

**Die Bedeutung der subzellulären Lokalisierung von
*Cyclin A in Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Axel Dienemann

aus Bad-Ems

Köln 2003

Berichtersteller:

Priv.-Doz. Dr. Frank Sprenger

Prof. Dr. Maria Leptin

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

- Der eukaryontische Zellzyklus 1
- Die Regulation der Cyclin abhängigen Kinasen 3
- Die Cycline 6
- Verschiedene Cdk/Cyclin-Komplexe regulieren die Zellzyklusübergänge 9
- Die Rolle der Lokalisierung von Zellzykluskomponenten..... 10
- Die Sonderrolle von Cyclin A..... 13
- Zielsetzung der Arbeit 16

2. Ergebnisse 18

- 2.1 Analyse der funktionellen Bedeutung der Lokalisierung von Cyclin A für die Mitose..... 18
 - 2.1.1 Expression und Aktivität der Konstrukte 20
 - 2.1.2 Lokalisierung der Cyclin A-Konstrukte während des Zellzyklus 22
 - 2.1.3 Biochemische Analysen zur Lokalisierung von tor-HA-Cyclin A..... 33
 - 2.1.4 Wiederherstellung der Mitose 16 in *Cyclin A* Mutanten 36
 - 2.1.5 Die Expression von tor-HA-Cyclin A führt zu einem mitotischen Defekt 40
 - 2.1.6 Wiederherstellung der Mitose 15 in *Cyclin A/Cyclin B* Doppelmutanten durch Expression von tor-HA-Cyclin A 42
 - 2.1.6 Wiederherstellung der Mitose 15 in *Cyclin A/Cyclin B* Doppelmutanten durch Expression von tor-HA-Cyclin A 43
 - 2.1.7 Überwindung der embryonalen Letalität von *Cyclin A* Mutanten..... 44
 - 2.1.8 *in vivo* Analyse von transgenem Cyclin A-GFP 48
- 2.2 Analyse der funktionellen Bedeutung der Lokalisierung von Cyclin A für die Induktion ektoptischer S-Phasen 50
 - 2.2.1 Induktion von ektoptischen S-Phasen in der embryonalen Epidermis 50
 - 2.2.2 Induktion ektoptischer S-Phasen in der Augenimaginealscheibe 52
- 2.3 Untersuchungen zur Regulation der Lokalisierung von Cyclin A 54
 - 2.3.1 Cyclin A wird während der Interphase durch Kernexport im Cytoplasma lokalisiert 54
 - 2.3.2 Suche nach möglichen NES-Sequenzen in Cyclin A durch Vergleich mit NES-Konsensussequenzen 56
 - 2.3.2 Suche nach möglichen NES-Sequenzen in Cyclin A durch Vergleich mit NES-Konsensussequenzen 57
 - 2.3.3 Analyse einer Cyclin E ähnlichen Kernimportsequenz..... 58
- 2.4 *in vivo* Analyse von möglichen CDK-Phosphorylierungsstellen auf die Lokalisierung von Cyclin A. 59

3. Diskussion 62

- Detaillierte Analyse der Lokalisierung von Cyclin A und der Cyclin A-Konstrukte 62
- Die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase ist nicht essentiell 65
- Die essentielle Funktion von Cyclin A kann nicht von Cyclin B übernommen werden 69
- Die Lokalisierung von Cyclin A ist für die Induktion ektoptischer S-Phasen unwichtig 70
- Membranverankertes tor-HA-Cyclin A führt zu verschiedenen Phänotypen 71
- LMB-sensitiver Kernexport ist an der Lokalisierung von Cyclin A während der Interphase beteiligt.. 73
- Eine Cyclin E-ähnliche NLS hat keinen Einfluß auf den Kernimport von Cyclin A..... 75
- Untersuchungen zur Rolle der Autophosphorylierung auf die Lokalisierung von Cyclin A 76
- Die subzelluläre Lokalisierung von Cyclin A hat keine essentielle Funktion..... 76

4. Material und Methoden 78

- 4.1 Geräte und Arbeitsmaterialien 78
- 4.2 Chemikalien, Enzyme und Kits 78
- 4.3 Antikörper..... 79

| | |
|---|------------|
| 4.3.1 primäre Antikörper..... | 79 |
| 4.3.2 sekundäre Antikörper..... | 80 |
| 4.4 Oligonukleotide | 80 |
| 4.4.1 Herstellung der verschiedenen Konstrukte | 80 |
| 4.4.2 Sequenzierung von Cyclin A | 81 |
| 4.4.3 Sequenzierung von GFP | 81 |
| 4.5 Bakterien, DNA-Vektoren und rekombinante Plasmide..... | 81 |
| 4.5.1 Bakterien..... | 81 |
| 4.5.2 DNA-Vektoren und rekombinante Plasmide | 81 |
| 4.6 DNA-Methoden | 84 |
| 4.6.1 Lösungen..... | 84 |
| 4.6.2 Medien und Agarplatten | 85 |
| 4.6.3 Präparation von Plasmid-DNA | 85 |
| 4.6.4 Klonierung und Analyse von DNA..... | 86 |
| 4.7 Proteinchemische und immunologische Methoden | 89 |
| 4.7.1 Lösungen..... | 89 |
| 4.7.2 Proteinchemische Methoden | 90 |
| 4.7.3 Immunologische Methoden | 92 |
| 4.7 Drosophila Methoden | 93 |
| 4.7.1 Medien, Agarplatten und Lösungen..... | 93 |
| 4.7.2 Fliegenstämme | 94 |
| 4.7.3 Dechorionierung und Fixierung von Drosophila Embryonen..... | 96 |
| 4.7.7. Sortieren von mutanten Embryonen für Embryonenextrakte..... | 97 |
| 4.7.8 Inkubation von Embryonen mit Leptomycin B..... | 97 |
| 4.7.9 Einbettung von Embryonen nach Antikörperfärbung | 98 |
| 4.7.10 Nachweis von S-Phasen in Augenimaginalscheiben..... | 98 |
| 4.7.11 Nachweis von S-Phasen in Embryonen | 99 |
| 4.7.12 P-Element vermittelte Transformation von Drosophila Embryonen..... | 99 |
| 4.7.13 mRNA-Injektion in Embryonen..... | 99 |
| 4.7.14 Das UAS/Gal4-Expressionssystem in <i>Drosophila</i> | 99 |
| 5. Literatur..... | 101 |
| 6. Zusammenfassung..... | 113 |
| 7. Abstract..... | 114 |
| 8. Abkürzungen | 115 |
| 10. Erklärung..... | 118 |
| 11. Lebenslauf | 119 |

1. Einleitung

Der eukaryontische Zellzyklus

Die Zellteilung ermöglicht sowohl den Aufbau von mehrzelligen Organismen als auch die Vermehrung von ein- und mehrzelligen Organismen. Damit stellt die Zellteilung für alle Lebewesen einen fundamentalen Prozeß dar.

Als Zellzyklus bezeichnet man die festgelegte Abfolge von Zellwachstum, Verdopplung des Genoms und schließlich der Zellteilung. Die Kontrolle des Zellzyklus gewährleistet die Integrität des Genoms und dass die DNA während der Zellteilung zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt wird. Die Wichtigkeit der Regulation des Zellzyklus kommt zum Ausdruck, wenn sie ausfällt, keine Kontrolle der Zellteilung mehr möglich ist und der Organismus stirbt, weil entweder während der Entwicklung zu wenige Zellen den Organismus aufbauen können, oder weil Zellwucherungen Tumore entstehen lassen.

Die Zellzyklen in Eukaryonten sind von der Hefe bis zum Menschen sehr ähnlich. Ein Standard-Zellzyklus (Abb.1) kommt durch die zyklische Wiederholung einer festgelegten Sequenz von Ereignissen zustande. Diese Sequenz wird grob in die eigentliche Teilung, die Mitose (M), und die zwischen zwei Teilungen liegende Interphase gegliedert. Während der Interphase replizieren die Zellen ihre DNA in einem definierten Zeitraum, der als S-Phase bezeichnet wird. Der Zeitraum vor der S-Phase heißt G1-Phase (Gap=Lücke), der nach der S-Phase heißt G2-Phase. Die Abfolge von G1-, S- und G2-Phase konstituiert also eine Interphase. Während dieser Zeit wachsen die Zellen, es findet Proteinsynthese statt, die DNA wird repliziert und das Centrosom verdoppelt. Die Mitose besteht aus der Kernteilung und der Zytoplasmateilung. Die Kernteilung ist anhand der DNA Morphologie in vier Phasen gegliedert, die als Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase bekannt sind. Während der Prophase beginnt die Kondensation der DNA und außerdem wird die Kernmembran fragmentiert, wodurch die Mikrotubuli des Spindelapparates Kontakt mit den Kinetochoren der Chromosomen aufnehmen können. In der Metaphase werden die stark kondensierten Chromosomen im Spindelzentrum, senkrecht zur Teilungsebene, als sogenannte Metaphasenplatte angeordnet. Die polwärts gerichteten Spindelkräfte werden während dieses sehr dynamischen Vorgangs durch die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden ausgeglichen. Die Kohäsion wird durch

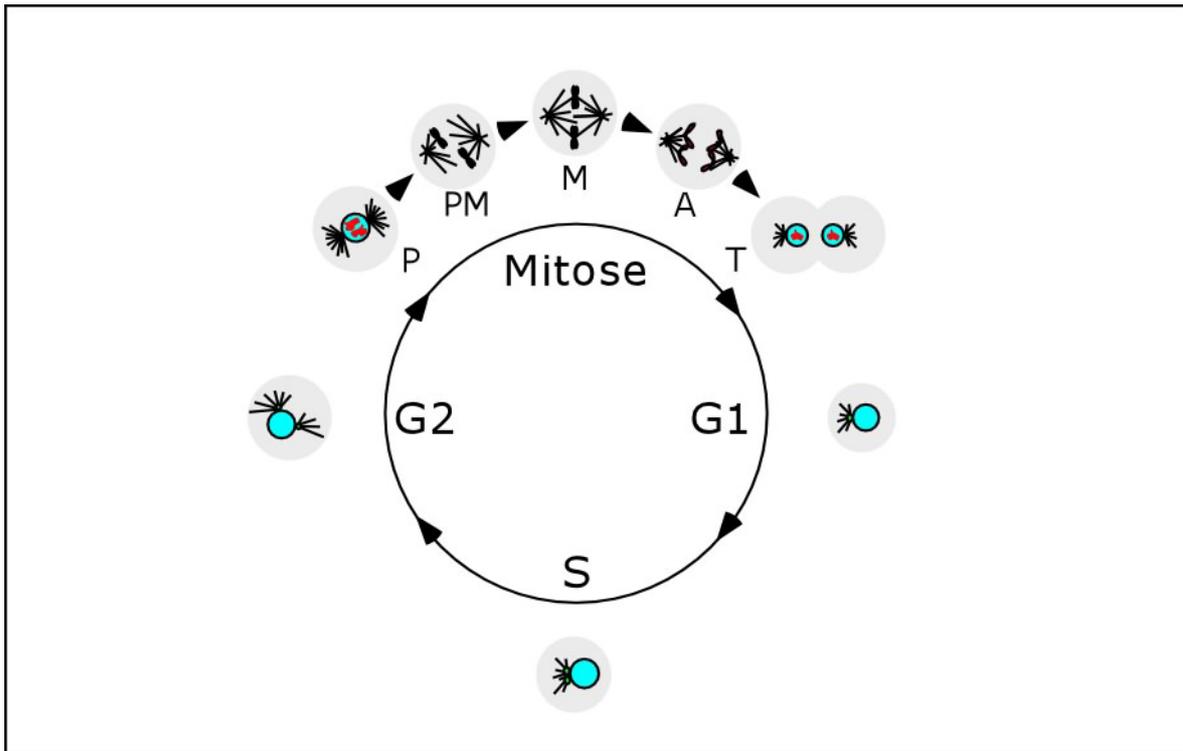


Abb 1: Schema eines typischen eukaryontischen Zellzyklus. Ein Zellzyklus gliedert sich in die Mitose und die Interphase. Die Interphase besteht aus der G1-, der S- und der G2-Phase. Die Zellen verdoppeln ihr Genom während der S-Phase. Die Mitose und die S-Phase sind durch die G1- bzw. die G2-Phase voneinander getrennt. In der Mitose wird das Genom auf zwei Tochterzellen verteilt. Für eine genauere Beschreibung der Vorgänge s. Text.

P=Prophase, PM=Prometaphase, M=Metaphase, A=Anaphase, T=Telophase.

einen Komplex erreicht, der von der konservierten Proteinfamilie der Cohesine aufgebaut wird (Michaelis et al., 1997). Der Cohesin-Komplex wird während der S-Phase entlang der Chromosomenarme gebildet und hält so die Schwesterchromatiden zusammen. Um in die Anaphase eintreten und die Schwesterchromatiden auf die entgegengesetzten Pole verteilen zu können, muß der Cohesin-Komplex aufgelöst werden. Dies geschieht durch proteolytische Spaltung, wobei eine Untereinheit des Cohesin-Komplexes von einer Protease namens Separin gespalten wird (Nasmyth et al., 2000; Uhlmann, 2001). In höheren Eukaryonten werden die Schwesterchromatiden zum größten Teil schon während der Prophase getrennt und während der Metaphase nur noch an den Kinetochoren zusammengehalten (Waizenegger et al., 2000). In der Telophase bildet sich um jeden Chromatidensatz eine neue Kernmembran und die DNA dekondensiert. Die Mitose wird durch die Zytoplasmateilung abgeschlossen, wobei in tierischen Zellen die Plasmamembran zwischen den beiden Kernen eingeschnürt wird und schließlich zwei Tochterzellen entstehen (Glotzer, 2001; Guertin et al., 2002).

Dieser Überblick beschreibt nur grob die komplexen Vorgänge, die in einer Zelle während des Zellzyklus ablaufen. Aber er wirft die Frage auf, wie die Übergänge zwischen den Zellzyklusphasen auf molekularer Ebene reguliert und gesteuert werden?

Die Regulation der Cyclin abhängigen Kinasen

Die Hauptkontrollpunkte sind die Übergänge zwischen der G1- und der S-Phase (G1/S) und zwischen der G2-Phase und der Mitose (G2/M). Die Regulation dieser Übergänge erfolgt hauptsächlich durch die Aktivität von konservierten, heterodimeren Serin/Threonin Kinasen, die als Cyclin abhängige Kinasen (cyclin dependent kinases = Cdks) bezeichnet werden (Nurse, 1990). In höheren Eukaryonten sind mehr als 10 Cdks beschrieben worden, wobei aber nur zwei, Cdk1 und Cdk2, zentrale Funktionen während des Zellzyklus besitzen. Andere CDKs haben zusätzliche Zellzyklusfunktionen oder spielen eine Rolle bei der Transkription oder bei neuronalen Differenzierungsvorgängen (Morgan, 1997).

Die Cdks kontrollieren die Übergänge zwischen den Zellzyklusphasen, indem sie Zielproteine durch Phosphorylierung regulieren. Jedoch ist noch unbekannt, wie das genaue Timing und der logische Ablauf garantiert werden (Georgi et al, 2002). Eine ganze Reihe von Zielproteinen wurde aufgrund von zwei Eigenschaften identifiziert, durch die Interaktion mit Cdk/Cyclin-Komplexen und dadurch, dass sie *in vivo* oder zumindest *in vitro*, von Cdk/Cyclin-Komplexen phosphoryliert werden können. Beschriebene Zielproteine sind z.B. E2F-1 und Retinoblastoma (Rb) (Kitagawa et al., 1996; Xu et al., 1994), die Rb ähnlichen Proteine p107 und p130 (Peeper et al., 1993; Yang et al., 1999), p21 (Jaumot et al., 1997), Cdc6 (Petersen et al., 1999), Cdc20 (Ohtoshi et al., 2000) Mdm2 (Zhang und Prives, 2001), S6K1 (Shah et al., 2003) und Myb (Saville und Watson, 1998). Die Identifizierung der *in vivo* Substrate von Kinasen ist sehr schwierig, und es sind nur einige wenige Cdk Substrate bekannt (Kitagawa et al., 1996; Petersen et al., 1999; Xu et al., 1994). Dass die Anzahl der Substrate jedoch groß ist, konnte erst kürzlich in Hefe gezeigt werden. In David Morgans Labor wurde eine Cdk1-Mutante hergestellt, die ein sterisch größeres und radioaktiv markiertes ATP-Analogon akzeptieren kann. Mit dieser Cdk1 wurden offene Leseraster der Hefe auf Phosphorylierung hin untersucht. So konnten ca. 500 Substrate von Cdk1 identifiziert werden, was einem Zehntel des gesamten Proteoms entspricht (Ubersax et al., 2002). Dies zeigt eindeutig, wieviele Proteine an dem fundamentalen Prozeß der Zellteilung beteiligt sind.

Aktive Cdks bestehen grundsätzlich aus zwei Untereinheiten, der Kinase und dem regulatorischen Cyclin (Doree und Hunt, 2002; Draetta et al., 1989; Labbe et al., 1989). Die monomere Cdk ist eine prolängerichtete (Zhang et al., 1994), inerte Kinase, die erst durch die Bindung eines Cyclins in einem 2-Schrittmechanismus aktivierbar wird. Im ersten, sehr schnellen Schritt formen die Cdk und das Cyclin einen Komplex. Die Bindung des Cyclins führt dann im zweiten, limitierenden Schritt zu einer langsameren, kritischen Konformationsänderung der Kinase, wobei zwei Strukturelemente (C- und T-lobe) derart verschoben werden, dass die T-lobe an einem konservierten Threoninrest (T161) phosphoryliert werden kann. Erst die Phosphorylierung an dem T161 führt über die Entstehung der optimalen Substratbindungsstelle zur vollständigen Aktivierung der Kinase (Desai et al., 1995; Holmes und Solomon, 2001; Morgan, 1995; Morris et al., 2002).

Die aktivierende Phosphorylierung wird von der Cdk aktivierenden Kinase (CAK) katalysiert (Morgan, 1995; Solomon, 1994). Die CAK der Bierhefe, CIV, ist eine monomerische, gut charakterisierte Kinase (Kaldis et al., 1996; Thuret et al., 1996). Für höhere Eukaryonten ist über die Natur der CAK-Aktivität nur wenig bekannt. In *Drosophila* kann ein heterotrimerer Komplex aus Cdk7/Cyclin H/Mat1 die Phosphorylierung des T-lobe *in vitro* durchführen und temperaturensensitive Cdk7 Mutanten sind letal und zeigen verschiedene Zellzyklusdefekte (Devault et al., 1995; Fesquet et al., 1997; Fisher und Morgan, 1994; Larochelle et al., 1998). Es ist noch unklar, ob die Cdk-Aktivierung durch Cdk7/Cyclin H/Mat 1 *in vivo* relevant ist oder ob es sich um einen *in vitro* Artefakt handelt, weil der Komplex auch bei der Regulation der Transkription eine Rolle spielt (Roy et al., 1994; Serizawa et al., 1995).

Nachdem sich der aktive Cdk/Cyclin-Komplex gebildet hat wird die zellzyklusspezifische Aktivität des Komplexes grundsätzlich durch zwei Regulationsmechanismen kontrolliert. Zum einen durch Phosphorylierungen der Cdk an zwei konservierten Positionen, T14 und Y15, welche von Wee, Mik1 und Myt1 Kinasen durchgeführt werden (Campbell et al., 1995; Jackman und Pines, 1997; Morgan, 1996; Mueller et al., 1995). Diese inhibierenden Phosphorylierungen stellen wichtige, schnell wirkende Regulationsmechanismen dar und werden durch das Verhältnis der Aktivitäten der entsprechenden Kinasen und Phosphatasen bestimmt. Die Phosphatase, die beide inhibitorischen Phosphorylierungen entfernt heißt Cdc25 (Millar et al., 1991). Diese duale Phosphatase ist in *Drosophila* als String, bzw. das keimbahnspezifische Homolog Twine, bekannt (Edgar und Datar, 1996; Edgar und O'Farrell, 1989; Edgar und O'Farrell, 1990).

Ein weiterer konservierter Regulationsmechanismus der Aktivität von Cdk/Cyclin-Komplexen besteht in der Bindung inhibierender Proteine, die als Cyclin abhängige Kinase Inhibitoren (cyclin dependent kinase inhibitors = CKIs) bezeichnet werden (Peter und Herskowitz, 1994; Sherr und Roberts, 1995; Sherr und Roberts, 1999). CKIs sind in vielen Organismen beschrieben worden und in Säugerzellen werden zwei Klassen unterschieden, die INK4-ähnlichen CKIs und die CKIs der KIP/CIP-Familie. INK4 inhibieren spezifisch Cdk4,6/CycD-Komplexe (Serrano et al., 1995), während die Mitglieder der KIP/CIP-Familie die Aktivität von S-Phase Cyclinen inhibieren (Toyoshima und Hunter, 1994). CKIs, die spezifisch mitotische Cdk/Cyclin-Komplexe inaktivieren sind für Bier- und Spaltheefe bekannt und heißen Sic1 bzw. Rum1 (Correa-Bordes und Nurse, 1995; Mendenhall, 1993). In *Drosophila* existieren keine CKIs der INK4-Familie und nur ein Homolog der KIP/CIP-Familie, nämlich *dacapo*, welches Cdk2/Cyclin E inhibiert (de Nooij et al., 1996; Follette und O'Farrell, 1997; Lane et al., 1996). Interessanterweise gibt es mit dem Gen *roughex (rux)* in *Drosophila* einen CKI, der spezifisch mitotische Cdk/Cyclin-Komplexe inhibiert (Foley et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Rux sowohl während der Mitose als auch für die Einführung und Aufrechterhaltung der G1-Phase benötigt wird (Foley und Sprenger, 2001; Gonczy et al., 1994; Thomas et al., 1994).

Die Aktivität der Cdk/Cyclin-Komplexe muß zusätzlich noch mit anderen zellulären Vorgängen koordiniert werden und außerdem muß die richtige Abfolge der Zellzyklusphasen kontrolliert werden. So muß die Replikation des Genoms vollständig abgeschlossen und die Integrität des Genoms sichergestellt sein, bevor die Zelle in die Mitose eintreten darf oder es müssen erst alle Kinetochoren von Mikrotubuli gebunden sein, bevor die Anaphase beginnen darf. Die Koordination ist durch sogenannte „checkpoints“ gewährleistet, die das Fortschreiten in die nächste Zellzyklusphase von der Beendigung der vorherigen Zellzyklusphase abhängig machen (Amon, 1999; Nigg, 2001; O'Connell et al., 2000).

Nachdem die Cdk/Cyclin-Komplexe ihre Funktion erfüllt haben erfolgt die vollständige Inaktivierung der Cdks durch den Abbau ihrer regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen. Der sequentielle Abbau der mitotischen Cycline ist z.B. essentiell für den geregelten Austritt aus der Mitose (Sigrist et al., 1995). Zusätzlich spielt die Inaktivierung der Cdk/Cyclin-Komplexe eine wichtige Rolle für die Kontrolle der DNA-Replikation, welche nur einmal innerhalb eines Zellzyklus stattfinden darf. Dies wird dadurch erreicht,

dass die „origins of replication“ nur gebildet werden können, wenn niedrige Kinaseaktivität vorliegt. Dieser Zustand wird durch den Abbau der Cycline und die damit irreversible Inaktivierung der Cdks sichergestellt (Noton und Diffley, 2000).

Die Cycline

Die Cycline sind die essentiellen, regulatorischen Untereinheiten der Cdk/Cyclin-Komplexe, die sowohl die Aktivierung als auch die Substratspezifität der Komplexe kontrollieren. Die Cycline sind eine Klasse von Proteinen, deren Name sich von ihrem zellzyklusabhängigen Entstehen und Verschwinden ableitet, wobei ihr Vorkommen in den Interphasen durch verstärkte Transkription und Translation ansteigt und nach der Erfüllung ihrer Funktion durch proteasomenabhängigen Abbau rapide abnimmt (Evans et al., 1983; Glotzer et al., 1991; Koepp et al., 1999; Swenson et al., 1986). Diese Eigenschaften zeigen auf, wie Cycline die Cdk/Cyclin-Komplexe regulieren: die Aktivität der relativ konstanten Menge an entsprechender Cdk wird durch die zur Verfügung stehenden Cycline bestimmt. Die zeitlichen Kombinationsmöglichkeiten von Cdks und Cyclinen ermöglichen die Kontrolle der Substratspezifität, um bestimmte Zellzyklusübergänge zu steuern. Der Abbau der Cycline, und damit die endgültige Inaktivierung der entsprechenden Cdk/Cyclin-Komplexe, trägt zu einem gerichteten Ablauf des Zellzyklus bei.

Die Cycline wurden ursprünglich in marinen Invertebraten identifiziert und sind seitdem in einer ganzen Reihe von Organismen beschrieben worden, wo sie von der Hefe bis zum Menschen konservierte Funktionen erfüllen (Draetta, 1990; Evans et al., 1983). Die Cycline werden aufgrund von Homologien in unterschiedliche Klassen (Cyclin A-J und T) unterteilt (Evans et al., 1983; Finley et al., 1996; Hunter und Pines, 1994; Napolitano et al., 2002), wobei in Metazoen nur Cycline des A-, B-, D- und E-Typs an der Zellzyklusregulation beteiligt sind (Nieduszynski 2002). Weiterhin wurden D-Typ ähnliche Cycline in Viren identifiziert, die als V-, K- und M-Cycline bekannt sind (Card et al., 2000).

Für die Cycline sind mehrere konservierte Motive beschrieben worden (Nugent et al., 1991). Sie bilden jedoch hauptsächlich aufgrund einer ca. 100 Aminosäuren umfassenden homologen Domäne, der sogenannten Cyclin-Box, eine Familie (Pines 1993, Hunter und Pines 1994). In Deletionsanalysen von Cyclin A aus Vertebraten wurde die Cyclin-Box als notwendiges Strukturelement zur Bindung und Aktivierung der Partnerkinasen Cdk1 und Cdk2 identifiziert (Kobayashi et al., 1992; Lees und Harlow, 1993; Nugent et al., 1991).

Durch Kristallstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass sich die Cyclin-Box in fünf α -Helices anordnet (Brown et al., 1995; Jeffrey et al., 1995). Weiter C-terminal liegende Sequenzen, die bei Sequenzvergleichen nur geringe Ähnlichkeit mit der Cyclin-Box haben, falten sich erstaunlicherweise ebenfalls zu fünf α -Helices und bilden zusammen mit der Cyclin-Box eine strukturell stabile Einheit. Diese Arbeiten haben auch gezeigt, dass bei der Bildung des Cdk/Cyclin-Komplexes das Cyclin, im Gegensatz zur Cdk, keine signifikanten Konformationsänderungen erfährt. Interessanterweise können Cyclin-Box ähnliche Faltungen auch bei pocket-Proteinen wie Retinoblastoma (RB) und bei Transkriptionsfaktoren gefunden werden, was darauf schließen läßt, dass diese Art der Faltung in der Natur als generelles Adaptermotif verwendet wird (Noble et al., 1997).

Wie die Cycline auf molekularer Ebene zur Substratspezifität beitragen ist noch nicht vollständig bekannt. Die Aufklärung der Kristallstruktur zwischen p27 und Cdk2/ Cyclin A (Russo et al., 1996) und die Erkenntnis, dass unterschiedliche Cdk/Cyclin-Komplexe verschiedene Substratpräferenzen haben (Higashi et al., 1995; Kitagawa et al., 1996; Peeper et al., 1993), führten zur Charakterisierung eines cyclinständigen Interaktionsmotifs, das „hydrophobic patch“ genannt wird (Schulman et al., 1998). Es befindet sich am Anfang der Cyclin-Box und wird hauptsächlich von hydrophoben Resten der α 1- und der α 3-Helix aufgebaut (Brown et al., 1995; Schulman et al., 1998). Substratproteine wie p21, p107, p130, E2F und RB besitzen ein sogenanntes RxL- oder Cy-Motif (Adams et al., 1996; Chen et al., 1996), welches mit dem hydrophobic patch interagieren kann. Da das hydrophobic patch bei Cyclinen des A-, B-, D- und E-Typs konserviert ist, kann es allein nicht für die Substratspezifität verantwortlich sein (Roberts, 1999; Schulman et al., 1998). Es scheint vielmehr eine konservierte Andockdomäne darzustellen, die sowohl durch das Umfeld des RxL-Motifs (Wohlschlegel et al., 2001) als auch durch die Position der Phosphorylierungsstelle im Substrat spezifiziert wird (Takeda et al., 2001). Das erst kürzlich identifizierte RRASK-Motif in B-Typ Cyclinen läßt jedoch vermuten, dass noch weitere Interaktionsdomänen einen Beitrag leisten (Goda et al., 2003).

Der zyklische Abbau der Cycline ist ein schon Eingang erwähntes Charakteristikum dieser Proteine, der die Inaktivierung der Cdk/Cyclin-Komplexe sicherstellt. Die Cycline werden durch ubiquitinabhängige Proteolyse im Proteasom abgebaut (Glutzer et al., 1991; Koepp et al., 1999; Murray et al., 1989). Eine zentrale Rolle bei der Auswahl der abzubauenen Substrate spielen die E3 Ubiquitin Ligasen, die Ubiquitin spezifisch auf Substrate übertragen und damit für den Abbau markieren (Koepp et al., 1999). Zwei E3

Ubiquitin Ligasen haben ausgewiesene Zellzyklusspezifität, der SCF-Komplex (Spruck und Strohmaier, 2002) und der APC (Zachariae und Nasmyth, 1999). Die meisten SCF-Substrate werden während frühen Zellzyklusphasen abgebaut, wohingegen der APC für den mitotischen Abbau notwendig ist. Die APC-Aktivität wird durch die zellzyklusabhängige Assoziation mit den temporären Untereinheiten Cdc20 oder Cdh1 reguliert (Inbal et al., 1999; Kramer et al., 2000; Visintin et al., 1997; Yamaguchi et al., 1997). Cdc20 wird für die Inaktivierung der mitotischen Cycline während des Übergangs von der Metaphase zur Anaphase benötigt. Es kann den APC nur binden, wenn dieser durch verschiedene mitotische Kinasen phosphoryliert wurde (Kramer et al., 2000; Shteinberg et al., 1999). Damit ist gewährleistet, dass dieser Komplex nur bei ausreichend hoher Kinaseaktivität gebildet wird, wie sie während der Mitose vorkommt. Zusätzlich wird die Cdc20 Aktivität noch durch den Spindelkontrollpunkt moduliert und somit die Bindung aller Kinetochoren an den Spindelapparat überwacht (Amon, 1999; Shah und Cleveland, 2000). Erst wenn alle Kinetochoren gebunden sind, wird Cdc20 aktiviert und der Übergang von der Metaphase zur Anaphase eingeleitet.

Die andere Untereinheit, Cdh1, wird während der Mitose ebenfalls phosphoryliert, wodurch aber die Bindung mit dem APC verhindert wird. Die Phosphorylierung scheint sowohl von Cdk1 als auch von Cdk2 durchgeführt zu werden (Kramer et al., 2000; Zachariae et al., 1998). Dadurch kann Cdh1 mit dem APC nur interagieren, wenn die Cdk-Aktivität niedrig ist, also gegen Ende der Mitose und während der G1-Phase (Blanco et al., 2000; Jaspersen et al., 1999; Listovsky et al., 2000; Sorensen et al., 2001). Die Cdk-Aktivität ist allerdings auch in der G2-Phase niedrig und nicht phosphoryliertes Cdh1 könnte zu diesem Zeitpunkt theoretisch mit dem APC interagieren und die mitotischen Cycline abbauen, bevor die Mitose eingeleitet wurde. In *Drosophila* wird eine frühzeitige Aktivierung von Cdh1 jedoch durch Rca1 verhindert (Grosskortenhaus und Sprenger, 2002) und in Vertebraten wird eine ähnliche Funktion von Emi1 erfüllt (Reimann et al., 2001).

Die für den mitotischen Abbau notwendigen Sequenzen innerhalb der Substrate wurden am besten bei B-Typ Cyclinen untersucht. Mutationen in der N-terminalen sogenannten destruction box, einem neun Aminosäuren langen Motiv mit der Aminosäureabfolge RxxLxxxxN, führten zu ineffektiver Ubiquitinierung und zur Stabilität der Proteine (Glotzer et al., 1991; King et al., 1996). Da alle bisher bekannten APC/Cdc20 Substrate eine destruction box besitzen (Morgan, 1999), kann man davon ausgehen, dass die

destruction box für den APC/Cdc20 vermittelten Abbau notwendig ist. Ein weiteres Abbaumotiv ist die KEN box, die in Proteinen zu finden ist, deren Abbau von der APC/Cdh1-Aktivität abhängig ist (Pfleger und Kirschner, 2000).

In *Drosophila* existieren drei mitotische Cycline, Cyclin A, Cyclin B und Cyclin B3, die während der Interphase stabil sind und in der Mitose nach einem stereotypen Muster nacheinander abgebaut werden (Sigrist et al., 1995). Die Aktivität des Cdc20 Homologs Fizzy (Fzy) ist für den Abbau der mitotischen Cycline zuständig (Dawson et al., 1995; Sigrist et al., 1995) und das Cdh1 Homolog Fizzy-related (Fzr) verhindert deren Reakkumulierung während der G1-Phase (Sigrist und Lehner, 1997). N-terminale Deletionen der Cycline sind stabil und arretieren die Mitose zu verschiedenen Zeitpunkten, die den sequentiellen Abbau der Cycline widerspiegeln. Das bedeutet, dass der Abbau den geregelten Austritt aus der Mitose gewährleistet (Luca et al., 1991; Sigrist et al., 1995). Interessanterweise zeigte eine detaillierte Analyse der am Abbau beteiligten Sequenzen in Cyclin A, dass der mitotische Abbau jedoch nicht allein von einer destruction box oder einer KEN box abhängt, sondern eine komplexe Verschachtelung mehrerer und vielleicht auch bisher unbekannter Sequenzen darstellt (Jacobs et al., 2001; Kaspar et al., 2001).

Verschiedene Cdk/Cyclin-Komplexe regulieren die Zellzyklusübergänge

In niederen Eukaryonten wie der Bier- und der Spalthefe existiert nur eine Cdk (Cdc28 bzw. Cdc2), die in Verbindung mit verschiedenen Cyclinen alle Aspekte des Zellzyklus steuert (Beach et al., 1982; Roberts, 1999). In höheren Eukaryonten haben sich dagegen im Laufe der Evolution mehrere Cdk Homologe entwickelt, deren Aktivitäten im Zusammenspiel mit verschiedenen Cyclinen auf bestimmte Übergänge des Zellzyklus spezialisiert sind.

In Metazoen leitet die Aktivität von Cdk4/Cyclin D und/oder Cdk6/Cyclin D Komplexen den Zellzyklus ein (Matsushime et al., 1994). Diese Komplexe werden als Vermittler zwischen extrazellulären, mitogenen Signalen und dem Zellzyklus angesehen (Sherr, 1994; Sherr und Roberts, 1999). Aktive Cdk4,6/Cyclin D Komplexe phosphorylieren das „pocket“-Protein Retinoblastoma (Rb) und überführen es auf diese Weise in die hyperphosphorylierte Form. In dieser Form kann Rb nicht mehr den S-Phase spezifischen Transkriptionsfaktor E2F inhibieren (Kato et al., 1993). E2F Zielgene beinhalten Proteine der DNA-Replikationsmaschinerie, wie die Ribonukleotid-Reduktase oder die Dihydrofolat-Reduktase, aber auch Cyclin E, welches durch einen positiven

„Feedback-Loop“ in Verbindung mit Cdk2 ebenfalls Rb phosphoryliert und so die Aktivierung von E2F verstärkt (Dyson, 1998). In *Drosophila* gibt es mit Cdk4 nur ein Cdk4,6 Homolog, welches mit Cyclin D komplexiert und wahrscheinlich eine konservierte Funktion erfüllt (Sauer et al., 1996). In *Drosophila* ist Cdk4 allerdings nicht essentiell und scheint hauptsächlich an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt zu sein (Datar et al., 2000; Meyer et al., 2000).

Für den Verlauf der S-Phase und die Akkumulierung von am G2/M-Übergang beteiligten Cyclinen, ist in höheren Eukaryonten und auch in *Drosophila* hauptsächlich die Aktivität eines Cdk2/CycE Komplexes notwendig (Knoblich et al., 1994). Auch für Cyclin A ist ein Einfluß auf die S-Phase bekannt (Lehner et al., 1991; Pagano et al., 1992), wobei Cyclin A in *Drosophila* allerdings nur in Komplexen mit Cdk1 (*cdc2*) gefunden wird (Sprenger et al., 1997).

Die Mitose wird durch die Aktivität der Cdk1 eingeleitet, welche mit den mitotischen Cyclinen des A- und B-Typs komplexiert (Nurse, 1990; Stern et al., 1993). Im Verlauf einer komplexen Reaktion kommt es zur Kondensierung der DNA, zur Fragmentierung der Kernmembran, dem Aufbau des Spindelapparates und schließlich zur Trennung der Chromatiden und zur Zellteilung (Nigg, 2001).

Die Rolle der Lokalisierung von Zellzykluskomponenten

Die oben beschriebenen, grundsätzlichen biochemischen Regulationsmechanismen von Cdk/Cyclin-Komplexen sind in den letzten Jahren um einen weiteren Regulationsmechanismus erweitert worden. Dieser findet auf zellulärer Ebene statt und manifestiert sich in der geregelten subzellulären Lokalisierung von Zellzykluskomponenten (Pines, 1999), wobei diese entweder ständig in einem bestimmten Kompartiment lokalisiert sind oder dynamische Änderungen der Lokalisierung erfahren. Dadurch kann die zeitliche und räumliche Interaktion zwischen Cdk/Cyclin-Komplexen und deren Regulatoren oder Substraten kontrolliert werden, was neben der Kontrolle der Aktivierung auch zur Substratspezifität beiträgt (Draviam et al., 2001; Miller und Cross, 2000; Pines, 1999) und erklärt, warum für diverse Zellzykluskomponenten unterschiedliche Lokalisierungen beschrieben wurden. Für Cyclin B2 aus *Asterioidea* und für eine Subfraktion des Cyclin B1 aus *Homo sapiens* konnte gezeigt werden, dass sie mikrotubuliassoziiert sind (Ookata et al., 1995). Cyclin B2 aus *Homo sapiens* lokalisiert in der Nähe des Golgi-Apparates (Draviam et al., 2001; Jackman et al., 1995). Cyclin B in

Drosophila zeigt eine dynamische Lokalisierung, die sich cytoplasmatisch, centrosomal, nukleär und spindelassoziiert darstellt (Huang und Raff, 1999). Cyclin A in Vertebraten ist im Kern lokalisiert (Pines und Hunter, 1991). Die Wee1-Kinase ist im Kern lokalisiert (Heald et al., 1993; Wu et al., 1996) und die Myt1-Kinase residiert an der cytoplasmatischen Seite vom Endoplasmatischen Reticulum und vom Golgi-Apparat (Liu et al., 1997). Von der Cdc25-Phosphatase existieren verschiedene Isoformen, die wahrscheinlich zelltypspezifisch im Kern oder Cytoplasma lokalisiert sind (Girard et al., 1992; Heald et al., 1993; Izumi et al., 1992; Jackman und Pines, 1997; Millar et al., 1991; Seki et al., 1992). Auch der Tumorsuppressor p53 (Liang und Clarke, 2001) und die an verschiedenen Aspekten der Mitose beteiligte Polo-Kinase (Taniguchi et al., 2002) unterliegen einer komplexen Lokalisierungskontrolle.

Die dynamische subzelluläre Lokalisierung von Cdk/Cyclin-Komplexen wurde zuerst bei Cyclin A in *Drosophila melanogaster* beobachtet (Lehner und O'Farrell, 1989) und ist am ausführlichsten für Cyclin B1 in Zellkultur menschlicher Fibroblasten untersucht worden. Cyclin B1 ist während der Interphase, ausgehend von der S-Phase im Zytoplasma lokalisiert. Mit Beginn der Prophase wird Cyclin B1 im Kern akkumuliert. Es wird angenommen, dass diese Akkumulierung prophasespezifisch ist und zur Induktion von prophasespezifischen Vorgängen wie der Kondensierung der Chromosomen und der Auflösung der Kernmembran benötigt wird. Die Änderung der Lokalisierung von Cyclin B ist konserviert von *Asterioidea* bis *Homo sapiens* (Gallant und Nigg, 1992; Ookata et al., 1992; Pines und Hunter, 1991).

Die Lokalisierung von Proteinen in den Kern wird durch die Kernporen reguliert, die in der das Genom umschließenden Kernmembran verankert sind. Partikel, wie z.B. kleine Proteine oder Metabolite, die eine Größe von 40 kDa nicht überschreiten, können mehr oder weniger frei zwischen dem Kern- und dem Zytoplasma diffundieren, wohingegen größere Makromoleküle nur durch aktive Transportvorgänge in den Kern hinein- oder auch wieder hinaustransportiert werden. Der Transport in beide Richtungen wird von löslichen Rezeptoren oder Rezeptorkomplexen katalysiert, die spezifisch ihre Substrate erkennen und den Weg durch die Kernporen erleichtern. Die Richtung der Transportvorgänge wird durch die asymmetrische Verteilung der kleinen GTPase Ran reguliert (Weis, 2003).

Extensive Studien zur Regulierung der Relokalisierung von Cyclin B1 führten zur Identifizierung einer Kernexportsequenz (NES=nuclear export sequence) im N-Terminus von Cyclin B1, die von dem Exportrezeptor Crm1 erkannt wird (Hagting et al., 1998;

Toyoshima et al., 1998; Yang et al., 1998). Die Kernexportsequenz antagonisiert während der Interphase den konstitutiven Kernimport, welcher für Cyclin B1 wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion mit Importin β erreicht wird (Moore et al., 1999; Takizawa et al., 1999). Das bedeutet, dass Cyclin B1 während der Interphase zwischen Kern und Zytoplasma hin- und hertransportiert wird, was als „shuttling“ bezeichnet wird. Cyclin B1 ist aber zytologisch nur im Zytoplasma nachzuweisen, was durch einen langsamen Kernimport und einen effizienten und schnellen Kernexport zu erklären ist. Für die prophasenspezifische Akkumulierung von Cyclin B1 im Kern sind Phosphorylierungen notwendig, die auf der einen Seite den Kernexport abschalten und auf der andere Seite die Kernimportrate erhöhen (Hagting et al., 1999; Yang et al., 2001). Als für diese regulatorischen Phosphorylierungen zuständigen Kinasen sind Plk1 (Vertebratenhomolog von Polo aus *Drosophila*), MAPK und Cdk1/Cyclin B selbst identifiziert worden (Hagting et al., 1999; Toyoshima-Morimoto et al., 2001; Walsh et al., 2003; Yang et al., 2001; Yuan et al., 2002). Ein alternatives oder paralleles Szenario zur Regulation der Cyclin B1 Lokalisierung behandelt den Transmembranrezeptor *patched* als zytoplasmatischen Anker (Barnes et al., 2001) und Cyclin F als Vermittler des Kernimports (Kong et al., 2000).

In Vertebraten ist auch für Cyclin A und Cyclin E gezeigt worden, dass beide Proteine durch „shuttling“ eine dynamische subzelluläre Lokalisierung besitzen. Bisher konnte nur für Cyclin E aus Vertebraten ein klassisches Kernimportsignal (NLS=nuclear import signal) charakterisiert werden (Moore et al., 2002), welches für den konservierten Importweg über Importin α /Importin β -Heterodimere benötigt wird (Moore et al., 1999; Weis, 2003). Für Cyclin B1 ist zwar eine direkte Bindung an Importin β beschrieben worden (Moore et al., 1999), aber welche Sequenzen in Cyclin B1 zu dieser Interaktion beitragen ist nicht bekannt. Weder in den Cdks noch in anderen Cyclinen konnten Kernimportsignale gefunden werden (Gallant et al., 1995; Yang und Kornbluth, 1999), obwohl verschiedene Cdk/Cyclin-Komplexe bekannt sind, die entweder konstitutiv im Kern lokalisiert sind oder zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin- und hertransportiert werden. Um die Kernlokalisierung der Cdk/Cyclin-Komplexe zu erklären, sind einige hypothetische Mechanismen vorgeschlagen worden. So könnte die Kernlokalisierung durch neue Importfaktoren, durch die Bildung einer klassischen NLS im Zuge der Cdk/Cyclin-Komplexbildung oder durch dritte Proteine, die eine klassische NLS besitzen erklärt werden (Gallant et al., 1995; Yang und Kornbluth, 1999). Sehr wahrscheinlich gibt es kein allgemeingültiges Prinzip, da z.B. Cyclin B1, im Gegensatz zu

Cyclin E nicht über den klassischen, Ran-abhängigen Mechanismus importiert wird (Moore et al., 1999; Takizawa et al., 1999). Für Cyclin A scheint die Komplexierung von Cdk2 notwendig für die Kernlokalisierung zu sein (Maridor et al., 1993), während Cyclin B und Cyclin E ohne Cdk-Bindung lokalisieren (Moore et al., 1999). Sowohl für Cdk4/Cyclin D1 (Diehl et al., 1998) als auch für Cyclin A aus *Drosophila* (Sprenger et al., 1997), sind Interaktionen mit „dritten“ Proteinen bekannt, die einen Einfluß auf die Lokalisierung ausüben könnten.

Obwohl verschiedene dynamische Lokalisierungen beschrieben sind, ist über die damit verbundene Funktion im Falle von Cyclin B1 relativ wenig bekannt. Für Cyclin B1 ist die Kernlokalisierung allein nicht ausreichend, um eine Mitose zu induzieren (Gallant et al., 1995). Der Kernexport von Cyclin B1 scheint aber bei dem DNA-checkpoint eine Rolle zu spielen, wobei DNA-Schäden nur repariert werden können, wenn Cyclin B1 aus dem Kern herausgehalten werden kann (Jin et al., 1998; Toyoshima et al., 1998). Da Cyclin B1 in humanen Zellen ein essentielles Gen ist, können im diesem System jedoch keine funktionalen Analysen durchgeführt werden.

Die Sonderrolle von Cyclin A

Das Gen *Cyclin A* nimmt in Vertebraten und *Drosophila* eine Sonderstellung ein, weil es sowohl für Aspekte der S-Phase als auch für mitotische Vorgänge benötigt wird (Lehner und O'Farrell, 1990; Lehner et al., 1991; Pagano et al., 1992). In Vertebraten kommen zwei Cyclin A Proteine vor, das keimbahnspezifische Cyclin A1 und das somatische, essentielle Cyclin A2 (Murphy et al., 1997; Yam et al., 2002). Cyclin A komplexiert mit der S-Phase spezifischen Cdk2 und der mitotischen Cdk1 und ist im Kern lokalisiert. Die genauen Funktionen von Cyclin A während den verschiedenen Phasen des Zellzyklus sind aber nur unzureichend bekannt und von Yam et al. (Yam et al., 2002) zusammengefaßt worden.

In *Drosophila* existiert nur ein Cyclin A und es ist das einzige mitotische Cyclin mit einem letalen Phänotyp der Einzelmutante (Jacobs et al., 1998; Lehner und O'Farrell, 1989). Die beiden anderen mitotischen Cycline, Cyclin B und Cyclin B3, sind nicht essentiell (Jacobs et al., 1998). Allerdings zeigen alle drei mitotischen Cycline funktionelle Redundanz (Jacobs et al., 1998; Knoblich und Lehner, 1993; Lehner und O'Farrell, 1990; Sigrist et al., 1995). Wie in Vertebraten (Resnitzky et al., 1995; Rosenberg et al., 1995) kann die Überexpression von Cyclin A auch in *Drosophila* S-Phasen induzieren (Lehner et

al., 1991; Sprenger et al., 1997). In *Drosophila* gibt es auch Hinweise, dass Cyclin A an der Replikationskontrolle beteiligt ist (Mihaylov et al., 2002; Sauer et al., 1995).

Der Locus des *Cyclin A*-Gens in *Drosophila* wurde durch *in situ* Hybridisierung in der Region 68 D/E auf dem linken Arm von Chromosom drei identifiziert. Die *Cyclin A*-cDNA ist 2385 bp lang und das offene Leseraster codiert für ein 491 AS großes Protein (Lehner und O'Farrell, 1989), welches neben der Cyclin-Box und jeweils zwei destruction- und KEN-box Motiven keine weiteren strukturellen Homologien aufweist. Während der Embryonalentwicklung wird Cyclin A mRNA und Protein maternal bereitgestellt. In den frühen Kernzyklen des syncytialen Embryos scheint die Proteinmenge konstant, obwohl die Halbwertszeit des Proteins kurz ist. Dies rührt von einer kontinuierlichen Translation her. In den folgenden Kernzyklen wird der Abbau von Cyclin A während der Mitose deutlicher, aber das Protein verschwindet nicht ganz. Die Regulation und Funktion von Cyclin A in diesen frühen Zyklen ist noch nicht verstanden. In Zyklus 14 zellularisieren die Kerne zu einem einschichtigen Epithel, welches dann das zelluläre Blastoderm darstellt. Mit der Umstellung auf zygotische Transkription erfolgt die Einführung der G2-Phase, was zu einer signifikanten Verlängerung des Zellzyklus führt (Edgar et al., 1994). Die Mitosen verlaufen nicht mehr synchron sondern in räumlichen und zeitlichen Mustern, die mitotische Domänen genannt werden (Foe, 1989). In diesen Zyklen, die bis Zyklus 16 beibehalten werden, akkumuliert Cyclin A in der S- und G2-Phase und wird schließlich in der Mitose vollständig abgebaut. Diese Zyklen sind denen in Vertebratensystemen sehr ähnlich. Der Abbau von Cyclin A während der Mitose ist notwendig, um in die nächste Interphase eintreten zu können (s.o). Wenn der Großteil der Zellen nach dem Zyklus 16 in die G1-Phase übergeht, kann Cyclin A nicht mehr akkumulieren, da der mitotisch induzierte Abbau auch in dieser Phase noch aktiv ist (Sgrist und Lehner, 1997).

In *Cyclin A*-Mutanten erlaubt die maternal bereitgestellte mRNA, dass bis Zyklus 16 eine normale Entwicklung stattfinden kann. Durch das Fehlen der zygotischen Transkription ab Zyklus 14 und den kontinuierlichen Abbau der maternalen mRNA kann Cyclin A nicht mehr in hohen Dosen akkumuliert werden. Die drastische Verringerung der Cyclin A-Konzentration ist schon in Zyklus 15 detektierbar, wenn praktisch kein Cyclin A mehr nachgewiesen werden kann (Lehner und O'Farrell, 1989). Infolge arretieren die Zellen in der G2-Phase von Zyklus 16 und die Mitose 16 findet nicht statt. Ist Cyclin A also für den Eintritt in die Mitose notwendig? Da Cyclin A auch eine Funktion während der S-Phase besitzt (Lehner et al., 1991; Sprenger et al., 1997) besteht die Möglichkeit,

dass Cyclin A bei der Vollendung der DNA-Replikation eine Rolle spielt (Lehner und O'Farrell, 1989; Lehner et al., 1991). Eine nicht vollendete S-Phase würde durch Aktivierung des DNA-checkpoints den Eintritt in die Mitose verhindern. Somit wäre das Ausbleiben der Mitose 16 in *Cyclin A* Mutanten auf die S-Phase Funktion von Cyclin A zurückzuführen und nicht auf eine mitotische Funktion. Dies scheint aber nicht der Fall zu sein (Jacobs et al., 2001), sodass man davon ausgehen kann, dass der G2-Arrest in *Cyclin A* Mutanten darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen nicht in die Mitose eintreten können. Dass trotz des *Cyclin A*-mutanten Hintergrundes die Mitosen bis zu Zyklus 16 ablaufen können, zeigt, dass schon geringe Mengen Cyclin A in Anwesenheit von Cyclin

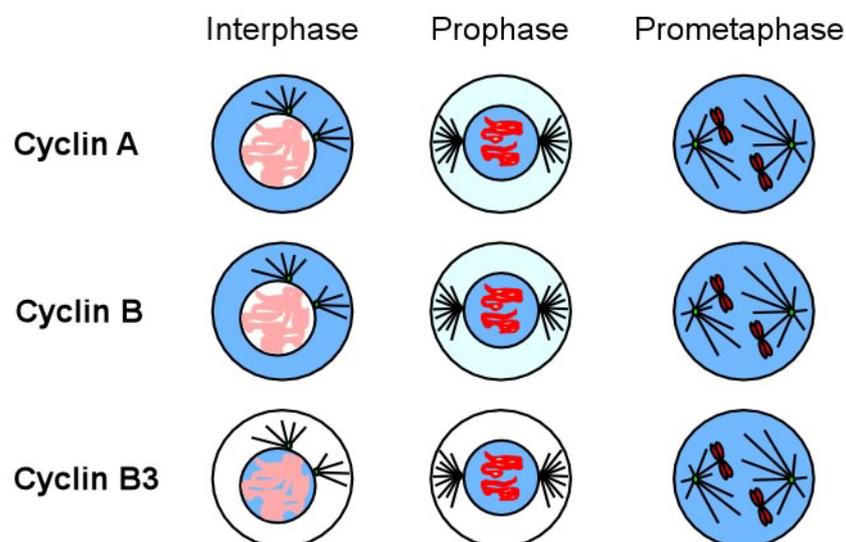


Abb. 2: Die Lokalisierung der mitotischen Cycline in *Drosophila*. Cyclin A und Cyclin B lokalisieren während der Interphase im Cytoplasma, während Cyclin B3 im Kern residiert. Mit dem Beginn der Prophase akkumulieren Cyclin A und Cyclin B auch im Kern. Nach der Auflösung der Kernmembran während der Prometaphase verteilen sich die Cycline in der ganzen Zelle und werden später sequentiell in der Metaphase und Anaphase abgebaut (nicht gezeigt).

B für den Zellzyklus ausreichen. Obwohl Cyclin A und Cyclin B teilweise überlappende Funktionen besitzen (Knoblich und Lehner, 1993) zeigt der Arrest in Zyklus 16, dass Cyclin A eine einzigartige Funktion ausüben muß, die von Cyclin B nicht übernommen werden kann.

Worin besteht die einzigartige Funktion von Cyclin A? Ein interessanter Aspekt der mitotischen Cycline in *Drosophila* ist die subzelluläre Lokalisierung (Abb. 2). Cyclin A und Cyclin B sind während der Interphase im Zytoplasma lokalisiert und akkumulieren

während der Prophase im Kern (Huang und Raff, 1999; Lehner und O'Farrell, 1989). Nach der Auflösung der Kernmembran in der Prometaphase verteilen sich Cyclin A und Cyclin B in der ganzen Zelle. Cyclin B3 ist bis zur Prometaphase im Kern lokalisiert und verteilt sich danach auch in der ganzen Zelle. Die spezifischen Funktionen der drei Cycline während der Mitose sind aufgrund der wenigen funktionellen Untersuchungen nicht genau bekannt.

Der *Cyclin A* mutante Phänotyp und die dynamische subzelluläre Lokalisierung legen in Analogie zu humanem Cyclin B1 den Schluß nahe, dass Cyclin A beim Eintritt in die Mitose für kernspezifische Vorgänge wie die Auflösung der Kernmembran und der Kondensierung der DNA notwendig ist.

Zielsetzung der Arbeit

Cyclin A ist in *Drosophila* das einzige essentielle mitotische Cyclin und zeigt eine dynamische zellzyklusabhängige Lokalisierung, wie sie für Cyclin B1 in menschlichen Fibroblasten beschrieben wurde (Lehner & O'Farrell, 1989; Pines & Hunter, 1991). Während der Interphase ist Cyclin A im Zytoplasma lokalisiert und akkumuliert in der Prophase im Kern. Es wird angenommen, dass diese Akkumulierung zur Induktion von prophasespezifischen Vorgängen wie der Kondensation der Chromosomen und der Auflösung der Kernmembran benötigt wird.

In der vorliegenden Arbeit soll durch funktionelle *in vivo* Analysen die Bedeutung der subzellulären Lokalisierung von Cyclin A aufgeklärt werden. Die *Cyclin A* Mutation ist durch einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase von Zellzyklus 16 und durch embryonale Letalität charakterisiert. In solch einem mutanten Hintergrund können Cyclin A-Proteine, deren Lokalisierung durch heterologe Lokalisierungssignale verändert wurde, auf Funktionalität getestet werden. Dabei sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Durch die Expression der verschieden lokalisierten Cyclin A-Konstrukte im *Cyclin A* mutanten Hintergrund soll herausgefunden werden, ob die Konstrukte den Cyclin A mutanten Phänotyp überwinden und die Mitose 16 induzieren können. Weiterhin soll geklärt werden, ob die Konstrukte den embryonal letalen Phänotyp von *Cyclin A* überwinden können und eventuell adulte Fliegen entstehen lassen können.

Cyclin A nimmt in *Drosophila* und Vertebraten eine Sonderstellung ein, weil es neben den mitotischen Aufgaben auch Aspekte der S-Phase reguliert (Lehner und O'Farrell,

1990; Lehner et al., 1991; Pagano et al., 1992). Für die S-Phase-Funktion von Cyclin A soll ebenfalls getestet werden, ob die subzelluläre Lokalisierung von Bedeutung ist.

Um den Mechanismus und die Regulation der Lokalisierung von Cyclin A aufzuklären, soll untersucht werden, ob Cyclin A einem Kern-Zytoplasma-„shuttling“ unterliegt und ob Autophosphorylierungen bei der Relokalisierung eine Rolle spielen.

Die Aufklärung der funktionellen Bedeutung der Lokalisierung von Cyclin A in *Drosophila* kann zum Verständnis der Zellzykluskontrolle auf subzellulärer Ebene beitragen.

2. Ergebnisse

2.1 Analyse der funktionellen Bedeutung der Lokalisierung von Cyclin A für die Mitose

Cyclin A ist in *Drosophila* ein essentielles Gen und es wird angenommen, dass Cyclin A für mitotische Vorgänge im Kern, wie der Auflösung der Kernmembran und der Kondensation der Chromosomen benötigt wird. Cyclin A ist während der Interphase im Zytoplasma lokalisiert und akkumuliert in der Prophase im Kern (Lehner und O'Farrell, 1989). Es wurde bisher aber nicht gezeigt, ob die Akkumulierung im Kern für die mitotische Funktion von Cyclin A notwendig ist.

Um Aufschluß über den Einfluß der Lokalisierung auf die Funktion von Cyclin A zu bekommen, sollen unter genetisch gut kontrollierbaren Bedingungen verschiedene Cyclin A-Konstrukte *in vivo* analysiert werden. Die Konstrukte unterscheiden sich von wildtypischem Cyclin A durch heterologe Lokalisierungssignale, die entweder zu einer konstitutiven Kernlokalisierung führen oder die Akkumulierung im Kern verhindern. Die Cyclin A-Konstrukte sollen im *Cyclin A* mutanten Hintergrund daraufhin untersucht werden, ob sie in der Lage sind, trotz einer veränderten Lokalisierung die wildtypische Funktion von Cyclin A zu übernehmen.

In Abb. 3 sind die Cyclin A-Konstrukte schematisch dargestellt. Alle Konstrukte sind mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop markiert, das *in vivo* die Unterscheidung zwischen dem endogenen und dem transgenen Protein ermöglicht. Das HA-Epitop selbst hat keinen Einfluß auf die Lokalisierung (Dienemann, 1999; Kaspar et al., 2001). Um eine konstitutive Kernlokalisierung zu erreichen, wurde Cyclin A mit der Kernlokalisierungssequenz (nuclear localization sequence = NLS) (Görlich und Mattaj, 1996) vom SV40-large T antigen fusioniert. Die Funktionalität von rekombinanten NLS ist für *Drosophila* bekannt (Davis et al., 1995). Wenn dieses Konstrukt in *Drosophila* Embryonen exprimiert wird, dann wird schon während der Interphase eine Kernlokalisierung erwartet. Das Kernexportsignal (nuclear export signal = NES) vom Protein Kinase A Inhibitor aus *H. sapiens* (Gerace, 1995; Görlich und Mattaj, 1996) vermittelt den Transport von Proteinen aus dem Kern heraus. Mit diesem Konstrukt soll die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase verhindert werden. Um neben

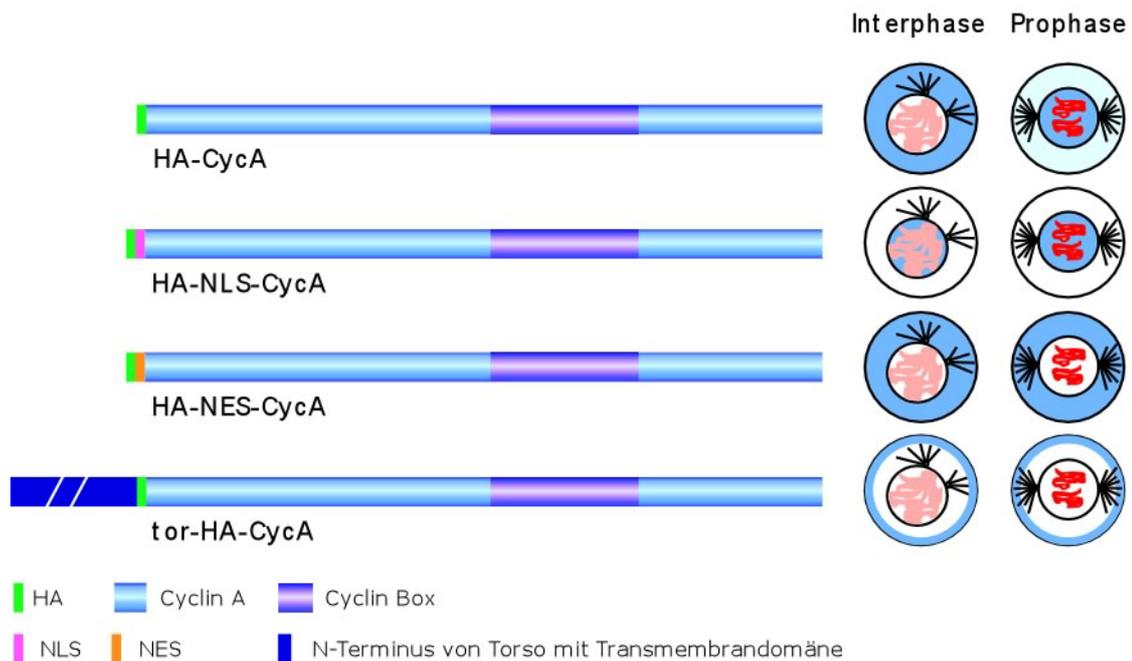


Abb. 3: Schematische Darstellung der Cyclin A-Konstrukte und ihrer Lokalisierung. Da sich das HA-Epitop nicht auf die Lokalisierung auswirkt, ist das HA-Cyclin A wie wildtypisches Cyclin A lokalisiert. Während der Interphase befindet es sich im Zytoplasma und akkumuliert in der Prophase im Kern. Um eine Kernlokalisierung schon während der Interphase zu erreichen, wurde Cyclin A mit der NLS vom SV40-large T antigen fusioniert. Die Akkumulierung im Kern soll durch die NES verhindert werden. Die Verankerung von Cyclin A in der Zellmembran durch die Transmembrandomäne von Torso verhindert nicht nur die Akkumulierung von Cyclin A im Kern sondern auch das „shuttling“ zwischen Kern und Zytoplasma.

der Kernakkumulierung sogar das „shuttling“ von löslichen Proteinen zwischen dem Kern und dem Zytoplasma zu verhindern, wurde Cyclin A in der Zellmembran verankert. Hierzu wurden der extrazelluläre-, der transmembrane und ein Stück des intrazellulären Teils des Transmembranrezeptors *torso* verwendet (Sprenger und Nüsslein-Volhard, 1992).

Die Konstrukte wurden als UAS-Transgene stabil in das Fliegen-genom integriert (Rubin und Spradling, 1982). Die rekombinanten NLS- und NES-Lokalisierungssignale wurden schon mit Cyclin A Transgenen, die mit dem Hitzeschockpromotor aktiviert werden konnten, beschrieben (Dienemann, 1999). Das UAS/Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993) erlaubt jedoch eine zeitlich und räumlich besser kontrollierbare und reproduzierbarere *in vivo* Analyse. Bevor die UAS-Konstrukte funktionell im *Cyclin A* mutanten Hintergrund untersucht werden, wird anhand von biochemischen Daten die Expressionsstärke und die Aktivität der Transgene gezeigt. Außerdem wird die Lokalisierung der Konstrukte *in vivo* detailliert dargestellt.

2.1.1 Expression und Aktivität der Konstrukte

Die Transgene wurden zunächst auf Expressionsstärke des entsprechenden Konstruktes hin untersucht. Dies ist für die Funktionalitätstests wichtig, da von den inserierten Konstrukten vergleichbare und vom Wildtyp nicht zu stark abweichende Proteinmengen exprimiert werden sollten. Um die Proteinmengen der Transgene mit der Menge an endogenem Cyclin A vergleichen zu können, wurden die anti-Cyclin A- und die anti-HA-Antikörper standardisiert. Hierfür wurden in einem Western Blot gleiche Mengen *in vitro* translatiertes HA-Cyclin A mit verschiedenen Verdünnungen der beiden Antikörper inkubiert (Abb. 4 A). In den Spuren 2 und 6 wird HA-Cyclin A von beiden Antikörpern annähernd gleich gut erkannt. Mit diesen Antikörper-Verdünnungen wurden dann Embryonenextrakte getestet (Abb. 4 B). Dabei wurden wildtypische Embryonenextrakte mit Extrakten verglichen, die das HA-Cyclin A Transgen unter der Kontrolle der *pairedGal4* (*prdGal4*)-Aktivatorlinie bei 25°C exprimierten. Die Embryonenextrakte waren 3-6 Std alt, was den Stadien 8-10 entspricht, also in einem Zeitfenster, in dem *prdGal4* aktiv ist (Sigrist und Lehner, 1997). Der Vergleich der Spuren 2 und 6 zeigt, dass die Proteinmenge von HA-Cyclin A ca. um einen Faktor 10 geringer ist als die Menge an endogenem Cyclin A, da man zehnmal mehr Embryonen einsetzen muß, um ein vergleichbares Signal zu erhalten.

Um nun die Proteinmengen der Konstrukte mit der Menge an endogenem Cyclin A vergleichen zu können, muß bedacht werden, dass die *prdGal4*-Aktivatorlinie kein ubiquitärer Aktivator ist, sondern die Expression in jedem zweiten Segment vermittelt. Dadurch exprimieren weniger als die Hälfte aller Zellen des Embryos HA-Cyclin A. Zusätzlich wird in den analysierten Embryonensammlungen nur in der Hälfte der Embryonen das Konstrukt exprimiert, da nicht in allen Embryonen das Konstrukt und die Aktivatorlinie gleichzeitig vorliegen. Mit diesen Vorüberlegungen bedeutet der Faktor 10, dass die Konstrukte maximal 25% der endogenen Cyclin A Menge erreichen. In den Funktionalitätstests liegt die von den Konstrukten exprimierte Proteinmenge also unterhalb der Menge an endogenem Cyclin A. Somit handelt es sich nicht um generelle Überexpression, wodurch die Analyse der Konstrukte sensitiv genug durchgeführt werden kann.

In Abb. 4C wurde die Expressionsstärke aller Transgene verglichen, die für die Funktionalitätstests verwendet wurden. Die Expressionsstärke der jeweiligen Transgene wurde mit der von HA-Cyclin A verglichen. Um eine bessere Abschätzung der

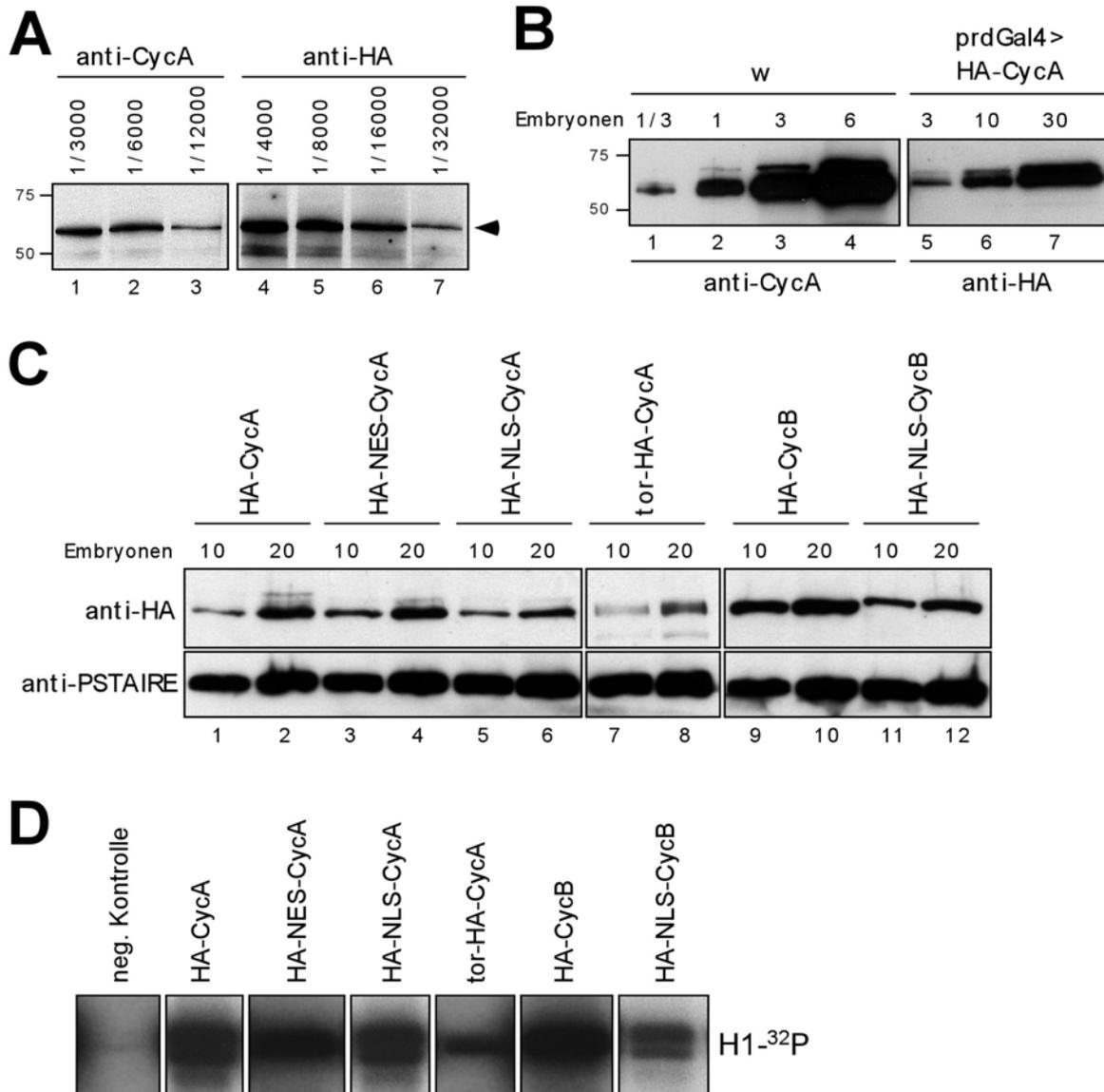


Abb. 4: Expressionsstärke und Aktivität der transgenen Konstrukte. In (A) wurden die anti-Cyclin A und die anti-HA Antikörper standardisiert. HA-Cyclin A wurde *in vitro* translatiert. 2% des reduzierten Translationsansatzes wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit den angegebenen Antikörperverdünnungen inkubiert. Die Spuren 2 und 6 zeigen vergleichbar starke Cyclin A-Signale (Pfeilkopf). Um die von den Transgenen exprimierte Menge an Cyclin A mit dem endogenen Cyclin A vergleichen zu können wurden mit diesen Antikörperverdünnungen in (B) wildtypische Embryonenextrakte und Extrakte, die HA-Cyclin A unter der Kontrolle von *prdGal4* exprimieren getestet. Die angegebenen Mengen an Embryonen wurde in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit 1/6000 anti-Cyclin A bzw. mit 1/16000 anti-HA inkubiert. Die Spuren 2 und 6 zeigen vergleichbare Signale. Es müssen ca. zehnmals mehr transgene Embryonen aufgetragen werden, um wildtypische Cyclin A Mengen zu erreichen. Die Expression von den restlichen Transgenen wurde in (C) mit HA-Cyclin A verglichen. Die angegebenen Mengen an Embryonen wurde in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem anti-HA inkubiert. Die Expression der Transgene ist vergleichbar stark. tor-HA-Cyclin A erscheint etwas schwächer, weil der anti-HA Antikörper das Epitop schlechter erkennt. Die Färbung mit anti-PSTAIRE diente als Ladungskontrolle. In (D) wurden die Konstrukte *in vitro* in einem Kinase Assay getestet. Die Aktivität von tor-HA-Cyclin A ist schwächer, weil in dem *in vitro* Translationssystem die Menge an funktionellem tor-HA-Cyclin A geringer ist. Die Zahlen am linken Bildrand in (A) und (B) markieren das Molekulargewicht in kDa.

Proteinmengen vornehmen zu können, wurden jeweils zwei verschiedene Konzentrationen der exprimierten Transgene in einem Western Blot getestet. Die Proteinmengen von HA-Cyclin A und HA-NES-Cyclin A sind annähernd gleich (vgl. Spuren 1-4). Das HA-NLS-Cyclin A Transgen wird etwas geringer exprimiert (vgl. Spuren 1,2 mit 5,6). Die Proteinmenge von tor-HA-Cyclin A erscheint sehr viel geringer als von HA-Cyclin A (vgl. Spuren 1,2 mit 7,8). Das liegt wahrscheinlich daran, dass der anti-HA Antikörper das HA-Epitop bei diesem Transgen schlechter erkennt, weil das HA-Epitop innerhalb des Proteins liegt. Wenn das HA-Epitop hingegen frei am N-Terminus vorliegt, kann es sehr gut erkannt werden (vgl. Abb. 4 A). Das HA-Cyclin B und das HA-NLS-Cyclin B Transgen werden zusätzlich bei den Funktionalitätstests analysiert. Das HA-NLS-Cyclin B Transgen wird ähnlich stark exprimiert wie HA-Cyclin A (vgl. Spuren 1,2 mit 11,12) und das HA-Cyclin B Transgen zeigt bei diesen Vergleichen die stärkste Expression (Spuren 9,10). Der Nachweis von Cdk1 mit dem anti-PSTAIR Antikörper diente als Ladungskontrolle.

Zusammengenommen zeigen die biochemischen Expressionstudien, dass die Transgene untereinander in vergleichbaren Mengen vorliegen aber nicht die endogene Menge an Cyclin A erreichen, sondern etwa zwei- bis dreimal schwächer exprimiert werden.

Die rekombinanten Lokalisierungssignale und das HA-Epitop haben keine Auswirkungen auf die Eigenschaft der Cycline ihre Partnerkinase Cdk1 zu binden und zu aktivieren. Dies wurde *in vitro* durch die Phosphorylierung des Substrates Histon H1 gezeigt (Abb. 4 D). Die Aktivität von tor-HA-Cyclin A ist schwächer, weil in dem *in vitro* Translationssystem die Menge an funktionellem tor-HA-Cyclin A geringer ist. Dies liegt daran, dass in dem Translationssystem keine Endomembranen vorhanden sind und deshalb bei Membranproteinen die Topologie beeinträchtigt ist.

2.1.2 Lokalisierung der Cyclin A-Konstrukte während des Zellzyklus

Nach der Analyse der Expression und Aktivität der Cyclin A-Konstrukte (Abb. 4), wurde durch immunohistochemische Fluoreszenzfärbungen kontrolliert, ob die Konstrukte auch die aus Abb. 3 erwartete subzelluläre Lokalisierung aufwiesen. Da die Cyclin A-Konstrukte mit dem HA-Epitop markiert sind, kann ihre Lokalisierung mit dem anti-HA Antikörper nachgewiesen und von der Lokalisierung des endogenen Cyclin A unterschieden werden. Um dem Verlauf des Zellzyklus detailliert folgen zu können wurden zusätzlich die Zellkernmembran und die DNA sichtbar gemacht. Die

Zellkernmembran wurde mit Agglutinin, einem Lektin aus dem Weizenkeim (wheat germ agglutinin = WGA), sichtbar gemacht, welches Glykoproteine der Kernlamina bindet. Die Färbung der Zellkernmembran dient als Marker, um zwischen den Kompartimenten Kern und Zytoplasma unterscheiden zu können. Die DNA wurde entweder mit Propidiumiodid oder mit dem anti-PH3 Antikörper nachgewiesen. Propidiumiodid ist ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen die Basen der DNA interkaliert. Der anti-PH3 Antikörper erkennt phosphoryliertes Histon H3 und ist somit ein spezifischer mitotischer Marker, da das PH3-Signal mit der Aktivität der Cdk1 korreliert ist (Bradbury, 1992; Hanks et al., 1983; Su et al., 1998).

In Abb. 5 ist die Lokalisierung von HA-Cyclin A dargestellt. HA-Cyclin A wurde mit der ubiquitären Aktivatorlinie maternalGal4 (matGal4) exprimiert. Diese Aktivatorlinie führt ab dem Blastodermstadium zu starker Expression in allen Geweben. Der in (A) und (B) dargestellte Embryo befindet sich in Zellzyklus 14, was ca. dem Stadium 7 entspricht. Anhand der PH3-Färbung in (B) sind die mitotischen Domänen erkennbar, die durch die lokale Aktivität von String reguliert werden (Edgar und O'Farrell, 1990; Foe, 1989). Die HA-Färbung in (A) zeigt deutlich, dass HA-Cyclin A zum größten Teil zytoplasmatisch und nur in den mitotischen Domänen im Kern lokalisiert oder gleichmäßig verteilt ist. Innerhalb der mitotischen Domänen ist HA-Cyclin A in den Zellen, die sich jenseits der Metaphase befinden bereits abgebaut und nicht mehr nachweisbar. In (C) sind einzelne Zellen vergrößert dargestellt und gemäß der Abfolge der Zellzyklusphasen angeordnet. In der Interphase ist HA-Cyclin A im Zytoplasma lokalisiert. Das WGA-Signal trennt deutlich den Kern und das Zytoplasma und es ist kein PH3-Signal detektierbar. Während der Prophase akkumuliert HA-Cyclin A im Kern. Dies ist anhand von zwei Prophasekernen dargestellt, die durch den zunehmenden Kondensationsgrad der DNA unterschieden werden können. In der frühen Prophase mit geringerer DNA Kondensation (links) ist HA-Cyclin A gleichmäßig in Kern und Zytoplasma verteilt. In der späteren Prophase mit stärkerer DNA Kondensierung (rechts) hat die Kernakkumulation ihren Höhepunkt erreicht und HA-Cyclin A ist hauptsächlich im Kern lokalisiert. Im Zuge der Prometaphase wird die Fragmentierung der Zellkernmembran durch die schwächer werdende WGA-Färbung offensichtlich. Durch das Wegfallen der Barriere zwischen den Kompartimenten wird HA-Cyclin A in der ganzen Zellen gleichmäßig verteilt. Während der Metaphase, wenn die DNA den höchsten Kondensationsgrad erreicht und in der Metaphasenplatte angeordnet wird, wird HA-Cyclin A abgebaut. Es gibt

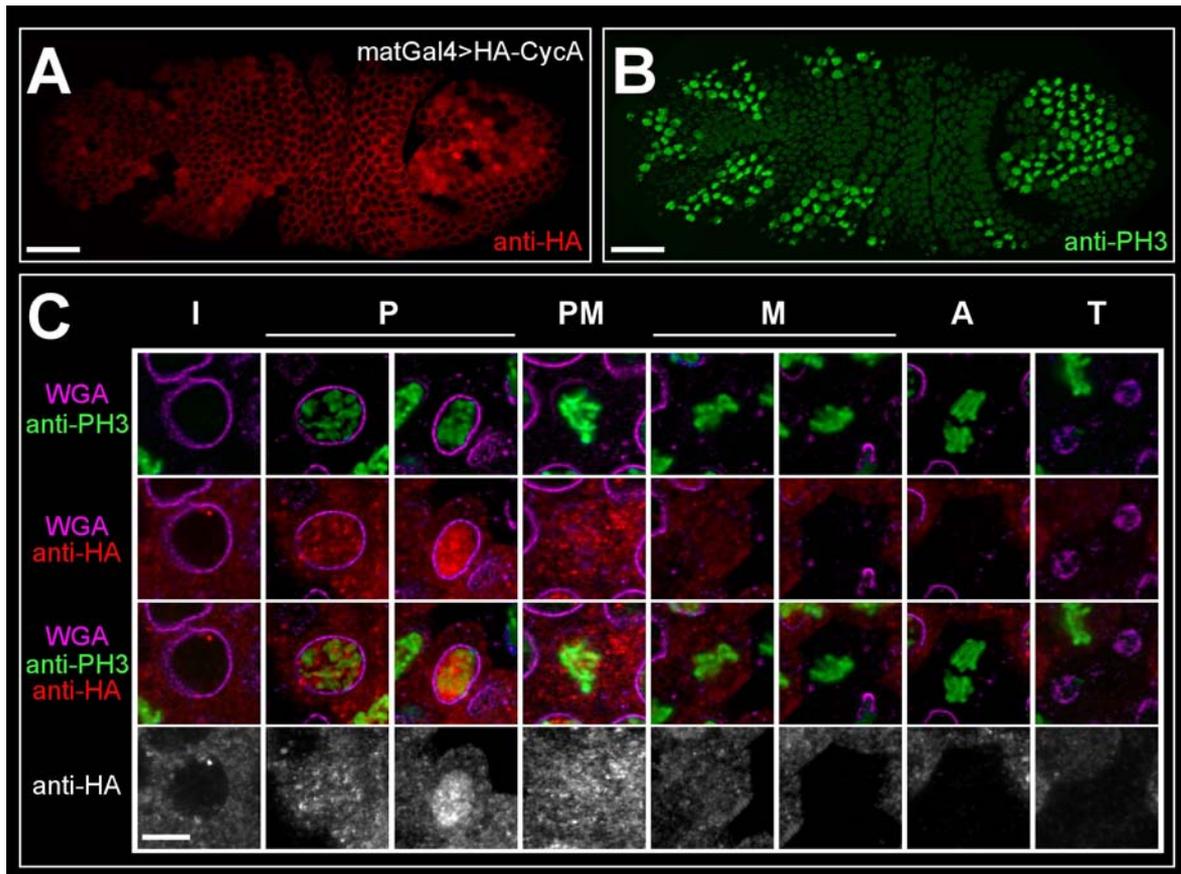


Abb. 5: Lokalisierung von HA-Cyclin A. Die Expression von HA-Cyclin A wurde mit *matGal4* aktiviert. Der in (A) und (B) dargestellte Embryo befindet sich in Zellzyklus 14 (ca. Stadium 7). Die PH3-Signale in (B) markieren die mitotischen Domänen. In (A) ist die hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisierung von HA-Cyclin A zu erkennen. Nur in den mitotischen Domänen akkumuliert HA-Cyclin A im Kern oder ist gleichmäßig in der Zelle verteilt. In (C) wurden einzelne Zellen vergrößert und gemäß der Abfolge der mitotischen Phasen angeordnet. In der Interphase (I) ist kein PH3-Signal nachweisbar und HA-Cyclin A ist im Zytoplasma lokalisiert. Während der Prophase (P) beginnt die DNA Kondensierung, das PH3-Signal verstärkt sich und HA-Cyclin A akkumuliert im Kern. Nach der Auflösung der Kernmembran in der Prometaphase (PM) erscheint HA-Cyclin A in der ganzen Zelle verteilt. In der Metaphase (M), wenn die DNA in der Metaphasenplatte angeordnet ist, wird HA-Cyclin A abgebaut und kann in den nachfolgenden Phasen (Anaphase (A) und Telophase (T)) nicht mehr detektiert werden. Die Balken in (A) und (B) entsprechen 50µm, in (C) 5µm.

Metaphasen in denen HA-Cyclin A noch vorhanden ist, und solche, in denen es verschwunden ist. In den restlichen mitotischen Phasen ist kein HA-Cyclin A mehr detektiert. Nach der Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase bilden sich im Laufe der Telophase wieder Kernmembranen um die dekodensierende DNA. Dies ist am Erscheinen des WGA-Signals und dem Verschwinden der PH3-Färbung zu erkennen.

Um die graduelle Akkumulierung von HA-Cyclin A während der Prophase detaillierter zu beschreiben, wurden Zellen anhand der fortschreitenden DNA Kondensierung angeordnet (Abb. 6). In der Interphase ist HA-Cyclin A im Zytoplasma lokalisiert und es kann kein PH3-Signal nachgewiesen werden. Mit dem Auftreten des PH3-Signals zu Beginn der Prophase ist auch HA-Cyclin A im Kern detektierbar. Im weiteren Verlauf der Prophase korreliert die stärker werdende DNA Kondensierung mit der Kernakkumulierung von HA-Cyclin A. Sowohl die dynamische subzelluläre Lokalisierung als auch der Zeitpunkt des Abbaus von HA-Cyclin A entsprechen also dem des wildtypischen Cyclin A (Dienemann, 1999; Lehner und O'Farrell, 1989). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase ein gradueller Prozess ist, der mit der stärker werdenden DNA-Kondensierung korreliert.

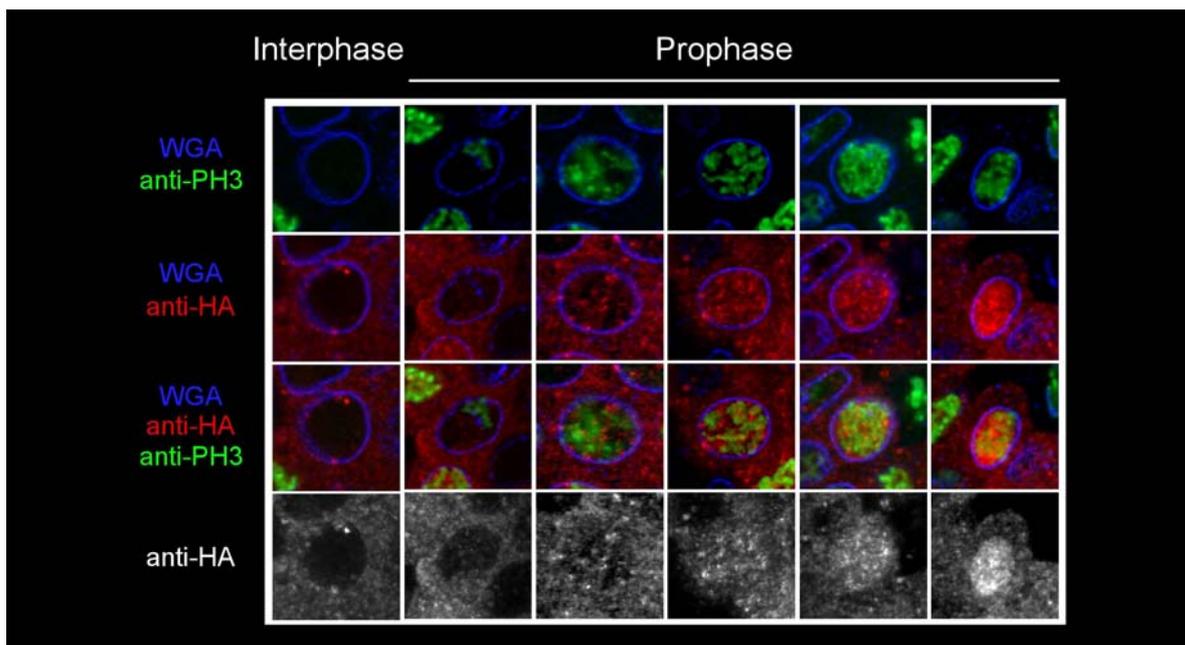


Abb. 6: Die Kernakkumulierung von HA-Cyclin A scheint mit der fortschreitenden DNA Kondensierung zu korrelieren. Alle vergrößerten Zellen entstammen dem in Abb. 5 dargestellten Embryo. Mehrere Prophasezellen wurden anhand der fortschreitenden DNA Kondensierung angeordnet. In der Interphase ist HA-Cyclin A im Zytoplasma lokalisiert. In dieser Zelle ist kein PH3-Signal detektierbar. Der Beginn der Prophase ist durch das Auftreten des PH3-Signals erkennbar. Mit dem Beginn der Prophase ist auch HA-Cyclin A im Kern nachweisbar. Die Akkumulierung von HA-Cyclin A im Zellkern korreliert im weiteren Verlauf der Prophase mit der stärker werdenden DNA Kondensierung.

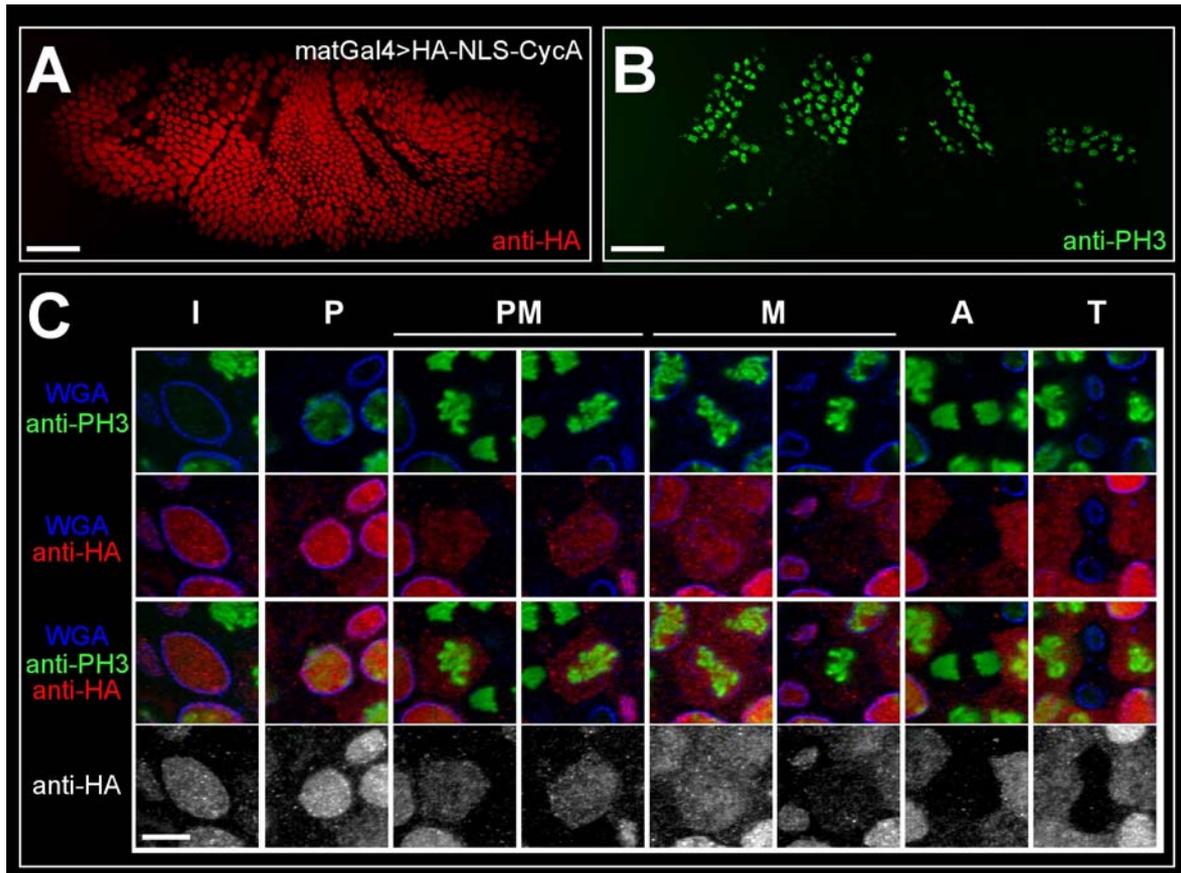


Abb. 7: Lokalisierung von HA-NLS-Cyclin A. Die Expression von HA-NLS-Cyclin A wurde mit matGal4 aktiviert. Der in (A) und (B) dargestellte Embryo befindet sich in Zellzyklus 14 (ca. Stadium 7). Die PH3-Signale in (B) markieren die mitotischen Domänen. In (A) ist die konstitutive Kernlokalisierung von HA-NLS-Cyclin A schon zu erkennen. In den mitotischen Domänen lassen die Bereiche, in denen kein HA-NLS-Cyclin A nachweisbar ist darauf schließen, dass das Konstrukt normal abgebaut wird. In (C) wurden einzelne Zellen vergrößert und gemäß der Abfolge der mitotischen Phasen angeordnet. In der Interphase (I) ist kein PH3-Signal nachweisbar und HA-NLS-Cyclin A ist im Kern lokalisiert. In der Prophase (P) wird durch die PH3-Färbung die kondensierende DNA sichtbar. Nach der Auflösung der Kernmembran in der Prometaphase (PM) erscheint HA-NLS-Cyclin A in der ganzen Zelle verteilt. In der Metaphase (M) wird HA-NLS-Cyclin A schließlich abgebaut und kann in den nachfolgenden Phasen (Anaphase (A) und Telophase (T)) nicht mehr detektiert werden. Die Balken in (A) und (B) entsprechen 50µm, in (C) 5µm.

Das NLS soll zu einer konstitutiven Kernlokalisierung führen, und somit Cyclin A schon während der Interphase in den Kern lokalisieren (s. Abb. 3). Die Abb. 7 dokumentiert die Lokalisierung von HA-NLS-Cyclin A. Auch in dieser Lokalisierungsstudie wurde das Transgen mit der Aktivatorlinie matGal4 exprimiert. Der in (A) und (B) dargestellte Embryo befindet sich in Zellzyklus 14 (entspricht Stadium 7). Die PH3-Signale in (B) markieren die mitotischen Domänen und die konstitutive Kernlokalisierung von HA-NLS-Cyclin A ist schon in (A) sehr gut zu erkennen. In den mitotischen Domänen lassen die

Bereiche, in denen kein HA-NLS-Cyclin A detektiert wird darauf schließen, dass HA-NLS-Cyclin A normal abgebaut wird. Bei den vergrößerten Zellen in (C) ist deutlich auszumachen, dass während der Interphase, also in Abwesenheit von PH3-Signalen, das HA-NLS-Cyclin A im Kern lokalisiert ist. In der Prometaphase, wenn die Kernmembran defragmentiert wird, verteilt sich HA-NLS-Cyclin A in der ganzen Zelle und wird schließlich während der Metaphase abgebaut. Während der Ana- und Telophase ist kein HA-NLS-Cyclin A mehr nachweisbar. Wie erwartet führt die rekombinante NLS zu einer konstitutiven Kernlokalisierung und ist damit dominant über endogene Lokalisierungssignale in Cyclin A. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das HA-NLS-Cyclin A wie wildtypisches Cyclin A abgebaut wird.

Das rekombinante NES soll die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase verhindern (s. Abb. 3). In Abb. 8 ist die Lokalisierung von HA-NES-Cyclin A dargestellt. Die Expression wurde mit *matGal4* aktiviert. Der in (A) und (B) gezeigte Embryo befindet sich in Zellzyklus 14 (ca. Stadium 7). In den mitotischen Domänen, die in (B) durch die PH3-Signale markiert sind, können in (A) keine Prophasen anhand der Kernakkumulierung erkannt werden. Das deutet darauf hin, dass die starke Kernakkumulierung, wie sie für Cyclin A in der Prophase typisch ist, durch das NES verhindert wird. Die Bereiche in den mitotischen Domänen, wo kein HA-NES-Cyclin A mehr nachgewiesen werden kann zeigen, dass das Konstrukt normal abgebaut wird. In der Interphase ist HA-NES-Cyclin A im Zytoplasma lokalisiert (C). Während der Prophase kann HA-NES-Cyclin A nicht wie wildtypisches Cyclin A im Kern akkumulieren (vgl. Abb. 5). Jedoch können sowohl in frühen als auch in späten Prophasen geringe Mengen an HA-NES-Cyclin A im Kern nachgewiesen werden. Mit der Fragmentierung der Kernmembran in der Prometaphase kann das HA-NES-Cyclin A in der ganzen Zelle verteilt werden und wird schließlich in der Metaphase abgebaut. Das Konstrukt kann anschließend weder in der Anaphase noch in der Telophase nachgewiesen werden.

Die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase konnte als gradueller Prozeß beschrieben werden (vgl. Abb. 6). Es wird angenommen, dass Cdk1/Cyclin A-Komplexe an der Auflösung der Kernmembran beteiligt sind (Lehner und O'Farrell, 1989; Peter et al., 1991). Es ist allerdings nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt die Fragmentierung der Kernmembran beginnt. Da die Lokalisierung des HA-NES-Cyclin A-Konstruktes im wildtypischen Hintergrund dokumentiert wurde, könnten die geringen Mengen an nukleärem HA-NES-Cyclin A während der Prophase

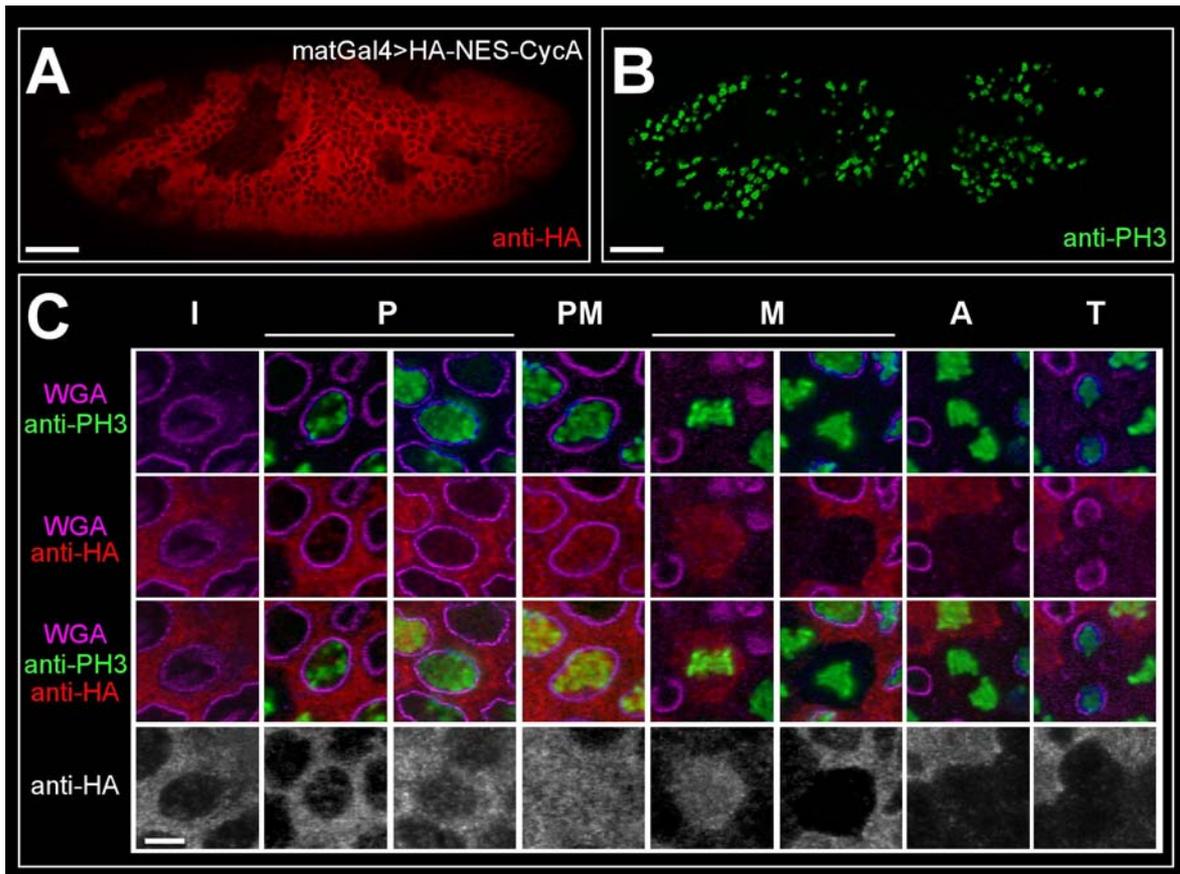


Abb. 8: Lokalisierung von HA-NES-Cyclin A. Die Expression von HA-NES-Cyclin A wurde mit *matGal4* aktiviert. Der in (A) und (B) dargestellte Embryo befindet sich in Zellzyklus 14 (ca. Stadium 7). Die PH3-Signale in (B) markieren die mitotischen Domänen. In (A) können innerhalb der mitotischen Domänen keine prophasespezifischen Kernakkumulierungen von HA-NES-Cyclin A erkannt werden. In den mitotischen Domänen lassen die Bereiche, in denen kein HA-NES-Cyclin A nachweisbar ist darauf schließen, dass das Konstrukt normal abgebaut wird. In (C) wurden einzelne Zellen vergrößert und gemäß der Abfolge der mitotischen Phasen angeordnet. In der Interphase (I) ist kein PH3-Signal nachweisbar und HA-NES-Cyclin A ist im Zytoplasma lokalisiert. In der Prophase (P) wird durch die PH3-Färbung die kondensierende DNA sichtbar. Obwohl keine Kernakkumulierungen während der Prophase gefunden werden können, wie sie für wildtypisches Cyclin A beschrieben sind, lassen sich geringe Mengen an HA-NES-Cyclin A im Kern nachweisen. Nach der Auflösung der Kernmembran in der Prometaphase (PM) erscheint HA-NES-Cyclin A in der ganzen Zelle verteilt. In der Metaphase (M) wird HA-NES-Cyclin A schließlich abgebaut und kann in den nachfolgenden Phasen (Anaphase (A) und Telophase (T)) nicht mehr detektiert werden.

Die Balken in (A) und (B) entsprechen 50µm, in (C) 5µm.

durch die beginnende Fragmentierung erklärt werden, die durch endogenes Cyclin A ausgelöst wird. Dadurch würde die Kernmembran den Kern nicht mehr vollständig schützen können und geringe Mengen an HA-NES-Cyclin A könnten an den Kernporen vorbei in den Kern eindiffundieren. Um dies zu testen, wurde HA-NES-Cyclin A mit der *prdGal4*-Aktivatorlinie im wildtypischen Hintergrund exprimiert und mit dem Antikörper

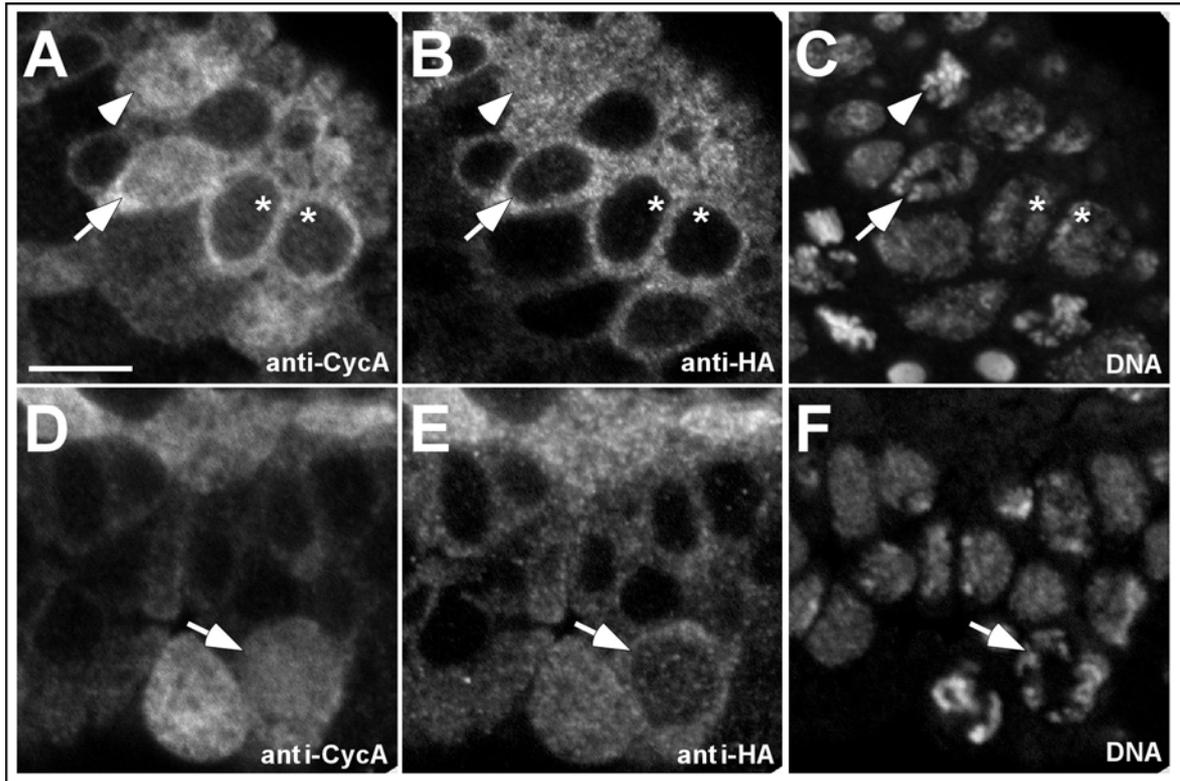


Abb. 9: Die schwache Kernlokalisierung von HA-NES-Cyclin A wird durch die graduelle Auflösung der Kernmembran ermöglicht. HA-NES-Cyclin A wurde unter der Kontrolle der *prdGal4*-Aktivatorlinie exprimiert und Embryonen im Stadium 9 wurden mit dem anti-Cyclin A und dem anti-HA Antikörper gefärbt. Die DNA wurde zur Unterscheidung der Kernphasen mit Propidiumiodid nachgewiesen. Die vergrößert dargestellten Zellen in (A)-(F) befinden sich in der Nähe der ventralen Mittellinie und zeigen verschieden weit fortgeschrittene Prophasen. In frühen Prophasen (Sterne in (A)-(C)) ist Cyclin A schwach im Kern lokalisiert und HA-NES-Cyclin A kann nur im Zytoplasma nachgewiesen werden. Mit der zunehmenden Akkumulierung von Cyclin A (Pfeile in (A) und (E)) ist auch HA-NES-Cyclin A schwach im Kern lokalisiert. Das starke zytoplasmatische Signal von Cyclin A kommt durch die Färbung mit dem anti-Cyclin A Antikörper, der neben dem endogenen Cyclin A auch das HA-NES-Cyclin A erkennt. Wenn die Kernakkumulierung von Cyclin A kurz vor dem Übergang zur Prometaphase maximal ist (Pfeilkopf in (A)) erscheint das HA-NES-Cyclin A gleichmäßig in der Zelle verteilt zu sein. Der Balken in (A) entspricht 10µm und gilt für alle Vergrößerungen.

gegen Cyclin A und mit dem anti-HA-Antikörper gefärbt. Zellen, die sich in der Prophase befinden und noch eine intakte Kernmembran haben, sollten also endogenes Cyclin A im Kern aufweisen. In derselben Zelle sollte das HA-NES-Cyclin A dagegen im Zytoplasma lokalisiert sein. Die DNA-Färbung mit Propidiumiodid dient zur Darstellung der mitotischen Phasen.

In Abb. 9 sind Zellen eines Embryos in Stadium 9 dargestellt, die sich in der Nähe der ventralen Mittellinie befinden. Die Lokalisierung von endogenem Cyclin A ist mit der von HA-NES-Cyclin A anhand von zwei Beispielen, (A)-(C) bzw. (D)-(F), verglichen worden.

Der Antikörper gegen Cyclin A weist sowohl das endogene Cyclin A als auch das HA-NES-Cyclin A nach. In den frühen Prophasen, die mit Sternen markiert sind (A)-(C), kann die beginnende DNA Kondensierung (C) erkannt werden und Cyclin A ist schwach im Kern detektierbar (A). Das HA-NES-Cyclin A ist zu diesem Zeitpunkt nur im Zytoplasma nachzuweisen (B). In der mit einem Pfeil markierten Zelle ist die Prophase schon fortgeschrittener (C). Cyclin A ist stärker im Kern akkumuliert, erscheint aber fast gleichmäßig in der Zelle verteilt (A). Das relativ starke zytoplasmatische Signal von Cyclin A ist z.T. durch das HA-NES-Cyclin A zu erklären, welches von dem α -Cyclin A Antikörper zusätzlich erkannt wird. Das HA-NES-Cyclin A ist sehr schwach im Kern lokalisiert (B). Nachdem die Prophase weiter vorangeschritten ist (Pfeil in F), wird die Kernakkumulierung von Cyclin A deutlicher (D) und die Menge an HA-NES-Cyclin A im Kern hat zugenommen. In einer sehr späten Prophase im Übergang zur Prometaphase, erkennbar an der starken DNA Kondensierung (Pfeilkopf in C), ist das endogene Cyclin A hauptsächlich im Kern akkumuliert (A). In dieser späten Prophase ist das HA-NES-Cyclin A homogen in der Zelle verteilt.

Die detaillierte Analyse der HA-NES-Cyclin A Lokalisierung im Vergleich zu endogenem Cyclin A zeigt, dass HA-NES-Cyclin A am Anfang der Prophase nicht im Kern akkumuliert. Das während der Prophase im Kern nachweisbare HA-NES-Cyclin A kann wahrscheinlich durch die sich auflösende Kernmembran eindiffundieren. Dies geschieht zeitlich gesehen, nachdem das endogene Cyclin A im Kern nachweisbar ist.

Die Verankerung von Cyclin A in der Zellmembran mit der Transmembrandomäne von *torso* soll verhindern, dass Cyclin A im Kern akkumulieren kann (s. Abb 3). Für eine primäre Analyse wurde mRNA in zellularisierende Embryonen injiziert, die für tor-HA-Cyclin A codiert. Nach zweistündiger Entwicklungszeit wurden die Embryonen fixiert und anschließend mit dem anti-HA Antikörper und dem anti-PH3 Antikörper angefärbt (Abb. 10). In (A) ist ein Embryo in Zellzyklus 14 (Stadium 7 oder 8) gezeigt. tor-HA-Cyclin A ist in direkter Nähe um die Injektionsstelle herum nachweisbar. In der Vergrößerung stellt sich die Lokalisierung von tor-HA-Cyclin A hauptsächlich als feines Signal dar, welches die Zellmembranen der einzelnen Zellen nachzeichnet (B). Zusätzlich sind punktförmige Signale im Zytoplasma sichtbar und auch das Zytoplasma selbst zeigt ein schwaches HA-Signal. Dies kommt wahrscheinlich durch die Reifung des membranständigen tor-HA-Cyclin A im Endomembransystem und durch Vesikel des sekretorischen Weges zustande.

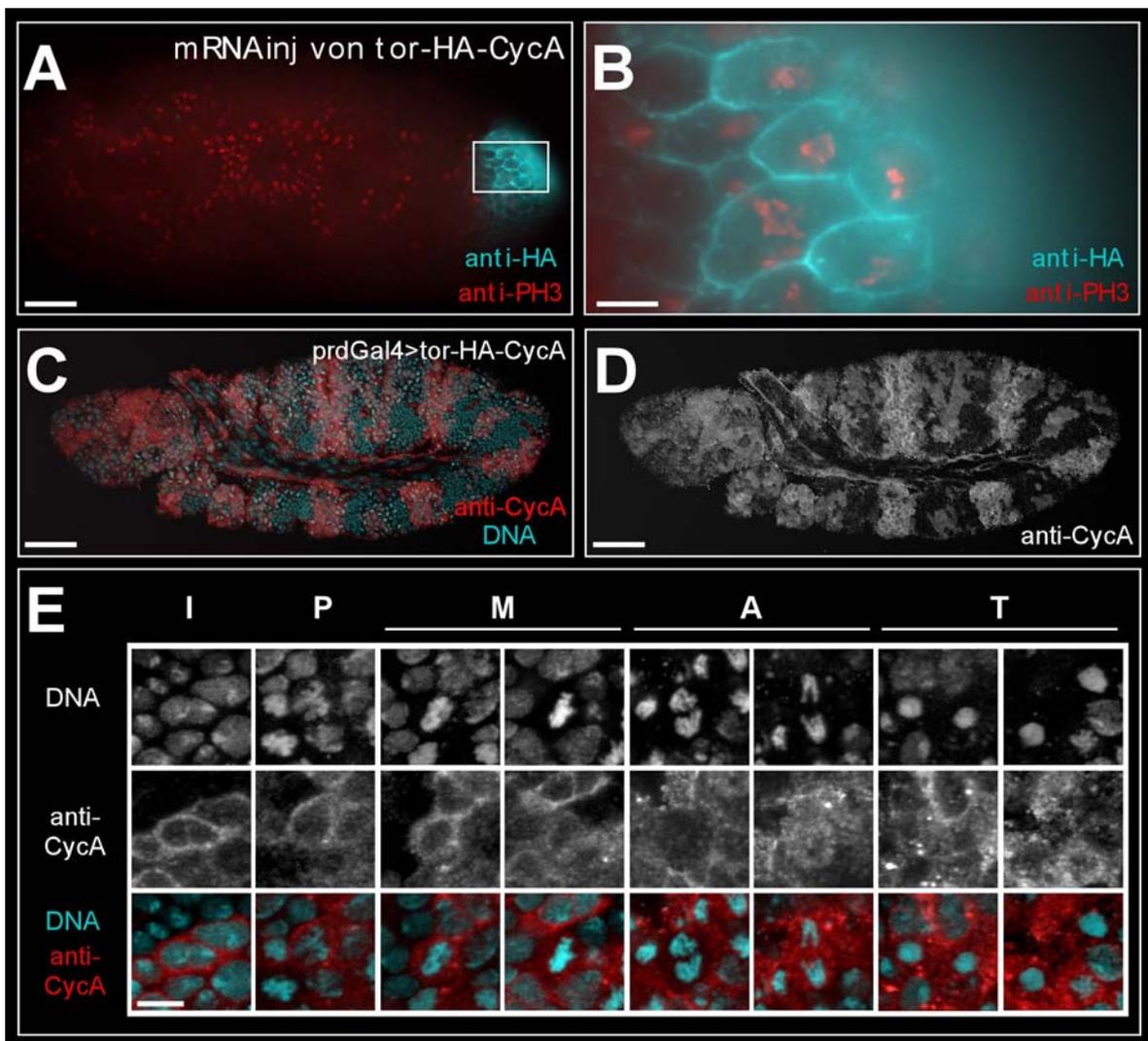


Abb. 10: Lokalisierung von tor-HA-Cyclin A. In (A) und (B) ist eine mRNA Injektion von tor-HA-Cyclin A in zellularisierende Embryonen dargestellt. Nach zweistündiger Entwicklungsphase wurden die injizierten Embryonen fixiert und mit anti-HA und anti-PH3 Antikörpern gefärbt. tor-HA-Cyclin A ist um die Injektionsstelle herum sichtbar (A). Die Vergrößerung (B) der in (A) markierten Region zeigt deutlich, dass das tor-HA-Cyclin A Signal die Zellmembran markiert und obwohl einige Prophasezellen sichtbar sind, findet man keine Kernakkumulierung von tor-HA-Cyclin A. Die Lokalisierung von transgenem tor-HA-Cyclin A ist in (C)-(E) dargestellt. tor-HA-Cyclin A wurde mit der *prdGal4*-Aktivatorlinie exprimiert und mit dem anti-Cyclin A Antikörper nachgewiesen. Die DNA wurde zur Unterscheidung der Kernphasen mit Propidiumiodid angefärbt. Während der Interphase kann tor-HA-Cyclin A nicht als feines Signal entlang der Zellmembran detektiert werden, sondern ist im gesamten Zytoplasma verteilt. An einigen Stellen sind punktförmige Signale nachweisbar. Wahrscheinlich ist das gesamte Endomembransystem und der sekretorische Weg mit tor-HA-Cyclin A markiert. Die punktförmigen Signale könnten also tor-HA-Cyclin A beinhaltende Vesikel darstellen. Während der Prophase kann keine Kernakkumulierung von tor-HA-Cyclin A festgestellt werden. In der Metaphase erscheint tor-HA-Cyclin A in der ganzen Zelle verteilt zu sein und wird nur unvollständig oder gar nicht abgebaut. Deshalb ist es auch noch in Ana- und Telophasen anwesend. Der Balken in (A), (C) und (D) entspricht 50µm, der Balken in (B) und (E) entspricht 5µm.

Obwohl viele Zellen in der Prophase sind, kann tor-HA-Cyclin A nicht im Kern detektiert werden.

Die Lokalisierung des transgenen tor-HA-Cyclin A-Konstruktes ist in (C)-(E) dargestellt. Die Expression von tor-HA-Cyclin A wurde mit *prdGal4* aktiviert, was zu Expression in jedem zweiten Segment führt (D). Da der anti-HA Antikörper das tor-HA-Cyclin A nicht gut erkennt, wurde das Konstrukt mit dem anti-Cyclin A Antikörper nachgewiesen. Deshalb ist auch das endogene Cyclin A zwischen den tor-HA-Cyclin A Streifen sichtbar (D). Der gezeigte Embryo befindet sich in Stadium 10 gegen Ende der Mitose 16. Dies ist am Abbau des endogenen Cyclin A zwischen den tor-HA-Cyclin A Streifen deutlich zu sehen. Dieser Zeitpunkt wurde absichtlich gewählt, damit in den tor-HA-Cyclin A Streifen das endogene Cyclin A Signal nicht die Lokalisierung von tor-HA-Cyclin A überlagert. Die DNA wurde mit Propidiumiodid angefärbt.

Folgt man tor-HA-Cyclin A zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus in den Vergrößerungen (E) ist offensichtlich, dass während der Interphase die Lokalisierung nicht oder nur in seltenen Fällen die Zellmembranen als feines Signal nachzeichnet wie es in (B) zu sehen ist. Meist ist ein das ganze Zytoplasma färbendes HA-Signal zu erkennen, was stellenweise durch punktförmige intensivere Signale unterbrochen wird. Wahrscheinlich ist das gesamte Endomembransystem und der sekretorische Weg durch die von *prdGal4* vermittelte starke Expression mit tor-HA-Cyclin A markiert. Die punktförmigen intensiven Signale würden demnach tor-HA-Cyclin A beinhaltende Vesikel darstellen. Eine weitere Erhöhung der tor-HA-Cyclin A Menge durch die Aktivierung von zwei Kopien tor-HA-Cyclin A mit den ubiquitären Aktivatorlinien *matGal4* oder *armadilloGal4* (*armGal4*) führt auch nicht zu einem klareren Signal in der Zellmembran, sondern eher zu einer stärkeren Färbung des Endomembransystems (nicht gezeigt). Die schwache Kernfärbung, die auch in der Prophase zu sehen ist, wird auf Hintergrundfärbung zurückgeführt. In allen untersuchten Prophasen kann keine Kernakkumulierung von tor-HA-Cyclin A detektiert werden und die dargestellte Prophase ist ein typisches Beispiel. In der Metaphase erscheint tor-HA-Cyclin A in der ganzen Zelle verteilt zu sein und wird nicht vollständig abgebaut. Je nach Expressionsstärke oder Abbauverhalten während der Metaphase in der individuellen Zelle, kann mehr oder weniger tor-HA-Cyclin A in der Anaphase detektiert werden. Bis in die späte Telophase und die nächste Interphase hinein ist tor-HA-Cyclin A nachweisbar, wobei die Kerne stets von tor-HA-Cyclin A-Signalen ausgespart bleiben.

Die Kernmembran wird im Verlauf der Pro- und Prometaphase fragmentiert. Doch die Kernmembran ist nur ein Teil des weitverzweigten Endomembransystems, welches das Endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat miteinschließt. Während der Mitose wird jedoch das gesamte Endomembransystem fragmentiert, zerfällt in Vesikel und kann auf diese Weise auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt werden (Shorter und Warren, 2002). Eine mögliche Erklärung für die zytoplasmatische Verteilung von tor-HA-Cyclin A könnte darin liegen, dass tor-HA-Cyclin A das gesamte Endomembransystem markiert. Da tor-HA-Cyclin A zudem während der Metaphase nicht vollständig abgebaut werden kann, erscheint es nach der Fragmentierung in der ganzen Zelle verteilt. Da aber in allen untersuchten Prophasen keine Kernakkumulierung von tor-HA-Cyclin A detektiert werden konnte, verhindert die Verankerung in der Membran wie erwartet die freie Diffusion von Cyclin A.

2.1.3 Biochemische Analysen zur Lokalisierung von tor-HA-Cyclin A

Um sicher zu stellen, dass tor-HA-Cyclin A ein strikt membranständiges Protein ist, wurde die Lokalisierung biochemisch untersucht. Hierfür wurden zunächst 6-8 Std. alte Embryonen (Stadium 9, 10) , die zwei Kopien tor-HA-Cyclin A unter der Kontrolle von *armGal4* exprimieren, durch Membranfraktionierung analysiert (Abb. 11 A). Obwohl eine Mischung verschiedener Proteaseinhibitoren bei der Homogenisierung eingesetzt wurde, führt die Behandlung zu multiplen Abbauprodukten von Cyclin A (Spur 7, eckige Klammer). Diese Abbauprodukte treten jedoch nur bei der Homogenisierung auf und sind in methanolfixierten Embryonenextrakten nicht nachweisbar (Spur 4). Das Auftreten der Abbauprodukte konnte auch nicht durch Fixierung in Anwesenheit des Metalloproteaseinhibitors EDTA oder durch den Einsatz von anderen Proteaseinhibitormischungen verhindert werden (nicht gezeigt). Das endogene Cyclin A bei 52 kDa (Spur 8, Pfeil) ist wegen der Abbauprodukte nicht zu erkennen (Spur 7, eckige Klammer). tor-HA-Cyclin A ist theoretisch 110 kDa groß und kann mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 140 kDa nachgewiesen werden (Spur 7). Der extrazelluläre Teil von Torso wird durch die Konjugation von Zuckerketten modifiziert und führt daher in der gereiften Form zu einem retardierten Laufverhalten. Die Bande bei 120 kDa entspricht dem unmodifizierten tor-HA-Cyclin A.

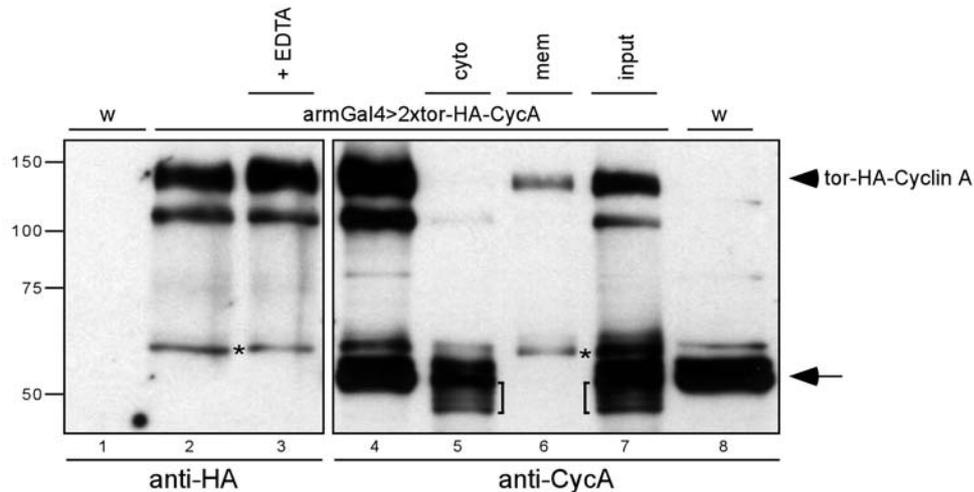


Abb. 11: tor-HA-Cyclin A sowie ein Spaltprodukt sind mit Membranen assoziiert. Für alle Proben wurden Embryonen verwendet, die sich in Stadium 10, 11 befanden. In Spur 1 und 8 wurden als Kontrolle wildtypische Embryonenextrakte (10 Embryonen/Spur) aufgetragen. Für die Proben in den Spuren 2-7 wurden zwei Kopien tor-HA-Cyclin A mit *armGal4* exprimiert. In den Spuren 2-4 wurden Embryonenextrakte (10 Embryonen/Spur) aufgetrennt. In Spur 3 wurde 20 mM EDTA bei der Extrakterstellung zugesetzt. Die Spuren 5-7 zeigen Proben der Membranfraktionierung (cyto=zytoplasmatische Probe nach Ultrazentrifugation, mem=Membranfraktion nach Dichtegradientenzentrifugation, input=Probe des Ausgangsmaterials). Die konzentrierten Proben der zytoplasmatischen und der Membranfraktion wurden durch Zugabe von Laemmli an den input angeglichen. Die verschiedenen Proben wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit den angezeigten Antikörpern inkubiert. Die Homogenisierung führt trotz Einsatz von Proteaseinhibitoren zu Abbauprodukten von Cyclin A, die nur in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden können (Spur 5 und 7, eckige Klammer). tor-HA-Cyclin A wurde spezifisch nur in der Membranfraktion detektiert (Spur 6). In dieser Fraktion wurde jedoch noch eine weitere ca. 60 kDa große Bande aufgereinigt (markiert mit einem Stern), die auch in methanolfixierten Embryonenextrakten mit dem anti-HA Antikörper nachgewiesen werden kann (Spur 2). Das endogene Cyclin A ist bei dem wildtypischen Extrakt mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Zahlen am linken Rand markieren das Molekulargewicht in kDa.

Nach Dichtegradientenzentrifugation kann tor-HA-Cyclin A spezifisch in der Membranfraktion detektiert werden (Spur 6). In dieser Fraktion wurde jedoch noch eine weitere ca. 60 kDa große Bande aufgereinigt (markiert mit einem Stern), die auch in methanolfixierten Embryonenextrakten mit dem anti-HA Antikörper nachgewiesen werden kann (Spur 2). Weder der Einsatz von EDTA (Spur 3) noch die Verwendung von anderen Proteaseinhibitormischungen verhindert das Auftreten der sternmarkierten Bande (nicht gezeigt). Die sternmarkierte Bande stellt wahrscheinlich ein verkürztes tor-HA-Cyclin A-Konstrukt dar, welches mit der Transmembrandomäne beginnt. Ein solches Konstrukt wäre ca. 65 kDa groß, entspricht also ungefähr dem apparenten Molekulargewicht der sternmarkierten Bande. Bei der Färbung mit dem anti-Cyclin A Antikörper, wird die

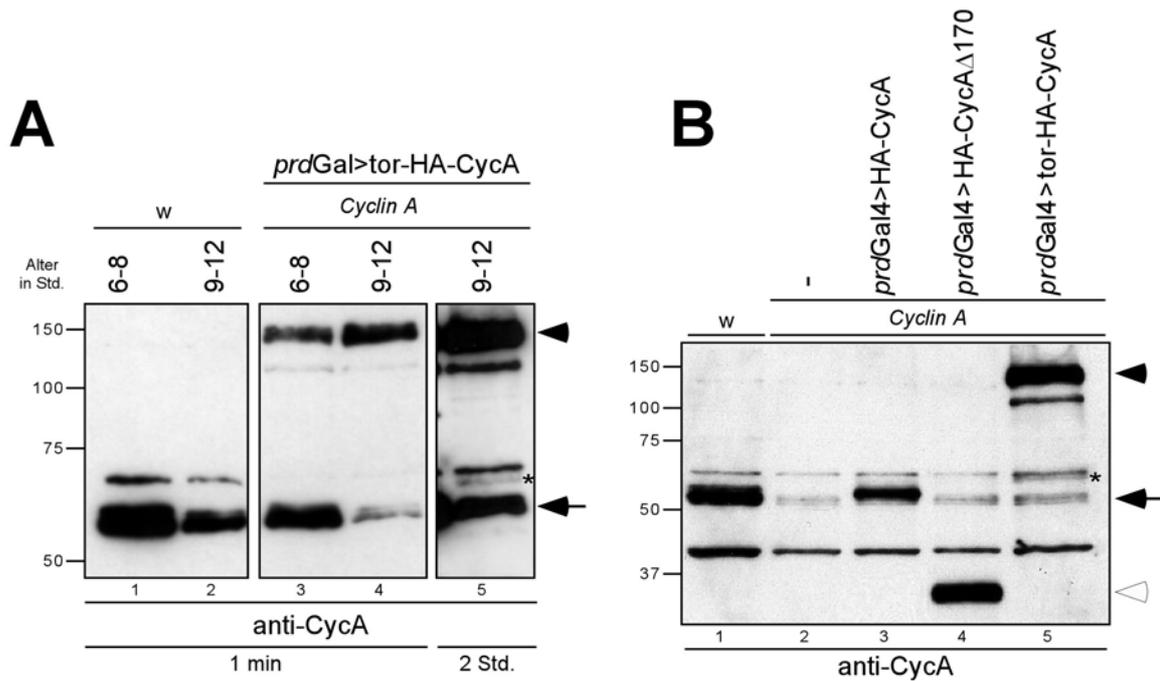


Abb. 12: Biochemische Analysen des Spaltproduktes von tor-HA-Cyclin A. In (A) ist dargestellt, dass die Menge an Spaltprodukt gering ist, weil sie erst nach langer Exponierung sichtbar wird. In Spur 1 und 2 wurden wildtypische Embryonenextrakte aufgetrennt (20 Embryonen /Spur), die sich entweder in Stadium 10, 11 (6-8 Std.) oder in Stadium 12, 13 (9-12 Std.) befanden. In Spur 3 und 4 wurden *Cyclin A* mutante Embryonenextrakte (20 Embryonen/Spur) aufgetragen, die tor-HA-Cyclin A unter Kontrolle der *prdGal4*-Aktivatorlinie exprimierten. Die Altersstufen entsprechen denen in Spur 1 und 2. Die verschiedenen Proben wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem anti-Cyclin A Antikörper inkubiert. In den wildtypischen Extrakten ist zu erkennen, dass die Menge an endogenem Cyclin A (Pfeil) mit zunehmendem Alter abnimmt (vgl. Spur 1 und 2). In den *Cyclin A* Mutanten ist die Menge an endogenem Cyclin A geringer als im Wildtyp (vgl. Spur 1 und 3 bzw. 2 und 4). tor-HA-Cyclin A (Pfeilkopf) akkumuliert mit zunehmendem Alter (vgl. Spur 3 und 4). Das mit einem Stern markierte tor-HA-Cyclin A Spaltprodukt wird erst nach langer Exponierung sichtbar (Spur 5 stellt die längere Exponierung von Spur 4 dar). In (B) ist gezeigt, dass keine weiteren Spaltprodukte von tor-HA-Cyclin A detektiert werden können. Es wurden Embryonenextrakte (10 Embryonen/Spur) aufgetragen, die sich in Stadium 12 befanden. In Spur 1 wurden wildtypische Extrakte aufgetrennt und in den Spuren 2-5 wurden *cyclin A* mutante Extrakte aufgetrennt (Spur 2), die verschiedene Cyclin A-Konstrukte unter der Kontrolle der *prdGal4*-Aktivatorlinie exprimierten (Spur 3-5). Die Menge an endogenem Cyclin A (Pfeil) ist in *Cyclin A* Mutanten stark reduziert (vgl. Spur 1 und 2). Die Expression der Cyclin A-Konstrukte ist in den Spuren 3-5 erkennbar. HA-Cyclin A überlagert das endogene Cyclin A (Spur 3). Weder das stabile Cyclin A Δ 170 (Spur 4, weißer Pfeilkopf) noch das stabile tor-HA-Cyclin A (Spur 5, Pfeilkopf) haben einen Einfluß auf die Menge an endogenem Cyclin A (Pfeil). Neben dem mit einem Stern markierten Spaltprodukt von tor-HA-Cyclin A (Spur5) können keine weiteren Spaltprodukte detektiert werden. Die Exponierung von (B) betrug 1 Std. Die Zahlen am linken Rand von (A) und (B) markieren das Molekulargewicht in kDa.

zusätzliche Bande durch Hintergrundbanden des anti-Cyclin A Antikörpers verdeckt (Spur4 und 7).

tor-HA-Cyclin A ist in der zytoplasmatischen Fraktion nicht nachweisbar (Spur 5). Das unmodifizierte tor-HA-Cyclin A kann sehr schwach detektiert werden, weil die zytoplasmatische Fraktion anscheinend leicht verunreinigt ist. Der Hauptanteil der Vesikel

und des restlichen Endomembransystems wurde bei der Ultrazentrifugation pelletiert. Die Abbauprodukte von Cyclin A (eckige Klammer) lassen nicht erkennen, ob neben der mit dem Stern markierten Bande noch weitere tor-HA-Cyclin A Spaltprodukte auftreten.

In Abb. 12 (A) und (B) wurden *Cyclin A* mutante Embryonen, die tor-HA-Cyclin A unter der Kontrolle von *prdGal4* exprimieren, untersucht. Durch die *Cyclin A* Mutation wurde die Menge an endogenem Cyclin A gesenkt, was die Detektion von eventuellen weiteren Spaltprodukten von tor-HA-Cyclin A erleichterte. In (A) ist die mit einem Stern markierte zusätzliche Bande erst nach langer Exponierung nachweisbar (vgl. Spur 4 und 5), was bedeutet, dass die Menge an Spaltprodukt gering ist. In (B) ist gezeigt, dass keine weiteren Spaltprodukte als die mit einem Stern markierte Bande nachweisbar sind (vgl. Spur 2 und 5). Die Menge an endogenem Cyclin A ist in tor-HA-Cyclin A exprimierenden Embryonen nicht erhöht und das Bandenmuster lässt keine weiteren zusätzlichen Banden erkennen.

Die biochemischen Analysen zeigen also, dass tor-HA-Cyclin A tatsächlich ein Membranprotein ist, da es nach Dichtegradientenzentrifugation nur in der Membranfraktion angereichert werden konnte. Ein ca. 60 kDa großes Spaltprodukt von tor-HA-Cyclin A wurde ebenfalls nur in der Membranfraktion gefunden, beinhaltet also noch die Transmembrandomäne von Torso. Die Menge an Spaltprodukt ist sehr gering und ist im Vergleich zu der Menge an endogenem Cyclin A in *Cyclin A* Mutanten zu vernachlässigen.

2.1.4 Wiederherstellung der Mitose 16 in *Cyclin A* Mutanten

Cyclin A ist in *Drosophila* ein essentielles Gen. Embryonen, die für *Cyclin A* mutant sind, können sich bis zum Zellzyklus 16 aufgrund eines maternal zur Verfügung gestellten Vorrats an *Cyclin A* mRNA entwickeln. Während der Entwicklung wird die maternale mRNA jedoch kontinuierlich abgebaut, so dass in amorphen *Cyclin A* Mutanten die Menge an funktioneller mRNA für *Cyclin A* ständig abnimmt. Dadurch kann in Zellzyklus 16 keine ausreichende Menge an Cyclin A translatiert werden und der Zellzyklus arretiert in der G2-Phase. Der Verlust der sechzehnten Zellteilung ist morphologisch erkennbar. In Abb. 13 wurde die Epidermis von *Cyclin A* mutanten Embryonen (Stadium 13) mit dem anti-Phospho-Tyrosin (anti-PTyr) Antikörper, einem Marker für Zellmembranen, gefärbt und mit der Epidermis von wildtypischen Embryonen verglichen. In den Segmenten der *Cyclin A* mutanten Embryonen (B) sind deutlich weniger, dafür aber größere Zellen zu

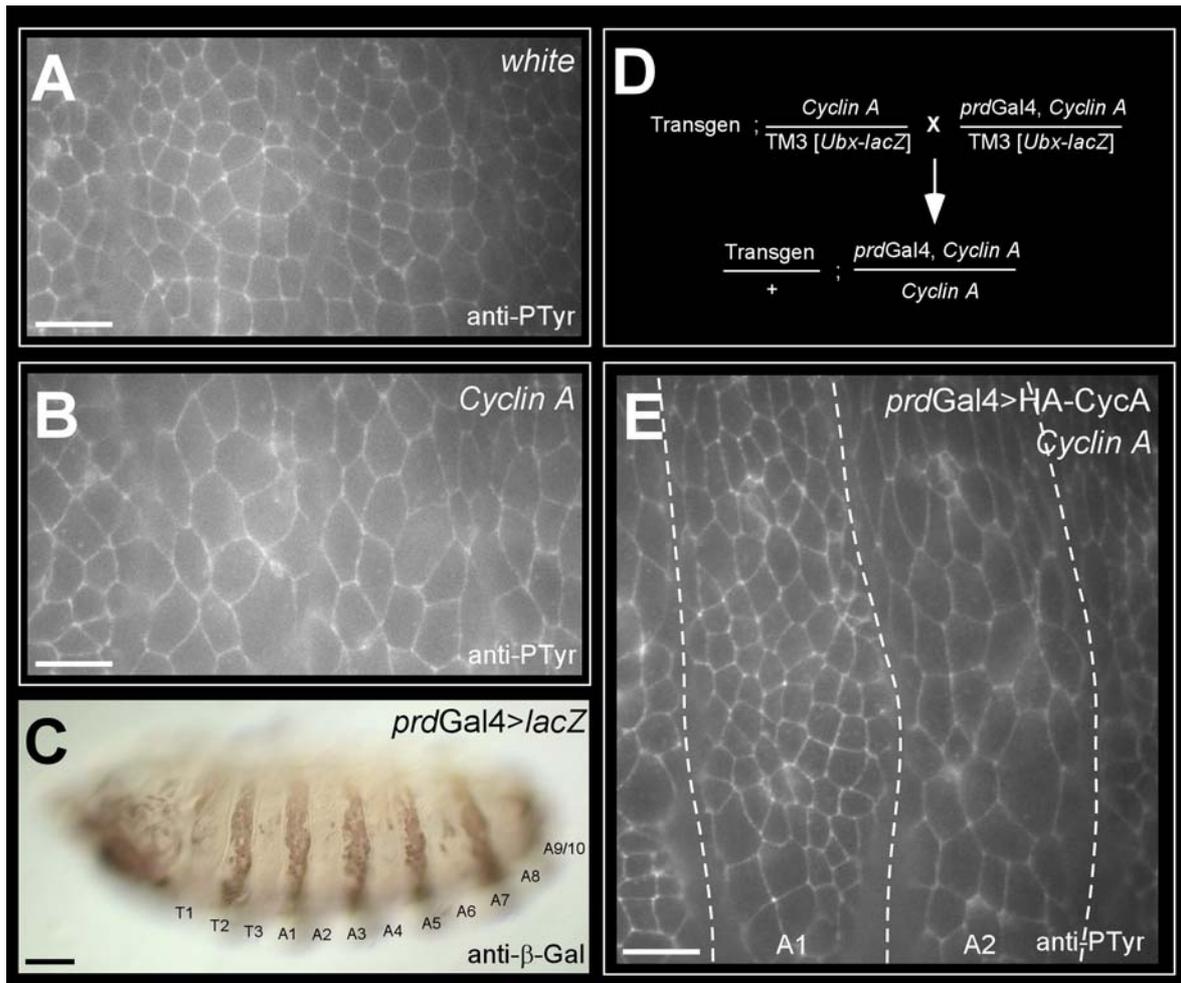


Abb. 13: Der *Cyclin A* mutante Phänotyp ist morphologisch erkennbar und diente als Basis für die funktionellen Studien der *Cyclin A*-Konstrukte. Die Epidermis von *Cyclin A* mutanten Embryonen (Stadium 13) wurde mit dem anti-Phospho-Tyrosin (anti-Ptyr) Antikörper angefärbt und mit der Epidermis von wildtypischen Embryonen verglichen. Der anti-Ptyr Antikörper ist ein Marker für Zellmembranen. Es sind Ausschnitte der Segmente A1 und A2 gezeigt. In den Segmenten der *Cyclin A* mutanten Embryonen (B) sind deutlich weniger, dafür aber größere Zellen zu erkennen als im Wildtyp (A). Um das Expressionsmuster der *prdGal4*-Aktivatorlinie darzustellen (C), wurde β -Galaktosidase (*lacZ*) unter der Kontrolle von *prdGal4* exprimiert und mit dem anti- β -Galaktosidase (anti- β -Gal) Antikörper nachgewiesen (braune Färbung in C). Die *prdGal4*-Aktivatorlinie vermittelt die Expression in jedem zweiten Segment. Die thorakalen (T1-T3) und die abdominalen Segmente (A1-A10) sind gekennzeichnet. Für die funktionellen Studien wurden die *Cyclin A*-Konstrukte mit der *prdGal4*-Aktivatorlinie im *Cyclin A* mutanten Hintergrund exprimiert (D). Die homozygoten *Cyclin A* Mutanten konnten durch die Abwesenheit des *Ubx-lacZ* markierten Balancers identifiziert werden. Durch den experimentellen Aufbau war es möglich, *Cyclin A* mutante Zellen in den Segmenten ohne *prdGal4*-Expression mit mutanten Zellen zu vergleichen, in denen die *prdGal4*-Aktivität die verschiedenen *Cyclin A*-Konstrukte exprimiert. In (E) ist beispielhalber für HA-*Cyclin A* gezeigt, wie die Daten für die funktionellen Tests erhoben wurden. Es ist ein vergrößerter Ausschnitt der Epidermis eines Stadium 13 Embryos gezeigt, der hauptsächlich die Segmente A1 und A2 abdeckt. Die Zellumrisse wurden mit dem anti-Ptyr Antikörper sichtbar gemacht. Die Größe des Ausschnitts wurde festgelegt und ist für alle untersuchten Genotypen beibehalten worden. Die weiß gestrichelten Linien wurden zur besseren Unterscheidung der Segmente eingefügt und die Zellen zwischen den Linien wurden ausgezählt. Im *Cyclin A* mutanten Hintergrund führt die *prdGal4* vermittelte Expression von HA-*Cyclin A* im Segment A1 zu einer deutlichen Zunahme der Zellzahl gegenüber dem Segment A2. HA-*Cyclin A* kann also den *Cyclin A* mutanten Phänotyp überwinden und die Mitose 16 induzieren. Die Balken in (A), (B) und (E) entsprechen 10 μ m, der Balken in (C) entspricht 50 μ m.

erkennen als im Wildtyp (A). Der Ausfall der sechzehnten Mitose in *Cyclin A* Mutanten ist also durch weniger Zellen in der Epidermis morphologisch erkennbar.

Dieser embryonale Phänotyp der *Cyclin A* Mutation diene als Basis für die funktionellen Studien der verschiedenen Cyclin A-Konstrukte. Hierfür wurden die Konstrukte mit der *prdGal4*-Aktivatorlinie im *Cyclin A* mutanten Hintergrund exprimiert (D). Die Aktivität von *prdGal4* führt zu Expression in jedem zweiten Segment (C). Somit können in der Epidermis eines Embryos mutante Zellen in den Segmenten ohne *prdGal4*-Expression mit mutanten Zellen verglichen werden, in denen die *prdGal4*-Aktivität die verschiedenen Cyclin A-Konstrukte exprimiert. Wenn die Konstrukte die wildtypische Funktion von Cyclin A übernehmen können, sollte dies den G2-Arrest überwinden und zu wildtypischen Zellzahlen in den *prdGal4*-Streifen führen.

Für die funktionelle Analyse wurden die Zellzahlen in einem definierten Bereich der Segmente A1 und A2 verglichen. In (E) ist beispielhalber für HA-Cyclin A gezeigt, wie die Daten erhoben wurden. Die *prdGal4* vermittelte Expression im *Cyclin A* mutanten Hintergrund führt im Segment A1 zu einer deutlichen Zunahme der Zellzahl gegenüber dem Segment A2. HA-Cyclin A kann also den *Cyclin A* mutanten Phänotyp überwinden und die Mitose 16 induzieren. Die weiß gestrichelten Linien wurden zur besseren Unterscheidung der Segmente eingefügt und der Bereich zwischen den Linien wurde ausgezählt. Für jedes Konstrukt wurde bei mindestens zehn Individuen die Zellzahl für das Segment A1 bzw. A2 ermittelt. In Abb. 14 sind die erhaltenen Ergebnisse graphisch dargestellt.

Im Wildtyp liegen in den Segmenten A1 bzw. A2 im Mittel zwischen 100 bzw. 120 Zellen vor. Der Ausfall der Mitose 16 in *Cyclin A* Mutanten führt mit ca. 60 Zellen nahezu zu einer Halbierung der Zellzahl. Durch die Expression von HA-Cyclin A oder HA-NES-Cyclin A im Segment A1 wird der *Cyclin A* mutante Phänotyp überwunden und wildtypische Zellzahlen erreicht. Dies läßt den Schluß zu, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A für die Induktion der Mitose nicht notwendig ist.

Die Zellzahl des mutanten Hintergrundes bei der HA-NLS-Cyclin A Kreuzung ist um etwa zehn Zellen erhöht. Trotzdem erscheint die Expression von HA-NLS-Cyclin A im Segment A1 mit Zellzahlen, die über dem wildtypischen Mittel liegen, mehr Mitosen induzieren zu können als die Expression von HA-Cyclin A oder HA-NES-Cyclin A. Es ist unklar, wie diese erhöhten Zellzahlen zustande kommen können. Die Expression von HA-NLS-Cyclin A im wildtypischen Hintergrund hatte keinen erkennbaren Einfluß auf das

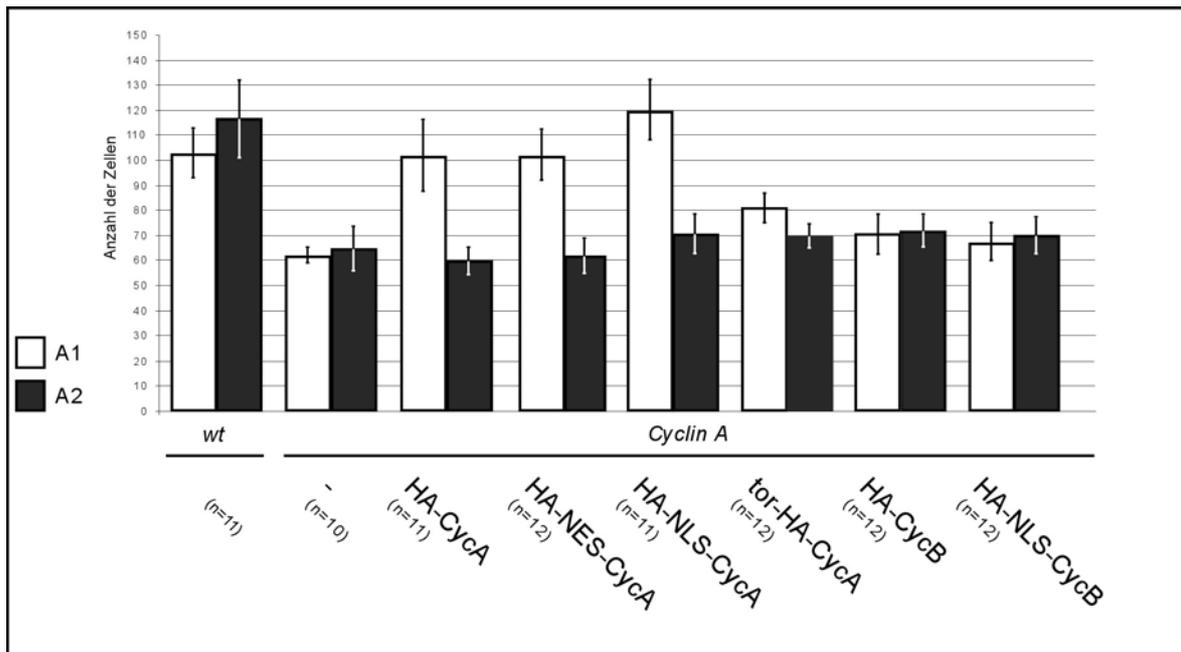


Abb. 14: Graphische Darstellung der funktionellen Analyse der Cyclin A-Konstrukte im *Cyclin A* mutanten Hintergrund. Die Grafik zeigt für verschiedene Genotypen die Zellzahlen der Segmente A1 (weiße Säulen) und A2 (schwarze Säulen). Wie die Daten erhoben wurden ist in Abb. 13 beschrieben. Für jeden Genotyp wurde bei mindestens 10 Individuen (n=Anzahl der Individuen) die Zellzahl für das Segment A1 bzw. A2 ermittelt und die Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung wurden in die Grafik eingetragen. Im Wildtyp (wt) liegen in den Segmenten A1 bzw. A2 im Mittel zwischen 100 und 120 Zellen vor. In der *Cyclin A* Mutante führt der Ausfall der Mitose 16 mit ca. 60 Zellen nahezu zu einer Halbierung der Zellzahl. Durch die Expression von HA-Cyclin A, HA-NES-Cyclin A und HA-NLS-Cyclin A im Segment A1 wird der *Cyclin A* mutante Phänotyp überwunden und wildtypische Zellzahlen erreicht. Es ist nicht klar, warum die Expression von HA-NLS-Cyclin A im Segment A1 zu Zellzahlen führt, die höher als die wildtypischen sind. Die Expression von tor-HA-Cyclin A ist ebenfalls in der Lage Mitosen zu induzieren. Allerdings werden nicht annähernd wildtypische Zellzahlen erreicht, weil die Anwesenheit von tor-HA-Cyclin A zu einem mitotischen Defekt führt (s. Kapitel 2.1.5). Weder die Expression von HA-Cyclin B noch von HA-NLS-Cyclin B kann unter diesen Bedingungen die Mitose 16 im *cyclin A* mutanten Hintergrund wiederherstellen.

mitotische PH3-Muster im Embryo (Daten nicht gezeigt, (Dienemann, 1999)). Außerdem wird HA-NLS-Cyclin A in der G1-Phase abgebaut, und kann nicht im Kern akkumulieren (Grosskortenhäus, 2001).

Die Expression des in der Zellmembran verankerten tor-HA-Cyclin A ist ebenfalls in der Lage Mitosen zu induzieren. Zusammengenommen mit den Daten der HA-NES-Cyclin A Expression bedeutet das, dass Cyclin A anscheinend nicht im Kern akkumulieren muß, um Mitosen auslösen zu können. Vielmehr scheint Cyclin A seine essentielle Funktion im Zytoplasma ausüben zu können. Allerdings werden durch tor-HA-Cyclin A nicht annähernd wildtypische Zellzahlen erreicht, weil die Anwesenheit von tor-HA-Cyclin A zu einem mitotischen Defekt führt (s.u.).

Weder die Expression von HA-Cyclin B noch von HA-NLS-Cyclin B kann in diesem Funktionalitätstest Mitosen im *Cyclin A* mutanten Hintergrund induzieren. Das bedeutet, dass Cyclin B assoziierte Kinaseaktivität, egal ob im Zytoplasma oder im Kern, nicht die Funktion von Cyclin A übernehmen kann.

2.1.5 Die Expression von tor-HA-Cyclin A führt zu einem mitotischen Defekt

In den funktionellen Tests im vorigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Expression von tor-HA-Cyclin A im *Cyclin A* mutanten Hintergrund Mitosen induzieren kann. Jedoch konnten nicht annähernd Zellzahlen erreicht werden, die mit wildtypischen Zellzahlen vergleichbar sind. Die Anwesenheit von in der Zellmembran verankertem tor-HA-Cyclin A muß also eine limitierende Wirkung auf das Voranschreiten der Mitose ausüben.

In Abb. 15 wurden die mitotischen Zellen in der Epidermis mit dem anti-PH3 Antikörper nachgewiesen, um herauszufinden, ob in tor-HA-Cyclin A exprimierenden Zellen weniger Mitosen induziert werden. Wildtypische Embryonen, die sich im Stadium 13 befinden, weisen einige mitotische Zellen in der Epidermis auf (A). Diese mitotischen Zellen fehlen in *Cyclin A* Mutanten, in denen sich nur noch die Zellen des zentralen Nervensystems teilen (B). Nach der Expression von HA-Cyclin A im *Cyclin A* mutanten Hintergrund sind wieder Mitosen in der Epidermis sichtbar (C). Die Expression von tor-HA-Cyclin A führt nicht zu weniger mitotischen Zellen in der Epidermis. Stattdessen werden mehr mitotische Zellen in den *prdGal4*-Streifen nachgewiesen (D). Jedoch weisen nicht alle Zellen in einem *prdGal4* Segment PH3-Signale auf, was auf die Variabilität des Phänotyps zurückzuführen ist.

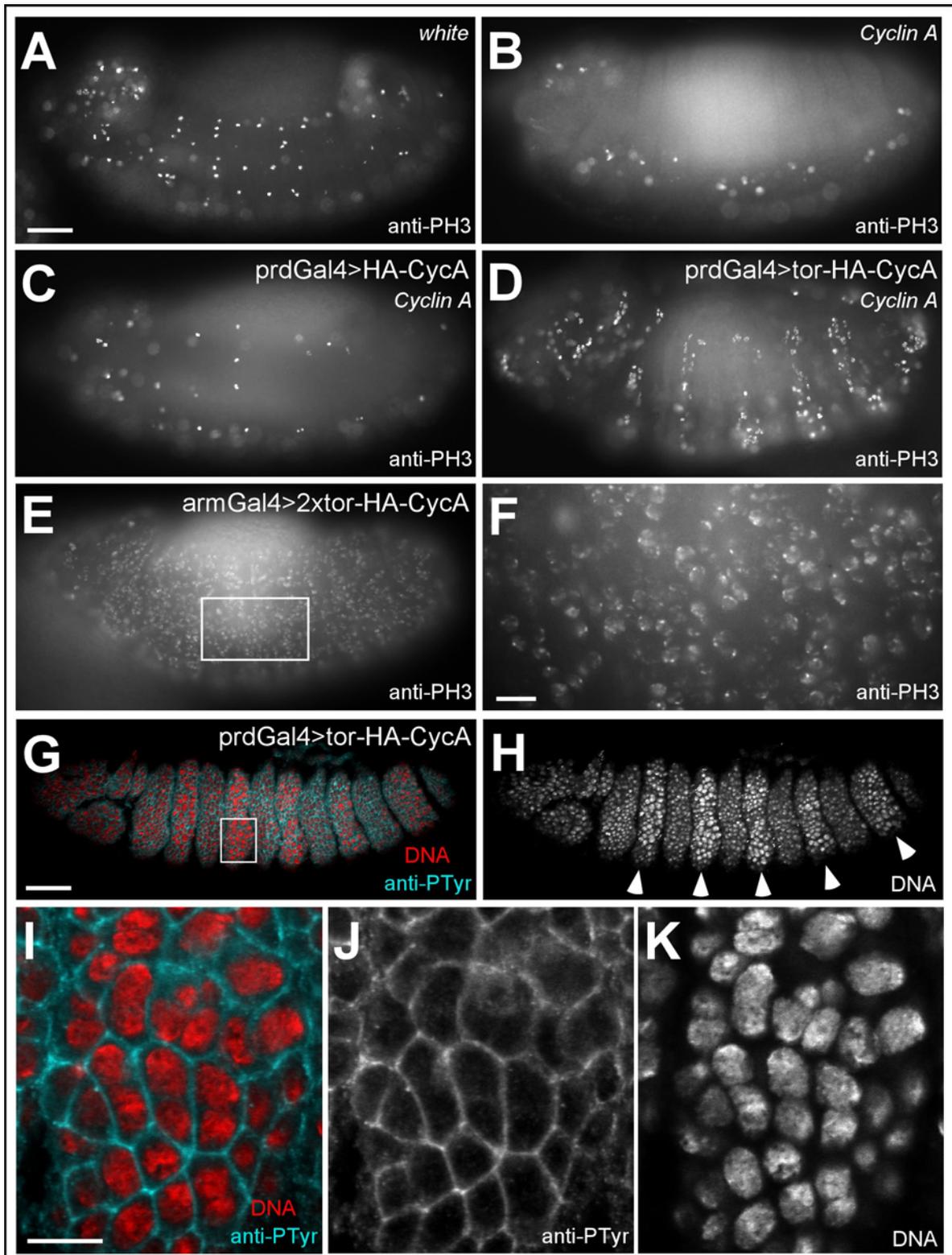
Eine Erhöhung der Menge an tor-HA-Cyclin A, durch die ubiquitäre Expression von zwei Kopien tor-HA-Cyclin A mit der *armGal4*-Aktivatorlinie (E) führt dazu, dass nahezu alle epidermalen Zellen PH3-positiv sind. Die Vergrößerung einer epidermalen Region (F), zeigt eine für den anti-PH3 Antikörper ungewöhnliche Markierung der DNA, die nicht mit üblichen PH3-Signalen vergleichbar ist (vgl. Abb. 5). Grundsätzlich fällt auf, dass der anti-PH3 Antikörper punktförmige Signale in fast allen Zellkernen sichtbar macht. Diese Signale könnten hochkondensierte DNA-Bereiche darstellen. Zusätzlich wird fast die gesamte DNA relativ unstrukturiert und schwach detektiert, was durch eine generelle, niedrige Kondensierung der DNA erklärt werden könnte.

In Abb. 14 (G),(H) wurde tor-HA-Cyclin A mit der *prdGal4* Aktivatorlinie exprimiert und Stadium 13 Embryonen wurden mit dem Zellmembranmarker anti-PTyr und Propidiumiodid gefärbt. In (H) ist deutlich zu sehen, dass die DNA in den *prdGal4*-Streifen (mit Pfeilköpfen markiert) mehr DNA-Farbstoff eingelagert hat, was auf einen erhöhten DNA-Gehalt hinweist. In den Vergrößerungen (I)-(K) der in (G) markierten Region, können Zellen detektiert werden, die zwei Zellkerne beinhalten. Die Zellkerne liegen sehr dicht beieinander oder sind nur unzureichend voneinander getrennt. Die Expression von tor-HA-Cyclin A führt also wahrscheinlich zu einem Cytokinesedefekt, wobei die DNA nicht ordnungsgemäß auf zwei Tochterzellen verteilt werden kann.

Dadurch ist zu erklären, warum tor-HA-Cyclin A in dem funktionellen Test den *Cyclin A* mutanten Phänotyp anscheinend nur unzureichend überwinden konnte. Für den funktionellen Test wurden ausschließlich Zellen gezählt, die anhand des Zellmembranmarkers nachgewiesen wurden. Da aber die Expression von tor-HA-Cyclin A zu Zellen führt, die zwar die DNA verdoppelt haben, sie aber nicht auf zwei Tochterzellen verteilt haben, wurden diese Zellen nur einmal gezählt.

Folgende Seite

Abb. 15: Die Expression von tor-HA-Cyclin A führt zu einem mitotischen Defekt. (A)-(D) Nachweis von mitotischen Zellen mit dem α -PH3 Antikörper in Stadium 13 Embryonen. Im Wildtyp (A) können einige mitotische Zellen in der Epidermis detektiert werden. Diese mitotischen Zellen fehlen in *Cyclin A* Mutanten (B), wo sich nur noch die Zellen des zentralen Nervensystems teilen. Die Expression von HA-Cyclin A im *Cyclin A* mutanten Hintergrund (C) führt wieder zu Mitosen in der Epidermis. Nach Expression von tor-HA-Cyclin A im *Cyclin A* mutanten Hintergrund (D) können mehr mitotische Zellen in den *prdGal4*-Streifen nachgewiesen werden. (E), (F) Zwei Kopien tor-HA-Cyclin A wurden mit der *armGal4*-Aktivatorlinie exprimiert. Eine ubiquitäre Erhöhung der Menge an tor-HA-Cyclin A führt dazu, dass nahezu alle epidermalen Zellen PH3-positiv sind (E). Die Vergrößerung (F) der in (E) markierten Region zeigt, dass der anti-PH3 Antikörper in fast allen Zellkernen punktförmige Signale sichtbar macht, die hochkondensierte DNA darstellen könnten. Zusätzlich wird fast die gesamte DNA relativ unstrukturiert und schwach detektiert, was durch eine generelle, niedrige Kondensierung der DNA erklärt werden könnte. (G)-(H) tor-HA-Cyclin A wurde mit der *prdGal4*-Aktivatorlinie exprimiert und Stadium 13 Embryonen wurden mit dem α -PH3 Antikörper und Propidiumiodid gefärbt. Die DNA in den *prdGal4*-Streifen (Pfeilköpfe in H) hat deutlich mehr DNA-Farbstoff eingelagert, was auf einen erhöhten DNA-Gehalt hinweist. In den Vergrößerungen (I)-(K) der in (G) markierten Region können Zellen detektiert werden, die zwei Zellkerne beinhalten. Die Zellkerne liegen sehr dicht beieinander oder sind nur unzureichend voneinander getrennt. Der Balken in A bzw. G entspricht 50 μ m und gilt auch für B-E bzw. H. Der Balken in F entspricht 10 μ m. Der Balken in I entspricht 10 μ m und gilt auch für J und K.



2.1.6 Wiederherstellung der Mitose 15 in *Cyclin A/Cyclin B* Doppelmutanten durch Expression von tor-HA-Cyclin A

Für die essentielle mitotische Funktion von Cyclin A während der Mitose 16 ist die Kernakkumulierung von Cyclin A assoziierter Kinaseaktivität nicht notwendig. Dies wurde in den funktionellen Tests mit zytoplasmatischen Cyclin A-Konstrukten im *Cyclin A* mutanten Hintergrund gezeigt (s. Kapitel 2.1.4). In *Cyclin A* Mutanten liegt noch das andere mitotische Cyclin, Cyclin B, vor, welches ebenfalls im Kern akkumuliert. Obwohl Cyclin A und Cyclin B teilweise redundante Funktionen besitzen (Knoblich und Lehner, 1993), kann das endogene Cyclin B in *Cyclin A* Mutanten nicht die Funktion von Cyclin A übernehmen (Lehner und O'Farrell, 1989). In den Funktionalitätstests (s. Kapitel 2.1.4) konnte gezeigt werden, dass die essentielle Funktion von Cyclin A während Mitose 16 auch nicht durch die Erhöhung der Cyclin B assoziierten Kinaseaktivität durch Expression von HA-Cyclin B übernommen werden kann. Durch die Expression von HA-NLS-Cyclin B konnte weiterhin gezeigt werden, dass es auch nicht ausreicht, die Cyclin B assoziierte Kinaseaktivität im Kern zu erhöhen.

Es ist bekannt, dass *Cyclin A/Cyclin B* Doppelmutanten in *Drosophila* in der G2-Phase von Zellzyklus 15 arretieren und die Mitose 15 nicht stattfindet (Knoblich und Lehner, 1993). Wenn also Cyclin A und Cyclin B in niedrigen Mengen in der Zelle vorliegen, kann die Mitose nicht eingeleitet werden. Wird die Menge eines der beiden Cycline erhöht, kann die Mitose 15 wiederhergestellt werden, wahrscheinlich weil die restliche Menge des niedrig vorliegenden Cyclins für den Synergieeffekt ausreicht (Knoblich und Lehner, 1993). Es ist nicht bekannt, ob die synergistischen Effekte auf der Kernakkumulierung der mitotischen Cycline beruhen. Wenn tor-HA-Cyclin A im *Cyclin A/Cyclin B* doppelmutanten Hintergrund exprimiert wird, sollte mit niedrigen Mengen an Cyclin B und hohen Mengen an membrangebundenem tor-HA-Cyclin A keine hohe Kernakkumulierung der mitotischen Cycline erreicht werden.

In Abb. 16 (A) ist durch funktionelle Tests im *Cyclin A/Cyclin B* doppelmutanten Hintergrund dargestellt, dass für die Wiederherstellung der Mitose 15 keine hohe Kernakkumulierung der mitotischen Cycline notwendig ist. Anhand der Zellzahlen für das Segment A2 im doppelmutanten Hintergrund ist ersichtlich, dass die Doppelmutante, im Vergleich zu der *Cyclin A* Mutante, zu einer weiteren Reduktion der Zellzahl führt. Auch morphologisch läßt sich mit dem Zellmembranmarker in der Epidermis (B) erkennen, dass die Zellen der Doppelmutante sehr groß erscheinen (vgl. Abb.13). Die Expression von

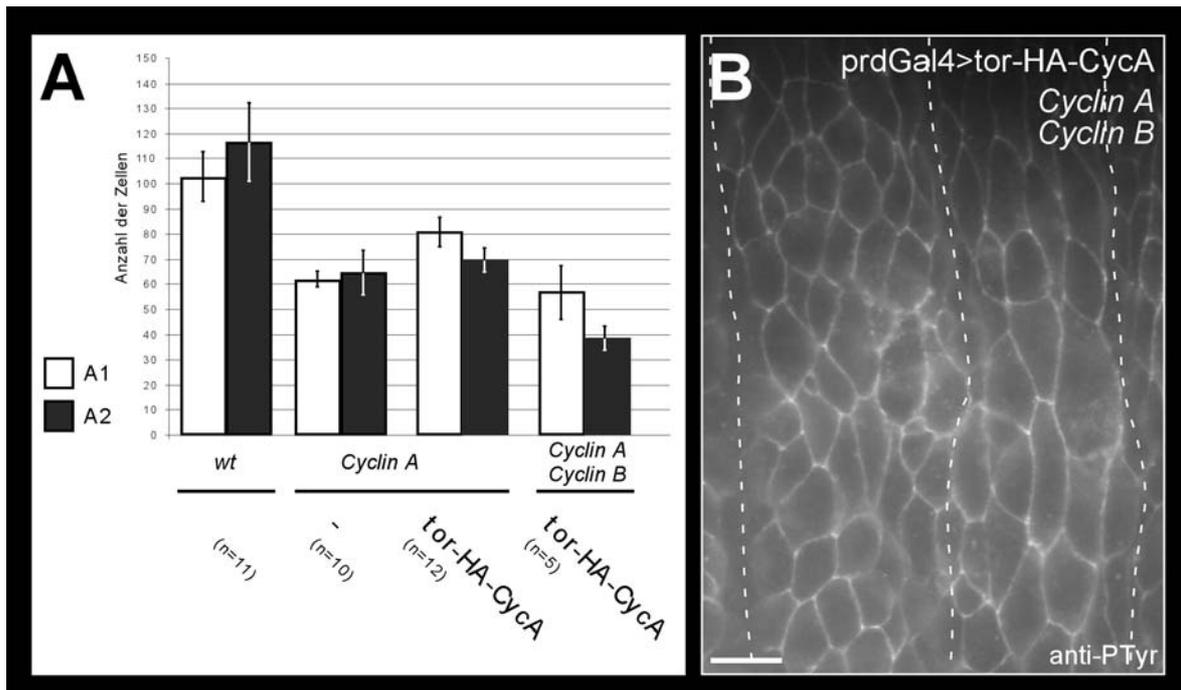


Abb. 16: Wiederherstellung der Mitose 15 in *Cyclin A/Cyclin B* Doppelmutanten durch Expression von tor-HA-Cyclin A. Die in (A) dargestellten Daten für die Zellzahlen im *Cyclin A/Cyclin B* doppelmutanten Hintergrund wurden wie in Abb. 13 und Abb. 14 beschrieben erhoben. Anhand der Zellzahlen für das Segment A2 im doppelmutanten Hintergrund ist ersichtlich, dass die Doppelmutante zu einer weiteren Reduktion der Zellzahl führt. Die Expression von tor-HA-Cyclin A überwindet den Arrest in der Mitose 15 und führt zu Zellzahlen, die mit der *Cyclin A* Mutante vergleichbar sind. (B) tor-HA-Cyclin A wurde unter Kontrolle von *prdGal4* im *Cyclin A/Cyclin B* doppelmutanten Hintergrund exprimiert. Stadium 13 Embryonen wurden mit dem anti-PTyr Antikörper gefärbt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Segmente A1 und A2, die zur besseren Unterscheidung mit weiß gestrichelten Linien markiert sind. Durch die Anfärbung der Zellumrisse ist auch morphologisch erkennbar, dass die Zellen der Doppelmutante im Segment A2 sehr groß erscheinen. Die Expression von tor-HA-Cyclin A im Segment A1 überwindet den Arrest in der Mitose 15 und führt im Vergleich zu Segment A2 zu mehr und kleineren Zellen. Der Balken in (B) entspricht 10µm.

tor-HA-Cyclin A überwindet die Arretierung in der Mitose 15 und führt zu Zellzahlen, die mit *Cyclin A* Mutanten vergleichbar sind (A).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die essentielle Funktion von Cyclin A nicht von Cyclin B übernommen werden kann und dass die Kernakkumulierung der mitotischen Cycline für die Induktion der Mitose nicht notwendig ist.

2.1.7 Überwindung der embryonalen Letalität von *Cyclin A* Mutanten

Die Wiederherstellung der Mitose 16 in *Cyclin A* Mutanten stellt einen relativ schnellen funktionellen Test für die verschiedenen Cyclin A-Konstrukte dar (s. Kapitel 2.1.4). Die erhaltenen Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die Lokalisierung von Cyclin A keine

essentielle Funktion ausübt, sondern dass die bloße Anwesenheit von Cyclin A ausreicht, um den *Cyclin A* mutanten Phänotyp zu überwinden. Anhand der Induktion von einer einzigen Mitose läßt sich aber nicht ableiten, dass die Lokalisierung von Cyclin A generell keine essentielle Funktion hat.

Der endogene *Cyclin A* Promotor ist in *Drosophila* nicht hinreichend analysiert, um die Funktion der Cyclin A-Konstrukte unter physiologischen Bedingungen testen zu können. Deshalb wurde der Einfluß der Konstrukte auf die Zellzyklen während der Entwicklung mit ubiquitären Aktivatorlinien untersucht.

Die *Cyclin A* Mutation manifestiert sich in embryonaler Letalität, weil in Abwesenheit von Cyclin A die Mitose 16 und wahrscheinlich auch folgende Mitosen nicht stattfinden. Die ausbleibenden Zellteilungen führen unter anderem zu Defekten in der Ausbildung des Nervensystems. Es wird angenommen, dass die fehlende Innervation dafür verantwortlich ist, dass keine Larven schlüpfen können. Durch die Expression der Konstrukte mit den ubiquitären Aktivatorlinien soll untersucht werden, ob die embryonale Letalität überwunden werden kann und ob die Lokalisierung von Cyclin A einen qualitativen oder quantitativen Einfluß darauf hat. Es wurden das HA-Cyclin A, das HA-NLS-Cyclin A und das HA-NES-Cyclin A Konstrukt analysiert. Die Konstrukte wurden bei verschiedenen Temperaturen im wildtypischen oder *Cyclin A* mutanten Hintergrund mit der *armGal4*- bzw. der *daGal4*-Aktivatorlinie exprimiert. Die Temperaturunterschiede führen mit aufsteigender Temperatur zu einer verstärkten Überexpression der Konstrukte. Die *Cyclin A* Mutation wurde in allen verwendeten Stämmen mit dem Balancer TM6 stabilisiert, der dominant mit *tubby* markiert ist. Diese Mutation führt zu Larven, die kürzer und dicker sind als die des Wildtyps. Somit können eventuell homozygote *Cyclin A* mutante Individuen schon im Larvenstadium aufgrund der Abwesenheit des Markers erkannt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 zusammengefaßt.

Die Überexpression der Konstrukte mit *armGal4* zeigt im wildtypischen Hintergrund keinen Effekt und die geschlüpften Fliegen weisen keine Phänotypen auf. Da bekannt ist, dass die Überexpression von Cyclin A in der Augenimaginalscheibe zu einem rauhen Augen Phänotyp führt (Sprenger et al., 1997), kann daraus geschlossen werden, dass entweder die Expression mit *armGal4* in der Augenimaginalscheibe zu schwach ist, um den Phänotyp zu induzieren, oder dass diese Aktivatorlinie in der Augenimaginalscheibe nicht funktioniert. Die Überexpression mit *armGal4* ist auch nicht in der Lage den embryonal letalen Phänotyp der *Cyclin A* Mutation zu überwinden. Dies könnte ebenfalls

| | | armGal4 | | | | | | daGal4 | | | | | |
|-------|-------------|----------------|---|---|-----------------|---|---|---------------|---|---|-----------------|---|---|
| | | <i>white</i> | | | <i>Cyclin A</i> | | | <i>white</i> | | | <i>Cyclin A</i> | | |
| | | L | P | A | L | P | A | L | P | A | L | P | A |
| 18° C | HA-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| | HA-NES-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| | HA-NLS-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| 25° C | HA-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | * | - | + | + |
| | HA-NES-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | * | - | + | + |
| | HA-NLS-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | * | - | + | + |
| 27° C | HA-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | * | - | + | + |
| | HA-NES-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | * | - | + | + |
| | HA-NLS-CycA | + | + | + | - | - | - | + | + | * | - | + | + |

Abb. 17: Tab. : Rettung der embryonalen Lethalität in *Cyclin A* Mutanten durch ubiquitäre Expression von *Cyclin A* Transgenen. Die *Cyclin A* Mutation manifestiert sich in embryonaler Letalität, weil in Abwesenheit von *Cyclin A* die Mitose 16 und wahrscheinlich auch folgende Mitosen nicht stattfinden. Die ausbleibenden Zellteilungen führen unter anderem zu Defekten in der Ausbildung des Nervensystems. Es wird angenommen, daß die fehlende Innervation dafür verantwortlich ist, daß keine Larven schlüpfen können. Die dargestellten Transgene wurden mit den ubiquitären Treibern *armGal4* bzw. *daGal4* im wildtypischen (*white*) oder *Cyclin A* mutanten Hintergrund bei verschiedenen Temperaturen exprimiert. Die *Cyclin A* Mutation wurde in allen verwendeten Stämmen mit dem TM6 Balancer stabilisiert, welcher dominant mit *tubby* markiert ist. Somit konnten eventuell homozygote *Cyclin A* mutante Individuen schon im Larvenstadium aufgrund der Abwesenheit des Markers unterschieden werden.

Die Expression mit *armGal4* zeigt in diesem Testsystem bei verschiedenen Temperaturen weder im wildtypischen noch im mutanten Hintergrund einen Effekt. Die starke Überexpression mit *daGal4* (25°C und 27°C) führt im wildtypischen Hintergrund zu Letalität. Der embryonal letale Phänotyp kann durch die starke Expression supprimiert werden, führt dann allerdings wie im wildtypischen Hintergrund zu Letalität. Eine milde Überexpression (18°C) zeigt jedoch keinen Effekt im wildtypischen Hintergrund. Der embryonal letale Phänotyp wird supprimiert und es können sogar Fliegen schlüpfen.

L=Larven, P=Puppen, A=Adulte

*=lethal im Puppenstadium, Fliegen haben raue Augen und schlüpfen nicht

**=lethal im Puppenstadium, viele nekrotisch während Metamorphose, Fliegen haben raue Augen und schlüpfen nicht

1=einige nekrotisch während Metamorphose, Fliegen haben raue Augen und schlüpfen nicht, sehr wenige Fliegen mit rauhen Augen versuchen zu schlüpfen

2=Fliegen haben raue Augen und weniger Borsten auf dem Notum, sehr kurze Lebensdauer

an einer zu schwachen Expression liegen oder daran, dass *armGal4* in lebenswichtigen Zellen, wie z.B. Nervenzellen nicht exprimiert wird.

Im Gegensatz dazu, führt die starke Expression der Konstrukte mit *daGal4* bei 25°C oder 27°C im wildtypischen Hintergrund zu Letalität. Die Fliegen liegen vollentwickelt im letzten Puppenstadium vor, schlüpfen aber nicht. Nach Entfernung der Puppenhülle, konnte für alle Konstrukte beobachtet werden, dass die Expression zu rauhen Augen führt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Cyclin A-Konstrukte in der Lage sind, Zelldifferenzierungsvorgänge zu stören und Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase zu überführen (Dong et al., 1997; Sprenger et al., 1997). Die Fliegen schlüpfen wahrscheinlich nicht, weil die Expression mit *daGal4* die funktionsfähige Ausbildung des Nervensystems stört. Werden hingegen nur geringe Mengen der Konstrukte im wildtypischen Hintergrund exprimiert (18°C), so hat das keinen Einfluß auf die Lebensfähigkeit.

Wenn die Konstrukte im *Cyclin A* mutanten Hintergrund mit *daGal4* exprimiert werden, kann interessanterweise bei allen Temperaturen die embryonale Letalität überwunden werden und es treten Larven und Puppen auf. Jedoch entwickeln sich nicht alle Puppen zu adulten Fliegen und es kann nekrotisches Gewebe während der Metamorphose beobachtet werden. Die starke Expression mit *daGal4* im *Cyclin A* mutanten Hintergrund (25°C und 27°C) führt allerdings auch bei den Puppen, die sich soweit entwickeln, zu Letalität im letzten Puppenstadium, wobei vollentwickelte Fliegen rauhe Augen aufweisen und nicht schlüpfen. Nur wenn die Konstrukte schwach exprimiert werden, nimmt die Anzahl der nekrotischen Metamorphosen ab und die Mehrzahl der Puppen entwickelt sich bis in späte Puppenstadien. Aber auch hier führt die Expression zu Letalität im späten Puppenstadium. Es konnten nur einige wenige Fliegen schlüpfen, was hauptsächlich an leeren *tubby*⁺ Puppen zu erkennen war. Die geschlüpften Fliegen zeigten einen variablen Phänotyp auf dem Notum, der sich auf die Anzahl der Borsten auswirkte. Es konnten nur einzelne Borsten fehlen (HA-Cyclin A, HA-NES-Cyclin A) oder auf dem Notum wurden nur wenige Borsten beobachtet (HA-NLS-Cyclin A). Die geschlüpften Fliegen wiesen nur eine sehr kurze Lebensdauer auf. Es wurde nicht statistisch erfasst, ob der beobachtete Borstenphänotyp mit der Lokalisierung der Konstrukte korreliert.

2.1.8 *in vivo* Analyse von transgenem Cyclin A-GFP

Um die Dynamik von Proteinen unter physiologischen Bedingungen beobachten zu können, ist der Einsatz von GFP (Green Fluorescent Protein aus *Aequorea victoria*) zu einer Standardmethode geworden. In dieser Arbeit sollte für *Drosophila* ein Cyclin A-GFP-Fusionsprotein hergestellt werden, damit die dynamische Lokalisierung von Cyclin A in Echtzeit untersucht werden könnte.

Der GFP-Anteil wurde C-terminal an Cyclin A fusioniert und hinter den konstitutiven Promotor eines Transformationsvektors kloniert. Die Expression von Cyclin A-GFP in den resultierenden Transgenen ist in Abb.17 (A) dargestellt. In transgenen Embryonenextrakten kann Cyclin A-GFP mit dem anti-GFP Antikörper spezifisch nachgewiesen werden (Spur 4), da die Größe der erkannten Bande bei 75 kDa dem *in vitro* translatierten Cyclin A-GFP entspricht (Spur 3). Der anti-Cyclin A Antikörper erkennt neben dem endogenen Cyclin A auch das Cyclin A-GFP (Spur 5). Obwohl der C-Terminus von Cyclin A äußerst sensitiv auf Änderungen wie Deletionen oder Punktmutationen reagiert (Daten nicht gezeigt, (Brown et al., 1995)) hat die C-terminale Fusion von GFP keine Auswirkungen auf die Bindung und Aktivierung von Cdk1 (B). Aus transgenen Embryonen kann nach Präzipitation mit dem anti-GFP Antikörper Cyclin A-GFP assoziierte Kinaseaktivität nachgewiesen werden (vgl. Spur 2 und 3). Mit dem anti-Cyclin A Antikörper kann neben dem endogenen Cyclin A auch Cyclin A-GFP präzipitiert werden (Spur 4), und aufgrund der Präzipitation des endogenen Cyclin A ist die Kinaseaktivität etwas stärker.

In Embryonen verschiedenen Alters konnte das GFP-Signal weder durch das GFP selbst noch durch Antikörperfärbungen nachgewiesen werden. Dies ist vor allem durch die geringe Menge an Cyclin A-GFP zu erklären, da in einer Studie über Cyclin B-GFP erst durch die Erhöhung der Kopienzahl der Transgene ein GFP-Signal erhalten werden konnte (Huang und Raff, 1999). Die Menge an Cyclin A-GFP scheint aber kritisch für die Lebensfähigkeit der transgenen Tiere zu sein. Von ursprünglich 15 unabhängigen Linien konnte nur ein Drittel am Leben erhalten werden. In diesen restlichen fünf Linien lag das Transgen immer heterozygot über einem Balancer vor und Cyclin A-GFP erreichte nicht mal die Hälfte der Menge an endogenem Cyclin A (C). Dies ist ein weiterer *in vivo* Hinweis darauf, dass die Überexpression von Cyclin A letal ist. Die Menge an Cyclin A-GFP konnte auch nicht transient durch eine Kreuzung erhöht werden, da die übrig gebliebenen Transgene alle auf dem dritten Chromosom inseriert waren.

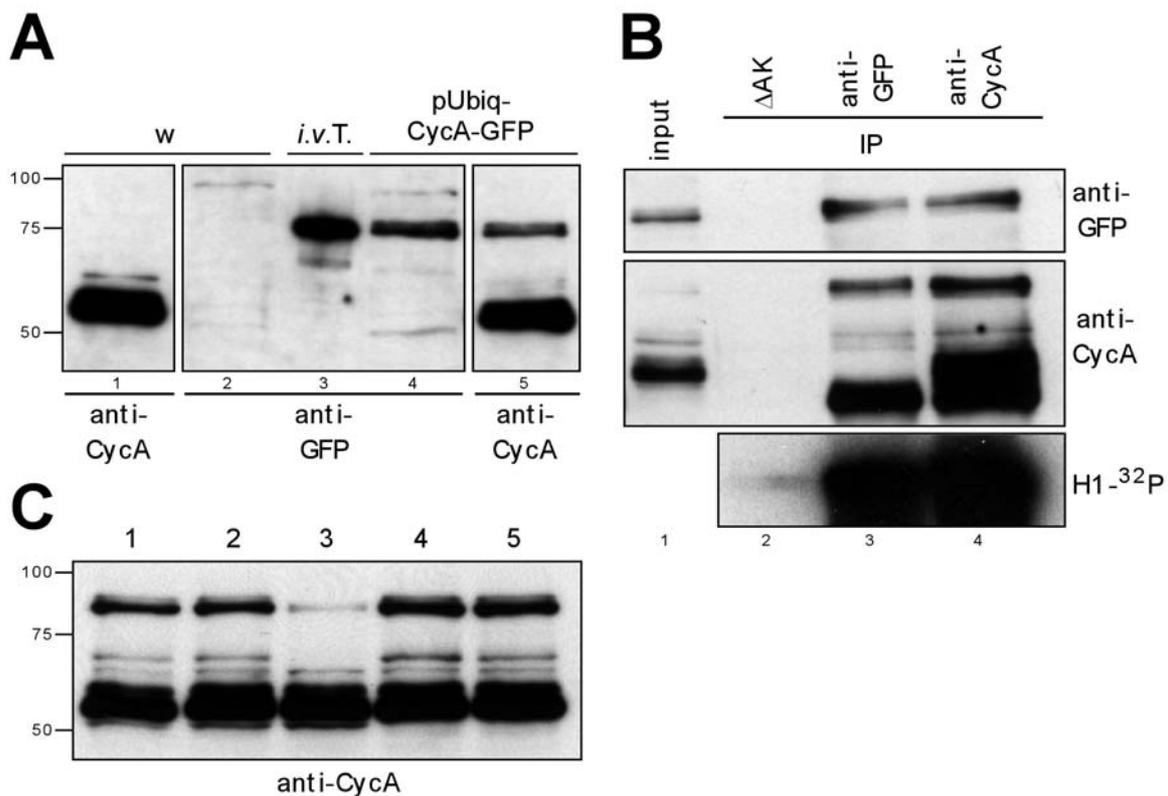


Abb. 18: Biochemische Analyse von transgenem Cyclin A-GFP. (A) Nachweis der Expression von transgenem Cyclin A-GFP. In Spur 1 und 2 wurden zur Kontrolle Embryonenextrakte (10 Embryonen/Spur) aufgetragen, die sich in Stadium 8-10 befanden. In Spur 3 wurde *in vitro* translatiertes Cyclin A-GFP aufgetragen (1% des reduzierten Translationsansatzes). In Spur 4 und 5 wurden Embryonenextrakte (10 Embryonen/Spur) aufgetragen, die ubiquitär transgenes Cyclin A-GFP exprimieren. Die Proben wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit den angezeigten Antikörpern inkubiert. Cyclin A-GFP kann in den transgenen Embryonen sowohl mit den anti-GFP als auch mit den anti-Cyclin A Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden (Spuren 3-5). Die Größe der erkannten Bande bei 75 kDa (Spuren 4 und 5) entspricht der Größe von *in vitro* translatiertem Cyclin A-GFP (Spur 3). (B) Cyclin A-GFP ist funktionell und kann die Partnerkinase Cdk1 binden und aktivieren. Für die Immunpräzipitation (IP) mit den angezeigten Antikörpern wurden Embryonen in Stadium 8-10 verwendet. In Spur 1 wurden 16% des reduzierten Homogenisats aufgetrennt. In den Spuren 2-4 wurde jeweils 1/3 der Immunpräzipitation mit den angezeigten Antikörpern aufgetragen. Mit den Proben der Spuren 2-4 wurden Kinase Assays durchgeführt. Die Proben wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben der IP wurden auf Nitrozellulose übertragen und mit den angezeigten Antikörpern inkubiert. Aus den transgenen Embryonen kann mit den anti-GFP und mit den anti-Cyclin A Antikörpern spezifisch Cyclin A-GFP präzipitiert werden (Spuren 3 und 4). Das mit dem anti-GFP Antikörper präzipitierte Cyclin A-GFP wies auch Kinaseaktivität (H1) auf (Spur 3), was bedeutet, dass die Partnerkinase Cdk1 von transgenem Cyclin A-GFP gebunden und aktiviert werden kann. (C) Expressionsstärke der Cyclin A-GFP Linien. In den Spuren 1-5 wurden Embryonenextrakte (Stadium 8-10) der Cyclin A-GFP Linien aufgetragen (20 Embryonen/Spur). Die Extrakte wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem anti-Cyclin A Antikörper inkubiert, der sowohl das endogene Cyclin A als auch das transgene Cyclin A-GFP erkennt. Das endogene Cyclin A läuft oberhalb von 50 kDa und Cyclin A-GFP läuft oberhalb von 75 kDa. Die Menge an Cyclin A-GFP erreicht in den meisten Linien nicht mal die Hälfte der Menge an endogenem Cyclin A (Spuren 1, 2, 4 und 5). Die Zahlen am linken Bildrand von (A) und (C) markieren das Molekulargewicht in kDa.

2.2 Analyse der funktionellen Bedeutung der Lokalisierung von Cyclin A für die Induktion ectopischer S-Phasen

2.2.1 Induktion von ectopischen S-Phasen in der embryonalen Epidermis

Die Zellen der Epidermis in *Drosophila* treten in Zellzyklus 17 in die erste G1-Phase ein (Abb. 19 A). Da die S-Phase in den mitotischen Zyklen direkt nach der Mitose, ohne eine G1-Phase einsetzt, muß für die Einführung der G1-Phase der Zellzyklus arretiert werden. Dies geschieht hauptsächlich durch die Inaktivierung des S-Phase Aktivators Cyclin E und wird durch das Absenken der Transkriptionsrate für Cyclin E und die Aktivierung des spezifischen Cyclin E/Cdk2-Inhibitors Dacapo erreicht. Die später folgenden Endozyklen der epidermalen Zellen werden durch die zyklische Expression von Cyclin E ermöglicht, und dadurch, dass die mitotischen Cycline nicht mehr akkumulieren können (Edgar und Lehner, 1996).

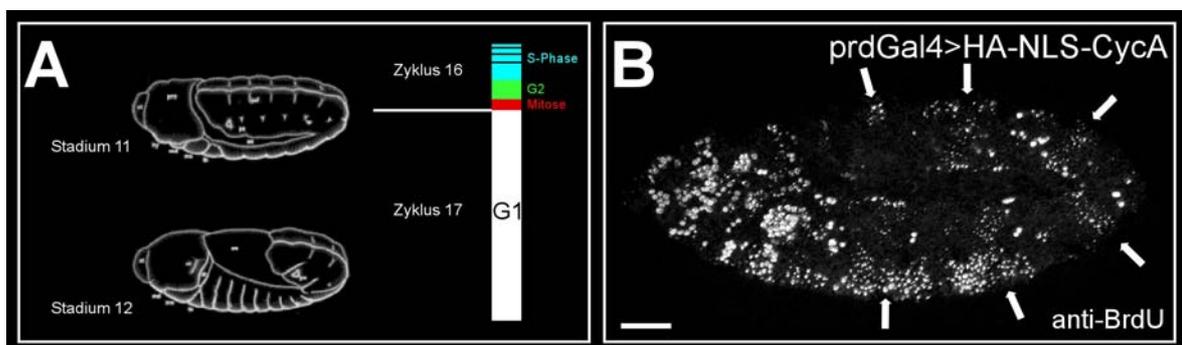


Abb. 19: Induktion ectopischer S-Phasen im Embryo durch die Expression von HA-NLS-Cyclin A. In (A) ist schematisch dargestellt, dass in Zyklus 17 die erste G1-Phase während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* eingeführt wird. In (B) ist ein Embryo im Stadium 11 gezeigt, der HA-NLS-Cyclin A unter der Kontrolle der *prdGal4* Aktivatorlinie exprimiert. Die S-Phasen wurden durch das während der DNA-Replikation inkorporierte Basenanalogon BrdU nachgewiesen. In den Streifen, wo HA-NLS-Cyclin A exprimiert wurde (Pfeile), können schwach ectopische S-Phasen detektiert werden. Die Expression von HA-Cyclin A oder HA-NES-Cyclin A hatte unter diesen Bedingungen keinen Effekt. Der Balken in (B) entspricht 50µm.

Die Überexpression von Cyclin A kann in *Drosophila* zur Induktion von ectopischen S-Phasen in der Epidermis führen (Sprenger et al., 1997). Für diesen Effekt sind entweder eine starke Überexpression von Cyclin A oder die Expression von stabilem Cyclin A

notwendig. Um herauszufinden, ob für die Induktion von ektoischen S-Phasen die Lokalisierung von Cyclin A eine Rolle spielt, wurden in Embryonen, die die verschiedenen Cyclin A-Konstrukte unter der Kontrolle von *prdGal4* exprimierten, die S-Phasen mit dem Basenanalogen BrdU sichtbar gemacht. Unter diesen Bedingungen konnten weder mit HA-Cyclin A noch mit HA-NES-Cyclin A ektoische S-Phasen induziert werden. Die Expression von HA-NLS-Cyclin A führte allerdings zu schwach nachweisbaren

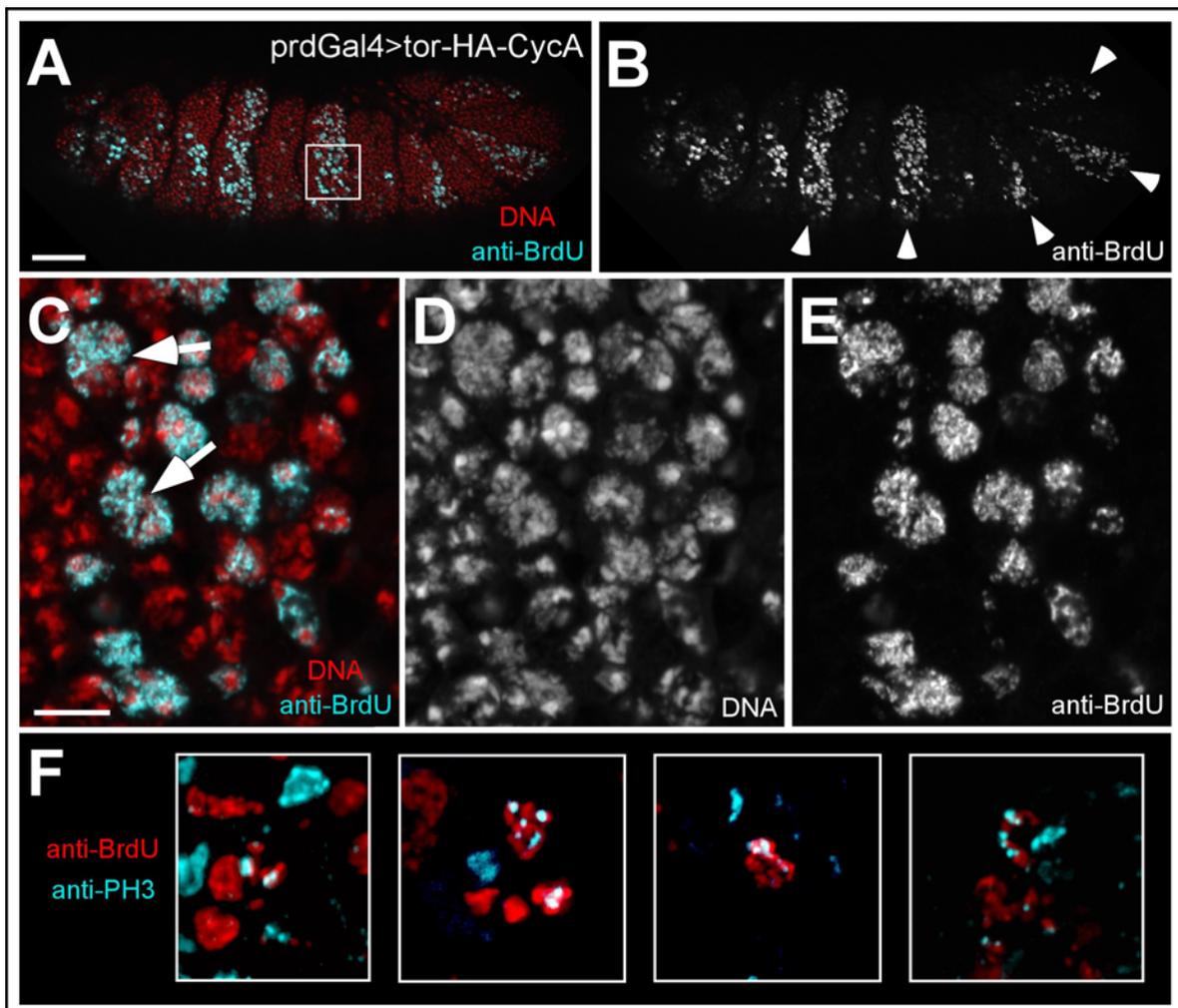


Abb. 20: Expression von tor-HA-Cyclin A führt zu ektoischen S-Phasen und mitotischen Katastrophen. In (A) und (B) ist ein Embryo im Stadium 12 dargestellt, der tor-HA-Cyclin A unter der Kontrolle von *prdGal4* exprimiert. Die S-Phasen wurden durch das während der DNA-Replikation inkorporierte Basenanalogen BrdU nachgewiesen. In den Streifen, wo tor-HA-Cyclin A exprimiert wurde (Pfeilköpfe in B), können ektoische S-Phasen detektiert werden. In den Vergrößerungen (C)-(E) der in (A) markierten Region ist deutlich zu erkennen, dass eng beieinander liegende Kerne (Pfeile in C), wie sie für den mitotischen Phänotyp von tor-HA-Cyclin A charakteristisch sind, mit BrdU markiert sind. Außerdem fällt die teilweise punktförmig kondensierte DNA auf (D). Die Doppelfärbung mit dem S-Phase-Marker BrdU und dem mitotischen Marker PH3 (F) zeigt, dass die tor-HA-Cyclin A exprimierenden Zellen gleichzeitig beide Marker aufweisen können, was für eine mitotische Katastrophe spricht. Der Balken in (A) entspricht 50µm, der Balken in (C) entspricht 10µm und gilt auch für (F).

ektopischen S-Phasen in den *prdGal4*-Streifen (Abb. 19, Pfeile in B). Die Zellen zwischen den *prdGal4*-Streifen dienen als interne Kontrolle und weisen keine BrdU-Färbung auf.

Die Expression von tor-HA-Cyclin A hat unter diesen Bedingungen die größte S-Phase induzierende Kapazität (Abb. 20). Der Stadium 12 Embryo in (A) und (B) zeigt starke BrdU-Einlagerung in den *prdGal4*-Streifen. Die Vergrößerungen (C)-(E) lassen erkennen, dass Zellkerne, die eng beieinander liegen, mit BrdU gefärbt sind (Pfeile in C). Die eng beieinander liegenden Zellkerne sind ein typische Merkmal für tor-HA-Cyclin A exprimierende Zellen, und resultieren aus einem Zytokinesedefekt (s. Kapitel 2.1.5). Auffällig ist außerdem die teilweise punktförmig kondensiert erscheinende DNA (D). Durch eine Doppelfärbung mit dem S-Phase-Marker BrdU und dem mitotischen Marker PH3 (F) konnte in einigen Zellen die Anwesenheit beider Marker detektiert werden. Da die Mitose normalerweise erst eingeleitet wird, wenn die S-Phase komplett abgeschlossen ist, und die Beendigung der S-Phase durch den „DNA-checkpoint“ gewährleistet wird, deutet die Doppelfärbung auf eine mitotische Katastrophe hin. Anscheinend kann der „DNA-checkpoint“ nicht die Aktivität von tor-HA-Cyclin A kontrollieren. Die Fähigkeit von tor-HA-Cyclin A S-Phasen zu induzieren, erklärt auch die schon erwähnte erhöhte DNA-Menge in *prdGal4*-Streifen (s. Abb. 15).

2.2.2 Induktion ektopischer S-Phasen in der Augenimaginalscheibe

Für die Induktion von ektopischen S-Phasen im Embryo werden ausreichend hohe Mengen an Cyclin A benötigt (Sprenger et al., 1997). Diese Mengen können mit nur einer Kopie des jeweiligen Transgens im Embryo anscheinend nicht erreicht werden. Ein sensitiveres System zur Untersuchung der Induktion von ektopischen S-Phasen stellen in *Drosophila* die Augenimaginalscheiben dar. Die Differenzierung der Augenimaginalscheiben beginnt im dritten Larvenstadium. Die Differenzierung verläuft wellenartig von Posterior nach Anterior und der Wellenkamm ist morphologisch als sogenannte morphogenetische Furche erkennbar (Abb. 21 A). Zellen die sich anterior zur morphogenetischen Furche befinden teilen sich asynchron und werden an der Kante der morphogenetischen Furche in der G1-Phase arretiert (Thomas et al., 1994). Zellen die sich innerhalb oder posterior zur morphogenetischen Furche befinden, werden in Cluster sortiert und differenzieren zu Ommatidien. Die meisten Zellen differenzieren direkt, doch einige Zellen teilen sich nocheinmal. Diese weitere Teilung wird auch als „zweite mitotische Welle“ bezeichnet und läuft direkt posterior zur morphogenetischen Furche ab

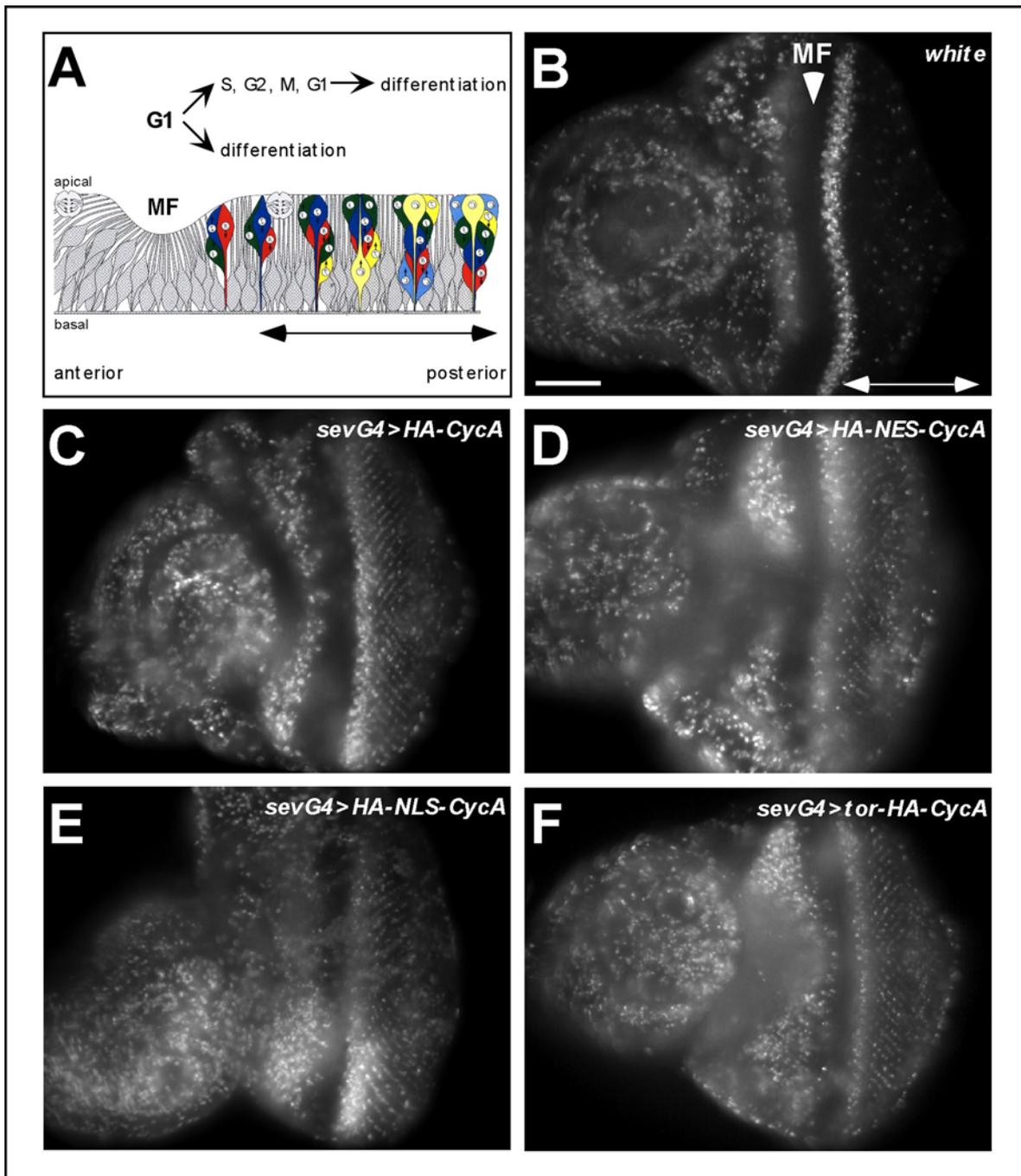


Abb. 21: Induktion von S-Phasen in der Augenimaginalscheibe durch Expression der Cyclin A-Konstrukte. In (A) ist das Zellzyklusprogramm innerhalb und posterior zur morphogenetischen Furche (MF) schematisch dargestellt. In der MF werden die Zellen der Augenimaginalscheibe in der G1-Phase synchronisiert. Posterior zur MF differenzieren die Zellen entweder direkt oder durchlaufen vorher noch einen kompletten Zellzyklus, der auch als zweite mitotische Welle bezeichnet wird. In (B)-(F) sind BrdU markierte Augenimaginalscheiben verschiedener Genotypen dargestellt. Im Wildtyp (B) ist die MF markiert und der Doppelpfeil kennzeichnet den posterioren Teil, in dem keine S-Phasen detektiert werden können (vgl. mit A). Alle mit *sevGal4* exprimierten Cyclin A-Konstrukte sind in der Lage S-Phasen im posterioren Teil zu induzieren, was an dem regelmäßigen BrdU-Signal im *sev*-Muster posterior zur MF erkennbar ist. Das Schema in (A) wurde aus (Bate et al., 1993) entnommen und modifiziert. Der Balken in (B) entspricht 50µm und gilt auch für (C)-(F).

(Thomas et al., 1994). Da der Mitose eine S-Phase vorausgehen muß, kann durch BrdU-Inkorporation während der DNA-Replikation die zweite mitotische Welle nachgewiesen werden (Abb. 21 B). Posterior zur zweiten mitotischen Welle sind praktisch keine weiteren BrdU-Signale detektierbar.

In Abb. 21 (C)-(F) ist der Nachweis von S-Phasen durch BrdU-Färbung in Augenimaginalscheiben, die die Cyclin A-Konstrukte mit der *sevGal*-Aktivatorlinie exprimieren, dargestellt. Die *sevGal4*-Aktivatorlinie vermittelt Expression in mehreren Zellen eines Ommatidiums. Da die Differenzierung der Ommatidien in Clustern voranschreitet, ist die *sevGal4* vermittelte Expression als regelmäßiges Muster nachweisbar, welches die Expression von *sev* widerspiegelt (Tomlinson et al., 1987). In (C)-(F) ist das BrdU-Signal im *sev*-Muster detektiert worden, woraus man schließen kann, dass alle getesteten Konstrukte ektopische S-Phasen induzieren können.

Die Lokalisierung von Cyclin A spielt also auch für die Induktion von S-Phasen in der Augenimaginalscheibe keine Rolle. Die Fliegen, die sich aus den Kreuzungen für die BrdU-Färbungen entwickelten, die also die Cyclin A-Konstrukte unter der Kontrolle der *sevGal4*-Aktivatorlinie exprimierten, zeigten den rauhe Augen-Phänotyp. Dieser Phänotyp ist ein charakteristischer adulter Marker für die Störung der Differenzierungsvorgänge in der Augenimaginalscheibe. Er ist schon für Cyclin A beschrieben worden und beruht unter anderem auf der Induktion von ektopischen S-Phasen (Sprenger et al., 1997).

2.3 Untersuchungen zur Regulation der Lokalisierung von Cyclin A

Den funktionellen Tests nach zu beurteilen, korreliert die Kernakkumulierung von Cyclin A in *Drosophila* nicht mit der Funktion von Cyclin A. Trotzdem ist die zellzyklusabhängige Kernakkumulierung eine charakteristische Eigenschaft von Cyclin A. Über den Mechanismus der Lokalisierung von Cyclin A gibt es bisher keine Erkenntnisse.

2.3.1 Cyclin A wird während der Interphase durch Kernexport im Cytoplasma lokalisiert

Für Cyclin B1 in Vertebraten konnte gezeigt werden, dass der konstitutive, aber langsame und nur unzureichend charakterisierte Kernimport während der Interphase durch

verstärkten Kernexport antagonisiert wird. Dabei wird die Interaktion mit dem Kernexportrezeptor Crm1 durch Phosphorylierung von Cyclin B1 reguliert. (Hagting et al., 1998; Moore et al., 1999; Takizawa et al., 1999; Toyoshima et al., 1998; Walsh et al., 2003; Yang et al., 1998).

Um herauszufinden, ob auch für Cyclin A in *Drosophila* der Kernexport zur Kontrolle der Lokalisierung verwendet wird, wurde der Inhibitor Leptomycin B (LMB) eingesetzt. LMB ist ein spezifischer Inhibitor des Exportrezeptors Crm1 (Kudo et al., 1998). LMB bindet kovalent an Crm1 und verhindert auf diese Weise die Interaktion des Rezeptors mit seinen Substraten.

In Abb. 22 (A)-(F) wurde HA-Cyclin A mit der *armGal4*-Aktivatorlinie exprimiert. Oktanpermeabilisierte 6-8 Std alte Embryonen (ca. Stadium 9,10) wurden entweder in Anwesenheit von LMB (D)-(F) oder einer entsprechenden Menge Lösungsmittel (A)-(C) für 1 Std inkubiert und anschließend fixiert. Die Färbung mit anti-HA weist das HA-Cyclin A nach und die Färbung mit anti-PH3 detektiert die Kernphasen. In der Kontrolle ohne LMB (A) ist der Großteil des HA-Cyclin A zytoplasmatisch und nur in Prophasen, wenn der anti-PH3 Antikörper ein Signal gibt, kann HA-Cyclin A im Kern nachgewiesen werden. Die Inhibierung des Kernexports durch LMB (D) führt jedoch auch in Interphasen zu kernlokalisiertem HA-Cyclin A. Die schwache Hintergrundfärbung in der Kontrolle (A) ist wahrscheinlich auf das Methanol zurückzuführen, welches als Lösungsmittel anstelle von LMB zugesetzt wurde. Dieser *in vivo* Versuch zeigt, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Interphase durch Kernexport verhindert wird.

In Cyclin B1 aus Vertebraten liegt das NES, welches von dem Kernexportrezeptor erkannt wird, im N-Terminus. Durch Deletionsanalysen von Cyclin A in *Drosophila* kann allerdings ausgeschlossen werden, dass das NES im N-Terminus lokalisiert ist (Abb. 22 G). Die verschiedenen Deletionen wurden durch mRNA-Injektion getestet (Kaspar et al., 2001). Alle Konstrukte konnten während der Interphase im Zytoplasma detektiert werden. Der N-Terminus birgt also keine Lokalisierungsinformationen, die durch die Deletionen hätten aufgedeckt werden müssen.

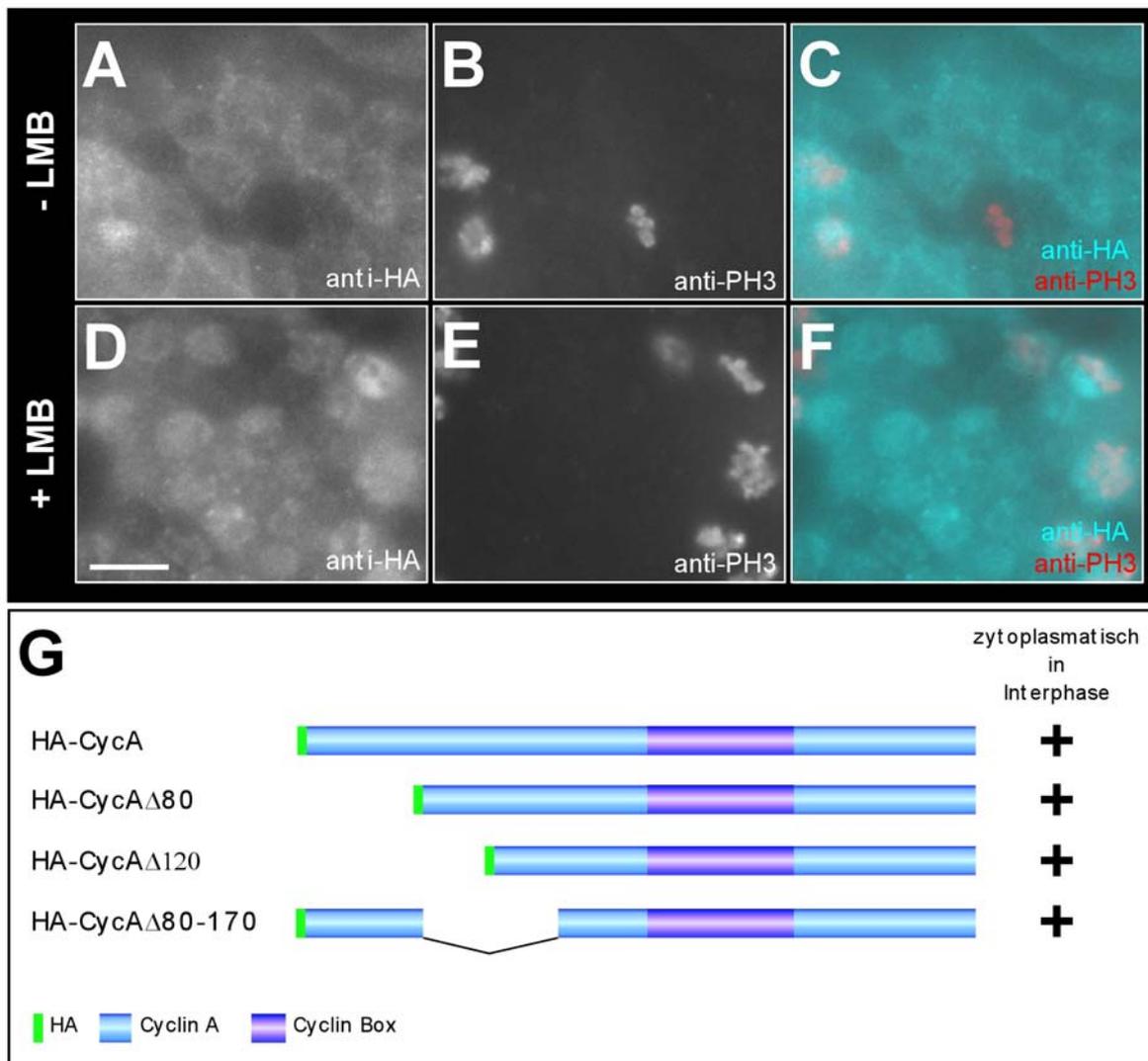


Abb. 22: Die konstitutive Kernlokalisierung von Cyclin A wird während der Interphase durch LMB-sensitiven Kernexport antagonisiert. (A)-(F) HA-Cyclin A wurde unter Kontrolle der *armGal4* Aktivatorlinie in Embryonen (Stadium 9, 10) exprimiert. Oktanpermeabilisierte Embryonen wurden entweder in Anwesenheit von LMB (D)-(F) oder einer entsprechenden Menge Lösungsmittel (A)-(C) inkubiert. Die Färbung mit α -HA weist das HA-Cyclin A nach und die Färbung mit α -PH3 detektiert die Kernphasen. Die Inhibierung des Kernexports durch LMB (D) führt dazu, dass HA-Cyclin A schon in der Interphase, wenn kein PH3-Signal detektierbar ist, im Kern akkumulieren kann. (G) Die den Kernexport vermittelnde Sequenz ist nicht im N-Terminus von Cyclin A lokalisiert. Durch die Deletion von möglichen N-terminalen Sequenzen, die den Kernexport katalysieren, sollten die Konstrukte während der Interphase im Zytoplasma lokalisiert sein. Die Konstrukte HA-Cyclin A Δ 80, HA-Cyclin A Δ 120 und HA-Cyclin A Δ 80-170 wurden durch mRNA-Injektion in Zusammenhang mit der Stabilität von Cyclin A getestet (Kaspar et al., 2001) und für die vorliegende Untersuchung auf die Lokalisierung während der Interphase analysiert. Da keine der untersuchten N-terminalen Deletionen Auswirkungen auf die Lokalisierung von Cyclin A während der Interphase hatte, kann davon ausgegangen werden, dass die den Kernexport vermittelnde Sequenz im C-terminalen Bereich liegen muß.

2.3.2 Suche nach möglichen NES-Sequenzen in Cyclin A durch Vergleich mit NES-Konsensussequenzen

Für viele Proteine sind mittlerweile NES beschrieben worden. Die häufigsten NES fallen in die Gruppe der klassischen Leucin-reichen NES. In Abb. 22 sind einige Proteine und die zugehörigen NES aufgelistet, so dass der charakteristische Abstand zwischen den hydrophoben Aminosäuren deutlich wird. Durch den Vergleich dieser bekannten NES wurden für die vier konservierten hydrophoben Positionen die am häufigsten vorkommenden Aminosäurereste abgeleitet und als „consensus“-Sequenz festgehalten. Dabei haben die Reste an den konservierten Positionen von oben nach unten absteigende Häufigkeiten und die Aminosäuren dazwischen sind nicht näher definiert. Mit dieser „consensus“-Sequenz wurde dann die Cyclin A Sequenz nach möglichen NES abgesucht. Die drei geboxten Domänen haben dem „consensus“ nach die größte Ähnlichkeit zu einem NES. Wie die Deletionsanalyse vermuten ließ, kann im N-Terminus von Cyclin A keine NES-ähnliche Sequenz gefunden werden.

| Leucin-reiche NES: | |
|----------------------|--|
| MAPKAPK2 | MTSALARMEV |
| cyclin B1 | LCQAFSDVLI |
| Rev HIV-1 | LPP-LETLTL |
| IkBaN-NES | MVKELQEIRL |
| IkBαC-NES | IQQQLGQLTL |
| IRF-3 | LDE-LLGMVL |
| PKI | LALKLAGLDI |
| TRADD | LEDALRNLC |
| D.m. E-APC (1) | CATSLSNLSM |
| D.m. E-APC (2) | VISGLSHLTV |
| consensus: | L₁₋₂₋₃ L₄₋₅ L₆₋₇ L |
| | M F M I |
| | I V V |
| | V I M |
| D.m. Cyclin A | |
| 92 | VVEQFKTFVS |
| 158 | VDRSILGVIQ |
| 231 | ISHNMRSILI |
| 264 | LDRFLSQMAV |
| 322 | VILKILSFDL |
| 349 | MPEKLYMTL |
| 356 | MTLYISELSL |
| 386 | LARHILGMEM |
| 408 | LED-LKTVVL |

Abb. 22: Suche nach Leucin-reichen NES in Cyclin A. Die häufigsten NES fallen in die Gruppe der klassischen Leucin-reichen NES. Einige Proteine und die zugehörigen NES sind derart aufgelistet worden, dass der charakteristische Abstand zwischen den hydrophoben Aminosäuren deutlich wird (Gasca et al., 2002; Morgan et al., 2002; Rosin-Arbesfeld et al., 2000; Yan et al., 1998; Yang et al., 1998). Die „consensus“-Sequenz wurde durch den Vergleich der bekannten NES abgeleitet. Die an den vier konservierten hydrophoben Positionen vorkommenden Aminosäuren haben von oben nach unten absteigende Häufigkeiten. Die Primärsequenz von Cyclin A wurde mit dieser „consensus“-Sequenz verglichen und nach NES abgesucht. Es wurden neun NES-ähnliche Bereiche gefunden, von denen aber nur drei aufgrund der verwendeten Aminosäuren als mögliche NES eingestuft werden können. Diese liegen in der Mitte und im C-Terminus von Cyclin A. Es konnten keine NES-ähnlichen Sequenzen im N-Terminus gefunden werden, was mit den Deletionsanalysen (Abb. 21) korreliert.

Die einem NES ähnlichsten Sequenzen liegen also alle im C-Terminus. Die Analyse des C-Terminus von Cyclin A ist jedoch schwierig. So können z.B. kleine Deletionen und sogar einzelne Punktmutationen die korrekte Faltung der Cyclin Box verhindern und das resultierende Protein ist nicht mehr funktionell und kann nicht mehr Cdk1 binden und aktivieren (Daten nicht gezeigt, (Brown et al., 1995)).

2.3.3 Analyse einer Cyclin E ähnlichen Kernimportsequenz

Es konnte gezeigt werden, dass Cyclin A während der Interphase durch Kernexport im Zytoplasma lokalisiert wird. Allerdings können weder in der Primärsequenz von Cyclin A noch in der der Partnerkinase Cdk1 offensichtliche Kernimportsequenzen gefunden werden. Daher geht man davon aus, dass Cyclin A entweder mit bisher unbekanntem Importfaktoren interagiert, dass erst durch die Cdk/Cyclin-Komplexbildung eine Kernimportsequenz gebildet wird oder dass dritte Proteine mit klassischer NLS den Komplex binden und den Kernimport katalysieren (Gallant et al., 1995; Yang und Kornbluth, 1999).

Erst kürzlich konnte für Cyclin E aus *Xenopus* ein basisches NLS im N-Terminus identifiziert werden (Moore et al., 2002). Diese NLS ist mit nur fünf Aminosäuren, davon vier basischen, relativ kurz. In Cyclin A in *Drosophila* konnte eine ähnliche kurze Sequenz detektiert werden (Abb. 23 A), die hauptsächlich aus vier basischen Aminosäuren besteht und in deren Nähe noch weitere basische Aminosäuren vorkommen. Diese Ansammlung von basischen Aminosäuren in Cyclin A wurde durch einen Aminosäureaustausch aufgehoben. Dabei wurden zwei der vier basischen Aminosäuren in saure Aminosäuren (Glutamate) umgewandelt. Wenn die positive Ladung der basischen Aminosäuren für die Bindung eines Importrezeptors notwendig wäre, dann sollte die Interaktion durch die negative Ladung der sauren Aminosäuren gestört sein.

Um die Funktionalität der potentiellen NLS in Cyclin A zu testen, wurde durch mRNA-Injektion getestet, ob Cyclin A mit der mutierten NLS während der Prophase im Kern akkumulieren kann (B)-(D). Die Mutation in der möglichen NLS von Cyclin A hat jedoch keine Auswirkungen auf die Lokalisierung von Cyclin A während der Prophase. In den beiden gezeigten Prophasezellen, erkennbar an dem PH3-Signal, akkumuliert das mutierte Cyclin A im Kern.

Das bedeutet, dass die Cyclin E ähnliche Kernimportsequenz in Cyclin A aus *Drosophila* nicht für den Kernimport von Cyclin A während der Prophase notwendig ist.

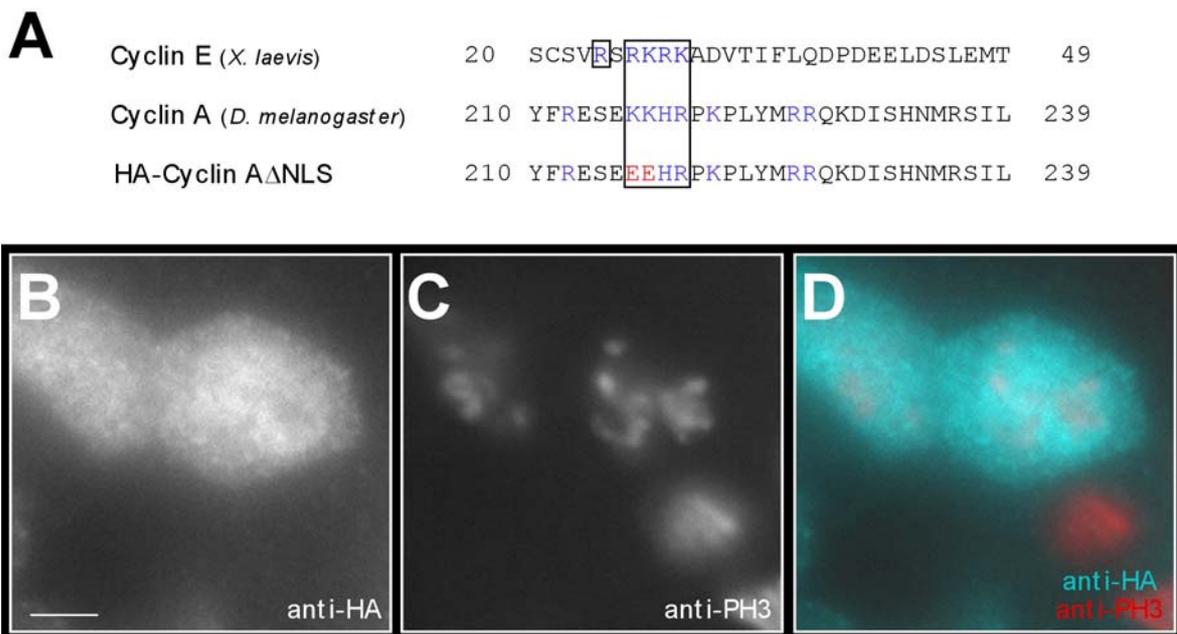


Abb. 23: Eine Cyclin E ähnliche Kernimportsequenz hat in Cyclin A keine Funktion bei der Kernlokalisierung während der Prophase. (A) In Cyclin A kann eine ähnlich kurze Kernimportsequenz identifiziert werden, wie sie für Cyclin E aus *Xenopus* beschrieben wurde (Moore et al., 2002). Diese Kernimportsequenz besteht hauptsächlich aus vier basischen Aminosäuren. Diese mögliche Kernimportsequenz in Cyclin A wurde durch Punktmutationen modifiziert. Zwei basische Aminosäuren wurden durch Glutamate ersetzt. In einem Kinase Assay wurde kontrolliert, dass dieser Austausch keine Auswirkungen auf die Bindung und Aktivierung der Partnerkinase Cdk1 hat (Daten nicht gezeigt). (B)-(D) mRNA-Injektion von HA-Cyclin A Δ NLS in zellularisierende Embryonen. Die Embryonen wurden nach einer zweistündigen Erholungsphase fixiert. Der anti-HA Antikörper weist das HA-Cyclin A Δ NLS nach, der anti-PH3 Antikörper markiert die Kernphasen. Die Mutation der möglichen NLS in Cyclin A hat keine Auswirkungen auf die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase. Es können zwei Prophasezellen erkannt werden, in denen HA-Cyclin A Δ NLS im Kern akkumulieren kann. Der Balken in (B) entspricht 5 μ m und gilt auch für (C) und (D).

2.4 *in vivo* Analyse von möglichen CDK-Phosphorylierungsstellen auf die Lokalisierung von Cyclin A

Die Lokalisierung von Cyclin B1 aus Vertebraten wird durch Phosphorylierungen reguliert. Durch die Phosphorylierung von Cyclin B1 wird auf der einen Seite die Kernexportsequenz inaktiviert und auf der anderen Seite der Kernimport beschleunigt. Obwohl einige beteiligte Kinasen mittlerweile identifiziert werden konnten, herrscht über den jeweiligen Einfluß noch Unklarheit. Zusätzlich gibt es kontroverse Darstellungen über den Einfluß der Autophosphorylierung von Cyclin B1 (Walsh et al., 2003).

Aus biochemischen Untersuchungen ist bekannt, dass Cyclin A phosphoryliert wird und ein Teil dieser Phosphorylierungen ist auf Autophosphorylierung zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). In der Primärsequenz von Cyclin A können fünf mögliche Cdk-Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die auf dem grundsätzlichen Cdk-Erkennungsmotiv (S/TP) basieren. Von diesen fünf Phosphorylierungsstellen sind drei im N-Terminus und zwei im C-Terminus von Cyclin A angeordnet (Abb. 24 A).

Um herauszufinden, ob die Autophosphorylierung einen Einfluß auf die Lokalisierung von Cyclin A hat, wurden die einzelnen Cdk-Phosphorylierungsstellen durch Punktmutationen inaktiviert. Dabei wurden die Serine oder Threonine in Valine umgewandelt, die nicht mehr phosphoryliert werden können. Durch Kinase Assays wurde kontrolliert, dass die Konstrukte funktionell sind, also Cdk1 binden und aktivieren können (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Lokalisierung durch Injektion von mRNA in zellularisierende Embryonen überprüft. Dabei konnte für HA-Cyclin A-S154V und HA-Cyclin A-T397V in einigen Zellen gezeigt werden, dass diese Konstrukte während der Prophase nicht im Kern akkumulierten. Dies ist für HA-Cyclin A-T397V stellvertretend in Abb. 24 (B),(C) dargestellt. Der Embryo in (B) befindet sich in Stadium 9 und das injizierte Konstrukt kann hauptsächlich im anterioren Bereich detektiert werden. In (C) ist die Vergrößerung der in (B) markierten Region gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass HA-Cyclin A-T397V in einigen Zellen während der Prophase nicht im Kern akkumuliert (Pfeilköpfe in C). Obwohl das PH3-Signal anzeigt, dass sich diese Zellen in der Prophase befinden, ist HA-Cyclin A-T397V nahezu vollständig zytoplasmatisch. Allerdings können auch einige Zellen nachgewiesen werden, in denen HA-Cyclin A-T397V während der Prophase normal im Kern akkumuliert (Sterne in C). Die Mutation der Cdk-Phosphorylierungsstellen hat anscheinend einen variablen Einfluß auf die Lokalisierung von Cyclin A.

Um die Funktion der Phosphorylierungsstellen reproduzierbar untersuchen zu können, wurden von allen fünf Punktmutationen UAS-Transgene hergestellt und als stabile Insertionen in das Genom von *Drosophila* integriert. Die Analyse beschränkte sich auf die Lokalisierung der Konstrukte während der Prophase. Dafür wurden die Punktmutationen mit der matGal4-Aktivatorlinie exprimiert und Embryonen, die sich in Stadium 7,8 befanden, wurden mit α -HA und α -PH3 Antikörpern gefärbt. Für keines der untersuchten Konstrukte konnten auffällige Lokalisierungsunterschiede während der Prophase dokumentiert werden, wie sie nach mRNA-Injektion für HA-Cyclin A-S154V und

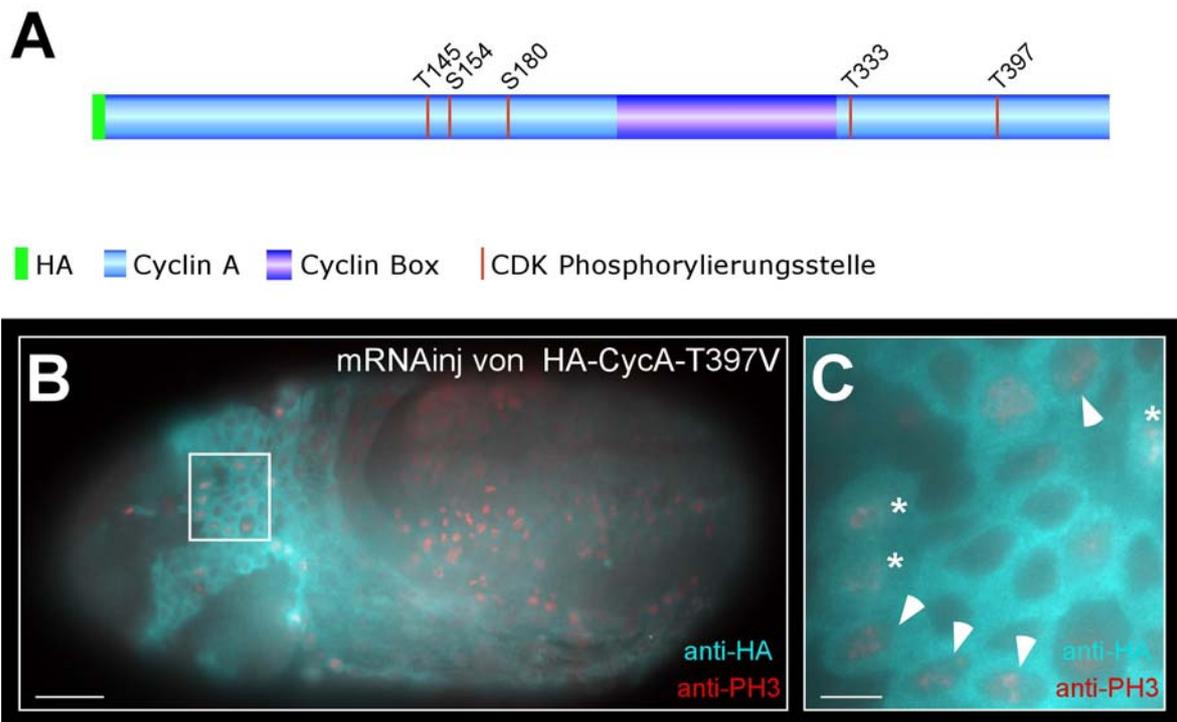


Abb. 24: Untersuchungen zum Einfluß der Autophosphorylierung auf die Lokalisierung von Cyclin A. (A) Die schematische Übersicht zeigt die Anordnung der möglichen Cdk-Phosphorylierungsstellen in Cyclin A. In der Primärsequenz von Cyclin A können fünf mögliche Cdk-Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die auf dem grundsätzlichen Cdk-Erkennungsmotiv (S/TP) basieren. Von diesen fünf Phosphorylierungsstellen sind drei im N-Terminus und zwei im C-Terminus von Cyclin A angeordnet. (B), (C) Nach mRNA-Injektion können Zellen detektiert werden, in denen HA-Cyclin A-T397V während der Prophase zytoplasmatisch ist. Die mRNA für HA-Cyclin A-T397V wurde in zellularisierende Embryonen injiziert. Nach zweistündiger Erholungsphase wurden die Embryonen fixiert und mit anti-HA und anti-PH3 Antikörpern gefärbt. Der Embryo in (B) befindet sich in Stadium 9 und das injizierte Konstrukt kann hauptsächlich im anterioren Bereich detektiert werden. Die Vergrößerung (C) der in (B) markierten Region zeigt, dass HA-Cyclin A-T397V in einigen Zellen (Pfeilköpfe) während der Prophase nicht im Kern akkumuliert, sondern zytoplasmatisch bleibt. Es können allerdings auch Zellen nachgewiesen werden (Sterne), wo HA-Cyclin A-T397V während der Prophase normal im Zellkern akkumuliert. Der Balken in (B) entspricht 50µm, der Balken in (C) 10µm.

HA-Cyclin A-T397V beobachtet wurden. Die Mutation einzelner Cdk-Phosphorylierungsstellen hat also keinen Einfluß auf die Lokalisierung von Cyclin A während der Prophase.

3. Diskussion

Cyclin A nimmt in Vertebraten und *Drosophila* eine Sonderstellung ein, weil es sowohl für Aspekte der S-Phase als auch für mitotische Vorgänge benötigt wird (Lehner und O'Farrell, 1990; Lehner et al., 1991; Pagano et al., 1992). Cyclin A ist in *Drosophila* das einzige essentielle mitotische Cyclin und zeigt eine dynamische zellzyklusabhängige Lokalisierung. Während der Interphase ist Cyclin A im Zytoplasma lokalisiert und akkumuliert in der Prophase im Kern (Lehner und O'Farrell, 1989). Es ist nicht bekannt, ob die Änderung der Lokalisierung eine grundlegende, funktionelle Bedeutung hat. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion und Regulation der subzellulären Lokalisierung von Cyclin A analysiert. Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass der LMB-sensitive Kernexport zur Kontrolle der zytoplasmatischen Lokalisierung von Cyclin A während der Interphase beiträgt und dass die Kernakkumulierung während der Prophase graduell verläuft. Die Lokalisierung von Cyclin A hat jedoch weder für den Eintritt in die Mitose noch für die Induktion von ektopischen S-Phasen eine essentielle oder regulatorische Funktion.

Detaillierte Analyse der Lokalisierung von Cyclin A und der Cyclin A-Konstrukte

Um die Funktion der Lokalisierung von Cyclin A aufzudecken, wurden Cyclin A-Konstrukte hergestellt, deren Lokalisierung durch heterologe Lokalisierungssignale verändert wurde. Dadurch sollte Cyclin A entweder konstitutiv im Kern lokalisieren oder die charakteristische Kernakkumulierung während der Prophase verhindert werden. Für die Untersuchungen wurden die Cyclin A-Konstrukte als UAS-Transgene stabil in das Genom von *Drosophila* integriert und konnten dadurch zeitlich und räumlich kontrolliert exprimiert und reproduzierbar analysiert werden. Die Konstrukte waren alle mit dem HA-Epitop markiert, um das transgene von dem endogenen Cyclin A unterscheiden zu können. Die Markierung mit dem HA-Epitop wurde gewählt, da schon gezeigt werden konnte, dass sie sich nicht auf die Lokalisierung von Cyclin A auswirkt (Dienemann, 1999; Kaspar et al., 2001). Für die späteren funktionellen Studien im *Cyclin A* mutanten Hintergrund mußte die Lokalisierung der Cyclin A-Konstrukte detailliert studiert werden, um zu dokumentieren, dass die erwartete mit der *in vivo* Lokalisierung übereinstimmt.

Durch die detaillierte Analyse der Lokalisierung von HA-Cyclin A konnte nochmals bestätigt werden, dass das HA-Epitop weder die Lokalisierung noch die Stabilität von Cyclin A beeinflusst. Weiterhin konnte erstmals gezeigt werden, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase graduell verläuft und mit der Kondensierung der DNA korreliert. Aufgrund der Kernakkumulierung während der Prophase wird angenommen, dass Cyclin A an prophasespezifischen Vorgängen wie der Kondensierung der DNA und der Auflösung der Kernmembran beteiligt ist (Lehner und O'Farrell, 1989; Peter et al., 1991). Aus der Beobachtung, dass Cyclin A graduell im Kern akkumuliert, könnte man ableiten, dass die ansteigende Kinaseaktivität im Kern die zunehmende DNA-Kondensierung katalysiert, und dass schließlich die anhaltend hohe Kinaseaktivität im Kern die Fragmentierung der Kernmembran erleichtert.

Aus Voruntersuchungen war bereits bekannt, dass eine konstitutive Kernlokalisierung durch das NLS dominant über die endogenen Lokalisierungssignale von Cyclin A ist (Dienemann, 1999). Die NES wurde auch in den Voruntersuchungen beschrieben, jedoch war die Lokalisierung von HA-NES-Cyclin A während der Prophase nicht immer eindeutig zytoplasmatisch. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, anhand von Zellen, die sich in der Prophase befanden und geringe Mengen an HA-NES-Cyclin A im Kern aufwiesen. Da diese Beobachtung nur in Prophasezellen und nicht in Interphasezellen gemacht wurde und die Lokalisierungsstudien im wildtypischen Hintergrund durchgeführt wurden, war die offensichtlichste Erklärung, dass das endogene Cyclin A die Fragmentierung der Kernmembran katalysierte. Dadurch die Kernmembran ihre Integrität verlor und der Kernexport beeinträchtigt wurde. Durch den simultanen Vergleich der Lokalisierung von Cyclin A und HA-NES-Cyclin A zu verschiedenen Zeitpunkten während der Prophase konnte eindeutig gezeigt werden, dass die NES die Kernakkumulierung von HA-NES-Cyclin A während der frühen Prophase verhindert. Das bedeutet, dass die heterologe NES dominant über die Kernakkumulierung von Cyclin A ist. Weiterhin lassen die Ergebnisse auch den indirekten Schluß zu, daß die Transportvorgänge durch die Kernporen tatsächlich noch während der Fragmentierung der Kernmembran stattfinden können. Die homogene Verteilung von HA-NES-Cyclin A findet im wildtypischen Hintergrund erst spät in der Prophase statt, und vorher scheint der Kernexport das durch die Fragmentierung der Kernmembran eindiffundierte HA-NES-Cyclin A kompensieren zu können.

Die Bestätigung der erwarteten Lokalisierung des in der Membran verankerten tor-HA-Cyclin A wurde erst durch die Kombination von immunohistochemischen und biochemischen Methoden möglich. Die Lokalisierung von tor-HA-Cyclin A nach mRNA-Injektion zeigte die erwartete Lokalisierung und tor-HA-Cyclin A konnte als Zellmembranprotein nachgewiesen werden, welches als feine Linie die Zellmembranen der einzelnen Zellen nachzeichnete. In Zellen, die sich in der Prophase befanden, konnte kein tor-HA-Cyclin A detektiert werden. Bei der Dokumentation der Lokalisierung fiel auf, dass tor-HA-Cyclin A nur in einem kleinen Bereich um die Injektionsstelle herum nachweisbar war. Bei frei diffundierbaren Proteinen findet man gewöhnlich eine gradientenähnliche Verteilung des Proteins, mit der höchsten Konzentration an der Injektionsstelle und stetig abnehmender Konzentration je weiter entfernt man sich von der Injektionsstelle befindet (Kaspar et al., 2001). Das bedeutet, daß die injizierte mRNA und die von ihr translatierten Proteine im Embryo vor der Zellularisierung diffundieren und infolge einen Gradienten bilden. Bei tor-HA-Cyclin A wird die Diffusion des Proteins jedoch dadurch verhindert, dass es als Membranprotein cotranslational in das Endoplasmatische Reticulum (ER) hinein translatiert wird. Dadurch kann weder die injizierte mRNA noch das junge Transmembranprotein weit von der Injektionsstelle wegdiffundieren.

Die Lokalisierung von transgenem tor-HA-Cyclin A war nicht so eindeutig wie nach der mRNA-Injektion. tor-HA-Cyclin A schien eher im gesamten Zytoplasma lokalisiert zu sein. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass bei den Transgenen die Menge an exprimiertem Protein höher ist, dass das Protein den gesamten sekretorischen Weg markiert oder dass das Protein vielleicht teilweise wieder in Vesikeln recycelt wurde oder durch eine Kombination dieser aufgeführten Möglichkeiten. Trotzdem kann aus zwei Beobachtungen geschlossen werden, dass tor-HA-Cyclin A ein Membranprotein ist: erstens konnte tor-HA-Cyclin A in keiner der untersuchten Prophasen signifikant im Kern akkumulieren, und zweitens wurde biochemisch gezeigt, dass tor-HA-Cyclin A nur in der Membranfraktion nachzuweisen ist. Bei den biochemischen Versuchen konnte auch ein Spaltprodukt von tor-HA-Cyclin A detektiert werden, dass jedoch mengenmäßig vernachlässigbar ist und ebenfalls nur in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte. Das Spaltprodukt muß also noch die Transmembrandomäne von Torso beinhalten. Die Entstehung des Spaltproduktes ist unklar, denn es gibt keine Referenz, ob normalerweise der extrazelluläre Teil von Torso prozessiert wird. Eine ähnliche

Prozessierung wurde auch bei einem Fusionsprotein mit einem verkürzten extrazellulären Teil von Torso beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Um die Dynamik der subzellulären Lokalisierung von Cyclin A unter physiologischen Bedingungen dokumentieren zu können, wurde ein transgenes Cyclin A-GFP-Konstrukt hergestellt und analysiert. Die C-terminale Fusion mit GFP hatte keine Auswirkungen auf die Aktivität von Cyclin A-GFP, aber das Fusionsprotein konnte *in vivo* nicht im Hinblick auf die Lokalisierung untersucht werden, weil es in Embryonen verschiedenen Alters weder durch die Autofluoreszenz des GFP-Anteils noch durch immunohistochemische Nachweismethoden detektiert werden konnte. Es konnte festgestellt werden, dass die Expression von Cyclin A-GFP nicht mal die Hälfte des endogenen Cyclin A erreichte. Es konnten keine Linien mit stärkerer Expression etabliert werden, weil die Überexpression von Cyclin A letal auf die Fliegen wirkt (s.u.). Da nur Insertionen auf dem dritten Chromosom erhalten werden konnten, müssen erst Insertionen auf anderen Chromosomen erhalten werden, damit die Expression transient durch eine Kreuzung erhöht werden kann.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der detaillierten Analyse der Lokalisierung der verschiedenen Cyclin A-Konstrukte, dass die heterologen Lokalisierungssignale die erwartete Lokalisierung herbeiführen. Das NLS führt zu einer konstitutiven Kernlokalisierung und die NES und die Membranverankerung verhindern die Akkumulierung im Kern. Die Konstrukte eignen sich also, um die funktionelle Bedeutung der Lokalisierung von Cyclin A zu analysieren.

Die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase ist nicht essentiell

Für die funktionellen Studien der Cyclin A-Konstrukte wurden verschiedene *in vivo* Systeme verwendet. Für die Analyse des Einflusses der Lokalisierung auf die mitotische Funktion von Cyclin A wurden Phänotypen zugrunde gelegt, die auf der *Cyclin A* Mutation basieren.

Die Wiederherstellung der Mitose 16 in *Cyclin A* Mutanten zeigte zunächst, dass die Lokalisierung von Cyclin A keine regulatorische Funktion bei der Induktion von Mitosen in der embryonalen Epidermis hat. Die Cyclin A-Konstrukte konnten alle die Mitose 16 induzieren, egal ob sie im Zytoplasma, an der Membran oder im Kern lokalisiert waren. Das bedeutet, dass Cyclin A nicht im Kern akkumulieren muß, um Prophasen einzuleiten. Auch die Ergebnisse mit tor-HA-Cyclin A bei der Wiederherstellung der Mitose 15 im

Cyclin A/Cyclin B doppelmutanten Hintergrund lassen darauf schliessen, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A für die Induktion der Mitose nicht notwendig ist.

Obwohl die Lokalisierungsstudien der Cyclin A-Konstrukte gezeigt haben, dass die an der Kernakkumulierung gehinderten Cyclin A-Konstrukte sich im Zytoplasma bzw. in der Zellmembran befinden, besteht die Möglichkeit, dass geringe nukleäre Mengen an HA-NES-Cyclin A oder eines nicht nachweisbaren tor-HA-Cyclin A-Spaltproduktes für die Induktion der Mitosen verantwortlich sind. In Vertebraten konnte ermittelt werden, dass Cyclin A etwa 100x effektiver die Substratphosphorylierung im Kern katalysieren kann als Cyclin E (Moore et al., 2002). Das unterstützt die Möglichkeit, dass schon geringe Mengen an Cyclin A für die Induktion der Mitose ausreichen. Da die beginnende DNA-Kondensierung zu Anfang der Prophase direkt mit der detektierbaren Kernakkumulierung von Cyclin A korreliert, kann davon ausgegangen werden, dass die mitoseinduzierenden Cyclin A Proteinmengen nicht unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Für HA-NES-Cyclin A konnte gezeigt werden, dass es in frühen Prophasen nicht im Kern akkumulieren kann. Daher kann geschlossen werden, dass HA-NES-Cyclin A die Mitose im Zytoplasma induzieren muß. Für tor-HA-Cyclin A konnte gezeigt werden, dass die Menge an Spaltprodukt sehr gering ist. Vergleicht man diese mit der Menge an restlichem Cyclin A in *Cyclin A* Mutanten, dann kann geschlossen werden, dass die Menge an Spaltprodukt noch geringer ist als die Menge an verbliebenem Cyclin A. Da das verbliebene Cyclin A keine Mitosen auslösen kann, kann davon ausgegangen werden, dass die Menge an Spaltprodukt nicht für die mitoseinduzierende Aktivität verantwortlich sein kann und auch tor-HA-Cyclin A die Mitose im Zytoplasma induzieren muß.

HA-NLS-Cyclin A induzierte unter den experimentellen Bedingungen mehr Mitosen als HA-Cyclin A oder HA-NES-Cyclin A. Es ist nicht ganz klar, wie diese erhöhten Zellzahlen zustande kommen können. Die Expressionsstudien haben gezeigt, dass HA-NLS-Cyclin A schwächer als endogenes Cyclin A und auch etwas schwächer als die anderen Cyclin A-Konstrukte exprimiert wird. Die erhöhte Zellzahl ist also nicht durch bloße Überexpression zu erklären. Von den getesteten frei diffundierbaren Cyclin-Konstrukten war nur HA-NLS-Cyclin A in der Lage, schwache ektopische S-Phasen in der Epidermis von Embryonen zu induzieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass HA-NLS-Cyclin A die Fähigkeit besitzt einen zusätzlichen Zellzyklus zu initiieren. Allerdings hatte die Expression von HA-NLS-Cyclin A im wildtypischen Hintergrund keinen erkennbaren Einfluß auf das mitotische PH3-Muster im Embryo (Daten nicht

gezeigt; (Dienemann, 1999). Außerdem wird HA-NLS-Cyclin A in der G1-Phase abgebaut, und kann nicht im Kern akkumulieren (Grosskortenhaus, 2001). Wenn die erhöhte Zellzahl etwas mit der Kernakkumulierung zu tun hat, müssen also schon vor der G1-Phase mehr Mitosen induziert worden sein. Ob dies der Fall ist, ist schwer aufzulösen, da das mitotische Muster in den Zellzyklen 15 und 16 sehr komplex ist. Es konnten keine auffälligen Unterschiede im PH3-Muster erkannt werden, und es ist fraglich, ob ca. 10 zusätzliche Zellteilungen in einem Segment innerhalb des komplexen Musters auffallen würden.

Anhand der Induktion von einer einzigen Mitose läßt sich jedoch nicht ableiten, dass die Lokalisierung von Cyclin A nicht notwendig ist und keine generelle essentielle Funktion hat. Daher wurde zusätzlich untersucht, ob die verschiedenen Cyclin A-Konstrukte in der Lage sind, die embryonale Letalität von *Cyclin A* Mutanten zu überwinden. Durch die ubiquitäre Expression der frei diffundierbaren Cyclin A-Konstrukte im *Cyclin A* mutanten Hintergrund konnte die embryonale Letalität überwunden werden und die Entwicklung von Larven und Puppen bis hin zu Adulten stattfinden. Dies zeigt, dass die Lokalisierung von Cyclin A auch während verschiedener Entwicklungsphasen keine essentielle Funktion besitzt.

Die Expression mit der *daGal4*-Aktivatorlinie zeigte sowohl im wildtypischen als auch im *Cyclin A* mutanten Hintergrund Effekte, die mit der exprimierten Proteinnmenge korrelierten. Im wildtypischen Hintergrund hatte die milde Expression der Cyclin A-Konstrukte bei 18°C keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit oder die Morphologie der Adulten. Dagegen führte die stärkere Expression der Konstrukte bei 25°C oder 27°C zu Letalität im finalen Puppenstadium. Da die Fliegen vollentwickelt in der Puppe vorlagen, konnte die Expression der Konstrukte keine gravierenden Auswirkungen auf die Entwicklung bis zur Metamorphose haben. Bei den Fliegen konnte ein rauhe Augen-Phänotyp gefunden werden, wie er für die Überexpression von Cyclin A in der Augenimaginalscheibe beschrieben ist (Sprenger et al., 1997). Die Fliegen konnten zudem nicht schlüpfen. Die Beobachtungen könnten dadurch erklärt werden, dass die Expression mit *daGal4* hauptsächlich die Zelldifferenzierungsvorgänge im Auge und im Nervensystem stört und vielleicht auch von Muskelzellen. Sowohl ein unzureichend entwickeltes Nervensystem, was die Muskeln nicht funktionsfähig innervieren kann als auch Defekte der Muskelausbildung selbst, könnten die stark eingeschränkte Bewegungsfähigkeit der Adulten erklären, die schließlich dazu führt, dass sie nicht

schlüpfen können. In der Augenimaginalscheibe konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Expression von Zellzyklusregulatoren in der Lage ist G1-Zellen in die S-Phase zu überführen und dadurch Differenzierungsvorgänge zu stören (Dong et al., 1997; Sprenger et al., 1997).

Wenn die Konstrukte mit *daGal4* im *Cyclin A* mutanten Hintergrund exprimiert wurden, konnte interessanterweise festgestellt werden, dass unabhängig von der Expressionsstärke die embryonale Letalität überwunden werden konnte. Das zeigte sich dadurch, dass die Entwicklung von Larven und Puppen stattfand. Unterschiede in der Expressionsstärke wurden erst während der Metamorphose offensichtlich. Die starke Expression der Konstrukte führte dazu, dass sich keine der Puppen in Adulte entwickeln konnten, weil sie entweder nekrotisch wurden oder nicht schlüpften. Nur die milde Expression der Konstrukte bei 18°C erlaubte die Entwicklung von Adulten, die allerdings nur eine kurze Lebensdauer aufwiesen. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, dass die Zellzyklen und die Zelldifferenzierungen im Embryo weniger sensitiv auf die Menge an Cyclin A reagieren, als die Zellzyklen und Zelldifferenzierungen in den Imaginalscheiben und während der Metamorphose.

Die Adulten, die nicht schlüpfen konnten und die nur kurzzeitig lebensfähigen Adulten wiesen zudem einen variablen Phänotyp auf dem Notum auf, der die Anzahl der Borsten betraf. Obwohl dieser Phänotyp nicht statistisch mit der Lokalisierung der Konstrukte korreliert wurde, konnte für HA-Cyclin A und HA-NES-Cyclin A festgestellt werden, dass weniger Borsten fehlten als bei HA-NLS-Cyclin A. Die Entwicklung der Borsten beginnt während der späten larvalen und frühen pupalen Stadien, wenn in den Flügelimaginalscheiben die sensorischen Vorläuferzellen (SMCs=sensory mother cells) definiert werden. Jede SMC teilt sich dann noch zweimal asymmetrisch, wodurch eine neurale Zelle und drei unterstützende Zellen entstehen. Zusammen bilden sie ein mechanosensorisches Organ, welches sich dann in der Adulten zu einer Borste differenziert. Der beobachtete Borstenphänotyp ähnelt dem Phänotyp der *Cyclin A^{har}* Mutation, die aufgrund einer Mutation in cis-regulatorischen Bereichen die Expression von Cyclin A speziell in SMCs reprimiert (Ueda et al., 1992). Die amorphe *Cyclin A* Mutation, die für die funktionellen Studien verwendet wurde, kann in diesem Stadium normalerweise nicht analysiert werden, da sie zu einem embryonal letalen Phänotyp führt. Die Entwicklung bis hin zu Adulten kann nur durch die milde Expression der Cyclin A-Konstrukte erreicht werden. Unter den experimentellen Bedingungen beruht der

beobachtete Borstenphänotyp wahrscheinlich auch auf einem Mangel an Cyclin A in den SMCs, und kann durch die Expression der Konstrukte variabel suprimiert werden kann. Das mit der Expression von HA-NLS-Cyclin A weniger Borsten differenziert werden können, kann wegen der zugrunde liegenden Mutation eher an der Expressionsstärke als der Lokalisierung des Konstruktes liegen. Für HA-NLS-Cyclin A konnte mit der *prdGal4*-Aktivatorlinie gezeigt werden, dass es schwächer exprimiert wird als HA-Cyclin A oder HA-NES-Cyclin A.

Ausgehend von diesen Beobachtungen, kann davon ausgegangen werden, dass die Lokalisierung von Cyclin A keine regulatorische Funktion für die Induktion und Aufrechterhaltung der Mitose spielen kann, und dass die Lokalisierung nicht zum geordneten Ablauf der mitotischen Vorgänge beiträgt. Dies ist ein klarer Unterschied zu Cyclin B1 aus Vertebraten, das z.B. nach DNA-Schädigung aus dem Kern heraustransportiert werden muß, damit die Reparaturprozesse durchgeführt werden können (Toyoshima et al., 1998). Somit kommt der Kernakkumulierung von Cyclin A keine essentielle Funktion zu. Vielleicht dient die Kernakkumulierung von Cyclin A nur einem effizienteren und schnelleren Ablauf der Kernprozesse. In dieser Arbeit wurden keine Experimente zur Dynamik und zum Timing der Mitosen bei Embryonen, die verschiedene Cyclin A-Konstrukte exprimieren, durchgeführt. Eine solche Analyse könnte aber klären, ob die Lokalisierung einen Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Mitose hat.

Die essentielle Funktion von Cyclin A kann nicht von Cyclin B übernommen werden

Bei der Charakterisierung der *Cyclin A* Mutation in *Drosophila* wurde festgestellt, dass *Cyclin A* trotz der Anwesenheit von Cyclin B ein essentielles Gen ist (Lehner und O'Farrell, 1989). In *Cyclin A* Mutanten ist die Menge und Aktivität von endogenem Cyclin B nicht verändert (persönliche Mitteilung Frank Sprenger). Dies ist ein Unterschied zum Vertebratensystem, wo Cyclin A möglicherweise an der Stabilisierung von Cyclin B zu Beginn der Mitose beteiligt ist und dadurch indirekt an der Induktion der Mitose durch Cyclin B (Yam et al., 2002). Um herauszufinden, ob eine Überexpression oder eine konstitutive Kernlokalisierung von Cyclin B den Mangel an Cyclin A ausgleichen und die Mitose 16 induzieren könnte, wurden bei den funktionellen Studien zur Wiederherstellung der Mitose 16 auch zwei Cyclin B-Konstrukte getestet. Es konnte gezeigt werden, dass weder die Expression von HA-Cyclin B noch von HA-NLS-Cyclin B die essentielle

Funktion von Cyclin A übernehmen kann. Die Versuche im *Cyclin A/cyclin B* doppelmutanten Hintergrund haben zusätzlich verdeutlicht, dass keine hohe Kernakkumulierung der mitotischen Cycline für die Induktion der Mitose 15 notwendig ist und dass eine zytoplasmatische Aktivität von tor-HA-Cyclin A ausreicht, um die Mitose 15 zu induzieren.

Somit können mehrere Aussagen abgeleitet werden. Für die Cyclin A assoziierte Kinase muß es einzigartige Substrate geben, die von der Cyclin B assoziierten Kinase nicht erkannt werden können. Die Substratspezifität kann nicht durch die Überexpression von Cyclin B umgangen werden. Durch die Überexpression von HA-Cyclin B und HA-NLS-Cyclin B sollte aufgrund der Mengen dieser Proteine eine die Stabilität betreffende Regulation vernachlässigbar sein, deshalb besteht die mitoseinduzierende Funktion von Cyclin A in *Drosophila* nicht in der Stabilisierung von Cyclin B. Für die Induktion der Mitose werden keine hohen nukleären Konzentrationen der mitotischen Cycline benötigt.

Die Lokalisierung von Cyclin A ist für die Induktion ektoischer S-Phasen unwichtig

Neben der mitotischen Funktion ist Cyclin A in *Drosophila* auch an Aspekten der Regulation der S-Phase beteiligt. Die S-Phase Funktion von Cyclin A ist in Vertebraten besser verstanden als in *Drosophila*. In Vertebraten wird Cyclin A zu Beginn der S-Phase synthetisiert und lokalisiert im Kern, unter anderem an Stellen, an denen DNA-Replikation stattfindet. Das Modell zur Funktion von Cyclin A während der S-Phase besagt, dass Cyclin A an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt ist und an der Verhinderung der Rereplikation während eines Zellzyklus (Coverley et al., 2002; Yam et al., 2002). In *Drosophila* ist Cyclin A während der Interphase zytoplasmatisch und kann nur während der Mitose im Kern detektiert werden (Lehner und O'Farrell, 1989). Trotzdem kann die Überexpression von Cyclin A zu ektoischen S-Phasen führen (Lehner et al., 1991; Sprenger et al., 1997) und es konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass Cyclin A an der Kontrolle zur Verhinderung der Rereplikation in *Drosophila* beteiligt ist (Mihaylov et al., 2002).

Um herauszufinden, ob für die Induktion von ektoischen S-Phasen die Lokalisierung von Cyclin A eine Rolle spielt, wurden die Cyclin A-Konstrukte in Embryonen oder Augenimaginalscheiben exprimiert und S-Phasen durch die Inkorporation des

Basenanalogs BrdU sichtbar gemacht. In Embryonen konnten ektopische S-Phasen nur durch die Expression von HA-NLS-Cyclin A oder tor-HA-Cyclin A induziert werden. Das bedeutet, dass die Lokalisierung einerseits unwichtig für die Induktion von ektopischen S-Phasen ist, da sowohl nukleäres wie zytoplasmatisches Cyclin A diesen Effekt zeigten. Da HA-NLS-Cyclin A jedoch schwächer als die beiden anderen frei diffundierbaren Cycline exprimiert wird, zeigt es andererseits auch, dass der Embryo anscheinend sensitiver auf konstitutiv kernlokalisiertes Cyclin A reagiert. tor-HA-Cyclin A zeigte die stärkste S-Phase induzierende Kapazität unter den experimentellen Bedingungen. Es könnte sein, dass tor-HA-Cyclin A aufgrund der Topologie eine erhöhte Stabilität aufweist oder nicht adäquat durch „checkpoints“ kontrolliert werden kann (s.u.). Der Farbstoff Propidiumiodid interkaliert zwischen die Basen der DNA und die Menge an eingelagertem Farbstoff korreliert mit der Menge an DNA. Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von tor-HA-Cyclin A auch dazu führt, dass die Zellen mehr DNA-Farbstoff einlagern können. Dies spricht dafür, dass tor-HA-Cyclin A in der Lage ist Endozyklen zu induzieren und die Schutzmechanismen der Rereplikation außer Kraft setzen kann.

In den Augenimaginalscheiben konnte gezeigt werden, dass die Lokalisierung von Cyclin A für die Induktion von ektopischen S-Phasen unerheblich ist. Alle getesteten Konstrukte waren in der Lage ektopische S-Phasen zu induzieren und es konnten keine offensichtlichen qualitativen oder quantitativen Unterschiede nachgewiesen werden. Obwohl die DNA-Replikation ein Prozess ist, der innerhalb des Kerns stattfindet, muß Cyclin A nicht in diesem Kompartiment lokalisiert sein, um S-Phasen zu induzieren. Da für die Zellteilung bekannt ist, dass mitosespezifische Vorgänge auch von anderen Kinasen in der Abwesenheit von Cdk1 katalysiert werden können (Gowdy et al., 1998), liegt die Vermutung nahe, dass auch für die Induktion und Durchführung der S-Phase mehrere Kinasen verantwortlich sind.

Membranverankertes tor-HA-Cyclin A führt zu verschiedenen Phänotypen

Das membranverankerte tor-HA-Cyclin A fiel bei allen Untersuchungen durch spezielle Effekte auf und hatte sowohl auf die S-Phase als auch auf die Mitose besondere Einflüsse. Bei den Lokalisierungsstudien konnte erst durch den Einsatz von immunohistochemischen und biochemischen Methoden gezeigt werden, dass tor-HA-Cyclin A tatsächlich ein Membranprotein ist. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass tor-HA-Cyclin A im Verlauf der Mitose stabilisiert war und nicht in allen Zellen während der Metaphase

abgebaut wurde. Das Protein konnte stattdessen in der Ana- und Telophase, bis in die nächste Interphase hinein nachgewiesen werden. Die erhöhte Stabilität könnte auf die Topologie von tor-HA-Cyclin A als Membranprotein zurückgeführt werden. Es könnte sein, dass der APC das Protein nur schlecht erkennt oder dass es schlecht im Proteasom abgebaut werden kann. Zusätzlich scheint tor-HA-Cyclin A nicht oder nur unzureichend durch „DNA checkpoints“ kontrolliert werden zu können, da es das einzige Cyclin A-Konstrukt ist, welches durch bloße Überexpression zu starken S-Phase und auch zu mitotischen Effekten führt. Die Variabilität dieser Effekte kann durch die individuelle Expressionsstärke in den jeweiligen Zellen erklärt werden und spricht dafür, dass ein bestimmter Schwellenwert an Kinaseaktivität erreicht werden muß, damit Zellzyklusübergänge aktiviert oder blockiert werden können.

Durch die erhöhte Stabilität und die Immunität gegenüber „checkpoints“ kann Cyclin A assoziierte Kinaseaktivität aufrechterhalten werden, die schließlich zu dem beobachteten mitotischen Defekt von tor-HA-Cyclin A führt. Der mitotische Defekt ist charakterisiert durch Zellen, welche die verdoppelte DNA nicht ordentlich auf zwei Tochterzellen verteilen können und stattdessen zwei Zellkerne beinhalten, die sehr dicht beieinanderliegen oder nur unzureichend getrennt sind. Die DNA zeigt später Anzeichen von Polyploidie, ist teilweise kondensiert und kann gleichzeitig Marker für S-Phasen und Mitosen aufweisen. Diese Doppelmarkierung zeigt, dass die Kontrolle der sequentiellen Abfolgen der Zellzyklusphasen von tor-HA-Cyclin A umgangen werden kann.

Das Auftreten von zwei Zellkernen läßt darauf schließen, dass die Anwesenheit von tor-HA-Cyclin A keinen Einfluß auf die Trennung der Chromosomen hat. Normalerweise führt stabiles Cyclin A zu einem Arrest während der Metaphase, und die Trennung der Chromosomen findet nicht statt (Sigrist et al., 1995). Es kann also sein, dass die Lokalisierung von Cyclin A in der Nähe oder an den Chromosomen einen Einfluß auf die Trennung der Schwesterchromatiden besitzt.

Wie kommt es zu dem mitotischen Defekt? Entweder kann während der Ana- und/oder der Telophase kein ausreichender Abstand zwischen den Tochterkernen erreicht werden, und die Zytokinese kann zwischen den unzureichend getrennten Kernen nicht durchgeführt werden. In diesem Fall wäre der primäre Grund der unzureichende Abstand zwischen den Tochterkernen. Das würde bedeuten, dass tor-HA-Cyclin A sich auf die Dynamik der Spindel auswirken würde. Bisher gibt es allerdings keinerlei Hinweise darauf, dass Cyclin A etwas mit der Dynamik der Spindel zu tun hat. Für Cyclin B ist hingegen die

Assoziation mit Mikrotubuli und ein Einfluß auf die Dynamik der Spindel bekannt (Huang und Raff, 1999; Jackman et al., 1995; Ookata et al., 1995; Stiffler et al., 1999). eine andere Erklärung könnte darin liegen, dass die Zytokinese direkt betroffen ist. Die Anwesenheit von Cyclin A assoziierter Kinaseaktivität an der Membran könnte einen direkten, inhibitorischen Einfluß auf die Zytokinese haben. Für Cyclin B und Cyclin B3 ist ein solcher Einfluß bekannt (Echard und O'Farrell, 2003). Die Defekte deuten darauf hin, dass auch Cyclin A einen Einfluß auf späte mitotische Vorgänge haben kann, die aber mit stabilen Cyclin A-Konstrukten nicht untersucht werden können, da sie den Zellzyklus schon viel früher, nämlich während der Metaphase arretieren.

Die Effekte, die mit tor-HA-Cyclin A in *Drosophila* beobachtet werden können, spiegeln Teilaspekte der Effekte wieder, die mit einem ER-verankerten Cyclin A2 in Vertebraten erhalten wurden (Faivre et al., 2002). Cyclin A2 ist normalerweise hauptsächlich im Kern lokalisiert und ist zusammen mit der Partnerkinase Cdk2 an S-Phase-Vorgängen und mit Cdk1 an mitotischen Vorgängen beteiligt. Das ER-verankerte Cyclin A2 verschiebt die Cyclin A2 assoziierte Kinaseaktivität in das Zytoplasma und führt zur Vermehrung von Centrosomen, zur Bildung multipolarer Spindeln, zu Polyploidie, zu Zellen mit mehreren Kernen, der Mißverteilung von Chromosomen und damit zu genetischer Instabilität. Daraus wurde ein Zusammenhang zwischen der ektopischen zytoplasmatischen Lokalisierung und dem Entstehen von Krebs hergestellt, da auch bei einigen Tumorarten die subzelluläre Lokalisierung von Cyclin A2 hin zu einem zytoplasmatischen Pool verschoben ist. Für tor-HA-Cyclin A konnte neben dem beschriebenen mitotischen Phänotyp zusätzlich beobachtet werden, dass in einigen tor-HA-Cyclin A exprimierenden Zellen der Centrosommarker γ -tubulin in Stadium 13 Embryonen ein starkes Signal gab, welches in Kontrollzellen nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Ob es sich dabei um mehrere Centrosomen in einer Zelle handelt wurde in dieser Arbeit nicht mehr verfolgt. Da in Vertebraten bekannt ist, dass Cyclin A an der Replikation des Centrosoms beteiligt ist (Meraldi et al., 1999), könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass auch Cyclin A in *Drosophila* am Centrosomenzyklus beteiligt ist.

LMB-sensitiver Kernexport ist an der Lokalisierung von Cyclin A während der Interphase beteiligt

Obwohl die funktionellen Studien gezeigt haben, dass die subzelluläre Lokalisierung von Cyclin A nicht mit der Funktion korreliert, stellt die zellzyklusabhängige

Akkumulierung trotzdem eine charakteristische Eigenschaft von Cyclin A dar. Über den Mechanismus und die Regulation der Lokalisierung gab es bisher keine Erkenntnisse. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass der LMB-sensitive Kernexport während der Interphase an der zytoplasmatischen Lokalisierung von Cyclin A beteiligt ist. Nach der Applikation des Kernexportinhibitors LMB konnte Cyclin A in Interphasezellen verfrüht im Kern akkumulieren. Das heißt, dass Cyclin A während der Interphase zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin- und hertransportiert werden muß. Diese Beobachtung beweist, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A kein passives oder sekundäres Ereignis sein kann, und daher sowohl die zytoplasmatische Lokalisierung als auch die Kernakkumulierung aktive und regulierte Prozesse sein müssen. Weiterhin schließt diese Beobachtung ein, dass Cyclin A durch einen noch nicht charakterisierten Importweg in den Kern gelangen muß und dass der Kernexportrezeptor Crm1 (*embargoed* in *Drosophila*) direkt oder indirekt mit Cyclin A oder dem Cdk1/Cyclin A-Komplex interagieren muß. Schließlich muß der Kernexport von Cyclin A während der Prophase beendet werden, damit Cyclin A im Kern akkumulieren kann.

In Vertebraten ist für Cyclin A und Cyclin B gezeigt worden, dass die Proteine zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin- und hertransportiert werden, obwohl durch immunohistochemische Methoden während der Interphase Cyclin A im Kern und Cyclin B im Zytoplasma nachzuweisen ist (Hagting et al., 1998; Jackman et al., 2002; Toyoshima et al., 1998). Auf mechanistischer Ebene der Lokalisierung besteht der wesentliche Unterschied zwischen Cyclin A und Cyclin B darin, dass der Kernexport von Cyclin A nicht durch LMB inhibiert werden kann (Jackman et al., 2002). Das bedeutet, dass die verwendeten Exportwege für Cyclin A und Cyclin B unterschiedlich sind, was sich dann auch in der unterschiedlichen Lokalisierung ausdrückt. Obwohl Cyclin A in *Drosophila* und Vertebraten ähnliche Funktionen besitzt, sind die Kernexportwege und die resultierende Lokalisierung unterschiedlich. Vorallem aufgrund des LMB-sensitiven Kernexports ist die Lokalisierung von Cyclin A in *Drosophila* mit Cyclin B1 aus Vertebraten vergleichbar.

In Cyclin B1 aus Vertebraten liegt die NES, welche von dem Kernexportrezeptor erkannt wird, im N-Terminus (Hagting et al., 1998; Toyoshima et al., 1998; Yang et al., 1998). Die Regulation des NES wird durch Phosphorylierungen katalysiert, die den Kernexport abschalten und die Kernimportrate erhöhen (Hagting et al., 1999; Toyoshima-Morimoto et al., 2001; Walsh et al., 2003; Yang et al., 2001). Durch Deletionsanalysen und

Sequenzvergleiche mit bekannten NES konnte in der vorliegenden Arbeit für Cyclin A aus *Drosophila* gezeigt werden, dass sich im N-Terminus kein NES befindet. Es konnten drei NES-ähnliche Bereiche in der Mitte und im C-Terminus von Cyclin A identifiziert werden, wobei die bei AS 408 beginnende mögliche NES wegen dem Leucinreichtum und der Ähnlichkeit zu IRF-3 am wahrscheinlichsten ist.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die Lokalisierung über dritte Proteine reguliert wird, die ein NES beinhalten. Aus den Deletionsanalysen kann gefolgert werden, dass diese Interaktionspartner in C-terminalen Bereichen binden müssen, wo sie mit dem „hydrophobic patch“ oder bisher nichtcharakterisierten Interaktionsmotiven interagieren könnten. Die Identifizierung von solchen Interaktionspartnern ist jedoch schwierig, da Cyclin A in Hefe letal ist und der C-Terminus nicht durch Deletionen analysiert werden kann .

Eine Cyclin E-ähnliche NLS hat keinen Einfluß auf den Kernimport von Cyclin A

Über den Kernimport von Cyclin A und Cyclin B ist nur wenig bekannt und es existieren nur Daten aus Vertebraten, die zeigen, dass die Cycline auf unterschiedliche Weise in den Kern gelangen. Cyclin B scheint ohne Cdk-Bindung über eine direkte Interaktion mit Importin β und unabhängig von der GTPase Ran in den Kern transportiert werden zu können (Moore et al., 1999; Takizawa et al., 1999). Cyclin A dagegen scheint die Cdk-Bindung, Importin α und Ran zu benötigen (Jackman et al., 2002; Maridor et al., 1993). Für Cyclin E konnte gezeigt werden, dass die Kernlokalisierung über eine klassische NLS und den Ran-abhängigen Importin α /Importin β -Komplex verläuft (Moore et al., 2002; Moore et al., 1999). Nur für Cyclin E ist die den Kernimport vermittelnde Sequenz bekannt.

In der Sequenz von Cyclin A in *Drosophila* konnte eine Ähnlichkeit mit der NLS aus Cyclin E gefunden werden, die durch eine Ansammlung von basischen Aminosäuren charakterisiert ist. Diese Sequenz hat jedoch keine Bedeutung für die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase, weil Cyclin A auch im Kern akkumuliert, wenn diese NLS-ähnliche Sequenz durch Aminosäureaustausche verändert ist. Da in Cyclin A keine weiteren NLS-ähnlichen Sequenzen gefunden werden können, ist dies ein Hinweis darauf, dass auch Cyclin A in *Drosophila* über alternative Kernimportwege in den Kern gelangt, ähnlich wie Cyclin A und Cyclin B in Vertebraten.

Untersuchungen zur Rolle der Autophosphorylierung auf die Lokalisierung von Cyclin A

Da aus biochemischen Experimenten bekannt war, dass Cyclin A durch Autophosphorylierung posttranslational modifiziert werden kann, sollte untersucht werden, ob diese Phosphorylierungen die Lokalisierung von Cyclin A beeinflussen können. In Cyclin A können fünf mögliche Cdk-Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die als nichtphosphorylierbare Punktmutationen getestet wurden. Durch mRNA-Injektion konnte für zwei Phosphorylierungsstellen ein Effekt beobachtet werden, der aber in den Transgenen nicht reproduziert werden konnte. Das HA-Cyclin A-S154V und das HA-Cyclin A-T397V konnten nach mRNA-Injektion in einigen Prophasezellen nicht im Kern akkumulieren. Da die Injektion von mRNA eine Standardmethode ist, können Artefakte durch die Behandlung der Embryonen nach der Injektion oder Fixierungsartefakte ausgeschlossen werden. Da die Konstrukte mit Punktmutationen *in vitro* gleichermaßen in der Lage waren die Partnerkinase Cdk1 zu binden und zu aktivieren wie HA-Cyclin A, könnte vielleicht eine verzögerte Translation dazu geführt haben, dass weniger Komplexe gebildet werden konnten. Wenn dies der Fall wäre, dann würde auch in *Drosophila* die Lokalisierung von der Formierung des Cdk/Cyclin A-Komplexes abhängen. In den Transgenen konnte der Lokalisierungsdefekt jedoch nicht beobachtet werden. Es könnte sein, dass die gleichmäßigere Expression durch die Aktivatorlinien dazu führt, dass die Konstrukte Komplexe bilden können.

Die Analyse der transgenen Cyclin A-Konstrukte mit Punktmutationen in den Phosphorylierungsstellen hat gezeigt, dass der Ausfall einzelner Phosphorylierungsstellen keinen Einfluß auf die Lokalisierung von Cyclin A hat. Um den Einfluß der Autophosphorylierung ausschließen zu können, müßte vorerst noch ein Konstrukt getestet werden, dem alle fünf Phosphorylierungsstellen gleichzeitig fehlen, um kooperative Effekte ausschließen zu können.

Die subzelluläre Lokalisierung von Cyclin A hat keine essentielle Funktion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisierung von Cyclin A in *Drosophila* kein Bestandteil der essentiellen Funktion von Cyclin A ist. Sowohl nukleäres als auch zytoplasmatisches Cyclin A können sogar im entwicklungsbedingten Kontext die *Cyclin A* Mutation überwinden, Mitosen induzieren und Adulte entstehen lassen oder ektopische S-Phasen induzieren. Die essentielle Funktion

von Cyclin A hängt also nicht mit der Lokalisierung zusammen, sondern muß durch die Substratspezifität charakterisiert sein.

Sowohl die DNA-Replikation als auch mitotische Vorgänge, wie die Auflösung der Kernmembran und die Kondensierung der DNA sind Prozesse, die im Kern ablaufen. Die Beobachtung, dass Cyclin A durch Kern-Zytoplasma-„shuttling“ lokalisiert wird legt die Vermutung nahe, dass Cyclin A an der Abstimmung von zytoplasmatischen Vorgängen mit Prozessen im Kern beteiligt ist, wie es auch für Cyclin B1 in Vertebraten postuliert wurde (Hagting et al., 1998). Für die Mitose würde das bedeuten, dass z.B. der Centrosomenzyklus im Zytoplasma mit der vollständigen Replikation der DNA im Kern koordiniert werden muß. Erst wenn beide Prozesse abgeschlossen sind, kann eine erfolgreiche Mitose stattfinden.

Dass mitotische Vorgänge auch in Abwesenheit von Cdk1-Aktivität induziert werden können (Gowdy et al., 1998) zeigte, dass die Cdk1-Aktivität nicht selbst jeden einzelnen Prozess steuern muß und dass andere Kinasen wichtige Funktionen, wie die Kondensierung der DNA und die Auflösung der Kernmembran katalysieren. Da die eigentliche mitoseinduzierende Aktivität bisher nur für Cdk/Cyclin-Komplexe gezeigt werden konnte, müssen die anderen mitotischen Kinasen nachgeschaltet sein und werden wahrscheinlich von Cdk1 aktiviert und reguliert. Möglicherweise aktiviert und reguliert Cdk1 eine ganze Palette von solchen auch als Vermittler-Kinasen bezeichneten Regulatoren. In *Drosophila* scheint nur Cyclin A-assoziierte Kinaseaktivität in der Lage zu sein, die Prozesse, die zur Induktion und zum Ablauf der Mitose führen initiieren und/oder aufrechterhalten zu können. Neben noch zu charakterisierenden Vermittler-Kinasen (Gowdy et al., 1998) sind vor allem Kinasen der NIMA- oder Polo-Familie an mitotischen Vorgängen beteiligt (Fry und Nigg, 1995; Ghosh et al., 1998; Glover et al., 1998; Ha Kim et al., 2002; Nigg, 1998). Beide Familien beinhalten Kinasen, die verschieden lokalisiert sind und an verschiedenen mitotischen Aspekten beteiligt sind. Da auch zytoplasmatisches Cyclin A Mitosen induzieren kann, müssen die Vermittler-Kinasen nach der Aktivierung im Zytoplasma in den Kern gelangen, um dort die mitotischen Prozesse zu induzieren. So ist z.B. für Nek2 aus Vertebraten eine dynamische zellzyklusabhängige Lokalisierung beschrieben worden (Ha Kim et al., 2002). In diesem Zusammenhang ist es möglich, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase einen effizienteren und schnelleren Ablauf der Kernprozesse garantiert und dadurch einen Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Mitose hat.

4. Material und Methoden

4.1 Geräte und Arbeitsmaterialien

Blotmaschine: Trans-Blot SD (Bio-Rad)

Computer und Software: Apple Macintosh, IBM-kompatibler PC. Programme: Microsoft Office (Microsoft Corp.), Canvas (Deneba Systems), Photoshop (Adobe), IPLab (Signal Analytics), EndNote (Niles Software, Inc.), DNA-Strider, Autodeblur (AutoQuant Imaging, Inc. New York)

Elektroporationsgerät: Genepulser (Bio-Rad)

Entwicklermaschine (Agfa)

Filme: Biomax MR (Kodak), Hyperfilm ECL (Amersham)

Filmkassetten (Suprema)

Filterpapier: 3MM (Whatman)

Geldokumentation: Polaroid-System

Gelelektrophorese: DNA (Eigenbau Inst. f. Genetik), Protein (Mini ProteanII, Bio-Rad)

Glashomogenisator: 15 ml Wheaton Dounce Tissue Grinder mit losem und eng anliegendem Pistill

Inkubatoren: Heizblöcke, Wasserbäder, Heizschränke (Mettler)

Mikromanipulator (Bachofer)

Mikroskope: Axiovert 10, Axioplan, Stemi 2000 (alle Zeiss), MZFL3, konfokales Mikroskop (Leica), Deconvolution (Aufnahme mit E-662 LVPZT-Amplifier/Servo, Physik Instrumente danach Datenverarbeitung mit Autodeblur)

Mikrowellenofen (Daewoo)

Nitrozellulose: Hybond ECL (Amersham)

PCR-Maschinen: Personal-Cycler, UNO-Block (Biometra)

Photographie: CCD-Kamera QUANTIX (Photometrics), ProgRes 3008 (Kontron Elektronik)

Plastikartikel: Gefäße, Petrischalen (Falcon, Eppendorf, Greiner)

Quarzküvetten: 500 µl Quarzküvette von Hellma, Lichtweg 10 mm

Scanner: Studioscan IIsi (Agfa)

Spektralphotometer: Zeiss, Genequant II (Pharmacia)

Vakuum-Geltrockner (Hofer Scientific Instruments)

Western-Blot-Maschine (Bio-Rad)

Zentrifugen: Hettich, Heraeus, Sorvall und Beckman

Zentrifugationszubehör: Rotoren: G3, SS34, SW55

Rotorbecher: 50 ml und 500 ml, polyallomer tubes (1/2x2 inch) für Ultrazentrifugation (alle Beckman)

4.2 Chemikalien, Enzyme und Kits

Verbrauchskemikalien: Aldrich (Steinheim), Amersham (Braunschweig), Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen); alle p.a. Qualität

Feinchemikalien und Bioreagenzien: DNA-Standard: 1 kb-Ladder (Gibco-BRL), ECL Western blotting detection system (Amersham), Kaninchen Retikulozytenlysate (Promega), ^{32}P - γ -ATP (30 Ci/mmol, Amersham), Protein-Standard: Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB),

Immunochemikalien: normales Zeigenserum (NGS, Dianova), normales Eselserum (NDS, Dianova), Vectashield Mounting Medium (Vector)

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen: Boehringer (Mannheim), Gibco / BRL (Eggenstein), NEB (Schwalbach / Taunus)

Kits: ABI PRISM Big Dye Terminator Version 2.1 (Perkin Elmer), Expand High Fidelity PCR-System (Roche), PCR Purification Kit (Qiagen), SP6-RNA-Polymerase Message Kit (Ambion), SpinEx Säulen (Costar), Vectastain-ABC Kit (Vector-Laboratories).

4.3 Antikörper

4.3.1 primäre Antikörper

| Antikörper gegen (Herkunft) | AK-Nr | Verdünnung | Bezugsquelle |
|-------------------------------------|----------|---|--|
| β -Gal (Kaninchen) | 059 | Embryonen: 1/750 | Cappel |
| BrdU (Maus) | 018 | Gewebe: 1/20 | Becton Dickinson |
| CycA (Kaninchen) | 030.10 | Embryonen: 1/100 Western: 1/3000 IP: 1/60 | F. Sprenger |
| | 030.11 | Embryonen: 1/100 Western: 1/3000 | |
| GFP (Kaninchen) | 197 | Western: 1/2500 IP: 1/150 | Torrey Pines Biolabs, Inc. |
| HA (Ratte) | 139 | Embryonen: 1/100 Western: 1/2000 | IgG-clone 3F10, Boehringer |
| HA (Maus) | 141 | IP: 1/375 | IgG-clone 12CA5, Boehringer (2,5 mg/ml) |
| Phospho-Histon 3 (Kaninchen) | 140, 239 | Embryonen: 1/500 | Upstate Biotechnologies |
| Phospho-Histon 3 (Maus) | 201 | Embryonen: 1/500 | Upstate Biotechnologies |
| Phospho-Tyrosin (Maus) | 102 | Embryonen: 1/10 | D. Morrison, NCI, USA |
| Wheat-Germ- Agglutinin-Texas Red | 152 | Embryonen: 1/1000 | MoBiTec |

4.3.2 sekundäre Antikörper

| Antikörper gegen (Herkunft) | gekoppelt mit | AK-Nr | Verdünnung | Bezugsquelle |
|--------------------------------|----------------------------|-------|------------------|---|
| Kaninchen (Ziege) | Alexa 488 | 187 | Embryonen: 1/500 | MoBiTec |
| Kaninchen (Ziege) | Biotin | 157 | Embryonen: 1/500 | Dianova |
| Kaninchen (Ziege) | Cy5 | 182 | Embryonen: 1:500 | Dianova |
| Kaninchen (Ziege) | Meerrettich- Peroxidase | 036 | Western: 1:3000 | Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Dianova |
| Maus (Ziege) | Rhodamin- RedX | 183 | Embryonen: 1/500 | Dianova |
| Maus (Ziege) | Meerrettich- Peroxidase | 039 | Western: 1:3000 | Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Dianova |
| Ratte (Ziege) | Alexa 488 | 184 | Embryonen: 1:500 | Dianova |
| Ratte (Ziege) | Meerrettich- Peroxidase | 038 | Western: 1:3000 | Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. |

4.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec, Invitrogen und Roth bestellt.

4.4.1 Herstellung der verschiedenen Konstrukte:

| | |
|---------------|---------------------------------|
| CO-057 | CGAAGCTAGCTGTTTCTGCTTTAG |
| CO-080 | GACGGATGTTTCAGCGGCCCATGTC |
| CO-094 | GACAGCGGCTCAAAGGATCCAACTTATAAA |
| CO-220 | GATCTGTGCGTGCCGACTGCTTAC |
| CO-221 | GTAAGCAGTCGGCACGCACAGATC |
| CO-222 | GAGATGTGGGTGCCAAGGCTGGAG |
| CO-223 | CTCCAGCCTTGGCACCCACATCTC |
| CO-235 | CGGGAGAGCGAGGAGGAGCATCGCCCAAG |
| CO-262 | TACGATCTGGATTCAGTGCCCATGTCCGTG |
| CO-263 | GTGACGGATGTTTCAGGTGCCCATGTCCGTG |
| CO-264 | ACTGAAACGGGAGTCGTGCCAACTGGAAGA |
| CO-271 | ACGGATGTTTCAGGTGCCCATGTCCGTGGAC |
| T7 | GTAATACGACTCACTATAGGGC |

4.4.2 Sequenzierung von Cyclin A:

| | |
|--------|---------------------------------|
| CO-039 | ATATCCATGGAGTACGGCGCCAAGAAATCG |
| CO-041 | ATATCCATGGTTCGACAAAGAGAACCATGAC |
| CO-076 | GGCGGAATTGGCGCCCGGCGCAAG |
| CO-078 | CGATCTGGATTCACGGCCCATGTC |
| CO-043 | AGTGCCACGCTGATATCACTGGACTG |
| CO-082 | ACGGGAGTCCGGCCAACTGGAAGA |
| CO-083 | TCT TCC AGT TGG CCG GAC TCC CGT |
| CO-084 | GATCTGTGCCGGCCGACTGCTTAC |
| CO-086 | GAGATGTGGCGGCCAAGGCTGGAG |
| CO-087 | CTCCAGCCTTGGCCGCCACATCTC |
| T3 | AATTAACCCTCACTAAAGGG |

4.4.3 Sequenzierung von GFP:

| | |
|--------|-----------------------|
| CO-130 | GATGAGCAAGGACGACTTCG |
| CO-131 | AGAAAGAGGATGAGCACCAG |
| CO-132 | TGT TTTATAAGTTTGGATCC |
| CO-152 | AGACACGTGCTGAAGTCAAG |
| CO-153 | GATCGAGCTTAAGGGAATCG |

4.5 Bakterien, DNA-Vektoren und rekombinante Plasmide

4.5.1 Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden für die Klonierungsarbeiten eingesetzt: *E. coli DH10B* (Grant et al., 1990), *E. coli XL1 Blue* (Stratagene).

4.5.2 DNA-Vektoren und rekombinante Plasmide

Für Klonierungen wurden die Grundgerüste folgender Vektoren verwendet: pBluescript II SK, pBluescript II KS (beide Stratagene), pSP64, pALTER-1 (beide Promega), pUAST (Brand und Perrimon, 1993), pWR-PUbq (Eintrag in Flybase: FBtp0010993).

Als Helferplasmid für die P-Element vermittelte Transformation diente pUChs Δ 2-3 (Mullins et al., 1989).

Der Ausgangsvektor für die meisten Klonierungen und PCR-gestützten Mutagenesen war der pSP64 Vektor. Dieser Vektor erlaubt die effiziente *in vitro* Transkription mit der SP6-Polymerase für *in vitro* und *in vivo* Tests der neu entstandenen Konstrukte und stellte geeignete Schnittstellen für weitere Subklonierungen zur Verfügung. Punktmutationen wurden hauptsächlich mit dem Altered Sites II-System (Promega) generiert und zur weiteren Analyse und späteren Subklonierung in den pSP64-Vektor überführt.

Zur Herstellung von transgenen Fliegen wurden die Konstrukte über die Bluescript-Vektoren in den Transformationsvektor pUAST übertragen. pUAST enthält für bakterielle

Konierung einen Teil des pUC-Vektors (Fermentas), die 3' und 5' P-Elementenden zur Transposase-vermittelten stabilen genomischen Integration, ein *white*⁺-Minigen zur Selektion von Transformanten, sowie fünf vor einem *hsp*⁷⁰-Basalpromotor geschaltete UAS-Kassetten zur Gal4-vermittelten Überexpression von Zielgenen.

Alle Cyclin A Konstrukte beginnen am 5' Ende mit einem *Xenopus* 5'-β-Globinleader, der eine hohe Translationseffizienz ermöglicht (Siegel und Walter, 1988). Darauf folgt ein HA-Epitop (Wilson et al., 1984), welches die immunohistochemische Unterscheidung zwischen endogenem und rekombinantem Protein erlaubt und schließlich die Cyclin A cDNA mit endogenem 3'UTR. Durch das Einfügen von Sequenzen vor das HA-Epitop oder zwischen das HA-Epitop und der Cyclin A cDNA, wurden verschiedene rekombinante Cyclin A Derivate kloniert, die zu einer veränderten subzellulären Lokalisierung von Cyclin A führen. Anwendung fanden die Kernlokalisierungssequenz vom SV40-large T antigen (nuclear localization sequence = NLS) (Davis et al., 1995; Görlich und Mattaj, 1996), das Kernexportsignal vom Protein Kinase A Inhibitor aus *H. sapiens* (nuclear export signal = NES) (Gerace, 1995; Görlich und Mattaj, 1996) und die transmembrandomäne von *torso* aus *D. melanogaster* (Sprenger und Nüsslein-Volhard, 1992).

4.5.2.1 In dieser Arbeit verwendete DNA-Konstrukte

| Bezeichnung | Konstrukt | Herkunft |
|-------------|---------------------|-------------------------|
| pAD-019 | pBSK-CycA | (Dienemann, 1999) |
| pAD-113 | pBSK-HA-NES-CycA | “ |
| pAD-114 | pBSK-HA-NLS-CycA | “ |
| pAD-164 | pBSK-HA-NLS-CycB | “ |
| pAD-188 | pBSK-HA-CycA | “ |
| pAD-197 | pSP-HA-CycAΔN400 | “ |
| pAD-235 | pBSK-HA-CycB | “ |
| pALTER-1 | | Promega |
| pOT-115 | pBSK-CycB-GFP | J. Raff |
| pOT-116 | pWR-PUBq-CycB-GFP | J. Raff |
| pSF-812 | pUAST-cdc2 | F. Sprenger |
| pTS-002 | pSP-HA-CycA (ΔNcoI) | Diplomarbeit T. Schulze |
| pTS-006 | pBSK-HA-CycA | Diplomarbeit T. Schulze |
| pTU-002 | pSP-tor | F. Sprenger |
| pTU-026 | pSP-torDextra | F. Sprenger |

4.5.2.2 In dieser Arbeit hergestellte DNA-Konstrukte

| Bezeichnung | Konstrukt | entstanden aus |
|-------------|-----------------|---------------------------------|
| pAD-224 | UAS-HA-CycA | pSF812 x pAD188 (Asp 718/Xba I) |
| pAD-H3 | UAS-HA-NLS-CycA | pSF812 x pAD114 (Asp 718/Xba I) |
| pAD-H2 | UAS-HA-NES-CycA | pSF812 x pAD113 (Asp 718/Xba I) |

| | | |
|---------|-----------------------------|---|
| pAD-H4 | UAS-HA-NLS-CycB | pSF812 x pAD164 (Asp 718/Xba I) |
| pAD-245 | UAS-HA-CycB | pSF812 x pAD235 (Asp 718/Xba I) |
| pAD-271 | pKSII-CycA-GFP | pOT115 x pAD019_T7/CO-094 (Asp718/BamHI) |
| pAD-274 | pWRpUbq-CycA-GFP | pOT116 x pAD271 (Asp718/NotI) |
| pAD-309 | pALTER-HA-CycA | pALTER-1 x pAD188 (Asp718/XbaI) |
| pAD-360 | pSP-torDextra-HA-CycA | pTU026 (BstEII, KLenow, XbaI) x pTS006 (NcoI, Klenow, XbaI) |
| pAD-383 | pSP-tor-HA-CycA | pTU002 (BstEII; Klenow, XbaI) x pTS pTS006 (NcoI, Klenow, XbaI) |
| pAD-388 | pBSK-tor-HA-CycA | pAD188 (HindIII, CIP) x pAD383 (HindIII, Scal) |
| pAD-391 | UAS-tor-HA-CycA | pAD-224 (ASp718/XbaI, CIP) x pAD388 (Asp718/XbaI) |
| pAD-393 | pALTER-HA-CycA-K216E, K217E | sspAD309 + CO-235, Amp R, Tet KO |
| pAD-396 | pSP-HA-CycA-K216E, K217E | pAD197 (HindIII, CIP) x pAD393 (HindIII) |
| pAD-385 | pSP-HA-CycA-T333V | Die 1. PCR wurde mit pTS002 und CO-057/220 bzw. pTS002 und CO-080/221 durchgeführt; äquimolare Mengen der entstandenen Fragmente wurden gemischt und die 2. PCR mit CO-057/080 durchgeführt. Das dabei entstandene Fragment wurde mit EcoRV/SacI geschnitten und in pTS002 (EcoRV, SacI, CIP) kloniert. |
| pAD-386 | pSP-HA-CycA-T397V | Die 1. PCR wurde mit pTS002 und CO-057/222 bzw. pTS002 und CO-080/223 durchgeführt; äquimolare Mengen der entstandenen Fragmente wurden gemischt und die 2. PCR mit CO-057/080 durchgeführt. Das dabei entstandene Fragment wurde mit EcoRV/SacI geschnitten und in pTS002 (EcoRV, SacI, CIP) kloniert. |
| pAD-402 | pALTER-HA-CycA-T145V | sspAD309 + CO-262, Amp R, Tet KO |
| pAD-403 | pALTER-HA-CycA-T154V | sspAD309 + CO-263, Amp R, Tet KO |
| pAD-404 | pALTER-HA-CycA-T180V | sspAD309 + CO-264, Amp R, Tet KO |
| pAD-409 | pSP- HA-CycA-T145V | pAD-197 (BamHI/EcoRV, CIP) x pAD402 (BamHI/EcoRV) |
| pAD-410 | pSP- HA-CycA-S154V | pAD-197 (BamHI/EcoRV, CIP) x pAD403 (BamHI/EcoRV) |
| pAD-411 | pSP- HA-CycA-T180V | pAD-197 (BamHI/EcoRV, CIP) x pAD404 (BamHI/EcoRV) |
| pAD-416 | pBSK-HA-CycA-T333V | pAD-019 (Hind III, CIP) x pAD385 (HindIII) |
| pAD-417 | pBSK-HA-CycA-T397V | pAD-019 (Hind III, CIP) x pAD386 (HindIII) |
| pAD-418 | pBSK-HA-CycA-T145V | pAD-019 (Hind III, CIP) x pAD386 (HindIII) |
| pAD-419 | pBSK-HA-CycA-S154V | pAD-019 (Hind III, CIP) x pAD386 (HindIII) |

| | | |
|---------|--------------------------|--|
| pAD-420 | pBSK-HA-CycA-T180V | pAD-019 (Hind III, CIP) x pAD386 (HindIII) |
| pAD-422 | pSP-HA-CycA-T145V, S154V | sspAD309 + CO-262, 271, Amp R, Tet KO |
| pAD-423 | pSP-HA-CycA-T333V, T397V | sspAD309 + CO-220, 222, Amp R, Tet KO |
| pAD-424 | UAS-HA-CycA-T145V | pSF812xpAD418 (Asp718/XbaI) |
| pAD-425 | UAS-HA-CycA-S154V | pSF812xpAD419 (Asp718/XbaI) |
| pAD-426 | UAS-HA-CycA-T180V | pSF812xpAD420 (Asp718/XbaI) |
| pAD-427 | UAS-HA-CycA-T333V | pSF812xpAD416 (Asp718/XbaI) |
| pAD-428 | UAS-HA-CycA-T397V | pSF812xpAD417 (Asp718/XbaI) |

UAS = pUAST (Brand und Perrimon, 1993) pBSK = pBluescript SK II (Stratagene)

pSP = pSP64 (Promega)

4.6 DNA-Methoden

Nicht näher erklärte Methoden wurden standardmäßig (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Falls nicht anders erwähnt wurden Lösungen mit deionisiertem Wasser (Millipore oder VE-Wasser) angesetzt, dampfsterilisiert oder sterilfiltriert.

4.6.1 Lösungen

| | |
|---------------------|--|
| Ammoniumacetat: | 7,5 M in H ₂ O |
| Ampicillin: | 50 mg/ml in H ₂ O (Lagerung bei -20°C) |
| Kanamycin: | 10 mg/ml in H ₂ O (Lagerung bei -20°C) |
| BSA: | 1 mg/ml in H ₂ O |
| DNA-Auftragspuffer: | 1 x TAE; 60 mM EDTA; 50% Glycerin; 0,1% w/v Xylencyanol; 0,1% w/v Bromphenolblau |
| EDTA: | 0,5 M in H ₂ O; pH 8,0 |
| Ethidiumbromid: | 10 mg/ml in H ₂ O |
| Lithiumchlorid: | 5 M in H ₂ O |
| Lysepuffer I: | 50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 10 mM EDTA |
| Lysepuffer II: | 200 mM NaOH; 1% w/v SDS |
| Lysepuffer III: | 5 M Kaliumacetat, pH 6,0 |
| Seqlysepuffer I: | 50 mM Glucose; 25 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase; 5 mg/ml Lysozym |
| Seqlysepuffer III: | 60 ml 5M KAc; 11,5 ml Essigsäure; 28,5 ml H ₂ O |
| Natriumacetat: | 3 M in H ₂ O, pH 5,1 |
| TAE (50x): | 2 M Tris-Acetat; 0,05 M EDTA, pH 8,5 |
| TE: | 1mM EDTA; 10 mM Tris-HCL, pH 8,0 |
| TE/RNase: | TE mit 10 µg/ml RNase |

4.6.2 Medien und Agarplatten

| | |
|---------------------|--|
| LB: | 10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl; mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt und mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt |
| LB/Amp: | LB mit 50 µg/ml Ampicillin |
| LB/Kan: | LB mit 30 µg/ml Kanamycin |
| LB-Amp-Agarplatten: | LB mit 1,5% Agar, Ampicillin (50 mg/ml), Methicillin (100µg/ml) |
| LB-Kan-Agarplatten: | LB mit 1,5% Agar, Kanamycin (30 mg/ml) |
| Terrific Broth: | A: 12 g Bactotrypton; 24 g Bacto-Hefeextrakt; 4 ml Glycerin in 900 ml H ₂ O B: 2,31 g KH ₂ PO ₄ ; 12,54 g K ₂ HPO ₄ in 100 ml H ₂ O A und B werden autoklaviert und nach Abkühlung unter 60°C gemischt |

4.6.3 Präparation von Plasmid-DNA

4.6.3.1 Alkalische Lyse (Miniprep)

Es wurden zwei Protokolle verwendet, die auf Ish-Horowicz und Burke (Ish-Horowicz und Burke, 1981) zurückzuführen sind. Entweder wurde rekombinante Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien zu analytischen Zwecken isoliert und anschließend durch Restriktionsanalyse auf die korrekte Klonierung hin untersucht. Oder es wurde rekombinante Plasmid-DNA zur Sequenzierung gewonnen.

Für analytische Zwecke wurden einzelne Bakterienkolonien in 2 ml LB/Amp-Medium angeimpft und die Kultur bei 37°C für mind. 12 Std. unter leichtem Schütteln hochgezogen. Aus 1,5 ml der Kultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß die Bakterien durch Zentrifugation (30 sec, 14.000 Upm, RT) sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl Lysepuffer I resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl Lysepuffer II gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 100 µl Lysepuffer III zugegeben, gemischt und das Lysat für 1 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und mit 500 µl EtOH versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde das Präzipitat durch Zentrifugation (5 min, 14.000 Upm, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Präzipitat wurde einmal mit 100 µl 80% EtOH (-20°C) gewaschen. Danach wurde es für 5 min getrocknet und anschließend in 20 µl TE/Rnase aufgenommen. Für einen Restriktionsverdau wurden zwischen 2 µl und 5 µl der Lösung eingesetzt.

Für sequenzierfähige Plasmid-DNA wurden einzelne Bakterienkolonien wie oben beschrieben angeimpft und über Nacht inkubiert. Aus 1,5 ml der Kultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 4.000 Upm, RT) sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl Seqlysepuffer I resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer II gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 150 µl Seqlysepuffer III zugegeben, gemischt und das Lysat nach einer Inkubationszeit von 5 min für 30 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und mit 1 ml EtOH versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde das Präzipitat durch Zentrifugation (20 min, 14.000 Upm, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Präzipitat wurde

einmal mit 100 µl 75% EtOH gewaschen. Danach wurde es für 5 min getrocknet und anschließend in 20 µl Wasser aufgenommen. Für die Sequenzierung wurden 2µl der Lösung eingesetzt.

4.6.3.2 Alkalische Lyse (Midiprep)

Dieses Verfahren ist ebenfalls von dem Protokoll von Ish-Horowitz und Burke (Ish-Horowicz und Burke, 1981) abgeleitet worden.

Die Bakterien aus einer 100 ml über Nacht-Kultur wurden in 2 Schritten in 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (5 min, 4.000 Upm, RT in einer Heraeus-Zentrifuge). Das Bakteriensediment wurde in 10 ml TE resuspendiert und die Bakterien wurden anschließend durch Zusatz von 10 ml Lysepuffer II aufgeschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde der Lysepuffer III hinzugefügt, gut gemischt und das Lysat zentrifugiert (10 min, 4.000 Upm, RT). Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und die Plasmid-DNA wurde nach Zusatz von 20 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (5 min, 4.000 Upm, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Präzipitat in 2 ml TE resuspendiert. Um die im Präzipitat befindliche RNA zu fällen wurden 2 ml LiCl zugefügt, der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend unter Kühlung zentrifugiert (5 min, 4.000 Upm, 4°C). Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde in einem frischen 15 ml Falcon-Röhrchen mit 4 ml TE und 4 ml Isopropanol versetzt und durch Zentrifugation (5 min, 4.000 Upm, 4°C) sedimentiert und anschließend getrocknet. Um die RNA-Kontamination weiter zu verringern wurde das Präzipitat in 250 µl TE/RNase aufgenommen und 30 min bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die Ethidiumbromid-Reinigung nach Stemmer (Stemmer, 1991) angewendet. Das dabei entstehende Präzipitat wurde in 100-200 µl TE resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und auf 1 mg/ml eingestellt.

4.6.4 Klonierung und Analyse von DNA

4.6.4.1 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Für analytische Zwecke wurden 0,5-1 µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 20 µl für max. 2 Std. eingesetzt. Für präparative Zwecke wurden entsprechend größere Mengen in einem Endvolumen von 80 µl für max. 4 Std. inkubiert. Die Temperatur- und Pufferbedingungen entsprachen den Herstellerangaben.

Um bei Klonierungen die Religation des Vektors zu verhindern, wurde dem Verdau für bis zu einer Stunde 1 U der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) zugesetzt. Vor der Auftrennung im Gel wurde die Phosphatase 15 min bei 70°C inaktiviert.

4.6.4.2 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten

Hierzu wurde das „Klenow-Fragment“ der Polymerase I aus *E.coli* verwendet. 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.

4.6.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standardamplifizierungen für Klonierungen wurden mit dem Expand High Fidelity PCR-Kit (ROCHE) in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Eine hohe Konzentration an Matrizen-DNA und wenig Reaktionszyklen minimierten zusätzlich die Fehlerrate.

Ansatz: 1µg DNA
 15pmol Primer 1
 15pmol Primer 2
 1µl dNTPs (10mM)
 5µl Puffer mit MgCl
 1U Expand High Fidelity Enzyme mix
 auf 50µl mit H₂O auffüllen

PCR-Programm:

| | | |
|-----|---------------|---|
| | 3 min | 95°C |
| 10x | 30 sec | 95°C |
| | 30 sec | 3°C-5°C unter der Schmelztemp. der verwendeten Primer |
| | 1min / kb DNA | 72°C |

4.6.4.4 Punktmutationen durch Zwei-Fragment-Mutagenese

Die Punktmutationen in den Konstrukten pAD-385 und pAD-386 wurden mit Hilfe von PCR mit fehlpaarenden Primern eingefügt. Die PCR-gestützte Mutagenese wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurden zwei an der Mutagenisierungsstelle überlappende, aber unterschiedlich orientierte Primer mit den entsprechenden sense- (CO-080) oder antisense- (CO-057) Primern kombiniert. Auf diese Weise erhält man zwei Fragmente, die in dem überlappenden Bereich mutagenisiert worden sind. Die folgenden Primerkombinationen wurden eingesetzt:

für pAD-385: CO-080 / CO-221 CO-057 / CO-220
 für pAD-386: CO-080 / CO-223 CO-057 / CO-222

Die PCR-Produkte wurden isoliert und die korrespondierenden Fragmente in äquimolaren Konzentrationen in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt. In dieser zweiten Reaktion wurde mit den beiden äußersten Primern (CO-080 und CO-057) das vollständige mutagenisierte Fragment synthetisiert. Das mutagenisierte Fragment wurde anschließend subkloniert und durch Sequenzierung positive Mutageneseereignisse ermittelt.

4.6.4.5 Punktmutationen mit dem Altered Sites II-System (Promega)

Die restlichen Punktmutationen wurden mit dem Altered Sites II-System nach Promega generiert. Dieses System basiert auf PCR-gestützter Mutagenese von einzelsträngiger DNA. Es bietet die Vorteile, daß bis zu 3 Mutageneseprimer gleichzeitig verwendet werden können und daß durch den Wechsel von Antibiotikaresistenzen auf erfolgreiche

Mutagenesen selektioniert werden kann. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (www.promega.com).

4.6.4.6 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen unter Standardbedingungen aufgetrennt (Agarose in TAE, Ethidiumbromid 1/20.000). Die Agarosekonzentration lag zwischen 0,4% für präparative Gele und 1-1,5% für analytische Gele.

DNA-Fragmente wurden mit einer Skalpellklinge mit der Agarose aus dem Gel geschnitten und mit SpinEx-Säulen (Costar) von der Agarose abgetrennt. Hierzu wurden die Agarblöckchen in den Säulen je zweimal für 5 min bei -70°C und bei 37°C inkubiert und anschließend für 5 min (14.000 Upm, RT) zentrifugiert. Der Säulendurchfluß wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 10 μl Natriumacetat versetzt und mit Ethanol aufgefüllt. Nach 10 min Inkubation bei -70°C oder -20°C über Nacht wurde das DNA-Präzipitat für 5 min (14.000 Upm, RT) sedimentiert, einmal mit 75% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die isolierten DNA-Fragmente wurden in 10-20 μl Wasser aufgenommen und 1/10 Vol. zur Mengenabschätzung im Agarosegel aufgetrennt.

4.6.4.7 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden 100-250 ng des geschnittenen Vektors mit dem dreifachen (sticky-end Klonierung) oder fünffachen Überschuß (blunt-end Klonierung) des zu integrierenden Fragments gemischt und mit Ligase und entsprechendem Puffer nach Herstellerangaben versetzt. Der Ligationsansatz wurde vorsichtig gemischt und nach Inkubation von 2 Std. bei RT oder bei 18°C über Nacht transformiert.

4.6.4.8 Transformation durch Elektroporation

Kompetente E. coli Zellen wurden nach einem von Hanahan beschriebenen Verfahren hergestellt (Hanahan et al., 1995). Die Waschschrte wurden mit eisgekühltem 10% Glycerin durchgeführt. Von den kompetenten Zellen wurden 30 μl Aliquots auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 μl des Ligationsansatzes versetzt und bei 2000 V und einer Kapazität von 25 μF mit einer Pulslänge von 4 msec elektroporiert. Anschließend wurde die Suspension mit 1 ml LB-Medium versetzt und 100-200 μl auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert.

4.6.4.9 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die zu messende DNA-Lösung wurde in TE verdünnt und in einer 500 μl Quarzküvette vorgelegt. Im Genequant wurden die Werte für E_{260} und E_{280} ermittelt. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet: $[\text{mg/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 / (\mu\text{l/ml})$.

4.6.4.10 Sequenzanalyse von DNA

Alle Sequenzreaktionen der rekombinanten Plasmide wurden mit Hilfe des PCR-gestützten Sequencing Kit (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.7 Proteinchemische und immunologische Methoden

4.7.1 Lösungen

| | |
|---|--|
| Aminosäuremix (ohne Methionin oder ohne Cystein): | Promega |
| Ammoniumpersulfat (APS): | 10% in H ₂ O |
| Immunpräzipitations-Puffer (= IP-Puffer): | 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 Na ₃ VO ₄ |
| Kinase Assay Puffer: | 25 mM Hepes pH 7,4; 10 mM MgCl ₂ ; 125 μM ATP; 250 μg/ml Histon H1; 0,3 mCi/ml γ-ATP |
| Laemmli-Puffer (4x): | 8% SDS; 400 mM DTT; 240 mM Tris, pH 6,8; 0,004% Bromphenolblau; 40% Glycerol; Lagerung bei -20°C |
| Laufpuffer: | 25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 0,1% SDS |
| Lysispuffer: | 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 0,25 M Sucrose; 0,1 M DTT; Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, 1:100) |
| PBS: | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,7 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 mit HCL |
| PBT: | 0,2% Tween20 in PBS |
| Ponceau-S: | 10% in H ₂ O |
| Pre-Kinase Waschpuffer: | 25 mM Hepes pH 7,4; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 25 μM ATP |
| Protein-G Sepharose (äquibriert): | 625 μl Protein-G Sepharose (Roche) 2 min bei 2000 rpm zentrifugieren; Überstand verwerfen; Sepharose zweimal mit jeweils 500 μl IP-Puffer waschen, schließlich in 500 μl IP-Puffer resuspendieren und bei 4°C lagern |
| Sammelgel: | 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 5% Bis-Acrylamid |
| Sucrose-Lösungen: | 2,5 M Sucrose wird in TKM angesetzt und bei -20°C gelagert. 2 M und 0,5 M Sucrose wird frisch angesetzt, indem die 2,5 M Sucrose in Lysispuffer verdünnt wird (beachte, daß der Lysispuffer schon Sucrose enthält) |
| TKM: | 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM KCL; 5 mM MgCl ₂ |
| Transferpuffer: | 5,82 g Tris; 2,93 g Glycin; 3,75 ml 10% SDS; 200 ml Methanol; mit auf 1 l auffüllen |
| Trenngel: | 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 10 oder 12,5% Bis-Acrylamid |

4.7.2 Proteinchemische Methoden

4.7.2.1 *in vitro* Transkription mit der SP6-Polymerase

Die mRNA-Synthese von linearisierter DNA wurde mit dem Megascript-Kit (Ambion) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.7.2.2 *in vitro* Translation in Retikulozytenlysat

Für die Translation wurde ca. 1 µg der *in vitro* translatierten RNA mit einer Mischung aus 17,5 µl Retikulozytenlysat, 0,25 µl Aminosäuremix ohne Methionin, 0,25 µl Aminosäuremix ohne Cystein und 0,25 µl RNase Inhibitor in einem Endvolumen von 25 µl für 2 Std. bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Der Translationsansatz wurde entweder mit der gleichen Menge Laemmli-Puffer vermischt und in einer SDS-PAGE analysiert oder es wurden 1,5 µl mit 5 µl Laemmli gemischt und als input-Kontrolle verwahrt, während der restliche Ansatz für die Cyclin-cdc2-Komplexbildung (s. Abschnitt 4.7.2.3) eingesetzt wurde.

4.7.2.3 Cyclin-cdc2 Komplexbildung

Der 25µl-Translationsansatz für rekombinantes Cyclin wurde mit 5 µl des Translationsansatzes für *D.m.* cdc2 in Anwesenheit von 2,5 µl GST-CIV, 10 mM MgCl₂ und 2 mM ATP bei RT für 30 min inkubiert.

4.7.2.4 Immunpräzipitation von rekombinanten Cyclin-cdc2-Komplexen

Der gesamte Ansatz zur Komplexbildung wurde mit 300 µl einer Lösung bestehend aus IP-Puffer, 15µl äquilibrierter Protein G-Sepharose, Protease Inhibitor-Cocktail (Sigma, 1:100), 20 mM EDTA und Antikörper für 2 Std. bei 4°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Protein G-Sepharose wurde abzentrifugiert (2min, 2000rpm, 4°C) und dreimal für 10 min bei 4°C mit IP-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Flüssigkeit mit iner 27G Kanüle vollständig abgenommen, die Sepharose in 40µl Laemmli-Puffer resuspendiert und 10 µl durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Wenn ein Kinase-Assay durchgeführt werden sollte, wurde nach dem letzten Waschschrift die Flüssigkeit mit einer 27G Kanüle vollständig abgenommen und nach dem Protokoll für Kinase-Assays (s. Abschnitt 4.7.2.6) weitergearbeitet.

4.7.2.5 Immunpräzipitation aus *Drosophila* Embryonen

Schockgefrorene *Drosophila* Embryonen wurden in 200 µl IP-Puffer auf Eis mit einem kleinen Plastikpistill vorsichtig homogenisiert. 15 µl des Homogenisats werden mit 15 µl Laemmli gemischt und als input-Kontrolle verwahrt. Die Immunpräzipitation wurde in einem Endvolumen von 300µl bestehend aus Embryonenhomogenisat, 15µl äquilibrierter Protein G-Sepharose, Protease Inhibitor-Cocktail (Sigma, 1:100), 20 mM EDTA und Antikörper durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 2 Std. oder über Nacht bei 4°C. Die Protein G-Sepharose wurde abzentrifugiert (2min, 2000rpm, 4°C) und dreimal für 10 min bei 4°C mit IP-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Flüssigkeit mit einer 27G Kanüle vollständig abgenommen, die Sepharose in 30µl Laemmli-Puffer resuspendiert und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Wenn ein Kinase-Assay

durchgeführt werden sollte, wurde nach dem letzten Waschschrift die Flüssigkeit mit einer 27G Kanüle vollständig abgenommen und nach dem Protokoll für Kinase-Assays (s. Abschnitt 4.7.2.6) weitergearbeitet.

4.7.2.6 Kinase Assay

Das Kinase-Assay wird als funktionaler Test für die rekombinanten Cyclin Derivate verwendet.

Nach dem letzten Waschschrift der Immunpräzipitation, wird das Präzipitat zweimal für 10 min bei 4°C in 300 µl Pre-Kinase Waschpuffer inkubiert (Zentrifugation mit 2000 rpm bei 4°C). Nach dem zweiten Waschschrift, wird die Flüssigkeit mit einer 27 G Kanüle vollständig entfernt und das Präzipitat in 15 µl Kinase Assay Puffer resuspendiert. Nach 30 min wird die Reaktion durch Zugabe von 15 µl Laemmli gestoppt. Nach dem Aufkochen der Proben werden 10 µl in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die weitere Behandlung ist in Abschnitt 4.7.2.9 beschrieben.

4.7.2.7 Membranfraktionierung und Herstellung eines cytoplasmatischen Extraktes von *Drosophila* Embryonen

Dieses Protokoll leitet sich von zwei Protokollen aus „*Drosophila* Protocols“ (Sullivan et al., 2000) ab.

0.3 g 6-8 Std. alte schockgefrorene Embryonen wurden in 1,5 ml Lysispuffer in einem Glashomogenisator durch 5 Stöße mit dem losen Pistill und 10 Stöße mit dem eng anliegenden Pistill homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit einer Pasteur-Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und Zellkerne, Teile des Dotters und größere Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 3200 rpm für 10 min bei 4°C sedimentiert. Die weißliche Fettschicht an der Oberfläche wird mit einem Zellstofftuch vorsichtig entfernt, wobei darauf zu achten ist, daß so wenig wie möglich von dem Überstand weggesaugt wird. Von dem Überstand wurden 50 µl aliquotiert und als input-Kontrolle bei -70°C verwahrt.

Der Überstand wurde sodann wie folgt aufgeteilt: für die Membranfraktionierung wurden in 2 polyallomer tubes (Beckmann) jeweils 2,2 ml 2,5 M Sucrose vorgelegt und mit 300 µl des Überstandes durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Suspension wurde zuerst mit 1,8 ml 2 M Sucrose und dann 1 ml 0,5 M Sucrose vorsichtig überschichtet. Für die Herstellung des cytoplasmatischen Extraktes wurde der Rest des Überstandes in ein weiteres polyallomer tube überführt und gegen Wasser austariert. Beide Ansätze wurden für 2,5 Std. mit 34.000 rpm bei 4°C in einem SW55 Rotor zentrifugiert.

Der cytoplasmatische Extrakt wurde abgenommen ohne das Pellet aufzuwirbeln und bei -70°C aufbewahrt. Die fraktionierten Membranen befanden sich in einer trüben Interphase, die mit einer Pasteur-Pipette in ein frisches polyallomer tube überführt wurde. Die Interphase wurde in 2 Vol. Lysispuffer resuspendiert und die entstandene Suspension zu gleichen Teilen auf zwei polyallomer tubes aufgeteilt und für 30 min mit 15.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig entfernt und das Pellet in 150 µl Lysispuffer resuspendiert und bei -70°C aufbewahrt.

4.7.2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur qualitativen Analyse werden die Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen nach der von Laemmli (Laemmli, 1970) beschriebenen Methode aufgetrennt.

Es wurde das Mini-Protean II-System von Bio-Rad verwendet. Die Stromstärke wurde während der Elektrophorese konstant gehalten und so eingestellt, daß eine Startspannung von ca. 100 V anlag.

4.7.2.9 Autoradiographie

Um radioaktiv markierte Proteine nachzuweisen und zu analysieren, wurden die getrockneten Gele in einer Filmkassette einem Kodak Biomax MR Röntgenfilm über Nacht exponiert und anschließend entwickelt.

4.7.2.10 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)

Der Western Blot wurde nach dem halbtrockenen Verfahren durchgeführt. Hierzu wurden 4 Filterpapiere und die Membran auf Gelgröße geschnitten und nach Befeuchten mit Transferpuffer in der Maschine wie folgt aufgeschichtet:

(Kathode)
2 Filterpapiere
Membran
Gel
2 Filterpapiere
(Anode)

Mögliche Luftblasen wurden durch Rollen mit einer Glaspipette entfernt. Anschließend wurde der Transfer bei konstanter Stromstärke bei 10 V für 30 min durchgeführt. Falls erforderlich wurde nach dem Transfer die Membran 5-10 min mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau-S bei RT inkubiert und anschliessend mit destilliertem Wasser solange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Die Membranen wurden entweder direkt für immunologische Nachweise verwendet oder in Plastikfolie verpackt und bei RT gelagert.

4.7.3 Immunologische Methoden

4.7.3.1 Immunologischer Nachweis von Antigenen auf Nitrozellulosemembranen

Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran in 5% Milchpulver/PBT für 1 Std. bei RT blockiert und danach mit dem primären Antikörper (ebenfalls in 5% Milchpulver / PBT) über Nacht 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 2 Std. bei RT. Die Membran wurde hiernach wieder 3 mal für 15 min mit PBT gewaschen. Die Membran wurde dann in einer Filmkassette zwischen zwei Overheadfolien ausgerichtet und mit PBT vor dem Austrocknen geschützt. Die Proteine wurden durch Chemilumineszenz (ECL, Amersham) auf Hyperfilm nachgewiesen. Die Filme wurden anschließend eingescannt und mit Photoshop oder Canvas bearbeitet.

4.7.3.2 Antikörperfärbung von *Drosophila* Embryonen

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

- in Methanol gelagerte Embryonen werden durch 5x schnelles Waschen mit PBT rehydriert
- 1 Std. Inkubation mit 2% NGS in PBT; soll später die DNA mit Propidiumiodid angefärbt werden, bei diesem Schritt RNase dazugeben (Endkonzentration: 0.4µg / µl)
- Inkubation mit dem primären Antikörper in 2% NGS in PBT für 2 Std. 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 2 Std. bei Raumtemperatur;
- Abnehmen des sekundären Antikörpers
- 5x schnelles Waschen mit PBT
- DNA-Färbung mit Propidiumiodid: 1:1000 Verdünnung der Stammlösung in PBT, 4 min bei RT
- 3x 15 min waschen mit PBT, weiter mit Einbettungsprotokoll (s. Abschnitt 4.7.9)
- 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, weiter mit Einbettungsprotokoll (s. Abschnitt 4.7.9)

4.7 Drosophila Methoden

Die Zusammensetzung des Fliegenfutters ist in Abschnitt 4.7.1 angegeben. Grundlegende Techniken für den Umgang mit *Drosophila* und Beschreibungen zur Sammlung von Embryonen sind bei Roberts (Roberts, 1998) und Ashburner (Ashburner, 1989) beschrieben.

4.7.1 Medien, Agarplatten und Lösungen

| | |
|-------------------|---|
| BrdU-Stammlösung: | 10 mg/ml in 40% Ethanol |
| Carnoy's: | Essigsäure:Chloroform:Ethanol (1:3:6) |
| Fixierlösung: | 4% oder 6% Formaldehyd in PBS oder 4% Paraformaldehyd in PBS |
| Futter: | 240 g Agar werden in 10 l H ₂ O für 2,5 Std. gekocht. Dann werden 2,4 kg Maismahl, 430 g Trockenhefe, 300 g Sojamehl, 2,4 kg Malzextrakt und 630 g Zuckerrübensirup in 15 l H ₂ O zugegeben und die |

| | |
|---------------------|--|
| | Mischung für weitere 4,5 Std. gekocht. Nach dem Abkühlen auf 60°C werden 190 ml Propionsäure dazugegeben und das Futter in Plastikbecher (Ø 2,5 cm, Höhe 6 cm oder Ø 4,5 cm, Höhe 9,5 cm) gegossen, sodaß die Becher zu ca. 1/3 gefüllt sind |
| Klebstoff: | Der Klebstoff von Tesapack-Streifen wird über mehrere Tage durch Schütteln in Heptan gelöst, abgegossen und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wird 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verwendet. |
| Klorix: | Bleich- und Desinfektionsmittel, enthält Natriumhypochlorid. Zum Gebrauch wird eine frisch angesetzte Mischung aus Klorix und Leitungswasser (1:1) verwendet. Lagerung bei 4°C. |
| Paraformaldehyd: | PBS gepuffertes 10% Paraformaldehyd |
| PBS: | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,7 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 mit HCL |
| PBT: | 0,2% Tween20 in PBS |
| Propidiumiodid: | 1 mg/ml; als 1/1000 Verdünnung eingesetzt |
| Ringer-Lösung: | 182 mM KCl; 46 mM NaCl; 3 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris; pH 7,2 einstellen, filtrieren und autoklavieren |
| Salz-Puffer: | 0,9% NaCl in PBS |
| Triton-Salz-Puffer: | 0,4% NaCl; 0,1% Triton X-100 in PBS |

4.7.2 Fliegenstämme

Alle verwendeten Marker sind bei Lindsley und Zimm (Lindsley und Zimm, 1992) beschrieben.

4.7.2.1 Verwendete Fliegenstämme

Als wildtypischer Referenzstamm und zum Injizieren wurde *white* (w^{1118} , abgekürzt als w) eingesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, war der CyO-Balancer mit *wg-lacZ* markiert. *Cyclin A* und *Cyclin B* wurden *CycA* bzw. *CycB* abgekürzt.

| Stamm-Nr. | Genotyp | Herkunft |
|-----------|---|----------------|
| F-178 | Df(2R)59AB <i>Cyclin B</i> (abgekürzt als <i>dCycB</i>) | Frank Sprenger |
| F-192 | <i>CycA</i> ^{C⁸LR1} /TM3 | Frank Sprenger |
| F-232 | w ; IF/CyO; TM6/MKRS | Frank Sprenger |
| TF-073 | UAS- <i>CycA</i> Δ170 | Frank Sprenger |
| TF-111 | UAS- <i>lacZ</i> | Frank Sprenger |
| TF-144 | <i>CycA</i> ^{neo114} , hs- <i>CycA</i> /TM3[<i>Ubx-lacZ</i>] | Frank Sprenger |
| TF-171 | <i>armGal4</i> | Frank Sprenger |
| TF-313 | <i>prdGal4</i> / TM3[<i>Ubx-lacZ</i>] | Frank Sprenger |
| TF-390 | <i>sevGal4</i> /CyO-GFP | Frank Sprenger |

| | | |
|--------|-----------------------------------|---------------|
| TK-361 | $y, w^-, matGal4/FM6; daGal4/TM2$ | Thomas Klein |
| TL-514 | $daGal4$ | Maria Leptin |
| TW-557 | $w^-; dof^1/TM3[Kr-GFP]$ | Robert Wilson |

4.7.2.2 Hergestellte Fliegenstämme

Wenn nicht anders vermerkt, war der CyO-Balancer mit *wg-lacZ* markiert. *Cyclin A* und *Cyclin B* wurden *CycA* bzw. *CycB* abgeküzt.

| Stamm-Nr. | Genotyp | Herstellung |
|-----------|--|--|
| TAD-013 | $w^-; dCycB/CyO; TM6/MKRS$ | F-178xF-232 |
| TAD-015 | $w^-; CycA^{neo114}/TM3[Kr-GFP]$ | TF-144xTW557 |
| TAD-016 | $w^-; IF/CyO; CycA^{C8LR1}/TM6$ | F-192xF-232 |
| TAD-017 | $w^-; CycA^{C8LR1}/TM3[Kr-GFP]$ | F-192xTAD-015 |
| TAD-018 | $w^-; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | F-192xTF-313 |
| TAD-019 | $w^-; CycA^{C8LR1}, prdGal4/TM3[Ubx-lacZ]$ | Rekombination zw. F-192 und TF-313, 3 Linien behalten |
| TAD-021 | $w^-; IF/CyO; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-016xTF-313 |
| TAD-030 | $w^-; UAS-HA-NES-CycA; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-226.8xTAD-021 |
| TAD-033 | $w^-; UAS-HA-NLS-CycA; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-225.10xTAD-021 |
| TAD-035 | $w^-; UAS-HA-CycA; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-224.15xTAD-021 |
| TAD-037 | $w^-; UAS-HA-CycB; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-245.9xTAD-021 |
| TAD-049 | $w^-; UAS-HA-NLS-CycB; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-227.7xTAD-021 |
| TAD-063 | $w^-; UAS-tor-HA-CycA; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-391.1xTAD-021 |
| TAD-064 | $w^-; UAS-tor-HA-CycA; CycA^{C8LR1}/TM6; IF/CyO[wg-lacZ];$ | TAD-391.2xTAD-021 |
| TAD-065 | $w^-; UAS-tor-HA-CycA; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]; IF/CyO[wg-lacZ];$ | TAD-064xTAD-021 |
| TAD-066 | $w^-; dCycB/CyO; CycA^{C8LR1}/TM6$ | TAD-013xTAD-021 |
| TAD-067 | $w^-; dCycB/CyO; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-064xTAD-066 |
| TAD-068 | $w^-; UAS-tor-HA-CycA; dCycB/CyO; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-064xTAD-067 |
| TAD-069 | $w^-; UAS-CycA\Delta 170; CycA^{C8LR1}/TM3[Ubx-lacZ]$ | TF-073xTAD-021 |
| TAD-070 | $w^-; dCycB/CyO; CycA^{C8LR1}, prdGal4/TM3[Ubx-lacZ]$ | TAD-067xTAD-019.1 |
| TAD-071 | $w^-; 2xUAS-tor-HA-CycA$ | TAD-391.5xTAD-391.10 |
| TAD-074 | $w^-; armGal4; TM6/MKRS$ | TF-171xF-232 |
| TAD-075 | $w^-; armGal4; CycA^{C8LR1}/TM6$ | TAD-074xTAD-017 |
| TAD-076 | $w^-; CycA^{C8LR1}, daGal4/TM6$ | Rekombination zw. TL-514 und TAD-017, 1 Linie erhalten |
| TAD-077 | $w^-; UAS-HA-NES-CycA; CycA^{C8LR1}/TM6$ | TAD-030xF-232 |

| | | | |
|---------|---|-----------------|----|
| TAD-078 | w^- ; UAS-HA-NLS- <i>CycA</i> ; <i>CycA</i> ^{C8LR1} /TM6 | TAD-033xF-232 | |
| TAD-079 | w^- ; UAS-HA- <i>CycA</i> ; <i>CycA</i> ^{C8LR1} /TM6 | TAD-035xF-232 | |
| TAD-224 | w^- ; UAS-HA- <i>CycA</i> | Transformation; | 12 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-225 | w^- ; UAS-HA-NLS- <i>CycA</i> | Transformation; | 12 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-226 | w^- ; UAS-HA-NES- <i>CycA</i> | Transformation; | 12 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-227 | w^- ; UAS-HA-NLS- <i>CycB</i> | Transformation; | 12 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-245 | w^- ; UAS-HA- <i>CycB</i> | Transformation; | 9 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-424 | w^- ; UAS-HA- <i>CycA</i> -T145V | Transformation; | 10 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-425 | w^- ; UAS-HA- <i>CycA</i> -S154V | Transformation; | 9 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-426 | w^- ; UAS-HA- <i>CycA</i> -S180V | Transformation; | 11 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-427 | w^- ; UAS-HA- <i>CycA</i> -T333V | Transformation; | 9 |
| | | Linien behalten | |
| TAD-428 | w^- ; UAS-HA- <i>CycA</i> -T397V | Transformation; | 9 |
| | | Linien behalten | |

4.7.3 Dechorionierung und Fixierung von *Drosophila* Embryonen

Um die *Drosophila* Embryonen fixieren zu können, und um das Gewebe für Antikörper zugänglich zu machen, müssen die Embryonen von ihren zwei Embryonalhüllen (Chorion und Vitellinmembran) befreit werden. Für Antikörperfärbungen wurden die Embryonen mit Formaldehyd fixiert. Für Embryonenextrakte, die in einem SDS-PAGE analysiert werden sollten, wurden die Embryonen mit MeOH fixiert. Für Embryonenextrakte, die für Immunpräzipitationen oder für Membranfraktionierung verwendet werden sollten, wurden die Embryonen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.7.3.1 Dechorionierung

Die Embryonen wurden auf Apfelsaftagarplatten gesammelt. Zum Dechorionieren wurden die Embryonen auf der Platte mit Klorix übergossen und für max. 2 min inkubiert. Embryonen, deren Chorion durch das Klorix aufgelöst wurde, steigen an die Oberfläche. Anschließend wurden die Embryonen in ein Gaze-Sieb abgegossen und ausreichend mit Leitungswasser gespült, um Klorixreste zu entfernen.

4.7.3.2 Formaldehydfixierung

Dechorionierte Embryonen wurden mit einem Pinsel in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem 750 μ l Fixierlösung und 750 μ l Heptan vorgelegt war. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C rotieren gelassen. 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 zu

Boden und werden mehrmals mit Methanol gewaschen. Fixierte Embryonen können in Methanol bei -20°C gelagert werden.

4.7.6.3 MeOH-Fixierung

Dechorionierte Embryonen wurden mit einem Pinsel in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem 1,5 ml eines MeOH/Heptan-Gemisches (1:1) vorgelegt war. Der Ansatz wurde für 20 min bei RT rotieren gelassen. Die fixierten, dehydrierten Embryonen sanken zu Boden. Die Embryonen wurden zweimal mit je 1 ml MeOH gewaschen und bei -20°C gelagert. Zur Probenvorbereitung für ein SDS-PAGE wurden die Embryonen in Laemmli-Puffer aufgenommen, und zwar in einem Verhältnis von 2-5 Embryonen pro μl Laemmli-Puffer. Die Embryonen wurden anschließend durch Kochen (5 min bei 96°C) homogenisiert.

4.7.6.4 Schockfixierung mit Stickstoff

Für Immunpräzipitationen wurden dechorionierte Embryonen mit einem Pinsel in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Heptan überführt, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurde ein maximales Äquivalent von 20 μl an Embryonen pro Reaktionsgefäß eingefroren und später für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C .

Für Membranfraktionierungen wurden Embryonen direkt von der Ablageplatte mit einem Spatel in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C .

4.7.7. Sortieren von mutanten Embryonen für Embryonenextrakte

Die in Abb. 12 eingesetzten Extrakte von *Cyclin A* mutanten Embryonen wurden wie folgt hergestellt: MeOH fixierte Embryonen des entsprechenden Genotyps wurden zuerst mit dem α - βGal Antikörper und anschließend mit einem Alexa-488 gekoppelten zweiten Antikörper gefärbt. Die *Cyclin A* mutanten Embryonen wurden in einem Uhrglas in PBS unter einem Mikroskop mit GFP-Filter anhand der Abwesenheit des *lacZ*-markierten Balancers identifiziert. Zur Probenvorbereitung für ein SDS-PAGE wurden die Embryonen in Laemmli-Puffer aufgenommen, und zwar in einem Verhältnis von 2-5 Embryonen pro μl Laemmli-Puffer. Die Embryonen wurden anschließend durch Kochen (5 min bei 96°C) homogenisiert.

4.7.8 Inkubation von Embryonen mit Leptomycin B

Leptomycin B (Sigma) ist ein aus dem Pilz *Streptomyces sp.* stammendes Cytotoxin und wurde als Inhibitor des Kernexportrezeptors Crm1 (auch als Exportin1 oder Xpo1 bezeichnet, bzw. *embargoed* in *Drosophila*) beschrieben (Fornerod et al., 1997; Stade et al., 1997). Leptomycin B ist eine verzweigte, nichtgesättigte Fettsäure, die den Kernexport durch kovalente Bindung des Rezeptors inhibiert, wodurch die Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem zu transportierenden Protein verhindert wird (Kudo et al., 1998).

Es wurde nach einem bereits beschriebenen Protokoll (Townsend und Bienz, 2000) wie folgt vorgegangen.

3-6 Std. alte Embryonen wurden dechorioniert und ausreichend mit Triton-Salz-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen zweimal mit Salz-Puffer gewaschen und dann in einem Glasgefäß mit Schraubdeckel in einer Suspension bestehend aus 1 ml

Oktan, 1 ml Salz-Puffer und 80 ng/ml Leptomycin B für eine Std. bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurde anstatt Leptomycin B die entsprechende Menge des Lösungsmittels (70% MeOH) zugesetzt. Die Suspension wurde entfernt, die Embryonen zweimal mit Heptan gespült und dann mit 750 µl Heptan/750 µl Fixierlösung (Paraformaldehyd) für 20 min bei RT fixiert. Das Heptan/Fix-Gemisch wurde eine halbe Std. vor Verwendung angesetzt, um das Heptan mit Paraformaldehyd zu sättigen. Die fixierten Embryonen wurden mit MeOH devitellinisiert und entweder bei -20°C gelagert oder direkt für eine Antikörperfärbung eingesetzt.

4.7.9 Einbettung von Embryonen nach Antikörperfärbung

- wurden Fluoreszenz gekoppelte sekundäre Antikörper benutzt: Embryonen in PBT auf einen Objektträger übertragen, PBT mit 27G Kanüle entfernen, Einbettung der Embryonen in Vectashield Einbettungsmedium
- Mit DAB gefärbte Embryonen werden durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert, kurz mit trockenem Aceton gewaschen und schließlich in einem 1:1 Aceton Araldit-Gemisch in kleine Plastikschälchen zum Sortieren übertragen in diesem Gemisch können sie nach Verdampfen des Acetons auch auf Objektträger übertragen und fotografiert werden

4.7.10 Nachweis von S-Phasen in Augenimaginalscheiben

Die S-Phasen können indirekt durch die Inkorporation des Thymidin-Basenanalogs BrdU während der DNA-Replikation nachgewiesen werden.

- bis zu 50 L3 Larven sammeln und in Ringer-Lösung waschen
- 100 µl BrdU-Stammlösung in einer kleinen Petrischale mit 1ml Hefe mischen, der Hefe-BrdU Brei sollte recht flüssig sein
- Larven für 3 Std. fressen lassen, dabei darauf achten, daß die Larven immer in der Hefe sind, danach die Larven ausgiebig in Ringer-Lösung waschen
- höchstens für 1 Std. die Augenimaginalscheiben in Ringer-Lösung derart vorpräparieren, daß Teile der Kutikula, das Gehirn mit daranhängenden Augenimaginalscheiben und die Mundhacken erhalten bleiben (die Scheiben sind dann besser zu erkennen und sinken schneller zu Boden). Die vorpräparierten Scheiben in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Ringer-Lösung sammeln
- die Scheiben werden dann für 30 min bei RT in frischem Carnoys fixiert, zwischendurch immer kontrollieren, daß sie nicht zusammenkleben, ansonsten kräftig schütteln
- nach der Fixierung werden die Scheiben durch eine Ethanolreihe (70%, 50% und 30% Ethanol) rehydriert und anschließend ausgiebig mit PBT gewaschen (in PBT können die Scheiben mehrere Wochen aufbewahrt werden)
- DNA-Denaturierung mit 2N HCL in PBT für 1 Std. bei RT (wieder schütteln lassen)
- ausgiebig mit PBT waschen
- Antikörperfärbung mit dem α -BrdU-Antikörper
- nach der Färbung werden die Scheiben mit Anhängsel auf einen Objektträger mit Vertiefung überführt und in PBT freipräpariert
- Objektträger mit ca. 8 Tropfen Vectashield vorbereiten und jeweils 2 Scheiben in einen Tropfen übertragen

4.7.11 Nachweis von S-Phasen in Embryonen

Es wurde nach dem in Sprenger (Sprenger et al., 1997) beschriebenen Protokoll vorgegangen.

4.7.12 P-Element vermittelte Transformation von *Drosophila* Embryonen

Für die Herstellung transgener Fliegenlinien wurden die Konstrukte mithilfe eines Transporters (Carriers) in die chromosomale DNA von *Drosophila* integriert (Rubin und Spradling, 1982). Als Carrier wurde pUAST verwendet. Die DNA wurde in *white* Mutanten injiziert. Die Konzentration des Carriers betrug 400 ng/μl, die des Helferplasmids 100 ng/μl in H₂O. Die möglichen Transformanten wurden durch Kreuzungen mit dem Stamm F-232 auf chromosomale Insertionen überprüft.

4.7.13 mRNA-Injektion in Embryonen

- 1 Std. alte Embryonen dechorionieren
- Embryonen auf einem Agarblöckchen aufreihen (30-45min) und auf ein Deckgläschen mit Heptan-Kleber überführen
- Embryonen in einem Exikator mit Silikagel für ca. 12 min trocknen lassen
- Embryonen mit 10S Voltalef-Öl überschichten
- die mRNA sollte kurz vor der Zellularisierung injiziert werden
- nach der Injektion Embryonen 2 Std. bei RT altern lassen
- für Lokalisationsstudien:
 - 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 (s. Abschnitt 4.7.3.2)
- für Immunpräzipitationen:
 - Embryonen mit Heptan von dem Deckgläschen spülen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen, einmal mit PBS waschen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefrieren (witer mit 4.7.2.5)

4.7.14 Das UAS/Gal4-Expressionssystem in *Drosophila*

Das UAS/GAL4 System erlaubt die ektopische Expression von Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Gewebe (Brand und Perrimon, 1993). Das System besteht aus einer 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 funktioniert. Um die Transkription zu aktivieren benötigt GAL4 eine bestimmte DNA Sequenzen, die sogenannten "Upstream Activating Sequences" (UAS-) Sequenzen.

Um das Gen des Interesses unter GAL4 Kontrolle zu exprimieren, kloniert man zunächst das Gen hinter die UAS-Sequenzen (z.B. im pUAST Vektor) und generiert transgene Fliegen (Effektorstamm). Die UAS-Sequenzen können von endogenen Transkriptionsfaktoren nicht aktiviert werden, deshalb wird das nachgeschaltete Gen nicht exprimiert. Nach Kreuzung von Aktivator- und Effektorstamm, 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 *prdGAL4*, *matGAL4*, *daGAL4*, und *sevGAL4* verwendet.

5. Literatur

- Adams, P. D., Sellers, W. R., Sharma, S. K., Wu, A. D., Nalin, C. M., und Kaelin, W. G., Jr.** (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* *16*, 6623-6633.
- Amon, A.** (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 69-75.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila* (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., und Donoghue, D. J.** (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *Embo J* *20*, 2214-2223.
- Bate, M., Martínez Arias, A., und Hartenstein, V.** (1993). *The Development of Drosophila melanogaster* (Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Beach, D., Durkacz, B., und Nurse, P.** (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* *300*, 706-709.
- 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*, 3945-3955.
- Bradbury, E. M.** (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* *14*, 9-16.
- Brand, A. H., und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401-415.
- Brown, N. R., Noble, M. E., Endicott, J. A., Garman, E. F., Wakatsuki, S., Mitchell, E., Rasmussen, B., Hunt, T., und Johnson, L. N.** (1995). The crystal structure of cyclin A. *Structure* *3*, 1235-1247.
- 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*, 1333-1347.
- Card, G. L., Knowles, P., Laman, H., Jones, N., und McDonald, N. Q.** (2000). Crystal structure of a gamma-herpesvirus cyclin-cdk complex. *Embo J* *19*, 2877-2888.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B. D., und Dutta, A.** (1996). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol* *16*, 4673-4682.
- 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*, 1001-1009.
- Coverley, D., Laman, H., und Laskey, R. A.** (2002). Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat Cell Biol* *4*, 523-528.
- Davis, I., Girdham, C. H., und PH, O. F.** (1995). A nuclear GFP that marks nuclei in living *Drosophila* embryos; maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. *Dev Biol* *170*, 726-729.
- 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*, 725-737.
- 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*, 1237-1247.
- Desai, D., Wessling, H. C., Fisher, R. P., und Morgan, D. O.** (1995). Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol Cell Biol* *15*, 345-350.

- Devault, A., Martinez, A. M., Fesquet, D., Labbe, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C., and 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*, 5027-5036.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., and Sherr, C. J.** (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* *12*, 3499-3511.
- Dienemann, A.** (1999). Untersuchungen zur Regulation und Funktion der subzellulären Lokalisierung von Cyclin A in *Drosophila melanogaster* (Diplomarbeit).
- Dong, X., Zavitz, K. H., Thomas, B. J., Lin, M., Campbell, S., and Zipursky, S. L.** (1997). Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: rca1 regulates Cyclin A. *Genes Dev* *11*, 94-105.
- Doree, M., and Hunt, T.** (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* *115*, 2461-2464.
- Draetta, G.** (1990). Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci* *15*, 378-383.
- Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J., and Beach, D.** (1989). Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* *56*, 829-838.
- Draviam, V. M., Orrechia, S., Lowe, M., Pardi, R., and Pines, J.** (2001). The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus. *J Cell Biol* *152*, 945-958.
- Dyson, N.** (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* *12*, 2245-2262.
- Echard, A., and O'Farrell, P. H.** (2003). The degradation of two mitotic cyclins contributes to the timing of cytokinesis. *Curr Biol* *13*, 373-383.
- Edgar, B. A., and Datar, S. A.** (1996). Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNAs terminates *Drosophila*'s early cell cycle program. *Genes Dev* *10*, 1966-1977.
- Edgar, B. A., Lehman, D. A., and O'Farrell, P. H.** (1994). Transcriptional regulation of string (cdc25): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development* *120*, 3131-3143.
- Edgar, B. A., and Lehner, C. F.** (1996). Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* *274*, 1646-1652.
- Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H.** (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* *57*, 177-187.
- Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H.** (1990). The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* *62*, 469-480.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T.** (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* *33*, 389-396.
- Faivre, J., Frank-Vaillant, M., Poulhe, R., Mouly, H., Jesus, C., Brechot, C., and Sobczak-Thepot, J.** (2002). Centrosome overduplication, increased ploidy and transformation in cells expressing endoplasmic reticulum-associated cyclin A2. *Oncogene* *21*, 1493-1500.
- 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*, 1303-1307.

- Finley, R. L., Jr., Thomas, B. J., Zipursky, S. L., und Brent, R.** (1996). Isolation of *Drosophila* cyclin D, a protein expressed in the morphogenetic furrow before entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 3011-3015.
- Fisher, R. P., und Morgan, D. O.** (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* *78*, 713-724.
- Foe, V. E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* *107*, 1-22.
- Foley, E., O'Farrell, P. H., und Sprenger, F.** (1999). Rux is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) specific for mitotic cyclin-Cdk complexes. *Curr Biol* *9*, 1392-1402.
- Foley, E., und Sprenger, F.** (2001). The cyclin-dependent kinase inhibitor Roughex is involved in mitotic exit in *Drosophila*. *Curr Biol* *11*, 151-160.
- Follette, P. J., und O'Farrell, P. H.** (1997). Cdks and the *Drosophila* cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* *7*, 17-22.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., und Mattaj, I. W.** (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* *90*, 1051-1060.
- Fry, A. M., und Nigg, E. A.** (1995). Cell cycle. The NIMA kinase joins forces with Cdc2. *Curr Biol* *5*, 1122-1125.
- Gallant, P., Fry, A. M., und Nigg, E. A.** (1995). Protein kinases in the control of mitosis: focus on nucleocytoplasmic trafficking. *J Cell Sci Suppl* *19*, 21-28.
- Gallant, P., und Nigg, E. A.** (1992). Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol* *117*, 213-224.
- Gasca, S., Canizares, J., De Santa Barbara, P., Mejean, C., Poulat, F., Berta, P., und Boizet-Bonhoure, B.** (2002). A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11199-11204.
- Gerace, L.** (1995). Nuclear export signals and the fast track to the cytoplasm. *Cell* *82*, 341-344.
- Ghosh, S., Paweletz, N., und Schroeter, D.** (1998). Cdc2-independent induction of premature mitosis by okadaic acid in HeLa cells. *Exp Cell Res* *242*, 1-9.
- Girard, F., Strausfeld, U., Cavadore, J. C., Russell, P., Fernandez, A., und Lamb, N. J.** (1992). cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells. *J Cell Biol* *118*, 785-794.
- Glotzer, M.** (2001). Animal cell cytokinesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 351-386.
- Glotzer, M., Murray, A. W., und Kirschner, M. W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *349*, 132-138.
- Glover, D. M., Hagan, I. M., und Tavares, A. A.** (1998). Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev* *12*, 3777-3787.
- Goda, T., Ishii, T., Nakajo, N., Sagata, N., und Kobayashi, H.** (2003). The RRASK motif in *Xenopus* cyclin B2 is required for the substrate recognition of Cdc25C by the cyclin B-Cdc2 complex. *J Biol Chem*.
- Gonczy, P., Thomas, B. J., und DiNardo, S.** (1994). roughex is a dose-dependent regulator of the second meiotic division during *Drosophila* spermatogenesis. *Cell* *77*, 1015-1025.
- Görlich, D., und Mattaj, I. W.** (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* *271*, 1513-1518.
- Gowdy, P. M., Anderson, H. J., und Roberge, M.** (1998). Entry into mitosis without Cdc2 kinase activation. *J Cell Sci* *111 (Pt 22)*, 3401-3410.

- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., and Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4645-4649.
- Grosskortenhaus, R.** (2001). Charakterisierung der Zellzyklusfunktion von *rcal* (*regulator of Cyclin A*) in *Drosophila melanogaster* (Doktorarbeit).
- Grosskortenhaus, R., und Sprenger, F.** (2002). Rca1 inhibits APC-Cdh1(Fzr) and is required to prevent cyclin degradation in G2. *Dev Cell* 2, 29-40.
- Guertin, D. A., Trautmann, S., und McCollum, D.** (2002). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 155-178.
- Ha Kim, Y., Yeol Choi, J., Jeong, Y., Wolgemuth, D. J., und Rhee, K.** (2002). Nek2 localizes to multiple sites in mitotic cells, suggesting its involvement in multiple cellular functions during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 730-736.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., und Pines, J.** (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 9, 680-689.
- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., und Pines, J.** (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *Embo J* 17, 4127-4138.
- Hanks, S. K., Rodriguez, L. V., und Rao, P. N.** (1983). Relationship between histone phosphorylation and premature chromosome condensation. *Exp Cell Res* 148, 293-302.
- Heald, R., McLoughlin, M., und McKeon, F.** (1993). Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74, 463-474.
- Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Taya, Y., Segawa, K., Nishimura, S., und Kitagawa, M.** (1995). Differences in substrate specificity between Cdk2-cyclin A and Cdk2-cyclin E in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 520-525.
- Holmes, J. K., und Solomon, M. J.** (2001). The role of Thr160 phosphorylation of Cdk2 in substrate recognition. *Eur J Biochem* 268, 4647-4652.
- 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, 2184-2195.
- Hunter, T., und Pines, J.** (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79, 573-582.
- 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, 350-354.
- Ish-Horowicz, D., und Burke, J. F.** (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9, 2989-2998.
- Izumi, T., Walker, D. H., und Maller, J. L.** (1992). Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol Biol Cell* 3, 927-939.
- Jackman, M., Firth, M., und Pines, J.** (1995). Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *Embo J* 14, 1646-1654.
- Jackman, M., Kubota, Y., den Elzen, N., Hagting, A., und Pines, J.** (2002). Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Biol Cell* 13, 1030-1045.
- Jackman, M. R., und Pines, J. N.** (1997). Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv* 29, 47-73.
- Jacobs, H. W., Keidel, E., und Lehner, C. F.** (2001). A complex degradation signal in Cyclin A required for G1 arrest, and a C-terminal region for mitosis. *Embo J* 20, 2376-2386.

- 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*, 3741-3751.
- 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*, 227-236.
- Jaumot, M., Estanol, J. M., Casanovas, O., Grana, X., Agell, N., und Bachs, O.** (1997). The cell cycle inhibitor p21CIP is phosphorylated by cyclin A-CDK2 complexes. *Biochem Biophys Res Commun* *241*, 434-438.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., und Pavletich, N. P.** (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* *376*, 313-320.
- Jin, P., Hardy, S., und Morgan, D. O.** (1998). Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *J Cell Biol* *141*, 875-885.
- Kaldis, P., Sutton, A., und Solomon, M. J.** (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* *86*, 553-564.
- 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*, 685-690.
- 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*, 331-342.
- King, R. W., Glotzer, M., und Kirschner, M. W.** (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell* *7*, 1343-1357.
- Kitagawa, M., Higashi, H., Jung, H. K., Suzuki-Takahashi, I., Ikeda, M., Tamai, K., Kato, J., Segawa, K., Yoshida, E., Nishimura, S., und Taya, Y.** (1996). The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *Embo J* *15*, 7060-7069.
- 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*, 107-120.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J. P., Gannon, J., und Hunt, T.** (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* *3*, 1279-1294.
- Koepp, D. M., Harper, J. W., und Elledge, S. J.** (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* *97*, 431-434.
- Kong, M., Barnes, E. A., Ollendorff, V., und Donoghue, D. J.** (2000). Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *Embo J* *19*, 1378-1388.
- 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*, 1555-1569.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., und Yoshida, M.** (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* *242*, 540-547.
- Labbe, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J. M., Picard, A., und Doree, M.** (1989). MPF from starfish oocytes at first

meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *Embo J* 8, 3053-3058.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F., und Vaessin, H. (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87, 1225-1235.

Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K., und Suter, B. (1998). Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev* 12, 370-381.

Lees, E. M., und Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 1194-1201.

Lehner, C. F., und O'Farrell, P. H. (1989). Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell* 56, 957-968.

Lehner, C. F., und O'Farrell, P. H. (1990). The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell* 61, 535-547.

Lehner, C. F., Yakubovich, N., und O'Farrell, P. H. (1991). Exploring the role of *Drosophila* cyclin A in the regulation of S phase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 56, 465-475.

Liang, S. H., und Clarke, M. F. (2001). Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 268, 2779-2783.

Lindsley, D. L., und Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster* (San Diego, Academic Press).

Listovsky, T., Zor, A., Laronne, A., und Brandeis, M. (2000). Cdk1 is essential for mammalian cyclosome/APC regulation. *Exp Cell Res* 255, 184-191.

Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z., und Piwnica Worms, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* 17, 571-583.

Luca, F. C., Shibuya, E. K., Dohrmann, C. E., und Ruderman, J. V. (1991). Both cyclin A delta 60 and B delta 97 are stable and arrest cells in M-phase, but only cyclin B delta 97 turns on cyclin destruction. *Embo J* 10, 4311-4320.

Maridor, G., Gallant, P., Golsteyn, R., und Nigg, E. A. (1993). Nuclear localization of vertebrate cyclin A correlates with its ability to form complexes with cdk catalytic subunits. *J Cell Sci* 106, 535-544.

Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., und Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14, 2066-2076.

Mendenhall, M. D. (1993). An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 259, 216-219.

Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A. M., Bartek, J., und Nigg, E. A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* 1, 88-93.

Michaelis, C., Ciosk, R., und Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91, 35-45.

Mihaylov, I. S., Kondo, T., Jones, L., Ryzhikov, S., Tanaka, J., Zheng, J., Higa, L. A., Minamino, N., Cooley, L., und Zhang, H. (2002). Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A. *Mol Cell Biol* 22, 1868-1880.

- Millar, J., McGowan, C., Jones, R., Sadhu, K., Bueno, A., Richardson, H., and Russell, P.** (1991). cdc25 M-phase inducer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 56, 577-584.
- Miller, M. E., and Cross, F. R.** (2000). Distinct subcellular localization patterns contribute to functional specificity of the Cln2 and Cln3 cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 542-555.
- Moore, J. D., Kornbluth, S., and Hunt, T.** (2002). Identification of the nuclear localization signal in *Xenopus* cyclin E and analysis of its role in replication and mitosis. *Mol Biol Cell* 13, 4388-4400.
- Moore, J. D., Yang, J., Truant, R., and Kornbluth, S.** (1999). Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J Cell Biol* 144, 213-224.
- Morgan, D. O.** (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Morgan, D. O.** (1996). The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr Opin Cell Biol* 8, 767-772.
- Morgan, D. O.** (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Ann Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Morgan, D. O.** (1999). Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat Cell Biol* 1, E47-53.
- Morgan, M., Thorburn, J., Pandolfi, P. P., and Thorburn, A.** (2002). Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. *J Cell Biol* 157, 975-984.
- Morris, M. C., Gondeau, C., Tainer, J. A., and Divita, G.** (2002). Kinetic mechanism of activation of the Cdk2/cyclin A complex. Key role of the C-lobe of the Cdk. *J Biol Chem* 277, 23847-23853.
- 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, 729-738.
- Murphy, M., Stinnakre, M. G., Senamaud-Beaufort, C., Winston, N. J., Sweeney, C., Kubelka, M., Carrington, M., Brechot, C., and Sobczak-Thépot, J.** (1997). Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* 15, 83-86.
- Murray, A. W., Solomon, M. J., and Kirschner, M. W.** (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339, 280-286.
- Napolitano, G., Majello, B., and Lania, L.** (2002). Role of cyclinT/Cdk9 complex in basal and regulated transcription. *Int J Oncol* 21, 171-177.
- Nasmyth, K., Peters, J. M., and Uhlmann, F.** (2000). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* 288, 1379-1385.
- Nigg, E. A.** (1998). Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* 10, 776-783.
- Nigg, E. A.** (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.
- Noble, M. E., Endicott, J. A., Brown, N. R., and Johnson, L. N.** (1997). The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem Sci* 22, 482-487.

- Noton, E., and Diffley, J. F.** (2000). CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. *Mol Cell* 5, 85-95.
- Nugent, J. H., Alfa, C. E., Young, T., and Hyams, J. S.** (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci* 99, 669-674.
- Nurse, P.** (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-508.
- O'Connell, M. J., Walworth, N. C., and Carr, A. M.** (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol* 10, 296-303.
- Ohtoshi, A., Maeda, T., Higashi, H., Ashizawa, S., and Hatakeyama, M.** (2000). Human p55(CDC)/Cdc20 associates with cyclin A and is phosphorylated by the cyclin A-Cdk2 complex. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 530-534.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J. C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T. J., Hotani, H., Okumura, E., Tachibana, K., and Kishimoto, T.** (1995). Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol* 128, 849-862.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Okano, T., Tachibana, K., and Kishimoto, T.** (1992). Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Embo J* 11, 1763-1772.
- 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, 961-971.
- Peeper, D. S., Parker, L. L., Ewen, M. E., Toebes, M., Hall, F. L., Xu, M., Zantema, A., van der Eb, A. J., and Piwnica-Worms, H.** (1993). A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *Embo J* 12, 1947-1954.
- Peter, M., Heitlinger, E., Haner, M., Aebi, U., and Nigg, E. A.** (1991). Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *Embo J* 10, 1535-1544.
- Peter, M., and Herskowitz, I.** (1994). Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 79, 181-184.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., and Helin, K.** (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J* 18, 396-410.
- Pfleger, C. M., and Kirschner, M. W.** (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14, 655-665.
- Pines, J.** (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1, E73-79.
- 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., Gardner, B. E., Margottin-Goguet, F., and Jackson, P. K.** (2001). Emil regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes Dev* 15, 3278-3285.
- Resnitzky, D., Hengst, L., and Reed, S. I.** (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* 15, 4347-4352.
- Roberts, D. B.** (1998). *Drosophila : a practical approach*, 2nd edn (Oxford, [Eng.] ; New York, IRL Press at Oxford University Press).
- Roberts, J. M.** (1999). Evolving ideas about cyclins. *Cell* 98, 129-132.

- Rosenberg, A. R., Zindy, F., Le Deist, F., Mouly, H., Metezeau, P., Brechot, C., and Lamas, E.** (1995). Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase. *Oncogene* *10*, 1501-1509.
- Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F., and Bienz, M.** (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* *406*, 1009-1012.
- 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*, 1093-1101.
- Rubin, G. M., and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* *218*, 348-353.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P.** (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* *382*, 325-331.
- Sambrook, J., Maniatis, T., and Fritsch, E. F.** (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sauer, K., Knoblich, J. A., Richardson, H., and 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*, 1327-1339.
- Sauer, K., Weigmann, K., Sigrist, S., and 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*, 1759-1769.
- Saville, M. K., and Watson, R. J.** (1998). The cell-cycle regulated transcription factor B-Myb is phosphorylated by cyclin A/Cdk2 at sites that enhance its transactivation properties. *Oncogene* *17*, 2679-2689.
- Schulman, B. A., Lindstrom, D. L., and Harlow, E.** (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 10453-10458.
- Seki, T., Yamashita, K., Nishitani, H., Takagi, T., Russell, P., and Nishimoto, T.** (1992). Chromosome condensation caused by loss of RCC1 function requires the cdc25C protein that is located in the cytoplasm. *Mol Biol Cell* *3*, 1373-1388.
- Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A., and Young, R. A.** (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature* *374*, 280-282.
- Serrano, M., Gomez-Lahoz, E., DePinho, R. A., Beach, D., and Bar-Sagi, D.** (1995). Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* *267*, 249-252.
- Shah, J. V., and Cleveland, D. W.** (2000). Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* *103*, 997-1000.
- Shah, O. J., Ghosh, S., and Hunter, T.** (2003). Mitotic regulation of S6K1 involves Ser/Thr, Pro phosphorylation of consensus and non-consensus sites by Cdc2. *J Biol Chem*.
- Sherr, C. J.** (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* *79*, 551-555.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M.** (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* *9*, 1149-1163.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M.** (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* *13*, 1501-1512.
- Shorter, J., and Warren, G.** (2002). Golgi architecture and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol* *18*, 379-420.

- 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, 193-198.
- Siegel, V., und Walter, P.** (1988). Functional dissection of the signal recognition particle. *Trends Biochem Sci* 13, 314-316.
- 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, 4827-4838.
- 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, 671-681.
- Solomon, M. J.** (1994). The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase. *Trends Biochem Sci* 19, 496-500.
- 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, 3692-3703.
- Sprenger, F., und Nüsslein-Volhard, C.** (1992). Torso receptor activity is regulated by a diffusible ligand produced at the extracellular terminal regions of the *Drosophila* egg. *Cell* 71, 987-1001.
- 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, 488-499.
- Spruck, C. H., und Strohmaier, H. M.** (2002). Seek and destroy: SCF ubiquitin ligases in mammalian cell cycle control. *Cell Cycle* 1, 250-254.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., und Weis, K.** (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041-1050.
- Stemmer, W. P.** (1991). A 20-minute ethidium bromide/high-salt extraction protocol for plasmid DNA. *Biotechniques* 10, 726.
- Stern, B., Ried, G., Clegg, N. J., Grigliatti, T. A., und Lehner, C. F.** (1993). Genetic analysis of the *Drosophila* cdc2 homolog. *Development* 117, 219-232.
- Stiffler, L. A., Ji, J. Y., Trautmann, S., Trusty, C., und Schubiger, G.** (1999). Cyclin A and B functions in the early *Drosophila* embryo. *Development* 126, 5505-5513.
- Su, T. T., Sprenger, F., DiGregorio, P. J., Campbell, S. D., und O'Farrell, P. H.** (1998). Exit from mitosis in *Drosophila* syncytial embryos requires proteolysis and cyclin degradation, and is associated with localized dephosphorylation. *Genes Dev* 12, 1495-1503.
- Sullivan, W., Ashburner, M., und Hawley, R. S.** (2000). *Drosophila* protocols (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Swenson, K. I., Farrell, K. M., und Ruderman, J. V.** (1986). The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47, 861-870.
- Takeda, D. Y., Wohlschlegel, J. A., und Dutta, A.** (2001). A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 276, 1993-1997.
- Takizawa, C. G., Weis, K., und Morgan, D. O.** (1999). Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7938-7943.
- Taniguchi, E., Toyoshima-Morimoto, F., und Nishida, E.** (2002). Nuclear translocation of plk1 mediated by its bipartite nuclear localization signal. *J Biol Chem* 277, 48884-48888.

- Thomas, B. J., Gunning, D. A., Cho, J., and Zipursky, L.** (1994). Cell cycle progression in the developing *Drosophila* eye: roughex encodes a novel protein required for the establishment of G1. *Cell* 77, 1003-1014.
- Thuret, J. Y., Valay, J. G., Faye, G., and Mann, C.** (1996). Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* 86, 565-576.
- Tomlinson, A., Bowtell, D. D., Hafen, E., and Rubin, G. M.** (1987). Localization of the sevenless protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell* 51, 143-150.
- Townsley, F. M., and Bienz, M.** (2000). Actin-dependent membrane association of a *Drosophila* epithelial APC protein and its effect on junctional Armadillo. *Curr Biol* 10, 1339-1348.
- Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., and Nishida, E.** (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage- induced G2 checkpoint. *Embo J* 17, 2728-2735.
- Toyoshima, H., and Hunter, T.** (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A., and Nishida, E.** (2001). Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 410, 215-220.
- Ubersax, J. A., Quang, P. N., Blethrow, J. D., Shokat, K. M., and Morgan, D. O. (2002). Large scale identification of substrates of the cyclin-dependent kinase cdc28. Paper presented at: The Cell Cycle (Cold Spring Harbour).
- Ueda, R., Togashi, S., Takahisa, M., Tsurumura, S., Mikuni, M., Kondo, K., and Miyake, T.** (1992). Sensory mother cell division is specifically affected in a Cyclin-A mutant of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 11, 2935-2939.
- Uhlmann, F.** (2001). Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO Rep* 2, 487-492.
- Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A.** (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278, 460-463.
- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J. M.** (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399-410.
- Walsh, S., Margolis, S. S., and Kornbluth, S.** (2003). Phosphorylation of the cyclin b1 cytoplasmic retention sequence by mitogen-activated protein kinase and plx. *Mol Cancer Res* 1, 280-289.
- Weis, K.** (2003). Regulating Access to the Genome. Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle. *Cell* 112, 441-451.
- Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., Cherenon, A. R., Connolly, M. L., and Lerner, R. A.** (1984). The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* 37, 767-778.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Takeda, D. Y., and Dutta, A.** (2001). Mutational analysis of the Cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 21, 4868-4874.
- Wu, L., Shiozaki, K., Aligue, R., and Russell, P.** (1996). Spatial organization of the Nim1-Wee1-Cdc2 mitotic control network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 7, 1749-1758.
- Xu, M., Sheppard, K. A., Peng, C. Y., Yee, A. S., and Piwnica-Worms, H.** (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14, 8420-8431.

- Yam, C. H., Fung, T. K., and Poon, R. Y.** (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 59, 1317-1326.
- Yamaguchi, S., Murakami, H., and 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, 2475-2486.
- Yan, C., Lee, L. H., and Davis, L. I.** (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J* 17, 7416-7429.
- Yang, J., Bardes, E. S., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A., and Kornbluth, S.** (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 12, 2131-2143.
- Yang, J., and Kornbluth, S.** (1999). All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol* 9, 207-210.
- Yang, J., Song, H., Walsh, S., Bardes, E. S., and Kornbluth, S.** (2001). Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites. *J Biol Chem* 276, 3604-3609.
- Yang, R., Muller, C., Huynh, V., Fung, Y. K., Yee, A. S., and Koeffler, H. P.** (1999). Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. *Mol Cell Biol* 19, 2400-2407.
- Yuan, J., Eckerdt, F., Bereiter-Hahn, J., Kurunci-Csacsko, E., Kaufmann, M., and Strebhardt, K.** (2002). Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 21, 8282-8292.
- Zachariae, W., and Nasmyth, K.** (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 13, 2039-2058.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W.** (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282, 1721-1724.
- Zhang, J., Sanchez, R. J., Wang, S., Guarnaccia, C., Tossi, A., Zahariev, S., and Pongor, S.** (1994). Substrate specificity of CDC2 kinase from human HeLa cells as determined with synthetic peptides and molecular modeling. *Arch Biochem Biophys* 315, 415-424.
- Zhang, T., and Prives, C.** (2001). Cyclin A-CDK phosphorylation regulates MDM2 protein interactions. *J Biol Chem* 276, 29702-29710.

6. Zusammenfassung

Cyclin A ist in *Drosophila* das einzige essentielle mitotische Cyclin. Die *Cyclin A* Mutation führt zu einem Arrest in der G2-Phase von Zellzyklus 16 und resultiert in embryonaler Letalität. Neben dieser mitotischen Funktion kann Cyclin A auch den G1-S Übergang induzieren. Cyclin A zeigt eine dynamische, zellzyklusabhängige Lokalisierung. In der Interphase ist es zytoplasmatisch und akkumuliert in der Prophase im Kern. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der subzelluläre Lokalisierung zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der LMB-sensitive Crm1-abhängige Kernexport zur zytoplasmatischen Lokalisierung von Cyclin A während der Interphase beiträgt. Die Lokalisierung von Cyclin A ist somit ein aktiver und regulierter Prozess. Deletionsstudien zeigten, dass diese Lokalisierung von der C-terminalen Hälfte in Cyclin A vermittelt wird.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase graduell verläuft und mit der voranschreitenden DNA-Kondensierung korreliert. Prophasespezifische Vorgänge im Kern könnten somit von der Menge an Cyclin A-assoziiierter Kinaseaktivität abhängen.

In funktionellen *in vivo* Analysen wurde jedoch gefunden, dass die Lokalisierung von Cyclin A weder für den Eintritt in die Mitose noch für die Induktion von ektopischen S-Phasen eine essentielle oder regulatorische Bedeutung hat. Dies konnte mit Cyclin A-Konstrukten, die durch heterologe Lokalisierungssignale verändert waren, gezeigt werden. Die Expression von zytoplasmatischem, membranverankertem oder nukleärem Cyclin A konnte die *Cyclin A* Mutation überwinden, Mitosen induzieren und Adulte entstehen lassen oder ektopische S-Phasen induzieren. Die essentielle Funktion von Cyclin A während des Zellzyklus hängt also nicht mit der Lokalisierung zusammen, sondern ist wahrscheinlich durch die Substratspezifität charakterisiert, die auch nicht durch Überexpression von Cyclin B übergangen werden kann. Als Substrate kommen sogenannte Vermittler-Kinasen in Frage, die nach Aktivierung von Cyclin A S-Phase- oder mitosespezifische Vorgänge im Kern katalysieren. Aufgrund der Abhängigkeit von Cyclin A, scheint die Aktivität der Vermittler-Kinasen im Verlauf der Mitose in *Drosophila* anscheinend nur durch Cyclin A aufrechterhalten werden zu können. In diesem Zusammenhang ist es möglich, dass die Kernakkumulierung von Cyclin A während der Prophase einen effizienteren und schnelleren Ablauf der Kernprozesse garantiert und dadurch einen Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Mitose hat.

7. Abstract

In *Drosophila* Cyclin A is the only essential mitotic Cyclin. The *Cyclin A* mutation results in a G2 arrest of cell cycle 16 and subsequently causes embryonic lethality. Apart from the mitotic function, Cyclin A is also able to trigger the transition from G1 to S phase. Cyclin A shows a dynamic subcellular localization that is cell cycle dependent. During interphase Cyclin A is cytoplasmic and accumulates in the nucleus at prophase. The goal of the work presented here was to analyze the significance of this subcellular localization.

The data showed that the LMB sensitive Crm1 dependent nuclear export contributes to the cytoplasmic localization of Cyclin A during interphase. This demonstrates that the localization of Cyclin A is an active and regulated process. Deletion analyses revealed that the C-terminus mediates the localization of Cyclin A.

The nuclear accumulation of Cyclin A at prophase was shown to be a gradual process that correlates with DNA condensation. This suggests that prophase specific processes could be depended on the amount of Cyclin A associated kinase activity.

Nevertheless, functional *in vivo* analyses revealed that the localization of Cyclin A has no essential or regulatory role for entry into mitosis or induction of ectopic S phases. This conclusion was drawn from the analysis of Cyclin A constructs containing heterologous localization signals. Expression of cytoplasmic, membrane-anchored or nuclear Cyclin A was able to overcome the *Cyclin A* mutation and to induce mitosis as well as ectopic S phases. Ubiquitous expression of such constructs in the *Cyclin A* mutant background even allowed the development of adults. Therefore, the function of Cyclin A during the cell cycle is not dependent on its localization but rather on substrate specificity that cannot be replaced by overexpressing Cyclin B. The information of cytoplasmic Cyclin A/Cdk1 activation could be delivered to the nucleus by mediator kinases that are substrates of Cyclin A/Cdk1. In this respect the nuclear accumulation of Cyclin A at prophase would not be a necessary event but could ensure a more efficient and rapid procedure of nuclear events and therefore would have a temporal influence on mitosis.

8. Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| A | Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Amoniumperoxidsulfat |
| ATP | Adenosintriophosphat |
| βGal | β-Galaktosidase |
| BrdU | Bromodeoxyuridin |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| c | centi- |
| cDNA | komplementäre DNA |
| Ci | Curie |
| Δ | Deletion |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Nukleotidmix |
| DTT | Dithiothreitol |
| E _x | Extinktion bei x nm |
| F | Farad |
| g | Gramm |
| IP | Immunpräzipitation |
| k | kilo- |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| m | milli- |
| max. | maximal |
| M | Mol |
| μ | mikro- |
| min | Minuten |
| mind. | mindestens |
| mm | millimeter |
| mol | molar |
| mRNA | Boten-RNA |
| N | Normal |
| NGS | (normal goat serum) normales Ziegen Serum |
| nm | Nanometer |
| OD | Optische Dichte |
| p | pico- |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| sec | Sekunden |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Std. | Stunden |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyldiamin |

| | |
|------|--------------------------------|
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| Vol. | Volumenanteile |
| x | -fach |
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Sprenger am Institut für Genetik der Universität zu Köln angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Sprenger für die Vergabe des Themas, für seine stets kritische Diskussionsbereitschaft und dass er jederzeit ansprechbar und hilfsbereit war. Er hat mir außerdem ermöglicht, an wissenschaftlichen Kongressen und Veranstaltungen aktiv teilnehmen zu können.

Frau Prof. Dr. Maria Leptin danke ich für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. Martin Hülskamp möchte ich dafür danken, dass er den Vorsitz bei der Disputation übernimmt.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Leptin und Klein für das angenehme Arbeitsklima auf unserer Etage.

Weiterhin möchte ich meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen in der Arbeitsgruppe Sprenger danken, Ruth Grosskortenhau, Edan Foley, Markus Kaspar und Norman Zielke. Die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und vor allem der Humor haben wesentlich dazu beigetragen, dass der Alltag im Labor nie grau werden konnte. Markus möchte ich zusätzlich dafür danken, dass er die Arbeit gelesen und korrigiert hat.

Stefan Geimer danke ich für Korrekturen und die entspannende Pausengestaltung.

Mein persönlicher Dank gilt Silke, für ihr Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung.

10. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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 Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Sprenger betreut worden.

Teilpublikationen:

Axel Dienemann und Frank Sprenger

The localization of Cyclin A in *Drosophila melanogaster* is dispensible for its function.

In Vorbereitung.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln, den 5.05.2003

Axel Dienemann

11. Lebenslauf

| | |
|-------------------------------|--|
| Name | Axel Dienemann |
| Geburtsdatum/-ort | 02.07.1971 in Bad-Ems |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | verheiratet |
| Schule und Zivildienst | |
| 1977-1981 | Katholische Grundschule in Refrath |
| 1981-1985 | Freie Waldorfschule Köln |
| 1985-1991 | Otto-Hahn Gymnasium Bensberg (Abitur) |
| 1991-1992 | Zivildienst beim Arbeiter-Samariter Bund |
| Studium | |
| 1992-1999 | Universität zu Köln, Diplomstudiengang Biologie, Schwerpunkte Genetik, Biochemie und Botanik |
| 10/1994 | Vordiplom |
| 10/1997 | Diplomprüfung |
| 11/1997-01/1999 | Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter Betreuung von Frau Prof. Maria Leptin mit dem Titel: „Untersuchungen zur Regulation und Funktion der subzellulären Lokalisierung von Cyclin A in <i>Drosophila melanogaster</i> “ |
| Promotion | |
| 02/1999-05/2003 | Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Sprenger mit dem Titel: „Die Bedeutung der subzellulären Lokalisierung von Cyclin A in <i>Drosophila melanogaster</i> “ |
| 07/2003 | Disputation |
| Berufliche Tätigkeit | |
| 03/1996-04/1996 | Studentische Hilfskraft am Institut für Botanik der Universität zu Köln |
| 06/1997 | Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik der Universität zu Köln |
| 11/1997-01/1999 | Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik der Universität zu Köln |
| 02/1999-heute | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Universität zu Köln |