gewährleisten. Nur in seltenen Fällen konnten mitotische Zellen beobachtet werden (Abb. 3.7 E). In *rcal* homozygoten Embryonen werden die mitotischen Cycline demnach abgebaut, noch bevor die Zellen in die Mitose eintreten können.

4.4 Der *rcal* Phänotyp basiert allein auf einem Mangel an Cyclin A

CycA ist das einzig essentielle, mitotische Cyclin in *Drosophila*. Allein mit seiner Abwesenheit ließe sich demnach schon der Ausfall der Mitose 16 in *rcal* homozygoten Embryonen erklären. Es ist jedoch denkbar, dass noch weitere Faktoren, die für den Eintritt in die Mitose benötigt werden, in *rcal* Mutanten fehlen. Zum Beispiel konnte ebenfalls der vorzeitige Abbau von CycB beobachtet werden. Die Analyse *CycA* homozygoter Embryonen hat außerdem gezeigt, dass selbst sehr geringe Mengen an CycA ausreichend sind, um die Mitose zu gewährleisten. So ist in *CycA* Mutanten schon im Zyklus 15 kaum noch CycA nachweisbar (Lehner and O'Farrell, 1989). Der Arrest tritt jedoch erst in der G2-Phase des Zyklus 16 auf. Auch in *rcal* Mutanten war die CycA Menge im Zyklus 16 verringert, aber das Protein konnte dennoch eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.7). *CycB* Mutanten

zeigen keine Veränderungen im mitotischen Programm der Embryogenese, allerdings arretieren *CycA;CycB* Doppelmutanten schon im Zyklus 15. Das zeigt, dass beide Cycline synergistisch die Mitose induzieren (Knoblich and Lehner, 1993). In der Doppelmutante reicht die Überexpression von *CycA* oder *CycB* aus, um die Mitose wieder herzustellen. Der *rca1* Phänotyp könnte also das Resultat des vorzeitigen Abbaus beider Cycline sein. Die beobachtete Reduktion von *CycA* allein würde danach nicht zu einem Defekt führen. Nur durch die zusätzliche Reduktion der *CycB* Konzentration käme es -wie in der *CycA;CycB* Doppelmutante- zum Ausfall der Mitose. Wäre das der Fall, müsste sowohl die Überexpression von *CycA* als auch die von *CycB* zur Wiederherstellung der Mitose in *rca1* Mutanten führen. Die Überexpression von *CycB* war allerdings nicht ausreichend, um die Mitose 16 wieder herzustellen. Auch in *CycA* Mutanten ist die Mitose 16 durch Überexpression von *CycB* nicht zu retten (unveröffentlichte Daten von Axel Dienemann). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von *CycA* in beiden Mutanten zur Wiederherstellung der Mitose. Demnach basiert der *rca1* Phänotyp, wie der Phänotyp *CycA* homozygoter Embryonen, nur auf dem Fehlen einer kritischen Menge *CycA*.

4.5 Rca1 verhindert den Cyclin A Abbau im Kern

In *Drosophila* befinden sich die Cycline A und B in der Interphase im Zytoplasma und akkumulieren während der Prophase im Kern (Huang and Raff, 1999; Lehner and O'Farrell, 1989). Es wird vermutet, dass diese Kernlokalisierung der Auslöser für bestimmte Vorgänge wie die Kondensation der DNA und die Auflösung der Kernmembran ist. Der Mechanismus dieser Kernlokalisierung ist allerdings nicht bekannt. In menschlichen Zellen befindet sich Cyclin B1, wie *CycA* und *B* in *Drosophila*, während der Interphase hauptsächlich im Zytoplasma und akkumuliert in der Prophase im Kern (Pines und Hunter, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass *CycB1* während der Interphase ständig vom Kern ins Zytoplasma und auch in umgekehrter Richtung transportiert wird (Hagting et al., 1998; Yang et al., 1998). Da der Kernexport von *CycB1* in der Interphase jedoch effektiver ist als der Import, kommt es zur Anreicherung im Zytoplasma. Die Akkumulation im Kern in der Prophase wird durch die Maskierung des Exportsignals gewährleistet (Yang et al., 1998). Ob dieser Mechanismus auch für *CycA* und *B* in *Drosophila* zutrifft, ist noch nicht bekannt. Es ist also nicht auszuschließen, dass beide Cycline während der Interphase eine dynamische Kernlokalisierung zeigen und einem ständigen Kernexport unterliegen. Da *Rca1* im Kern lokalisiert ist, könnte es spezifisch dort den Abbau der mitotischen Cycline verhindern. Eine

zweite Möglichkeit wäre, dass es Komponenten der Abbaumaschinerie im Kern festhält, um so den Abbau des Hauptanteils der Cycline im Zytoplasma zu verhindern.

Um einen Hinweis auf die Wirkungsweise von Rca1 zu bekommen, wurde ein Rettungsexperiment mit einem konstitutiv im Kern lokalisierten CycA (NLS-CycA) durchgeführt. Das NLS-CycA ist wie WT-CycA in der Lage den *CycA* mutanten Phänotyp zu retten (unveröffentlichte Daten von Axel Dienemann). Wenn Rca1 den Abbau der mitotischen Cycline spezifisch im Kern verhindert, würde ein konstitutiv im Kern lokalisiertes CycA in *rcal* Mutanten, gegenüber einem normalen CycA, verstärkt abgebaut werden. Könnte also das NLS-Konstrukt in *rcal* homozygoten Embryonen die Mitose 16 weniger effizient retten als WT-CycA, würde das die Theorie des Kernabbaus unterstützen. NLS-CycA war jedoch, wie WT-CycA, in der Lage die Mitose 16 in den *rcal* Mutanten wieder herzustellen. Die Zellzahlen zeigen, dass die NLS-Version darin sogar effizienter zu sein scheint. Eine statistische Auswertung dieser Beobachtung konnte jedoch nicht mehr durchgeführt werden. Dieses Ergebnis kann in zwei Richtungen interpretiert werden. Zum einen könnte es bedeuten, dass Rca1 doch nur den zytoplasmatischen Abbau der Cycline verhindert. Das NLS-CycA wäre durch die Kernlokalisierung davor geschützt und könnte deshalb in größeren Mengen akkumulieren als das WT-CycA. Die Folge wäre eine bessere Wiederherstellung der Mitose. Andererseits wird durch die konstitutive Kernlokalisierung des NLS-CycA eine höhere Konzentration an CycA im Kern ermöglicht. Selbst wenn die Cycline spezifisch nur im Kern abgebaut würden, stünde dann im Falle des NLS-CycAs eine höhere nukleäre CycA Konzentration zur Rettung der Mitose 16 zur Verfügung. Das Ergebnis dieses Rettungsexperiment lässt also keine eindeutige Aussage über den Mechanismus der Inhibition durch Rca1 zu.

Das Experiment lässt jedoch eine Aussage über den Ort des CycA Abbaus während der G1-Phase zu. In dem Rettungsexperiment mit WT-CycA waren in *rcal* Embryonen im Stadium 13, wenn sich alle epidermalen Zellen in der G1-Phase befinden, noch gut nachweisbare Mengen an CycA vorhanden waren (Abb. 3.12 A und D). In dem entsprechenden Experiment mit NLS-CycA konnten in Embryonen des gleichen Alters nur noch sehr geringe CycA Mengen festgestellt werden. Dieses restliche Protein befand sich auch nicht, wie man erwarten würde, im Kern, sondern ausschließlich im Zytoplasma (Abb. 3.14 F). Die Kernlokalisierung des NLS-CycA war allerdings bis zum Stadium 11 deutlich nachweisbar (Daten nicht gezeigt). NLS-CycA wird also in G1 Zellen effizienter abgebaut als normales CycA. Ansonsten würde man gleiche Proteinmengen der beiden CycA-Versionen erwarten. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass sich die Komponenten des CycA Abbaus in der G1-

Phase hauptsächlich im Kern befinden. Der APC-Fzr Komplex ist zu diesem Zeitpunkt für den Abbau der mitotischen Cycline verantwortlich. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rca1 spezifisch die Fzr assoziierte APC Aktivität inhibiert. Das Verhalten von NLS-CycA in G1 zeigt, dass der APC-Fzr Komplex im Kern aktiv ist. Rca1 ist ebenfalls im Kern lokalisiert und inhibiert Fzr assoziierte APC Aktivität. Das lässt indirekt darauf schließen, dass Rca1 spezifisch im Kern den Abbau von CycA verhindert.

4.6 Rca1 ist ein genereller Faktor in der Zellzyklusregulation

rcal homozygote Embryonen arretieren im Zellzyklus 16. Die klonale Analyse der *rcal* Funktion in Flügelimaginalscheiben (Abb. 3.15) hat verdeutlicht, dass Rca1 jedoch nicht nur während der Embryogenese benötigt wird. Die *rcal* mutanten Zellen in den Imaginalscheiben wiesen ebenfalls eine Reduktion der CycA Menge und Defekte in ihrem Proliferationsprogramm auf. Die Tatsache, dass überhaupt *rcal* Klone zu finden waren, zeigt andererseits, dass Zellen sich auch ohne *rcal* noch einige Male teilen können. Vermutlich reichte das vorhandene Protein oder die RNA in der Gründerzelle des Klons aus, um noch einige Teilungen zu erlauben. Nach ca. 2-3 Teilungen (die größten Klone bestanden aus 16 Zellen) sind dann keine ausreichenden Mengen an Rca1 mehr vorhanden, um den vorzeitigen CycA Abbau zu verhindern. In Abwesenheit von CycA kann das mitotische Programm nicht aufrechterhalten werden, und die Zellteilung wird eingestellt. Das erklärt den Wachstumsvorteil der Schwesterklone.

Die *rcal* homozygoten Zellen arretieren jedoch nicht völlig, sondern durchlaufen immer noch eine Art Zyklus. Die Kerne der *rcal* homozygoten Zellen waren stark vergrößert und wiesen einen erhöhten DNA Gehalt auf. Die Zellen haben ihre DNA demnach ohne dazwischenliegende Mitose mehrmals repliziert. Der mitotische Zyklus wurde also durch die Abwesenheit von Rca1 in einen sogenannten Endozyklus umgewandelt. Normalerweise blockiert die Anwesenheit der mitotischen Cycline in der G2-Phase eine erneute DNA-Replikation (Su et al., 1995). Diese Blockade wird durch den Abbau der Cycline im Verlauf der Mitose aufgehoben und so den Zellen ermöglicht, in die S-Phase einzutreten. Dies konnte vor allem durch Analysen von Zellzyklusmutanten in Hefe gezeigt werden. In *S. pombe* wird z. B. das mitotische Cyclin Cdc13 und sein Kinasepartner Cdc2 in G2 benötigt um eine Re-Replikation der DNA zu verhindern (Broek et al., 1991; Hayles et al., 1994). Ähnliches konnte in *S. cerevisiae* festgestellt werden. Hier führt eine zeitweilige Inhibition der Cdk Aktivität zu einer erneuten Replikation der DNA ohne vorangegangene Mitose (Dahmann et al., 1995). In *Drosophila* ist gezeigt worden, dass der Verlust von CycA oder der Cdk1

Aktivität zur Umwandlung von einem mitotischen Zellzyklus in einen Endozyklus führt (Hayashi, 1996; Sauer et al., 1995). Eine ähnliche Situation ist in den *rcal* Klonen zu finden. Mitotischen Cycline werden vorzeitig abgebaut, und dadurch ist auch eine geringe Cdk1 Aktivität zu erwarten. Das führt schließlich zur Einstellung des Proliferationsprogrammes und einer wiederholten Replikation der DNA.

4.7 Rca1 ist ein spezifischer Inhibitor von Fizzy-related

Der mitotische Abbau der Cycline A und B wird durch den APC vermittelt. Diese Ubiquitinligase polyubiquityliert die mitotischen Cycline und markiert sie dadurch für den Abbau durch das Proteasom (Glotzer et al., 1991). Die Aktivität des APCs ist normalerweise auf die Mitose und die G1-Phase beschränkt (Amon et al., 1994; Brandeis und Hunt, 1996). In *rcal* Mutanten kann man jedoch einen vorzeitigen Cyclinabbau in der Interphase beobachten. Rca1 wird also in dieser Phase gebraucht, um den APC zu inhibieren. Dadurch kann die Cyclinkonzentration, die für einen Eintritt in die Mitose benötigt wird, aufrechterhalten werden.

Auf molekularer Ebene ist es vorstellbar, dass Rca1 die APC Aktivität direkt inhibiert oder dessen Aktivierung verhindert. Bisher sind zwei Regulatoren des APC-Komplexes bekannt. Fizzy (Fzy) wird für dessen Aktivierung in der Mitose benötigt, während Fizzy-related (Fzr) am Ende der Mitose und in der G1-Phase diese Rolle übernimmt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Rca1 ein spezifischer Inhibitor Fzr assoziierter APC Aktivität ist. Die Daten sprechen gleichzeitig gegen eine Interaktion mit dem APC-Fzy Komplex.

Die Beobachtung, dass *fzr* epistatisch über *rcal* ist, ist der wichtigste Hinweis in Bezug auf die Spezifität von Rca1. Die Analyse der *fzr;rcal* Doppelmutante hat gezeigt, dass der vorzeitige Cyclinabbau in *rcal* homozygoten Embryonen von *fzr* abhängig ist. In den Doppelmutanten erfolgt kein vorzeitiger Abbau und die Mitose 16 wird wieder ausgeführt. Im Gegensatz zu *fzr;rcal* Doppelmutanten zeigen *rcal;fzy* Mutanten den *rcal* Phänotyp (persönliche Mitteilung von P. O'Farrell), d.h. *rcal* ist epistatisch über *fzy*.

Die Spezifität von Rca1 für Fzr zeigt sich auch in den Überexpressionsexperimenten. Die Überexpression von *fzr* führt zu einer Kopie des *rcal* mutanten Phänotyps. Die mitotischen Cycline werden vorzeitig abgebaut und die Zellen arretieren in der G2-Phase 16 ((Sigrist and Lehner, 1997); Abb. 3.24). Die gleichzeitige Überexpression von *rcal* hebt diesen Effekt wieder auf. Rca1 und Fzr haben also gegensätzliche Funktionen in der Kontrolle des Cyclinabbaus während der Interphase 16.

Im Gegensatz dazu hat die Überexpression von *fzy* keine Auswirkungen auf die Cyclinkonzentration und den Zellzyklusverlauf (Daten nicht gezeigt; (Sigrist and Lehner, 1997)). Das ist jedoch auch nicht zu erwarten, denn für die Aktivierung durch Fzy ist die mitotische Phosphorylierung des APCs erforderlich (Kramer et al., 2000). Das heißt, Fzy kann den APC nur in der Mitose aktivieren. Eine erhöhte Konzentration von Fzy in anderen Zellzyklusstadien hat deshalb keine Auswirkungen auf die APC Aktivität.

Fzr ist erst spät in der Embryogenese nachweisbar. Eine erhöhte Transkriptkonzentration von *Fzr* ist erst im Stadium 11 der Embryogenese sichtbar. Das Transkriptionsmuster korreliert also mit der Funktion bei der Einführung der G1-Phase im Zyklus 17 (Sigrist and Lehner, 1997). Zusätzlich weisen alle bisher veröffentlichten Daten darauf hin, dass Fzy der einzige APC Aktivator während der ersten 16 Zellzyklen in *Drosophila* ist (Dawson et al., 1993; Dawson et al., 1995; Sigrist et al., 1995; Sigrist and Lehner, 1997). Könnte Rca1 auch Fzy assoziierte APC Aktivität inhibieren, sollte eine Überexpression von Rca1 während der frühen Embryogenese Auswirkungen auf die Cyclinstabilität haben. Die Überexpression von HA-Rca1 während der ersten 16 Teilungen hatte jedoch keinen Einfluss auf die Cyclinmengen oder den Zellzyklusverlauf. Rca1 kann also in diesem Stadium der Entwicklung Fzy assoziierte APC Aktivität nicht inhibieren.

Schließlich konnten nicht nur genetische Interaktionen zwischen Rca1 und Fzr festgestellt werden, sondern auch biochemische. Immunpräzipitationsexperimente mit embryonalen Extrakten ergaben, dass beide Proteine sich in einem Komplex befinden. Unter identischen Versuchsbedingungen konnte eine Assoziation mit Fzy oder CycA nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Assoziation von Rca1 und Fzr war auch mit *in vitro* translatierten Proteinen nachweisbar. Für diese Interaktion werden demnach keine weiteren *Drosophila* Proteine benötigt. Man kann jedoch nicht ausschließen, dass noch andere Proteine, die im Retikulozytenlysat vorhanden sind, an der Bildung des Komplexes beteiligt sind. Um diese Möglichkeit ganz auszuschließen, müssten gereinigte Proteine eingesetzt werden. Der Komplex der aus den Extrakten präzipitiert wurde enthielt zusätzlich noch Cdc27, eine Untereinheit des APCs. Rca1 könnte also schon bestehende APC-Fzr Komplexe inhibieren und / oder die Assoziation von Fzr und dem APC verhindern. Die genaue Zusammensetzung des Rca1-Fzr Komplexes muss durch weiterführende Experimente ermittelt werden.

Alle diese Daten zeigen, dass Rca1 ein spezifischer Inhibitor von Fzr assoziierter APC Aktivität ist und in einem biochemischen Komplex mit Fzr vorliegt.

4.8 Rca1 wird im Embryo und den Imaginalscheiben unterschiedlich reguliert

Fzr assoziierte APC Aktivität wird zur Einführung und Aufrechterhaltung der G1-Phase benötigt. In *fzr* Mutanten kann der Abbau der mitotischen Cycline nach der Mitose 16 nicht aufrechterhalten werden. Als Folge davon scheitert auch die Einführung der G1-Phase im Zyklus 17. Da Rca1 ein spezifischer Inhibitor von Fzr ist, würde man demnach erwarten, dass durch eine Rca1 Überexpression auch Fzr assoziierte APC Aktivität in der G1-Phase inhibiert wird und so eine Kopie des *fzr* mutanten Phänotyps entsteht. Die ubiquitäre Überexpression von HA-Rca1 hatte aber keine Auswirkungen auf die Stabilität der mitotischen Cycline oder die Einführung der G1-Phase während der Embryogenese. Rca1 selbst wird aber, wie in Abbildung 3.19 gezeigt, während der G1-Phase in der Embryogenese abgebaut und kann vermutlich deshalb Fzr nicht beeinflussen. Außerdem ist es durchaus möglich, dass Rca1 einer zusätzlichen, zellzyklusspezifischen Regulation unterworfen ist. Diese würde gewährleisten, dass Rca1 im Verlauf der Mitose inhibiert wird und dadurch die Aktivierung des APCs durch Fzr gegen Ende der Mitose und in der G1-Phase erlauben. Vorstellbar wäre z. B. eine Phosphorylierung durch Cdk1. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass Rca1 in der Tat phosphoryliert wird (Daten nicht gezeigt, siehe auch Abschnitt 4.11).

Allerdings scheint sich die Rca1 Regulation in Imaginalscheiben von der im Embryo zu unterscheiden, was die Überexpressionsexperimente mit *arm*-Gal4 und *en*-Gal4 zeigen (Abb. 3.22). Hier führte die Rca1 Expression zu deutlichen Defekten während der Imaginalscheibenentwicklung. Dong et al. haben schon früher gezeigt, dass die Überexpression von Rca1 im sich entwickelnden Auge, wie die Überexpression von CycA, zu einem vorzeitigen Eintritt in die S-Phase und zu einem rauen Augenphänotyp führt. In den entsprechenden Augenimaginalscheiben konnten sie leicht erhöhte CycA Mengen nachweisen. Dies kann jedoch auch ein indirekter Effekt sein. Durch den vorzeitigen Eintritt in die S-Phase kann CycA akkumulieren, da es in der S-Phase im Gegensatz zur G1-Phase stabil ist. Zusätzlich konnte in eigenen Untersuchungen an Imaginalscheiben, die Rca1 überexprimieren, mit Antikörperfärbungen keine erhöhten CycA Mengen nachgewiesen werden. Die genauen Auswirkungen der Rca1 Überexpression in Imaginalscheiben und seine Regulation dort sind demnach noch unklar.

4.9 Die gleichzeitige Überexpression von Rca1 und Cyclin A verhindert die Mitose

Die Überexpression von Rca1 oder CycA im WT-Embryo hat keine Auswirkungen auf den Zellzyklusverlauf. Wie schon oben erwähnt unterliegt Rca1 wahrscheinlich verschiedenen Zellzyklus abhängigen Regulationsmechanismen, die seine Funktion auf die G2-Phase und möglicherweise die frühe Mitose beschränken. CycA / Cdk1 Aktivität wird ebenfalls auf mehreren Ebenen kontrolliert, z. B. durch Proteinabbau, Inhibitoren und inhibitorische Phosphorylierung (siehe Abschnitt 1.4), so dass die einfache Überexpression von CycA ebenfalls keinen Effekt hat. Die *CycA* und *rca1* Konstrukte sind aber funktionell, denn sie können die Mitose 16 in den Mutanten wiederherstellen. Erstaunlicherweise hat die gleichzeitige Überexpression beider Proteine genau den gegenteiligen Effekt. In WT-Embryonen führt die Überexpression von HA-Rca1 und HA-CycA unter *prd*-Gal4 Kontrolle zu einem Ausfall der Mitose 16. Dieser Phänotyp ist allerdings nicht vollkommen penetrant. Einige Embryonen tolerieren die Überexpression der beiden Proteine und durchlaufen ihr normales Proliferationsprogramm. Diese Variabilität könnte auf schwankende Expressionslevel zurückzuführen sein. Der Ausfall der Mitose 16 in den *HA-rca1;HA-CycA* Embryonen kann jedoch nicht als G2-Arrest bezeichnet werden, denn es war noch eine signifikante Anzahl an Metaphasezellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Zellen, die sowohl Rca1 als auch CycA überexprimieren können also zumindest in die Mitose eintreten. Dies ist auch bei Zellen zu beobachten die stabiles CycA exprimieren. Allerdings arretieren diese dann für einige Zeit in der Metaphase der Mitose 16. Ein solcher Arrest konnte in den *HA-rca1;HA-CycA* Embryonen nicht festgestellt werden. Auch eine Erhöhung der *rca1* bzw. *CycA* Dosis führte nicht zu einem Metaphasearrest. Es ist jedoch denkbar, dass, durch die Co-Expression von Rca1, CycA für eine kurze Zeit stabiler ist als normalerweise. Die Zellen sind in der Lage eine Metaphasenplatte zu etablieren, der Übergang zur Anaphase würde allerdings durch das stabilisierte CycA verzögert. Ab einem bestimmten Zeitpunkt bliebe der Zelle keine Zeit mehr für die Vervollständigung der Mitose, und die DNA dekondensiert wieder. Die weitere Analyse dieses Phänotyps, z. B durch Lebend-Beobachtung dieser Embryonen könnte Aufschluss darüber geben. Eine Aufklärung dieses Effekts könnte gleichzeitig helfen die Regulation von CycA und Rca1 besser zu verstehen.

4.10 Fzr kann durch Phosphorylierung und durch Rca1 reguliert werden

Verschiedene Veröffentlichungen zeigen, dass Cdh1 (das Fzr Homolog in Vertebraten) durch Phosphorylierung reguliert wird (Kotani et al., 1999; Kramer et al., 2000). Diese Daten belegen, dass Cdh1 nur unphosphoryliert an den APC binden und ihn aktivieren kann. Cdk1 sowie Cdk2 können Cdh1 phosphorylieren und damit inhibieren (Blanco et al., 2000; Jaspersen et al., 1999; Listovsky et al., 2000; Sorensen et al., 2001; Zachariae et al., 1998). Folglich findet man keine Cdh1 assoziierte APC Aktivität in der S-Phase und der frühen Mitose. Durch den Abbau der Cycline im Verlauf der Mitose sinkt die Cdk1 Aktivität und erlaubt so die Akkumulation von unphosphoryliertem Cdh1 und dessen Bindung an den APC. Die Aktivität des APC-Cdh1 Komplexes wird während der G1-Phase aufrechterhalten. Beim G1⇒S Übergang wird der Komplex dann schließlich durch die ansteigende Cdk2 Aktivität erneut inhibiert (Lukas et al., 1999).

Allerdings ist auch in der G2-Phase nur geringe Cdk Aktivität zu finden, wenn auch nicht in allen Zellzyklen. In *Drosophila* wird Cdk1 durch Phosphorylierung an zwei Tyrosinresten in der G2-Phase inhibiert (Edgar et al., 1994). CycE / Cdk2 assoziierte Kinaseaktivität ist jedoch während der ersten 15 Teilungen, einschließlich der G2-Phasen, ständig vorhanden (Knoblich et al., 1994). Erst im Verlauf des Zellzyklus 16 ändert sich das. Die Einstellung der CycE assoziierten Kinaseaktivität zu diesem Zeitpunkt ist eine wichtige Voraussetzung für die Einführung der ersten G1-Phase (Duronio and O'Farrell, 1995; Knoblich et al., 1994; Richardson et al., 1995). Experimente haben gezeigt, dass eine ektopische Expression von CycE im Zyklus 16 die Zellen direkt wieder in die S-Phase eintreten lässt (Duronio and O'Farrell, 1995; Knoblich et al., 1994). Der Abbau von *CycE* mRNA und die Synthese des CycE / Cdk2 Inhibitors Dacapo gewährleisten die Einstellung der Cdk2 Aktivität (de Nooij et al., 1996; Knoblich et al., 1994; Lane et al., 1996). Das bedeutet, dass in der G2-Phase des Zyklus 16 Cdk1- und Cdk2 Aktivität inhibiert sind. In diesem Stadium kann Fzr folglich nicht durch Phosphorylierung daran gehindert werden an den APC zu binden und ihn zu aktivieren. Diese Rolle übernimmt dann zu diesem Zeitpunkt Rca1. In Übereinstimmung mit diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CycE die Mitose 16 in *rca1* homozygoten Embryonen wieder herstellen kann (Abb. 3.26). Zusätzlich ist diese Überexpression auch in der Lage den Effekt der Fzr Überexpression aufzuheben (Sigrist and Lehner, 1997). Rca1 scheint folglich in Anwesenheit erhöhter Kinaseaktivität in der G2-Phase 16 überflüssig zu sein.

Den oben beschriebenen Ergebnissen nach kann Fzr in der G2-Phase also durch Phosphorylierung und die Interaktion mit Rca1 kontrolliert werden. Dass diese zwei

Mechanismen nicht vollständig redundant sind, zeigt die Analyse der *rcal;CycA* Doppelmutante. In *CycA* Einzelmutanten ist der maternale CycA Anteil trotz seiner geringen Konzentration ausreichend um die Teilungen einschließlich der Mitose 15 zu erlauben. In *rcal;CycA* homozygoten Embryonen arretieren die Zellen jedoch vor der Mitose 15. Dieser Phänotyp ist nur durch eine weitere Reduktion der CycA Mengen in der Doppelmutante zu erklären. Die schon geringe CycA Konzentration wird durch die Abwesenheit von Rca1 noch zusätzlich verringert. Dadurch ist schon im Zyklus 15 nicht mehr ausreichend CycA für den Eintritt in die Mitose vorhanden. Obwohl CycE in diesem Stadium noch vorhanden ist, kann es in der Doppelmutante die Funktion von Rca1 nicht übernehmen. Die Rca1 abhängige Inhibition von Fzr kann also nur zum Teil durch CycE vermittelte Phosphorylierung ersetzt werden. Dieses Experiment zeigt zusätzlich, dass auch schon vor Einführung der G1-Phase im Zyklus 17 Fzr assoziierte APC Aktivität vorhanden ist. Der maternale Rca1 Anteil ist jedoch nur bei normaler CycA Konzentration in der Lage diese Aktivität zu inhibieren und damit die Mitose 15 zu gewährleisten.

4.11 Ein Modell der Rca1 Funktion und Regulation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Rca1 ein neuer Inhibitor des APC Regulators Fzr ist. In G2-Phasen mit niedriger Cdk Aktivität kann die Aktivierung des APCs durch Fzr nicht durch Phosphorylierung verhindert werden. In diesen ist die Funktion von Rca1 essentiell. Es inhibiert die Fzr assoziierte APC Aktivität und verhindert so den vorzeitigen Abbau der mitotischen Cycline. Damit wird der Eintritt in die Mitose gewährleistet. Ein mögliches Modell der Wirkungsweise von Rca1 ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Rca1 ist im Kern lokalisiert und die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass es dort den Abbau von CycA verhindert. In G2-Phasen bzw. sehr frühen mitotischen Stadien mit niedriger Cdk Aktivität übernimmt es die Aufgabe, die vorzeitige Aktivierung des APC-Fzr Komplexes zu verhindern. Die biochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Rca1 in einem Komplex mit Fzr befindet. Zusätzlich konnte eine Interaktion mit Cdc27, einer Untereinheit des APCs, nachgewiesen werden. Ob diese Verbindung direkt oder indirekt ist, geht aus diesem Experiment nicht hervor. Rca1 könnte also zum einen die Bildung des APC-Fzr Komplexes verhindern, indem es getrennt an Fzr und Cdc27 bindet. Es ist aber auch möglich, dass es den bereits gebildeten Komplex inhibiert. Eine Kombination aus beiden Möglichkeiten wäre ebenfalls denkbar.

Da die Überexpression von Rca1, zumindest im Embryo, keine Auswirkungen auf die G1-Phase hat, muss es Mechanismen geben, die die Funktion von Rca1 auf die G2-Phasen und

eventuell die frühe Mitose beschränken. Das könnte z. B. durch den Abbau des Proteins gewährleistet werden. Es konnte in der Tat ein Abbau von Rca1 im Verlauf der G1-Phase 17 festgestellt werden. Das Protein verschwand allerdings nur langsam in den G1 Zellen. Fzr assoziierte APC Aktivität wird vermutlich auch schon gegen Ende der Mitose benötigt, um die Einführung der G1-Phase zu gewährleisten. Da Rca1 während der Mitose stabil ist, muss es einen zweiten Mechanismus geben, der sicherstellt, dass Rca1 Fzr nicht auch am Ende der Mitose inhibiert. Denkbar wäre eine Inhibition von Rca1 durch Cdk1 vermittelte Phosphorylierung. Beim Eintritt in die Mitose verhindert Cdk1 durch Phosphorylierung von Fzr dessen Bindung an den APC. Rca1 wäre von diesem Zeitpunkt an überflüssig. Allerdings müsste eine erneute Inhibition von Fzr durch Rca1 am Ende der Mitose, wenn Cdk1 Aktivität sinkt, verhindert werden, z. B durch vorangegangene Phosphorylierung von Rca1. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass Rca1 in der Tat phosphoryliert wird (Daten nicht gezeigt). Durch welche Art von Kinaseaktivität ist allerdings noch völlig unklar. Nach diesem Modell würde Rca1 nur in Zellzyklen die eine G2-Phase mit niedriger Cdk Aktivität besitzen benötigt. Die ersten 15 Zellteilungen in *Drosophila* könnten also ohne Rca1 ablaufen.

Die Funktion von Rca1 wird jedoch auch in Imaginalscheiben benötigt. In *rca1* homozygoten Zellen in diesem Gewebe wird wie im Embryo CycA vorzeitig abgebaut und dadurch die Mitose verhindert. Die Überexpression von Rca1 in Imaginalscheiben führt jedoch -im Gegensatz zu der im Embryo- zu Defekten während der weiteren Entwicklung. Deshalb muss sich hier die Regulation von Rca1 von der im Embryo unterscheiden.

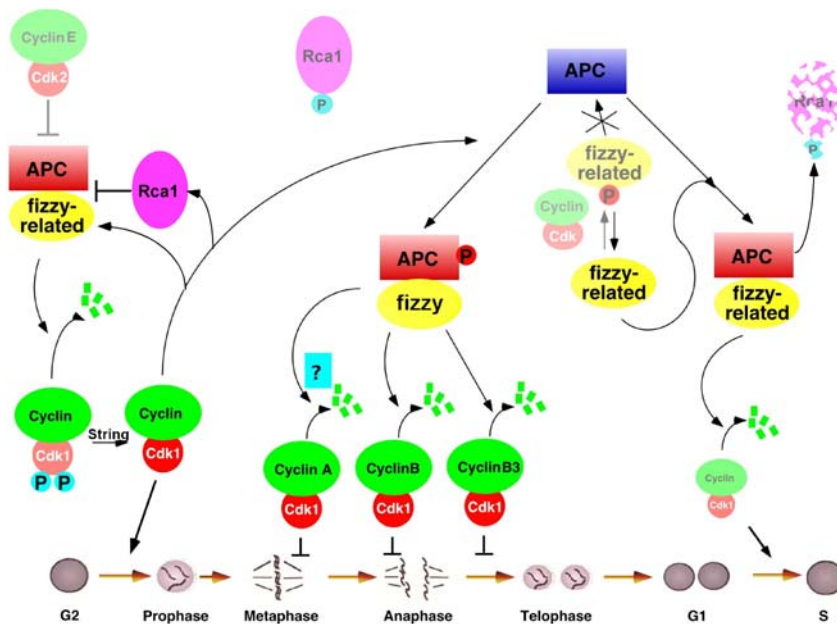


Abb. 4.1 Ein Modell der Rca1 Funktion und Regulation

In der G2-Phase und frühen mitotischen Stadien mit niedriger Cdk Aktivität verhindert Rca1 die vorzeitige Aktivität des APC-Fzr Komplexes. Im Verlauf der frühen Mitose steigt die Cdk1 Aktivität. Fzr wird phosphoryliert und dadurch inhibiert. Rca1 ist von diesem Zeitpunkt an überflüssig, bleibt jedoch während der gesamten Mitose stabil. Sein Abbau ist erst im Verlauf der G1-Phase zu beobachten. Da Rca1 eine KEN-Box besitzt, könnte es selbst ein Substrat des APC-Fzr Komplexes sein. Durch den Rca1 Abbau in der G1-Phase wird eine erneute Inhibition von Fzr verhindert. Fzr assoziierte APC Aktivität wird aber am Ende der Mitose, für die Einführung der G1-Phase, benötigt. Da Rca1 während der Mitose stabil ist, muss es einen zweiten Mechanismus geben, der sicherstellt, dass Rca1 Fzr nicht auch zu diesem Zeitpunkt inhibiert. Denkbar wäre eine Inhibition von Rca1 durch Cdk1 vermittelte Phosphorylierung.

4.12 Mögliche Rca1 Homologe in Vertebraten

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Rca1 ein wichtiger Bestandteil der Zellzyklusregulation ist. In allen bisher untersuchten Organismen ist die grundlegende Regulation des Zellzyklus konserviert. Auch die Mechanismen zur APC Regulation sind konserviert, und Fzr und Fzy Homologe sind in allen Systemen zu finden. Man würde deshalb erwarten, dass die Inhibition von Cdh1 (Fzr) durch einen Rca1 ähnlichen Faktor ebenfalls in anderen Organismen zu finden ist. In menschlichen Zellen z. B. sind die verschiedenen Phosphoisoformen von Cdh1 im Verlauf des Zellzyklus untersucht worden. Die Phosphorylierung und damit Inhibition von Cdh1 findet man in der S-Phase und der frühen Mitose (Kotani et al., 1999; Kramer et al., 2000). In der G1-Phase liegt das Protein dagegen in unphosphorylierter Form vor. Interessanterweise ist ein Rückgang der Cdh1 Phosphorylierung auch in der späten S-Phase und in G2 zu beobachten (Kramer et al., 2000). Trotzdem lässt sich in diesen Stadien nur geringe Cdh1 assoziierte APC Aktivität nachweisen. Das zeigt, dass es auch in menschlichen

Zellen einen Mechanismus geben muss, der die APC-Cdh1 Aktivität in Zeiten niedriger Cdk Aktivität einschränkt.

Gegen Ende dieser Arbeit wurden mögliche Homologe von *rca1* in Frosch, Maus und menschlichen Zellen beschrieben (Reimann et al., 2001). Das Froschprotein mit dem Namen Emi1 (early mitotic inhibitor 1) ist zu 18% identisch mit Rca1 (26% Ähnlichkeit). Die Homologien betreffen vor allem die in Abschnitt 3.4 erwähnten Domänen. Auch die Reihenfolge dieser Motive in den Proteinen ist konserviert. Reimann et al. konnten zeigen, dass Emi1 mit Cdc20 (Fzy in *Drosophila*) interagiert und dessen vorzeitige Assoziation mit dem APC verhindert. Im Gegensatz dazu belegen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass Rca1 ein spezifischer Inhibitor von Fzr assoziierter APC Aktivität ist. Dieser Unterschied spiegelt möglicherweise die Art der Zellzyklusregulation in den beiden Organismen wieder. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass sowohl der CycA / Cdk1- als auch der CycB / Cdk1 Komplex in der G2-Phase inhibitorischen Phosphorylierung unterliegt (Campbell et al., 1995; Edgar et al., 1994). Die Cdk1 Aktivität wird also in der G2-Phase effizient inhibiert. Im Frosch erfolgt diese Phosphorylierung allerdings nur am CycB / Cdk1 Komplex und nicht an CycA / Cdk1. Deshalb ist hier auch in der G2-Phase Cdk1 Kinaseaktivität zu erwarten (Clarke et al., 1992; Devault et al., 1992). Das kann zur Phosphorylierung des APCs führen und dadurch seine Aktivierung durch Cdc20 ermöglichen. Der APC-Cdc20 Komplex wäre damit noch vor dem Spindelkontrollpunkt aktiv und könnte daher ungehindert den Abbau der mitotischen Cycline einleiten. Emi1 scheint sich also spezifisch dieser Art der Zellzyklusregulation angepasst zu haben. Im Gegensatz dazu wird Rca1 benötigt, um in Phasen geringer Cdk Aktivität, in denen Fzr-, aber nicht Fzy assoziierte APC Aktivität möglich ist, die vorzeitige Aktivierung des APC Komplexes zu verhindern. Beide Proteine kontrollieren also Regulatoren des APCs und gewährleisten so den Eintritt in die Mitose. Neuere, noch unveröffentlichte Arbeiten mit dem menschlichen Emi1 haben ergeben, dass dieses Protein den APC-Cdh1 Komplex inhibiert (persönliche Mitteilung von P. Jackson). Die Emi1 Proteine scheinen also trotz geringer Sequenzhomologie wirkliche funktionelle Homologe von Rca1 zu sein.

In anderen Organismen sind ebenfalls Mechanismen, die einen vorzeitigen Abbau der mitotischen Cycline verhindern, vorhanden. In der Hefe *S.pombe* z. B. findet man in der G2-Phase auch nur eine geringe Cdk Aktivität. Deshalb muss auch hier eine vorzeitige Aktivierung des APC-Ste9 (Ste9 = Cdh1 Homolog) verhindert werden. Die Hefe erreicht das vermutlich dadurch, dass sie die Ste9 Proteinkonzentration in den G2-Phasen niedrig hält (Blanco et al., 2000).

Es existieren also in verschiedenen Organismen unterschiedliche Regulationsmechanismen, die eine vorzeitige Aktivierung des APCs verhindern. Der *rca1* mutante Phänotyp verdeutlicht, wie wichtig diese Mechanismen sind.

4.13 Weiterführende Arbeiten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente führten zur Aufklärung der Rca1 Funktion und des Zusammenhangs zwischen Rca1 und CycA. Die hier dargelegten Ergebnisse werfen allerdings neue Fragestellungen auf. Wie funktioniert die Inhibition der Fzr assoziierten APC Aktivität durch Rca1? Verhindert es die Bildung des APC-Fzr Komplexes oder inhibiert es den schon gebildeten Komplex? Auch eine Kombination dieser beiden Möglichkeiten wäre denkbar. Durch Bindungsstudien *in vitro* könnten diese Fragen beantwortet werden. Zusätzlich können sich aus der Analyse der einzelnen Domänen in Rca1 Antworten auf diese Fragen ergeben. In Emi1 wurde z. B. gezeigt, dass die cysteinreiche Region im C-Terminus für die Interaktion mit Cdc20 verantwortlich ist (Reimann et al., 2001) In Rca1 könnte diese Region den Kontakt mit Fzr vermitteln. Eine Deletion dieses Bereiches und die anschließende Analyse des Proteins in Immunpräzipitationsexperimenten würde darüber Auskunft geben.

Mit Hilfe dieser Deletionsanalyse wäre es auch möglich, die Regionen des Proteins zu ermitteln, die für die Funktion essentiell sind. Ein denkbarer Test hierbei wäre die Fähigkeit der einzelnen Konstrukte in *rca1* homozygoten Embryonen die Mitose 16 wieder herzustellen. Auf diese Weise könnte man z. B. die Notwendigkeit der NLS-Sequenz und der möglichen F-Box überprüfen. Untersuchungen an Emi1 habe gezeigt, dass die F-Box hier keine Rolle spielt (Reimann et al., 2001). Die Herstellung eines zytoplasmatischen Rca1 könnte zeigen, ob Rca1 spezifisch nur im Kern funktioniert.

Eine weiterer wichtiger Punkt wäre die Aufklärung der Rca1 Regulation. Die vorliegenden Ergebnisse deuten daraufhin, dass Rca1 durch Abbau und eventuell durch Phosphorylierung reguliert wird. Die Existenz der KEN-Box in der Mitte des Proteins kann sogar bedeuten, dass Rca1 ein Substrat des APC-Fzr Komplexes ist. Eine Deletion dieser Aminosäuren würde zeigen, ob diese Region wirklich den Abbau des Proteins reguliert. Ein in der G1-Phase stabiles Rca1 würde darüber hinaus Auskunft geben, ob dieser Abbau wichtig für einen normalen Zellzyklusverlauf ist. Eine genauere Analyse des Rca1 Phosphorylierungsstatus während des Zellzyklus und die Mutation der möglichen Phosphorylierungsstellen könnte zeigen, ob Rca1 auch auf dieser Ebene reguliert wird.

Schließlich wäre es interessant zu erfahren, ob die Rca1 Homologe aus anderen Organismen in der Lage sind, die Funktion von Rca1 zu übernehmen und in *rca1* Mutanten die Mitose 16 wiederherstellen können. Dieser Test würde zeigen, inwieweit der oben beschriebenen Regulationsmechanismus des APCs und seine Komponenten während der Evolution wirklich konserviert wurden. Die Injektionsexperimente aus Abschnitt 3.16 zeigen, dass zumindest die zellzyklusspezifischen Abbaumechanismen für Emi1 in *Drosophila* konserviert sind.

5. Literatur

Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Current Opinion in Genetics and Development* 9, 69-75.

Amon, A., Irniger, S., und Nasmyth, K. (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* 77, 1037-50.

Ashburner, M. (1989). "*Drosophila*-A laboratory handbook".

Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W., und Elledge, S. J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-74.

Beach, D., Durkacz, B., und Nurse, P. (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 300, 706-9.

Blanco, M. A., Sanchez Diaz, A., de Prada, J. M., und Moreno, S. (2000). APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *Embo J* 19, 3945-55.

Brand, A. H., und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15.

Brandeis, M., und Hunt, T. (1996). The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *Embo J* 15, 5280-9.

Britton, J. S., und Edgar, B. A. (1998). Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* 125, 2149-58.

Broek, D., Bartlett, R., Crawford, K., und Nurse, P. (1991). Involvement of p34cdc2 in establishing the dependency of S phase on mitosis. *Nature* 349, 388-93.

Campbell, S. D., Sprenger, F., Edgar, B. A., und O'Farrell, P. H. (1995). *Drosophila* Wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates *Drosophila* Cdc2 in vitro. *Mol Biol Cell* 6, 1333-47.

Campos-Ortega, J. A., und Hartenstein, V. (1997). "*The embryonic development of Drosophila melanogaster*".

Clarke, P. R., Leiss, D., Pagano, M., und Karsenti, E. (1992). Cyclin A- and cyclin B-dependent protein kinases are regulated by different mechanisms in *Xenopus* egg extracts. *Embo J* 11, 1751-61.

Correa-Bordes, J., und Nurse, P. (1995). p25rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34cdc2 mitotic kinase. *Cell* 83, 1001-9.

- Dahmann, C., Diffley, J. F., und Nasmyth, K. A. (1995). S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr Biol* 5, 1257-69.
- Datar, S. A., Jacobs, H. W., de La Cruz, A. F., Lehner, C. F., und Edgar, B. A. (2000). The *Drosophila* Cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *Embo J* 19, 4543-4554.
- Dawson, I. A., Roth, S., Akam, M., und Artavanis Tsakonas, S. (1993). Mutations of the fizzy locus cause metaphase arrest in *Drosophila melanogaster* embryos. *Development* 117, 359-76.
- Dawson, I. A., Roth, S., und Artavanis Tsakonas, S. (1995). The *Drosophila* cell cycle gene fizzy is required for normal degradation of cyclins A and B during mitosis and has homology to the CDC20 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 129, 725-37.
- de Nooij, J. C., Letendre, M. A., und Hariharan, I. K. (1996). A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* 87, 1237-47.
- Devault, A., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Garrigues, A. M., Labbe, J. C., Lorca, T., Picard, A., Philippe, M., und Doree, M. (1992). Cyclin A potentiates maturation-promoting factor activation in the early *Xenopus* embryo via inhibition of the tyrosine kinase that phosphorylates cdc2. *J Cell Biol* 118, 1109-20.
- Devault, A., Martinez, A. M., Fesquet, D., Labbe, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C., und Doree, M. (1995). MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *Embo J* 14, 5027-36.
- Dong, X., Zavitz, K. H., Thomas, B. J., Lin, M., Campbell, S., und Zipursky, S. L. (1997). Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: rca1 regulates Cyclin A. *Genes Dev* 11, 94-105.
- Duronio, R. J., und O'Farrell, P. H. (1995). Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin Eis a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* 9, 1456-68.
- Duronio, R. J., O'Farrell, P. H., Xie, J. E., Brook, A., und Dyson, N. (1995). The transcription factor E2F is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9, 1445-55.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-62.
- Edgar, B. A., Lehman, D. A., und O'Farrell, P. H. (1994b). Transcriptional regulation of string (*cdc25*): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development* 120, 3131-43.
- Edgar, B. A., und Lehner, C. F. (1996). Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* 274, 1646-52.
- Edgar, B. A., und O'Farrell, P. H. (1990). The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* 62, 469-80.

- Edgar, B. A., Sprenger, F., Duronio, R. J., Leopold, P., and O'Farrell, P. H. (1994). Distinct molecular mechanisms regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 8, 440-52.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M. W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* 12, 1871-83.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M. W. (1999). Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 354, 1583-90.
- Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B., and Deshaies, R. J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91, 221-30.
- Fesquet, D., Morin, N., Doree, M., and Devault, A. (1997). Is Cdk7/cyclin H/MAT1 the genuine cdk activating kinase in cycling *Xenopus* egg extracts? *Oncogene* 15, 1303-7.
- Fisher, R. P. (1997). CDKs and cyclins in transition(s). *Curr Opin Genet Dev* 7, 32-8.
- Fisher, R. P., and Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-24.
- Foe, V. E. (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* 107, 1-22.
- Foley, E., O'Farrell, P. H., and Sprenger, F. (1999). Rux is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) specific for mitotic cyclin-Cdk complexes. *Curr Biol* 9, 1392-402.
- Foley, E., and Sprenger, F. (2001). The cyclin-dependent kinase inhibitor Roughex is involved in mitotic exit in *Drosophila*. *Curr Biol* 11, 151-160.
- Frank, L. H., and Rushlow, C. (1996). A group of genes required for maintenance of the amnioserosa tissue in *Drosophila*. *Development* 122, 1343-52.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-8.
- Gonczy, P., Thomas, B. J., and DiNardo, S. (1994). roughex is a dose-dependent regulator of the second meiotic division during *Drosophila* spermatogenesis. *Cell* 77, 1015-25.
- Guacci, V., Koshland, D., and Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* 91, 47-57.
- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., and Pines, J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *Embo J* 17, 4127-38.
- Hayashi, S. (1996). A Cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development* 122, 1051-8.

- Hayles, J., Fisher, D., Woollard, A., und Nurse, P. (1994). Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell* 78, 813-22.
- Huang, J., und Raff, J. W. (1999). The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in *Drosophila* cells. *Embo J* 18, 2184-95.
- Inbal, N., Listovsky, T., und Brandeis, M. (1999). The mammalian Fizzy and Fizzy-related genes are regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels. *FEBS Lett* 463, 350-4.
- Jacobs, H. W., Keidel, E., und Lehner, C. F. (2001). A complex degradation signal in Cyclin A required for G(1) arrest, and a C-terminal region for mitosis. *Embo J* 20, 2376-86.
- Jacobs, H. W., Knoblich, J. A., und Lehner, C. F. (1998). *Drosophila* Cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like Cyclin B. *Genes Dev* 12, 3741-51.
- Jaspersen, S. L., Charles, J. F., und Morgan, D. O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9, 227-36.
- Kaldis, P., Sutton, A., und Solomon, M. J. (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* 86, 553-64.
- Kaspar, M., Dienemann, A., Schulze, C., und Sprenger, F. (2001). Mitotic degradation of cyclin A is mediated by multiple and novel destruction signals. *Curr Biol* 11, 685-90.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E., und Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7, 331-42.
- Knoblich, J. A., und Lehner, C. F. (1993). Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *Embo J* 12, 65-74.
- Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., und Lehner, C. F. (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77, 107-20.
- Koepp, D. M., Schaefer, L. K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J. W., und Elledge, S. J. (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294, 173-7.
- Kotani, S., Tanaka, H., Yasuda, H., und Todokoro, K. (1999). Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors. *J Cell Biol* 146, 791-800.
- Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., und Peters, J. M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* 11, 1555-69.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F., and Vaessin, H. (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* *87*, 1225-35.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K., and Suter, B. (1998). Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev* *12*, 370-81.
- Lear, B. C., Skeath, J. B., and Patel, N. H. (1999). Neural cell fate in *rca1* and *cycA* mutants: the roles of intrinsic and extrinsic factors in asymmetric division in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* *88*, 207-19.
- Lehman, D. A., Patterson, B., Johnston, L. A., Balzer, T., Britton, J. S., Saint, R., and Edgar, B. A. (1999). Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, *string/Cdc25*. *Development* *126*, 1793-803.
- Lehner, C. F., and O'Farrell, P. H. (1990). The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell* *61*, 535-47.
- Lehner, C. F., and O'Farrell, P. H. (1989). Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell* *56*, 957-68.
- Lindsley, D. L., and Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*.
- Listovsky, T., Zor, A., Laronne, A., and Brandeis, M. (2000). Cdk1 is essential for mammalian cyclosome/APC regulation. *Exp Cell Res* *255*, 184-91.
- Lukas, C., Sorensen, C. S., Kramer, E., Santoni_Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J. M., Bartek, J., and Lukas, J. (1999). Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* *401*, 815-8.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., and Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* *14*, 2066-76.
- Mendenhall, M. D. (1993). An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *259*, 216-9.
- Meyer, C. A., Jacobs, H. W., Datar, S. A., Du, W., Edgar, B. A., and Lehner, C. F. (2000). *Drosophila* Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *Embo J* *19*, 4533-42.
- Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* *91*, 35-45.
- Miroux, B., and Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* *260*, 289-98.
- Morgan, D. O. (1996). The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr Opin Cell Biol* *8*, 767-72.

- Morgan, D. O. (1999). Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat Cell Biol* *1*, E47-53.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* *270*, 86-90.
- Mullins, M. C., Rio, D. C., and Rubin, G. M. (1989). cis-acting DNA sequence requirements for P-element transposition. *Genes Dev* *3*, 729-38.
- Murray, A. (1995). Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* *81*, 149-52.
- Nasmyth, K., and Nurse, P. (1981). Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* *182*, 119-24.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* *11*, 961-71.
- Peter, M., and Herskowitz, I. (1994). Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* *79*, 181-4.
- Pfleger, C. M., and Kirschner, M. W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* *14*, 655-65.
- Pines, J., and Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* *115*, 1-17.
- Reimann, J. D., Freed, E., Hsu, J. Y., Kramer, E. R., Peters, J. M., and Jackson, P. K. (2001). Emil is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* *105*, 645-55.
- Richardson, H., O'Keefe, L. V., Marty, T., and Saint, R. (1995). Ectopic cyclin E expression induces premature entry into S phase and disrupts pattern formation in the *Drosophila* eye imaginal disc. *Development* *121*, 3371-9.
- Roy, R., Adamczewski, J. P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J. P., Schaeffer, L., Nigg, E. A., Hoeijmakers, J. H., and Egly, J. M. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* *79*, 1093-101.
- Rubin, G. M., and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* *218*, 348-53.
- Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* *45*, 145-53.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed.
- Sanson, B., White, P., and Vincent, J. P. (1996). Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* *383*, 627-30.

- Sauer, K., Knoblich, J. A., Richardson, H., und Lehner, C. F. (1995). Distinct modes of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9, 1327-39.
- Sauer, K., Weigmann, K., Sigrist, S., und Lehner, C. F. (1996). Novel members of the cdc2-related kinase family in *Drosophila*: cdk4/6, cdk5, PFTAIRE, and PITSLRE kinase. *Mol Biol Cell* 7, 1759-69.
- Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A., und Young, R. A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIID. *Nature* 374, 280-2.
- Serrano, M., Gomez-Lahoz, E., De Pinho, R. A., Beach, D., und Bar-Sagi, D. (1995). Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* 267, 249-52.
- Shah, J. V., und Cleveland, D. W. (2000). Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 103, 997-1000.
- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-5.
- Sherr, C. J., Kato, J., Quelle, D. E., Matsuoka, M., und Roussel, M. F. (1994). D-type cyclins and their cyclin-dependent kinases: G1 phase integrators of the mitogenic response. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology* 59, 11-9.
- Sherr, C. J., und Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-12.
- Sherr, C. J., und Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-63.
- Shteinberg, M., Protopopov, Y., Listovsky, T., Brandeis, M., und Hershko, A. (1999). Phosphorylation of the cyclosome is required for its stimulation by Fizzy/cdc20. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 193-8.
- Sigrist, S., Jacobs, H., Stratmann, R., und Lehner, C. F. (1995). Exit from mitosis is regulated by *Drosophila* fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3. *Embo J* 14, 4827-38.
- Sigrist, S. J., und Lehner, C. F. (1997). *Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* 90, 671-81.
- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., und Harper, J. W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-19.
- Solomon, M. J., Lee, T., und Kirschner, M. W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* 3, 13-27.

- Sorensen, C. S., Lukas, C., Kramer, E. R., Peters, J. M., Bartek, J., und Lukas, J. (2001). A conserved cyclin-binding domain determines functional interplay between anaphase-promoting complex-Cdh1 and cyclin A-Cdk2 during cell cycle progression. *Mol Cell Biol* *21*, 3692-703.
- Sorensen, C. S., Lukas, C., Kramer, E. R., Peters, J. M., Bartek, J., und Lukas, J. (2000). Nonperiodic activity of the human anaphase-promoting complex-Cdh1 ubiquitin ligase results in continuous DNA synthesis uncoupled from mitosis. *Mol Cell Biol* *20*, 7613-23.
- Spradling, A. C., und Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* *218*, 341-7.
- Sprenger, F., Yakubovich, N., und O'Farrell, P. H. (1997). S-phase function of *Drosophila* cyclin A and its downregulation in G1 phase. *Curr Biol* *7*, 488-99.
- Su, T. T., Follette, P. J., und O'Farrell, P. H. (1995). Qualifying for the license to replicate. *Cell* *81*, 825-8.
- Tautz, D., und Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* *98*, 81-5.
- Thomas, B. J., Gunning, D. A., Cho, J., und Zipursky, L. (1994). Cell cycle progression in the developing *Drosophila* eye: roughex encodes a novel protein required for the establishment of G1. *Cell* *77*, 1003-14.
- Thuret, J. Y., Valay, J. G., Faye, G., und Mann, C. (1996). Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* *86*, 565-76.
- Toyoshima, H., und Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* *78*, 67-74.
- van der Reijden, B. A., Erpelinck Verschuere, C. A., Lowenberg, B., und Jansen, J. H. (1999). TRIADs: a new class of proteins with a novel cysteine-rich signature. *Protein Sci* *8*, 1557-61.
- Visintin, R., Prinz, S., und Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* *278*, 460-3.
- Wai, P., Truong, B., und Bhat, K. M. (1999). Cell division genes promote asymmetric interaction between Numb and Notch in the *Drosophila* CNS. *Development* *126*, 2759-70.
- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., und Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* *103*, 399-410.
- Wieschaus, E., und Nüsslein-Volhard, C. (1986). "Looking at embryos".
- Xu, T., und Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* *117*, 1223-37.

Yamaguchi, S., Murakami, H., und Okayama, H. (1997). A WD repeat protein controls the cell cycle and differentiation by negatively regulating Cdc2/B-type cyclin complexes. *Mol Biol Cell* 8, 2475-86.

Yang, J., Bardes, E. S., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A., und Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 12, 2131-43.

Zachariae, W., und Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 13, 2039-58.

Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., und Seufert, W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282, 1721-4.

6. Zusammenfassung

Drosophila melanogaster besitzt drei mitotische Cycline, die überlappende und unterschiedliche Funktionen während der Mitose besitzen. Cyclin A (CycA) ist jedoch das einzige für die Mitose essentielle Cyclin. Obwohl diese Tatsache schon lange bekannt ist, herrscht über seine Regulation und die daran beteiligten Faktoren noch Unklarheit.

Das Gen *rca1* (*regulator of Cyclin A*) zeigt einen ähnlichen mutanten Phänotyp wie *CycA* homozygote Embryonen. Beide Mutanten sind embryonal letal und arretieren in der G2-Phase des Zellzyklus 16. Das legt die Vermutung nahe, dass Rca1 direkt an der Regulation von CycA beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von Rca1 untersucht, um zu verstehen, welche Rolle es in der Zellzyklusregulation hat und wie diese Funktion mit der Rolle von CycA zusammenhängt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Rca1 ein essentieller Inhibitor des "Anaphase promoting complex" (APC) in *Drosophila* ist. Die Aktivität des APCs ist normalerweise auf die Mitose und die G1-Phase beschränkt. Das wird durch Assoziation mit zwei regulatorischen Proteinen Fizzy (Fzy) und Fizzy-related (Fzr) gewährleistet. Genetische Versuche zeigten, dass die mitotischen Cycline in *rca1* Mutanten durch den APC-Fzr Komplex vorzeitig in der G2-Phase abgebaut werden. Dadurch wird die Durchführung der Mitose 16 unmöglich. Eine Erhöhung der *CycA* Dosis ist ausreichend, um diese Mitose wiederherzustellen. In *rca1* Mutanten fehlt demnach, wie in *CycA* homozygoten Embryonen, nur eine ausreichende Menge an CycA. Die Funktion von Rca1 ist allerdings nicht auf die Embryogenese beschränkt, wie die klonale Analyse verdeutlicht. In *rca1* homozygoten Imaginalscheibenzellen ist, wie im Embryo, ein Abbau von CycA und ein Ausfall der Proliferation zu beobachten. Zusätzlich zu der genetischen Interaktion, konnte eine physikalische Interaktion von Rca1 und Fzr in biochemischen Experimenten nachgewiesen werden. Immunpräzipitations-Experimente zeigten, dass Rca1 in einem Komplex mit Fzr vorliegt, der auch die APC Untereinheit Cdc27 beinhaltet.

Fzr assoziierte APC Aktivität wird auch durch Cdk vermittelte Phosphorylierung inhibiert. In Phasen niedriger Cdk Aktivität, wie in G2, steht diese Art der Inhibition allerdings nicht zur Verfügung. Die vorliegenden Daten zeigen, dass in diesen Situationen die Anwesenheit von Rca1 essentiell wird. Rca1 ist also ein neuartiger Zellzyklusregulator des APCs, der dessen vorzeitige Aktivierung durch Fzr verhindert. Diese Art der Regulation wird in Phasen geringer Cdk Aktivität benötigt, wenn die Assoziation von Fzr mit dem APC nicht durch Phosphorylierung inhibiert werden kann.

7. Abstract

Cyclin A (CycA) is the only essential mitotic cyclin in *Drosophila melanogaster*. Although this has already been known for quite a while barely any upstream and downstream targets of the CycA / Cdk1 complex are known.

The mutant phenotype of the gene *regulator of CycA* (*rca1*) is strikingly similar to that of *CycA* mutants. Both mutants are embryonic lethal and arrest in G2 of embryonic cell cycle 16 suggesting that both genes act in a common pathway. The aim of this work has been to understand the role of *rca1* during cell cycle regulation and its relation to CycA.

The data described here demonstrate that Rca1 is an essential inhibitor of the anaphase promoting complex (APC) in *Drosophila*. APC activity is usually restricted to mitotic stages and G1 by its activators Fizzy (Fzy) and Fizzy-related (Fzr) respectively. Genetic experiments show that in *rca1* mutants, mitotic cyclins are degraded prematurely in G2 by APC-Fzr dependent proteolysis. Consequently, cells fail to execute mitosis 16. Supplying additional CycA was sufficient to rescue this mitotic failure. This demonstrates that CycA is the crucial mitotic factor missing in *rca1* mutant embryos. The requirements for *rca1* function are not restricted to embryogenesis. Clonal analysis of *rca1* function shows that imaginal cells lacking *rca1* have also reduced cyclin levels and fail to proliferate normally.

A biochemical interaction between Rca1 and Fzr was seen in coimmunoprecipitation experiments. These show that both proteins are present in a complex which also contains Cdc27, a subunit of the APC.

It has been shown before that Cdk mediated phosphorylation of Fzr prevents its interaction with the APC. The data presented here reveal a novel control of APC activity by Rca1 at the G2 stage when low Cdk activity is unable to inhibit Fzr interaction.

Therefore Rca1 is an important novel regulator of mitotic entry which is necessary to prevent premature Fzr dependent APC activity. Such a function is required for all cells in which kinase activity is low during G2.

8. Lebenslauf

Name	Ruth Grosskortenhaus
Geburtsdatum/-ort	30. April 1973 Köln
Schulbildung	
1979-1983	Gemeinschaftsgrundschule Stenzelbergstraße, Köln
1983-1992	Hildegard von Bingen Gymnasium, Köln Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
Studium	
1992-1994	Grundstudium der Biologie an der Universität zu Köln
1994	Vordiplom
1994-1996	Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln
1996	Diplomprüfung in den Fächern: Genetik (Hauptfach), Entwicklungsbiologie und Biochemie
1996-1997	Diplomarbeit unter Betreuung von Frau Prof. Maria Leptin am Institut für Genetik der Universität zu Köln mit dem Titel: „Genetische Analyse der Musterbildung im Mesoderm von <i>Drosophila melanogaster</i> “
Promotion	
1997-2002	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Frau Prof. Maria Leptin am Institut für Genetik der Universität zu Köln
Berufliche Tätigkeit	
1996-1997	Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik der Universität zu Köln
1997-1998	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik der Universität zu Köln
seit 1998	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Genetik der Universität zu Köln
Köln, November 2001	

9. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Maria Leptin betreut worden.

Teilpublikationen:

Ruth Grosskortzenhaus und Frank Sprenger

Rca1 inhibits APC-Cdh1^{Fzr} and is required to prevent Cyclin degradation in G2.

Zur Veröffentlichung eingereicht.

