

**Charakterisierung von Substraten
der Rezeptoren des
nukleocytoplasmatischen Transports
in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III -
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Iris Zengerly

Saarbrücken

2008

Tag des Promotionskolloquiums:

19.05.2008

Dekan:

Professor Dr. U. Müller

Vorsitzender:

Professor Dr. V. Flockerzi

Berichterstatter:

Professor Dr. R. Zimmermann

Professor Dr. J. Rettig

Akadem. Mitarbeiter:

Dr. G.-W. Kohring

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMPS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
d. h.	das heißt
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ETS	externer transkribierter Spacer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]- ethansulfonsäure
hnRNP	heterogener nukleärer Ribonukleopartikel

K _D	Dissoziationskonstante
IBB	Importin β-Bindungsdomäne
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ITS	interner transkribierter Spacer
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
MDa	Megadalton
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mRNP	mRNA-Proteinpartikel
NES	Kernexportsequenz
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Kernlokalisationsignal
NPC	Kernporenkomplex
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
Ponceau-S	3-Hydroxyl-4-[2-sulfo-4-phenylazo]-2,7-naphthalen-disulfonsäure
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RanBP	Ran bindendes Protein
RBD	Ran bindende Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
SRC-Motiv	Serin-Arginin-Cystein-Motiv
SV40	Simian Virus 40
TAP	Tandem-Affinitätsreinigung
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Units, relative Enzymeinheiten
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der nukleocytoplasmatische Transport	2
1.1.1. Der Kernporenkomplex	2
1.1.2. Die Importin β -homologen Transportrezeptoren	3
1.1.3. Der Ran-GTP-Gradient	5
1.1.4. Import und Export	6
1.2. Sub2	14
1.3. Dbp2	16
1.4. Imp4	17
1.5. Taf4	19
1.6. Rfc2	20
2. Material und Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Geräte	23
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	24
2.2. Chemikalien	25
2.2.1. Enzyme	26
2.2.2. Antikörper	27
2.2.3. Oligonukleotide	27
2.2.4. Plasmide	31
2.3. Organismen	33
2.3.1. Bakterienstämme	33
2.3.2. Hefestämme	33
2.4. Nährmedien	36
2.4.1. Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien	36
2.4.2. Nährmedium zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	37
2.5. Molekularbiologische Methoden	39
2.5.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
2.5.2. Isolierung von DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	40
2.5.3. Polymerasekettenreaktion	41
2.5.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
2.5.5. Agarose-Gelelektrophorese	43
2.5.6. Ligation	44
2.5.7. Transformation von <i>E. coli</i>	45
2.5.8. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	46
2.6. Hefegenetische Methoden	47
2.6.1. Bestimmung des "mating type" von Hefestämmen	47
2.7. Mikroskopische Untersuchungen	47
2.7.1. <i>In vivo</i> -Mikroskopie	47
2.7.2. Indirekte Immunfluoreszenz	48
2.8. Biochemische Methoden	49
2.8.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.8.2. Färbung von Gelen	51
2.8.3. Präparation von Proteinproben zur massenspektrometrischen Analyse	54
2.8.4. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen mit anschließender Immundetektion (Western Blot)	54

Inhaltsverzeichnis

2.8.5.	Quantifizierung von Proteinen	55
2.8.6.	Synthese von Proteinen	56
2.8.7.	Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i> -Lysat	58
2.8.8.	Umpuffern, Entsalzung und Aufkonzentrieren	62
2.8.9.	Herstellung polyklonaler Antikörper	63
2.8.10.	Herstellung von Lysat aus Hefezellen.....	65
2.9.	<i>In vitro</i> -Bindungsstudien (Protein-Protein-Interaktionen).....	70
2.9.1.	Bindungs- und Funktionalitätstests mit isolierten rekombinanten Proteinen... 70	
2.9.2.	Bindungs- und Ablösungsversuche mit rekombinanten	
	GST-Fusionsproteinen und Importinen.....	71
2.9.3.	”GST-Pulldown-Assays” mit Hefelysat.....	72
2.9.4.	Test auf Bindefähigkeit von S-TEV-ZZ-Fusionsproteinen an ihre Matrices... 74	
2.9.5.	Tandemaffinitätsreinigung mit Hefelysat.....	74
2.9.6.	Co-Reinigung endogener Hefeproteine mittels ”TAP-Tag“ aus	
	Hefe-Cytosol und der unlöslichen Fraktion	79
3.	Ergebnisse	81
3.1.	Präparation von Cytosol und Kernlysat aus <i>S. cerevisiae</i>	82
3.2.	<i>In vitro</i> -Interaktionen von Yrb1 und Cse1 mit Hefeproteinen.....	86
3.2.1.	Pulldown-Assays von rekombinantem GST-Yrb1 und -Cse1 mit	
	Hefe-Cytosol und -Kernlysat	86
3.2.2.	Tandem-Affinitätsreinigung von Yrb1-S-TEV-Z und Cse1-S-TEV-ZZ	
	aus Hefe-Cytosol und -Kernlysat	95
3.3.	Interaktionen von Importinen mit Hefeproteinen.....	113
3.3.1.	Interaktionen von endogenem Kap114- und Kap120-S-TEV-ZZ	
	mit Hefeproteinen.....	113
3.3.2.	Die Interaktion verschiedener Importine mit Hefeproteinen	129
4.	Diskussion	149
4.1.	Beurteilung der Qualität der Präparation der cytosolischen, unlöslichen und	
	der Kernlysatfraktion.....	149
4.2.	Vergleich der experimentellen Methodik: ”GST-Pulldown-Assay“,	
	TAP-Bindungsversuche und Co-Reinigungsstudien mittels ”TAP-Tag“	152
4.3.	<i>In vitro</i> gefundene Interaktionspartner von Yrb1	156
4.3.1.	Potenzielle Transportrezeptoren für Yrb1	156
4.3.2.	Bekannte Komplexe mit Yrb1.....	158
4.3.3.	Yrb1 interagiert <i>in vitro</i> mit Nbp35, Ded1 und verschiedenen	
	ribosomalen Proteinen.....	158
4.3.4.	Andere <i>in vitro</i> gefundene Bindungspartner von Yrb1	160
4.4.	<i>In vitro</i> gefundene Interaktionspartner von Cse1	161
4.4.1.	Der Srp1/Cse1/Gsp1-Exportkomplex	161
4.4.2.	Potenzielle Interaktionspartner von Cse1.....	161
4.5.	<i>In vitro</i> gefundene Interaktionspartner von Kap114 und Kap120.....	162
4.6.	Potenzielle Importrezeptoren von Dbp2, Sub2, Imp4, Taf4 und Rfc2	167
4.7.	Rfc2 wird über den klassischen NLS-Importweg in den Zellkern transportiert	173
4.7.1.	Rfc2 interagiert <i>in vitro</i> direkt mit den Transportfaktoren des	
	klassischen Importweges und wird durch Bindung von Gsp1-GTP an	
	Kap95 wieder von diesem Komplex abgelöst.....	173

Inhaltsverzeichnis

4.7.2.	Mutationen des <i>SRP1</i> - und des <i>KAP95</i> -Gens führen zu Defekten beim nukleären Import von Rfc2	175
4.7.3.	Rfc2 besitzt am N-Terminus eine klassische Kernlokalisierungssequenz	176
4.7.4.	Nup2 ist am klassischen NLS-Transport von Rfc2 in den Nukleus beteiligt.	177
4.8.	Die Rolle von Rfc2/RFC2, Srp1/Importin α und Cse1/CAS bei der Mitose und der Pathogenese.....	178
5.	Zusammenfassung/ Summary	182
6.	Literaturverzeichnis.....	184

1. Einleitung

In eukaryotischen Zellen erlaubt die Einlagerung der genetischen Information in den Zellkern eine räumliche und zeitliche Trennung der DNA-Replikation und -Transkription von der cytoplasmatischen Proteinsynthese. Diese Kompartimentierung lässt aber nicht nur eine Regulation dieser Prozesse zu, sondern macht gleichzeitig auch ein System eines selektiven makromolekularen Transports zwischen Nukleus und Cytoplasma notwendig. Jede Zelle muss zu schnellem und gerichtetem Transport tausender Proteine und RNAs in den und aus dem Zellkern fähig sein. Dies wird durch lösliche Rezeptoren bewerkstelligt, die mit Komponenten der Kernporenkomplexe interagieren, um ihre spezifischen Substrate zu transferieren. Es werden aber nicht nur die eigenen Substanzen des Organismus transportiert, sondern auch exogene, beispielsweise Viruspartikel. Einige Negativstrang-RNA-Viren replizieren ihre RNA im Zellkern der Wirtszelle und nutzen so die nukleäre Maschinerie des Wirts. Die genomischen RNAs dieser Viren assoziieren mit zellulären Proteinen und bilden große Komplexe, die sog. viralen Ribonukleoproteine. Letztere enthalten nukleäre Import- und Exportsignale, welche für die Translokation in den und aus dem Zellkern verantwortlich sind (Cros und Palese, 2003). Retroviren synthetisieren nach ihrem Eintritt in die Wirtszelle im Cytoplasma eine DNA-Kopie ihres Genoms, die es ins Genom des Wirts zu integrieren gilt. Auch in diesem Fall formen sich große Nukleoproteinkomplexe, die über den Kernporenkomplex in den Nukleus geschleust werden müssen (Suzuki und Craigie, 2007). Der Eingriff in den nukleocytoplasmatischen Transport der Viruspartikel stellt einen viel versprechenden Ansatz zur Entwicklung antiviraler Therapeutika dar (Cros und Palese, 2003). Während in letzterem Fall die Hemmung des Imports das Ziel ist, müssen umgekehrt potenzielle Arzneistoffe in der Gentherapie so konstruiert werden, dass sie in der Lage sind, die Barriere der Kernhülle zu überwinden (Vaughan *et al.*, 2006). Auch bei der Pathogenese und der Therapie einiger Krebsarten spielt der nukleocytoplasmatische Transport eine Rolle. Bestimmte Rezeptoren sind für den Transport von verschiedenen proliferationsaktivierenden Proteinen, Transkriptionsfaktoren, Onkogen- und Tumorsuppressor-Gen-Produkten verantwortlich (Behrens *et al.*, 2003), welche an der Tumorgenese beteiligt sind. Man kann also sagen, dass der nukleocytoplasmatische Transport einen zentralen Dreh- und Angelpunkt bei der Aufrecht- und Gesunderhaltung des Organismus sowie bei der Therapie vieler viraler und erblich bedingter Krankheiten bzw. gewisser Krebsarten darstellt. Zur Untersuchung nukleocytoplasmatischer Transportvorgängen wurde in dieser Arbeit die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus verwendet.

1.1. Der nukleocytoplasmatische Transport

1.1.1. Der Kernporenkomplex

Transport von Proteinen und RNAs in den und aus dem Zellkern geschieht durch den Kernporenkomplex (NPC), eine große makromolekulare Struktur, die in die Doppelmembran der Kernhülle eingebettet ist. In *S. cerevisiae* hat er eine Größe von 50 MDa (Rout *et al.*, 2000) und pro Zelle gibt es ca. 100-200 (Allen *et al.*, 2000). In Abb. 1 ist der schematische Aufbau des NPC dargestellt. Er besitzt eine achtfache Symmetrie und setzt sich aus einem zentralen Doppelring, ins Cytoplasma ragenden Filamenten und einer Korbstruktur in Richtung des Nukleoplasmas zusammen.

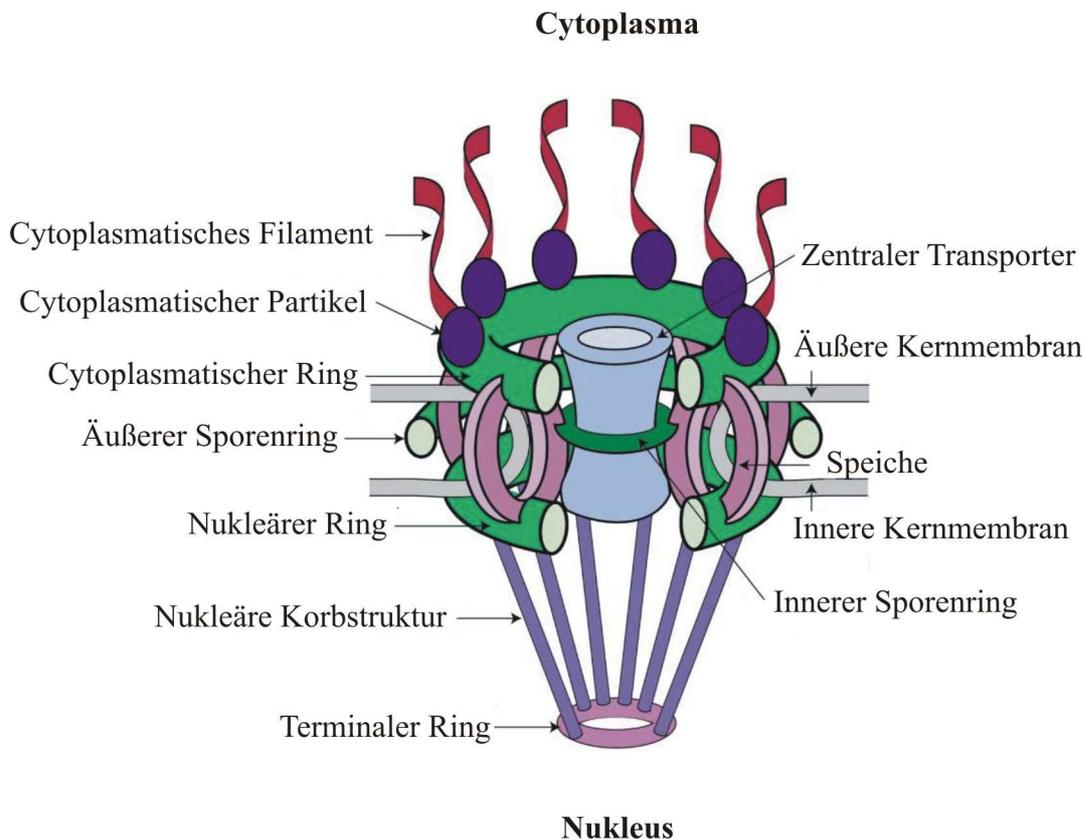


Abb. 1: Der schematische Aufbau des Kernporenkomplexes (Suntharalingam und Wentz, 2003)

Der NPC ist für freie Diffusion von Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht (bis ca. 20-40 kDa) offen (Bonner, 1978), so dass Nukleus und Cytoplasma in ständigem ionischen Kontakt stehen. Im Gegensatz dazu diffundieren Proteine und RNA im Allgemeinen nicht durch den NPC. Makromoleküle translozieren mit Hilfe spezifischer Transportrezeptoren (Mattaj und Englmeier, 1998). Diese so genannten Karyopherine binden transient an Nukleoporine, die Bausteine des NPC, während sie den NPC passieren. Für den Transport

existieren verschiedene Modelle. Das "Brownian affinity gate"-Modell besagt, dass der Transportrezeptor/Substrat-Komplex anfänglich an die cytoplasmatischen Filamente des NPC bindet. Die an den cytoplasmatischen und nukleären Verlängerungen in großer Zahl vorhandenen FG-Motive dienen als Bindungsstellen. Dabei handelt es sich um Phenylalanin-Glycin-reiche Motive, die oft als GLFG- oder FXFG-"Repeats" vorkommen (Rout *et al.*, 2000). Die Interaktion der Transportkomplexe mit den Nukleoporinen in der Nähe des zentralen Kanals des NPC erhöht die Wahrscheinlichkeit des Eintritts in das Innere des NPC. Der Transfer würde über die Brownsche Bewegung erfolgen. Das "Selective phase"-Modell sagt die Existenz eines Maschenwerks von Nukleoporinen vorher, die über ihre FG-Motive miteinander interagieren. Dieses Maschenwerk ist innerhalb des NPC zentral positioniert und stellt für inertes Substrat eine permeable Barriere dar. Die Interaktionen zwischen den Nukleoporinen in den Maschen können durch Transportrezeptoren transient aufgebrochen werden, indem die Rezeptoren an der Gitterstruktur teilnehmen und in die hydrophoben Interaktionen der FG-Motive einbezogen werden. Laut dem "Oily spaghetti"-Modell besitzt der NPC einen offenen zentralen Kanal. Flexible FG-Motiv-enhaltende Nukleoporine bedecken die Wand dieses Kanals und stellen Bindungsstellen für die Passage der Transportrezeptoren zur Verfügung. Die Rezeptoren sind in der Lage, die lockeren Nukleoporin-Ketten während ihres Durchtritts zur Seite zu schieben. Transiente Assoziationen mit den FG-Motiven und Zufallsbewegungen würden zur Translokation führen (zusammengefasst in (Fried und Kutay, 2003)).

Die Proteomanalyse des Hefe-NPC hat ergeben, dass er sich aus ungefähr 30 Proteinen zusammensetzt (Pemberton und Paschal, 2005). Es gibt verschiedene Klassen von Nukleoporinen: Transmembranproteine, die den NPC in der Kernmembran verankern, FG-enhaltende Nukleoporine und eine neu entdeckte Klasse von Nukleoporinen, die "WD-Repeats" bzw. das Siebenflügel-Propellermotiv enthalten (Pemberton und Paschal, 2005). Von den FG-Nukleoporinen vermutet man, dass sie ungefähr die Hälfte der Masse des NPC ausmachen. Die meisten von ihnen sind symmetrisch verteilt, einige beschränken sich jedoch auf die cytoplasmatische oder die nukleäre Seite des NPC (Pemberton und Paschal, 2005).

1.1.2. Die Importin β -homologen Transportrezeptoren

Der Import und der Export der meisten Proteine, ribosomaler Untereinheiten und einiger RNAs wird durch eine große evolutionär konservierte Familie von Transportfaktoren, die

Importin β -Familie (Tabelle 1), vermittelt. Während humane Zellen mindestens 20 Mitglieder enthalten, umfasst diese Familie in Hefe 14 Mitglieder (Pemberton und Paschal, 2005).

Tabelle 1: Die Importin β -homologen Transportrezeptoren in *S. cerevisiae* (Pemberton und Paschal, 2005)

Transport- richtung	Protein	Synonym	Substrat	Größe [kDa]	essenziell
Import	Kap95	Rsl1, Imp β	Viele Cargos, inklusive derer mit basischer NLS zusammen mit Srp1	94,8	ja
	Kap104	-	Nab2, Hrp1	103,7	ts
	Kap108	Sxm1	Lhp1, ribosomale Proteine	108,4	nein
	Kap111	Mtr10	Npl3, Hrb1	110,7	ts
	Kap114	Yrb9	TBP, Histone, Nap1, Sua7	113,9	nein
	Kap119	Nmd5	TFIIS, Hog1, andere	120,0	nein
	Kap120	Yrb11, Lph2	Rpf1	119,6	nein
	Kap121	Pse1	Ribosomale Proteine, Histone, Pho4, andere	121,0	ja
	Kap122	Pdr6	TFIIA	123,5	nein
	Kap123	Yrb4	Ribosomale Proteine, Histone	122,6	nein
Import/Export	Kap142	Msn5	Pho4, andere, inklusive phosphorylierte Proteine (Export), Replikation Protein A-Komplex (Import)	142,1	nein
Export	Kap109	Cse1	Srp1	109,4	ja
	Kap124	Xpo1 , Crm1	Leucin-reiche NES-Cargos	124,1	ja
	Kap127	Los1	tRNA	126,8	nein

ts = temperatursensitive Mutante

Die meisten Karyopherine vermitteln entweder nukleären Import (Importine) oder nukleären Export (Exportine) und alle interagieren direkt mit ihren Cargos (Pemberton und Paschal, 2005), auch wenn Kap95 zusätzlich Srp1 als Adapter-Protein benutzt (Enekel *et al.*, 1995). Da es viel mehr Substrate als Transportrezeptoren gibt, vermutet man, dass jedes Karyopherin mehrere Substrate transportiert. Dies soll über multiple Bindungsstellen geschehen und die einzelnen Karyopherine sollen in der Lage sein, abhängig vom Substrat verschiedene Konformationen einzunehmen (Pemberton und Paschal, 2005). Die Importin β -Homologen besitzen vergleichbare Molekulargewichte (95-142 kDa), saure isoelektrische Punkte (4-6) und eine ähnliche Domänenstruktur (Fried und Kutay, 2003; Mosammaparast und Pemberton, 2004; Weis, 2003). Diese umfasst eine N-terminale Ran-bindende Domäne, eine zentrale

Nukleoporin-bindende Domäne und eine C-terminale Substrat-bindende Domäne. Die atomaren Strukturdaten eines Teils der Karyopherine weisen darauf hin, dass sich jedes typischerweise aus 20 HEAT-Motiven zusammensetzt. Dabei handelt es sich um Motive von ca. 40 Aminosäuren, die zwei antiparallele Helices bilden, die durch eine kurze Schleife miteinander verbunden sind. Das HEAT-Motiv ist nach dem Motiv in den Proteinen benannt, in denen es zum ersten Mal entdeckt worden ist. Es handelt sich dabei um “Huntington, elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1“ (Andrade und Bork, 1995). Die HEAT-Motive bilden eine Superhelix mit ausgedehnten Interaktionsoberflächen in Form eines N-terminalen und eines C-terminalen Bogens (Pemberton und Paschal, 2005).

Ein weiteres Charakteristikum der Importin β -Homologen ist ihre Affinität zu Ran-GTP. Diese Affinitäten sind unterschiedlich ausgeprägt: während die Importrezeptoren stark an Ran-GTP binden, besitzen Exportkomplexe in Abwesenheit ihres Substrats nur geringe Affinität zu Ran-GTP. Darüber wird die Assoziation bzw. Dissoziation der Substrate und damit die Direktionalität des Transports festgelegt (vgl. 1.1.3) (Fornerod *et al.*, 1997; Jäkel und Görlich, 1998; Schlenstedt *et al.*, 1997; Solsbacher *et al.*, 1998).

1.1.3. Der Ran-GTP-Gradient

Die kleine Ras-ähnliche GTPase Ran, eines der am höchsten konservierten Proteine in Eukaryoten, ist in allen untersuchten Organismen für die Lebensfähigkeit der Zelle essenziell (Künzler und Hurt, 2001; Macara, 2001). Sowohl Ran aus Säuger als auch das Hefehomolog Gsp1 spielen eine direkte Rolle beim nukleären Transport, indem sie die Assemblierung und Disassemblierung von Transportkomplexen kontrollieren. Die Ran/Gsp1-Aktivität wird durch Interaktionen mit evolutionär konservierten Proteinen reguliert, indem sie dabei helfen, seine subzelluläre Lokalisierung durch wechselseitige Umwandlung in den GTP- bzw. GDP-gebundenen Zustand festzulegen (Görlich und Kutay, 1999). Die Bildung von Ran-GTP aus Ran-GDP erfordert Nukleotid-Austausch und wird durch den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor RanGEF/Prp20 vermittelt (Pemberton und Paschal, 2005). Wahrscheinlich geschieht das, während RanGEF/Prp20 an Chromatin gebunden ist und man vermutet, dass Ran mit GTP beladen sein muss, damit beide Proteine wieder freigesetzt werden (Nemergut *et al.*, 2001). Es wird gemutmaßt, dass diese hohe lokale Ran-Konzentration am Chromatin wichtig ist für die Mikrotubulus-Assemblierung, die sich in der Nähe abspielt (Kalab *et al.*, 2002).

Da Ran/Gsp1 ständig in Exportkomplexen ins Cytoplasma co-transportiert wird, ist ein gezielter Import des Proteins erforderlich. Ran/Gsp1-Import in den Nukleus wird durch NTF2/Ntf2 vermittelt. Dieses homodimere Protein interagiert nur mit der GDP-gebundenen Form von Ran/Gsp1, welches in der Hauptsache im Cytoplasma zu finden ist. Wie die Karyopherine interagiert Ntf2 direkt mit den Nukleoporinen (Bayliss *et al.*, 2002). Der Gsp1-Transport wird dadurch unidirektional, indem Gsp1-GDP auf der nukleoplasmatischen Seite zu Gsp1-GTP umgewandelt wird (Stewart *et al.*, 1998). Anschließend kehrt Ntf2 wieder ins Cytoplasma zurück.

Im Cytoplasma wirkt RanGAP/Rna1 auf die Ran-/Gsp1-GTP-Karyopherin-Exportkomplexe ein. Dabei handelt es sich um ein Protein, das die sonst schwache GTPase-Aktivität von Ran/Gsp1 *in vitro* um den Faktor 10^5 stimuliert (Bischoff *et al.*, 1994; Corbett *et al.*, 1995). Da Ran-/Gsp1-GTP in diesem Exportkomplex für RanGAP/Rna1 nicht zugänglich ist, ist die Mitwirkung von RanBP1/Yrb1 erforderlich (vgl. 1.1.4) (Görlich und Kutay, 1999).

Die Lokalisierung von RanGEF/Prp20 im Nukleus und RanGAP/Rna1 im Cytoplasma erklärt, wie ein solch steiler Ran-GTP-Gradient zwischen den beiden Kompartimenten entsteht (Izaurralde *et al.*, 1997). Unterstützung erhielt dieses Modell durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Untersuchungen an Interphase-Zellkernen aus *Xenopus*-Eiern. Messungen der auf FRET basierenden Analysen ergaben einen Ran-GTP-Konzentrationsunterschied von mehr als Faktor 100 zwischen Nukleus und Cytoplasma (Kalab *et al.*, 2002). Der Nukleotid-gebundene Zustand von Ran bedingt die Direktionalität des Transports (Görlich und Kutay, 1999; Görlich *et al.*, 1996b; Izaurralde *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1998).

1.1.4. Import und Export

NLS und NES

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Proteine, die in den Nukleus importiert werden, in der Regel ein Kernlokalisierungssignal (NLS) enthalten (Fried und Kutay, 2003; Weis, 2003). Durch die Charakterisierung der NLS des SV40 T-Antigens ($^{126}\text{PKKKRKV}^{132}$) und von Nukleoplasmin ($^{150}\text{KRPAATKKAGQAKKKLD}^{173}$) wurde zum ersten Mal die Struktur der basischen bzw. klassischen NLS aufgeklärt, welche aus einem (monopartit) oder zwei (bipartit) "Clustern" basischer Aminosäureresten (K oder R) besteht, die durch einen "Linker" (ungefähr 10 Aminosäureresten) voneinander getrennt sind (Görlich und Kutay, 1999; Lange *et al.*, 2006). Der Import vieler nukleärer Proteine wird durch die klassische NLS vermittelt.

Daneben existieren aber auch andere Importsignale, deren Charakterisierung sich größtenteils erst am Anfang befindet. Die NLS-Aktivität wird über verschiedene Mechanismen wie Modifizierung oder Signalmaskierung reguliert (Kaffman und O'Shea, 1999).

Exportine erkennen spezifische Signale, die Kernexportsignale (NES) (Fried und Kutay, 2003; Weis, 2003). Die NES mehrerer Substrate wurden bestimmt und die am besten charakterisierte ist die hydrophobe NES, welche drei oder vier hydrophobe Reste enthält (Fischer *et al.*, 1995). Sie kommt bei allen Eukaryoten vor und wird in Hefe durch das Karyopherin Xpo1 erkannt (Formerod *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu enthalten Substrate des Karyopherins Msn5 keine solche hydrophoben NES (Mosammaparast und Pemberton, 2004). Bei den meisten Msn5-Exportsubstraten wurde gezeigt, dass Phosphorylierung ihre Erkennung positiv reguliert, was vermuten lässt, dass entweder die Phosphorylierungsstelle ein Teil der NES ist oder dass die Phosphorylierung indirekt die NES-Erkennung durch den Rezeptor beeinflusst (Kaffman und O'Shea, 1999; Mosammaparast und Pemberton, 2004).

Der Import

Karyopherine, die Import vermitteln, binden ihr Substrat im Cytoplasma über eine Erkennungssequenz, das Kernlokalisierungssignal (NLS). Mit einer Ausnahme interagieren die Importrezeptoren direkt mit ihrem Substrat. Der Karyopherin-Substrat-Komplex transloziert durch den NPC, indem er mit NPC-Proteinen, den Nukleoporinen, interagiert. Einmal im Kern interagiert das Importin β -Homologe mit Ran-GTP und der sich ergebende Karyopherin-Ran-GTP-Komplex führt zur Dissoziation des Substrats vom Importrezeptor (Abb. 2), wohingegen das Karyopherin ins Cytoplasma zurück transportiert wird (Pemberton und Paschal, 2005).

Der Export

Importin β -Homologe, die Export vermitteln, binden ihr Substrat im Nukleus ebenfalls über eine Erkennungssequenz, das Kernexportsignal (NES). Karyopherin-Bindung an ein Exportsubstrat geht mit Ran-GTP-Bindung einher, was zur Bildung eines ternären Karyopherin-Substrat-Ran-GTP-Komplex im Nukleus führt (Pemberton und Paschal, 2005). Dort steht Ran-GTP reichlich zur Verfügung. Es folgt die Freisetzung ins Cytoplasma, wo Rna1 und Yrb1 den Exportkomplex disassemblieren. Yrb1 macht Ran für Rna1 zugänglich und Rna1 stimuliert die niedrige GTPase-aktivität von Ran. Abhängig vom Transportrezeptor

entsteht dabei ein transientes Disassemblierungsintermediat aus Yrb1/Ran-GTP/Karyopherin oder Yrb1 bewirkt direkt die Freisetzung von Ran-GTP vom Rezeptor (Maurer *et al.*, 2001; Solsbacher *et al.*, 1998). In jedem Fall wird Ran-GTP zu Ran-GDP hydrolysiert (Abb. 2).

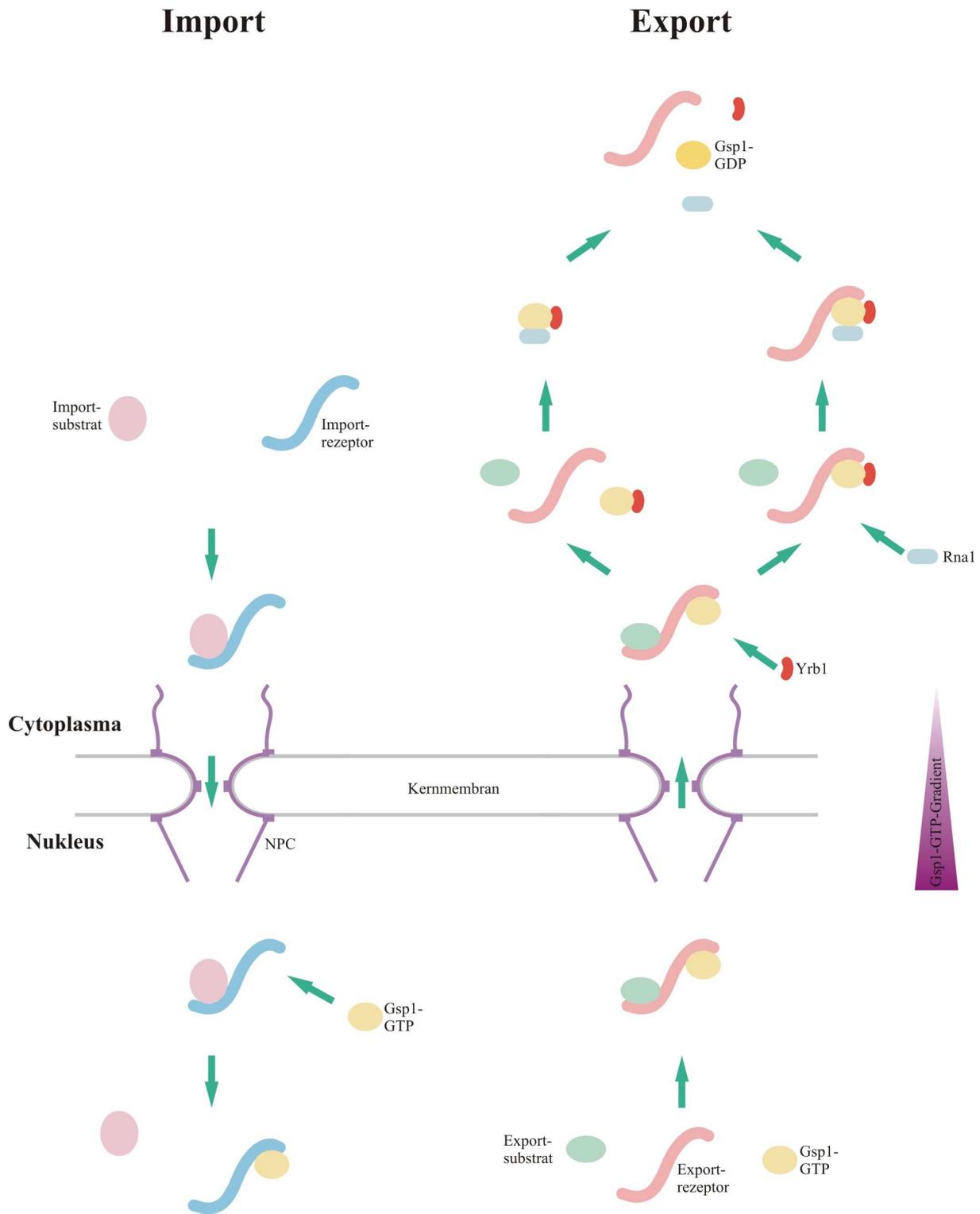


Abb. 2: Schematische Darstellung des nukleären Imports und Exports von Proteinen

Der Importrezeptor Kap114

Für das Importin β -Homolog Kap114 wurde gezeigt, dass es das TATA-bindende Protein TBP in den Zellkern und somit an seinen Wirkungsort bei der Transkription schleust (Morehouse *et al.*, 1999; Pemberton *et al.*, 1999). Die Transkription von Genen durch die RNA-Polymerase II (RNAP II) schließt viele Schritte ein und einer der frühesten ist die Rekrutierung allgemeiner Transkriptionsfaktoren (TF) und von RNAP II zwecks Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) (siehe auch 1.5). TBP, Bestandteil des TFIID, bindet an die TATA-Box vieler Promotoren und leitet die Bildung des PIC in die Wege. Nach der TBP-DNA-Bindung interagiert eine zweite PIC-Komponente, TFIIB, mit TBP sowie der DNA und stabilisiert deren Assoziation. Die übrigen Bestandteile des PIC, also TFIIF, TFIIE, TFIIH und die RNAP II, werden auf dieser Plattform zusammengesetzt, so dass die RNA-Polymerase mit den zu transkribierenden Genen in Kontakt treten kann (Hahn, 2004; Hampsey, 1998). TFIIB spielt durch Interaktion mit der DNA, TBP, TFIIF und RNAP II eine zentrale Rolle bei der PIC-Bildung. Zusätzlich soll TFIIB eine Funktion bei der Auswahl des Startpunktes ausüben (Hahn, 2004; Hampsey, 1998). Man glaubt, dass TFIIB nicht nach jeder Transkriptionsrunde am Promotor gebunden bleibt, wodurch der Import von TFIIB für die Transkription relevant sein könnte. Es wurde gezeigt, dass Sua7, das Hefehomolog von TFIIB, durch Kap114 in den Kern transportiert wird, möglicherweise durch Interaktion mit TBP, auch wenn Sua7 in der Lage ist, direkt an Kap114 zu binden (Hodges *et al.*, 2005).

Chromatin-Assemblierung ist ein komplexer Prozess, der zahlreiche zelluläre Vorgänge betrifft, wie Transkription, Zellzyklus-Progression und DNA-Replikation bzw. -Reparatur. Die zahlreichen Faktoren, die an der Chromatin-Assemblierung beteiligt sind, werden in zwei Klassen eingeteilt: Histon-Transferproteine bzw. Chaperone und ATP-abhängige Motorkomplexe. Diese beiden Klassen von Faktoren scheinen für die initiale Anlagerung der Histone an die DNA und für die Bildung regulär angeordneter Nukleosomen wichtig zu sein (Haushalter und Kadonaga, 2003; Tyler, 2002). Es wurde gezeigt, dass das Histon-Chaperon Nap1 in einem Komplex mit Kap114, Hta und Htb in den Kern eintritt und als Cofaktor beim Kap114-vermittelten Histonimport fungiert. Nap1 lenkt Hta und Htb spezifisch zu Kap114 und macht den Komplex unempfindlich gegen Gsp1-GTP, so dass er im Nukleus assoziiert bleibt (Mosammaparast *et al.*, 2002). Vielmehr hemmt Kap114 sogar die Nap1-vermittelte Anlagerung von Hta und Htb an das Chromatin. Mindestens zwei der drei Histon-Bindungsstellen in Kap114 sollen an der Fähigkeit zur Hemmung der Chromatin-Assemblierung beteiligt sein (Mosammaparast *et al.*, 2005). Kap114 ist in der Lage, sowohl Hta bzw. Htb und Nap1 direkt in einer nicht-kompetitiven Weise zu binden, als auch mit den

beiden Histonen über Nap1 als Brücke indirekt zu interagieren. Umgekehrt kann Kap114 auch indirekt über die Histonbindung von Nap1 rekrutiert werden (Mosammaparast *et al.*, 2001b).

Der Importrezeptor Kap120

Das Gsp1-bindende Protein Kap120, das mit seinem Säuger-Homolog Importin 11 24 % Sequenzhomologie teilt, ist außer im Cytoplasma hauptsächlich an der Kernhülle und im Nukleoplasma zu finden (Caesar *et al.*, 2006), der typischen Lokalisierung der Importin β -Homologen. Kap120 wurde als Importrezeptor von Rpf1 identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein nukleoläres Protein, das an der 25S rRNA-Prozessierung und am Export der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt ist (Caesar *et al.*, 2006). Bereits zuvor wurde beobachtet, dass in Zellen, in denen *KAP120* deletiert worden war, der Export der großen ribosomalen Untereinheit gestört war (Stage-Zimmermann *et al.*, 2000). Obwohl die genauen Exportmechanismen noch nicht genau geklärt wurden, weiß man, dass 70 zusätzliche Faktoren dafür erforderlich sind (Lei und Silver, 2002b; Oeffinger *et al.*, 2004; Stage-Zimmermann *et al.*, 2000). Die Biogenese der aus 76 Proteinen und 4 rRNAs bestehenden ribosomalen Untereinheiten benötigt snoRNAs (siehe auch 1.4), prozessierende Enzyme und RNA-Helikasen (siehe auch 1.3). Der 35S-Vorläufer wird dabei in die 18S rRNA der kleinen Untereinheit und die 25S bzw. 5,8S rRNA der großen Untereinheit gespalten (Kressler *et al.*, 1999; Venema und Tollervey, 1999). Das in diesen Prozess involvierte Rpf1 bindet direkt an Kap120 und wird durch Gsp1-GTP aus diesem Importkomplex wieder freigesetzt. Es wurde gezeigt, dass *in vivo* mindestens drei verschiedene Importine am nukleären Import von Rpf1 beteiligt sind: Kap120, Kap114 und Nmd5. Der Exportdefekt der großen ribosomalen Untereinheit in $\Delta kap120$ -Zellen wurde bei *RPF1*-Überexpression zum größten Teil umgekehrt. Kap120 ist also kein direkter ribosomaler Exportfaktor (Caesar *et al.*, 2006).

Die Importfaktoren Importin α / Importin β und der Exportrezeptor Cse1

Das Srp1/Kap95-Heterodimer bzw. Importin α /Importin β im Säuger lenkt viele Proteine zum NPC und vermittelt ihre Translokation über die Kernhülle. Srp1/Importin α bindet als Adapterprotein klassische NLS-enthaltende Proteine und verbindet sie mit Kap95/Importin β , welches den Import des NLS-Proteins vermittelt (Eenkel *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1995). Importin α besitzt am N-Terminus eine Importin β -bindende Domäne (IBB) (Cingolani *et al.*,

1999) und bildet nachfolgend eine Superhelix, die sich aus 10 Armadillo (ARM)-Motiven zusammensetzt (Conti *et al.*, 1998) (benannt nach dem *Drosophila* Armadillo-Protein, wo sie als erstes entdeckt wurden (Peifer *et al.*, 1994)). Jedes ARM-Motiv besteht aus ungefähr 40 Aminosäureresten, die in drei Helices angeordnet sind. Eine Reihe von ARM-Motiven erzeugt eine superhelikale Struktur, die eine flache, konkave Furche besitzt, wodurch eine NLS-Bindungstasche gebildet wird. Srp1/Importin α besitzt zwei NLS-Bindungsstellen: eine große N-terminale zwischen ARM 2 und 4 sowie eine kleine zwischen ARM 7 und 8 (Conti *et al.*, 1998). Interaktionen, die sowohl auf Ladung als auch auf Hydrophobizität basieren, führen im Allgemeinen zur Erkennung der NLS (Conti und Kuriyan, 2000). Die flexible IBB interagiert entweder *in trans* mit Importin β oder *in cis* mit der cNLS-Bindungstasche. Wenn Importin α nicht an Importin β gebunden ist, interagiert die autoinhibitorische Sequenz innerhalb der N-terminalen Domäne der IBB, welche eine cNLS imitiert, mit der NLS-Bindungstasche (Kobe, 1999). Es wurde gezeigt, dass die IBB-Domäne einen extensiven Kontakt mit der konkaven Oberfläche der HEAT-Motive 7-19 in Importin β herstellt, indem sie ihren L-förmigen Arm in die superhelikale Achse des Importrezeptors streckt (Cingolani *et al.*, 1999). Die positiv geladene IBB-Domäne interagiert mit vielen sauren Resten der inneren Helices von Importin β sowie mit einer sauren Schleife, die zwischen den beiden Helices von HEAT 8 herausragt. Importin β schleust den ternären Komplex über den NPC in den Nukleus, indem es an aufeinanderfolgende Schlüssel-Nukleoporine bindet, die FG-Motive enthalten (Iovine und Went, 1997; Suntharalingam und Went, 2003). Die Ran-GTP-Bindung an Importin β löst die Dissoziation des Substrat/Importin α/β -Komplexes aus (Floer *et al.*, 1997; Gilchrist *et al.*, 2002). Die Rolle der autoinhibitorischen IBB-Domäne soll dabei die effiziente Freisetzung des cNLS-Substrats sicherstellen (Gilchrist *et al.*, 2002; Gilchrist und Rexach, 2003; Harreman, 2003). Auch Cse1/CAS, welches bevorzugt an substratfreies Importin α bindet, und Nup2 sind an der Disassemblierung des Importkomplexes beteiligt. Eine Sequenz innerhalb der N-terminalen Domäne von Nup2 stellt zur inneren konkaven Furche von Importin α einen Kontakt her und beschleunigt die Freisetzung des NLS-Substrats von Importin α (Hahn-Quintes, 2004; Matsuura *et al.*, 2003).

Der Export von Importin β geschieht im Komplex mit Ran-GTP (Görlich *et al.*, 1996a; Iovine und Went, 1997; Weis *et al.*, 1996). Im Cytoplasma dissoziiert der Komplex wieder und das gebundene GTP wird hydrolysiert. *In vitro* wird dies mit Hilfe von Importin α und RanBP1 erreicht (Bischoff und Görlich, 1997; Floer *et al.*, 1997).

Das essenzielle Cse1 bildet eine Superhelix mit einem N-terminalen und einem C-terminalen Bogen, welche Gsp1-GTP umklammern. Gleichzeitig stellt es über das ARM-Motiv 10 einen

extensiven Kontakt mit Srp1 her und fixiert es in einer Konformation, dass es nicht mit einem Substrat interagieren kann (Solsbacher *et al.*, 1998). Zusätzlich bindet auch Srp1 direkt an Gsp1-GTP. Die Interaktion von Gsp1 und Cse1 unterscheidet sich von der mit den Importinen. Es besitzt zwei Gsp1-Bindungsstellen, jedoch vermittelt die N-terminale Bindungsstelle im Gegensatz zur C-terminalen nur eine schwache Bindung zwischen Cse1 und Gsp1-GTP (Matsuura und Stewart, 2004).

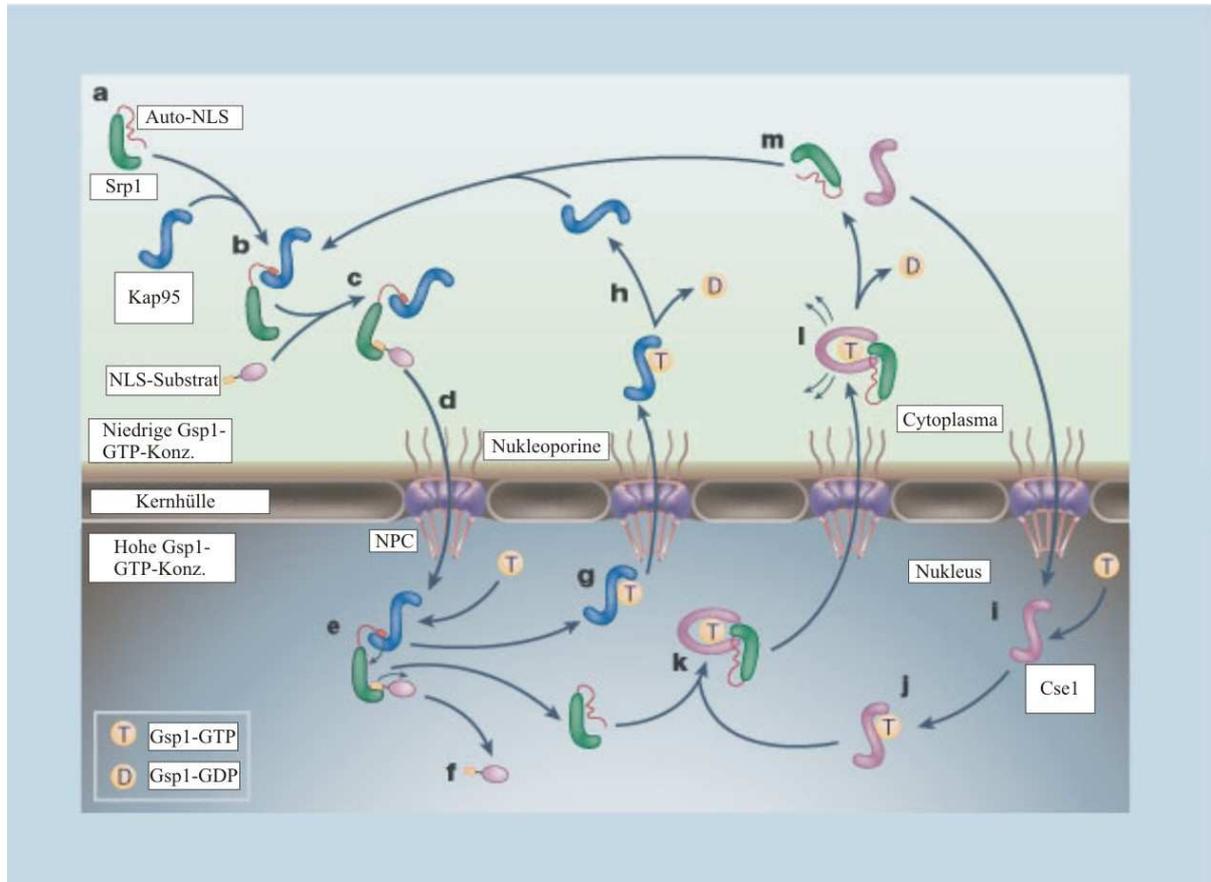


Abb. 3: Modell des nukleocytoplasmatischen Kreislaufs von cNLS-Protein/Srp1/Kap95/Cse1 (Hoelz und Blobel, 2004)

(a) Die autoinhibitorische Sequenz der Importin β -bindenden Domäne blockiert reversibel die NLS-Bindungstasche von Srp1. (b und c) Durch Bindung von Kap95 bzw. eines NLS-Proteins werden die jeweiligen Bindungsstellen freigelegt. (d) Kap95 schleust den ternären Komplex über den NPC in den Kern. (e und f) Gsp1-GTP interagiert mit Kap95 und der Komplex disassembliert. (g) Kap95 wandert im Komplex mit Gsp1-GTP zurück ins Cytoplasma, wo das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird. Kap95 steht nun für einen weiteren Importzyklus zur Verfügung (h). (j und k) Es bildet sich ein trimerer Exportkomplex aus Cse1, Srp1 und Gsp1-GTP, der ins Cytoplasma eintritt. (l) Der Komplex zerfällt unter Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP. (i) Freies Cse1 wird in den Kern zurücktransportiert und steht somit einem erneuten Exportzyklus zur Verfügung.

Substratfreies Cse1 besitzt eine geschlossene, ringartige Struktur (Cook *et al.*, 2005), was vermutlich die Substratbindung hemmt, da die Gsp1-GTP- und Substrat-Bindungsstelle in Cse1 in dieser Konformation teilweise versteckt liegen. Der Komplex transloziert durch den NPC ins Cytoplasma (Künzler und Hurt, 1998; Solsbacher *et al.*, 1998). Gsp1-gebundenes

GTP ist im Komplex mit Srp1/Cse1 vor Hydrolyse geschützt, so dass der Komplex assoziiert bleibt, bis das Cytoplasma erreicht ist. Es wurde gezeigt, dass Yrb1 alleine in der Lage ist, den Komplex zu disassemblieren und dass es in Anwesenheit von Rna1 eine katalytische Wirkung besitzt (Matsuura und Stewart, 2004; Solsbacher *et al.*, 1998). Mit Hilfe von Rna1 hydrolysiert nun Gsp1 das gebundene GTP zu GDP. Zum Rücktransport von Cse1 in den Kern werden keine weiteren Faktoren benötigt (Abb. 3).

Daneben wurde gezeigt, dass Cse1 an der Spindelassoziaton (Scherf *et al.*, 1996), der Chromosomensegregation während der Mitose (Xiao *et al.*, 1993) und bei der Cyclin-Degradation (Irniger *et al.*, 1995) beteiligt ist.

Für Srp1/Importin α aus verschiedenen Spezies wurden neben seiner nucleocytoplasmatischen Transportfunktion ebenfalls andere Aufgaben nachgewiesen. Es spielt eine Rolle bei der Chromosomen- und nukleären Segregation, bei der Bildung der mitotischen Spindel und beim Ubiquitin-vermittelten Protein-Degradationsweg (Küssel und Frasch, 1995b; Loeb *et al.*, 1995; Tabb *et al.*, 2000; Yano *et al.*, 1994).

Yrb1

Yrb1 (“Yeast Ran-binding Protein 1”), das Hefehomolog zum humanen RanBP1, ist ein essenzielles 23 kDa großes Protein, welches für den gerichteten Transport über den NPC unabdingbar ist (Schlenstedt *et al.*, 1995). Es ist in der Lage, über die Gsp1-bindende Domäne (RBD) mit dem C-Terminus von Gsp1/Ran zu interagieren (Masaya und Nishimoto, 2000; Seewald *et al.*, 2003). Zusammen mit RanGAP/Rna1 vermittelt es die Dissoziation der Gsp1-GTP-enthaltenden Exportkomplexe (Kehlenbach *et al.*, 1999; Schlenstedt *et al.*, 1995; Solsbacher *et al.*, 1998). Transportrezeptoren blockieren die GTPase-Aktivierung durch Rna1. Dieser Effekt wird durch Yrb1/RanBP1 wieder aufgehoben. Es bildet sich ein Disassemblierungsintermediat, bei dem Gsp1-/Ran-GTP gleichzeitig an Yrb1/RanBP1 und an den Exportrezeptor bindet. Gsp1 scheint transient als ein Gsp1-GTP/Yrb1-Komplex freigesetzt zu werden, der durch Rna1 irreversibel in Gsp1-GDP und Yrb1 umgewandelt wird. Rna1/RanGAP und Yrb1/RanBP1 wirken also katalytisch bei der Freisetzung von Gsp1-/Ran-GTP vom Transportrezeptor. Für verschiedene Exportine wurden unterschiedliche Mechanismen postuliert. Bei Xpo1 soll sich ein stabiles Disassemblierungsintermediat bilden, bestehend aus Yrb1/Gsp1-GTP/Xpo1. Dieser Komplex wird anschließend durch Rna1 dissoziiert (Maurer *et al.*, 2001). Bei Srp1/Cse1/Gsp1-GTP reicht Yrb1 aus, um Gsp1 von Cse1 abzulösen und damit den Exportkomplex vollständig zu disassemblieren (Solsbacher *et al.*, 1998) (vgl. auch Abb. 2).

Yrb1/RanBP1 liegt zum größten Teil cytoplasmatisch vor, befindet sich jedoch im Fließgleichgewicht, d. h. es pendelt kontinuierlich zwischen Cytoplasma und Nukleus hin und her (Künzler *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2001; Plafker und Macara, 2000). Das Protein wird aktiv in den Zellkern transportiert und der nukleäre Import wird durch zwei separate nukleäre Ziel-Sequenzen vermittelt. Der Import erfordert eine intakte RBD und hängt von der Region zwischen Aminosäurerest 121 und 131 ab. Diese Region interagiert mit dem C-Terminus von Gsp1-GTP (Künzler *et al.*, 2000), ist jedoch nicht ausreichend für den Import (Künzler *et al.*, 2000). Zusätzlich zur RBD könnte eine N-terminale Verlängerung außerhalb der RBD den Import vermitteln (Maurer *et al.*, 2001). Welches Importin β -Homolog den Yrb1/RanBP1-Import vermittelt, wurde noch nicht geklärt. Alle untersuchten Karyopherin-Mutanten zeigten keine Hemmung im Yrb1-Import (Künzler *et al.*, 2000). Als möglicher Kandidat für einen unkonventionellen Transport wird der humane ternäre Komplex aus RanBP1, Importin β und RanGDP vorgeschlagen (Chi *et al.*, 1996; Chi *et al.*, 1997), der auch für die entsprechenden Proteine aus Hefe *in vitro* nachgewiesen wurde (Maurer *et al.*, 2001). Der Export von Yrb1 aus dem Nukleus erfordert Xpo1, auch wenn Yrb1 kein Leucin-reiches NES enthält. Die intakte RBD ist notwendig und ausreichend für den Export (Künzler *et al.*, 2000), was sich damit deckt, dass die Interaktion über Gsp1 vermittelt wird (Künzler *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2001).

Die physiologische Signifikanz des Yrb1-Pendelns wurde bislang nicht entschlüsselt, aber es werden verschiedene Szenarien diskutiert. Eine Möglichkeit ist, dass Yrb1 auf irgendeine Weise in den Kern gelangt und kontinuierlich durch Xpo1 wieder ausgeschleust werden muss, weil nukleäres Yrb1 nicht mit seiner Funktion bei der Dissoziation von Exportkomplexen kompatibel ist. Alternativ dazu könnte es in den frühen Schritten des Xpo1-vermittelten Exports eine Rolle spielen. Im Gegensatz dazu könnte eine nukleärer Pool an Yrb1 für Vorgänge unabhängig vom nukleocytoplasmatischen Transport notwendig sein wie z. B. die Mikrotubulus-Organisation (Künzler *et al.*, 2000).

1.2. Sub2

SUB2 ist ein essenzielles Gen in *S. cerevisiae*, das für ein Mitglied der phylogenetisch konservierten DEAD Box-RNA Helikase-Familie (siehe 1.3) kodiert, welche sowohl beim Prä-mRNA-Spleißen als auch beim mRNA-Export eine Rolle spielt, in Organismen angefangen bei Hefe bis hin zum Menschen (Linder und Stutz, 2001). Humanes Sub2 (UAP56 oder BAT1) komplementiert Hefe-Sub2, was zeigt, dass dieses Protein sowohl

funktional als auch strukturell konserviert ist (Zhang und Green, 2001). Man vermutet, dass Sub2 am Spleißen, bei der Transkription, beim mRNA-Export und an der Genom-Stabilisierung beteiligt ist (Lahue *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae* scheint es für die Entfernung des hemmenden Spleißfaktors Mud2 vom Pyrimidin-Teil in Introns im frühen Stadium der Spleißosom-Assemblierung zuständig zu sein. Das ist ein ATP-abhängiger Schritt, der wahrscheinlich eine RNA-Protein-Chaperonaktivität von Sub2 einschließt (Kistler und Guthrie, 2001). Daneben wurde Sub2 als ein Faktor identifiziert, der für den mRNA-Export wichtig ist. Es interagiert genetisch und biochemisch mit dem essenziellen nukleären Exportprotein Yra1, welches wiederum direkt mit dem NPC-assoziierten Protein Mex67 interagiert. Man vermutet, dass Sub2 Yra1 an die mRNA rekrutiert und bei dessen Bindung an den NPC wieder abgelöst wird (Sträßer und Hurt, 2001). Die beiden Proteine liegen in stöchiometrischen Mengen mit dem THO-Transkriptionselongationskomplex, bestehend aus den vier Proteinen Tho2/Rlr1, Hpr1, Mft1 und Thp2 (Chávez *et al.*, 2000), vor, was zur Bildung eines neuen Komplexes, dem TREX-Komplex (Transkription/Export), führt. Man vermutet, dass sich auch das hnRNP Tho1 an diesen Komplex anlagert und ähnlich wie Sub2 an mRNA-Biogenese und -Export teilnimmt (Jimeno *et al.*, 2006).

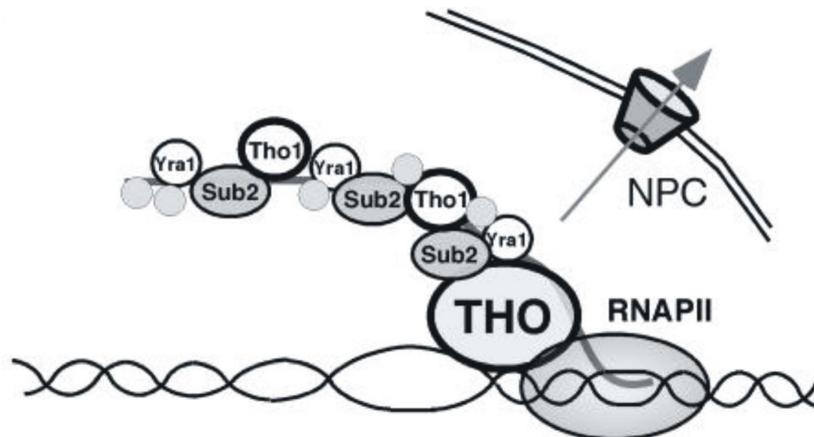


Abb. 4: Modell zur Funktion des TREX-Komplexes

Über den THO-Komplex lagert sich der TREX-Komplex an das aktive Gen an und hilft der RNAPII bei der Transkriptionselongation. Sub2 ist am Spleißprozess beteiligt und rekrutiert Yra1 an die mRNA. Dieses Protein ist in der Lage, an den NPC zu binden und vermittelt so den nukleären Export (Jimeno *et al.*, 2006).

Dieser Komplex verbindet direkt Transkriptionselongation mit Spleißen und Export. Während der Transkription wird der TREX-Komplex speziell für die aktivierten Gene rekrutiert und bewegt sich über die ganze Länge der Gene mit der RNA-Polymerase II (Abb. 4) (Sträßer *et al.*, 2002). Der THO-Komplex erhöht die Translationselongation durch lange und GC-reiche

Ausgangs-DNA und unterdrückt transkriptionsassoziierte Rekombination (Kistler und Guthrie, 2001; Libri *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 1998; Sträßer und Hurt, 2001; Zhang und Green, 2001). *SUB2* wurde als Dosis-abhängiger Suppressor von *rlr1-1* identifiziert (West Jr. und Milgrom, 2002). *RLR1* ist ein Suppressor von *SIN4/TSF3* (West Jr. *et al.*, 2000); *SIN4/TSF3* (Chen *et al.*, 1993; Jiang und Stillman, 1992) wiederum kodiert für eines von ungefähr 20 Untereinheiten des Mediator-Komplexes der PolII-Transkriptionsmaschinerie (Myers und Kornberg, 2000). *RLR1* ist außerdem ein "Multicopy"-Suppressor von *HPR1* (Piruat und Aguilera, 1998), ein Gen, das zusätzlich zur Transkription mit Hyperrekombination und der Chromatinstruktur assoziiert ist (Fan *et al.*, 2001; Piruat und Aguilera, 1998; Zhu *et al.*, 1995). Auf diesen Grundlagen basierend wurde die Hypothese aufgestellt, dass Rlr1 und Hpr1 in Verbindung mit Sub2 eine Transkriptionsgekoppelte mRNP-Assemblierungs-/Exportfunktion ausüben (West Jr. und Milgrom, 2002).

1.3. Dbp2

Für viele komplexe zelluläre Prozesse, die die Genfunktion und -expression beeinflussen (DNA-Rekombination, Prä-mRNA-Spleißen, rRNA-Prozessierung, Proteinsynthese) wurde gezeigt, dass sie die Aktivität von DNA- und RNA-Helikasen der Superfamilien I und II benötigen (de la Cruz *et al.*, 1999; Matson *et al.*, 1994). Die Helikase-Funktion spielt aber auch beim "Nonsense"-vermittelten mRNA-Abbau eine Rolle. Dieser Mechanismus ist für den schnellen Umsatz sowohl von mRNA verantwortlich, die verfrühte Stoppcodons enthält (Peltz *et al.*, 1993), als auch von ungespleißter Prä-mRNA, die ins Cytoplasma eintritt (He *et al.*, 1993), von mRNA mit einem schwachen Translationsinitiationskontext (Welch und Jacobson, 1999), einiger mRNAs mit "upstream open reading frames" (Oliveira und McCarthy, 1995) und von Transkripten mit ausgedehnten 3'-untranslatierten Regionen (Muhlrad und Parker, 1999). Dbp2, das Hefehomolog zum humanen p68, gehört zur Familie der DEAD Box-Proteine. Diese strukturell und funktional verwandten Proteine enthalten eine Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) -Sequenz und sind in einer Vielzahl von Spezies zu finden, angefangen von Bakterien bis hin zu höheren Eukaryoten. Die Proteinfamilie ist an der Spermatogenese, Embryogenese, Zellwachstum und -teilung sowie der RNA-Prozessierung (Entwindung und Spleißen der RNA) beteiligt (Cadwell *et al.*, 1997; Fuller-Pace, 1994; Kitajima *et al.*, 1994; Linder *et al.*, 1989; Schmid und Linder, 1992). Es wurde nachgewiesen, dass durch Deletion des *DBP2*-Gens sowohl "Nonsense"-enthaltende Transkripte als auch 35S Prä-rRNA akkumulieren (Bond *et al.*, 2001). Das bedeutet also, dass Dbp2 bei beidem

eine Rolle spielt: beim "Nonsense"-vermittelten mRNA-Abbau und bei der rRNA-Prozessierung. Die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt. Man vermutet jedoch, dass Dbp2 eine Hauptrolle bei der Bildung des 27SA₃-Vorläufers aus der 35S Prä-rRNA spielt, weniger bei der vorgeschalteten Bildung des 27SA₂-Vorläufers. Daneben weisen Mutationsanalysen darauf hin, dass die Dbp2-Aktivität in Form von ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und RNA-Bindung für den "Nonsense"-vermittelten mRNA-Abbau essenziell ist (Bond *et al.*, 2001). Zuvor wurde bereits gezeigt, dass Dbp2 mit Upf1 interagiert, welches ebenfalls am "Nonsense"-vermittelten mRNA-Abbau beteiligt ist (He und Jacobson, 1995; Peltz *et al.*, 1993). Upf1 ist ein Mitglied der RNA-Helikase-Superfamilie I und besitzt Nukleinsäurebindungs-, RNA-Helikase- und ATPase-Aktivität (Weng *et al.*, 1996; Weng *et al.*, 1998). Dbp2 hingegen gehört zur Familie der Helikase-Superfamilie II. Unabhängig davon wurde nachgewiesen, dass Dbp2 ein großes 3'-nahes Intron enthält, welches die *DBP2*-Genexpression autoreguliert (Barta und Iggo, 1995).

1.4. Imp4

Eukaryotische Ribosomenbiogenese ist ein dynamischer Prozess, der die Assemblierung und Disassemblierung von RNA-Protein- und RNA-RNA-Komplexen einschließt. Man vermutet, dass dabei mit Hilfe von Cofaktoren gebildete und dissoziierte transiente RNA-Protein- und RNA-RNA-Interaktionen eine Schlüsselrolle spielen. Bestimmte Proteine fördern diese Hybridisierung zwecks Stabilisierung, Erhöhung der Bildungsrate und Freilegung der Bindungsstelle (Kressler *et al.*, 1999; Venema und Tollervey, 1999).

Ribosomenbiogenese beginnt mit der Transkription der Prä-rRNA. Sie enthält die 18S rRNA der kleinen Untereinheit sowie die 5,8S und 25S rRNA der großen Untereinheit, welche durch zwei interne "Spacer" (ITS1 und ITS2) voneinander getrennt sind und von zwei externen "Spacern" (5'ETS und 3'ETS) flankiert werden. Um die reife ribosomale Untereinheit zu erzeugen, wird die Prä-rRNA modifiziert (Pseudouridylierung und Methylierung), durch Exo- und Endonukleasen an den Schnittstellen A₀, A₁ und A₂ gespalten, gefaltet und mit mindestens 79 ribosomalen Proteinen assembliert (Fatica und Tollervey, 2002). Die Freisetzung der 18S rRNA geschieht mit Hilfe des "small subunit processome" (SSUP), welches sich aus der "U3 small nucleolar RNA" und 28 oder mehr assoziierten Proteinen zusammensetzt (Dragon *et al.*, 2002). Die U3 snoRNA enthält konservierte Sequenzelemente und kann in drei Regionen eingeteilt werden: die 5'-Domäne, die Angel-Region und die 3'-Domäne. Es bildet sich ein U3 Prä-rRNA-Duplex, wobei die U3 snoRNA 5'-Domäne

(Nukleotide 16-22) mit der komplementären Stelle des 18S Teils und die Angel-Region (Nukleotide 39-48) mit der komplementären Stelle des 5'ETS interagiert (siehe Abb. 5) (Beltrame und Tollervey, 1995; Hughes, 1996; Sharma und Tollervey, 1999).

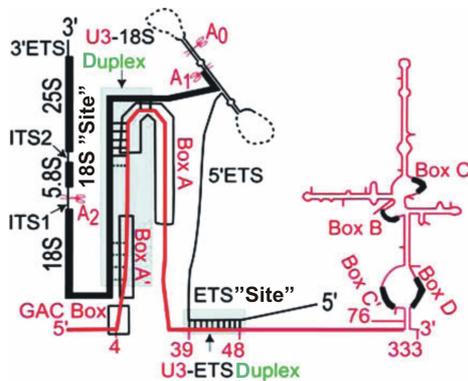


Abb. 5: Schematische Darstellung der Prä-rRNA und der U3 snoRNA

Die U3 snoRNA (rot) bildet Basenpaare mit der Prä-rRNA (schwarz). Konservierte Sequenzelemente der 5'-Domäne sind eingerahmt. An den Duplexstellen (grün) sind die genetisch verifizierten (durchgezogene Linien) und erwarteten (gepunktete Linien) Interaktionen gezeigt (Gérczei und Correll, 2004).

Man vermutet, dass Imp3, Imp4 und Mpp10 ein Heterotrimer bilden, welches diese RNA-RNA-Interaktionen vermittelt. Es wurde bereits gezeigt, dass Imp3 und Imp4 das ansonsten instabile Duplex zwischen der Angel-Region und dem externen "Spacer" stabilisiert. Lediglich Imp4 scheint die Box A-Stammstruktur der 5'-Domäne so neu zu arrangieren, dass die Stelle freigelegt wird, die mit dem 5'-Ende der 18S rRNA interagiert. Imp3 und Imp4 helfen also dem SSUP beim Andocken an die Prä-rRNA (Abb. 6) und sind daher für die Ribosomenbiogenese essenziell (Gérczei und Correll, 2004).

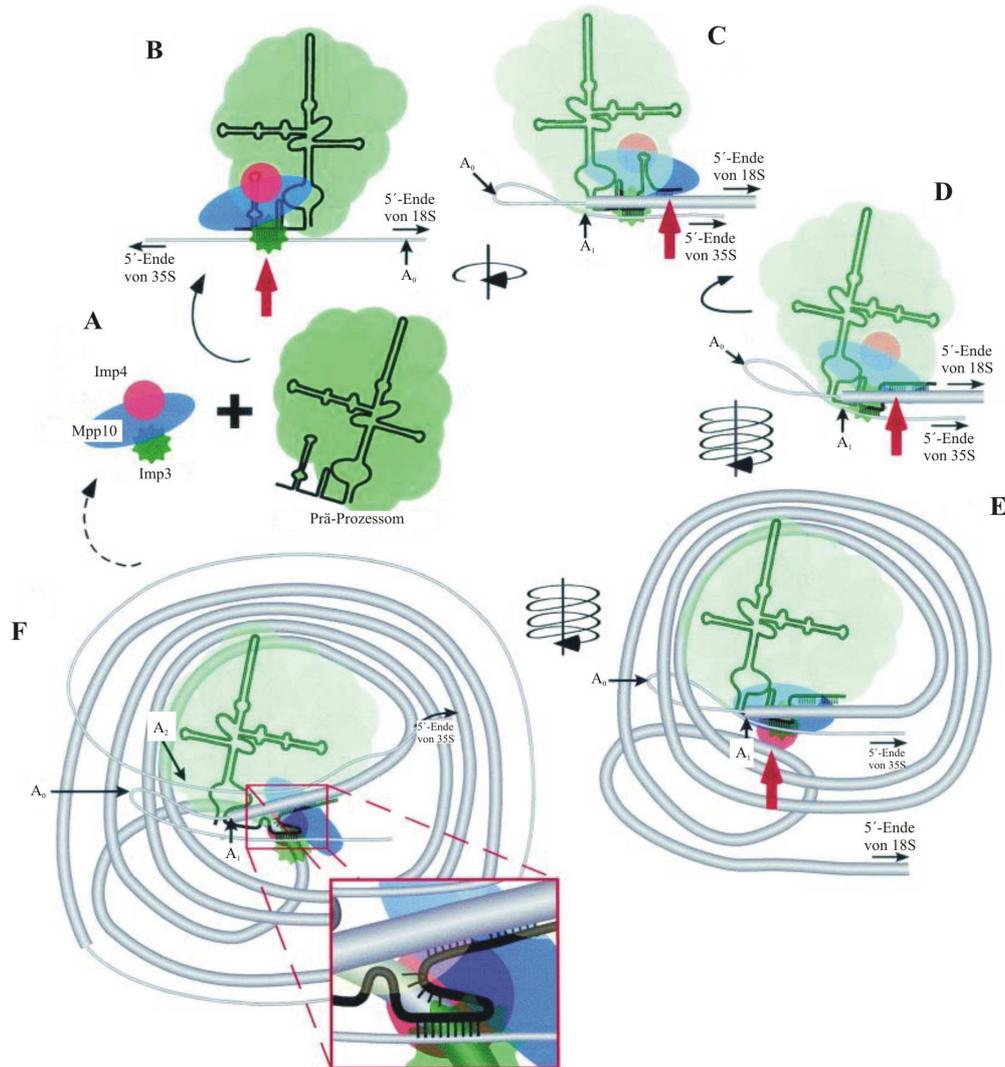


Abb. 6: Modell für die Rolle von Imp4, Mpp10 und Imp3 bei der SSU-Prozessom-Aktivität

Die transkribierten "Spacer", die 18S rRNA bzw. die U3 snoRNA sind als dünne bzw. dicke graue Bänder sowie dünne schwarze Linien dargestellt. Der rote Kreis, das blaue Oval und der grüne Stern symbolisieren Imp4, Mpp10 und Imp3. Die übrigen SSU-Prozessomproteine werden durch grüne Kugeln repräsentiert. Die schwarzen Pfeile deuten die Bewegungen des Prozessoms an und die roten Pfeile weisen auf die Hauptprozessierungsschritte hin. (A) Imp4, Mpp10 und Imp3 interagieren vor ihrer Assoziation mit dem SSU-Prozessom miteinander. Imp3 lenkt Mpp10 und Imp4 zur U3 snoRNA und das Prozessom zu seiner Bindungsstelle im 5'ETS. (B) Die Prä-rRNA wird um das Prozessom gefaltet und die Box A' der U3 snoRNA interagiert mit der 18S rRNA. (C) Dieser Schritt erleichtert wahrscheinlich die Interaktion zwischen dem 5'-Ende der Box A und den Nachbarregionen auf der 18S rRNA. (D und E) Die Prä-rRNA wird anschließend um das SSU-Prozessom gewickelt, um das 3'-Ende in die Nähe des RNA-bindenden Proteins Imp4 zu bringen. (F) Die Imp4-Bindung richtet die 18S rRNA am 3'-Ende der Box A aus. Dadurch, dass die Prä-rRNA weiter um das Prozessom gewickelt wird, wird die A₂-Schnittstelle in die Nähe der A₀- und der A₁-Schnittstelle gebracht (Wehner *et al.*, 2002).

1.5. Taf4

Zur Initiation der Transkription benötigt die eukaryotische RNA-Polymerase II (RNAP II) die sog. allgemeinen Transkriptionsfaktoren. Sie bringen die RNAP II in die richtige Position, helfen bei der Trennung der beiden DNA-Stränge und setzen nach Transkriptionsbeginn die

Polymerase vom Promotor frei. Dieser enthält die TATA-Box als Schlüsselkomponente, welche durch den Transkriptionsfaktor TFIID erkannt wird, woraufhin auch TFIIB bindet. Die Folge ist eine lokale Verbiegung der DNA, was für die übrigen Proteine wie ein Startsignal wirkt. TFIIE, TFIIIF, TFIIH sowie die RNAP II und einige andere Faktoren lagern sich an den Promotor an (Transkriptions-Initiationskomplex). TFIIH phosphoryliert unter Verbrauch von ATP die RNAP II, die dadurch ihre Konformation ändert, vom Komplex freigesetzt wird und mit der Transkription beginnt (Alberts *et al.*, 1998) (siehe auch 1.1.4).

Der allgemeine Transkriptionsfaktor TFIID setzt sich zusammen aus dem TATA-Box-bindenden Protein (TBP) und 14 verschiedenen TBP-assoziierten Faktoren, den Tafs (auch Taf_{II}s; das Molekulargewicht liegt zwischen 17-150 kDa) (Sanders und Weil, 2000), von denen 13 für das Überleben der Zelle essenziell sind (Yatherajam *et al.*, 2003) und von denen neun ein Histon-Faltungsmotiv enthalten (Selleck *et al.*, 2001). In Studien mit Hefe wurde gezeigt, dass Tafs eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der RNAP II-Transkription spielen. Das Gen, das für die TFIID-Untereinheit Taf4 (Taf48/Tsg2) kodiert, ist essenziell für normales Zellwachstum und das C-terminale Histon-Faltungsmotiv in Taf4 ist für seine Funktion notwendig (Thuault *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass Taf4 mit Taf12/Taf61/Taf68 dimerisiert, welches für die Stabilität des Komplexes erforderlich ist (Reese *et al.*, 2000). Taf17, Taf60, Taf61/68 bilden zusammen mit Taf4 einen spezifischen Taf-Oktamerkomplex, der jedes Taf in zwei Kopien enthält. Alle vier Proteine enthalten Histon-Faltungsmotive (Helix-Schleife-Helix-Schleife-Helix) und das Taf-Oktamer ähnelt dem Histon-Oktamer in Stöchiometrie und Histonfaltungsinteraktionen. Man vermutet ein Taf17₂-Taf60₂-Heterotetramer, das auf beiden Seiten durch ein Taf4-Taf68-Heterodimer flankiert wird (Selleck *et al.*, 2001). Das Protein zeigt signifikante Sequenzhomologie zur konservierten C-terminalen Region des *Drosophila* TAF110p sowie des humanen TAF130/135p (Sanders und Weil, 2000).

1.6. Rfc2

Replikasen zellulärer Chromosomen benutzen ein zirkuläres gleitendes Klammerprotein, das die DNA umschließt und die Polymerase an ihr Ausgangs-DNA bindet, um eine hohe Prozessivität in der DNA-Synthese zu erreichen (Kelman und O'Donnell, 1995). In der eukaryotischen Zelle handelt es sich dabei um den "proliferating cell nuclear antigen processivity factor" (PCNA) (Gulbis *et al.*, 1996; Krishna *et al.*, 1994). Dieses ringförmige Protein benötigt einen ATP-verstärkten Multiprotein-Klammerlader zur Anlagerung an die

DNA. Der eukaryotische Klammerlader ist der heteropentamere Replikationsfaktor C (RFC). Bei seinen fünf Untereinheiten (Rfc1-5 bzw. Rfc-A-E) handelt es jeweils um verschiedene Proteine, die aber homolog zueinander (Cullmann *et al.*, 1995; O'Donnell *et al.*, 1993) und Mitglieder der AAA⁺-Familie von ATPasen sind. Die RFC-Untereinheiten sind kreisförmig in folgender Reihenfolge angeordnet: Rfc5:Rfc2:Rfc3:Rfc4:Rfc1. Der Komplex enthält vier ATP-Stellen (Stelle A-D), welche an den Berührungspunkten der Untereinheiten lokalisiert sind. Dabei bringt Rfc5 einen Argininfinger eines SRC-Motivs in die ATP-Stelle von Rfc2 ein, Rfc2 in die ATP-Stelle von Rfc3, Rfc3 in die ATP-Stelle von Rfc4 und Rfc4 in die ATP-Stelle von Rfc1 (Yao *et al.*, 2003).

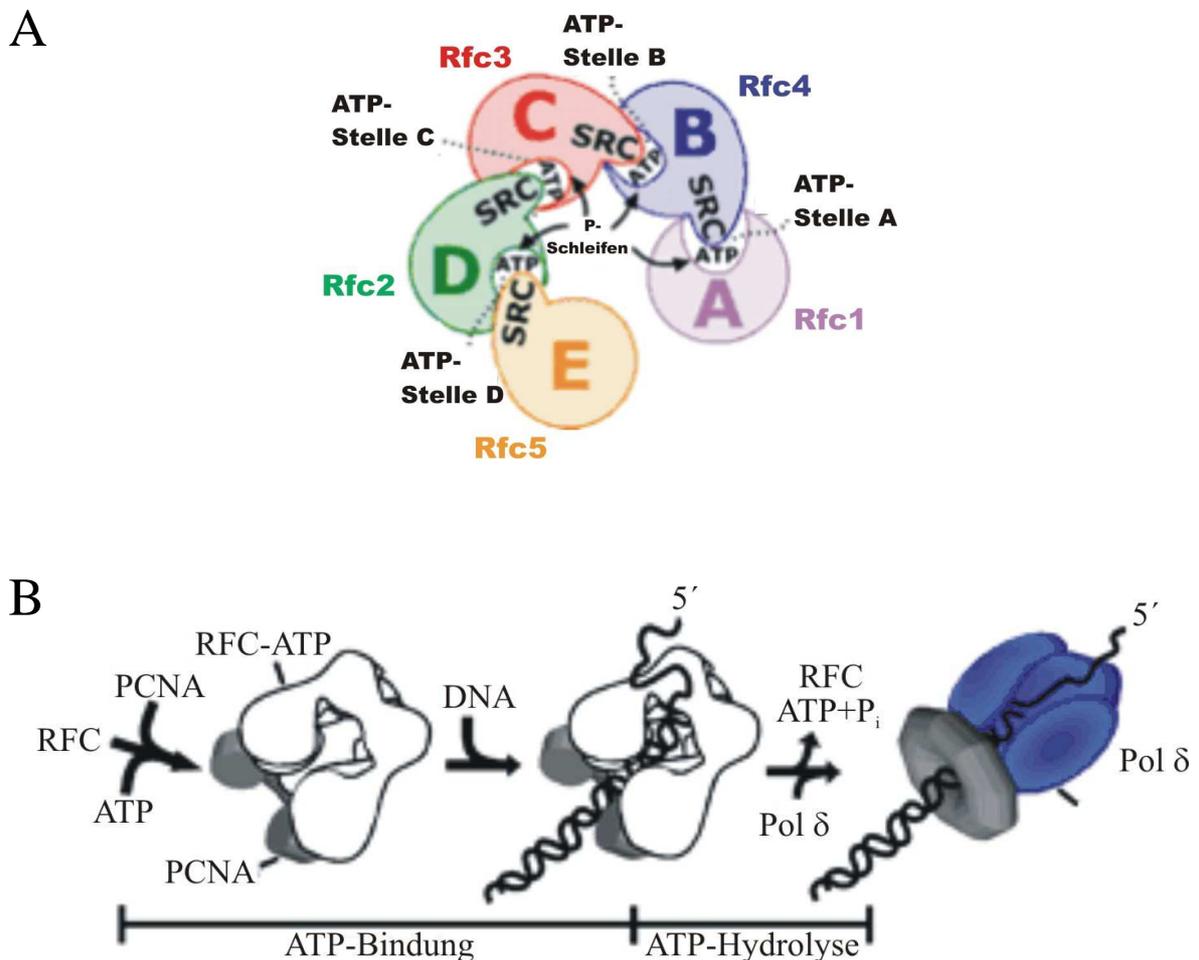


Abb. 7: Der Replikationsfaktor C-Komplex

(A) Schematische Darstellung der Anordnung der ATP-Stellen in den AAA⁺-Modulen des RFC-Heteropentamers. Jede ATP-Stelle befindet sich an den Berührungspunkten der Untereinheiten. Die Nachbar-Untereinheit enthält einen Argininfinger in einem konservierten SRC-Motiv, der mit dem γ -Phosphat des ATP, welches an die angrenzende Untereinheit gebunden ist, interagiert.

(B) Modell der einzelnen Schritte des PCNA-Beladung mit DNA, gekoppelt mit ATP-Bindung und -Hydrolyse. Nachdem PCNA beladen worden ist, löst sich RFC von der Klammer, um die Anlagerung der Polymerase zu ermöglichen (Johnson *et al.*, 2006).

An jeder ATP-Stelle liegt also ein Argininrest der einen Untereinheit in der Nähe des γ -Phosphats des ATPs, welches an die benachbarte Untereinheit gebunden ist und mit dessen P-Schleife interagiert (Abb. 7A). Die ATP-Stellen fungieren in verschiedenen Schritten während des Ladens des PCNA auf die DNA. Die ATP-Bindung an RFC fördert die Rekrutierung und Öffnung von PCNA, wobei alle RFC-Untereinheiten Kontakt zu PCNA haben. Die DNA kann nun in dessen Zentrum eingelagert werden. Die ATP-Bindung aktiviert einen γ -Phosphat-Sensor in der ATP-Stelle C, welcher die Assoziation der DNA begünstigt. Die anschließende ATP-Hydrolyse an Stelle D wird durch PCNA stimuliert, was mit der Schließung des PCNA um die DNA gekoppelt ist. Dadurch wird der Kontakt zu Rfc2 und Rfc5 getrennt und der γ -Phosphat-Sensor von ATP-Stelle C ausgeschaltet. Es startet eine geordnete Hydrolyse um den Ring, was zu einer verringerten Affinität von RFC zur DNA und zum Abstoßen von RFC von der PCNA-Ladestelle führt (siehe Abb. 7B) (Johnson *et al.*, 2006).

Daneben bilden die Rfc2-5-Untereinheiten mit Elg1, Rad24 bzw. Ctf18 alternative Komplexe, die an der Beibehaltung der genomischen Stabilität, dem DNA-Schaden-Kontrollpunkt sowie an der Bildung der Schwesterchromatid-Kohäsion beteiligt sind (Bylund *et al.*, 2006; Naiki *et al.*, 2001; Naiki *et al.*, 2000; Ogiwara *et al.*, 2007).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Äkta Explorer 100 mit Software "Unicorn" (General Electric Healthcare, Freiburg)
Autoklav V-150 (Systemec, Wetzlar)
Autoklav-Schutzhandschuhe (Bel-Art-Products, Pequannock, USA)
Autoradiographie-Kassette (18 x 24 cm) (Amersham-Buchler, Braunschweig)
Behälter für Flüssigstickstoff, Isotherm KGW (Pequannock, USA)
Brutschränke Hera cell 150 (Thermo Electron Corporation, St. Johann in Tirol)
DNA-Imager Universal Hood II (Biorad, München)
Eismaschine AF20 Scotsman (Enodis, Frimont)
Entwicklermaschine Gevomatic 60 (Agfa-Gevaert, München)
Feinwaagen (Kern, Balingen)
Gel-Gießschlitten und Elektrophoresekammern für Agarose-Gele (Peqlab, Erlangen)
Gilson-Pipetten (Abimed, Düsseldorf)
Innova 44 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Jouan CR3i Multifunction Centrifuge (Thermo Electron Corporation, St. Johann in Tirol)
Kühlzentrifuge 541+R+F45-30-11 (Eppendorf, Hamburg)
Kühlzentrifuge Avanti J-20 XP (Beckman, München)
Leuchttisch Prolite Basic (Kaiser, Eisleben)
Lichtmikroskop Eclipse TS100 für Hellfeld (Nikon, Düsseldorf)
Magnetrührer (Heidolph, Schwabach)
Mikrowellenherd Micromaxx (Medion, Mühlheim)
Wasseraufbereitungsanlage Pure Lab Ultra (Elga, Ransbach-Baumbach)
Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Gießapparatur für SDS-Polyacrylamidgele, Glasplatten, Spacer, Kämme, Apparatur zum Lauf von SDS-Gelen) (Biorad, München)
Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Apparatur zum Blotting von SDS-Gelen) (Biorad, München)
Novex Mini-cell Xcell surelock (Invitrogen, Karlsruhe)
PCR-System MBS Satellite 0.26 (Thermo Electron Corporation, St. Johann in Tirol)
pH-Meter pH 720 (WTW Inolab, Weilheim)
Photometer Ultrospec 3100 pro (Amersham-Biosciences, Freiburg)

Optima Max Ultracentrifuge (Beckman, München)
Optima LE-80K Ultracentrifuge (Beckman, München)
Replica-Plater 8 x 6 (Sigma-Aldrich, München)
Rotoren für die Ultrazentrifugen SW28, Ti70 und TLA 100.3 (Beckman, München)
Rotoren für die Kühlzentrifuge JA10, JA20 und JA25.5 (Beckman, München)
Routine-Mikroskop Eclipse TE2000-U (Durchlicht, Auflichtfluoreszenz) (Nikon, Düsseldorf)
mit X-Cite 120 Fluorescence Illumination System Exfo (Nikon, Düsseldorf) und Software
NIS Elements
Spannungsgerät Power PAC 300 (Biorad, München)
Spannungsgerät Consort EV 231 (Turnhout, Belgien)
Speedvac Savant DNA 110 (Thermo Electron Corporation, St. Johann in Tirol)
Speedvac Savant SC 110 (GMI, Inc., USA)
Sterilbank Top Safe 1.2 (Nunc, Wiesbaden)
Superloop 50 ml (General Electric Healthcare, Freiburg)
Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg)
Tiefkühltruhe Herafreeze Heraeus (-80°C) (Thermo Electron Corporation, St. Johann in Tirol)
Tiefkühltruhe Premium Super A⁺⁺ (Liebherr, Deutschland)
Tischzentrifuge 5415C mit Standardrotor (Eppendorf, Hamburg)
Typhoon 9410 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, Freiburg)
Ultraturrax T18 Basic Disperser (Ika Works Inc., Staufen)
(Ultra-) Zentrifugengefäße aus Polycarbonat und Polypropylen (Beckman, München)
UP 400s Ultraschallprozessor mit Micro- und Macrotip (Dr. Hielscher, Teltow)
UV-Tisch (Peqlab, Erlangen)
Vortex-Mixer Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA)
Wasserbäder, temperierbar (Julabo, Seelbach)
Wipptische (Fröbel, Wasserburg)

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24 x 60 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Dialyseschlauch Spektra-Por (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA)
Chromatographiesäulen (Disposable Chromatography Columns) (BioRad, München)
Einmalspitzen (Sarstedt, Nürnberg)
Filterpapier DE81 (Schleicher & Schuell, Dassel)
"high pure PCR product purification kit" (Roche, Mannheim)

Immobilon-P Transfermembran (Dicke 0,45 µm, PVDF) (Millipore Co., Bedford, MA, USA)
Küvetten (1,5 ml Halbmikro) (Brand, Wertheim)
LoBind Tubes (Eppendorf, Hamburg)
Mikroschraubröhren 2 ml (Sarstedt, Nürnberg)
Mikrotiterplatten (96-Loch-Platten) (Sarstedt, Nürnberg)
Mobicol-Säulen (Mobitec, Eupen)
MonoS HR5/5-Säule (General Electric Healthcare, Freiburg)
MonoQ HR5/5-Säule (General Electric Healthcare, Freiburg)
NuPAGE Novex Bis-Tris Gels 4-12 %, 1 mm x 12 Well (Invitrogen, Karlsruhe)
Objektträger 76 x 26 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
PCR-Reaktionsgefäße (Greiner bio-one, Nürtingen)
PD10 Entsalzungssäulen (General Electric Healthcare, Freiburg)
Petrischalen mit Nocken (94/16 mm und 145/20 mm) (Greiner & Söhne, Nürtingen)
Plastikröhrchen: 15 ml und 50 ml (Greiner & Söhne, Nürtingen)
Poly-Prep Chromatography Columns (Biorad, München)
Reaktionsgefäße: 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
Reaktionsgefäß mit Sterilfiltereinsatz aus Cellulose-Acetat 0,22 µm (Spin X) (Corning Inc., Corning, N.Y., USA)
Röntgenfilme X-Omat AR (Kodak, München)
Rundfilter 604, Ø 90 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)
Skalpelle (B. Braun, Melsungen)
Sterilfilter: 0,2 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)
3MM-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel)
Vivaspin 15, Vivaspin 4 und Vivaspin 500 (Vivascience, Binbrook Lincoln, UK)
Whatman 3MM- Papier (Whatman, Maidstone, UK)
Zeba Entsalzungssäulen (Pierce, Rockford)

2.2. Chemikalien

Biorad, München: Kaleidoscope prestained SDS-Page Standard *broad range*

Fluka, Taufkirchen: L-Cystein

General Electric Healthcare, Freiburg: Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Western-Blot-Detektionssystem, ECL plus Blotting Detection System, IgG-Sepharose, GSH-Sepharose

Gibco BRL, USA: 10 kDa Proteinleiter, 1 kb DNA-Leiter

Heirler, Radolfzell: Magermilchpulver

ICN, USA: PMSF

Invitrogen, Karlsruhe: BenchMark Protein Ladder, NuPAGE Running Buffer, NuPAGE LDS Sample Buffer, NuPAGE Sample Reducing Agent, NuPAGE Antioxidant, TEV-Protease

MBI Fermentas, St. Leon-Rot: Page Ruler Prestained Protein Ladder, Page Ruler Protein Ladder, IPTG, Rapid DNA Ligation Kit

Merck, Darmstadt: Manganchlorid, Ammoniumsulfat, Natriumthiosulfat, Formalin, Silbernitrat, Natriumcarbonat, Bis-Tris-Cl, Aktivkohle, β -Mercaptoethanol

Novagen, Madison: S-Protein-Sepharose

Pierce, Rockford: SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate

Qiagen, Hilden: Nickel-NTA-Agarose, Anti-Penta-His-Antikörper POD-gekoppelt

Remel, Lenexa: Bacto-Trypton, Bacto-Hefe-Extract, Bacti Agar, Bacti Meat Peptone, Yeast Nitrogen base w/o amino acids

Roche Diagnostics, Mannheim: Nukleotid-Mix mit je 10 mM dNTPs, DTT, Leupeptin

Serva, Heidelberg: LB-Medium Powder, Ammoniumpersulfat, TEMED, Ponceau S, Sulfo Link Kit

Sigma-Aldrich, München: Pepstatin A, Antipain, Chymostatin, Tween 20, Ficoll, PVP, Glutathion, p-Phenylendiamin, Sorbitol, Lithiumacetat, Rubidiumchlorid, Kaliumacetat, Antifoam A, Antifoam 204, Kanamycin, alle verwendeten Aminosäuren außer L-Cystein, Adeninsulfat, p-Aminobenzoesäure, Ampicillin, BSA, DAPI, Dextrose, DMSO, Galaktose, *myo*-Inositol, säuregewaschene Glasperlen ("glass beads" 425-600 microns), Lachssperma-DNA, Poly-L-Lysin (Hydrobromid, Molekulargewicht 134000 - 246000 Da; P-1399), Natriumazid, PEG 3300, Raffinose, Uracil

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen.

2.2.1. Enzyme

ICN, USA: Zymolyase-100 T aus *Arthrobacter luteus*

MBI Fermentas, St. Leon-Rot: Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Rapid DNA Ligation Kit

New England Biolabs, Frankfurt: Restriktionsendonukleasen

Roche, Mannheim: alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Expand High Fidelity PCR System, *Pwo* DNA-Polymerase, Restriktionsendonukleasen, RNase A, DNase I

2.2.2. Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Antigen	Verdünnung für		Typ	Herkunft
	Western Blot	Immunfluoreszenz		
GFP	1:1000	1:1000	Affinitäts- gereinigter polyklonaler Antikörper	Clontech, Palo Alto USA
Rpf1	1:1000	-		Laborkollektion
Kap120	1:1000	-		Laborkollektion
Kap114	1:500	-		Laborkollektion
Srp1	1:5000	1:1000		Laborkollektion
Kap95	1:300	-		Laborkollektion
Cse1	1:500	1:500		Laborkollektion
Yrb1	1:2000	1:1000		Laborkollektion
Hta1	1:2000	-		Laborkollektion
Gsp1	1:1000	-		Laborkollektion
GST	1:2000	-		Laborkollektion
Prp20	1:2000	-		Laborkollektion
Rna1	1:1000	-		diese Arbeit
His ₅	1:1000	-		POD- gekoppelter Antikörper
Kaninchen- IgG	1:1000	-	POD- gekoppelter Antikörper	Sigma-Aldrich, München
Kaninchen- IgG	-	1:1000	FITC- gekoppelter Antikörper	Jackson Immuno- research Lab

2.2.3. Oligonukleotide

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz 5' → 3'
8	<i>YRB9</i> 3' -	CGGCTCGAGCCAATCGGGTCCATTATCTGAC
10	<i>YRB11</i> 3' -	CGGCTCGAGAATGCGCGATCAAAGATAACC
98	<i>YRB1</i> ΔN40 ATG <i>Bam</i> HI +	GCGGATCCATGAAAGACGAAGAAGATAACC
142	<i>CSE1</i> -C485 <i>Bam</i> HI +	GCGGATCCAATGAGATCAATCTTTAGA

388	<i>YRB9</i> +	ATCCGACAGTGAACGTAAAGTTCTTTCAGAAGCCCTTTTGC GGATCCCCGGGTAAATTA
389	<i>YRB9</i> -	CTAACTACTTTACATCTGATATCTCCACGGCTTATGTATATA AGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
390	<i>YRB9</i> Test	GCCAGACAGGTATGTACAAGTTC
394	<i>YRB11</i> +	ACAAATGTTTTTATCCATCCAGCCTCAAGAGGCTCGTCCAC GGATCCCCGGGTAAATTA
395	<i>YRB11</i> -	GAATGCGCGATCAAAGATAACCACTGTAATGTTGTTAGTCG AATTCGAGCTCGTTTAAAC
396	<i>YRB11</i> Test	CATCCATCGCATCTTTATGGATC
420	GFP Test -	CATAACCTTCGGGCATGGCACTC
432	<i>IMP4 BglIII</i> ATG +	GCGAGATCTATGCTAAGAAGACAAGCCCGTG
434	<i>IMP4</i> F2 +	GTTGAGAAGATTCATAAGGACTGCCAATAAAAAAGACTATT TGCGGATCCCCGGGTAAATTA
435	<i>IMP4</i> R1 -	GACTTACATAAGGCCTCATCGGCCTTCTATTTAACCTTTAC GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
506	Protein A Test	GGCTTGGGTCATCTTTTAAAC
524	<i>CSE1</i> F2 +	CCCAAGAAAATCAAGTAAAATTAATCAATTATTAGTTGGT AATCGGATCCCCGGGTAAATTA
525	<i>CSE1</i> R1 -	CAAAGAGCTCCATTTTCATCTATATATAATTCTCTACACCA GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
526	<i>YRB1</i> F2 +	TAAAGAAGAATTTGAAAAAGCTCAAGAAATCAACAAAAG GCTCGGATCCCCGGGTAAATTA
527	<i>YRB1</i> R1 -	CATTAGGAACAAAAAATCTAGACGCAAGTAACAAGCACA TCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
534	Protein A Test -	CCGGAATTCGCTTATTTAGAAGTGGCGCGC
631	<i>RNAI</i> ATG <i>NedI</i> +	GGAATTCATATGGCTACCTTGCACTTCGTTT
632	<i>RNAI</i> no stop <i>BglIII</i> -	CGAGATCTTTTGATTTTCAGTTTCAGCTAAAC
693	<i>YRB11</i> 3' Test -	CTGCGACATCTAATTAGTAGC
694	<i>YRB11</i> -300 +	CATCTTTATGGATCGAAATGCTCG

697	<i>DBP2</i> no ATG <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCACTTACGGTGGTAGAGATCAG
698	<i>DBP2</i> 3' <i>Xho</i> I/ <i>Ava</i> I -	GCGCTCGAGTCAATAGTTTGAACGACCTC
699	<i>RRP3</i> no ATG <i>Bgl</i> III +	GCGCAGATCTAAAAATTTAAAATTAATCAATGAGC
701	<i>RFC2</i> no ATG <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCTTTGAAGGGTTTGGTCCAAAT
702	<i>RFC2</i> 3' <i>Xho</i> I/ <i>Ava</i> I -	GCGCTCGAGGTGATGTGCTGAGAAGATAAG
703	<i>RFC5</i> no ATG <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCTCATTGTGGGTAGATAAATAC
704	<i>RFC5</i> 3' <i>Xho</i> I/ <i>Ava</i> I -	GCGCTCGAGACTAAGATGCGTTAAATATCAG
705	<i>RPC40</i> no ATG <i>Bam</i> HI +	GCGGGATCCTCAAATATTGTGGGTATTGAATA
706	<i>RPC40</i> 3' <i>Xho</i> I/ <i>Ava</i> I -	GCGCTCGAGCCAATTCTACTAATACTAGAAG
707	<i>SUB2</i> no ATG <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCTCACACGAAGGTGAAGAAGATTT
708	<i>SUB2</i> 3' <i>Xho</i> I/ <i>Ava</i> I -	GCGCTCGAGCTAATTTTTTCCACTTCCCC
709	<i>TAF4</i> no ATG <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCGCAAATTCGCCGAAAAAGCCATC
710	<i>TAF4</i> 3' <i>Sal</i> I -	GCGCGTCGACTAAGCGACACCAACCGGCC
711	<i>FUS3</i> no ATG <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCCCAAAGAGAATTGTATACAATATATC
712	<i>FUS3</i> 3' <i>Sal</i> I -	GCGGTCGACGTCCGCGTCCTCAGCGGC
713	<i>DBP3</i> no ATG <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCACAAAGGAAGAAATCGCAGAC
714	<i>DBP3</i> 3' <i>Xho</i> I/ <i>Ava</i> I -	GCGCTCGAGAAAGTGGGCAGTTATAATAG
719	<i>RRP3</i> 3' <i>Sal</i> I -	GCGCGTCGACAAATAGGAAACGAATAAGAAATG
726	<i>RFC2</i> +	CATCCAATTATTAACCTTATTGGTTAAAATATCCCAACTCCG GATCCCCGGGTTAATTAA
727	<i>RFC2</i> -	ATTCTTACTTTATGTGCGCTCTATATTCAATTATATAAAGGA ATTCGAGCTCGTTTAAAC

728	<i>RPC40</i> +	GAATAAGGCTGAGTATTTGAAAACTGTCCAATTACCCAAC GGATCCCCGGGTAAATTA
729	<i>RPC40</i> -	TTAATATTTTTCTCAAAGTGTGTTTTTTTTATTAGTATGGAA TTCGAGCTCGTTTAAAC
730	<i>SUB2</i> +	CCCAGAAGAAGGCATTGATCCGTCCACTTATTTGAATAATC GGATCCCCGGGTAAATTA
731	<i>SUB2</i> -	TAATACAAAATCTTTATATAATCTATATAAAAACGTATCTG AATTCGAGCTCGTTTAAAC
732	<i>TAF4</i> +	TCAGACTATTATTTCAAAGGGTTATGCCAAGATCAGAGATC GGATCCCCGGGTAAATTA
733	<i>TAF4</i> -	TTTGAAACACTATACCTTTAAATATTATAGACAGTATAAGG AATTCGAGCTCGTTTAAAC
734	<i>FUS3</i> +	GAAAGACCTCAAGAACTCATTGGAACGAAATATTTAGTC GGATCCCCGGGTAAATTA
735	<i>FUS3</i> -	TGTATATGTATACATTGTTCTTCGGGTTGATATTTTAAATGGA ATTCGAGCTCGTTTAAAC
738	<i>RRP3</i> +	AAGAATGATGACAAGAGAGAATATGGACATGGGAGAAAGG CGGATCCCCGGGTAAATTA
739	<i>RRP3</i> -	AAGTTAAATTGAACTTTTGGGCGTTAAAAGGTAAACCATGG AATTCGAGCTCGTTTAAAC
740	<i>RFC2</i> Test +	CGGCAGGTGACTTGAGAAGAGGC
741	<i>RPC40</i> Test +	GCTAAGCTAAGGCCTGGTCAAG
742	<i>SUB2</i> Test +	CTACCACAAGAGCTAATGAG
743	<i>TAF4</i> Test +	GGTAGAAGAAGTGAAGTTTCTGCGGC
744	<i>FUS3</i> Test +	GACGGCCAATCTTCCCTGGCAGAG
746	<i>RRP3</i> Test +	GGCAGGTAAGAGGTCTATTCTCGTGGC
747	<i>DBP2</i> +	GAGAGATGGTGGCTGGGGTAACAGAGGTCGTTCAAACATC GGATCCCCGGGTAAATTA
748	<i>DBP2</i> -	ACTTATATAATTATTATTAATAGAGATGAATGAATTGAATG AATTCGAGCTCGTTTAAAC
749	<i>DBP2</i> Test +	GGGAGTCCAAACATGAATTTGTGGGGGGC
767	<i>RFC2-ΔN15</i> +	CGCGGATCCTTAGCCGCAGAGCAATC
768	<i>RFC2-N31</i> -	CGCCTCGAGCTAGTATTTCTCAACCCAGGG

2.2.4. Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

pGS-Nr.	Marker	Beschreibung	Herkunft
10	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T-1	Amersham-Pharmacia
40	<i>HIS3</i> <i>AMP^r</i>	pRS313	Laborkollektion
43	<i>URA3 AMP^r</i>	pRS316	Laborkollektion
139	<i>URA3 AMP^r</i>	YE _p GAL- <i>GST</i>	Laborkollektion
372	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	YC _p GAL- <i>SGFP-4G</i>	Laborkollektion
395	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-CSE1</i>	Laborkollektion
422	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	YC _p GAL- <i>NLS-GST-GFP</i>	Laborkollektion
459	<i>AMP^r</i>	pQE9- <i>SRP1</i>	Laborkollektion
468	<i>AMP^r</i>	pQE9- <i>HIS₆-GSP1Q71L</i>	K. Weis
506	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>NPL3</i>	Laborkollektion
519	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	YC _p GAL- <i>GFP-GFP</i>	Laborkollektion
552	<i>AMP^r</i>	pGEX-2T-TEV- <i>YRB1</i>	Laborkollektion
675	<i>AMP^r</i>	pQE9- <i>HIS₆-CSE1</i>	Laborkollektion
722	<i>AMP^r</i>	pQE9- <i>HIS₆-KAP95</i>	Laborkollektion
786	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-GSP1Q71L</i>	K. Weis
804	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T-TEV- <i>(XhoI)</i>	Laborkollektion
962	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4TEV-KAP95</i>	Laborkollektion
1006	<i>AMP^r</i>	pQE9- <i>HIS₆-PSE1</i>	Laborkollektion
1010	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-TEV-KAP104</i>	Laborkollektion
1011	<i>AMP^r</i>	pQE30- <i>HIS₆-KAP123</i>	Laborkollektion
1091	<i>AMP^r</i>	pQE60- <i>NMD5</i>	Laborkollektion
1164	<i>KAN^r</i>	pET249- <i>HIS₆-TEV</i>	Laborkollektion
1190	<i>AMP^r</i>	pQE30- <i>HIS₆-KAP114</i>	Laborkollektion
1441	<i>AMP^r</i>	pQE60- <i>KAP120-HIS₆</i>	Laborkollektion
1445	<i>AMP^r</i>	pBSIMP4 orf	Laborkollektion
1466	<i>URA3 AMP^r</i>	YE _p GAL- <i>GST-RPF1</i>	Laborkollektion
1475	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-RPP1</i>	Laborkollektion
1536	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pFA6a- <i>GFP(S65T)-HIS3MX6</i>	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)

1542	<i>AMP^r</i>	pQE30- <i>SXM1</i>	Laborkollektion
1553	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pFAG-S-TEV-ZZ- <i>HIS3MX6</i>	K. Weis
1604	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>HIS₆</i>	R. Zimmermann
1605	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>RNAI-HIS₆</i> Vektor: pGS1604 <i>BglII/NdeI</i> Insert: PCR von genom. DNA, Oligos 631/632	diese Arbeit
1727	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-RFC2</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/XhoI</i> Insert:PCR von genom. DNA, Oligos 701/702	diese Arbeit
1728	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-RFC5</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/XhoI</i> Insert:PCR von genom. DNA, Oligos 703/704	diese Arbeit
1729	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-RPC40</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/XhoI</i> Insert:PCR von genom. DNA, Oligos 705/706	diese Arbeit
1730	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-SUB2</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/XhoI</i> Insert:PCR von genom. DNA, Oligos 707/708	diese Arbeit
1731	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-TAF4</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/SalI</i> Insert:PCR von genom. DNA, Oligos 709/710	diese Arbeit
1732	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-FUS3</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/SalI</i> Insert:PCR von genom. DNA, Oligos 711/712	diese Arbeit
1733	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-DBP3</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/XhoI</i> Insert:PCR von genom. DNA, Oligos 713/714	diese Arbeit
1734	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-DBP2</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/XhoI</i> Insert:PCR von cDNA, Oligos 697/698	diese Arbeit
1735	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-RRP3</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/ SalI</i> Insert:PCR von genom. DNA, Oligos 699/719	diese Arbeit
1736	<i>AMP^r</i>	pGEX- <i>GST-4T-IMP4</i> Vektor:pGS804 <i>BamHI/XhoI</i> Insert:pGS1445 <i>BglII/XhoI</i>	diese Arbeit
1757	<i>URA3 AMP^r</i>	YEpGAL- <i>GST-SUB2</i> Vektor: pGS139 <i>BamHI/SalI</i> Insert: pGS1730 <i>BamHI/XhoI</i>	diese Arbeit
1768	<i>LEU2</i> <i>AMP^r</i>	YCpGAL- <i>GFP-RFC2</i> Vektor: pGS372 <i>BamHI/SalI</i> Insert: pGS1727 <i>BamHI/XhoI</i>	diese Arbeit
1769	<i>LEU2</i> <i>AMP^r</i>	YCpGAL- <i>GFP-SUB2</i> Vektor: pGS372 <i>BamHI/SalI</i> Insert: pGS1730 <i>BamHI/XhoI</i>	diese Arbeit
1803	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	YCpGAL- <i>GFP-GFP-RFC2-N31</i> Vektor: pGS519 <i>BamHI/SalI</i> Insert: PCR von pGS1727, Oligos 701/768	diese Arbeit

1804	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	YCpGAL-GFP-RFC2-ΔN15 Vektor: pGS372 <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I Insert: PCR von pGS1727, Oligos 702/767	diese Arbeit
------	---------------------------------------	---	--------------

2.3. Organismen

2.3.1. Bakterienstämme

- *E. coli* JM101: *F' traD36 proA⁺ proB⁺ laq^q lacZΔM15/supE thi-1Δ(lac-proAB)* (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)
- *E. coli* BL21 (DE3) pLysS: *B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻m_B⁻) gal λ (DE3) [pLysS Cam^R]* (Studier *et al.*, 1990)
- *E. coli* M15: *Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺ [pREP4 Kan^R]* (Qiagen, Hilden)
- *E. coli* Rosetta (DE3): *F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm laq Y1 (DE3) pRARE (Cm^R)* (Novagen, Madison)
- *E. coli* Rosetta star:BL21 (DE3) Star + pRARE (Novagen, Madison)

2.3.2. Hefestämme

Tabelle 5: Stämme der Laborkollektion

GSY -Nr.	Beschreibung	Herkunft
6	MATα Paarungstyp-Testerstamm	Laborkollektion
7	MATa Paarungstyp-Testerstamm	Laborkollektion
154	MATα <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i>	A. Corbett
155	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i>	A. Corbett
158	MATa/α <i>ura3-52/-, leu2Δ1/-, his3Δ200/-, trp1Δ63/-</i>	A. Corbett
171	MATα <i>ura3-1 leu2-3,112 trp1Δ63 ade2-1 his3-11,15 can1-100</i>	G. Fink
202	MATα <i>ura3 leu2 his3 trp1 ade2 srp1-31 ts</i>	J. Loeb
203	MATα <i>ura3 leu2 his3 trp1 ade2 srp1-49 ts</i>	J. Loeb
432	MATα <i>ura3 leu2 his3 trp1 ade2 nup2Δ::ura3::HIS3</i>	J. Loeb
468	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 ade2 ade3 his3 rsl1-1 rna1-1 [pPS714 2μ URA3 ADE3 RNAI]</i>	D. Koepp
503	MATα <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 kap114::LEU2</i>	Laborkollektion

511	MAT α <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i> <i>kap120::TRP1</i>	Laborkollektion
527	MAT α <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i> <i>nmd5::TRP1 kap114::LEU2 kap120::URA3</i>	Laborkollektion
664	MAT α <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ63 ade2-1</i> <i>can1-100 ts srp1-54</i>	M. Nomura

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Mutante/Stammbezeichnung	Transformation von	Test
1127 [<i>CSE1-S-TEV-ZZ HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1553; Oligos 524/525; in GSY155	PCR mit Oligos 142/506; Immunoblot
1128 [<i>YRB1-S-TEV-ZZ HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1553; Oligos 526/527; in GSY155	PCR mit Oligos 98/506, 98/534, 526/534; Immunoblot
1129 [<i>YRB1-S-TEV-Z HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1553; Oligos 526/527; in GSY155	PCR mit Oligos 98/506, 98/534, 526/534; Immunoblot
1187 [<i>KAP114-S-TEV-ZZ HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1553; Oligos 388/389; in GSY171	PCR mit Oligos 390/534, 390/8; Immunoblot
1188 [<i>KAP120-S-TEV-ZZ HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1553; Oligos 394/395; in GSY171	PCR mit Oligos 396/534, 693/694; Immunoblot
1220 [<i>IMP4-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 434/435; in GSY155	PCR mit Oligos 432/420; Immunoblot
1221 [<i>nmd5::TRP1 kap114::LEU2</i> <i>kap120::URA3</i> <i>IMP4-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 434/435; in GSY527	PCR mit Oligos 432/420; Immunoblot
1222 [<i>RPC40-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 728/729; in GSY155	PCR mit Oligos 741/420; Immunoblot
1223 [<i>kap114::LEU2</i> <i>RPC40-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 728/729; in GSY503	PCR mit Oligos 741/420; Immunoblot
1224 [<i>kap120::URA3</i> <i>RPC40-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 728/729; in GSY511	PCR mit Oligos 741/420; Immunoblot
1225 [<i>nmd5::TRP1 kap114::LEU2</i> <i>kap120::URA3</i> <i>RPC40-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 728/729; in GSY527	PCR mit Oligos 741/420; Immunoblot
1226 [<i>SUB2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 730/731; in GSY155	PCR mit Oligos 742/420; Immunoblot
1227 [<i>kap114::LEU2</i> <i>SUB2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 730/731; in GSY503	PCR mit Oligos 742/420; Immunoblot

1228 [<i>nmd5::TRP1 kap114::LEU2 kap120::URA3 SUB2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 730/731; in GSY527	PCR mit Oligos 742/420; Immunoblot
1229 [<i>TAF4-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 732/733; in GSY155	PCR mit Oligos 743/420; Immunoblot
1230 [<i>kap114::LEU2 TAF4-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 732/733; in GSY503	PCR mit Oligos 743/420; Immunoblot
1231 [<i>kap120::URA3 TAF4-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 732/733; in GSY511	PCR mit Oligos 743/420; Immunoblot
1232 [<i>nmd5::TRP1 kap114::LEU2 kap120::URA3 TAF4-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 732/733; in GSY527	PCR mit Oligos 743/420; Immunoblot
1233 [<i>DBP2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 747/748; in GSY155	PCR mit Oligos 749/420; Immunoblot
1234 [<i>nmd5::TRP1 kap114::LEU2 kap120::URA3 DBP2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 747/748; in GSY527	PCR mit Oligos 749/420; Immunoblot
1235 [<i>RFC2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 726/727; in GSY155	PCR mit Oligos 740/420; Immunoblot
1236 [<i>kap114::LEU2 RFC2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 726/727; in GSY503	PCR mit Oligos 740/420; Immunoblot
1237 [<i>kap120::URA3 RFC2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 726/727; in GSY511	PCR mit Oligos 740/420; Immunoblot
1238 [<i>nmd5::TRP1 kap114::LEU2 kap120::URA3 RFC2-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 726/727; in GSY527	PCR mit Oligos 740/420; Immunoblot
1239 [<i>FUS3-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 734/735; in GSY155	PCR mit Oligos 744/420; Immunoblot
1240 [<i>kap114::LEU2 FUS3-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 734/735; in GSY503	PCR mit Oligos 744/420; Immunoblot
1241 [<i>kap120::URA3 FUS3-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 734/735; in GSY511	PCR mit Oligos 744/420; Immunoblot
1242 [<i>nmd5::TRP1 kap114::LEU2 kap120::URA3 FUS3-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 734/735; in GSY527	PCR mit Oligos 744/420; Immunoblot
1246 [<i>YRB1-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 526/527; in GSY155	PCR mit Oligos 98/420; Immunoblot
1247 [<i>CSE1-GFP HIS3</i>]	Longtine-PCR von pGS1536; Oligos 524/525; in GSY155	PCR mit Oligos 142/420; Immunoblot

2.4. Nährmedien

2.4.1. Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	

LB-Ampicillin-Platten:	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Bacto-Agar	15 g
	1 M NaOH	1 ml
in 1 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert		

Das Medium zum Gießen der Agarplatten wurde autoklaviert und unter Rühren auf ca. 50°C abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml Ampicillin-Lösung wurde es in Petrischalen gegossen, welche bei 4°C gelagert wurden, nachdem sich der Agar verfestigt hatte.

TB-Medium:	Bacto-Trypton	6 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	12 g
	Glycerin 50%	4 ml
	in 450 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
nach dem Abkühlen Zugabe von 50 ml Kaliumphosphatpuffer (0,89 M, pH 7,4)		

Kaliumphosphatpuffer 0,89M:	KH ₂ PO ₄	23,1 g
	K ₂ HPO ₄	125,4 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest.} , pH 7,4, autoklaviert	

Zur Kultivierung plasmidtragender *E. coli*-Stämme wurde dem Medium je 1 ml der entsprechenden Antibiotikumlösung pro 1 l Medium zugesetzt.

Ampicillin-Lösung:	Ampicillin	100 mg/ml
	in H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	
Kanamycin-Lösung:	Kanamycin	25 mg/ml
	in H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	
Chloramphenicol-Lösung:	Chloramphenicol	34 mg/ml
	in Ethanol, sterilfiltriert	

Die Antibiotikumlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.4.2. Nährmedium zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

YPD-Medium:	Bacto-Pepton	20 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	10 g
	Dextrose	20 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	

Es wurde gegebenenfalls Antifoam A oder 204 (Verdünnung 1:10000) zugesetzt.

YPD-Platten:	Bacto-Pepton	20 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	10 g
	Dextrose	20 g
	Bacto-Agar	20 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	

YPD _{Ade} -Platten:	Bacto-Pepton	20 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	10 g
	Dextrose	20 g
	L-Adeninlösung (30 mM)	10 ml
	Bacto-Agar	20 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	

Das Medium wurde nach dem Autoklavieren in Petrischalen gegossen und die Platten nach dem Festwerden bei 4°C gelagert.

Selektivmedium:	“Yeast Nitrogen Base“	6,7 g
	Aminosäure-Mix	2,0 g
	(-2, -4 oder -7)	
	entsprechende	
	Aminosäurelösungen	10,0 ml
in 0,9 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert		

Vor dem Benutzen wurde entweder 100 ml Glukose-, Galaktose- oder Raffinose-Lösung (20%ig) zugegeben.

Selektivplatten:	A: Bacto-Agar	20,0 g
	in 0,75 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
	B: "Yeast Nitrogen Base"	6,7 g
	Aminosäure-Mix (-2, -4 oder -7) entsprechende Aminosäurelösung	2,0 g 10,0 ml
in 0,15 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert		

Die Lösungen A und B wurden nach dem Autoklavieren auf ca. 50°C abgekühlt und vereinigt. Danach wurden 100 ml 20%ige Glukose- oder Galaktose-Lösung zugegeben und das Medium in Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem Festwerden bei 4°C gelagert.

Aminosäuremix:

Adeninsulfat	5 g	L-Histidin	10 g
<i>para</i> -Aminobenzoesäure	1 g	L-Isoleucin	10 g
<i>myo</i> -Inositol	10 g	L-Leucin	50 g
Uracil	10 g	L-Lysin	10 g
L-Alanin	10 g	L-Methionin	10 g
L-Arginin	10 g	L-Phenylalanin	10 g
L-Asparagin	10 g	L-Prolin	10 g
L-Aspartat	10 g	L-Serin	10 g
L-Cystein	10 g	L-Threonin	10 g
L-Glutamin	10 g	L-Tryptophan	10 g
L-Glutamat	10 g	L-Tyrosin	10 g
L-Glycin	10 g	L-Valin	10 g

Die Aminosäuren/ Nukleinbasen wurden in einem Mörser miteinander verrieben. Zur Herstellung der Aminosäuremixe -2 [Uracil, Leucin], -4 [Uracil, Leucin, Histidin, Tryptophan] und -7 [Uracil, Leucin, Histidin, Tryptophan, Methionin, Lysin, Adenin] wurden die entsprechenden Aminosäuren/ Nukleinbasen weggelassen. Fehlende Aminosäuren/ Nukleinbasen wurden aus den unten aufgeführten Lösungen mit 10 ml/l ergänzt.

Tabelle 7: Aminosäure-/ Nukleinbasenlösungen für Selektivmedien

Aminosäure/ Nukleinbase	Konzentration [g/200 ml]	Konzentration [mM]
L-Uracil	0,45	20
L-Leucin	2,63	100
L-Tryptophan	1,64	40
L-Histidin	4,20	100
L-Methionin	5,97	200
L-Lysin	3,65	100
L-Adenin	1,10	30

Die Aminosäurelösungen wurden bei 4°C gelagert. Die Adenin- und Uracil-Lösung wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die Bestimmung des Paarungstyps (vgl. 2.6.1) wurden B-Platten verwendet:

B-Platten:

„Yeast Nitrogen Base“	6,7 g
Bacto-Hefeextrakt	1,0 g
D-Glukose	0,5 g
Agar	20,0 g
in 0,9 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	

Nach dem Autoklavieren wurden 100 ml Glukoselösung (20%) zugegeben. Das Medium wurde in Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem Festwerden bei 4°C gelagert.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmidminipräparation

GTE-Lösung:

Glukose	50 mM
Tris pH 8,0	25 mM
EDTA	10 mM
in H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	

NaOH/SDS-Lösung:

NaOH	200 mM
SDS	1 %
in H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	

TE-Puffer pH 8,0:	Tris pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
RNase A (10 mg/ml):	RNase A	10 mg/ml
	Tris pH 7,5	10 mM
	NaCl	10 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , 15 min bei 100°C im Wasserbad gekocht	

Die Plasmidminipräparation wurde mittels alkalischer Lyse nach der modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde für mindestens 7 Stunden in 2 ml TB-Medium mit Ampicillin (Konzentration 100 mg/ml, Endverdünnung 1:1000) unter Rollen bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 s bei 15800 x g geerntet und das gewonnene Pellet durch Vortexen in 100 µl GTE-Lösung suspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 200 µl frischer NaOH/SDS-Lösung und Mischen durch mehrmaliges Umschwenken. 150 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 neutralisierten den pH-Wert. Durch Hinzufügen von 400 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließendes Vortexen wanderten die meisten Zellbestandteile in die organische Phase, während die DNA in der wässrigen Phase verblieb. Nach 2 min Zentrifugation bei 15800 x g wurde die obere wässrige Phase mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA abgenommen, die DNA mit 1 ml 96% Ethanol gefällt, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 2 min bei 15800 x g zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer pH 8,0/ RNase A-Lösung (RNase A-Endkonzentration 50 µg/ml) aufgenommen, für 3 min bei 55°C gelöst und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

2.5.2. Isolierung von DNA aus *S. cerevisiae*

Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

“Cracking”-Puffer:	Triton X-100	2 % (v/v)
	SDS	1 % (w/v)
	NaCl	100 mM
	Tris pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	

Die Hefezellen wurden in 2 ml YPD_{Ade}- oder dem entsprechenden Selektivmedium über Nacht kultiviert. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 15800 x g für 5 s. Nach Resuspendieren des Pellets in 200 µl H₂O_{bidest} sowie Zugabe von 200 µl “Cracking“-Puffer und 1 - 2 Spatelspitzen Glasperlen wurde die enthaltene DNA durch Extraktion der übrigen Zellbestandteile mit 400 µl Phenol-Chloroform abgetrennt. Der Ansatz wurde für 5 min gevortext und bei 15800 x g für 2 min zentrifugiert. Zum klaren Überstand wurden 50 µl 7,5 M NH₄-Acetat und 500 µl 96%iges Ethanol gegeben. Der Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 15800 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Speedvac getrocknet und in 40 µl TE-Puffer pH 8,0 (siehe 2.5.1) gelöst.

2.5.3. Polymerasekettenreaktion

PCR zur Klonierung von DNA-Fragmenten

Für Klonierungspolymerasekettenreaktionen wurden die entsprechenden Oligonukleotid-Primer (siehe Tabelle 3), genomische bzw. im Falle von *DBP2* cDNA aus *S. cerevisiae* als Ausgangs-DNA und *Pwo* als Polymerase eingesetzt. Dieses Enzym wird aus *Pyrococcus woesei* isoliert. Es besitzt eine deutlich höhere Temperaturstabilität als *Taq* (siehe unten) und zusätzlich eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität (sog. “proofreading“) erlaubt. Die Anzahl der Amplifikationszyklen lag zwischen 30 bis 35 und die Dauer des Elongationsschritts richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments (1 min pro 1000 bp).

Die PCR-Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

PCR-Ansatz:	10,0 µl	10-fach <i>Pwo</i> -Puffer ohne MgSO ₄
	8,0 µl	MgSO ₄ (25 mM)
	2,0 µl	dNTPs (10 mM jedes Nukleotids)
	je 1,0 µl	Oligonukleotide (50 pM)
	0,5 µl	Matrizen-DNA
	0,5 µl	<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)
	77,0 µl	H ₂ O _{bidest} .

Anschließend wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe des “High pure PCR product purification kits” nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

PCR zur Integration genomischer Modifikationen

Bei dieser Art der Polymerasekettenreaktion wurden Gen-Kassetten amplifiziert, die gezielt ins Hefegenom integriert wurden. Dazu wurden bispezifische Oligonukleotid-Primer und das

“Expand high fidelity“-System benutzt, welches *Taq*-DNA-Polymerase und *Pwo*-DNA-Polymerase (siehe oben) als Mischung enthält. *Taq* wird aus *Thermus aquaticus* isoliert, einem hitzestabilen Bakterienstamm, der in 70°C heißen Quellen wächst. Der Vorteil der Kombination beider Enzyme liegt in der hohen Prozessivität der *Taq* (35-1000 Basen je Anlauf) und der um etwa Faktor 10 geringeren Fehlerrate der *Pwo*. Für die Reaktion wurden die Plasmide pGS1536 und pGS1553 (siehe Tabelle 4) verwendet. Die Zahl der Amplifikationszyklen betrug 35.

Die PCR-Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

PCR-Ansatz:	10,0 µl	10-fach Puffer P1
	2,0 µl	dNTPs (10 mM jedes Nukleotids)
	je 1,0 µl	Oligonukleotide (50 pM)
	1,0 µl	Matrizen-DNA
	0,5 µl	Expand-DNA-Polymerase (5 U/µl)
	84,5 µl	H ₂ O _{bidest.}

Vor der weiteren Verwendung wurde die mittels PCR amplifizierte DNA mit Hilfe des “High pure PCR product purification kits” nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

PCR zur Überprüfung genomischer Modifikationen

Um die Richtigkeit und Stabilität der genomischen Integration einer solchen Gen-Kassette zu überprüfen, wurde erneut eine PCR wie im vorangehenden Abschnitt durchgeführt. Als Ausgangs-DNA diente isolierte genomische DNA aus transformierten Hefezellen. Als Polymerase wurde wieder die des “Expand high fidelity“-Systems herangezogen. Da nur auf ein Vorhandensein des Ziel-Gens getestet werden sollte, reichten 50 µl PCR-Ansatz und das PCR-Produkt wurde nicht gereinigt, sondern es wurde direkt ein Aliquot auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

2.5.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die für den DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen bestmöglichen Bedingungen richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Bei der analytischen Spaltung wurden zu einem Gesamtansatz von 10 µl 0,5 - 1 µg DNA und 1 Unit pro Enzym (bis zu 3 Restriktionsendonukleasen), beim präparativen Verdau in einem Ansatz von 40 µl 2 - 4 µg DNA und 4 Units je Restriktionsendonuklease zugegeben. Beiden Mischungen wurde BSA zugesetzt, so dass man eine Endkonzentration von 0,1 mg/ml erhielt. Die Reaktionsansätze wurden zwischen 1 - 17 Stunden bei 37°C inkubiert und die Spaltung durch Hinzufügen von 6-fach-

DNA-Probenpuffer abgestoppt und im Agarose-Gel auf Vollständigkeit hin kontrolliert (vgl. 2.5.5).

Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Das Problem der Religation eines durch Restriktionsenzyme linearisierten Vektors kann verringert werden, indem man die Vektor-DNA dephosphoryliert. Dazu verwendet man üblicherweise alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (“calf intestine alkaline phosphatase“ (CIP)). Nach dem Restriktionsverdau bleiben an den 5'-Enden der DNA-Fragmente Phosphatreste zurück, die für die Ligation benötigt werden. Entfernt man diese Phosphatreste, kann keine Selbstligation des Vektors mehr stattfinden. Das Fragment, das man einfügen möchte, besitzt dagegen noch beide Phosphatreste und kann daher seinerseits mit der Vektor-DNA ligieren. Dazu wurden 0,5 µl alkalische Phosphatase (0,5 Units) zur präparativen Spaltung gegeben und für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 6-fach-DNA-Probepuffer gestoppt und das Vektor-Fragment im Agarose-Gel gereinigt (vgl. 2.5.5).

2.5.5. Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer:	Tris-Acetat	40,00 mM
	EDTA	1,00 mM
	in H ₂ O bidest.	
DNA-Probenpuffer (6-fach):	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol FF	0,25 % (w/v)
	Saccharose	40,00 % (w/v)
	in H ₂ O bidest.	
Ethidiumbromidlösung:	Ethidiumbromid	10 mg/ml
	in H ₂ O bidest.	

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, DNA-Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren. Dazu wurden 1,2 g Agarose mit 120 ml TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät aufgeköcht, bis sich die Agarose gelöst hatte, und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Daraus wurde mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kamms ein Gel mit Taschen gegossen. Sobald das Gel erstarrt war, wurde es in eine Elektrophoresekammer gelegt und solange TAE-Puffer zugegeben, bis

es knapp bedeckt war. Anschließend wurden dem Puffer, der mit der Anode in direktem Kontakt stand, 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugefügt. Die DNA-Proben wurden in 6-fach-DNA-Probenpuffer aufgenommen und in die Taschen pipettiert. Es wurde eine Spannung zwischen 50 - 200 Volt angelegt. Sobald die DNA im elektrischen Feld ausreichend weit gewandert war, wurde sie auf einem UV-Tisch visualisiert oder mit Hilfe eines Imagers fotografiert. Zur Bestimmung der Größe der analysierten DNA-Fragmente wurde zusätzlich ein DNA-Längenstandard im Bereich von 500 bis 12000 bp aufgetragen.

Isolierung von DNA aus dem Agarosegel

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im Anschluss an die Gelelektrophorese auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Gelblöckchen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem 0,22 µm Sterilfiltereinsatz gegeben. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 15800 x g wurde das Volumen des Filtrates bestimmt und die DNA gefällt. Dazu wurde die Lösung mit 1/10 ihres Volumens an 3 M Natriumacetat pH 5,2 und dem 2,5-fachen Volumens an Ethanol_{abs} versetzt. Es schloss sich eine Inkubation für 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C an. Danach wurde der Ansatz für 20 min bei 4°C und 15800 x g zentrifugiert, das Präzipitat mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in der Speedvac in TE-Puffer pH 8,0 (siehe 2.5.1) aufgenommen.

2.5.6. Ligation

Die Ligation ist der letzte Schritt bei der Konstruktion eines rekombinierten DNA-Moleküls. Bei der Verknüpfung des Vektors mit der DNA, die man klonieren möchte, bilden ihre klebrigen Enden Wasserstoffbrücken-Bindungen der komplementären Basen aus.

In einem Gesamtansatz von 10 µl wurde das zu klonierende DNA-Fragment im Überschuss zum Vektor eingesetzt. Als Kontrolle für die Religationsrate wurde auch ein Ansatz ohne "insert" zusammen pipettiert. Die Reaktion wurde durch 2,5 Units T₄-DNA-Ligase katalysiert und lief über Nacht bei 25°C. Bei dem ebenfalls benutzten "Rapid DNA Ligation-Kit" war der Ablauf ähnlich. Es wurden 5 Units T₄-DNA-Ligase eingesetzt. Allerdings war eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur ausreichend. Beide Ligationsansätze wurden anschließend für eine Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.5.7. Transformation von *E. coli*

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Puffer 1:	Kaliumacetat	30 mM
	RbCl	100 mM
	CaCl ₂	10 mM
	MnCl ₂	50 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 5,8 eingestellt mit Essigsäure, sterilfiltriert	
Puffer 2:	MOPS	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerin	15 %
		in H ₂ O _{bidest.} , pH 6,5 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert

E. coli-Zellen, die man in eine eisgekühlte Salzlösung bringt, nehmen DNA wesentlich wirksamer auf als unbehandelte Zellen. Warum dies so ist, ist nicht genau klar. Bekannt ist aber, dass dabei nur die DNA-Bindung an die Außenseite der Zelle beeinflusst wird, nicht die eigentliche Aufnahme ins Cytoplasma.

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Hanahan (1983). 10 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie des jeweiligen *E. coli*-Stammes von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht unter Rollen bei 37°C inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 weiter bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Kultur wurde in Zentrifugenbechern für 5 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 4°C und 6370 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml Puffer 1 auf Eis resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 8 ml Puffer 2 resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz betrug zwischen 10⁵ - 10⁷ cfu pro µg Bluescript-DNA.

Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Zunächst wurden 100 µl der zu transformierenden Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid-Lösung vermengt. Der Ansatz wurde eine halbe Stunde auf Eis stehen gelassen und dann einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 45 - 90 s

unterzogen. Nach Inkubation für 1 min auf Eis wurde die Zellsuspension mit 500 µl LB-Medium vermischt und für 30 - 60 min bei 37°C unter Rollen inkubiert. Der Ansatz wurde entweder auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert oder diente zum Animpfen einer größeren Flüssigkultur. Beides wurde bei 37°C bebrütet.

2.5.8. Transformation von *S. cerevisiae*

Herstellung kompetenter Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode

Lithiumacetat/TE:	Lithiumacetat	100 mM
	Tris pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	

Zur Herstellung von kompetenten Hefezellen wurde eine Methode von Ito *et al.* (1983) angewandt. Dabei wurde eine Über-Nacht-Kultur (YPD- oder Selektivmedium) angeimpft und bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Hatten die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 erreicht, wurden sie durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 913 x g geerntet. Das Pellet wurde in der Hälfte des Ausgangsvolumens an Lithiumacetat/TE aufgenommen, erneut wie oben zentrifugiert, um wieder in 1/100 des Ausgangsvolumens resuspendiert zu werden. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung spätestens am nächsten Tag bei 4°C verwahrt.

Transformation von DNA in Hefezellen

PEG-Lösung:	Lithiumacetat	100 mM
	Tris pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	PEG 3300	40 % (w/v)
	in H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	

6 µl Lachssperma-DNA (4,2 mg/ml) wurden bei 95°C für 3 min denaturiert und danach sofort für 1 min auf Eis inkubiert. 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines gereinigten PCR-Produktes und 50 µl kompetente Hefezellen wurden hinzupipettiert. Zur Kontrolle wurde auch eine Mixtur ohne die zu integrierende DNA angesetzt. Die Suspension wurde mit 350 µl PEG-Lösung vermischt und die Zellen bei 30°C für 30 min unter Rollen inkubiert. Es wurden 35 µl DMSO hinzugefügt, geschüttelt und die Zellen einem 15-minütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, gefolgt von einer 3-minütigen Zentrifugation bei 720 x g. Das Pellet wurde in 500 µl YPD_{Ade}-Medium resuspendiert und für 1 h bei 30°C unter Rollen inkubiert. Die Zellen wurden danach einmal mit 500 µl TE-Puffer pH 7,5

gewaschen, anschließend in 50 µl des gleichen Puffers resuspendiert und auf die jeweiligen Selektivplatten ausplattiert. Die beimpften Platten wurden bei 30°C inkubiert.

2.6. Hefegenetische Methoden

2.6.1. Bestimmung des “mating type“ von Hefestämmen

Zur allgemeinen Kontrolle wurden die Stämme GSY1127, 1128, 1129, 1246 und 1247 einem Test zur Bestimmung des Paarungstyps unterzogen. Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten überführt, wo jeder Stamm in 150 µl sterilem H₂O_{bidest.} suspendiert wurde. Anschließend wurden die Stämme mittels eines “replica-platers 8x6“ auf YPD-Platten gestempelt und diese bei 30°C inkubiert. Zuvor wurden frische Kulturen der Testerstämme GSY6α und GSY7a auf YPD-Platten so angelegt, dass die Stämme gleichmäßig auf den Platten ausplattiert waren. Diese Stämme tragen ausschließlich spezielle Auxotrophien, die ansonsten nicht als genomische Marker verwendet wurden, nämlich GSY7 MATa *hom3* und GSY6 Matα *lys1*. Anschließend wurde zunächst je ein Testerstamm, dann die zu testenden Stämme auf ein steriles Samttuch auf einem Replika-Block übertragen und auf eine frische YPD-Platte überstempelt, die über Nacht bei 30°C inkubiert wurde. Besaß nun der zu testende Stamm einen zum Testerstamm entgegengesetzten Paarungstyp, so kam es zum “mating“ zwischen den beiden Stämmen. Die Zellen wurden von dieser Platte über ein steriles Samttuch auf einem Replika-Block auf eine B-Platte übertragen und diese über Nacht bei 30°C inkubiert. War ein “mating“ zwischen dem zu testenden Stamm und dem Testerstamm erfolgt, so wurde sowohl die Auxotrophie des Testerstammes wie auch die Auxotrophien des zu testenden Stammes komplementiert, so dass ein prototropher Stamm entstand, der auf B-Platten, die keine Aminosäuren enthielten, wachsen konnte.

2.7. Mikroskopische Untersuchungen

2.7.1. *In vivo*-Mikroskopie

In lebenden Hefezellen wurde die Lokalisation von Proteinen mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus einer Quallenart bestimmt, welches, durch UV-Licht angeregt, grünes Licht abstrahlt. Dazu wurden Fusionsproteine verwendet, deren Gene plasmidkodiert unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors oder unter der Kontrolle des endogenen Promotors aus dem Hefegenom standen und konstitutiv exprimiert wurden.

Letztere wurden nach der Methode nach Longtine (Longtine *et al.*, 1998) (vgl. 2.5.3) ins Hefegenom integriert.

Bei plasmidkodierten Fusionsproteinen wurden die Zellen der transformierten Hefestämme in Selektivmedium mit 2% Glukose angezogen, in dem gleichen Selektivmedium mit 2% Raffinose 1:200 verdünnt und über Nacht bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase unter Schütteln kultiviert. Die Synthese der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 2% Galaktose für 1 - 4 Stunden induziert. Fusionsproteine, deren Gene ins Genom integriert waren, wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in dem jeweiligen Selektivmedium kultiviert.

Wenn es sich um einen temperatursensitiven Hefestamm handelte, wurden die Zellen zunächst bei der permissiven Temperatur von 25°C kultiviert und eine Probe davon entnommen. Dann wurden die Zellen für 1 - 2 h bei der restriktiven Temperatur von 37°C kultiviert und es wurde wieder eine Probe entnommen. Von der Kultur wurden 10 µl auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und im Mikroskop untersucht. Die Hefezellen wurden mit einer digitalen Kamera aufgenommen.

2.7.2. Indirekte Immunfluoreszenz

PBS (10 x):	NaCl	90,00 g
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3,17 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	17,80 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000,00 ml
	pH 7,3, sterilfiltriert	
PBS/Sorbitol:	Sorbitol	20,10 g
	PBS (10 x)	10,00 ml
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100,00 ml, sterilfiltriert
BSA/PBS:	BSA	20,00 mg
	PBS (10 x)	1,00 ml
	Na-Azid (20%)	10,00 µl
	H ₂ O _{bidest.}	ad 10,00 ml, sterilfiltriert
Antibleichreagens:	p-Phenylendiamin	10,00 mg
	PBS (10 x):	1,00 ml
	Glycerin (87%)	9,00 ml

Hefestämme vom Wildtyp bzw. mit ins Genom integrierten Fusionsproteinen wurden über Nacht in dem entsprechenden Medium bei 30°C unter Rollen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1,0 inkubiert. 5 ml davon wurden mit 600 µl 37%iger Formaldehyd-Lösung gemischt und 1 h bei 30°C weiterinkubiert. Daraufhin wurde die Suspension bei 4°C und 720 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml PBS/Sorbitol gewaschen und schließlich in 1 ml PBS/Sorbitol aufgenommen. Durch Zugabe von 2 µl Zymolyase-Lösung (10 mg/ml) und leichtem Schwenken bei 30°C für 30 min wurde die Zellwand leicht verdaut. Die Hefezellen wurden bei 720 x g für 3 min zentrifugiert, mit 1 ml PBS/Sorbitol-Lösung wiederum gewaschen und in 100 - 500 µl PBS/Sorbitol aufgenommen. 20 - 30 µl der Zellsuspension wurde auf die präparierten diagnostischen Objektträger ("Diagnostic microscope slide") gegeben (30 µl 0,2%ige Poly-L-Lysin-Lösung wurden in die Aussparungen pipettiert, 2 min ruhen gelassen, abgesaugt; die Aussparungen wurden 3 x mit H₂O_{bidest} gewaschen und getrocknet). Nach 30 s wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die Objektträger erst für 6 min in kaltes Methanol, dann für 30 s in kaltes Aceton überführt und anschließend getrocknet. Zwecks Blockierens wurden die Zellen für 1 h mit BSA/PBS behandelt, gefolgt von einer Über-Nacht-Inkubation mit Erst-Antikörper in einer feuchten Kammer. Daran schloss sich eine Reaktion mit dem Zweitantikörper (FITC/TexasRed anti-rabbit, 1:1000) für ca. 6 h an. Dann wurde einmal mit BSA/PBS gewaschen, für 30 sec mit DAPI (1 mg/ml, 1:1000 verdünnt in BSA/PBS) inkubiert, 3 x gewaschen und die Objektträger getrocknet. Nachdem ausreichend Antibleichreagens aufgetragen worden war, wurden Deckgläser aufgelegt, die Objektträger mit Nagellack verschlossen und bei -20°C aufbewahrt.

2.8. Biochemische Methoden

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

Das Biorad-Gelsystem

5-fach Laufpuffer:	Tris	15,0 g
	Glycin	72,0 g
	SDS	5,0 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1,0 l
Elektrodenpuffer:	Tris	50,0 mM
	Glycin	384,0 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	in H ₂ O _{bidest.}	

2-fach SDS-Probenpuffer:	Tris (0,5 M, pH 6,8)	1,875 ml
	Glycerin (50%)	3,000 ml
	SDS	0,300 g
	Bromphenolblau	0,200 g
	2-Mercaptoethanol	0,750 ml
	H ₂ O _{bidest.}	1,875 ml

Die meisten Proteine binden SDS ("Sodium dodecyl sulfate") zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. SDS denaturiert die Proteine - besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol, welches im SDS-Probenpuffer nach Laemmli (Laemmli, 1970) enthalten ist - und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Bei der SDS-Elektrophorese trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe also nur noch nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf. In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Elektrophoresen mit niederprozentigen Sammel- und höherprozentigen Trenngelen durchgeführt. Neben den Fertiggele von Invitrogen (siehe unten) wurde die BioRad-Gelgießapparatur verwendet, mit der man Gele der Größe 90 x 80 x 1 oder 0,75 mm erhielt. Für den Aufbau der Apparatur gab es eine Anleitung des Herstellers. Die benötigten Lösungen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol wieder entfernt und das Sammelgel gegossen, in das ein Kamm zur Erzeugung der Taschen gesteckt wurde.

Tabelle 8: Pipettierschema für SDS-Gele

Komponenten		11		15	4%iges Sammelgel
		%iges Trenngel			
H ₂ O _{bidest.}	[ml]	1,82		1,15	1,525
Rotiphorese Gel 30	[ml]	1,83		2,5	0,325
1,5 M Tris pH 8,8	[ml]	1,25			-
0,5 M Tris pH 6,8	[ml]	-			0,625
10% SDS (w/v)	[ml]	50,00			25,000
10% AMPS (w/v)	[µl]	25,00			12,500
TEMED	[µl]	2,50			2,500

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 2-fach SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95°C inkubiert und für 10 sec bei 15800 x g zentrifugiert. Die Gele wurden in die Kammer eingesetzt, die Apparatur mit 1-fach Laufpuffer (BioRad-Gele) gefüllt und die vorbereiteten Proben aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurde ein Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen (10 kDa-Proteinmarker, "BenchMark Protein Ladder", "PageRuler Protein Ladder", "caleidoscopic" oder "PageRuler prestained protein Marker"). Die Elektrophorese der BioRad-Gele erfolgte für ca. 1 h bei 200 V, solange, bis die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau, in selteneren Fällen nach Vorum silbergefärbt (siehe 2.8.2).

Das Invitrogen-Gelsystem

MOPS SDS Running Buffer (20 x)	MOPS	210,0 g
	Tris Base	121,0 g
	SDS	20,0 g
	EDTA	7,4 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1,0 l

Die zu untersuchenden Proben wurden entweder in 2-fach SDS-Probenpuffer oder in NuPAGE LDS Sample Buffer (4 x) und NuPAGE Sample Reducing Agent (10 x) aufgenommen. In diesem Fall fand die Denaturierung der Proben nur bei 70°C für 10 min statt. Der Zusammenbau der Gelkammer, inklusive Fertiggel (NuPAGE Novex Bis-Tris Gel 4 - 12%), erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Als Laufpuffer diente MOPS SDS Running Buffer (1 x), direkt von der Firma Invitrogen oder selbst hergestellt. Für einen reduzierenden Lauf wurde noch NuPAGE Antioxidant (0,25%) zugesetzt. Auf das Gelsystem wurde eine Spannung von 200 V angelegt. Nach ca. 50 min war der Lauf beendet. Das Gel wurde entweder mit kolloidalem Coomassie oder nach Vorum (Mortz *et al.*, 2001) silbergefärbt (vgl. 2.8.2).

2.8.2. Färbung von Gelen

Standard-Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Coomassie-Färbelösung:	Coomassie R-250	2 g
	Coomassie G-250	50 mg
	Methanol	500 ml
	Eisessig	100 ml
	H ₂ O _{bidest}	400 ml

Entfärber 1:	Methanol	500 ml
	Eisessig	100 ml
	H ₂ O _{bidest.}	400 ml
Entfärber 2:	Methanol	100 ml
	Eisessig	50 ml
	H ₂ O _{bidest.}	850 ml

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel zunächst für 20 - 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Entfärber 1 entfärbte das Gel (mindestens 1 h) und zur Aufbewahrung wurde Entfärber 2 genommen. Nach dem Einscannen wurde das Gel für 30 min in 10%iger Glycerinlösung inkubiert und getrocknet.

Kolloidale Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Kolloidale Coomassie-Lösung	Methanol	340,00 ml
	Phosphorsäure (85%)	23,50 ml
	Ammoniumsulfat	170,00 g
	Coomassie G-250	0,66 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1,00 l

Methanol, Phosphorsäure und Coomassie G-250 wurden gemischt und auf ca. 550 ml mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Getrennt davon wurde das Ammoniumsulfat in ca. 400 ml H₂O_{bidest} aufgenommen und langsam zur ersten Lösung gegeben. Anschließend wurde auf 1 l mit H₂O_{bidest} aufgefüllt.

Das Gel wurde über Nacht mit kolloidalem Coomassie in Glasschalen (im Gegensatz zu Plastikschälchen kaum Anhaftung von Fremdprotein an der Gefäßwand und somit geringere Gefahr der Kontamination des Gels) gefärbt und mit H₂O_{bidest} wieder entfärbt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

Silberfärbung nach Vorum

Fixierer	Methanol	50 ml
	Essigsäure	12 ml
	Formalin	50 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

Sensibilisierungslösung	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,062 g
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 100,000 ml
Färbelösung	AgNO_3	0,4 g
	Formalin	76,0 μl
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 100,0 ml
Entwickler	Na_2CO_3	6 g
	Sensibilisierungslösung	1 ml
	Formalin	50 μl
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 100 ml

Das Natriumcarbonat wurde zunächst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst, dann wurden die übrigen Komponenten zugegeben.

Stopp-Lösung	Methanol	50 ml
	Essigsäure	12 ml
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 100 ml

Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag. Ein Reduktionsschritt mit Thiosulfat drückt die Nachweisgrenze von 5 ng auf 50 bis 100 pg Protein pro Bande. Allerdings ist es schwierig, die Färbung genau zu reproduzieren, und es wirkt sich nachteilig aus, dass verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben. Überdies ist die Silberfärbung keineswegs spezifisch für Proteine, sondern färbt auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide.

Die Vorgehensweise bei der Silberfärbung wird nachstehend erläutert. Bei jedem Schritt wurden jeweils 100 ml Lösung pro Gel genommen. Eingangs wurde für 2 h oder über Nacht in Glasschalen fixiert. Dann wurde 3 x mit 35%igem Ethanol für jeweils 20 min gewaschen, für 5 min sensibilisiert und wieder 3 x mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ für je 5 min gewaschen. Die Färbelösung blieb für 20 min auf den Gelen, bevor erneut 2 x mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen wurde. Nun wurde das Gel solange entwickelt, bis die Intensität der Färbung zufriedenstellend war. Die Reaktion wurde abgestoppt. Aufbewahrt wurden die Gele in 1%iger Essigsäure bei 4°C.

2.8.3. Präparation von Proteinproben zur massenspektrometrischen Analyse

Proben, die nach einem Bindungsversuch (vgl. 2.9) analysiert werden sollten, wurden in den meisten Fällen mit einem Fertigel von Invitrogen aufgetrennt und entweder mit kolloidalem Coomassie oder silbergefärbt (vgl. 2.8.2). Nach dem Scannen wurde das Gel unter möglichst sterilen Bedingungen mit einer sauberen Glasplatte auf einen Leuchttisch gelegt, um die einzelnen Banden besser sehen zu können. Von jeder interessanten Bande wurden mit einem sterilen Skalpell zwei 1 x 1 mm große Gelstückchen ausgeschnitten, jeweils in ein "Protein LoBind Tube" gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur massenspektrometrischen Analyse wurden die Proben auf Trockeneis an den Arbeitskreis von Prof. Albert Sickmann im Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg geschickt.

2.8.4. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen mit anschließender Immundetektion (Western Blot)

Transfer von Proteinen

Transferpuffer:	Glycin	7,2 g
	Tris	1,5 g
	H ₂ O _{bidest.}	1000 ml

Um Proteine spezifisch mit Antikörpern nachweisen zu können, müssen sie zuerst von einem SDS-Gel auf eine Membran transferiert werden. Nachstehende Komponenten waren für die Übertragung notwendig und wurden in folgender Reihenfolge übereinander gestapelt: Auf den Einsatz der Blot-Apparatur wurde ein mit Transferpuffer vollgesaugtes Schwämmchen gelegt, gefolgt von einem getränkten Filterpapier, dem Gel, der mit Methanol aktivierten und mit Transferpuffer äquilibrierten Membran und einem zweiten Filterpapier. An dieser Stelle wurden eventuell vorhandene Luftblasen ausgestrichen. Zum Abschluss wurde noch ein weiteres Schwämmchen oben aufgelegt und der Einsatz geschlossen. Dieser wurde in die Mini-Trans-Blot-Apparatur gegeben, so dass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode hin gelegen waren, mit Transferpuffer aufgefüllt und die Proteine unter Rühren und Eiskühlung bei einer Spannung von 100 V innerhalb einer Stunde transferiert.

Immunologische Detektion der Proteine

PBS (10 x):	NaCl	90,00 g
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3,17 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	17,80 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000,00 ml
	pH 7,3, sterilfiltriert	
PBST:	PBS (10 x)	25,0 ml
	Tween 20	625,0 µl
	H ₂ O _{bidest.}	225,0 ml
Blockierungslösung:	Magermilchpulver	2,5 g
	PBS (10 x)	5,0 ml
	H ₂ O _{bidest.}	45,0 ml

Vor der Reaktion der transferierten Proteine mit Antikörpern wurden die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit einer Blockierungslösung abgesättigt (1 h). Über Nacht wurde dann mit Erst-Antikörper bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot gewaschen (PBS für 2 min, 2 x PBST für 5 min, PBS für 2 min) und für 1 h in Zweit-Antikörper (Peroxidase-gekoppelt, 1:1000) geschwenkt. Beide Antikörper wurden mit Blockierungslösung verdünnt. Es wurde ein weiteres Mal wie oben gewaschen und mit den entsprechenden Chemikalien (ECL, ECL plus, SuperSignal) eine Chemilumineszenz oder Fluoreszenz erzeugt, die mit Röntgenfilmen oder mit Hilfe des Typhoon-Imagers detektiert wurden.

2.8.5. Quantifizierung von Proteinen**BioRad-Protein-Assay**

Diese Art der Proteinbestimmung beruht auf der Methode von Bradford (1976). Bei der Bindung von Coomassie G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Damit ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Bei der praktischen Durchführung wurden 10 µl Probe - gegebenenfalls noch mal verdünnt - mit 200 µl Biorad-Färbereagenz und 790 µl H₂O_{bidest} zusammen pipettiert, 5 min inkubiert und bei 595 nm vermessen, nachdem gegen einen Nullwert abgeglichen worden war. Die Proteinkonzentration ließ sich anhand einer BSA-

Eichgerade ermitteln. Mit diesem Verfahren wurden Gesamtproteingehalte von Hefelysaten und Konzentrationen von gereinigten Proteinen bestimmt.

Bestimmung der Extinktion bei 280 nm

Die Messung der Extinktion bei 280 nm beruht auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin bei dieser Wellenlänge. Bei bekannter Aminosäuresequenz kann mit Hilfe der Software Lasergene aus der Anzahl der aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsfaktor (AF) ermittelt werden. Die Proteinkonzentration in mg/ml ergibt sich aus dem Produkt von OD_{280} , dem AF und einem eventuellen Verdünnungsfaktor. Mit dieser Methode wurde die Konzentration von Lösungen gereinigter Proteine bestimmt.

$$\text{Konzentration [mg/ml]} = OD_{280} \times AF$$

2.8.6. Synthese von Proteinen

Synthese von Proteinen in *S. cerevisiae*

Tris-SO ₄ -Puffer:	Tris	100,00 mM
	DTT	10,00 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 9,4 mit H ₂ SO ₄ eingestellt, sterilfiltriert	
PBS (10 x):	NaCl	90,00 g
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3,17 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	17,80 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000,00 ml
	pH 7,3, sterilfiltriert	
PBS/Sorbitol:	Sorbitol	20,10 g
	PBS (10 x)	10,00 ml
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100,00 ml
	sterilfiltriert	
Hochsalz-PBS:	NaCl	1,00 M
	Na ₂ HPO ₄	20,00 mM
	NaH ₂ PO ₄	5,00 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 7,3, sterilfiltriert	

Für die Synthese von GST-Sub2 bzw. GST-Rpf1 in *S. cerevisiae* wurde das entsprechende Gen in einen YEpGAL-GST-Vektor kloniert, welcher in einen Hefestamm vom Wildtyp transformiert wurde. Dieser wurde verwendet, um 5 ml des -Ura-Mediums mit 2% Glukose anzupflanzen. Die Vorkultur wurde für 24 h bei 30°C unter Rollen inkubiert, am nächsten Tag in Selektiv-Medium mit 2% Raffinose auf eine OD₆₀₀ von 0,05 - 0,08 verdünnt und wiederum über Nacht bei 30°C und 250 rpm inkubiert. War eine OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 erreicht, wurde die Kultur mit 2% Galaktose versetzt und für weitere 4 - 6 h unter den gleichen Bedingungen geschüttelt. Dadurch wurde die Synthese des Fusionsproteins induziert. Die Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4420 x g geerntet, mit PBS/Sorbitol gewaschen und bei -80°C gelagert.

Um Lysat herzustellen, wurden ca. 1 g Zellen in 5 ml 100 mM Tris-SO₄-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 30°C unter Rollen inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 2060 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 5 ml PBS/Sorbitol aufgenommen und mit 10 mM DTT, 10 µl PLAC und 100 µl Zymolyase-100T (10 mg/ml) für 2 h bei 30°C unter Rollen inkubiert. Der Zellwandverdau wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach einem zufriedenstellenden Ergebnis wurde Tween 20 zu einer Endkonzentration von 0,2% zugegeben, woran sich eine Inkubation für 90 min bei 4°C anschloss. Nach Zentrifugation für 15 min bei 2060 x g und 4°C wurde der Überstand (Ü1) abgenommen und bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde in 5 ml kaltem Hochsalz-PBS aufgenommen und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 2060 x g und 4°C wurde erneut der Überstand (Ü2) abgenommen und bei -80°C gelagert. Der Proteingehalt von Überstand 1 und 2 sowie des resuspendierten Pellets wurde mit der Biorad-Methode (siehe 2.8.5) ermittelt. Um die Menge und Bindefähigkeit des Fusionsproteins zu überprüfen, wurden je 200 µl der Überstände mit je 30 µl zuvor dreimal mit PBSKMT gewaschener GSH-Sepharose für 1 h bei 4°C geschwenkt, anschließend wurde das Pellet wieder dreimal mit PBSKMT gewaschen, in 30 µl 2-fach SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Diese Ansätze sowie Proben von Ü1, Ü2 und deren Pellet wurden durch SDS-PAGE (vgl. 2.8.1) und Western Blot (vgl.2.8.4) analysiert.

Synthese von Proteinen in *E. coli*

Protease-Inhibitor-Mix (PLAC) (3 mg Protease-Inhibitor/ml):	Pepstatin A	12 mg
	Leupeptin	12 mg
	Antipain	12 mg
	Chymostatin	12 mg
	alle in je 1 ml DMSO gelöst und vereinigt	

Die optimalen Bedingungen für die Synthese der Fusionsproteine wurden zunächst in kleinerem Maßstab untersucht. Entscheidende Parameter waren dabei der zu verwendende *E. coli*-Stamm, die Temperatur (zwischen 15 und 37°C) und die Dauer der Synthese (1 - 3 h). War ein Fusionsprotein schlecht löslich, wurden bei der Induktion der Genexpression zusätzlich noch 2% Ethanol hinzugefügt.

Am Anfang wurde ein entsprechendes Expressionsplasmid in einen geeigneten *E. coli*-Stamm transformiert (siehe 2.5.7). Damit wurde eine Über-Nacht-Kultur in LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika angeimpft und bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am Tag darauf wurde diese Kultur in LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika 1:20 verdünnt und unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1 erreicht war. Durch Zugabe von 72 mg IPTG (Isopropylthiogalaktosid)/ Liter (0,3 mM) wurde die Genexpression unter den zuvor ermittelten Bedingungen induziert. Die Zellen wurden danach durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 4412 x g geerntet und in 35 ml pro l Zellkultur eines geeigneten Puffers (PBSKMT für GST-Fusionsproteine bzw. His₆-Lyse-Puffer für His₆-Fusionsproteine) aufgenommen.

Vor dem Zellaufschluss wurden 10 µl PLAC, ein Protease-Inhibitor-Mix, zugesetzt. Die Lyse erfolgte durch dreimalige Ultraschallbehandlung für 1 min mit je 3 min Pause zur Abkühlung der Probe. Die ultraschallbehandelten Zellen wurden für 30 min bei 4°C und 48254 x g zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wurde bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.8.7. Reinigung von Proteinen aus *E. coli*-Lysat

E. coli-Lysate mit GST- oder His₆-Fusionsproteinen wurden affinitätschromatographisch mit einer geeigneten Matrix gereinigt. Die so isolierten Proteine wurden entweder direkt verwendet oder über Ionenaustauschchromatographie weiter gereinigt.

Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen mit "His₆-Tag"

His ₆ -Lyse-Puffer:	Tris	50 mM
	NaCl	300 mM
	β-Mercaptoethanol	2 mM
	Imidazol	10 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 8,0, sterilfiltriert	
Wasch-Puffer:	Tris	50 mM
	NaCl	300 mM
	β-Mercaptoethanol	2 mM
	Imidazol	20 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 8,0, sterilfiltriert	
Ni-NTA-Elutions-Puffer:	Tris	50 mM
	NaCl	300 mM
	β-Mercaptoethanol	2 mM
	Imidazol	250 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 8,0, sterilfiltriert	

Pro 35 ml Zelllysat wurden 3 ml Ni-NTA-Agarose dreimal mit Lyse-Puffer gewaschen. Das Säulenmaterial wurde mit dem Lysat für 1 h bei 4°C unter Rollen inkubiert, so dass das Fusionsprotein daran binden konnte. Die Suspension wurde anschließend unter Beimengung weiteren Lyse-Puffers in eine Chromatographiesäule gegeben. Eine mit dem gleichen Puffer getränkte Fritte wurde vorsichtig auf das Säulenmaterial gesetzt. Die Säule wurde mit 50 ml Wasch-Puffer bei 4°C gewaschen und das gebundene Fusionsprotein bei 4°C in acht 1 ml-Fraktionen mit Ni-NTA-Elutionspuffer eluiert. Im BioRad-Assay (vgl. 2.8.5) wurden die Fraktionen bestimmt, die Fusionsprotein enthielten. Aus diesen Fraktionen wurde mit PD10- oder Zeba-Säulen (vgl. 2.8.8) das Imidazol entfernt, die so gereinigten Proteinlösungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Um die Reinheit und Menge des eluierten Proteins zu bestimmen, wurden von allen Fraktionen Proben für eine SDS-PAGE entnommen.

Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen mit “GST-Tag“

PBSKM:	MgCl ₂	1,0 mM
	KCl	3,0 mM
	NaCl	155,0 mM
	NaH ₂ PO ₄	5,0 mM
	Na ₂ HPO ₄	20,0 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 7,3, sterilfiltriert	
PBSKMT:	MgCl ₂	1,0 mM
	KCl	3,0 mM
	NaCl	155,0 mM
	NaH ₂ PO ₄	5,0 mM
	Na ₂ HPO ₄	20,0 mM
	Tween20	0,1 % (v/v)
in H ₂ O _{bidest.} , pH 7,3, sterilfiltriert		
GSH-Elutionspuffer:	Tris	50,0 mM
	Glutathion (reduzierte Form)	10,0 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 8,0, frisch angesetzt	

In diesem Fall wurden pro 35 ml Zelllysat 3 ml Glutathion-Sepharose 4B dreimal mit PBSKM gewaschen und mit dem Lysat für 1 h bei 4°C zwecks Bindung des Fusionsproteins gerollt. Diese Suspension wurde in eine Chromatographiesäule gegeben und PBSKM zugesetzt. Eine Fritte wurde in dem gleichen Puffer getränkt und vorsichtig auf das Säulenmaterial gesetzt. Daraufhin wurde die Säule mit 50 ml PBSKMT bei 4°C gewaschen und das Fusionsprotein bei 4°C in acht 1 ml-Fractionen mit GSH-Elutionspuffer eluiert. Im BioRad-Assay wurden die Fractionen ermittelt, die das Fusionsprotein enthielten. Aus diesen Fractionen wurde mittels PD10- oder Zeba-Säulen (vgl. 2.8.8) das Glutathion entfernt, bevor die Fractionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden. Zur Bestimmung der Reinheit und der Menge des eluierten Proteins wurden von allen Fractionen Proben für eine SDS-PAGE entnommen.

Lösungen zur Ionenaustauschchromatographie

Puffer 0 MonoQ:	Tris	25 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 8,0, sterilfiltriert	

Puffer A MonoQ:	Tris	25 mM
	NaCl	50 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 8,0, sterilfiltriert	
Puffer B MonoQ:	Tris	25 mM
	NaCl	1 M
	Glycerin	10% (v/v)
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 8,0, sterilfiltriert	
Puffer 0 MonoS:	K ₂ HPO ₄	25 mM
	KH ₂ PO ₄	25 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 6,8, sterilfiltriert	
Puffer A MonoS:	K ₂ HPO ₄	25 mM
	KH ₂ PO ₄	25 mM
	KCl	10 mM
	MgCl ₂	1 mM
	β-Mercaptoethanol	2 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 6,8, sterilfiltriert	
Puffer B MonoS:	K ₂ HPO ₄	25 mM
	KH ₂ PO ₄	25 mM
	KCl	1 M
	MgCl ₂	1 mM
	β-Mercaptoethanol	2 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 6,8, sterilfiltriert	

Bevor die Proteinlösung auf die Ionenaustauschersäule aufgetragen wurde, wurde ihre Salzkonzentration durch Verdünnen mit Puffer0 MonoS/MonoQ oder durch Umpuffern mit einer PD10 in Puffer 0 MonoS/ MonoQ auf weniger als 50 mM gesenkt. Für den Auftrag auf eine MonoS/ MonoQ HR5/5 (1 ml Säulenvolumen) bediente man sich eines 50 ml-“Superloops“ und des Äkta Explorers 100. Zunächst wurden mit 5 ml Puffer A MonoS/ MonoQ ungebundene Proteine von der Säule gewaschen. Dann wurde der Anteil von Puffer B MonoS/ MonoQ kontinuierlich zuerst über 20 ml von 0% auf 50% und dann über 10 ml auf 100% erhöht. Gewaschen wurde im Anschluss daran mit 5 ml Puffer B MonoS/ MonoQ und mit 5 ml Puffer A MonoS/ MonoQ reäquilibriert. Mit Beginn des Gradienten wurde der Säulendurchlauf in 1 ml-Fractionen gesammelt und der Proteingehalt durch kontinuierliche Messung der OD₂₈₀ in einem Elutionsprofil aufgezeichnet. Am Ende

des Laufs wurden die Protein enthaltenden Fraktionen anhand des Elutionsprofils ermittelt. Der Grad der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE bestimmt, wozu von jeder Fraktion 10 μ l abgenommen wurden. Anschließend wurden die Fraktionen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.8.8. Umpuffern, Entsalzung und Aufkonzentrieren

Gelfiltration mit PD10- und Zeba-Säulen

Die Gelfiltration oder Größenausschlusschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen einem Gelkompartiment und dem umgebenden Kompartiment. PD10- und Zeba-Säulen dienen zur Umpufferung von Volumina bis 2,5 ml bzw. 4 ml. Im Falle der PD10 wurde die Säule zunächst mit 10 ml des Ziel-Puffers bei 4°C äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung aufgegeben und 1 ml-Aliquots gesammelt. Nach dem Probenauftrag wurde der Ziel-Puffer hinzugefügt, bis man 8 Fraktionen erhalten hatte. Diese wurden quantifiziert (vgl. 2.8.5), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Benutzung der Zeba-Säulen richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

Dialyse

Es wurde ein Dialyseschlauch mit dem Ausschlussvolumen von 12 - 14 kDa in dem Puffer, in den umgepuffert werden sollte, für 10 min quellen gelassen. Die umzupuffernde Proteinlösung wurde luftblasenfrei in den an einem Ende mit einer Klemme verschlossenen Dialyseschlauch gefüllt. Nachdem auch das andere Ende mit einer Klemme verschlossen worden war, wurde der Schlauch unter Rühren entweder einmal für 2 h in dem 40-fachen Volumen an Dialysierpuffer inkubiert und, nachdem der Puffer gewechselt worden war, noch einmal über Nacht oder für 5 h in dem 1000-fachen Volumen an Dialysierpuffer. Danach wurde die dialysierte Lösung für 20 min bei $48400 \times g$ und 4°C zentrifugiert und bei -80°C gelagert.

Ultrafiltration

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurden diese in Vivaspin-Ultrafiltrations-Konzentratoren mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa eingefüllt und bei 4°C und $3000 \times g$ zentrifugiert, bis die gewünschte Konzentration erreicht war.

2.8.9. Herstellung polyklonaler Antikörper

Herstellung von Antiseren

Um einen polyklonalen Antikörper gegen Rna1 herzustellen, wurde ein Kaninchen mit dem Antigen immunisiert. Das Protein wurde in *E. coli* als His₆-Fusion synthetisiert und gereinigt (Abb. 8; vgl. 2.8.6 und 2.8.7). Die Injektion erfolgte im Abstand von vier Wochen mit je 500 µl Proteinlösung der Konzentration 0,7 mg/ml. 7 Tage nach jeder Immunisierung wurde dem Kaninchen Blut entnommen, aus dem 5 - 15 ml Serum gewonnen wurden. Sowohl die Immunisierung als auch die Gewinnung des Antiserums wurden von Dr. Nastainczyk (Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) durchgeführt.

Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper

Zur Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper wurde der Sulfo-Link-Kit mit den mitgelieferten Puffern und Lösungen verwendet. Darüber hinaus wurde der folgende Puffer benötigt:

Waschpuffer	Tris	50 mM
	NaCl	500 mM
	in H ₂ O _{bidest.} , pH 7,5, eingestellt mit HCl, sterilfiltriert	

Nach den Vorgaben des Herstellers wurden 5 mg des gereinigten Proteins über interne Cystein-Reste an das Sulfo-Link-Säulenmaterial gekoppelt. Das Serum, das den gewünschten Antikörper enthält, wurde mit EDTA zu einer Endkonzentration von 5 mM versetzt und für 30 min bei 48400 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht kontinuierlich über die Säule mit dem gekoppelten Protein gepumpt. Am nächsten Tag wurde die Säule einmal mit 10 ml PBS und dann mit Waschpuffer so lange gewaschen, bis die OD₂₈₀ des Eluates < 0,01 war. Anschließend wurde mit jeweils 5 ml 100 mM Glycin pH 2,2 unter Rühren in 365 µl Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8) so lange eluiert, bis die OD₂₈₀ des Eluates < 0,5 war. Die Eluate wurden gegen PBS dialysiert (vgl.2.8.8), in 500 µl-Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

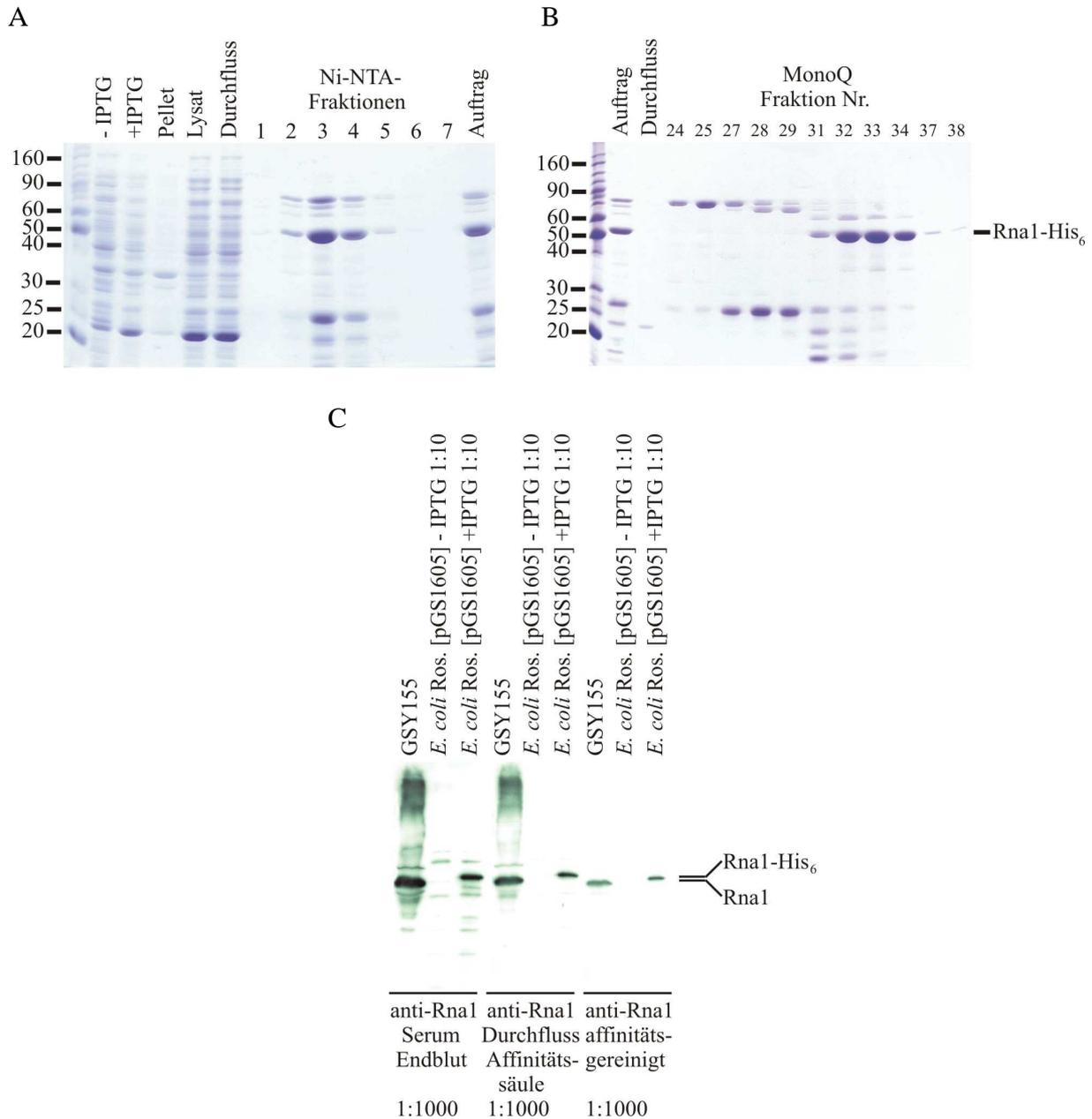


Abb. 8: Synthese von Rna1 und Affinitätsreinigung eines polyklonalen Antikörpers gegen Rna1

(A) *E. coli* Rosetta-Zellen wurden mit pGS1605 transformiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1. Nach Entnahme einer Probe (-IPTG) wurde die Synthese von Rna1-His₆ durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,3 mM) induziert und die Zellen für 1 h bei 37°C weiter kultiviert. Dann wurde erneut eine Probe entnommen (+IPTG). Nun wurde ein Gesamtzelllysate (Lysat) hergestellt und daraus das Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose gereinigt. Vom Durchlauf der Säule sowie den unlöslichen Bestandteilen (Pellet) wurden ebenfalls Proben analysiert. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau detektiert. (B) Das Eluat der Ni-NTA-Säule wurde vereinigt und auf eine MonoS HR 5/5-Säule aufgetragen. Das Protein wurde mit einem Salzgradienten eluiert und in 1 ml-Fractionen gesammelt. Die daraus entnommenen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. (C) Aus Hefewildtypzellen (GSY155) und mit pGS1605 transformierten *E. coli* Rosetta-Zellen (vor und nach Induktion der Proteinsynthese) wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Die *E. coli*-Lysate wurden 1:10 mit SDS-Probenpuffer verdünnt, die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde eine Immundetektion mit Antiserum und mit affinitätsgereinigten Rna1-spezifischen Antikörpern bzw. dem Durchfluss der Reinigung (alle drei 1:1000 in Blockierungslösung) als Primärantikörpern durchgeführt.

Die Effizienz der Reinigung wurde in einer SDS-PAGE (vgl. 2.8.1) mit anschließender Immundetektion (vgl. 2.8.4) überprüft. Als Erstantikörper wurden das für die Reinigung eingesetzte Serum, der Durchfluss und der gereinigte Antikörper zum Vergleich eingesetzt, mit denen dann Proteine aus *E. coli*- bzw. *S. cerevisiae*-Lysaten detektiert wurden (Abb. 8).

2.8.10. Herstellung von Lysat aus Hefezellen

Präparation von Hefelysat für Immunoblots

Hefezellen wurden in entsprechendem Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 kultiviert. 4 OD₆₀₀-Einheiten wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 1430 x g geerntet. Das Pellet wurde in 0,5 ml 0,25 mM NaOH/ 1% 2-Mercaptoethanol resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert, mit 80 µl kalter Trichloressigsäure (50%ig) versetzt und wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei 4°C und 7200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 0,5 ml kaltem Aceton gewaschen, nach dem Trocknen in der Speedvac in 95 µl SDS-Probenpuffer mit 5 µl Tris-Base resuspendiert (1 M) und für 10 min bei 95°C inkubiert. In der Regel wurden bei der Analyse durch SDS-PAGE und Immunblot (vgl. 2.8.1 und 2.8.4) 10 µl dieses Ansatzes auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Daneben wurde auch eine einfachere Methode der Zellyse verwandt. Ein definiertes Volumen einer Zellsuspension wurde mit SDS-Probenpuffer und einer Spatelspitze Glasperlen vermengt und 2 min gevortext. Auch diese Proben wurden für 10 min bei 95°C inkubiert und wie oben analysiert.

Präparation von Cytosol, unlöslicher Fraktion und Kernlysate aus Hefe

YPD + AF204:	Pepton	20 g
	Yeast Extract	10 g
	Dextrose	20 g
	Antifoam 204	250 µl
	H ₂ O	ad 1 l

20%ige Sorbitol/KP _i -Lösung	Sorbitol	200,0 g
	K ₂ HPO ₄	348,8 mg
	KH ₂ PO ₄	408,3 mg
	H ₂ O	ad 1,0 l

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,5 eingestellt und die Lösung anschließend sterilfiltriert.

Tris (100 mM, pH 9,5):	Tris	12,1 g
	H ₂ O	ad 1,0 l

DTT (1 M):	DTT	771,5 mg
	H ₂ O	5,0 ml

Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

8%ige PVP-Lösung:	PVP	40 g
	H ₂ O	ad 500 ml

PM-Buffer:	K ₂ HPO ₄	1,10 g
	KH ₂ PO ₄	1,86 g
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,20 g
	H ₂ O	ad 1,00 l

Die Lösung wurde mit KOH-Lösung (1 M) auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und sterilfiltriert.

8% PVP/PM-Buffer:	8% PVP-Lösung	410 ml
	PM-Buffer	17 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei +4°C gelagert.

1%ige SDS-Lösung:	SDS	0,1 g
	H ₂ O	ad 10,0 ml

Zymolyase-Lösung (10 mg/ml):	Zymolyase	10 mg
	PBS/Sorbitol (10 mg/ml)	1 ml

Die Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

7,5%ige Ficoll/Sorbitol-Lösung:	Ficoll 400	15 g
	Sorbitol 1,1 M	ad 200 ml

Die Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

Sorbitol-Lösung (1,1 M):	Sorbitol	200,4 g
	H ₂ O	ad 1,0 l

Solution P:	PMSF	100 mg
	Pepstatin A	2 mg
	Ethanol _{abs.}	5 ml

Die Substanzen wurden vermischt und solange bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sich das Pepstatin A gelöst hatte. Die Lagerung erfolgte bei -20°C

0,6 M Sacchrose/PVP:	Saccharose	20,6 g
	8% PVP / PM	ad 100,0 ml

2,52 M Sacchrose/PVP:	Saccharose	42,75 g
	8% PVP / PM	ad 500,00 ml

2,25 M Sacchrose/PVP:	Saccharose	75,2 g
	8% PVP / PM	ad 100,0 ml

2,15 M Sacchrose/PVP:	Saccharose 8% PVP + PM	35,9 g ad 50,0 ml
BMDST:	Bis-Tris-Cl MgCl ₂ DTT Saccharose Tween 20 In H ₂ O _{bidest.}	10,00 mM 0,60 mM 0,50 mM 0,34 mM 0,05 %

Bis-Tris-Cl wurde zuerst in H₂O_{bidest.} gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 6,5 eingestellt. Dann wurden die übrigen Komponenten zugegeben.

Die Sacchorose/PVP-Lösungen sowie der BMDST-Puffer wurden bei -20°C gelagert.

Abb. 9: Fließschema der Kernlysatzpräparation

Zellanzucht: 250 ml YPD + AF 204 mit Hefezellen animpfen, Inkubation über Tag bei 30°C und 250 rpm



Am Abend Animpfen einer 1,5 l-Kultur mit einer Ziel-OD₆₀₀ von 2 - 3 für den nächsten Morgen, Inkubation über Nacht bei 30°C und 250 rpm



Zellernte: Am 2. Tag Zellernte durch Zentrifugation bei 4°C und 4412 x g für 10 min, Waschen des Pellets mit 2,5 ml H₂O pro Pellet und 10 ml 20%iger Sorbitol/KP₁-Lösung, dazwischen Zentrifugationsschritt (4°C, 2645 x g, 5 min)



Zellgewicht: Auswiegen der nassen Zellen (in g)



Behandlung mit Tris-Lösung (das 5-fache des Zellgewichts in ml) und DTT-Lösung (das 50-fache des Zellgewichts in µl) unter Rollen für 10 min bei 30°C, Zentrifugation bei 2645 x g und 4°C für 5 min



Zellwandverdau durch Zugabe von Zymolyase (pro ml Zellsuspension 70 µl Enzym-Lösung) und 20%iger Sorbitol/KP_i-Lösung (2,2 mal das Zellgewicht in ml), bei 30°C langsam rollen lassen, Beobachtung des Aussehens der Zellen unter dem Mikroskop, anschließend zentrifugieren der Sphäroplasten bei 2645 x g und 4°C für 5 min



Resuspendieren jedes Pellets in 11 - 22 ml 20%iger Sorbitol/KP_i-Lösung (je nach Größe des Pellets), Auftragen auf ein 7,5%iges Ficoll-Kissen (15 ml pro 1,5 l-Kultur), Zentrifugieren bei 4°C und 3016 x g für 15 min



Zellyse: Zugabe von 14 ml 8%iger PVP/PM-Lösung und Solution P im Verhältnis 1:1000 zum Pellet, Zellaufschluss mit Ultraturrax-Homogenisator bei Stufe 3,5 in 30 sec-Intervallen auf Eis bis zur ausreichenden Lyse (Beobachtung unter dem Lichtmikroskop)



Cytosol: Zugabe von ca. 20 ml 0,6 M Saccharose/PVP (je nach Viskosität der Suspension) und Solution P (1:1000), Zentrifugation bei 4°C und 48254 x g für 30 min, Einfrieren des Überstandes (Cytosol) bei -80°C.



Unlösliche Fraktion: Zum Erhalt der unlöslichen Fraktion Pellet in 10 ml W-Bindungspuffer und 10 µl Solution P resuspendieren und bei -80°C einfrieren. Für die weitere Präparation des Kernlysats Zugabe von 4,26 ml 0,6 M Saccharose/PVP und 16,74 ml 2,52 M Saccharose/PVP pro Pellet



Saccharose/PVP-Gradient: Herstellung des Gradienten (8 ml 2,52 M Saccharose/PVP-, 8 ml 2,25 M Saccharose/PVP-, 8 ml 2,15 M Saccharose/PVP-Lösung je Pellet); Auftrag der Suspension auf den Gradienten, Ultrazentrifugation mit einem Swing-out-Rotor bei 140992 x g und 4°C für 4 h



Kernfraktion: Separation der einzelnen Fraktionen; die intakten Kerne befinden sich zwischen der 2,52 M- und der 2,25 M Saccharose/PVP-Schicht; Zugabe von 15 ml 8%iger PVP-Lösung zur Kernfraktion, Ultrazentrifugation bei 4°C und 237497 x g für 1 h



Kernlyse: Resuspension des Pellets in 1 - 8 ml BMDST-Puffer (je nach Größe des Pellets) und Solution P in einer Verdünnung von 1:2000, Lyse der Kerne mittels Ultraschall in 30 sec-Intervallen auf Eis (währenddessen Beobachtung unter einem Lichtmikroskop), Zugabe von 20 µl DNase I (1 mg/ml) pro ml Kernlysat, Lagerung bei -80°C

Abb. 9 zeigt den schematischen Ablauf einer Präparation von Cytosol und Kernlysat sowie der unlöslichen Fraktion gemäß einem abgeänderten Protokoll von S. Wente (vgl. www.mc.vanderbilt.edu/vumcdept/cellbio/wentelab/protocols/yeast_nuclei_prep.html). Am ersten Tag wurden, wie oben beschrieben, Hefezellen hochgezogen und am nächsten Morgen geerntet. Nach der Ernte und zwei darauf folgenden Waschschritten wurde das Gewicht der nassen Zellen bestimmt. Um die Zellwand etwas "einzuweichen", wurde das Pellet mit Tris und DTT behandelt. Der eigentliche Verdau erfolgte unter Zuhilfenahme des Enzyms Zymolyase. Das Fortschreiten des Zellwandabbaus wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Die erhaltenen Sphäroplasten wurden mittels eines Ficoll-Kissens gereinigt und nach Zugabe von Protease-Inhibitoren mit einem Homogenisator lysiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert und das Cytosol auf diese Weise abgetrennt. Die restlichen Zellbestandteile wurden auf einen Gradienten gegeben, der aus Saccharose-Lösungen mit verschiedenen Molaritäten bestand, es sei denn, die unlösliche Fraktion sollte direkt für Bindungsversuche verwendet werden. Das Ganze wurde über mehrere Stunden in einem Swing-out-Rotor zentrifugiert und man erhielt das in Abb. 10 dargestellte Ergebnis.

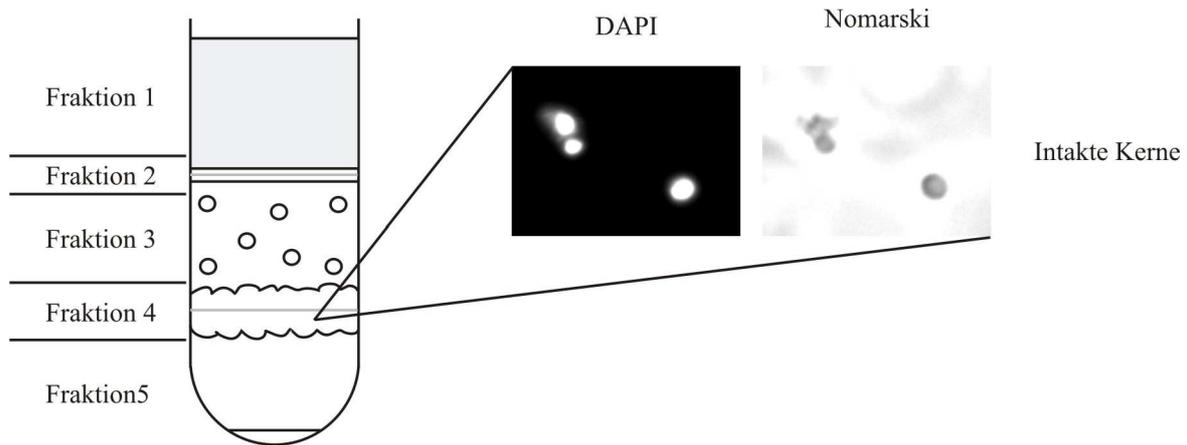


Abb. 10: Schematische Darstellung des Gradienten und mikroskopische Aufnahme der isolierten Kerne

Bei Fraktion 1 handelte es sich um eine trübe wässrige Phase, gefolgt von Fraktion 2, einer festen glatten weißen Schicht. In diese beiden Phasen waren außer den Kernen alle festen Zellbestandteile enthalten. Fraktion 3 war klar und flüssig, jedoch wenn eine große Menge an Suspension aufgetragen worden war, enthielt sie weiße Flöckchen, die sich als Kernklumpen entpuppten, welche aber hauptsächlich in Fraktion 4 zu finden waren. Hierbei handelte es sich um eine dicke geflockte Schicht. Die unterste Phase war wieder klar und wässrig. Allerdings setzte sich zuweilen ein Pellet aus unlysierten Zellen bzw. Sphäroplasten ab.

Wie in Abb. 10 gezeigt (von oben nach unten) gab es zuerst eine trübe Phase, die durch eine eher feste glatte weiße Schicht von der nächsten klaren Phase abgetrennt war. Ab und an enthielt sie je nach Menge der aufgetragenen Suspension auch weiße Flocken. An der Interphase zur untersten Schicht befanden sich die Kerne, die sich makroskopisch in einer dicken weißen geflockten Schicht zeigten. Mikroskopisch ergab sich das in Abb. 10 dargestellte Bild.

Alle Fraktionen wurden mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen und die Kerne wurden durch Zugabe von 8%iger PVP-Lösung und anschließender Zentrifugation gereinigt. Das Pellet wurde in Puffer mit Protease-Inhibitor aufgenommen und durch Ultraschall lysiert. Die schleimige Konsistenz der Suspension, welche von der freigesetzten DNA herrührte, wurde durch Zugabe des Enzyms DNase I wieder aufgehoben.

2.9. *In vitro*-Bindungsstudien (Protein-Protein-Interaktionen)

2.9.1. Bindungs- und Funktionalitätstests mit isolierten rekombinanten Proteinen

Um Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* zu untersuchen oder durch bereits bekannte Interaktionen die Funktionalität von Proteinen zu überprüfen, wurden "GST-Pulldown-Assays" durchgeführt. Dazu wurden 20 - 30 μ l GSH-Sepharose dreimal mit PBSKMT oder W-Bindungspuffer gewaschen, indem jeweils 500 μ l Puffer zugegeben, für 15 sec bei 720 x g

zentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt wurde. Zu der so vorbereiteten Sepharose wurden entweder 8 oder 30 µg eines GST-Fusionsproteins gegeben, mit PBSKMT oder W-Bindungspuffer auf 1 ml aufgefüllt und für 1 h bei 4°C unter Rollen inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Bindungsproteine falls nötig ultrazentrifugiert (4°C, 539511 x g, 30 min). Danach wurden die Ansätze wie beschrieben mit PBSKMT oder W-Bindungspuffer gewaschen. Je 12 bzw. 50 µg eines anderen Proteins, das keinen "GST-Tag" besitzen durfte, wurden zugeben, wieder auf 300 oder 1000 µl mit PBSKMT oder W-Bindungspuffer aufgefüllt und für 1 h bei 4°C unter Rollen inkubiert. Danach wurde wie beschrieben gewaschen und durch Inkubation für 5 min bei 95°C mit 2-fach SDS-Probenpuffer eluiert. Die gebundenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert.

2.9.2. Bindungs- und Ablösungsversuche mit rekombinanten GST-Fusionsproteinen und Importinen

Um gefundene Interaktionspartner-Ligand-Komplexe als wirkliche Substrat-Importin-Komplexe zu identifizieren, muss u. a. eine Verdrängung des Substrats durch Gsp1 vom Importin nachgewiesen werden. Dazu wurden "GST-Pulldown-Assays" ähnlich den bereits oben erwähnten durchgeführt. Zunächst wurden 20 µl GSH-Sepharose dreimal mit PBSKMT gewaschen. Zum so vorbereiteten Säulenmaterial wurde eine etwa 10 µg GST-Fusionsprotein entsprechende Menge an *E. coli*- oder Hefelysat gegeben, mit PBSKMT auf 200 - 1500 µl aufgefüllt und für 1 h bei 4°C unter Rollen inkubiert. In der Zwischenzeit wurden für die zeitlich nicht gestaffelten Ablösungsversuche 22,5 µg His₆-Gsp1QL-GTP mit 12 µg des jeweiligen Importins und PBSKMT (ad 300 µl) für 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach wurden die Ansätze der Vorbindung wie beschrieben mit PBSKMT gewaschen. Dann wurden die inzwischen vorbereiteten Importin/Gsp1QL-GTP-Lösung zugegeben und die Ansätze 1 h bei Raumtemperatur unter Rollen inkubiert. Oder im Falle der zeitlich gestaffelten Ablösung wurden je 12 µg eines Importins zugegeben, auf 300 µl mit PBSKMT aufgefüllt und für 1 h bei 4°C unter Rollen inkubiert. In beiden Fällen wurde gewaschen und entweder wie unter 2.9.1 eluiert oder in den gestaffelten Ablösungsversuchen erst an dieser Stelle 22,5 µg His₆-Gsp1QL-GTP zugeben, auf 300 µl aufgefüllt und für 30 min bei Raumtemperatur unter Rollen inkubiert. Es folgten wieder drei Waschschrte und die Elution (s. o.). Die Proben wurden durch SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blau bzw. im Western Blot analysiert.

2.9.3. "GST-Pulldown-Assays" mit Hefelysat

W-Bindungspuffer	Kaliumacetat	110,0 mM
	HEPES	20,0 mM
	Natriumacetat	2,0 mM
	Magnesiumacetat	5,0 mM
	Glycerol	10,0 %
	Tween 20	0,2 %
	DTT	1,0 mM
	Solution P	0,1 %
	H ₂ O _{bidest}	

Zunächst wurde die HEPES-Lösung mit KOH auf pH 7,4 eingestellt. Dann wurden alle Komponenten bis hin zu Tween 20 in H₂O_{bidest} gelöst und die Mischung sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. DTT und Solution P wurden erst bei Benutzung zugegeben.

In diesen Interaktionsstudien wurden endogene Hefeproteine an rekombinantes GST-Fusionsprotein gebunden. Dazu wurde letzteres an GSH-Sepharose gebunden und mit Hefe-Cytosol bzw. -Kernlysat aus Wildtypzellen inkubiert (Abb. 11). Praktisch wurde dabei so vorgegangen, dass zunächst zu 30 µl gewaschener (3 x mit PBSKMT oder W-Bindungspuffer (Kendirgi *et al.*, 2005)) GSH-Sepharose 10 µg GST-Fusionsprotein gegeben wurden. Mit einem der beiden Puffer wurde auf 250 µl aufgefüllt und für 1 h bei 4°C unter Rollen inkubiert. In späteren Versuchen wurde währenddessen die entsprechende Zellfraktion mit soviel W-Bindungspuffer für 1 h bei 4°C inkubiert, dass man bei der nachfolgenden Bindung ein Volumen von 1 ml erreichte. Die Suspension wurde bei 720 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand für den weiteren Versuch genommen. Die Ansätze mit der Vorbindung wurden ebenfalls zentrifugiert, allerdings nur für 5 s bei Raumtemperatur und 720 x g. Das gewonnene Pellet wurde wieder 3 x gewaschen und die entsprechende Zellfraktion zugegeben. Im Falle des Cytosols handelte es sich entweder um unbehandelte oder bei 720 x g und 4°C für 10 min abzentrifugierte oder inkubierte und zentrifugierte (s. o.) Zellfraktion, beim Kernlysat gab es nur die letzten beiden Möglichkeiten.

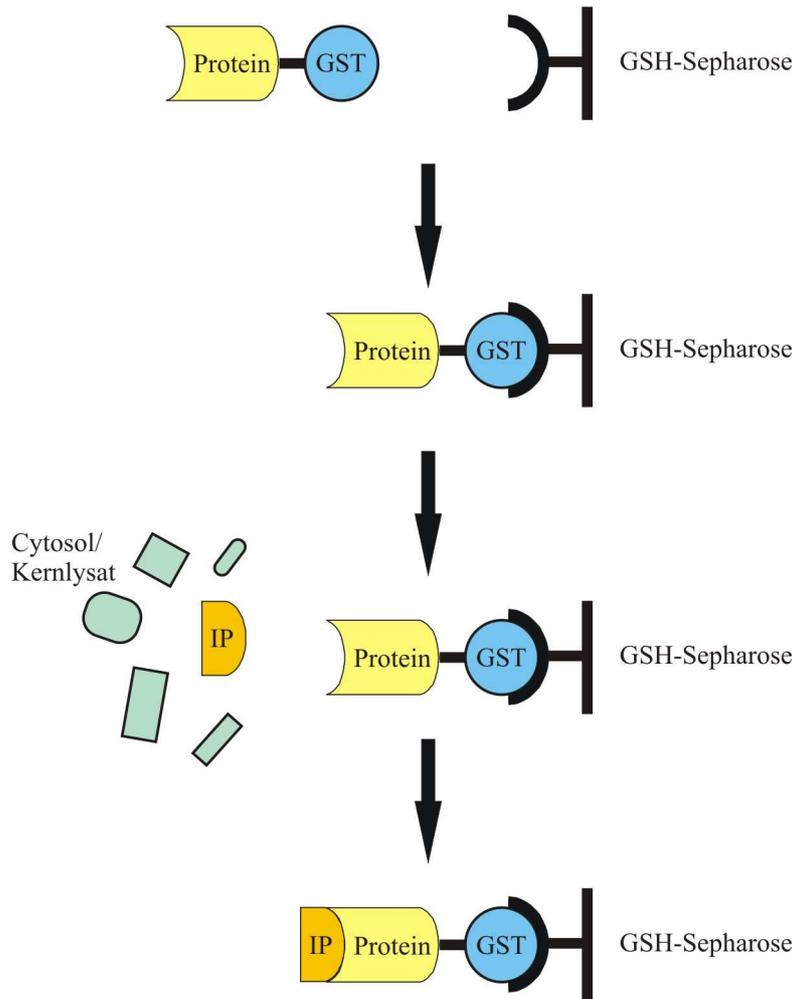


Abb. 11: Das Prinzip des “GST-Pulldown-Assays“

Aus *E. coli*-Zellen hergestellte GST-Fusionsproteine wurden an GSH-Sepharose gebunden. Wildtyp-Hefe-Cytosol bzw. -Kernlysate wurde zugegeben, so dass endogene Hefepoteine an den rekombinant hergestellten Liganden binden konnten. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt.

Die Gesamtproteinmengen des Cytosols schwankten pro Ansatz zwischen 1,1 und 2,1 mg, die des Kernlysats zwischen 0,3 und 0,8 mg. Es wurde soviel PBSKMT oder W-Bindungspuffer zugegeben, dass man am Schluss ein Volumen von 1 ml hatte. In einem Parallelansatz wurden jeweils 15 µg His₆-Gsp1QL-GTP hinzugefügt. Diese Mutante ist GTPase-defizient, wodurch mögliche Exportkomplexe stabilisiert wurden. Die Ansätze wurden noch einmal für 1 h bei 4°C unter Rollen inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 s bei Raumtemperatur und 720 x g wurde das Pellet noch dreimal gewaschen, in 7,5 µl NuPAGE LDS-Sample-Buffer (4 x), 3 µl Sample Reducing Agent (10 x) und 19,5 µl H₂O_{bidest} aufgenommen und für 10 min bei 70°C gekocht. Die Proben wurden durch SDS-PAGE oder im Western Blot analysiert und gegebenenfalls durch Massenspektrometrie qualitativ untersucht (vgl. 2.8.3).

2.9.4. Test auf Bindefähigkeit von S-TEV-ZZ-Fusionsproteinen an ihre Matrices

Cytosol, die unlösliche Fraktion bzw. Kernlysate aus Zellen verschiedener Hefestämme (Wildtyp und transformierte Stämme) mit einem Gesamtproteingehalt von 3 mg wurden für 20 min auf Eis mit PBSKMT (ad 1,5 ml) inkubiert und zentrifugiert (für 10 min bei 4°C und 720 x g). Anschließend wurden die Überstände für 1 h bzw. 20 h bei 4°C unter Rollen mit je 30 µl mit Puffer gewaschener IgG- bzw. S-Protein-Sepharose inkubiert. Es wurde 3 x mit PBSKMT gewaschen und zentrifugiert (für 5 s bei 720 x g und Raumtemperatur). Von allen Überständen und den Pellets wurden Proben genommen und eine Immunoblot-Analyse (siehe 2.8.4) durchgeführt.

2.9.5. Tandemaffinitätsreinigung mit Hefelysat

Synthese, Reinigung und Funktionalität der TEV-Protease

TEV-Lagerungspuffer	Tris	50,0 mM
	EDTA	1,0 mM
	DTT	5,0 mM
	Glycerin (v/v)	50,0 %
	Triton X-100 (w/v)	0,1 %

Die Substanzen wurden in H₂O_{bidest} gelöst, der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und sterilfiltriert.

Reaktionspuffer (10 x)	Tris	500 mM
	EDTA	5 mM

Die Substanzen wurden in H₂O_{bidest} gelöst, der pH-Wert auf 8 eingestellt und sterilfiltriert.

Die hier verwendete TEV-Protease, ein katalytisch aktives 29 kDa-Fragment der TEV-Protease aus dem "tobacco etch virus", wurde dazu benutzt, einmal an ihre Matrix gebundene Fusionsproteine mit "S-TEV-ZZ-Tag" abzuspalten, um sie an eine zweite Matrix zu binden, was den Reinigungsgrad erhöht. Die TEV-Protease reagiert spezifisch auf ihre Erkennungssequenz, Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, und spaltet zwischen Glutamin und Glycin. In dieser Arbeit wurde die TEV-Protease mit einem "Polyhistidin-Tag" synthetisiert (vgl. 2.8.6), mittels Affinitätschromatographie und Kationenaustauschchromatographie (vgl. 2.8.7) gereinigt (Abb. 12) und die Proteinlösung am Schluss 1:2 mit TEV-Lagerungspuffer verdünnt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

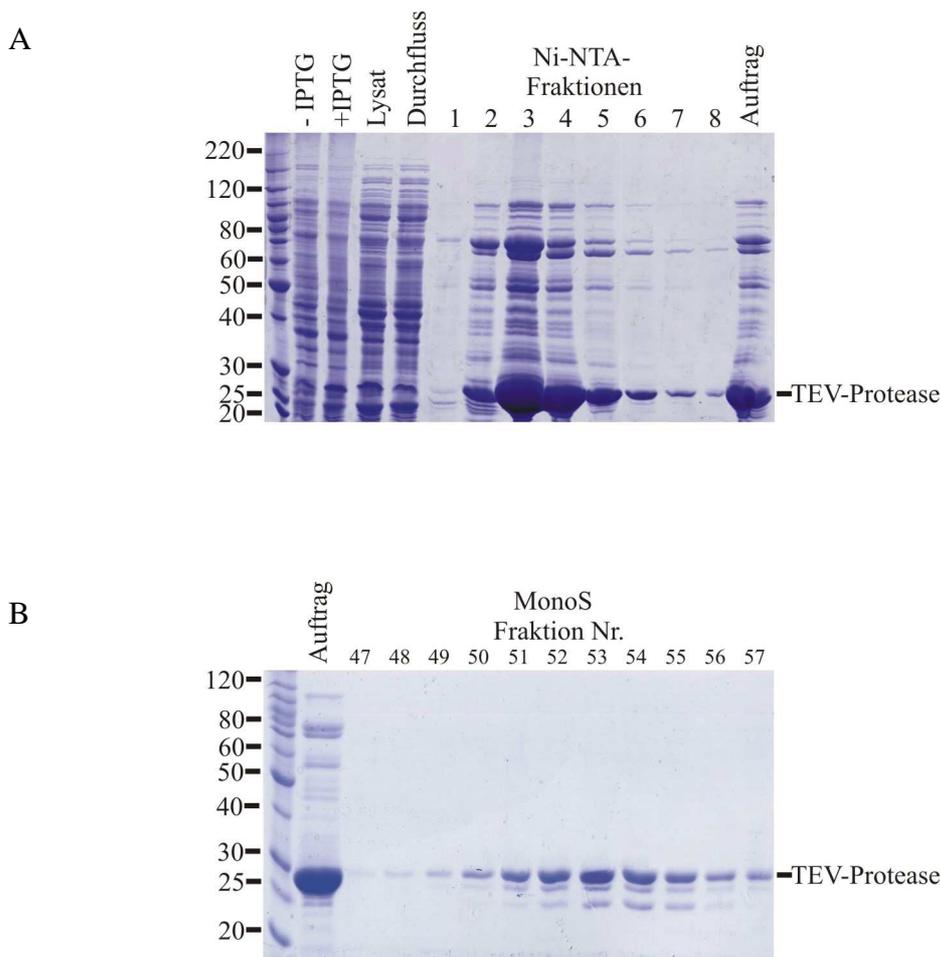


Abb. 12: Synthese und Reinigung von TEV-Protease

(A) *E. coli* BL21-Zellen wurden mit pGS1164 transformiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 1. Nach Entnahme einer Probe (-IPTG) wurde die Synthese von His₆-TEV-Protease durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,3 mM) induziert und die Zellen für 3 h bei 30°C weiter kultiviert. Dann wurde erneut eine Probe entnommen (+IPTG). Nun wurde ein Gesamtzelllysat (Lysat) hergestellt und daraus das Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose gereinigt. Vom Durchfluss und den vereinigten Fraktionen (Auftrag) der Affinitätsäule wurden ebenfalls Proben entnommen. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau detektiert. (B) Das vereinigte Eluat der Ni-NTA-Säule wurde auf eine MonoS HR 5/5-Säule aufgetragen. Das Protein wurde mit einem Salzgradienten eluiert und in 1 ml-Fractionen gesammelt. Die daraus entnommenen Proben wurden per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Zur Überprüfung der Funktionalität des Enzyms wurden selbst hergestellte Chargen mit einer TEV-Protease der Firma Invitrogen verglichen. Dabei wurden 300 ng der eigenen bzw. 2 Units der gekauften TEV-Protease zu 5 µg GST-TEV-Rpp1 bzw. GST-TEV-Yrb1 pipettiert und mit Reaktionspuffer (1 x) auf 100 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden bei 4°C für 3,5 h unter Rollen inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert. In Abb. 13 ist je nach Charge und Substrat eine mehr oder weniger große Fähigkeit zur Spaltung ersichtlich. Zur Optimierung der notwendigen Menge an TEV-Protease in den späteren TAP-Bindungsversuchen wurde Yrb1-S-TEV-ZZ aus Hefe-Cytosol gebunden und mit verschiedenen

hohen Mengen an TEV-Protease inkubiert. Dabei wurden zunächst 30 μ l IgG-Sepharose pro Ansatz mit PBSKMT gewaschen, 233 μ l Cytosol mit einem Gesamtproteingehalt von 1 mg zugegeben, mit PBSKMT auf 250 μ l aufgefüllt und 2 h bei 4°C unter Rollen inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 s bei 720 x g und Raumtemperatur wurden die Pellets dreimal mit PBSKMT gewaschen. Nach Zugabe von je 0, 150, 500 und 1500 ng TEV-Protease wurde bei Raumtemperatur für 1 h unter Rollen inkubiert. Die Ansätze wurden wie oben beschrieben zentrifugiert und gewaschen. Wie Abb. 13 zeigt, wurden die Proben durch SDS-PAGE (vgl. 2.8.1) analysiert. Hieraus wird ersichtlich, dass für eine ausreichende Spaltung eine Menge an TEV-Protease von mindestens 1,5 μ g/mg Gesamtprotein notwendig ist (oder eine entsprechende Menge an TEV-Protease einer neuen Charge mit abweichender Spaltungsaktivität).

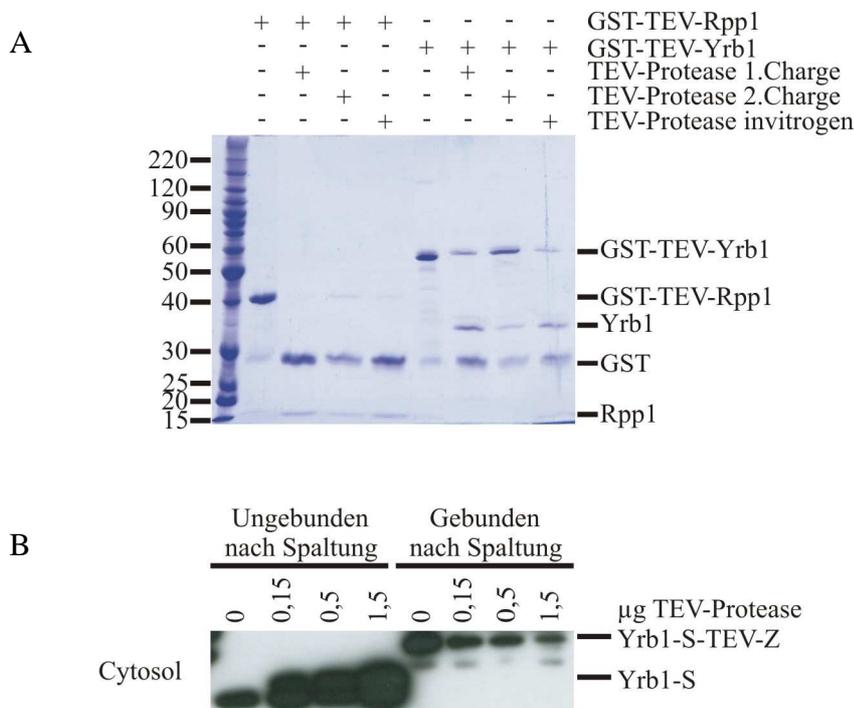


Abb. 13: Funktionalität der TEV-Protease und Optimierung der TAP-Versuchsbedingungen

(A) Zur Überprüfung der Aktivität wurden verschiedene Chargen TEV-Protease (300 ng der selbst hergestellten bzw. 2 Units der Firma Invitrogen) mit 5 μ g GST-TEV-Rpp1 bzw. GST-TEV-Yrb1 bei 4°C für 3,5 h inkubiert. Das Ausmaß der Spaltung wurde durch SDS-PAGE analysiert. (B) Zwecks Bestimmung der Mindestmenge an notwendiger TEV-Protease für eine effektive Spaltung des S-TEV-Z(Z)-Proteins innerhalb des "Tags" wurden 233 μ l Cytosol mit Yrb1-S-TEV-Z (Gesamtproteingehalt 1 mg) an IgG-Sepharose gebunden und mit verschiedenen Mengen an TEV-Protease inkubiert (1 h bei Raumtemperatur). Die Detektion erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot-Analyse.

Weitere Optimierungsversuche für Cse1-S-TEV-ZZ zeigten, dass sich das Ergebnis durch Änderungen hinsichtlich Temperatur und Dauer (von 1 h bei Raumtemperatur auf 20 h bei 4°C) verschlechterte (Daten nicht gezeigt).

TAP-Bindungsversuche mit Hefe-Cytosol und -Kernlysate

Um mögliche Bindungspartner von endogenem Yrb1 bzw. Cse1 aus Hefe zu co-isolieren, wurden die sog. TAP-Bindungsversuche durchgeführt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Hefe-Cytosol bzw. -Kernlysate, die Cse1-S-TEV-ZZ oder Yrb1-S-TEV-Z enthielten, wurden mit einer ersten Matrix inkubiert, so dass die beiden Proteine über ihren "Doppeltag" in Komplex mit einem möglichen Interaktionspartner daran binden konnten. Häufig- und besonders im Falle der IgG-Sepharose- kommt es vor, dass viele Proteine unspezifisch über Bindungsstellen mit sehr niedriger Affinität an das Säulenmaterial binden. Um diese "Verunreinigungen" zu vermeiden, wurden die Proteine, nachdem die Matrix gewaschen worden war, an ihrer TEV-Protease-Spaltstelle gespalten, und über den zweiten "Tag" an eine weitere Matrix gebunden, so dass man einen doppelten Reinigungseffekt hatte (Abb. 14).

Praktisch wurde dabei wie folgt vorgegangen: 100 µl IgG-Sepharose (der Antikörper bindet reversibel über seinen F_c-Teil an die ZZ-Domäne des Protein A) wurden 3 x mit PBSKMT gewaschen und mit der jeweiligen Zellfraktion (siehe 2.8.10), welche zuvor mit dem gleichen Volumen an PBSKMT verdünnt wurde, für 2 h bei 4°C unter Rollen inkubiert. Im Fall von Cytosol wurden dabei pro Ansatz zwischen 50 und 206 mg Gesamtprotein verwendet (aus 2,3 - 14 g Zellen bzw. 0,7 - 4,5 l Kultur), beim Kernlysate handelte es sich um 20 - 27 mg Gesamtprotein (aus 9,5 - 14 g Zellen bzw. 3,5 - 9 l Kultur). Nach Zentrifugation für 5 s bei 720 x g oder für 1 min bei 2645 x g bei Raumtemperatur oder 4°C wurde der Überstand abgenommen und eine Probe entnommen. Das Pellet wurde 3 x mit PBSKMT gewaschen und entweder mit TEV-Reaktionspuffer alleine oder mit TEV-Protease, die zuvor mit TEV-Reaktionspuffer 1:2 verdünnt worden war, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge an TEV-Protease schwankte bezogen auf den Gesamtproteingehalt zwischen 96 und 920 µg. Im Anschluss an die Spaltung wurde wieder wie oben zentrifugiert, das Pellet wieder 3 x gewaschen, mit 2-fach SDS-Probenpuffer versetzt, der Überstand wurde durch Mobicol-Säulen gegeben, um möglicherweise mitabgesaugtes Säulenmaterial abzutrennen - auch davon sowie dem Überstand wurden Proben genommen - und zu 15 µl gewaschener S-Protein-Sepharose gegeben und für 2 h bei 4°C gerollt. Das S-Protein (103 Aminosäuren) leitet sich wie der "S-Tag" selbst (15 Aminosäuren) von der RNase A ab und zeigt zu diesem eine starke Affinität (K_D-Wert von 0,1 µM). Nach der zweiten Bindung wurde wieder wie oben zentrifugiert, das Pellet gewaschen und Proben von Überstand und Pellet vorbereitet. Alle Proben wurden durch SDS-PAGE oder im Western Blot analysiert und gegebenenfalls durch Massenspektrometrie qualitativ untersucht (vgl. 2.8.3).

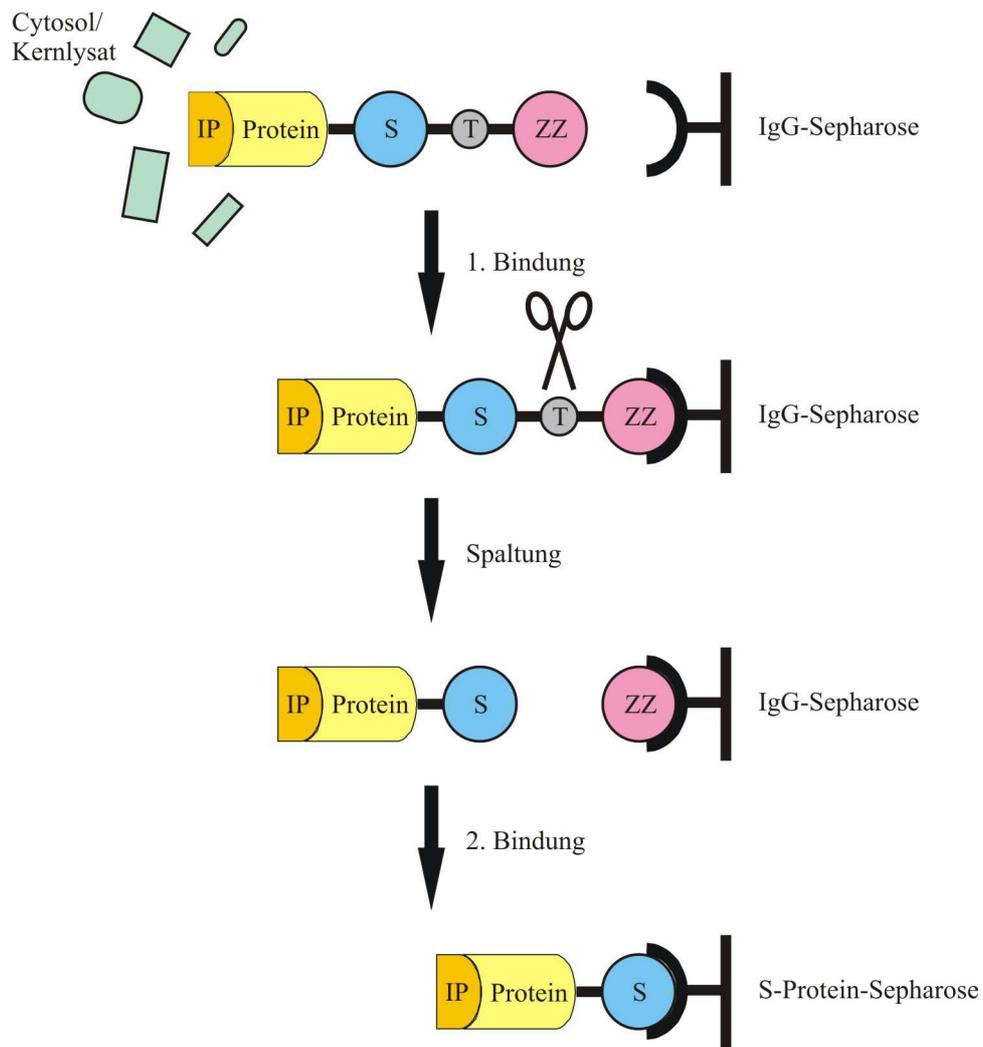


Abb. 14: Prinzip der TAP-Bindungsversuche

Die "TAP-Tag"-Gen-Kassette wurde genomisch hinter das Gen des Zielproteins integriert. Das endogen synthetisierte Protein aus Hefe-Cytosol oder -Kernlysate hat im Komplex mit einem möglichen Interaktionspartner über die ZZ-Domäne des "TAP-Tags" an IgG-Sepharose gebunden (1. Bindung). Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit PBSKMT abgetrennt. Durch die Aktivität der zugegebenen TEV-Protease wurde der Komplex mit dem einfachen "S-Tag" abgespalten und wiederum an S-Protein-Sepharose gebunden (2. Bindung). Durch SDS-PAGE mit anschließender Massenspektrometrie wurden die Komplexe analysiert.

2.9.6. Co-Reinigung endogener Hefeproteine mittels “TAP-Tag“ aus Hefe-Cytosol und der unlöslichen Fraktion

TST-Puffer	Tris	50,00 mM
	NaCl	150,00 mM
	Tween 20	0,05 %
	H ₂ O _{bidest}	
TAP-Lyse-Puffer	KCl	150 mM
	Tris	20 mM
	MgCl ₂	5 mM
	Triton-X 100	10 ml
	H ₂ O _{bidest}	

Um den Stress für die Proteine, der zur Unfunktionalität oder Abbau sowohl von Ligand als auch vom Bindungsprotein führen könnte, zu verringern, wurden die TAP-Bindungsversuche (vgl. 2.9.5) vereinfacht bzw. modifiziert. Zum einen wurde nur noch Hefe-Cytosol und unlösliche Fraktion verwendet, was die Dauer und auch Materialverluste bedingt durch die Präparation reduzierte. Zum anderen wurde die Spaltung durch TEV-Protease ausgeklammert und nur noch einmalig an IgG-Sepharose gebunden (Abb. 15), was bedeutete, dass die Proteine zeit- und temperaturmäßig weniger strapaziert wurden. Um eine unerwünschte Elution der leichten und schweren Kette der IgGs zu vermeiden, wurde eine modifizierte Methode von Dr. Susanne Bailer (persönliche Mitteilung) verwendet.

Es wurden pro Zellfraktion 300 µl IgG-Sepharose in einer Poly-Prep-Chromatographiesäule vorgelegt. Das Säulenmaterial wurde abwechselnd mit 2 ml TST-Puffer, 2 Säulenvolumina 0,5 M Essigsäure, pH 3,4, 1 ml TST-Puffer, Essigsäure wie eben und schließlich solange mit TST-Puffer gewaschen, bis man einen pH-Wert von 7 erreicht hatte. Anschließend wurde die jeweilige Zellfraktion mit einer Gesamtproteinmenge von 45,5 mg nach einer Zentrifugation in 30 ml TAP-Lyse-Puffer für 1 h bei 48254 x g und 4°C auf die Säule aufgetragen, so dass der Ligand-Interaktionspartner-Komplex über die ZZ-Domäne des “TAP-Tags“ an die IgG-Sepharose binden konnte. Die Säule wurde mit je 10 ml TAP-Lyse-Puffer und TST-Puffer gewaschen. Um den pH-Wert auf 5 einzustellen und das Salz zu verdrängen, wurden 1,5 ml 5 mM Ammoniumacetat, pH 5, auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte nun mit 1 ml 0,5 M Essigsäure, pH 3,4. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren

und über Nacht in einer Speedvac mit angeschlossener Kühlfalle gefriergetrocknet. Nach Zugabe von 2-fach SDS-Probenpuffer wurden sie durch SDS-PAGE mit dem Invitrogen-Gel-System aufgetrennt (vgl. 2.8.1) und massenspektrometrisch analysiert (vgl. 2.8.3).

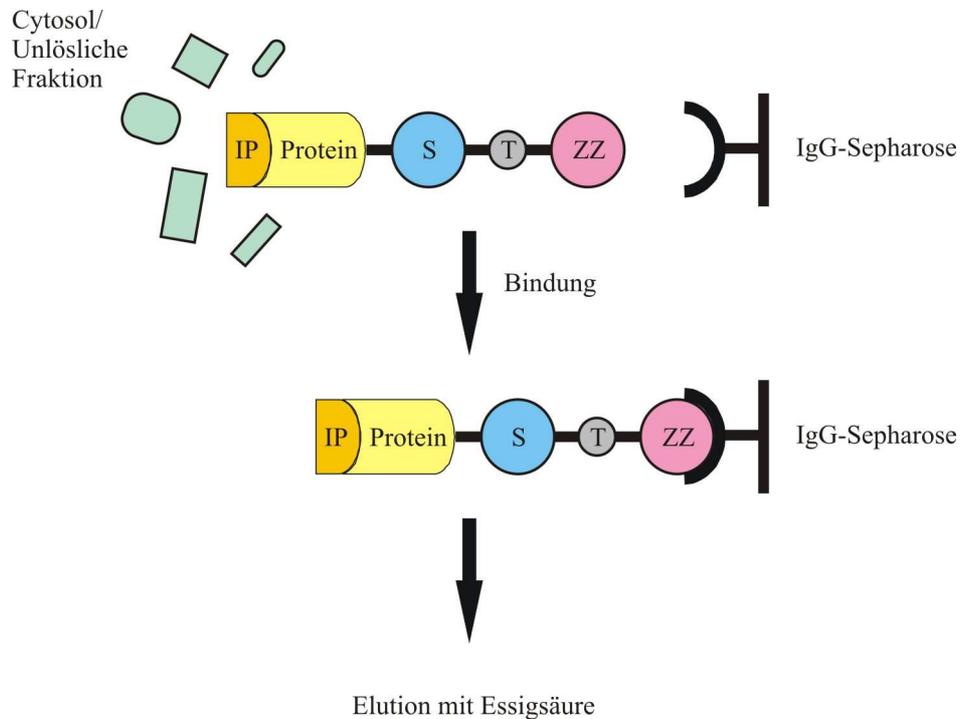


Abb. 15: Schematische Darstellung der Co-Reinigung endogener Hefeproteine mittels "TAP-Tag"

Die "TAP-Tag"-Gen-Kassette wurde genomisch hinter das Gen des Zielproteins integriert. Das endogen synthetisierte Protein aus Hefe-Cytosol oder unlöslicher Fraktion hat im Komplex mit einem möglichen Interaktionspartner über die ZZ-Domäne des "TAP-Tags" an IgG-Sepharose gebunden. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen abgetrennt, der Protein-Komplex wurde mit Essigsäure eluiert und anschließend durch SDS-PAGE und Immunoblotting bzw. Massenspektrometrie analysiert.

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion bestimmter am nukleocytoplasmatischen Transport beteiligter Faktoren näher zu beleuchten und neue Substrate verschiedener Importin β -homologer Transportrezeptoren zu finden. Die Direktionalität des Austauschs einer Vielzahl von Makromolekülen zwischen Nukleus und Cytoplasma wird durch die GTPase Gsp1 bestimmt. Durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren entsteht ein Gsp1-GTP-Gefälle mit einer hohen Konzentration im Kern und einer niedrigen im Cytoplasma (Pemberton und Paschal, 2005). Soll ein Substrat importiert werden, bildet sich ein Heterodimer aus "Cargo" und Importin, welches über die Kernpore in den Nukleus transloziert. Durch Bindung von Gsp1-GTP an den Rezeptor wird das Substrat wieder freigesetzt und das Importin ist in der Lage, mit dem gebundenen Gsp1 ins Cytoplasma zurückzukehren (Pemberton und Paschal, 2005). Sollen umgekehrt Proteine oder mRNA aus dem Zellkern ausgeschleust werden, so bildet sich ein ternärer Komplex aus Substrat, Exportrezeptor und Gsp1-GTP, welcher den NPC passiert und ins Cytoplasma gelangt (Pemberton und Paschal, 2005). Im Falle des Import-Adaptermoleküls Srp1 handelt es sich um das Exportin Cse1 (Hood und Silver, 1998; Solsbacher *et al.*, 1998). Der nunmehr cytosolische Komplex dissoziiert, indem Gsp1 das gebundene GTP hydrolysiert (Pemberton und Paschal, 2005). Dabei wird es unter anderem durch Yrb1 stimuliert (Solsbacher *et al.*, 1998).

Für den Importrezeptor Kap114 sind bereits mehrere Substrate bekannt: die Histone Hta1 bzw. Htb1 (Greiner *et al.*, 2004; Mosammaparast *et al.*, 2001b), das Histon-Chaperon Nap1 (Mosammaparast *et al.*, 2002), das TATA-bindende Proteine TBP (Pemberton *et al.*, 1999) und möglicherweise TFIIB (Hodges *et al.*, 2005), welche beide bei der Transkriptionsinitiation eine Rolle spielen. Auch für Kap120 wurde kürzlich Rpf1 als ein Imports substrat entdeckt (Caesar *et al.*, 2006). Das Heterodimer Srp1/Kap95 transportiert Proteine mit einer klassischen Kernlokalisierungssequenz in den Nukleus (Enenkel *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde es sich zur Aufgabe gemacht, sowohl für Yrb1 und Cse1 als auch für Kap114, Kap120, Kap95 und Srp1 neue Interaktionspartner zu finden. Dazu bediente man sich "GST-Pulldown-Assays" mit rekombinanten Liganden und Hefelysaten verschiedener Kompartimente. Daneben machte man sich die zum Teil modifizierte Methode der Tandem-Affinitätsreinigung zunutze, mit deren Hilfe endogene Protein-Protein-Komplexe der einzelnen Kompartimente aus Hefelysaten isoliert wurden. Auch wurden Interaktionen in Bindungsstudien mit ausschließlich rekombinanten isolierten Proteinen untersucht. Um einen

Schritt weiter zu gehen, wurden neben diesen *in vitro*-Experimenten auch *in vivo*-Tests durchgeführt. Dabei wurde entweder eine *GFP*-Kassette ins Hefegenom integriert oder ein Plasmid für das entsprechende Fusionsprotein in die Zelle eingeführt und die Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

3.1. Präparation von Cytosol und Kernlysate aus *S. cerevisiae*

Yrb1, Cse1, Kap114 und Kap120 sind Proteine, die am nukleocytoplasmatischen Transport beteiligt sind. Um zusätzlich zu den schon bekannten weitere Transportsubstrate zu finden bzw. andere Aufgaben dieser Proteine in der Zelle näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit diverse Bindungsversuche durchgeführt, bei denen entweder rekombinante Proteine mit Cytosol bzw. Kernlysate aus Hefewildtypzellenzellen inkubiert wurden oder über einen "Tag" direkt endogene Komplexe aus Cytosol, unlöslicher Fraktion (=Zellorganellen und Zellmembran) und Kernlysate extrahiert wurden. Zur Herstellung dieser Fraktionen wurden zunächst die entsprechenden Hefezellen kultiviert. War die gewünschte Zelldichte erreicht, wurden sie geerntet und gewaschen. Die Zellwand wurde mit Zymolyase verdaut und man erhielt Sphäroplasten. Nach einem Reinigungsschritt wurden sie mit einem Homogenisator lysiert und das erhaltene Homogenat zentrifugiert. Auf diese Weise wurde die cytosolische Fraktion gewonnen. Die unlösliche Fraktion wurde entweder in Puffer aufgenommen und bis zu ihrem Gebrauch eingefroren oder im Falle einer nachfolgenden Kernpräparation auf einen Saccharose/PVP-Gradienten gegeben und zentrifugiert. Die so abgetrennten Kerne wurden gewaschen, in Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert.

Abb. 16 zeigt den Ablauf einer solchen Aufarbeitung nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE bzw. nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und anschließender Immundetektion mit Yrb1, Rna1, Hta1 sowie Prp20 als Markerproteine. Im Gel wurden die Proben bis auf die intakten Kerne und das Kernlysate, welche 6 x so konzentriert waren, in sich entsprechenden Mengen aufgetragen. Die intakten Zellen und das Zelllysate zeigen das gleiche Bandenmuster, d. h. offensichtlich werden nicht speziell einzelne Proteine - oder zumindest nur wenige - durch die Behandlung abgebaut. Trotzdem ist beim Lysate deutlich weniger Gesamtprotein vorhanden. Im weiteren Verlauf der Aufarbeitung sieht man, dass sich bei der Auftrennung in Cytosol- und unlösliche Fraktion das Proteinmuster stark ändert (siehe z.B. die Banden bei 50 und 60 kDa im Cytosol und die Bande bei 53 kDa in der unlöslichen Fraktion) bzw. dass das meiste Protein in der Cytosol-Fraktion verblieben ist und bedeutend weniger Protein in der unlöslichen Fraktion zu finden war.

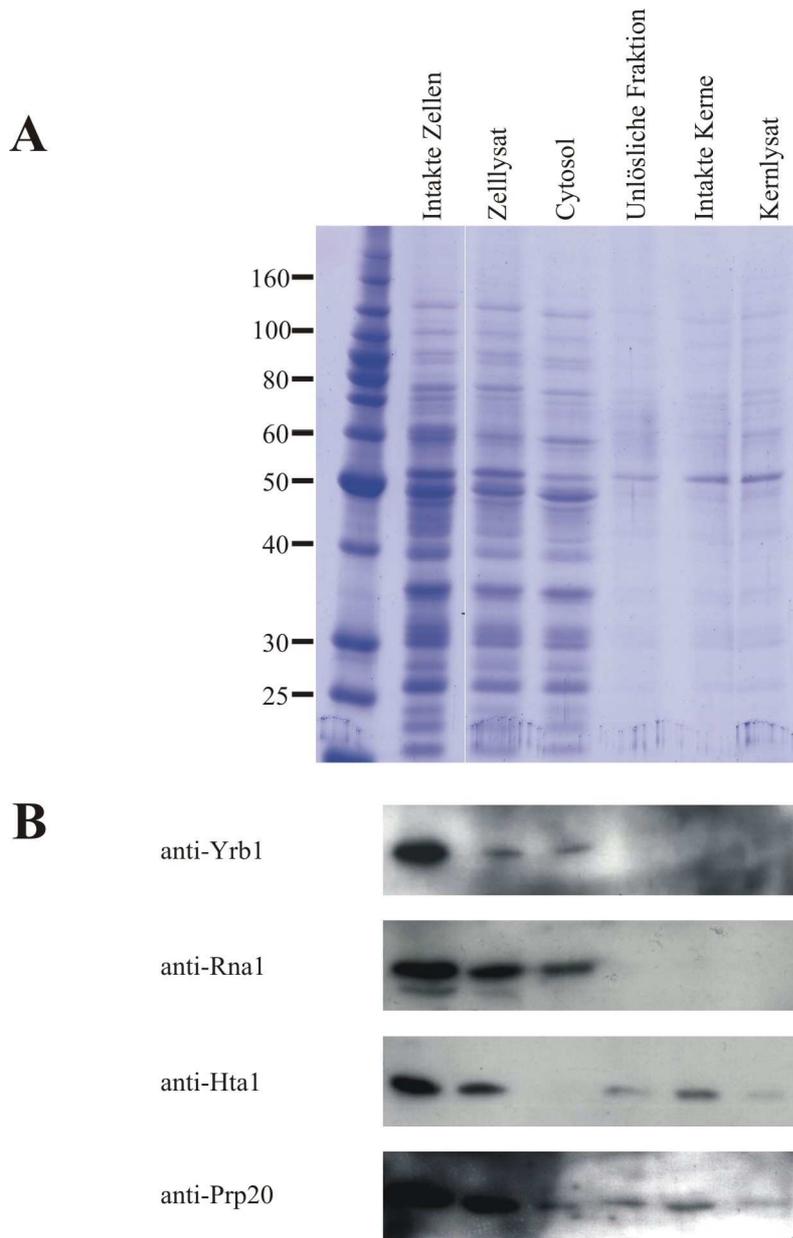


Abb. 16: Auftrennung eines Hefezellysats in eine cytosolische und Kernlysatfraktion

(A) Zellen des Stammes GSY158 wurden über Nacht in 3 l YPD-Medium mit Antifoam A bei 30°C kultiviert. 3,4 g Zellen wurden geerntet und nach dem beschriebenen Protokoll aufgearbeitet. Von den einzelnen Phasen der Cytosol- und Kernlysats-Präparation wurden Proben entnommen und durch SDS-PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau visualisiert. Die Proben der intakten Kerne und des Kernlysats sind 6 x so konzentriert wie die übrigen, die sich untereinander entsprechen. (B) GSY158-Zellen wurden über Nacht in 4,5 l YPD-Medium mit Antifoam A bei 30°C kultiviert. 14,5 g Zellen wurden geerntet und nach dem beschriebenen Protokoll aufgearbeitet. Von den einzelnen Phasen der Cytosol- und Kernlysats-Präparation wurden Proben entnommen und in einem Immunoblot analysiert. Dabei wurden Antikörper gegen Yrb1 (1:2000) und Rna1 (1:1000) als Markerproteine für das Cytosol sowie gegen Hta1 (1:2000) und Prp20 (1:2000) als Marker für die Kerne und ein anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) benutzt. In diesem Fall entsprechen sich die Proben mengenmäßig und es wurde je 1/111 110stel des Volumens der jeweiligen Fraktion auf das SDS-Gel aufgetragen.

Bei der weiteren Präparation der Suspension sieht man, dass sich das Bandenmuster nicht mehr ändert, lediglich weniger Protein vorhanden ist (wenn man die 6fach höhere Konzentration berücksichtigt) - ein schlüssiges Resultat, da die Kerne von den übrigen

Organellen abgetrennt wurden und auf diese Weise erneut Proteine verloren gingen. Die Lyse der Kerne durch Ultraschall scheint die Proteine jedoch nur wenig strapaziert zu haben.

Der Gesamtproteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe der Biorad-Methode (vgl. 2.8.5) berechnet. Die absoluten und relativen Zahlen sowie der prozentuale Anteil der Markerproteine sind in Tabelle 9 aufgeführt. In dieser Aufarbeitung wurden aus 14,5 g Zellen zu Beginn der Präparation 998 mg Protein erhalten. Nach der Zelllyse hatte sich der Proteingehalt halbiert. Das Cytosol und die unlösliche Fraktion trennten sich ungefähr im Verhältnis 4 Teile zu 1 Teil auf; an dieser Stelle sowie im Folgenden gab es aber nur noch wenig Verluste. Nach der Auftrennung mit Hilfe des Saccharose/PVP-Gradienten verringerte sich der Proteingehalt noch etwas, da die übrigen Organellen von den Kernen separiert worden waren. Jedoch hat die Ultraschallbehandlung am Ende der Präparation den Proteinen offensichtlich nicht allzu sehr zu geschadet.

Wie bereits erwähnt, wurden im Anschluss daran Markerproteine für Cytosol (Yrb1 und Rna1) und für die Kerne (Hta1 und Prp20) mittels Immunoblot analysiert (Tabelle 9), um die Güte der Präparation und die Reinheit der einzelnen Fraktionen zu bestimmen. Yrb1 kommt hauptsächlich im Cytosol vor, aber auch in geringeren Mengen im Kern (Künzler *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2001). Darum wurde als ein zweites Protein Rna1 herangezogen, von dem man annimmt, dass es ausschließlich cytosolständig ist (Hopper *et al.*, 1990). Bei Yrb1 sieht man, dass es ein sehr instabiles Protein ist, denn, auch wenn man die Gesamtverluste bis zur Zelllyse abzieht, gehen noch ungefähr 4/5 des Yrb1 zusätzlich verloren. Ähnliches zeigte sich bereits bei anderen Methoden der Lysat-Herstellung, bei denen Yrb1 komplett abgebaut wurde (Dr. Silvia Hahn-Quintes und Dr. Stefanie Caesar, persönliche Mitteilung). Bei der weiteren Aufarbeitung erwies es sich aber als eher stabil: im Cytosol ist fast genauso viel Yrb1 wie im Zelllysate. Ab der Stufe der unlöslichen Fraktion fiel die Menge an Yrb1 allerdings unter die Detektionsgrenze, was ein Zeichen dafür ist, dass die übrigen Fraktionen nur wenig bis gar nicht mit Cytosol kontaminiert sind. Bei Rna1 sieht es ein bisschen anders aus: es zeigte sich bis zur Zelllyse zunächst stabil und es gab nicht mehr Verluste als die, die es bezogen auf den Gesamtproteingehalt sowieso schon gab. Im Cytosol sollte die gesamte Menge an Rna1 wieder zu finden sein, welche sich aber fast auf die Hälfte reduziert hatte. In den übrigen die Kerne enthaltenden Fraktionen wurde es jedoch nicht nachgewiesen, was wiederum zeigte: die Kontamination der Kernfraktion mit Cytosol war gering bis nicht vorhanden.

Tabelle 9: Quantifizierung der Gesamtprotein- und der Markerproteinmenge im Verlauf der Aufarbeitung (Präparation aus 4,5 l Kultur und 14,4 g nassen Zellen eines Wildtyp-Hefestammes)

Fraktion	Masse Gesamtprotein [mg]	Anteil an Ausgangsmasse Gesamtprotein [%]	Anteil an Ausgangsmenge Yrb1 [%]	Anteil an Ausgangsmenge Rna1 [%]	Anteil an Ausgangsmenge Hta1 [%]	Anteil an Ausgangsmenge Prp20 [%]
Intakte Zellen	998,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Zelllysats	514,4	52,5	9,5	63,5	47,2	60,0
Cytosol	375,6	37,6	7,6	35,5	0,0	21,3
Unlösliche Fraktion	108,8	10,9	0,0	0,0	7,5	27,9
Intakte Kerne	73,6	7,4	0,0	0,0	17,9	43,7
Kernlysats	60,1	6,0	0,0	0,0	1,4	16,4

Als Marker für die Kerne wurde das Histon Hta1 herangezogen. Da dieses Kernprotein aber an DNA gebunden vorliegt und bei der Abtrennung des Cytosols durch eine Zentrifugation in jedem Fall pelletieren würde, kann Hta1 nur bedingt für die Bestimmung der Güte der Präparation herangezogen werden. Aber auch hier sieht man, dass sich auf der Stufe des Zelllysats die Menge an Protein ungefähr halbiert und kein spezieller Abbau des Histons stattgefunden hat. In der Cytosol-Fraktion wurde überhaupt kein Hta1 nachgewiesen, was ein Indiz für ihre Reinheit ist. Auffällig ist jedoch der starke Abbau zwischen der Stufe des Zelllysats und der der unlöslichen Fraktion, der noch stärker ist als bei Rna1. Die Menge an Hta1 reduzierte sich an dieser Stelle auf ca. 1/5 der Menge im Zelllysats. Zwischen der unlöslichen Fraktion und der der intakten Kerne scheint keine Degradation stattgefunden zu haben (Beim erhöhten Proteingehalt der Kernfraktion handelte es sich vermutlich um einen Pipettierfehler, da es sich sowohl hier als auch bei der unlöslichen Fraktion um sehr hoch viskose Suspensionen handelte, die schlecht zu pipettieren waren.), im Gegensatz zum Kernlysats selbst, wo sich der Proteingehalt erneut stark reduziert hat.

Ein weiterer Marker war das lösliche Prp20. Auch bei diesem Protein geht der Verlust bis zur Zellyse nicht über den sowieso schon vorhandenen hinaus. Allerdings wird bei der Auftrennung in das Cytosol und die unlösliche Fraktion ganz klar ersichtlich, dass das

Cytosol verhältnismäßig stark mit Kernlysat kontaminiert ist. Degradiert worden ist das Protein an dieser Stelle jedoch nur wenig. Die Diskrepanz zwischen unlöslicher und Kernfraktion ist wieder auf einen Pipettierfehler zurückzuführen. Aber auch hier hat kein Abbau stattgefunden. Jedoch hat die Ultraschallbehandlung zwecks Kernlyse dem Protein erheblich geschadet.

Zusammenfassend kann man also folgendes sagen: Die Kernfraktionen sind nicht bzw. kaum mit Cytosol verunreinigt, das Cytosol ist merklich mit Kernlysat verunreinigt. Jedoch war die Qualität des gewonnenen Materials für die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien ausreichend.

3.2. *In vitro*-Interaktionen von Yrb1 und Cse1 mit Hefeproteinen

3.2.1. Pulldown-Assays von rekombinantem GST-Yrb1 und -Cse1 mit Hefe-Cytosol und -Kernlysat

Bindungsstudien von GST-Yrb1 mit Hefe-Cytosol und -Kernlysat

Der Austausch von Makromolekülen zwischen Zellkern und Cytoplasma erfolgt mit Hilfe der Importin β -homologen Transportfaktoren. Dazu ist ein Gsp1-GTP-Gefälle erforderlich, welches die Richtung des Transports bestimmt. Beim nukleocytoplasmatischen Export tritt ein trimerer Komplex aus "Cargo", Transportrezeptor und Gsp1-GTP zusammen, der die Kernpore passiert und im Cytoplasma durch die Gsp1-vermittelte Hydrolyse von GTP zu GDP dissoziiert. Dabei wird die GTPase-Aktivität durch Rna1 stimuliert, dessen Wirkung wiederum durch Yrb1 gesteigert wird. Die Funktion von Yrb1 in diesem Kompartiment ist somit geklärt. Von verschiedenen Arbeitsgruppen (Künzler *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2001) wurde andererseits gezeigt, dass es nicht nur dort lokalisiert ist, sondern zwischen Kern und Cytosol hin- und herwandert. Das wirft die Frage auf, welche Aufgabe es im Nukleus erfüllen könnte. Ferner ist nicht wirklich geklärt, wie Yrb1 in den Zellkern transportiert wird. Eine einfache Diffusion aufgrund des geringen Molekulargewichtes wird jedoch ausgeschlossen. Für das humane Homolog RanBP1 gibt verschiedene Ansatzpunkte für ein mögliches Importmodell. Versuche mit GFP-GFP- bzw. GST-Fusionen von RanBP1 haben gezeigt, dass auch diese Fusionsproteine in den Zellkern gelangen, obwohl sie für eine passive Diffusion zu groß sind. Zum einen könnte man sich nun vorstellen, dass es einen spezifischen Mechanismus gibt, der keine löslichen Faktoren wie die Karyopherine benötigt (Plafker und Macara, 2000). Zum anderen könnte der gefundene ternäre Komplex aus RanBP1, Importin β

und Ran-GDP bzw. den Hefehomologen Yrb1, Kap95 und Gsp1-GDP ein möglicher Kandidat für einen unkonventionellen Import sein (Künzler *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde diesen Sachverhalten nachgegangen. Es wurden folgende Experimente durchgeführt: rekombinantes GST-Yrb1 wurde in *E. coli* JM101 synthetisiert und gereinigt. Das Fusionsprotein wurde an GSH-Sepharose gebunden. Anschließend wurde entweder Cytosol (Abb. 17) oder Kernlysat (Abb. 18) aus Hefewildtypzellen zugesetzt, um endogene Interaktionspartner aus Hefe zu binden. Zur Stabilisierung eventuell vorhandener Exportkomplexe wurde parallel GTPase-defizientes Gsp1Q71L-GTP (Maurer *et al.*, 2001) zugegeben. Als Kontrollen wurde die jeweilige Zellfraktion allein mit dem Säulenmaterial inkubiert, GST vorgebunden und die Zellfraktion zugegeben bzw. lediglich GST-Yrb1 an die Matrix gebunden. In einer Immunoblot-Analyse wurde gezeigt, dass das GST-Fusionsprotein an GSH-Sepharose bindet, durch die Zellfraktion nicht verdrängt wird und Gsp1Q71L-GTP mit GST-Yrb1 interagiert (Abb. 17, Daten für Kernlysat nicht gezeigt). Das wird durch die silbergefärbten SDS-Gele (Abb. 17 und Abb. 18) bestätigt.

Abb. 17 zeigt, dass nur wenige Proteine der Cytosol-Fraktion unspezifisch an das Säulenmaterial haften, an das immobilisierte GST bindet etwas mehr, aber dennoch vernachlässigbar wenig. Die meisten "Verunreinigungen" entstehen tatsächlich durch GST-Yrb1 selbst. Dabei handelt es sich aber zum größten Teil um Abbauprodukte, welche durch Immunoblotting bzw. massenspektrometrisch detektiert wurden (Daten nicht gezeigt). Allerdings erscheint die Menge an "Verunreinigung" größer als sie eigentlich ist, da selbst kleinste Mengen an Protein angefärbt und deutlich sichtbar werden, wohingegen bei den in größerer Zahl vorhandenen Proteinen bald eine Sättigung eintritt. Wenn man nun alle diese "Verunreinigungen" bei Seite lässt, bleiben in der vorletzten Spur (GST-Yrb1 + Cytosol + Gsp1Q71L-GTP) vier Banden bei ca. 70 kDa, 105 kDa, 115 kDa und 120 kDa, die analysiert werden sollten (*).

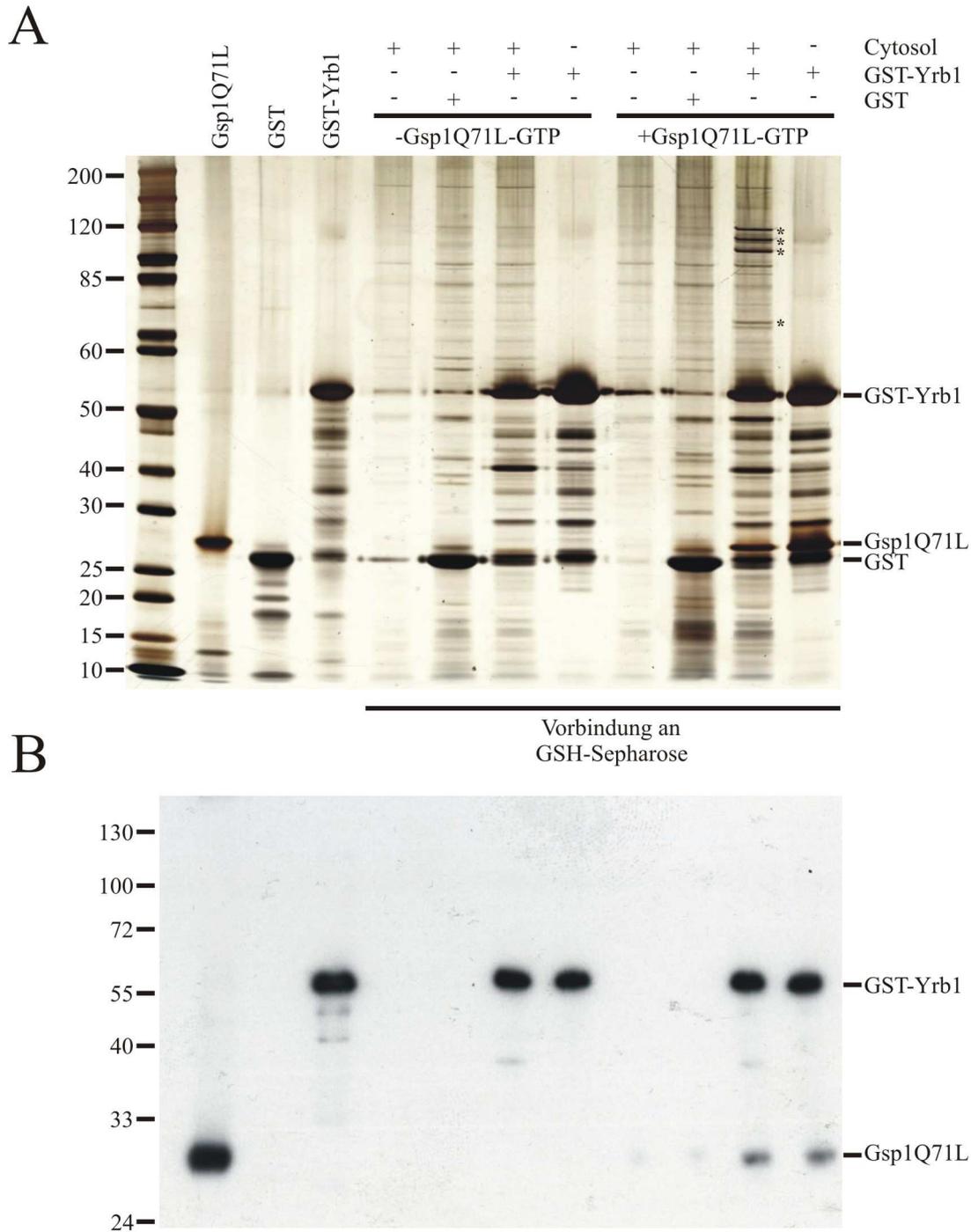


Abb. 17: Yrb1 bindet *in vitro* an verschiedene cytosolische Hefepoteine

(A) GST-Yrb1 wurde in *E. coli* JM101 synthetisiert und mittels Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Das erhaltene Fusionsprotein (10 µg) wurde für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden. Nachdem Cytosol mit einem Gesamtproteingehalt von 2,1 mg in W-Bindungspuffer für 1 h bei 4°C inkubiert und die Suspension zentrifugiert worden war, wurde der Überstand zur gewaschenen GSH-Sepharose mit dem gebundenen GST-Yrb1 gegeben. Die Ansätze wurden noch einmal für 1 h bei 4°C inkubiert. In einem Parallelansatz wurden jeweils zusätzlich 15 µg in *E. coli* M15 synthetisiertes und gereinigtes His₆-Gsp1Q71L-GTP hinzugefügt. Nachdem die Ansätze gewaschen worden waren, wurden die Proben durch SDS-PAGE und Massenspektrometrie analysiert. (B) Daneben wurden die Proben einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Der Auftrag auf das SDS-Gel erfolgte wie unter (A). Als Erst-Antikörper wurden dabei zunächst anti-Gsp1 (1:1000) und später anti-Yrb1 (1:2000) verwendet, als Zweit-Antikörper anti-Kaninchen-Antikörper (1:1000).

Gelstückchen mit den gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine vom Arbeitskreis von Prof. Albert Sickmann im Rudolf-Virchow-Zentrum für

Experimentelle Biomedizin in Würzburg massenspektrometrisch untersucht. Jedoch kam es dort zu technischen Problemen, so dass die gefundenen Proteine an dieser Stelle nicht weiter charakterisiert werden können. Es könnte sich aber bei den oberen drei Proteinen durchaus um Importin β -Homologe handeln. Dafür spräche ihr Molekulargewicht. Überdies wurde, wie in Abb. 27 dargestellt, gezeigt, dass Kap120 unter den gegebenen Versuchsbedingungen *in vitro* an Yrb1 bindet.

Der gleiche Versuch wurde mit Kernlysat durchgeführt. Zum einen wurde dabei wie oben W-Bindungspuffer mit Protease-Inhibitor (Abb. 18B) genommen, zum anderen PBSKMT ohne Inhibitor (Abb. 18A). Beide Puffer haben einen optimalen Pufferbereich zwischen pH 6,5 und 8. In jeder der zwei Lösungen liegt ein Salz in hoher Konzentration vor, bei W-Bindungspuffer handelt es sich dabei um Kaliumacetat, im Fall von PBSKMT jedoch um Natriumchlorid. Mit PBSKMT wurde neben einem GST-Yrb1-Abbauprodukt Nbp35 gefunden (Tabelle 10) (Die Analyse erfolgte erneut durch den Arbeitskreis von Prof. Albert Sickmann in Würzburg.). Dieses Nukleotid-bindende Protein besitzt NTPase-Aktivität und ist an der Biogenese extramitochondrialer Eisen-Schwefel-Proteine beteiligt (Hausmann *et al.*, 2005; Vitale *et al.*, 1996). Ein pGEX-GST-4T-TEV-NBP35-Vektor wurde kloniert und GST-Nbp35 in *E. coli* JM101 synthetisiert. Aus dem Gesamtzelllysate wurde das Fusionsprotein an GSH-Sepharose gebunden und Yrb1 zugesetzt. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde jedoch keine Bindung festgestellt. Da es sich bei Nbp35 um eine P-Schleife-NTPase handelt, sollte ein möglicherweise falscher Nukleotid-Beladungszustand ausgeschlossen werden. Dazu wurde das vorgebundene GST-Nbp35 zunächst mit EDTA inkubiert, um das im Puffer vorhandene Mg^{2+} zu komplexieren und eine Nukleotid-Austauschreaktion zu induzieren. Es wurde ATP bzw. GTP zugegeben und die Reaktion durch erneute Zugabe von Mg^{2+} gestoppt. Als nun Yrb1 zugegeben wurde, war erneut keine Bindung ersichtlich (Daten nicht gezeigt).

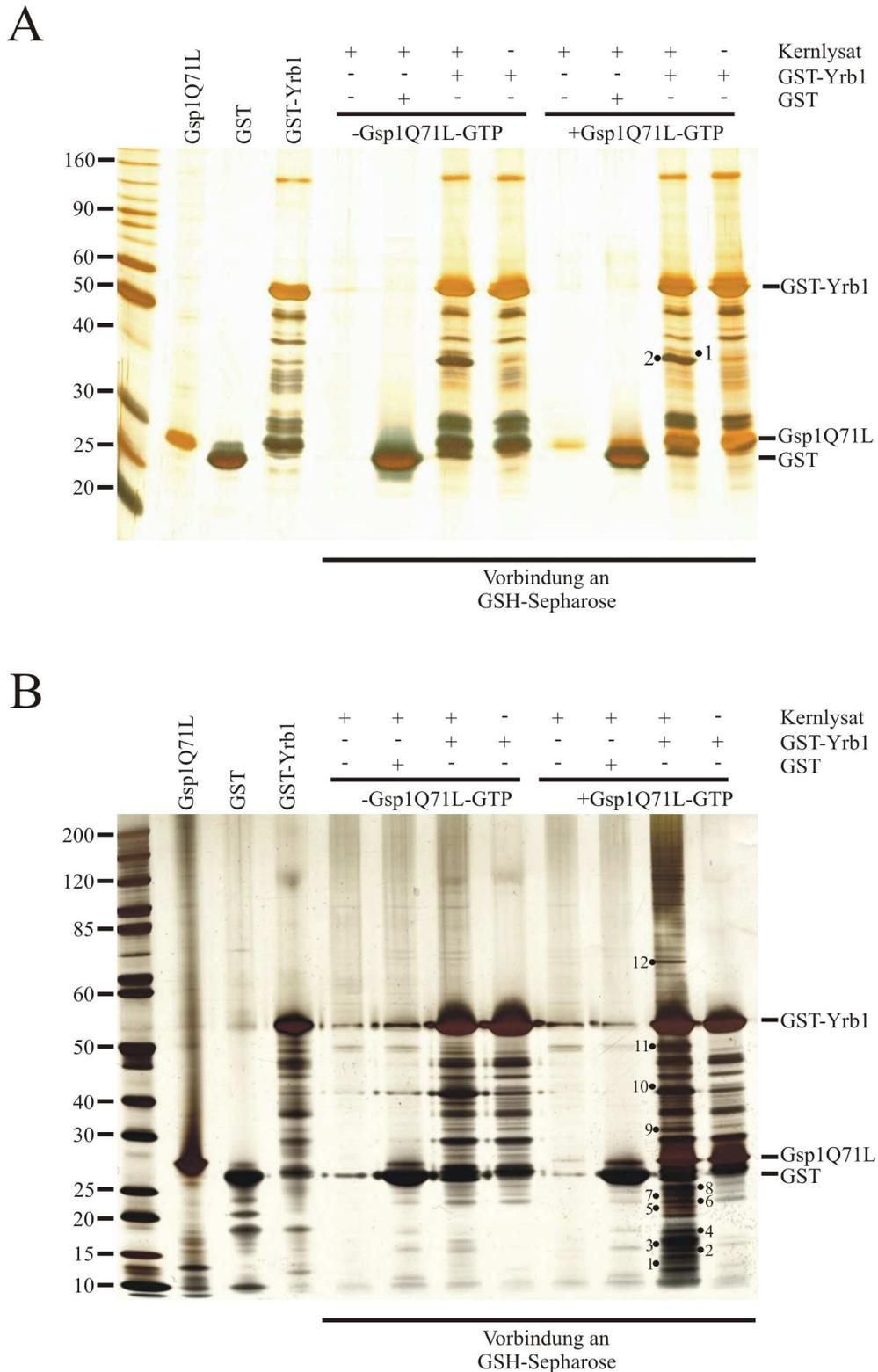


Abb. 18: Yrb1 bindet *in vitro* an verschiedene nukleäre Hefepoteine

GST-Yrb1 wurde in *E. coli* JM101 synthetisiert und mittels Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Das erhaltene Fusionsprotein (10 µg) wurde für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden (A und B). Nachdem Kernlysat mit einem Gesamtproteingehalt von 0,3 mg zentrifugiert (A) bzw. Kernlysat mit einem Gesamtproteingehalt von 0,8 mg in W-Bindungspuffer für 1 h bei 4°C inkubiert und die Suspension zentrifugiert worden war (B), wurde der Überstand zur gewaschenen GSH-Sepharose mit dem gebundenen GST-Yrb1 gegeben und im Falle von (A) mit PBSKMT auf 1 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden noch einmal für 1 h bei 4°C inkubiert. In einem Parallelansatz wurden jeweils zusätzlich 15 µg in *E. coli* M15 synthetisiertes und gereinigtes His₆-Gsp1Q71L-GTP hinzugefügt. Nachdem die Ansätze gewaschen worden waren, wurden die Proben durch SDS-PAGE und Massenspektrometrie analysiert (A und B).

Bei Verwendung von W-Bindungspuffer mit Protease-Inhibitor statt PBSKMT haben bedeutend mehr Proteine an GST-Yrb1 gebunden. Neben einigen ribosomalen Proteinen wurden die Histone Hhf1 und Hhf2, der Importrezeptor Kap123, der Translationselongationsfaktor Tef1, die Phosphopyruvat-Hydratase Eno1 bzw. 2, die Lysin-tRNA-Ligase Krs1, das Ribosomen-assoziierte Chaperon Ssb2 und die DEAD-Box-RNA-Helikase Ded1 gefunden. Von dem ebenfalls gebundenen GTPase-aktivierenden Protein Rna1 ist bereits bekannt, dass es mit Gsp1-GTP und Yrb1 einen trimeren Komplex bildet, was im Normalfall zur Hydrolyse von GTP führt (Schlenstedt *et al.*, 1995; Seewald *et al.*, 2003). Da es sich in diesem Fall um GTPase-defizientes Gsp1Q71L-GTP handelte, blieb das Heterotrimer stabil.

Tabelle 10: An Yrb1 aus Kernlysats mittels "GST-Pulldown-Assay" gebundene Interaktionspartner

Abbildung	Banden-Nr.	Protein	MW des Proteins [kDa]	Funktion	Lokalisation
3A	1	Nbp35	35,3	Komponente der cytosolischen und nukleären Eisen-Schwefel-Protein-Assemblierungs-Maschinerie	Nukleus, Cytoplasma
	2	GST-Yrb1-Abbau	23,0		
3B	1	Hhf1/Hhf2	11,4	Histon H4	Nukleosom
	2	Rps14a	14,5	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
		Rpl35b	13,9	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	3	Rps16b	15,8	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
		Rps17a	15,8		
		Rps18b	17,0		
		Rpl25	15,8	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	4	Kap123-Fragment	122,6	Proteinimport in den Nukleus	Cytoplasma, Kernpore, Kern
5	Rpl20a	21,2	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol	
6	Rpl18a	20,6	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol	

3B	6	Rps0b	28,0	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	7	Rpl16b	22,3	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	8	Rpl19b	21,7	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	9	Gsp1	24,8		
	10	Rpl4b	15,1	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	11	Tef1	50,0	Translationselongation	Cytosol
		Rna1	45,8	Gsp1-GTPase-Aktivator-Aktivität	Cytosol, (Nukleus)
		Eno1/Eno2	46,8 / 46,9	Glukoneogenese, Glykolyse	Cytoplasma, Phosphopyruvat-Hydratase-Komplex
	12	Krs1	68,0	Lysin-tRNA-Ligase-Aktivität	Cytoplasma
		Ssb2	66,6	ATPase-Aktivität, Bindung ungefalteter Proteine	Cytoplasma, Polysom
		Ded1	65,6	Translationsinitiation	Cytoplasma

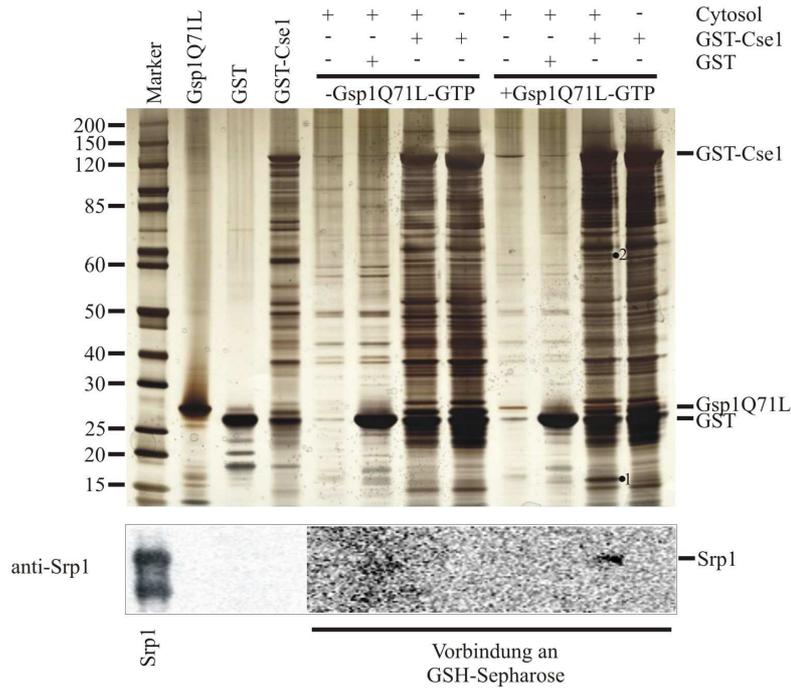
Die Angaben wurden der SGD-Datenbank entnommen.

Bindungsstudien von GST-Cse1 mit Hefe-Cytosol und -Kernlysate

Proteine und mRNA werden mit Hilfe von Import- und Exportrezeptoren zwischen Zellkern und Cytoplasma transportiert. Enthält ein "Cargo" eine klassische NLS, wird es von Kap95 in den Nukleus importiert. Dazu wird zusätzlich Srp1 als Adaptermolekül benötigt, welches das Substrat direkt bindet. Es entsteht ein trimere Komplex, der den NPC passiert. Im Kern verdrängt Gsp1-GTP durch Interaktion mit Kap95 das "Cargo" und Srp1 aus dem Importkomplex. Kap95 kehrt mit Gsp1-GTP ins Cytoplasma zurück, ohne dass noch weitere Faktoren benötigt werden. Srp1 hingegen bildet mit dem Exportin Cse1 und Gsp1-GTP einen trimere Exportkomplex, welcher die Kernpore durchquert und so zurück ins Cytoplasma gelangt (Hood und Silver, 1998; Solsbacher *et al.*, 1998). Durch Hydrolyse des an Gsp1 gebundenen GTP zu GDP dissoziiert der Komplex und Srp1 wird freigesetzt. Nun scheint dies nicht die einzige Funktion von Cse1 zu sein. Verschiedene Arbeitsgruppen vermuten, dass Cse1 bzw. sein Säuger-Homolog CAS eine Rolle beim Zellzyklus, der Zellproliferation und der Apoptose spielen, z.B. beim Mitose-Spindel-Checkpoint, der

Chromosomensegregation oder einfach als Exportrezeptor von Srp1/ Importin α als Transporter von Zellzyklus-Faktoren (Behrens *et al.*, 2003). Um das näher zu beleuchten, wurden die nachfolgenden "GST-Pulldown-Assays" durchgeführt: Rekombinantes GST-Cse1 aus *E. coli* wurde an GSH-Sepharose gebunden. Nachdem die Ansätze gewaschen worden waren, wurde zentrifugiertes Cytosol bzw. Kernlysate aus Hefe, verdünnt mit W-Bindungspuffer inklusive Protease-Inhibitor, zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Gleichzeitig wurde ein zweiter gleicher Ansatz mit zusätzlichem Gsp1Q71L-GTP gemischt, um eventuell vorhandene Exportkomplexe zu stabilisieren. Als Kontrollen dienten mit der jeweiligen Zellfraktion inkubierte GSH-Sepharose, gebundenes GST inkubiert mit einer der beiden Zellfraktionen und gebundenes GST-Cse1 allein (Abb. 19). Während die Zellfraktion an sich und GST allein kaum bis wenig "Verunreinigungen" miteinbrachten, stammte deren Hauptanteil von GST-Cse1 selbst. Durch Immunoblot-Analyse mit einem Primärantikörper gegen GST wurde allerdings gezeigt, dass es sich dabei in der Mehrzahl um Abbauprodukte von GST-Cse1 handelt (Daten nicht gezeigt). Auch zu beachten wäre, dass die Intensitäten der Banden durch die Silberfärbung nicht unbedingt mit der Menge an Protein korrelieren und deshalb unter dem Aspekt des Ausmaßes der Verunreinigung nicht wirklich miteinander verglichen werden können. Des Weiteren wurde mittels Immunoblotting mit anti-Cse1-Antikörpern belegt, dass das zugegebene Cytosol das gebundene Fusionsprotein nicht verdrängt, jedoch das Kernlysate GST-Cse1 etwa um die Hälfte ablöst (Daten nicht gezeigt). Um die Qualität der Versuchsbedingungen einzuschätzen, wurde der trimere Exportkomplex aus Cse1, Gsp1-GTP und Srp1 nachgewiesen. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE, Transfer auf eine PVDF-Membran und Immundetektion mit einem Primärantikörper gegen Srp1, wurde gezeigt, dass Cse1 bei Zugabe von exogenem Gsp1Q71L-GTP Srp1 sowohl im Cytosol als auch im Kernlysate gebunden hat. Das gleiche Ergebnis wurde nach massenspektrometrischer Analyse der Proteine durch den Arbeitskreis von Prof. Albert Sickmann in Würzburg erhalten, nachdem die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt worden waren (Abb. 19). Außerdem wurden neben Fragmenten vermutlich des exogen zugesetzten Cse1 und Gsp1 mit der cytosolischen Fraktion der Co-Aktivatoren von Gsp1-GTP Yrb1, das Protein Ypr115w, dessen Funktion noch nicht geklärt ist, und die RNA-Exonuclease Rex3 gefunden, aus dem Kernlysate wurde desgleichen Yrb1 und Ypr115w gebunden (Tabelle 11). In früheren Versuchen, bei denen statt W-Bindungspuffer PBSKMT genommen wurde, wurde Rex3 sowohl in den Experimenten mit der cytosolischen, als auch mit der nukleären Fraktion nachgewiesen. In letzterem Fall wurde außerdem die mitochondriale Methyl-Transferase Oms1 gefunden (Daten nicht gezeigt).

A



B

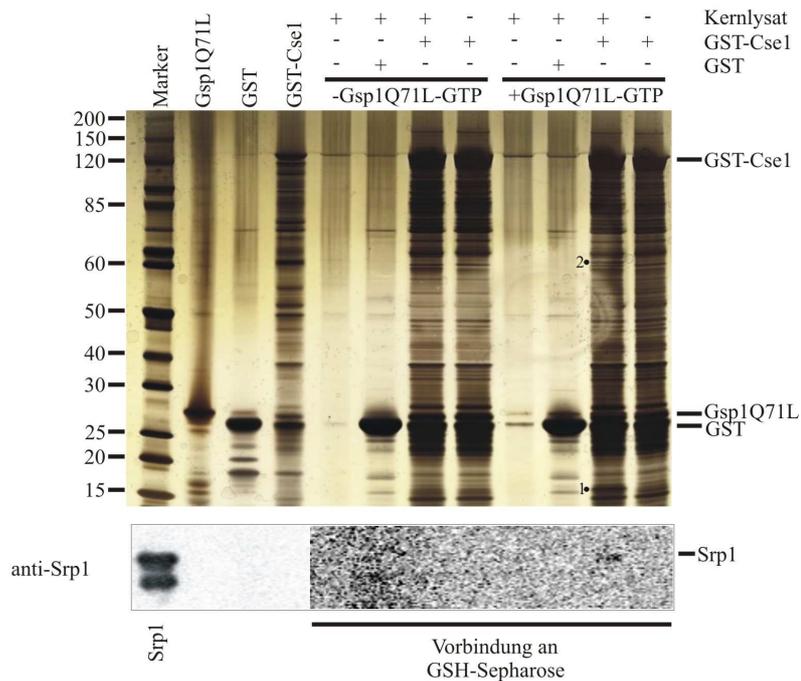


Abb. 19: Cse1 bindet *in vitro* an verschiedene cytosolische und nukleäre Hefepoteine

GST-Cse1 wurde in *E. coli* JM101 synthetisiert und mittels Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Das erhaltene Fusionsprotein (10 µg) wurde für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden (A und B). Nachdem Cytosol mit einem Gesamtproteingehalt von 2,1 mg (A) bzw. Kernlysat mit einem Proteingehalt von 0,8 mg (B) in W-Bindungspuffer für 1 h bei 4°C inkubiert und die Suspension zentrifugiert worden war, wurde der Überstand zur gewaschenen GSH-Sepharose mit dem gebundenen GST-Cse1 gegeben. Die Ansätze wurden noch einmal für 1 h bei 4°C inkubiert. In einem Parallelansatz wurden jeweils zusätzlich 15 µg in *E. coli* M15 synthetisiertes und gereinigtes His₆-Gsp1Q71L-GTP hinzugefügt. Nachdem die Ansätze gewaschen worden waren, wurden die Proben durch SDS-PAGE und Massenspektrometrie analysiert. Daneben wurden die Proben einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Als Erst-Antikörper wurde anti-Srp1 (1:5000) verwendet (A und B), als Sekundärantikörper anti-Kaninchen (1:1000).

Tabelle 11: An Cse1 mittels “GST-Pulldown-Assay“ aus Cytosol und Kernlysat gebundene Interaktionspartner

Abbildung	Banden-Nr.	Protein	MW [kDa]	Funktion	Lokalisation
4A	1	Cse1-Fragment	109,4		
		Yrb1-Fragment	23,0	Ran-bindendes Protein	Cytoplasma, Nukleus
		Gsp1-Fragment	24,8		
	2	Srp1	60,4		
		Cse1-Fragment	109,4		
		Ypr115w-Fragment	120,4	unbekannt	Cytoplasma
		Rex3	45,9	RNA-Prozessierung	Cytoplasma, Nukleus
4B	1	Yrb1-Fragment	23,0	Ran-bindendes Protein	Cytoplasma, Nukleus
		Cse1-Fragment	109,4		
		Ypr115w-Fragment	120,4	unbekannt	Cytoplasma
	2	Cse1-Fragment	109,4		
		Srp1	60,4		

Die Angaben wurden der SGD-Datenbank entnommen.

3.2.2. Tandem-Affinitätsreinigung von Yrb1-S-TEV-Z und Cse1-S-TEV-ZZ aus Hefe-Cytosol und -Kernlysat

Die Nachteile der herkömmlichen Varianten von Bindungstests mit Hilfe eines einfachen “Affinitätstags“ liegen zum einen in einer möglicherweise fehlenden Modifikation des meist rekombinant hergestellten Liganden, die für die Assoziation mit dem Bindungspartner eventuell notwendig ist. Soll der Protein-Protein-Komplex wieder vom Säulenmaterial eluiert werden, sind zum anderen oft stringente Bedingungen wie hohe Salz- oder Detergens-Konzentrationen erforderlich, die aber auch den Komplex zerstören können. Häufig kommt es vor, dass in großer Zahl vorhandene Proteine unspezifisch an die Matrix binden, was die Identifikation der tatsächlichen Interaktionspartner erschwert. Um das zu umgehen, wurde von Rigeaut (Rigaut *et al.*, 1999) die Methode der Tandem-Affinitätsreinigung (kurz TAP) entwickelt. Dabei wird ein endogenes Protein mit einem “Doppeltag“ versehen, über den es im Komplex mit einem Interaktionspartner zunächst an eine erste Matrix bindet. Des Weiteren enthält dieser “TAP-Tag“ eine TEV-Protease-Spaltstelle, wodurch der Protein-Protein-Komplex durch Zugabe dieses Enzyms von der Säule eluiert wird. Mit dem nunmehr einfachen “Tag“ bindet der Ligand an eine zweite Matrix. Es hat sich als eine gute Methode erwiesen, die gefundenen Proteine anschließend einer massenspektrometrischen Analyse zu

unterziehen, bei der Proteinmengen bis zu etwa 100 fmol detektiert werden (Puig *et al.*, 2001). Mit der TAP-Methode kann man also sehr selektiv Protein-Protein-Komplexe auffindig machen, indem man den Hintergrund von in großer Zahl in der Zelle vorhandener Proteine bzw. gegebenenfalls auch "ausgelaufener" Bestandteile des Säulenmaterials erheblich absenkt. Welche Bedingungen sind nun an einen solchen "TAP-Tag" zu stellen? Zum einen sollte er eine hohe Affinität an die Matrix haben, um in geringerer Zahl vorhandenes "Target-Protein" vollständig zu binden und so aufzukonzentrieren. Die Bindung sollte hoch spezifisch sein, um das Verhältnis von spezifisch zu nicht-spezifisch an die Matrix gebundenem Material zu erhöhen. Die Elution sollte effizient und charakteristisch sein und damit eine gute Wiederfindung des "Target-Proteins" ermöglichen. Gleichzeitig sollten milde Bedingungen der Elution die Protein-Komplex-Struktur schützen. Häufig benutzte "Tags" bei "Pull-down-Assays" sind z.B. FLAG (Brizzard *et al.*, 1994), His₆ (Hochuli *et al.*, 1988), Strep (Schmidt und Skerra, 1993), CBD ("chitin-bindung domain") (Chong *et al.*, 1997), CBP ("calmodulin-binding peptide") (Stofko-Hahn *et al.*, 1992) und zwei IgG-bindende Einheiten des Protein A aus *Staphylococcus aureus* (Lohman *et al.*, 1989). Die letzten beiden wurden bislang zur Tandem-Affinitätsreinigung herangezogen (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999). Obwohl sich diese Methode als gutes Mittel erwiesen hat, Protein-Komplexe in der Zelle zu identifizieren, scheint das System für nur in geringer Zahl vorkommender Proteine und für spezielle Zellarten nicht immer ausreichend zu sein (Drakas *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Zeghouf *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde statt des "CBP-Tags" der "S-Tag" genommen, welcher die nachfolgenden Vorteile in sich vereinigt: es handelt sich um einen kleinen "Tag" (15 Aminosäuren), der mit einer hohen Affinität an seinen Liganden, das S-Protein, bindet (K_D -Wert = $1,1 \times 10^{-7}$ M bei 25°C in 50 mM Natriumacetat-Puffer mit 0,1 M Natriumchlorid, pH 6,0 (Connelly *et al.*, 1990; Raines *et al.*, 2000)). Er ist gut löslich und besitzt bei neutralem pH-Wert eine beinahe neutrale Netto-Ladung. Die exakte Natur der Interaktion zwischen "S-Tag" und S-Protein verringert die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung mit anderen Molekülen und nicht zuletzt ist das Peptid geeignet, innerhalb eines Fusionproteins eingegliedert zu werden - wie in dieser Arbeit geschehen -, ohne dabei seine Fähigkeit zur S-Protein-Bindung zu verlieren (Raines *et al.*, 2000). Die entsprechende Gen-Kassette für den "S-TEV-ZZ-Tag" wurde von Karsten Weis (Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley) zur Verfügung gestellt. Diese wurde genomisch integriert und das jeweilige Protein in physiologischen Mengen exprimiert, um Artefakte in Form von unspezifischen Bindungen durch in hoher Zahl vorhandene Proteine zu minimieren.

Lokalisierung von Yrb1 und Cse1 mit C-terminalem “Tag“ in *S. cerevisiae*

Die Gen-Kassette für den “S-TEV-ZZ-Tag“ wurde genomisch so in das Hefegenom integriert, dass das Ziel-Protein seinen “Tag“ am C-Terminus aufwies. Dabei stellte sich die Frage, ob Yrb1 und Cse1 unter diesen Bedingungen weiterhin physiologisch lokalisiert sein würden und damit ihrer Funktion in der Zelle gerecht werden könnten. Um das zu überprüfen, wurde eine *GFP*-Kassette ins Genom eingeführt und die Lokalisierung des exprimierten veränderten Yrb1-GFP und Cse1-GFP (C-terminal) mit der der nativen Proteine verglichen.

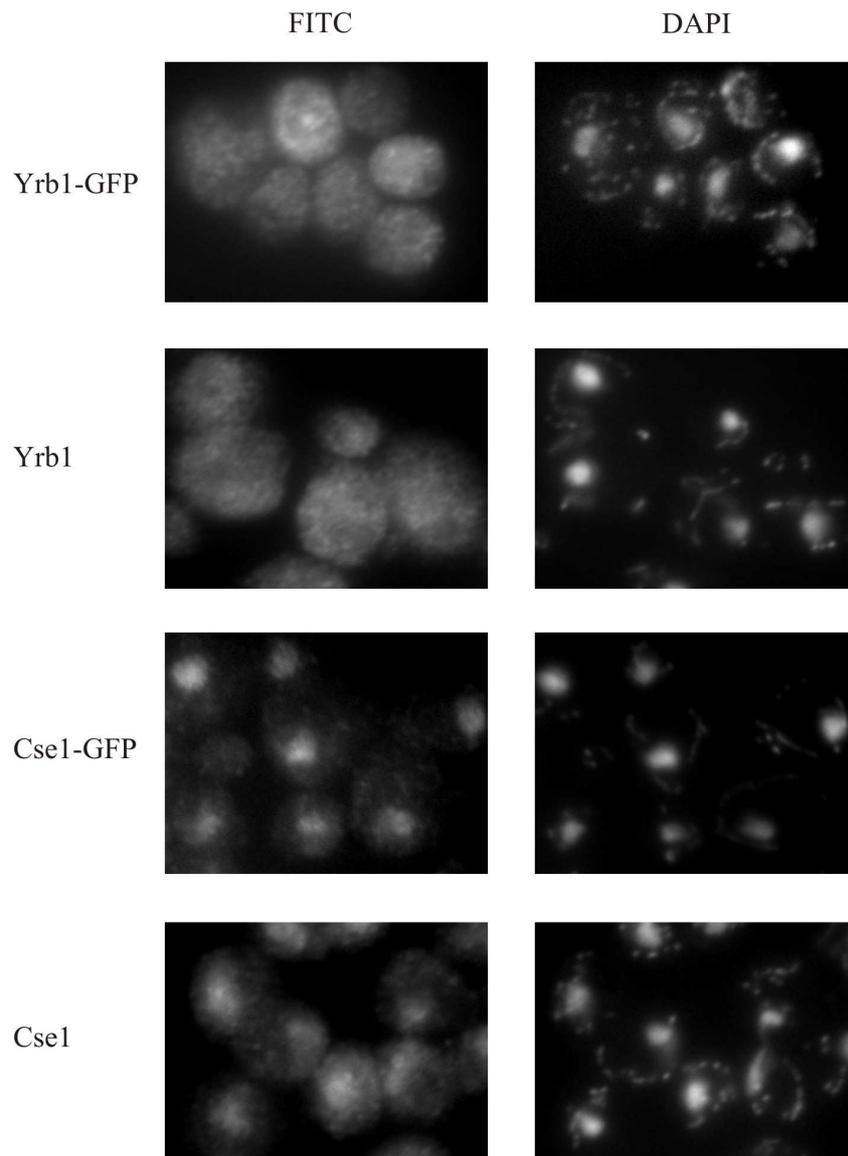


Abb. 20: Yrb1 und Cse1 weisen mit einem“Tag“ am C-Terminus eine physiologische Lokalisierung auf. Zellen der Stämme GSY1246 (*YRB1-GFP*) und GSY1247 (*CSE1-GFP*) wurden in synthetischem Vollmedium kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen für eine indirekte Immunfluoreszenz mit Formaldehyd fixiert und mit den Antikörpern anti-GFP (1:1000), anti-Yrb1 (1:1000) bzw. anti-Cse1 (1:500) inkubiert, welche im Anschluss mit FITC-gekoppeltem anti-Kaninchen-IgG (1:1000) detektiert wurden. Als Kontrollen für das native Protein dienten dabei die beiden Stämme wechselseitig. Zusätzlich wurde die DNA mit DAPI angefärbt.

Die erhaltenen Hefestämme wurden in Bezug auf die korrekte Integration der *GFP*-Kassette untersucht. Die synthetisierten Proteine wurden im Gesamtzelllysate mittels SDS-PAGE und anschließender Immundetektion mit GFP-spezifischen Antikörpern detektiert. Auf DNA-Ebene erfolgte der Nachweis durch Isolierung der genomischen DNA und anschließender Durchführung einer PCR mit Oligonukleotiden, die im Leserahmen des *YRB1*- bzw. *CSE1*-Gens und in dem miteingeführten Markergen hybridisierten (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins wurde durch indirekte Immunfluoreszenz in einer Färbung mit GFP- bzw. Yrb1- und Cse1-spezifischen Antikörpern im Falle der nativen Proteine nachgewiesen. Yrb1 mit "Tag" am C-Terminus ist wie endogenes Yrb1 hauptsächlich im Cytoplasma, wenig im Kern lokalisiert (bei ausschließlich cytosolischer Lokalisation müssten Aussparungen im Bereich des Nukleus zu sehen sein). Auch bei Cse1 entspricht seine Lokalisierung mit C-terminalem "Tag" der physiologischen: Cse1-GFP verteilt sich auf Cytoplasma und Nukleus (Abb. 20). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Bindungsversuchen mit Yrb1 und Cse1 mit "TAP-Tag" am C-Terminus gearbeitet.

Synthese von Yrb1-S-TEV-Z in *S. cerevisiae* und seine Mengenbestimmung in Cytosol und Kernlysate

Der Co-Aktivatoren der Gsp1-GTPase Yrb1 spielt eine Rolle bei der Dissoziation von Exportkomplexen, die aus dem Zellkern ausgeschleust wurden. Yrb1 wurde aber nicht nur im Cytosol, sondern auch im Nukleus nachgewiesen (Künzler *et al.*, 2000). Um seine Funktion dort zu klären, sind in dieser Arbeit Bindungsversuche gemacht worden, in denen endogen in der Hefezelle vorkommende Protein-Protein-Komplexe ermittelt wurden. Das Zielprotein wurde mit einem sog. "TAP-Tag" versehen, mit den entsprechenden Zellen eine Zellfraktionierung durchgeführt und aus den gewonnenen Fraktionen Ligand-Interaktionspartner-Komplexe extrahiert. Bei einer solchen Tandem-Affinitätsreinigung (TAP) wird das "Target-Protein" über einen "Doppeltag" an eine Matrix gebunden, an einer spezifischen Spaltstelle gespalten und über den "restlichen" "Tag" an eine zweite Matrix gebunden, um so einen erhöhten Reinigungsgrad zu erreichen. In dieser Arbeit wurde eine *S-TEV-ZZ*-Gen-Kassette hinter das *YRB1*-Gen in das Hefegenom integriert. Die Richtigkeit der Integration wurde zum einen durch Isolierung der genomischen DNA und anschließende Durchführung einer PCR mit Oligonukleotiden, die im Leserahmen des *YRB1*-Gens und hinter dem miteingeführten Markergen im Genom hybridisierten (Daten nicht gezeigt) belegt. Zum anderen wurde das synthetisierte Protein im Gesamtzelllysate mittels SDS-PAGE und

anschließender Immundetektion mit Yrb1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 21A).

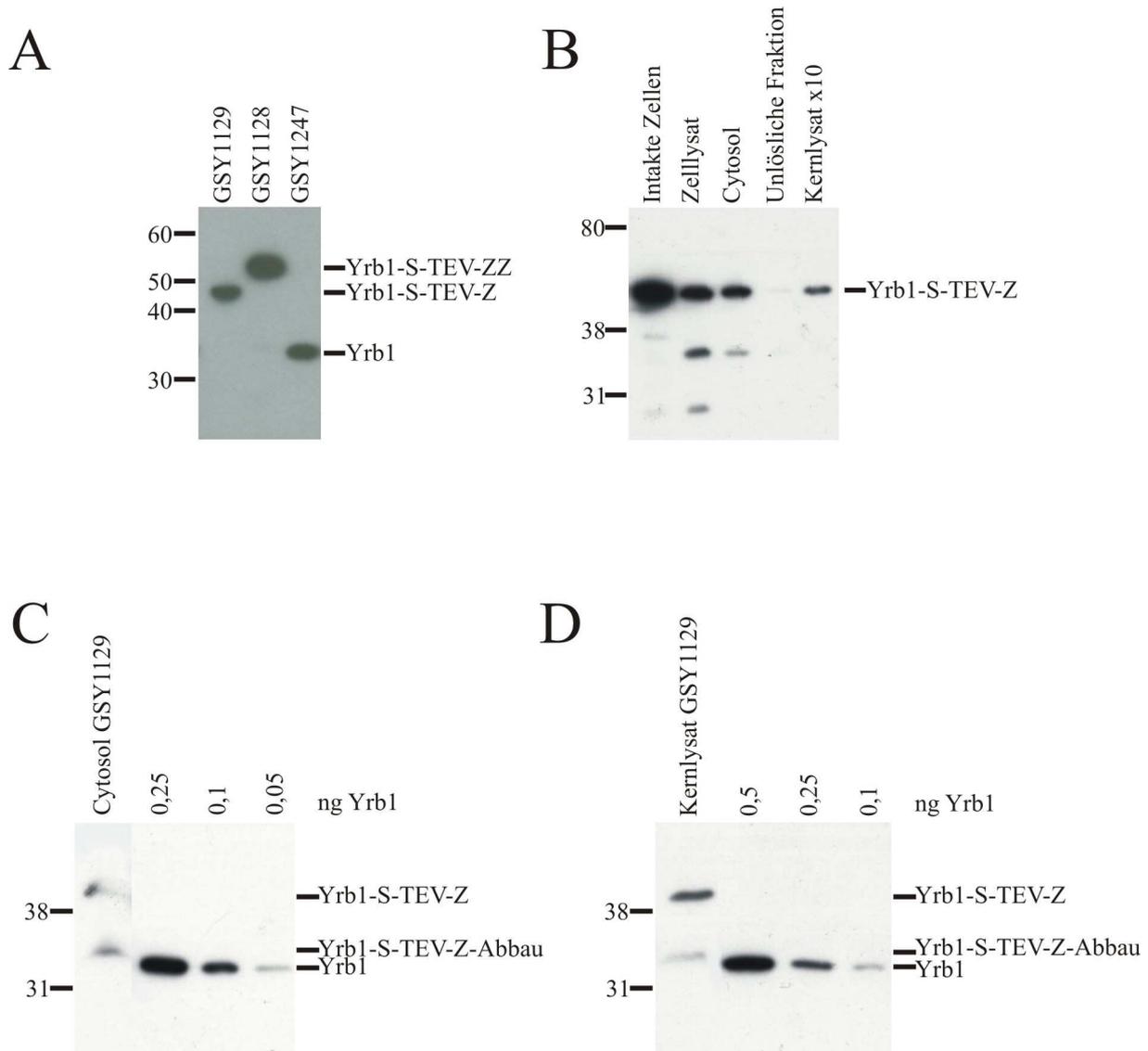


Abb. 21: Die Synthese von Yrb1-S-TEV-Z und seine Mengenbestimmung in Cytosol und Kernlysate

(A) Aus Zellen der Stämme GSY1128, GSY1129 und GSY1247 als Kontrolle für natives Yrb1 wurden durch einfachen Aufschluss mittels Vortexen unter Zugabe von Glasperlen Gesamtzelllysate hergestellt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-Yrb1 (1:2000) als Erst-Antikörper detektiert. (B) GSY1129-Zellen wurden kultiviert und daraus Cytosol und Kernlysate gewonnen. Von den einzelnen Stationen der Aufarbeitung wurden Proben entnommen (die Probe des Kernlysats ist 10-fach so konzentriert wie die übrigen) und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Bei der anschließenden Immunoblot-Analyse wurde mit anti-Yrb1 (1:2000) als Erst-Antikörper inkubiert. (C) 6,16 μ l Cytosol aus GSY1129 und verschiedene Mengen rekombinantes Yrb1 wurden in einem Immunoblot analysiert und die Menge des enthaltenen Yrb1-S-TEV-Z mit Hilfe der ImageQuant TL v2003.03-Software quantifiziert. (D) Analog wurde mit 2,63 μ l Kernlysate aus GSY1129 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Aus der Größe der erhaltenen Produkte lässt sich schließen, dass die Gen-Kassette bei beiden erhaltenen Klonen prinzipiell an der richtigen Stelle eingegliedert wurde, jedoch bei Stamm GSY1129 eine Z-Domäne des Protein A-Teils des “Tags“ fehlt und lediglich Yrb1-S-TEV-Z synthetisiert wird. GSY1128 synthetisiert Yrb1-S-TEV-ZZ korrekt, jedoch zeigte sich, dass

dieser Stamm nur sehr schlecht wächst. Vorstellbar wäre, dass das essenzielle Yrb1 wegen der zweiten Z-Domäne durch sterische Behinderung in seiner Funktion gehemmt wird. GSY1129 hingegen zeigte gutes Wachstum und weil Yrb1-S-TEV-Z in der Lage war, sowohl an IgG-, als auch an S-Protein-Sepharose zu binden (Abb. 22), wurde im Weiteren nur noch dieser Stamm verwendet. Mittels Immunoblotting wurde nachgewiesen, dass die Mengen an Yrb1 mit "Tag" in GSY1129 und an nativem Yrb1 in Hefewildtypzellen vergleichbar sind (Daten nicht gezeigt).

Für die nachfolgenden Bindungsversuche wurde jedoch kein Gesamtzelllysat verwendet, sondern Cytosol bzw. Kernlysat. Dadurch sollte verhindert werden, dass Artefakte entstehen, die bei räumlicher Trennung nicht gebildet bzw. durch deren Interaktion physiologische Komplexe zerstört würden. Die einzelnen Stufen einer solchen Präparation sind in Abb. 21B aufgeführt. Im Verlauf der Aufarbeitung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten anteilig sich entsprechende Aliquots entnommen und mit SDS-Puffer verdünnt. Als einzige Ausnahme wurde die Probe des Kernlysats 10 x so konzentriert angesetzt. Die Proteine wurden wieder mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper gegen Yrb1 unterzogen. Man sieht, dass es ausgehend von den intakten Zellen über Zellwandverdau und Homogenisierung der Zellen bis hin zum Zelllysat bereits starke Verluste an Yrb1-S-TEV-Z gab. Das entspricht jedoch dem Verhalten des nativen Yrb1 (vgl. 3.1), welches ebenfalls in dieser Phase den stärksten Abbau zeigte, vielleicht sogar noch mehr als hier. Das könnte man damit erklären, dass der "Tag" das Protein etwas gegen Proteasen abschirmt. Im weiteren Verlauf zeigte sich Yrb1-S-TEV-Z als stabil. Zwischen Zelllysat und Cytosol, wo der Hauptanteil des Proteins zu finden ist, ist kaum ein Unterschied zu erkennen und auch die Lyse der Kerne durch Ultraschall scheint dem Protein nicht zu schaden, da es keine Verluste gab (man berücksichtige die 10-fach höhere Konzentration an Kernlysat im Vergleich zur unlöslichen Fraktion). Daraus wurde abgeleitet, dass die Verteilung von Yrb1-S-TEV-Z der physiologischen des nativen Proteins entspricht, was bereits durch *in vivo*-Mikroskopie gezeigt wurde (vgl. Abb. 20).

Anhand der in Abb. 21C und D dargestellten Immunoblot-Analysen (anti-Yrb1-Antikörper) wurde mit Hilfe der Software ImageQuant TL v2003.03 der Gehalt an Yrb1-S-TEV-Z in der cytosolischen und der Kernlysat-Fraktion im Vergleich mit ebenfalls aufgetragenem rekombinantem Yrb1 bestimmt. Dabei blieb der Abbau des Proteins unbeachtet und es wurde nur intaktes Protein quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Quantifizierung von Yrb1-S-TEV-Z in Cytosol bzw. Kernlysate aus GSY1129

Zellfraktion	Cytosol	Kernlysate
Volumen der aufgetragenen Zellfraktion [μl]	6,16	2,63
errechnete Masse Yrb1-S-TEV-Z in der aufgetragenen Probe [ng]	0,07	0,25
Konzentration von Yrb1-S-TEV-Z in der jeweiligen Zellfraktion [ng/ μl]	0,012	0,096
Masse an Yrb1-S-TEV-Z [ng] pro 1 μg Gesamtprotein in der jeweiligen Zellfraktion	0,0018	0,025
Masse an Yrb1-S-TEV-Z [ng] aus der jeweiligen Zellfraktion pro 1 g Zellen	146	51

Dabei wurde für die verwendete Cytosolfraction, die mit Puffer gemischt vorliegt, eine Konzentration von 0,012 ng Yrb1-S-TEV-Z pro μl bestimmt und für die in diesem Fall benutzte mit Puffer verdünnte Kernlysate-Fraktion eine Konzentration von 0,096 ng pro μl . Man beachte, dass das Cytosol zuvor stärker verdünnt wurde als das Kernlysate. Zurückgerechnet auf die Menge an Gesamtprotein in der jeweiligen Fraktion ergibt sich damit ein Yrb1-S-TEV-Z-Gehalt von 0,0018 ng/ μg Gesamtprotein im Cytosol und von 0,025 ng/ μg Gesamtprotein im Kernlysate (wesentlich höherer Gesamtproteingehalt im Cytosol!). Bezogen auf das Zellfeuchtgewicht bedeutet das, dass aus 1 g Zellen 146 ng Yrb1-S-TEV-Z im Cytosol und 51 ng im Kernlysate gewonnen wurden. Trotz der großen Verluste entspricht das von der Tendenz her immer noch der physiologischen Verteilung in den Kompartimenten.

Tandem-Affinitätsreinigung mit Yrb1-S-TEV-Z

Wenn Makromoleküle aus dem Zellkern ausgeschleust werden, so geschieht das unter Komplexbildung mit einem Exportrezeptor und Gsp1-GTP, welches im Nukleus im Vergleich zum Cytoplasma im Überschuss vorliegt. Dort angekommen wird das gebundene GTP durch Gsp1 hydrolysiert und der Komplex dissoziiert. Neben Rna1 stimuliert dabei Yrb1 die GTPase-Aktivität von Gsp1. Da jedoch gezeigt wurde, dass Yrb1 zwischen Kern und Cytoplasma pendelt (Künzler *et al.*, 2000), sollten die im Folgenden gezeigten Bindungsversuche dazu dienen, Importrezeptoren für Yrb1 aufzufindig zu machen bzw. seine Funktion im Kern dadurch näher zu beleuchten, dass entsprechende nukleäre Interaktionspartner detektiert werden sollten. Bei den Experimenten wurde eine S-TEV-ZZ-

Gen-Kassette in Hefe genomisch integriert. Aus diesen Hefezellen wurde wie im Kapitel 2.8.10 beschrieben Cytosol und Kernlysat hergestellt. Das synthetisierte Yrb1 wurde in Komplex mit eventuellen Interaktionspartnern über seinen "Tag" an IgG-Sepharose immobilisiert (2 h, 4°C), mit TEV-Protease über eine spezielle Spaltstelle für dieses Enzym eluiert (1 h, Raumtemperatur), um an eine weitere Matrix, die S-Protein-Sepharose, erneut gebunden zu werden (2 h, 4°C). Von den einzelnen "Stationen" wurden Proben entnommen und entweder lediglich durch SDS-PAGE und Färbung mit kolloidalem Coomassie analysiert (Abb. 22A) oder die Proteine wurden von einem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen und immunologisch mit Antikörpern gegen Yrb1 bzw. Cse1 detektiert (Abb. 22B und C). Vor allem in der Immunoblot-Analyse wird deutlich, dass es gelungen ist, Yrb1-S-TEV-Z aus dem Cytosol (B) und aus dem Kernlysat (C) durch Bindung an IgG-Sepharose zu extrahieren. Nach Zugabe von TEV-Protease wurde Yrb1-S abgespalten und war im Überstand wiederzufinden. Parallel dazu gab es jeweils einen Ansatz ohne TEV-Protease, um unspezifische Effekte zu visualisieren. Yrb1 mit dem jetzt nur noch einfachen "Tag" wurde in einem zweiten Bindungsschritt an S-Protein-Sepharose gebunden. Speziell mit Cytosol (B) zeigte sich, dass das Protein durch die TEV-Protease an seiner Spaltstelle angegriffen wurde, es jedoch bei beiden Ansätzen unspezifischen Abbau gab, der in Yrb1 ohne "Tag" (man beachte auch das Molekulargewicht) resultierte und deshalb im Überstand zu finden war. Das Degradationsprodukt zeigte sich auch bei Bindung an S-Protein-Sepharose im Überstand, was erneut auf ein Fehlen des "Tags" hindeutet. Alles in allem verlief die Bindung an beide Matrices gut, jedoch nicht quantitativ (Die Auftragsmengen der Proben der einzelnen Schritte entsprechen sich im Hinblick auf die Parallelansätze (- / + TEV-Protease), nicht bezüglich der einzelnen "Stationen" (1. Bindung/ Spaltung/ 2. Bindung). Die Verhältnisse zueinander sind Abb. 22 zu entnehmen.). Unter (A) ist der Verlauf desselben Bindungsversuchs nach einer SDS-PAGE und Färbung mit kolloidalem Coomassie dargestellt, jedoch ist das Ziel-Protein aufgrund seiner geringen Menge und der Überlagerung durch sonstige Proteine nicht so deutlich sichtbar wie in der Immundetektion. Die eluierte schwere und leichte Kette des IgGs sowie daran anhaftende Proteine verdecken die Bindung von Yrb1-S-TEV-Z an und seine Ablösung von der ersten Matrix, jedoch sieht man im dazugehörigen Überstand eine schwache Bande auf entsprechender Höhe. Deutlich sieht man jedoch die Immobilisierung von Yrb1-S an S-Protein-Sepharose in dem Ansatz, welchem zuvor TEV-Protease zugesetzt wurde, jedoch nicht in dem ohne Enzym.

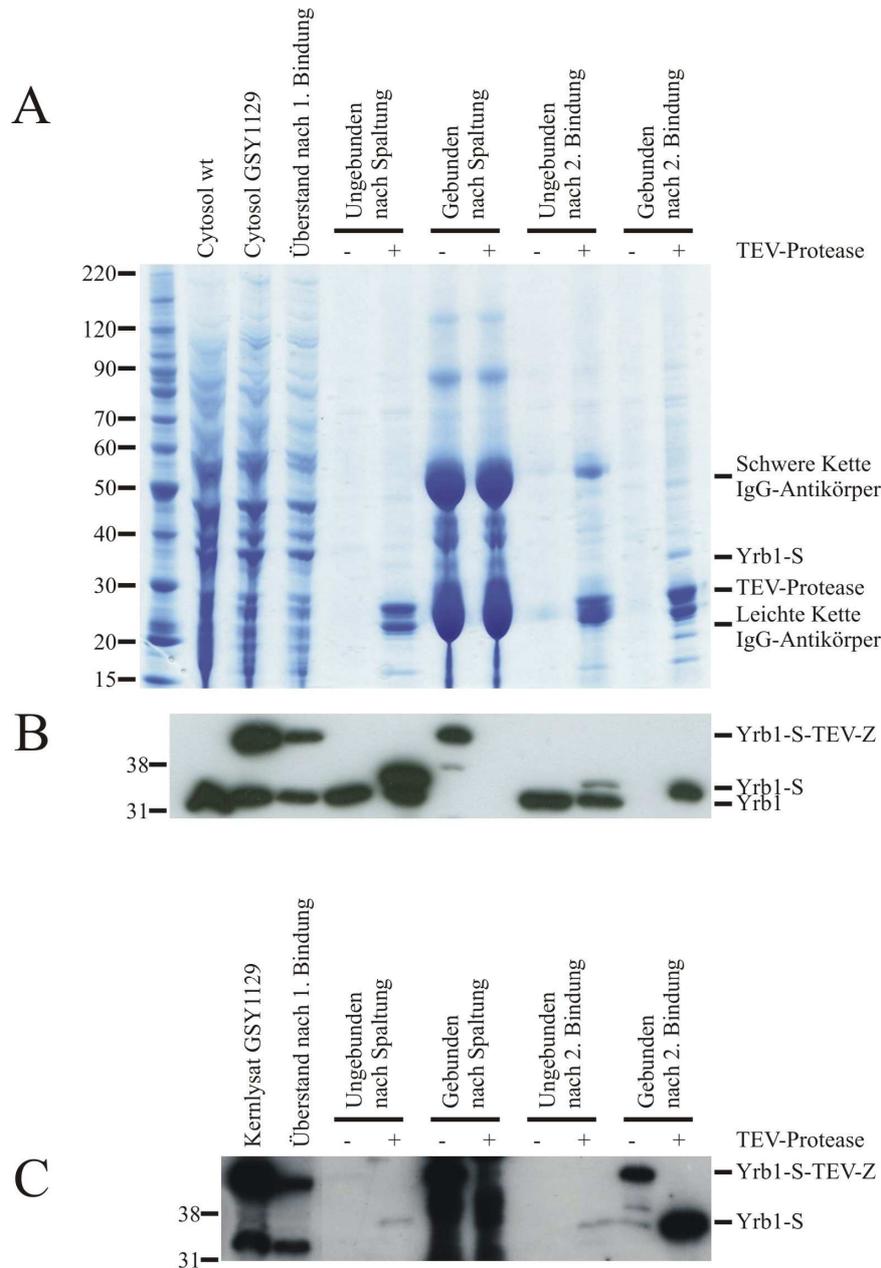


Abb. 22: Tandem-Affinitätsreinigung von Yrb1-S-TEV-Z

Zellen des Hefestammes GSY1129 wurden kultiviert und daraus eine Cytosol-Fraktion und Kernlysate bereitet. (A und B) Cytosol mit einem Gesamtproteingehalt von 206 mg aus 7 g Zellen wurden zusammen mit IgG-Sephrose für 2 h bei 4°C inkubiert (1. Bindung). Parallel dazu wurde ein Kontroll-Ansatz vorbereitet, der keiner TEV-Protease-Behandlung unterzogen wurde. Nach Zentrifugation wurde aus dem Überstand (ÜS0; Abkürzungen vergleiche unten) eine Probe entnommen. Zu den Ansätzen wurden entweder 276 µg TEV-Protease (Spaltung) oder lediglich Puffer gegeben. Nach der Inkubation (für 1 h bei Raumtemperatur) wurde wiederum zentrifugiert und vom Überstand (ÜS1) bzw. Pellet (Pe1) wurde ein Aliquot entnommen. Der Überstand wurde zu S-Protein-Sephrose gegeben, inkubiert (für 2 h, 4°C) (2. Bindung) und wieder zentrifugiert. Auch hier wurde von Überstand (ÜS2) und Pellet (Pe2) ein Aliquot entnommen. Alle Proben, inklusive Ausgangsmaterial, wurden durch SDS-PAGE mit kolloidalem Coomassie bzw. Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper gegen Yrb1 (1:2000) und einem anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) detektiert. (B) Bezogen auf die Menge des Ausgangsmaterials (AM) wurden die übrigen Proben um folgende Faktoren konzentrierter bzw. weniger konzentriert aufgetragen: AM:ÜS0:ÜS1:Pe1:ÜS2:Pe2 verhält sich wie 1:0,2:46:25,6:46:26,8. (C) Parallel dazu wurde mit Kernlysate verfahren. Dabei wurden pro Ansatz 27 mg Gesamtprotein aus 14 g Zellen genommen und mit 746 µg Protease behandelt. Die Proben wurden durch Immunoblot-Analyse mit anti-Yrb1 (1:2000) als Erst-Antikörper und einem anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) detektiert und in folgendem Verhältnis aufgetragen: AM:ÜS0:ÜS1:Pe1:ÜS2:Pe2 wie 1:0,4:0,8:70:0,8:47.

Im Vergleich dazu sieht man im Versuch mit Kernlysat (C), dass auch hier beide Bindungen zwar deutlich, aber nicht quantitativ verliefen. Die TEV-Spaltung war wiederum spezifisch, jedoch kam es im Ansatz ohne Enzym zur Ablösung von Yrb1-S-TEV-Z, was in der vorletzten Spur deutlich wird, wo Yrb1 mit dem intakten "Doppeltag" an S-Protein-Sepharose bindet. Dem ist nicht so bei Zugabe von TEV-Protease. Anzunehmen ist, dass, da es sich bei solchen Bindungen immer um Gleichgewichtsreaktionen handelt, in beiden Fällen Yrb1-S-TEV-Z mit komplettem "Tag" abgelöst wurde, bei Zugabe von TEV-Protease das besser zugängliche freie Protein aber sofort gespalten wurde.

Synthese von Cse1-S-TEV-ZZ in *S. cerevisiae* und seine Mengenbestimmung in Cytosol und Kernlysat

Cse1 ist der Exportrezeptor von Srp1 (Hood und Silver, 1998; Solsbacher *et al.*, 1998), einem Protein, welches am nukleären Import von "Cargos" mit einer klassischen NLS beteiligt ist. Um weitere Substrate zu detektieren bzw. andere Funktionen von Cse1 im Kern zu beleuchten, wurden Bindungsversuche mit Cse1 mit einem "TAP-Tag" durchgeführt. Dazu wurde eine *S-TEV-ZZ*-Gen-Kassette ins Hefegenom eingeführt. Die Richtigkeit der Integration wurde überprüft. Die genomische DNA wurde isoliert und eine Polymerase-Kettenreaktion mit Oligonukleotiden durchgeführt, die im Leserahmen des *CSE1*-Gens und hinter dem miteingeführten Markergen im Genom hybridisierten (Daten nicht gezeigt). Daneben wurde aus den transformierten Zellen ein Komplettlysat hergestellt und das exprimierte Protein durch Immunoblotting mit einem Antikörper gegen Cse1 detektiert (Abb. 23A). Im zusätzlichen Vergleich mit dem nativen Protein sieht man einen "Shift" von 109,5 kDa nach 126,5 kDa mit "TAP-Tag". Bei der direkten Gegenüberstellung der gleichen Mengen an mit Glasperlen lysierten Hefewildtypzellen und Zellen des Stammes GSY1127 in einer Immunoblot-Analyse sieht man, dass beide Proteine ähnlich stark synthetisiert wurden (Daten nicht gezeigt). Abb. 23 zeigt den Ablauf einer Präparation von Cytosol und Kernlysat mit den transformierten Hefezellen. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.8.10 beschrieben. Von den einzelnen Phasen wurden Proben genommen. Mengenmäßig entsprechen sie sich bis auf das Kernlysat, dessen Probe 3-fach so konzentriert war wie die übrigen. Die Verluste zwischen den einzelnen Stationen waren gering, jedoch sieht man - im Cytosol stärker als im Kernlysat - überall eine Abbaubande auf einer Höhe zwischen nativem und Protein mit "Tag". Die Aufteilung von Cse1-S-TEV-ZZ zwischen Cytosol und Kern entspricht im Prinzip der physiologischen: das Protein ist in beiden Kompartimenten deutlich vertreten.

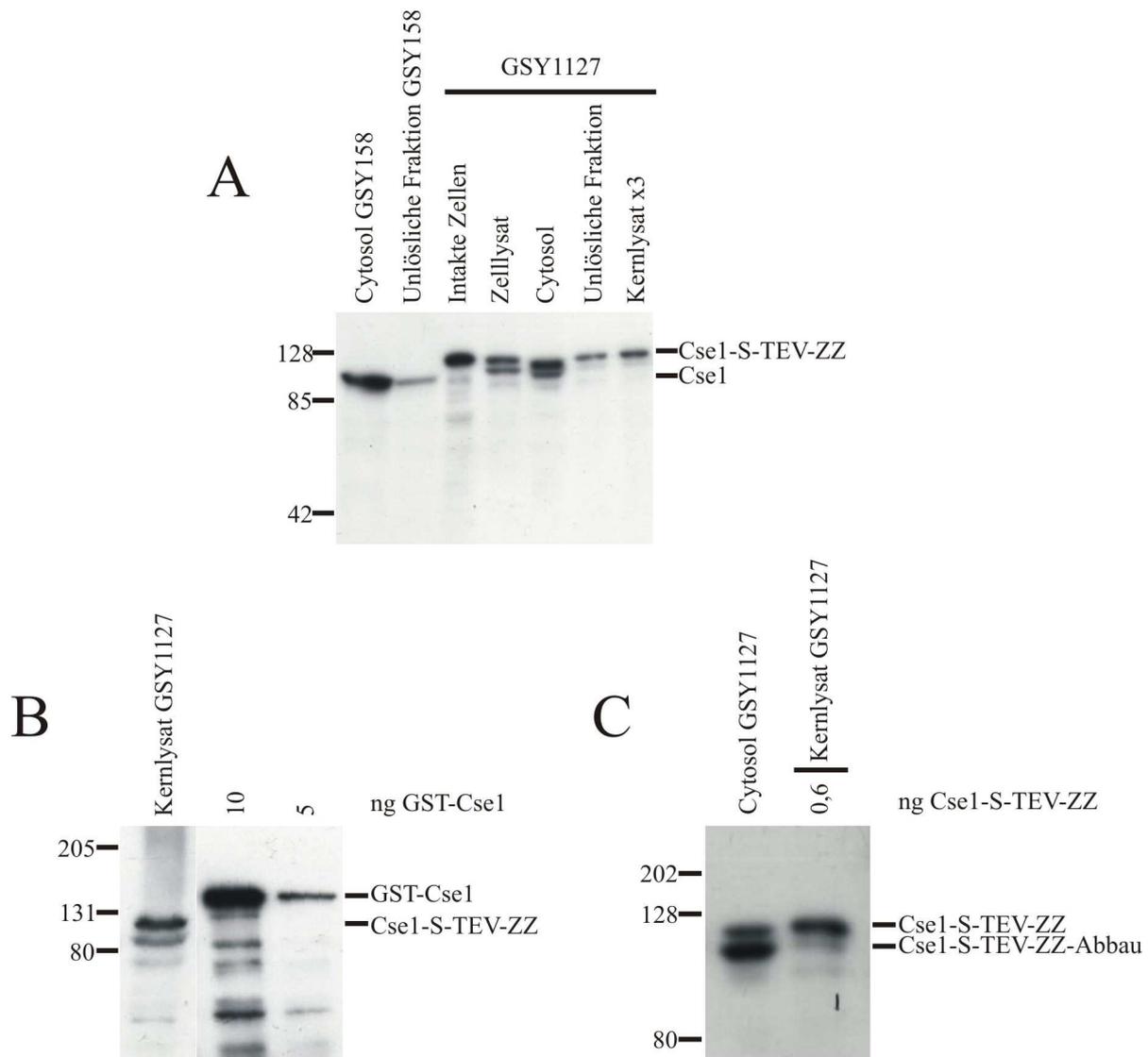


Abb. 23: Die Synthese von Cse1-S-TEV-ZZ und seine Mengenbestimmung in Cytosol und Kernlysate

(A) Zellen der Hefestämme GSY1127 und GSY158 als Kontrolle für das native Protein wurden kultiviert und daraus Cytosol und Kernlysate gewonnen. Von den einzelnen Stationen der Aufarbeitung- beim Wildtyp nur von Cytosol und der unlöslichen Fraktion- wurden Aliquots entnommen (die Probe des Kernlysats ist 3-fach so konzentriert wie die übrigen) und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Bei der anschließenden Immunoblot-Analyse wurde mit anti-Cse1 (1:500) als Erst-Antikörper und anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) inkubiert. (B) 2,5 µl Kernlysate aus GSY1127 und verschiedene Mengen rekombinantes GST-Cse1 wurden mit Immunoblot-Analyse detektiert und die Menge des enthaltenen Cse1-S-TEV-ZZ mit Hilfe der ImageQuant TL v2003.03-Software quantifiziert. (D) Die Menge an in Cytosol enthaltenem Cse1-S-TEV-ZZ wurde in direktem Vergleich zum Kernlysate ermittelt. 0,247 µl Cytosol sowie 0,6 ng Cse1-S-TEV-ZZ aus Kernlysate wurden aufgetragen und die enthaltenen Menge mit der ImageQuant TL v2003.03-Software berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Abb. 23 zeigt die Mengenbestimmung von Cse1-S-TEV-ZZ in Cytosol (C) und Kernlysate (B). Durch eine Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper gegen Cse1 wurde die Menge des Proteins anhand verschiedener Mengen GST-Cse1 mit der ImageQuant TL v2003.03-Software bestimmt. Die Menge an Cse1-S-TEV-ZZ im Cytosol wurde mit der im Kernlysate

verglichen und berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgeführt. Dabei ergab sich für das verwendete Cytosol eine Konzentration von 1,38 ng Cse1-S-TEV-ZZ/ μ l und für das Kernlysate 2,4 ng/ μ l. Das bedeutet, pro 1 μ g Gesamtprotein der jeweiligen Zellfraktion sind im Cytosol 0,186 ng und im Kernlysate 0,338 ng Cse1-S-TEV-ZZ zu finden. Bezogen auf 1 g Zellen (Zellfeuchtgewicht) sind das im Cytosol 2,6 μ g Protein und im Kernlysate 777 ng. Das bedeutet, das Protein verteilt sich, wenn auch nicht ganz gleichmäßig, zwischen der Cytosol- und der Kernfraktion.

Tabelle 13: Quantifizierung von Cse1-S-TEV-ZZ in Cytosol bzw. Kernlysate aus GSY1127

Zellfraktion	Cytosol	Kernlysate
Volumen der aufgetragenen Zellfraktion [μ l]	0,247	2,5
errechnete Masse Cse1-S-TEV-ZZ in der aufgetragenen Probe [ng]	0,34	5,9
Konzentration von Cse1-S-TEV-ZZ in der jeweiligen Zellfraktion [ng/ μ l]	1,38	2,4
Masse an Cse1-S-TEV-ZZ [ng] pro 1 μ g Gesamtprotein in der jeweiligen Zellfraktion	0,186	0,338
Masse an Cse1-S-TEV-ZZ [ng] aus der jeweiligen Zellfraktion pro 1 g Zellen	2600	777

Tandem-Affinitätsreinigung mit Cse1-S-TEV-ZZ und Identifikation eines bekannten Protein-Protein-Komplexes

Proteine, die eine klassische Kernlokalisierungssequenz enthalten, werden in den Nukleus importiert, indem sie über das Adapterprotein Srp1 an Kap95 binden und das Heterotrimer die Kernpore durchquert. Durch Interaktion von Gsp1-GTP mit Kap95 wird das Substrat wieder freigesetzt und die Transportfaktoren werden zurückgeführt. Kap95 ist gemeinsam mit Gsp1-GTP in der Lage, ohne weitere Faktoren zurück ins Cytoplasma zu gelangen, Srp1 benötigt dazu Cse1 (Hood und Silver, 1998). Zusammen mit Gsp1-GTP bildet sich ein ternärer Komplex, der ins Cytoplasma transloziert. Dort angekommen gibt Cse1 sein Substrat wieder frei.

Diese Transportfunktion scheint aber nicht seine einzige Aufgabe zu sein. Man vermutet, dass Cse1 bzw. CAS eine Rolle beim Zellzyklus, der Zellproliferation bzw. der Apoptose spielen könnte, z.B. beim Mitose-Spindel-Checkpoint, der Chromosomensegregation oder einfach

beim Export von Srp1/ Importin α als Transporter von Zellzyklus-Faktoren (Hood *et al.*, 2001; Sakakida *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 1994). Um das zu überprüfen, wurde in Bindungsstudien nach weiteren Interaktionspartnern gesucht. Dazu bediente man sich der Methode der Tandem-Affinitätsreinigung. Die *S-TEV-ZZ*-Kassette wurde in Hefe genomisch hinter dem *CSE1*-Gen eingegliedert und eine Zellfraktionierung durchgeführt. Das synthetisierte Cse1 trug demzufolge einen "TAP-Tag", über den es anfangs an IgG-Sepharose gebunden wurde. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 4°C. Eluiert wurde durch spezifische Spaltung mit TEV-Protease innerhalb des "Tags" (für 1 h bei Raumtemperatur). Über den verbliebenen "S-Tag" wurde das Protein an S-Protein-Sepharose noch einmal gebunden. Die Suspension wurde erneut für 2 h bei 4°C inkubiert. Auf diese Weise wurden endogen in der Hefezelle vorliegende Komplexe mit Cse1 isoliert. Abb. 24 A zeigt den Ablauf einer solchen Tandem-Affinitätsreinigung mit Kernlysat. Es gibt jeweils zwei Parallel-Ansätze, ohne und mit Zugabe von TEV-Protease. Man sieht, dass sowohl die erste Bindung, als auch Spaltung und zweite Bindung gut funktioniert haben. Nichtsdestoweniger erkennt man, dass wie bei Yrb1 auch hier die Bindungen nicht quantitativ verlaufen und noch verhältnismäßig viel Ligand im Überstand verbleibt. Darüber hinaus fällt auf, dass bei der TEV-Protease-Inkubation auch ohne Enzym etwas Protein abgespalten oder abgelöst wird. Offenbar läuft das erhaltene Produkt auf der gleichen Höhe wie Cse1-S, in jedem Fall aber höher als das native Protein. Jedoch zeigt es keinerlei Affinität zu S-Protein-Sepharose. Es ist nicht offensichtlich, was genau mit dem Ziel-Protein geschehen ist, indessen ist klar, dass der "Tag" nicht mehr funktional war.

Bei dem Bindungsversuch mit Cytosol gab es ein ähnliches Ergebnis (Abb. 24B). Aus der Immunoblot-Analyse lässt sich schließen, dass die erste Bindung, die Spaltung sowie die zweite Bindung prinzipiell gelungen sind. Ob die Bindung an IgG-Sepharose quantitativ verlaufen ist, lässt sich aus diesem Versuch nicht ableiten. Man sieht in der Spur des Ausgangsmaterials nur Abbau und das eigentliche Cse1-S-TEV-ZZ fällt mengenmäßig unter die Detektionsgrenze, so dass man aus dem Fehlen einer Bande an Cse1-S-TEV-ZZ in der ungebundenen Fraktion (1. Bindung) nicht ableiten kann, ob das Protein komplett extrahiert wurde oder ob es in zu geringer Menge vorhanden war, um visualisiert zu werden. Wie in den Versuchen mit Kernlysat sieht man auch hier, dass bei Spaltung auch in der Puffer-Kontrolle Protein abgelöst wird. Die Bande befindet sich wieder auf der Höhe von Cse1-S, der "Tag" ist unfunktional und interagiert kaum mit S-Protein-Sepharose. Die zweite Bindung des Protease-behandelten Proteins ist wieder sehr deutlich, wenn auch nicht vollständig. In der

ungebundenen Fraktion, welche ca. 100 x so verdünnt ist wie die gebundene, ist noch eine schwache Bande von Cse1-S zu erkennen.

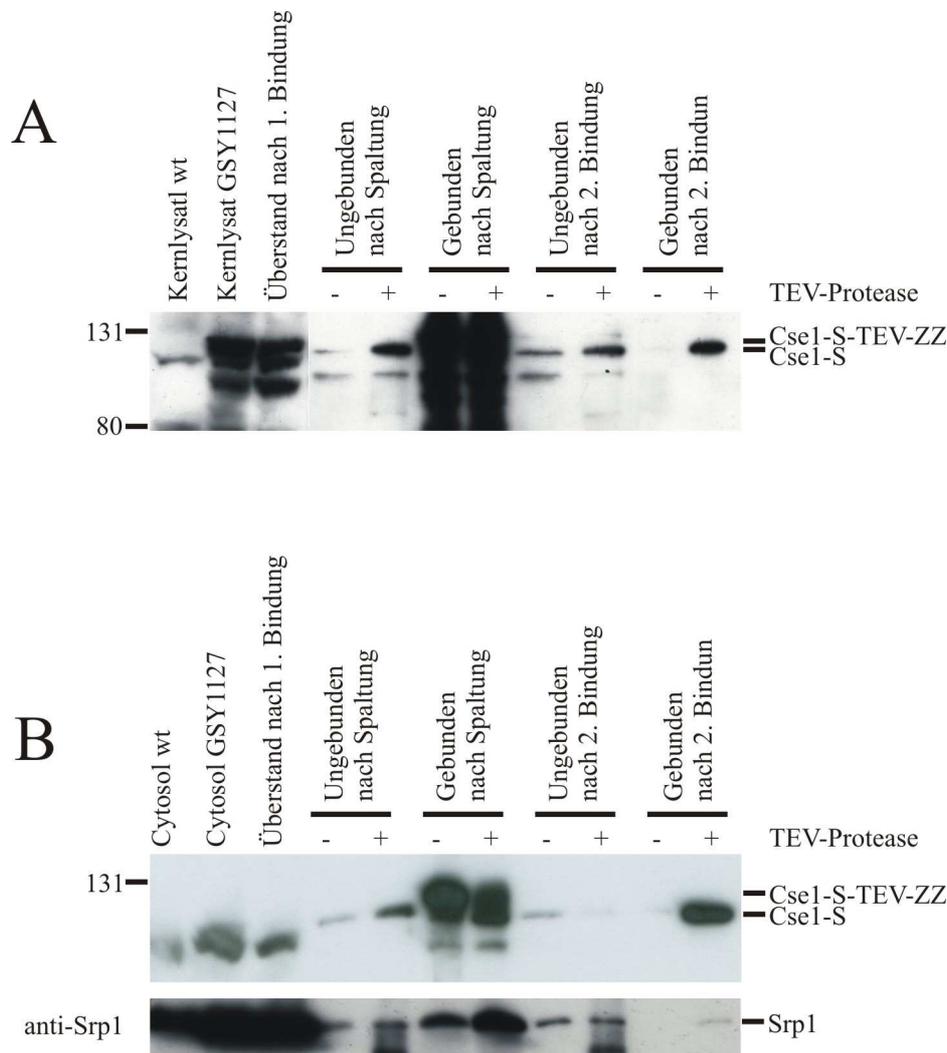


Abb. 24: Tandem-Affinitätsreinigung von Cse1-S-TEV-ZZ

Zellen des Hefestammes GSY1127 wurden kultiviert und daraus eine Cytosol-Fraktion und Kernlysate bereitete. (A) Kernlysate mit einem Gesamtproteingehalt von 20 mg aus 9,5 g Zellen wurden zusammen mit IgG-Sepharose inkubiert (für 2 h, 4°C) (1. Bindung). Parallel dazu wurde ein Kontroll-Ansatz vorbereitet, der keiner TEV-Protease-Behandlung unterzogen wurde. Nach Zentrifugation wurde vom Überstand (ÜS0; Abkürzungen vergleiche unten) ein Aliquot entnommen. Zu den Ansätzen wurden entweder 97 µg TEV-Protease (1 h bei Raumtemperatur) (Spaltung) oder lediglich Puffer gegeben. Nach der Inkubation wurde wiederum zentrifugiert und vom Überstand (ÜS1) bzw. Pellet (Pe1) wurde eine Probe entnommen. Der Überstand wurde zu S-Protein-Sepharose gegeben, inkubiert (für 2 h, 4°C) (2. Bindung) und wieder zentrifugiert. Auch hier wurde von Überstand (ÜS2) und Pellet (Pe2) eine Probe entnommen. Alle Aliquots, inklusive Ausgangsmaterial, wurden durch eine Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper gegen Cse1 (1:500) und einem anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) detektiert. Bezogen auf die Menge des Ausgangsmaterials (AM) wurden die übrigen Proben um folgende Faktoren konzentrierter aufgetragen: AM:ÜS0:ÜS1:Pe1:ÜS2:Pe2 verhält sich wie 1:3,5:22:248:22:551. (B) Parallel wurde mit Cytosol verfahren. Dabei wurden pro Ansatz 50 mg Gesamtprotein aus 3,6 g Zellen genommen und mit 230 µg TEV-Protease behandelt. Die Proben wurden durch eine Immunoblot-Analyse mit anti-Cse1 (1:2000) und anti-Srp1 (1:10000) als Erst-Antikörper und einem anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) detektiert und in folgendem Verhältnis aufgetragen: AM:ÜS0:ÜS1:Pe1:ÜS2:Pe2 wie 1:0,7:4,7:126:4,7:420.

In dem gleichen Bindungsversuch sollte das bekannte Exportsubstrat Srp1 nachgewiesen werden. In einer Immunoblot-Analyse wurde mit einem Antikörper gegen Srp1 (Abb. 24B unten) detektiert und man erkennt, dass es im Komplex mit Cse1-S an S-Protein-Sepharose gefunden wurde. Nach der TEV-Protease-Spaltung wurde es zwar auch in der ungebundenen Fraktion der Puffer-Kontrolle detektiert, jedoch weniger als mit Protease. Außerdem wurde es bei der Kontrolle nicht noch einmal über Cse1 an S-Protein-Sepharose gebunden, sondern verlief vollständig im Überstand. Das bedeutet also, es hat sich tatsächlich ein Srp1-Cse1-Komplex gebildet und es handelt sich nicht um eine unspezifische Bindung an die zweite Matrix. Im Gegensatz dazu scheint es sehr wohl unspezifisches Anhaften von Srp1 an IgG-Sepharose zu geben. Anders ist es nicht zu erklären, dass nach Zugabe von TEV-Protease mehr Srp1 an der Säule zurückbleibt als ohne. Dieses starke unspezifische “Kleben bleiben“ von Proteinen an Immunglobulin G ist bekannt und wird auch durch das in Abb. 27 dargestellte Experiment bestätigt. Was zudem auffällt: der größte Teil von Srp1 liegt von Anfang an nicht im Komplex vor. Das ist jedoch zu erwarten, da der Exportkomplex aus Srp1, Cse1 und Gsp1-GTP durch Hydrolyse von GTP zu GDP in der cytosolischen Fraktion größtenteils zerstört bzw. gar nicht erst gebildet wird. Srp1 und Cse1 haben alleine nur eine geringe Affinität zueinander (Solsbacher *et al.*, 1998).

Bindungsstudien mit Yrb1-S-TEV-Z und Cse1-S-TEV-ZZ aus Cytosol

Für Yrb1 und Cse1 sollten in *in vitro*-Bindungsstudien neue Interaktionspartner gefunden werden. Dazu wurde eine S-TEV-ZZ-Gen-Kassette in Hefezellen genomisch integriert, einmal an *YRBI* und einmal an *CSE1*. Aus den transformierten Zellen wurde Cytosol gewonnen. Ein Volumen mit einem Gesamtproteingehalt zwischen 64 - 206 mg pro Ansatz wurde für 2 h bei 4°C mit IgG-Sepharose inkubiert, so dass Yrb1-S-TEV-Z bzw. Cse1-S-TEV-ZZ in Komplex mit einem eventuellen Interaktionspartner an die Matrix gebunden wurden. Die Pellets wurden gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit TEV-Protease (96 - 920 µg) behandelt. Der Überstand wurde mit S-Protein-Sepharose für 2 h bei 4°C inkubiert, die Pellets wurden im Anschluss gewaschen und die gebundenen Proteine mit 2-fach SDS-Probenpuffer eluiert. Die Proben wurden an den Arbeitskreis von Prof. Albert Sickmann im Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg geschickt. Dort wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung nach Vorum (Mortz *et al.*, 2001) durchgeführt (Abb. 25A).

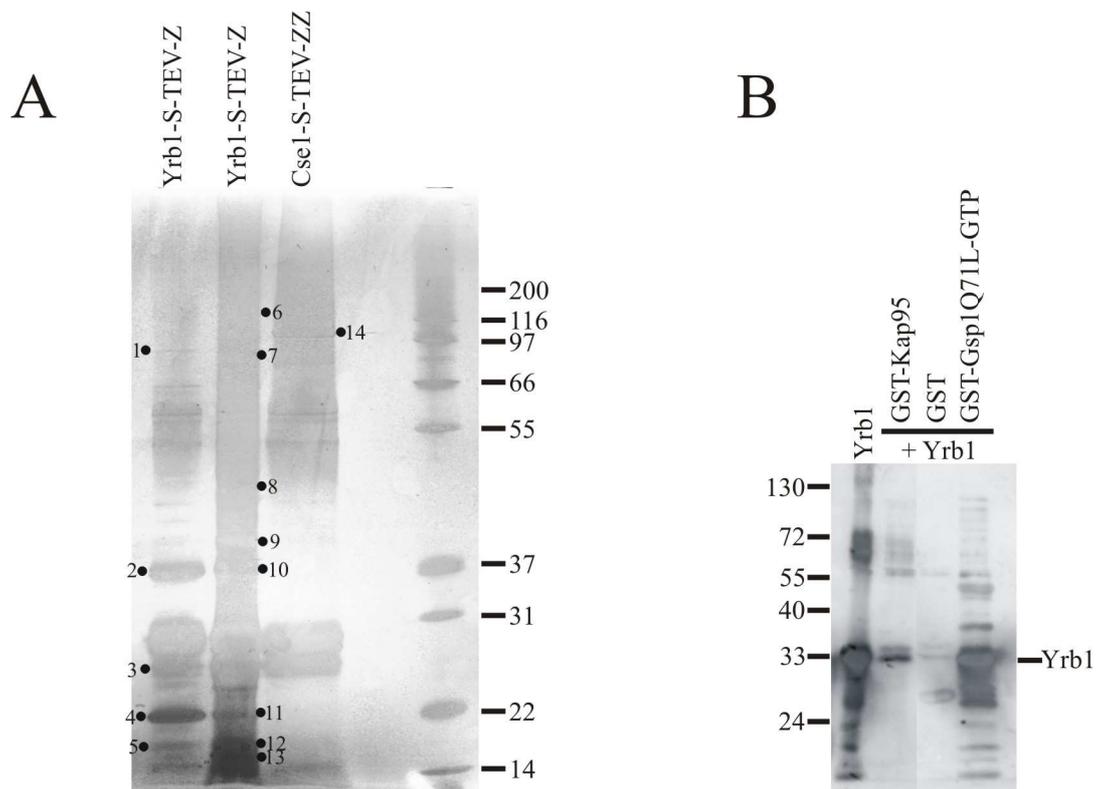


Abb. 25: Tandem-Affinitätsreinigung von Yrb1-S-TEV-Z und Cse1-S-TEV-ZZ aus Cytosol und Bindungsversuch mit rekombinanten Proteinen

(A) Zellen der Hefestämme GSY1129 (Spur 1 und 2) und GSY1127 (Spur 3) wurden kultiviert und daraus eine Cytosol-Fraktion bereit. Damit wurden wie beschrieben Tandem-Affinitätsreinigungen durchgeführt. Für Spur 1 wurden pro Ansatz 64 mg Gesamtprotein aus 2,3 g Zellen, für Spur 2 206 mg aus 7,5 g Zellen und für Spur 3 200 mg aus 14 g Zellen genommen. Die Proben, die nach der 1. Bindung an IgG-Sepharose, nach Spaltung mit TEV-Protease (Spur 1 96 µg, Spur 2 276 µg, Spur 3 920 µg) und nach der 2. Bindung an S-Protein-Sepharose erhalten wurden, wurden an den Arbeitskreis von Prof. Albert Sickmann im Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg geschickt. Dort wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, wobei für Spur 1 7,5 µl, für Spur 2 14,5 µl und für Spur 3 8,5 µl des zur Verfügung stehenden Materials aufgetragen wurden. Das Gel wurde nach der Methode von Vorum silbergefärbt und die gefundenen Proteine mittels Massenspektrometrie detektiert (Tabelle 14). (B) GST, GST-Kap95 und GST-Gsp1Q71L-GTP wurden in *E. coli* (Kap95: BL21, sonst JM101) synthetisiert und gereinigt. Je 30 µg der Proteine wurden an GSH-Sepharose gebunden. Als Puffer wurde W-Bindungspuffer benutzt. Danach wurde zentrifugiert und gewaschen. Die Ansätze wurden mit 50 µg Yrb1, das zuvor ultrazentrifugiert (bei 4°C und 539511 x g für 30 min) worden war, für 1 h bei 4°C inkubiert. Es wurde erneut zentrifugiert und gewaschen und die Proben mit 2-fach SDS-Probenpuffer eluiert. Es wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt, bei der ein Antikörper gegen Yrb1 (1:2000) und ein anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) eingesetzt wurde.

Die gebundenen Proteine wurden mittels Massenspektrometrie detektiert und sind in Tabelle 14 aufgelistet. Für Cse1 (Spur 3) wurden keine physiologischen Bindungspartner gefunden. Mit Yrb1 haben folgende Proteine interagiert: die ribosomalen Proteine Rpl9a, Rpl12b, Rpl17b, Rpl21b, Rpl25, Rpl26b, Rpl27b, Rps13, Rps14a und Rps20, die an Glykolyse und Glukoneogenese beteiligten Proteine Eno2, Pkg1 und Tdh3, daneben Arf1 und 2, die in den ER-zu-Golgi- und Intra-Golgi-Transport involviert sind, der NLS-Protein-Importrezeptor Kap95, die CTP-Synthase Ura7, die Prolin-tRNA-Ligase Yhr020w, der Translationselongationsfaktor Tef2, die Alkoholdehydrogenase Adh1, die ATPase Vma2,

Yer160c, welches bei der Ty-Element-Transposition fungiert, die Methionin-Adenosyl-Transferase Sam1, Asc1, dessen Funktion noch unbekannt ist, sowie die an Proteinbiosynthese bzw. -faltung oder Stressantwort beteiligten Proteine Hsp82, Hsc82, Ssa1 und 2, Ssb2 und Sse1. Ssa1 soll darüber hinaus am klassischen NLS-Protein-Import in den Nukleus beteiligt sein. Man nimmt an, dass es die Bindung des Substrats an den Rezeptor erleichtert bzw. den Protein-Protein-Komplex stabilisiert (Shulga *et al.*, 1996). Die gefundene Wechselwirkung von Kap95 zu Yrb1 wurde genauer untersucht. In *E. coli* synthetisiertes GST-Kap95 und als Kontrollen GST und GST-Gsp1Q71L-GTP wurden an GSH-Sepharose gebunden. Zu den gewaschenen Pellets wurde ultrazentrifugiertes Yrb1 gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit einem Antikörper gegen Yrb1 wurde immunodetektiert (Abb. 25B). Bei der Negativkontrolle GST ist fast keine Interaktion zu erkennen. Die Positivkontrolle Gsp1Q71L-GTP zeigt eine starke Wechselwirkung mit Yrb1. Im Vergleich dazu ist die gefundene Bindung von Kap95 schwächer, aber deutlich erkennbar.

Tabelle 14: Mit Yrb1 und Cse1 mittels TAP im Cytosol "gefischte" Proteine

Banden-Nr.	Protein	MW [kDa]	Funktion	Lokalisation
1	Kap95	94,7		
2	Yrb1	23,0		
3	Rpl9a	21,6	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
4	Yrb1	23,0		
5	Rpl27b	15,5	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	Rps13	17,0	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
6	Hsp82	81,4	Proteinfaltung, Stressantwort	Cytoplasma
	Hsc82	81,0	Proteinfaltung, Stressantwort	Cytoplasma, Mitochondrium
	Sse1	77,4	Proteinfaltung	Cytoplasma
7	Ssa2	69,5	Proteinfaltung	Cytoplasma, Zellwand, Vakuolenmembran
	Ssa1	69,7	SRP-abhängiges co-translationales Protein-Membran-Targeting, Proteinfaltung, Protein-Import in den Nukleus	Cytoplasma, Nukleus, Zellwand, Vakuolenmembran
	Ura7	64,7	CTP-Synthase-Aktivität	Cytosol
	Ssb2	66,6	Proteinbiosynthese	Cytoplasma, Polysom

7	Hsc82	81,0	Proteinfaltung, Stressantwort	Cytoplasma, Mitochondrium
8	Eno2	46,9	Glukoneogenese, Glykolyse	Phosphopyruvat-Hydratase, lösliche Fraktion
	Yhr020w	77,4	Prolin-tRNA-Ligase-Aktivität	unbekannt
	Tef2	50,0	Translationselongation	Cytosol
	Pgk1	44,7	Glukoneogenese, Glykolyse	Cytoplasma, Cytosol
9	Adh1	36,8	Alkoholdehydrogenase-Aktivität	Cytosol
	Tdh3	35,7	Glukoneogenese, Glykolyse	Cytoplasma, Cytosol, Zellwand, Lipid-Partikel
	Vma2	57,8	Protonen-transportierende ATPase-Aktivität	Cytoplasma, Protonen-transportierende ATPase-V1-Domäne
	Yer160c	198,6	Ty-Element-Transposition	Retrotransposon-Nukleokapsid
10	Yrb1	23,0		
	Sam1	41,8	Methionin-Adenosyl-Transferase-Aktivität	Cytoplasma
	Asc1	34,8	unbekannt	Cytoplasma
	Tef2	50,0	Translationselongation	Ribosom
11	Yrb1	23,0		
	Arf1	20,5	ER-zu-Golgi-Transport, Intra-Golgi-Transport	Golgi-Vesikel, Cytosol
	Arf2	20,7	ER-zu-Golgi-Transport, Intra-Golgi-Transport	Golgi-Vesikel, Cytosol
	Rpl12b	17,8	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	Rpl21b	18,3		
12	Rps13	17,0	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	Rps20	13,9		
	Rpl17b	20,6	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	Rpl25	15,8		
	Rpl27b	15,5		
13	Rps14a	14,5	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
	Rpl26b	14,2	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	Cytosol
14	Cse1	109,4		

Die Angaben wurden der SGD-Datenbank entnommen.

3.3. Interaktionen von Importinen mit Hefeproteinen

3.3.1. Interaktionen von endogenem Kap114- und Kap120-S-TEV-ZZ mit Hefeproteinen

Die Synthese und Isolierung von Kap114- bzw. Kap120-S-TEV-ZZ

Zum Austausch von Makromolekülen zwischen Zellkern und Cytoplasma sind Transportrezeptoren notwendig. Am Import sind die sog. Importine beteiligt. Zu ihnen zählen Kap114 und Kap120. Die Mechanismen sind nur teilweise bis wenig geklärt. Aufschluss über die genauen Mechanismen bzw. weitere Importssubstrate sollten deshalb die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien geben. Es wurde eine *S-TEV-ZZ*-Kassette genomisch integriert. Um die Richtigkeit der Integration zu überprüfen, wurde die DNA isoliert und eine PCR-Analyse mit Oligonukleotiden durchgeführt, die im Leserahmen des Ziel-Gens und hinter dem miteingeführten Markergen im Genom hybridisierten (Daten nicht gezeigt). Daneben wurde aus den transformierten Zellen ein Komplettlysate hergestellt und das synthetisierte Protein durch Immunoblotting mit einem Antikörper gegen Kap114 bzw. Kap120 detektiert (Abb. 26A und B). Im Vergleich zum Gesamtzellysate aus Hefewildtypzellen sieht man im Falle von Kap114-S-TEV-ZZ einen "Massenshift" von 17 kDa gegenüber dem nativen Protein. Bei Kap120-S-TEV-ZZ trat der Unterschied nicht so stark hervor. Die aufgetragenen Volumina der Lysate aus Wildtyp- und den genomisch veränderten Zellen waren jeweils die gleichen, woraus abzuleiten ist, dass sich die Mengen an synthetisiertem Protein mit "Tag" und die des nativen in etwa entsprechen. Des Weiteren sind Präparationen zur Gewinnung einer cytosolischen und einer unlöslichen Fraktion aus den transformierten Zellen gezeigt. Von den einzelnen Phasen einer solchen Aufarbeitung wurden Proben entnommen, die wieder einer SDS-PAGE und anschließender Immunoblot-Analyse mit den gleichen Antikörpern wie oben unterzogen wurden (Abb. 26A und B).

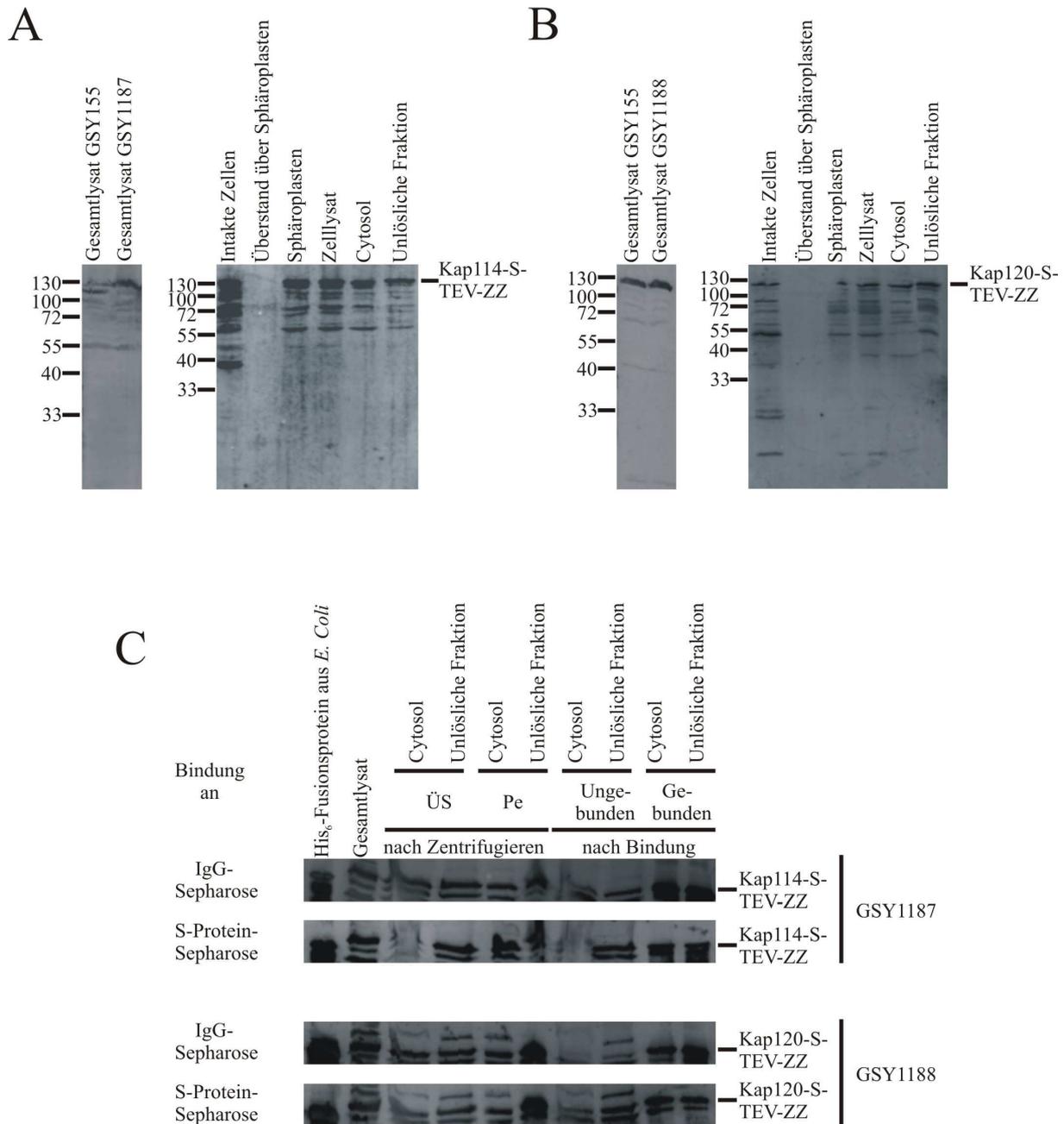


Abb. 26: Synthese und Verteilung von Kap114-S-TEV-ZZ bzw. Kap120-S-TEV-ZZ in den Zellkompartimenten sowie ihre Bindung an IgG- und S-Protein-Sepharose

(A) Aus Zellen der Stämme GSY1187 und GSY155 als Kontrolle für natives Kap114 wurden mittels TCA-Fällung Gesamtlysate hergestellt. Die Proben wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-Kap114 (1:500) als Erst-Antikörper detektiert. Daneben wurden aus GSY1187-Zellen eine cytosolische und eine unlösliche Fraktion gewonnen. Von den einzelnen Stationen der Aufarbeitung wurden Proben entnommen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Bei der anschließenden Immunoblot-Analyse wurde mit einem Erst-Antikörper gegen Kap114 detektiert. (B) Analog wurde mit Zellen des Hefestammes GSY1188 verfahren. Als Antikörper wurde hier anti-Kap120 (1:1000) verwendet. (C) Cytosol und die unlösliche Fraktion aus GSY1187- und GSY1188-Zellen mit einem Gesamtproteingehalt von 3 mg wurden für 20 min auf Eis mit W-Bindungspuffer inkubiert und zentrifugiert (für 10 min bei 4°C und 720 x g). Anschließend wurden die Überstände für 1 h bei 4°C mit je 30 µl IgG- bzw. S-Protein-Sepharose inkubiert. Aus allen Überständen und den Pellets wurden Proben entnommen und eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Es wurden dieselben Antikörper wie unter (A) und (B) verwendet. Die Überstände nach Zentrifugieren waren bei der cytosolischen Fraktion 13 x so verdünnt, bei der unlöslichen 6 x so verdünnt wie die Pellets und die ungebundenen Fraktionen sind 44 x weniger konzentriert aufgetragen als die gebundenen.

Man sieht, dass es in beiden Fällen nur zu geringen Verlusten kam. Zwischen intakten Zellen und Sphäroplasten geht etwas Material verloren, was zu umgehen, wie unter 3.1 erläutert, nicht möglich war. Der Zellaufschluss durch den Homogenisator hat den Proteinen nicht geschadet. Die Mengen vor und nach der Behandlung entsprechen sich. Nach der Separation der cytosolischen und der unlöslichen Fraktion waren die zwei Fusionsproteine in beiden Fraktionen in prägnanten Mengen zu finden, Kap114-S-TEV-ZZ jedoch etwas mehr in der erst genannten, Kap120-S-TEV-ZZ etwas mehr in der zweiten. Dies entspricht also annähernd der physiologischen Verteilung in den Kompartimenten: beide Proteine sind hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, weniger im Cytosol, wobei der Unterschied bei Kap120 stärker ausgeprägt ist (Caesar *et al.*, 2006; Morehouse *et al.*, 1999). Auffällig ist, dass es trotz der geringen Verluste im Sinne eines vollständigen Verschwindens der S-TEV-ZZ-Proteine prägnante Degradationsprodukte gab, die sich von Anfang bis Ende durchzogen.

Im nächsten Schritt wurden die gewonnene cytosolische und unlösliche Fraktion dahingehend untersucht, ob die “Tags“ des exprimierten Kap114 bzw. Kap120 funktional sind und an IgG- und an S-Protein-Sepharose binden (Abb. 26C). Dazu wurden die cytosolische und die unlösliche Fraktion mit W-Bindungspuffer inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Von den Pellets und den Überständen wurden Proben genommen. Die Überstände wurde zu IgG- bzw. S-Protein-Sepharose gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Pellets mit den gebundenen Proteinen wurden gewaschen und wie Aliquots der neu erhaltenen Überstände mit SDS-Probenpuffer eluiert. Alle Proben inklusive Gesamtlysat und rekombinantem Protein aus *E. coli* wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblotting detektiert (Antikörper vergleiche oben). Man sieht in beiden Fällen, dass nach Zentrifugation der zwei Zellfraktionen der größere Anteil des Proteins löslich geblieben ist (Man beachte: Der Überstand ist im Falle des Cytosols ca. 13 x weniger konzentriert aufgetragen, bei der unlöslichen Fraktion ca. 6 x weniger.). Die Bindung an die Matrix war bei jedem Protein sowohl für die zwei Säulenmaterialien als auch für beide Zellfraktionen erfolgreich. Die ungebundene Fraktion wurde etwa 44 x weniger konzentriert aufgetragen als die gebundene. Man sieht also, dass die Bindungen bis auf Kap120-S-TEV aus Cytosol an IgG-Sepharose nicht quantitativ verlaufen sind. Jedoch war es für diese Zwecke ausreichend. Eine Inkubation der Zellfraktionen für 20 h statt nur für 1 h brachte keine Verbesserung (Daten nicht gezeigt).

Co-Reinigung von Kap114- bzw. Kap120-S-TEV-ZZ und Hefeproteinen

Der erste Schritt beim Zusammenbau von neuem Chromatin ist die Zellzyklus-regulierte Synthese und der nukleäre Import von Core-Histonen. Der Transport von Hta1 und Htb1 in

den Zellkern geschieht mit Hilfe des Karoypherins Kap114. Nap1, ein Protein, welches am Zusammenbau des Nukleosoms beteiligt ist, verstärkt die Affinität von Kap114 zu den NLSs der Histone und wird co-transportiert (Mosammaparast *et al.*, 2002). Im Kern moduliert Kap114 die Funktion des Histon-Chaperons Nap1 und hemmt die Absetzung von H2A bzw. H2B (Mosammaparast *et al.*, 2005). Daneben importiert Kap114 aber auch Komponenten des Präinitiationskomplexes: das TATA-bindende Protein (TBP) (Pemberton *et al.*, 1999), einer Untereinheit des allgemeinen Transportfaktors TFIID, und möglicherweise TFIIB (Hodges *et al.*, 2005). Neben anderen lagern diese beiden Proteine RNA-Polymerase II an die DNA an, so dass die Transkription beginnen kann.

Kap120 wurde als Importrezeptor identifiziert (Caesar *et al.*, 2006). Es transportiert Rpf1 in den Zellkern. Dabei handelt es sich um ein nukleoläres Protein, welches am Prozessierungsschritt von 27S zu 25S rRNA bei der Ribosomenbiosynthese beteiligt ist (Wehner und Baserga, 2002). Um die genauen Zusammenhänge näher zu erforschen bzw. weitere Transportsubstrate zu finden, wurden in dieser Arbeit *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurde eine S-TEV-ZZ-Gen-Kassette hinter dem KAP114- bzw. KAP120-Gen ins Hefegenom integriert. Aus Zellen dieser Hefestämme sowie eines Wildtyp-Stammes wurde wie beschrieben eine cytosolische und eine unlösliche Fraktion hergestellt. Über den "Tag" wurde endogenes Kap114- bzw. Kap120-S-TEV-ZZ an IgG-Sepharose immobilisiert. Zur Kontrolle wurde das Säulenmaterial auch mit der jeweiligen Zellfraktion des Hefestamms vom Wildtyp inkubiert. Die Säule wurde gewaschen und der pH-Wert auf 5 eingestellt. Im Anschluss wurde mit 0,5 M Essigsäure eluiert. Nachdem die Proben über Nacht in einer Speedvac mit angeschlossener Kühlung gefriergetrocknet worden waren, wurden sie durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt (Abb. 27A). Zur Kontrolle wurden die gleichen Proben auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen Hta1 und Rpf1 immundetektiert (Abb. 27B). Hta1 wurde bei beiden Proteinen und beiden Zellfraktionen vom Antikörper erkannt. Rpf1 dagegen wurde nur zusammen mit Kap114 aus Cytosol und der unlöslichen Fraktion nachgewiesen. In den Proben mit Cytosol und der unlöslichen Fraktion aus Wildtypzellen wurde kein Protein detektiert. Zusätzlich wurde mit anti-Yrb1-Antikörper immundetektiert. Man erkennt eine Bande bei der unlöslichen Fraktion mit Kap120-S-TEV-ZZ.

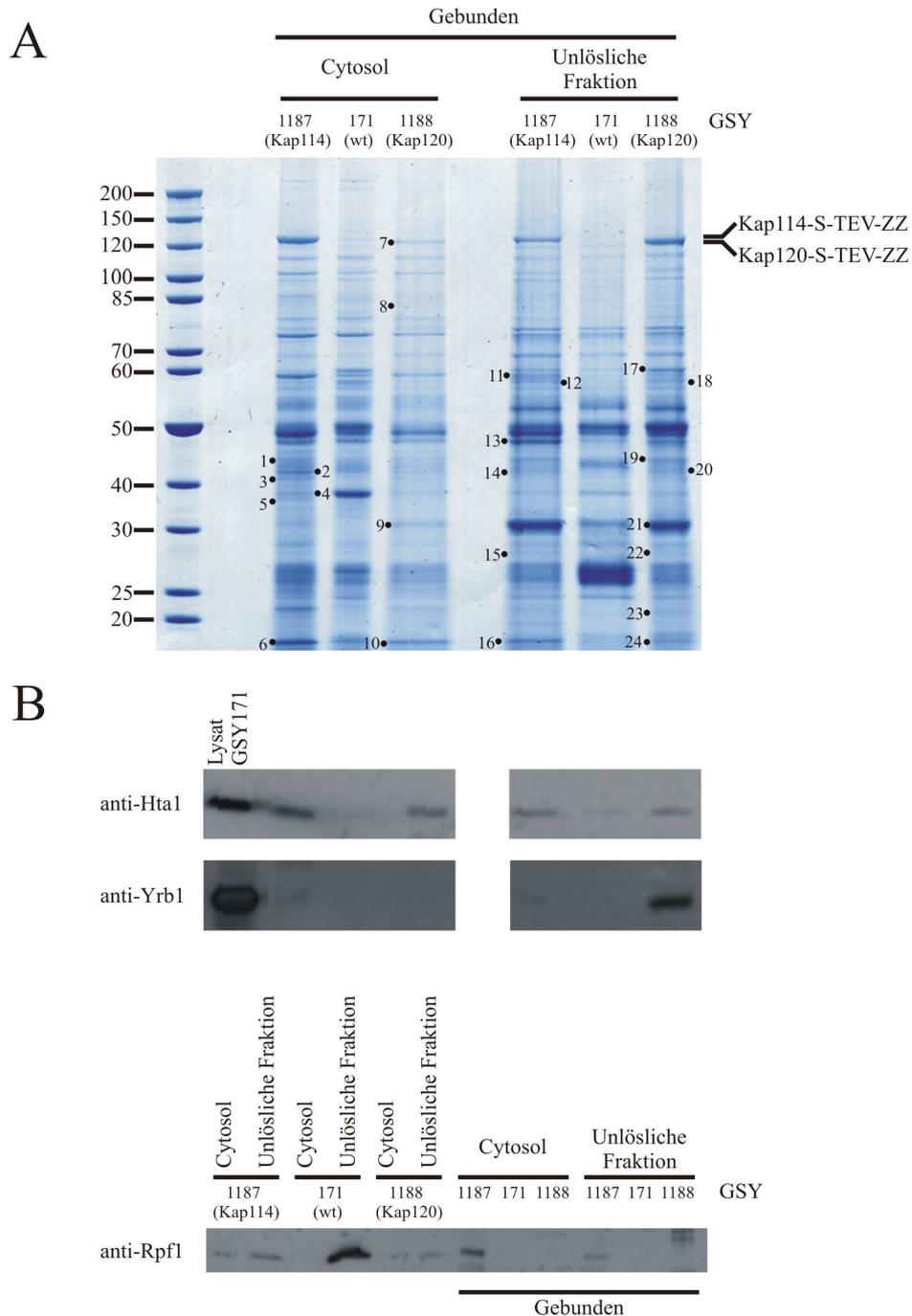


Abb. 27: Co-Reinigung von Hefeproteinen mit Kap114-S-TEV-ZZ und Kap120-S-TEV-ZZ aus Cytosol und der unlöslichen Fraktion

(A) Aus Zellen der Hefestämme GSY1187 (Kap114), GSY171 (wt) und GSY1188 (Kap120) wurden eine cytosolische und eine unlösliche Fraktion hergestellt. Die jeweilige Zellfraktion mit einem Gesamtproteingehalt von 45,5 mg wurde zusammen mit TAP-Lyse-Puffer und einem Protease-Inhibitor-Mix zentrifugiert (bei 48254 x g und 4°C für 1 h). Im Anschluss daran wurden die Überstände bei 4°C über eine Säule mit gewaschener (TST-Puffer, 0,5 M Essigsäure, pH 3,4) IgG-Sepharose gegeben. Die Säule wurde erneut mit je 10 ml TAP-Lyse-Puffer und TST-Puffer gewaschen und der pH-Wert auf 5 eingestellt. Die Elution erfolgte mit 0,5 M Essigsäure. Das Eluat wurde über Nacht in einer Speedvac mit angeschlossener Kühlung gefriergetrocknet und die Proteinbanden durch SDS-PAGE und Färbung mit kolloidalem Coomassie detektiert. Nachdem Gelstückchen mit den ausgesuchten Proteinen ausgeschnitten worden waren, wurden sie vom Arbeitskreis von Prof. Albert Sickmann im Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg durch Massenspektrometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in den Tabelle 15 - Tabelle 18 zu finden. (B) Mit denselben Proben wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Es wurden Antikörper gegen Hta1 (1:2000), Yrb1 (1:2000) und Rpfl (1:1000) sowie anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) eingesetzt. Im Fall von Rpfl wurde zusätzlich das zentrifugierte Ausgangsmaterial aufgetragen (linke Hälfte).

Mit dem kolloidal-Coomassie-gefärbten SDS-Gel wurde wie folgt verfahren: Alle Banden wurden mit denen der Fraktionen des Wildtyp-Stamms verglichen und von denen, die in dieser Spur nicht zu finden waren, wurden Gelwürfel ausgeschnitten und an den Arbeitskreis von Prof. Albert Sickmann im Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg gesandt. Dort wurden die Proteine massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 - Tabelle 18 aufgelistet. Mit Kap114-S-TEV-ZZ aus Cytosol wurden folgende Proteine bzw. Proteingruppen co-gereinigt: ribosomale Proteine, proteasomale Proteine, ein Histon, mitochondriale Proteine, Golgi-Proteine, Proteine des ER, Dehydrogenasen, diverse Synthetasen, Isomerasen, Phosphorylasen, Transferasen, Kinasen und Proteine des Cytoskeletts. Daneben wurden das an der Ribosomenbiogenese beteiligte Imp4, die Replikationsfaktor C-Untereinheiten Rfc2 und Rfc5, die Untereinheit der RNA-Polymerase I und III Rpc40, die RNA-Helikase und Untereinheit des TREX-Komplexes Sub2 und das am nukleocytoplasmatischen Export von mRNA beteiligte Npl3 detektiert. Mit Letzteren wurde im Folgenden weitergearbeitet. Es wurden die Proteine ausgewählt, deren Importmechanismen noch nicht geklärt und die nukleär bzw. nukleolär lokalisiert sind oder ihre Aufgabe zumindest darauf schließen lässt. Die gleichen Auswahlkriterien galten auch für alle anderen Proteine, mit denen weitere Experimente durchgeführt wurden. Aus der unlöslichen Fraktion wurden bis auf die Isomerasen Proteine der gleichen Gruppen nachgewiesen und zusätzlich ein Chaperon, eine ATPase und eine Translationsinitiationsfaktor 3-Untereinheit. Mit der ebenfalls "gefischten" mitogen-aktivierten Proteinkinase Fus3, der RNA-Helikase Dbp3 und der Transkriptionsfaktor-TFIID-Untereinheit Taf4 wurde im Nachfolgenden weitergearbeitet.

An Kap120-S-TEV-ZZ aus Cytosol wurden weit weniger Proteine gebunden. Aber auch hier wurden wieder ribosomale und proteasomale Proteine, Komponenten des ER, eine Synthase und eine Kinase gefunden, daneben Translationselongationsfaktor 3. Aus der unlöslichen Fraktion interagierten verschiedene Proteine der gleichen Gruppen wie bei Kap114-S-TEV-ZZ aus Cytosol bis auf die Isomerasen. Zusätzlich wurden neben Proteinen unbekannter Funktion eine Peroxidase, eine Aldolase, eine ATPase, eine RNA-Helikase sowie Taf4, Fus3, das an der ribosomalen Biogenese beteiligte Rrp3 und die die RNA-Helikase Dbp2 erhalten. Mit den letzten Vier wurden weitere Experimente durchgeführt.

In allen vier Spuren wurden häufig die zahlreich in der Zelle vorkommenden Proteine Eft1/2 sowie Tef1/2 (Translationselongationsfaktoren), Cdc19 (Pyruvat-Kinase) und Pdc1 (Pyruvat-Decarboxylase) gefunden (Die Angaben wurden der SGD-Datenbank entnommen.),

allerdings sowohl auf der ihrer Größe entsprechender Höhe im Gel als auch darüber und darunter.

Tabelle 15: Mit Kap114-S-TEV-ZZ aus Cytosol co-gereinigte Hefeproteine

Banden-Nr.	Protein	Lokalisation	Funktion	MW [kDa]	Moleküle pro Zelle
1	Rpn9	Proteasom	Nicht-ATPase-Regulations-Untereinheit des 26S-Proteasoms	45,8	12400
	Scj1	ER-Lumen	Chaperon-Bindung	42	8260
	Mck1	Lösliche Fraktion	Glykogen-Synthase-Kinase 3-Aktivität	43,4	396
	Rpt6	Nukleus, Proteasom	ATPase des 19S-Regulationspartikels des 26S-Proteasoms	45,5	4700
	Act1	Cytoskelett	Zellpolarisation, Endocytose, andere Cytoskelett-Funktionen	41,9	-
	Tys1	Cytoplasma, Nukleus	Tyrosin-tRNA-Ligase-Aktivität	44,2	2710
	Ktr3	Membranfraktion	Mannosyl-Transferase-Aktivität	47,9	704
	Sub2	Nukleus	ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivität, Bindung von RNA und Protein, RNA-Spleißfaktor-Aktivität	50,6	51700
	Hoc1	Alpha-1,6-Mannosyltransferase komplex	Alpha-1,6-Mannosyl-Transferase-Aktivität, Transfer von Glykosyl-Gruppen	46,3	7160
2	Npl3	Cytoplasma, Nukleus	Bindung von mRNA und Poly(A)	45,4	78700
	Psa1	Cytoplasma	Mannose-1-Phosphat-Guanylyl-Transferase-Aktivität	39,7	97100
	Rpn8	Proteasom	Nicht-ATPase-Regulations-Untereinheit des 26S-Proteasoms	38,5	19800
	Grs1	Cytoplasma, Mitochondrium	Glycyl-tRNA-Ligase-Aktivität	75,7	98400
	Gfa1	unbekannt	Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Transaminase-Aktivität	80,9	14300
3	Sis1	cytosolische kleine. ribosomale Untereinheit	Chaperon-Regulator-Aktivität, Bindung ungefalteter Proteine	37,6	20300
	Rpc40	Nukleus	DNA-gerichteter RNA-Polymerase-Aktivität	37,9	13000

3	Rpt2	Nukleus, Proteasom	ATPase des 19S-Regulationspartikels des 26S-Proteasoms	49	-
	Ura2	Cytoplasma, Cytoplasma-Membran, Mitochondrium	Aspartatcarbamoyl-Transferase-Aktivität, Carbamoyl-Phosphat-Synthase-Aktivität	24,6	11000
	Ypr118w	Cytoplasma, Nukleus	Ribose-Isomerase-Aktivität	45,2	922
	Apa1	Cytoplasma, Nukleus	Bis(5'-Nucleosyl)-Tetraphosphatase-Aktivität	36,8	19600
	Rfc5	Nukleus	DNA-Klammerlader-Aktivität	40,4	5040
4	Tdh3	Cytoplasma, Zellwand, Lipidpartikel	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase	35,8	169000
	Gvp36	Cytoplasma, Golgi-Membran	unbekannt	36,8	7720
	Adh1	Cytosol	Alkoholdehydrogenase	37,2	-
	Rpn11	Nukleus, Proteasom	Metalloprotease-Untereinheit des 19S-Regulationspartikels des 26S-Proteasom-Lid-Komplexes	34,4	16400
	Ald6	Cytoplasma, Mitochondrium	Aldehyddehydrogenase	54,8	135000
	Imp4	Nukleus und Nukleolus	Bestandteil des SSU-Prozessoms (Prä-18S-rRNA-Prozessierung)	33,6	-
	Rpt6	Nukleus, Proteasom	ATPase des 19S-Regulationspartikels des 26S-Proteasoms	45,5	4700
	Rfc2	Nukleus	DNA-Klammerlader-Aktivität, Purin-Nukleotid-Bindung	40	4610
5	Tdh2	Cytoplasma, Zellwand, Lipidpartikel	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase	36	121000
	Rpn11	Nukleus, Proteasom	Metalloprotease-Untereinheit des 19S-Regulationspartikels des 26S-Proteasom-Lid-Komplexes	34,4	16400
	Gvp36	Cytoplasma, Golgi-Membran	unbekannt	36,8	7720
	Ald6	Cytoplasma, Mitochondrium	Aldehyddehydrogenase	54,8	135000
	Yhr020w	unbekannt	Prolin-tRNA-Ligase-Aktivität	77,8	-
	Prs4	Cytoplasma	Ribose-Phosphat-Dephosphokinase	36,1	5280
	Ydr051c	Cytoplasma, Nukleus	unbekannt	39,4	3170
6	Rps15	Cytosol	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	16	-
	Rps16b			15,8	-
	Rps17a			15,8	30900

6	Rps18b	Cytosol	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	17,1	112000
	Rps19a			15,9	29000
	Rps20			14	-
	Rpl26a	Cytosol	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	14,2	-
	Htb2	Nukleosom	Chromatin-Assemblierung, Chromosomen-Funktion	14,2	443000

Die Angaben wurden der SGD-Datenbank entnommen.

Tabelle 16: Mit Kap114-S-TEV-ZZ aus der unlöslichen Fraktion co-gereinigte Hefeproteine

Banden-Nr.	Protein	Lokalisation	Funktion	MW [kDa]	Moleküle pro Zelle
11	Ilv1	Mitochondrium	Threonin-Ammonium-Lyase-Aktivität	64,1	11900
	Cyb2	Mitochondrium	L-Laktat-Dehydrogenase-Aktivität	66	4590
12	Ilv1	Mitochondrium	Threonin-Ammonium-Lyase-Aktivität	64,1	11900
	Gua1	unbekannt	GMP-Synthase-Aktivität	58,7	-
	Ald6	Cytoplasma, Mitochondrium	Aldehyddehydrogenase	54,8	135000
	Vma2	Cytoplasma, Vakuole	Protonen-transportierende ATPase-Aktivität	57,8	131000
	Trp2	Cytoplasma	Tryptophan-Biosynthese	57,1	6510
	Ald4	Mitochondrium	Aldehyddehydrogenase	57	22200
	Anp1	Golgi-Apparat	Alpha-1,6-Mannosyl-Transferase-Aktivität	58,2	-
	Ade4	Cytoplasma	Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase	57,5	18700
13	Tuf1	Mitochondrium	Translationselongation	48,1	58500
	Ydj1	Cytosol	ER-assoziiierter Proteinkatabolismus, "Protein-Targeting" zum Mitochondrium	45,3	119000
	Dbp3	Nukleolus	ATP-abhängige RNA-Helikase	59	38900
	Pda1	Mitochondrium	Pyruvat-Metabolismus	46,7	100000
	Gsf2	Cytoplasma, ER, Mitochondrium	Protein-Faltung, Sekretionsweg	46	21400
	Idp1	Mitochondrium	Glutamat-Biosynthese, Isocitrat-Stoffwechsel	48,3	-
	Mnn1	Golgi-Apparat	Alpha-1,6-Mannosyl-Transferase-Aktivität	47,9	3480
	Arg8	Mitochondrium	Acetylnithin-Transaminase-Aktivität	47	2300
14	Psa1	Cytoplasma	Mannose-1-Phosphat-Guanylyl-Transferase-Aktivität	39,7	97100

14	Rpl4b	Cytosol	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	39,1	151000
	Erg26	ER	C-3-Sterol-Dehydrogenase-Aktivität	39	2580
	Lys12	Mitochondrium	Lysin-Biosynthese	40,3	19100
	Hom2	Cytoplasma, Nukleus	Aspartat-Semialdehyddehydrogenase-Aktivität	40	18400
	Tif34	Translationsinitiationsfaktor 3-Komplex, Multi-eIF-Komplex	Translationsinitiationsfaktor-Aktivität	39,1	2400
	Act1	Cytoskelett	Zellpolarisation, Endocytose, andere Cytoskelett-Funktionen	41,9	-
	Sis1	Cytosol	Chaperon-Regulator-Aktivität, Bindung ungefalteter Proteine	37,6	20300
	Rpn8	Proteasom	Nicht-ATPase-Regulations-Untereinheit des 26S-Proteasoms	38,5	19800
	Mpd2	ER	Protein-Disulfid-Isomerase	32,8	1520
	Fus3	Cytoplasma, "Mating-Projektionstip", Mitochondrium, Nukleus	Mitogen-aktivierte Proteinkinase, involviert in "Mating"-Pheromon-Antwort	41	8480
	Mkt1	Cytoplasma, Polysom	Nuklease-Aktivität	94,7	3430
	Pda1	Mitochondrium	Pyruvat-Metabolismus	46,7	100000
15	Rps3	Cytosol	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	26,5	146000
	Dpm1	Mitochondrium, Kernmembran-ER-Netzwerk	Dolichyl-Phosphat-Mannose-Transferase-Aktivität	30,5	1890
	Ggc1	Mitochondrium	Guanin-Nukleotid-Transporter-Aktivität	33,3	-
	Ilv6	Mitochondrium	Regulatorische Untereinheit der Aceto-Laktat-Synthase	34,3	15800
	Taf4	Nukleus	RNA-Polymerase II-Transkriptionsfaktor-Aktivität	42,4	1940
	Pet9	Mitochondrium	ATP:ADP-Antiporter-Aktivität	34,6	-
	Mpd2	ER	Protein-Disulfid-Isomerase	32,8	1520
	Ilv1	Mitochondrium	Threonin-Ammonium-Lyase-Aktivität	64,1	11900
	Mgm101	Mitochondrium	DNA-Reparatur, Mitochondriale Genom-Erhaltung	43,4	-

15	Atp3	Mitochondrium	ATP-Synthese-gekoppelter Protonen-Transport	34,4	26100
16	Rps13	Cytosol	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	17	-
	Rps15			16	-
	Rps16b			15,8	-
	Rps17a			15,8	30900
	Rps18b			17,1	112000
	Rps19a			15,9	29000
	Rps20			14	-
	Rps24b			15,3	6160
	Rpl26a	Cytosol	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	14,2	-
Htb2	Nukleosom	Chromatin-Assemblierung, Chromosomen-Funktion	14,2	443000	

Die Angaben wurden der SGD-Datenbank entnommen.

Tabelle 17: Mit Kap120-S-TEV-ZZ aus Cytosol co-gereinigte Hefeproteine

Banden-Nr.	Protein	Lokalisation	Funktion	MW [kDa]	Moleküle pro Zelle
7	Kap120				
	Mpd2	ER	Protein-Disulfid-Isomerase	32,8	1520
	Yef3	Ribosom	Translationselongation	116,7	871000
	Ils1	Cytosol	Isoleucin-tRNA-Ligase-Aktivität	123,4	23300
8	Mpd2	ER	Protein-Disulfid-Isomerase	32,8	1520
	Pfk2	Cytoplasma	Glykolyse	105,2	90200
9	Mpd2	ER	Protein-Disulfid-Isomerase	32,8	1520
	Rpn10	Proteasom	Nicht-ATPase-Regulations-Untereinheit des 26S-Proteasoms	29,8	17200
10	Rps15	Cytosol	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	16	-
	Rps16b			15,8	-
	Rps17a			15,8	30900
	Rps18b			17,1	112000
	Rps19a			15,9	29000
	Rps20			14	-
	Rps24b			15,3	6160
	Rps26b			15,3	503000
	Rpl26a	Cytosol	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	14,2	-
	Rpl34b			13,6	21000
	Rpn9	Proteasom	Nicht-ATPase-Regulations-Untereinheit des 26S-Proteasoms	45,8	12400

Die Angaben wurden der SGD-Datenbank entnommen.

Tabelle 18: Mit Kap120-S-TEV-ZZ aus der unlöslichen Fraktion co-gereinigte Hefeproteine

Banden-Nr.	Protein	Lokalisation	Funktion	MW [kDa]	Moleküle pro Zelle
17	Ilv1	Mitochondrium	Threonin-Ammonium-Lyase-Aktivität	64,1	11900
	Cyb2	Mitochondrium	L-Laktat-Dehydrogenase-Aktivität	66	4590
	Dhh1	Cytoplasma	RNA-Helikase-Aktivität, Protein-Bindung	57,9	42900
	Dbp2	Cytoplasma, Nukleus, Mitochondrium	ATP-abhängige RNA-Helikase der DEAD-Box-Protein-Familie	61,2	33100
	Ilv3	Mitochondrium	Dihydroxysäuredehydratase-Aktivität	63,4	171000
	Ypl247c	Cytoplasma, Nukleus	unbekannt	57,9	799
	Trp5	Cytoplasma, Nukleus	Tryptophan-Biosynthese	77	15500
	Ald6	Cytoplasma, Mitochondrium	Aldehyddehydrogenase	54,8	135000
	Lcb2	Mikrosomen	Sphingolipid-Biosynthese	63,9	54500
18	Ald6	Cytoplasma, Mitochondrium	Aldehyddehydrogenase	54,8	135000
	Ilv1	Mitochondrium	Threonin-Ammonium-Lyase-Aktivität	64,1	11900
	Ald4	Mitochondrium	Aldehyddehydrogenase	57	22200
	Rpn3	Proteasom	Nicht-ATPase-Regulations-Untereinheit des 26S-Proteasoms	60,8	16700
	Vma2	Cytoplasma, Vakuole	Protonen-transportierende ATPase-Aktivität	57,8	131000
	Ybr056w	Cytoplasma	unbekannt	58	1960
	Gua1	unbekannt	GMP-Synthase-Aktivität	58,7	-
	Trp2	Cytoplasma	Tryptophan-Biosynthese	57,1	6510
	Hfd1	Endosom, Lipidpartikel, Mitochondrium	3-Chloroallyl-Aldehyddehydrogenase-Aktivität	60,3	2930
	Thr4	Cytoplasma, Nukleus	Threonin-Synthase-Aktivität	57,6	26000
	Rpt1	Proteasom	ATPase des 19S-Regulationspartikels des 26S-Proteasoms	52,3	105
Rrp3	Nukleolus	35S Primärtranskript-Prozessierung	56,2	-	
19	Gvp36	Cytoplasma, Golgi-Membran	unbekannt	36,8	7720
	Sis1	Cytosol	Chaperon-Regulator-Aktivität, Bindung ungefalteter Proteine	37,6	20300

19	Rpn8	Proteasom	Nicht-ATPase-Regulations-Untereinheit des 26S-Proteasoms	38,5	19800
	Hom2	Cytoplasma, Nukleus	Aspartat-Semialdehyddehydrogenase-Aktivität	40	18400
	Fmp26	Mitochondrium	unbekannt	44,6	2290
	Erg26	ER	C-3-Sterol-Dehydrogenase-Aktivität	39	2580
	Scj1	ER-Lumen	Chaperon-Bindung	42	8260
	Fba1	Cytoplasma	Glykolyse, Glukoneogenese	39,9	1020000
	Qcr2	Mitochondrium,	Ubichinol-Cytochrom-C-Reduktase-Aktivität	40,5	35700
	Mdj1	Mitochondrium	Bindung von Chaperonen und ungefalteten Proteinen	56	7570
	Mck1	Lösliche Fraktion	Glykogen-Synthase-Kinase 3-Aktivität	43,4	396
	Ktr3	Membranfraktion	Mannosyl-Transferase-Aktivität	47,9	704
	Fus3	Cytoplasma, "Mating-Projektionstip", Mitochondrium, Nukleus	Mitogen-aktivierte Proteinkinase, involviert in "Mating"-Pheromon-Antwort	41	8480
	Act1	Cytoskelett	Zellpolarisation, Endocytose, andere Cytoskelett-Funktionen	41,9	-
	Pda1	Mitochondrium	Pyruvat-Metabolismus	46,7	100000
20	Psa1	Cytoplasma	Mannose-1-Phosphat-Guanylyl-Transferase-Aktivität	39,7	97100
	Lys12	Mitochondrium	Lysin-Biosynthese	40,3	19100
	Ura2	Cytoplasma, Cytoplasma-Membran, Mitochondrium	Aspartatcarbamoyl-Transferase-Aktivität, Carbamoyl-Phosphat-Synthase-Aktivität	24,6	1100
21	Mpd2	ER	Protein-Disulfid-Isomerase	32,8	1520
	Pet9	Mitochondrium	ATP:ADP-Antiporter-Aktivität	34,6	-
	Atp3	Mitochondrium	ATP-Synthese-gekoppelter Protonen-Transport	34,4	26100
	Ilv6	Mitochondrium	Regulatorische Untereinheit der Aceto-Laktat-Synthase	34,3	15800
22	Rps3	Cytosol	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	26,5	14600
	Mpd2	ER	Protein-Disulfid-Isomerase	32,8	1520
	Dpm1	Mitochondrium, Kernmembran-ER-Netzwerk	Dolichyl-Phosphat-Mannose-Transferase-Aktivität	30,5	1890

22	Pet9	Mitochondrium	ATP:ADP-Antiporter-Aktivität	34,6	-
	Taf4	Transkriptionsfaktor-TFIID-Komplex	RNA-Polymerase II-Transkriptionsfaktor-Aktivität	42,4	1940
	Ilv6	Mitochondrium	Regulatorische Untereinheit der Aceto-Laktat-Synthase	34,3	15800
	Atp3	Protonen-transportierende ATP-Synthase, "Central stalk"	ATP-Synthese-gekoppelter Protonen-Transport	34,4	26100
23	Rpl12a	Cytosol	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	13,6	68500
	Rpl21b	Cytosol	Protein-Komponente der großen ribosomalen Untereinheit	13,6	66400
	Cbp6	Mitochondrium	Protein-Biosynthese	18,7	2130
	Tsa1	Cytoplasma	Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität	21,7	378000
	Emp24	ER-zu-Golgi-Vesikel, ER	ER-zu-Golgi-Transport, Protein-Retention im ER, Vesikel-Organisation	23,5	26800
	Hom2	Cytoplasma, Nukleus	Aspartat-Semialdehyddehydrogenase-Aktivität	40	18400
	Atp7	Mitochondrium	ATP-Synthese-gekoppelter Protonen-Transport	19,8	6820
	Mpd2	ER	Protein-Disulfid-Isomerase	32,8	1520
	Abf2	Mitochondrium	Mitochondriale Genom-Erhaltung	21,5	3810
Yer067w	Cytoplasma, Nukleus	unbekannt	19,1	8450	
24	Rps13	Cytosol	Protein-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit	17	-
	Rps15			16	-
	Rps17a			15,8	30900
	Rpn13	Proteasom	Untereinheit des 19S-Regulationspartikels des 26S-Proteasoms	18	12200
	Yml030w	Mitochondrium	unbekannt	18,6	1210

Die Angaben wurden der SGD-Datenbank entnommen.

Die Proteine, mit denen weitere Experimente durchgeführt wurden wie z. B. *in vivo*-Lokalisierungsstudien und "GST-Pulldown-Assays" mit rekombinanten Proteinen, sind grau unterlegt.

Die Lokalisation von Taf4, Imp4, Rfc2, Rpc40, Fus3, Sub2 und Dbp2 in Hefezellen

Im nächsten Schritt wurden die *in vitro* gefundene Interaktionen *in vivo* überprüft. Ausgewählt wurden Proteine, deren Importmechanismen noch nicht geklärt wurden und die hauptsächlich bzw. ausschließlich im Nukleus sowie Nukleolus zu finden sind oder ihre bereits bekannte Funktion in der Zelle auf eine solche Lokalisierung schließen lässt. Es wurden die Lokalisierungen von Taf4 und Imp4 bestimmt, welche zuvor mittels Fluoreszenzmikroskopie noch nicht gezeigt wurden, sowie der Einfluss verschiedener Importrezeptoren auf Rfc2, Rpc40, Taf4, Fus3, Imp4, Sub2 und Dbp2 beobachtet. Dazu wurde eine *GFP*-Kassette hinter das jeweilige Gen ins Hefegenom integriert. Zur Kontrolle der Korrektheit der Integration wurde die genomische DNA isoliert und eine PCR-Analyse mit Oligonukleotiden durchgeführt, die im Leserahmen des Ziel-Gens und in dem miteingeführten Markergen binden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde aus den transformierten Zellen ein Gesamtzellysate gewonnen und das synthetisierte GFP-Fusionsprotein durch Immunoblotting mit einem Antikörper gegen GFP detektiert (Daten nicht gezeigt). Zellen der daraus resultierenden Hefestämme wurden bei 30°C in synthetischem Vollmedium bis zu ihrer logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Jeweils ein Aliquot davon wurde genommen und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. 28). Nachfolgend werden die Resultate dieser Lokalisierungsstudien erläutert.

In Hefezellen, die keine Deletion der Importine enthielten, zeigte Taf4 neben einem schwach cytoplasmatischen Signal ein starkes Kernsignal. Imp4 war nukleär mit einer Anhäufung im Nukleolus. Diese Lokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde zuvor noch nicht gezeigt.

Um den Einfluss einiger Importine auf die genannten Proteine zu überprüfen, wurde die *GFP*-Kassette hinter das jeweilige Gen ins Genom solcher Hefezellen integriert, in denen die Gene, die für verschiedene Importine kodieren, deletiert waren. Da einige Liganden sowohl an Kap114 wie auch an Kap120 gebunden hatten (Taf4 und Fus3) sowie in Anlehnung daran, dass auch Rpf1 abgesehen von Nmd5 hauptsächlich durch diese beiden Importrezeptoren transportiert wird (Caesar *et al.*, 2006) und wie Imp4 (Lee und Baserga, 1999), Dbp2 (Bond *et al.*, 2001) und Rrp3 (O`Day *et al.*, 1996) an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist (Dunbar *et al.*, 2000), wurden neben den einfach-deletierten $\Delta kap114$ - und $\Delta kap120$ -Stämmen auch der dreifach deletierte $\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$ -Stamm untersucht.

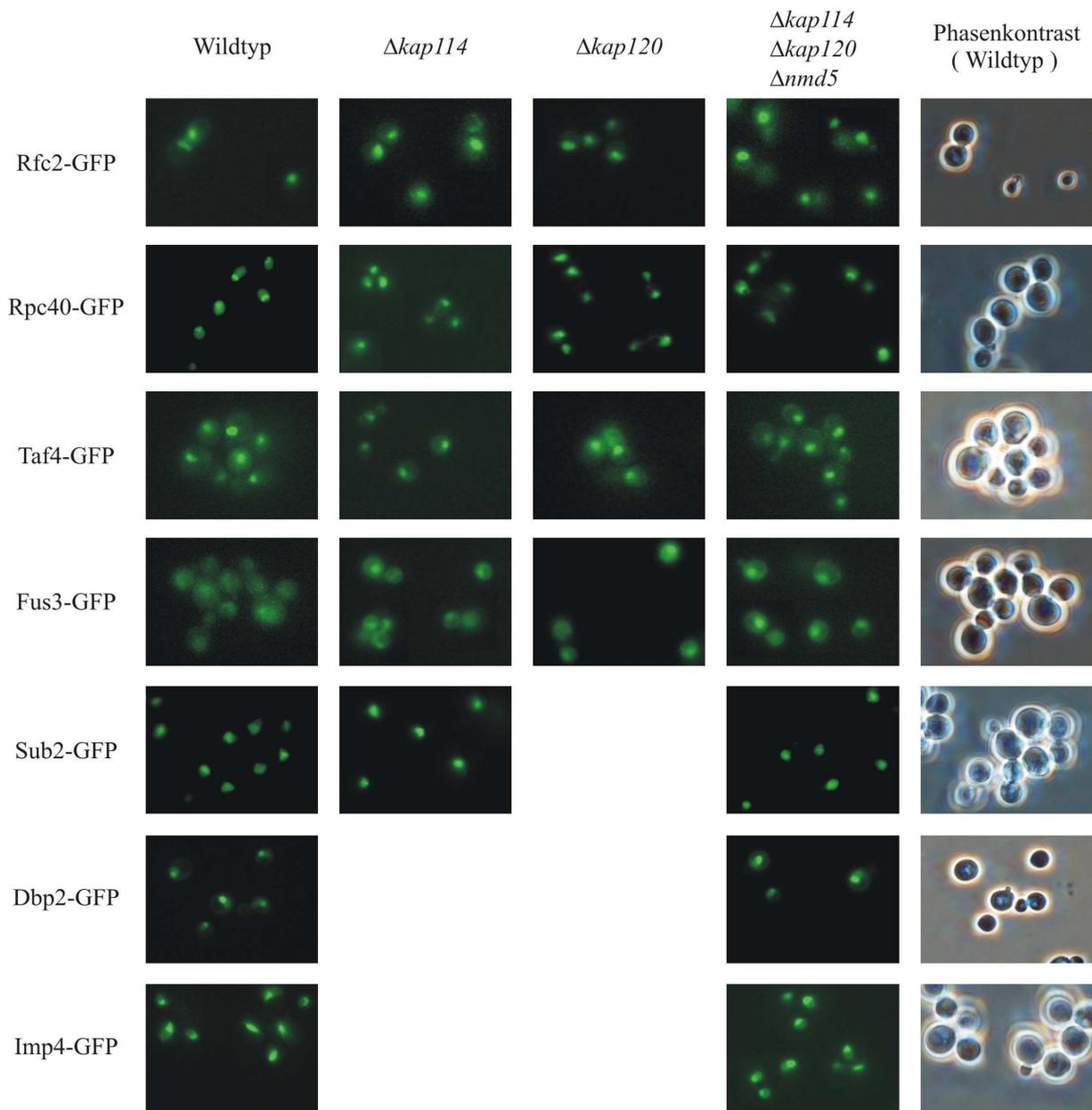


Abb. 28: Die Lokalisierung von Taf4, Imp4, Rfc2, Rpc40, Fus3, Sub2 bzw. Dbp2 sowie der Einfluss von Kap114, Kap120 und Nmd5 auf deren Import

In die Stämme GSY155 (Wildtyp), GSY503 ($\Delta kap114$), GSY511 ($\Delta kap120$) und GSY527 ($\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$) wurde hinter das jeweilige Gen eine GFP-Gen-Kassette genomisch integriert. Die daraus resultierenden Stämme GSY1220 (*IMP4-GFP*), GSY1221 ($\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$ *IMP4-GFP*), GSY1222 (*RPC40-GFP*), GSY1223 ($\Delta kap114$ *RPC40-GFP*), GSY1224 ($\Delta kap120$ *RPC40-GFP*), GSY1225 ($\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$ *RPC40-GFP*), GSY1226 (*SUB2-GFP*), GSY1227 ($\Delta kap114$ *SUB2-GFP*), GSY1228 ($\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$ *SUB2-GFP*), GSY1229 (*TAF4-GFP*), GSY1230 ($\Delta kap114$ *TAF4-GFP*), GSY1231 ($\Delta kap120$ *TAF4-GFP*), GSY1232 ($\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$ *TAF4-GFP*), GSY1233 (*DBP2-GFP*), GSY1234 ($\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$ *DBP2-GFP*), GSY1235 (*RFC2-GFP*), GSY1236 ($\Delta kap114$ *RFC2-GFP*), GSY1237 ($\Delta kap120$ *RFC2-GFP*), GSY1238 ($\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$ *RFC2-GFP*), GSY1239 (*FUS3-GFP*), GSY1240 ($\Delta kap114$ *Fus3-GFP*), GSY1241 ($\Delta kap120$ *FUS3-GFP*) und GSY1242 ($\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$ *FUS3-GFP*) wurden in synthetischem Vollmedium bei 30°C bis zum Erreichen der logarithmischen Phase kultiviert. Ein Aliquot wurde entnommen, um das jeweilige GFP-Fusionsprotein mittels Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren. Zum Vergleich wurden die Zellen auch bei Phasenkontrast fotografiert (hier gezeigt: Wildtyp).

In den oben aufgezählten Mutanten gab es allerdings keine Misslokalisierungen. Rfc2 war hauptsächlich nukleär, Rpc40 befand sich komplett in Kern und Nukleolus, Taf4 zeigte bei allen drei “knock-out“-Mutanten ein schwaches cytoplasmatisches und ein starkes nukleäres Signal, Fus3 verteilte sich bei den vier Stämmen gleichmäßig über Zellkern und Cytosol, Imp4 und Dbp2 waren im Triple-“knock-out“-Stamm immer noch in Nukleus und Nukleolus und Sub2 zeigte sich bei den beiden untersuchten Mutanten kernständig. Unter Umständen waren die *in vitro* gefundenen Interaktionen artifizieller Natur oder die untersuchten Importine sind nicht die einzigen Transportrezeptoren dieser Proteine und ein möglicher Importdefekt wird durch andere Rezeptoren kompensiert.

3.3.2. Die Interaktion verschiedener Importine mit Hefeproteinen

Synthese von GST-Fusionsproteinen

Ein Teil der in Abb. 27 dargestellten Wechselwirkungen von Kap114 und Kap120 zu verschiedenen endogenen Hefeproteinen wurden hinsichtlich ihrer Spezifität noch einmal mit rekombinanten isolierten Fusionsproteinen überprüft. Dabei wurden die Proteine ausgesucht, über deren Importmechanismus noch nichts bekannt ist und die nukleär bzw. nukleolär lokalisiert sind oder ihre Aufgabe zumindest auf eine solche Lokalisation schließen lässt. Die kodierenden Sequenzen der gefundenen Interaktionspartner Rfc5, Rpc40, Fus3, Dbp3, Rrp3 (Daten nicht gezeigt), Rfc2, Taf4, Dbp2 und Imp4 (Abb. 29A- D) wurden in pGEX-4T-Expressionsvektoren kloniert. Das Plasmid pGEX-4T-*NPL3* entstammte der Laborkollektion. Anschließend wurden die entsprechenden GST-Fusionsproteine in *E. coli* Rosetta Star synthetisiert. Abb. 29 zeigt Proben vor und nach der Induktion der Proteinexpression sowie die Auftrennung nach Aufschluss der Zellen in eine lösliche (Lysat) und unlösliche Fraktion (Pellet), nachdem sie einer SDS-PAGE unterzogen und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt worden sind. 75 µl Lysat wurden für 1 h bei 4°C mit GSH-Sepharose inkubiert (Gebunden), um so das entsprechende GST-Fusionsprotein zu isolieren und seine Bindefähigkeit an die Matrix zu kontrollieren. Die Synthese sowie die Isolierung sind bei allen aufgelisteten Proteinen gelungen und nach der Bindung an die Matrix gab es nur wenige “Verunreinigungen“ bzw. Abbauprodukte (bei Taf4 etwas stärker). GST-Sub2 konnte auf diese Weise nicht gereinigt werden, stattdessen wurden nur Degradationsprodukte erhalten (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde ein YEpGAL-*GST-SUB2*-Vektor kloniert. Hefewildtypzellen wurden mit diesem Plasmid transformiert, kultiviert und die Proteinsynthese durch Galaktose induziert. Zur Kontrolle der erfolgten Genexpression und

Proteinsynthese wurde eine Probe genommen und die pelletierten Zellen in PBS/Sorbitol resuspendiert. Nach Zellwandverdau lysierten die Zellen durch Zugabe von 0,2% Tween 20. Es wurde zentrifugiert und der Überstand (ÜS1) abgetrennt. Das Pellet wurde in Hochsalz-PBS aufgenommen, wieder zentrifugiert und der Überstand (ÜS2) separiert. Alle Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem anti-GST-Antikörper (1:2000) visualisiert (Abb. 29E).

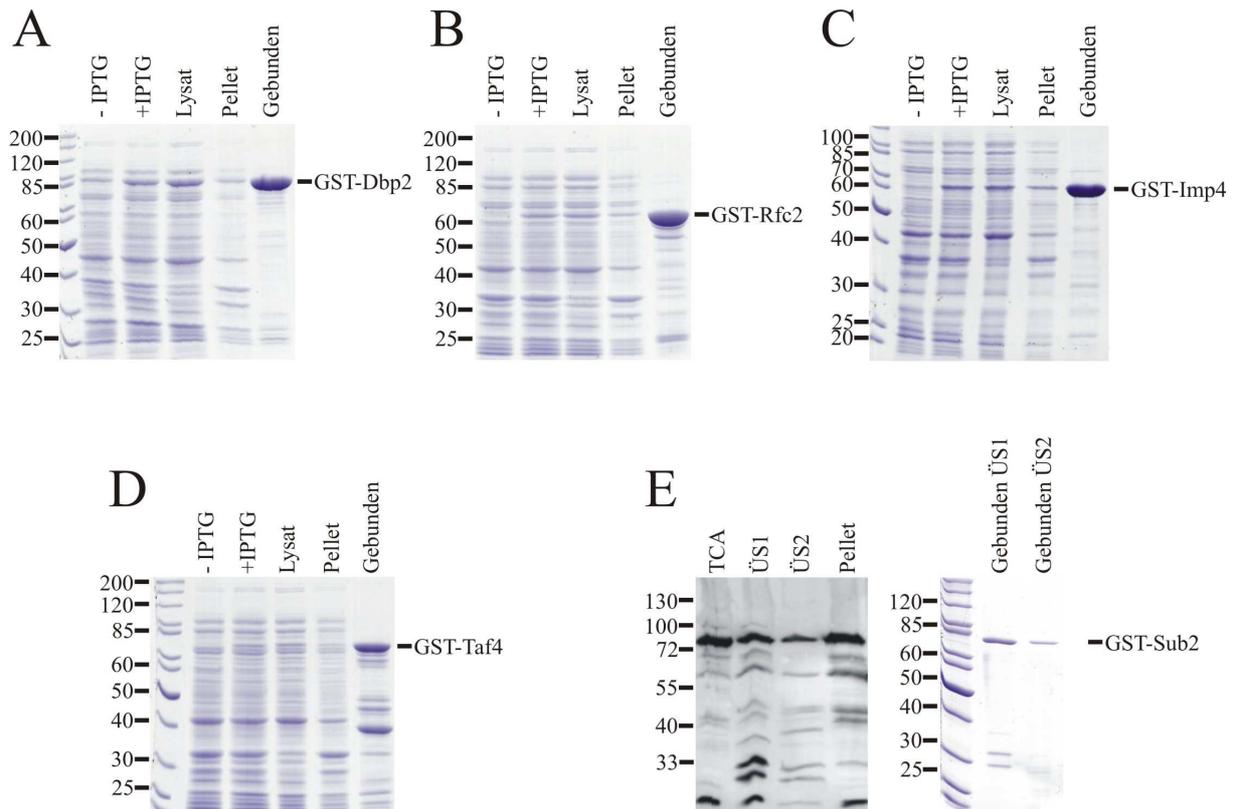


Abb. 29: Synthese von GST-Dbp2, -Rfc2, -Imp4 und -Taf4 in *E. coli* sowie von GST-Sub2 in *S. cerevisiae*
 (A-D) *E. coli* Rosetta Star-Zellen wurden mit pGEX-4T-DBP2 (pGS1734) (A), pGEX-4T-RFC2 (pGS1727) (B), pGEX-4T-IMP4 (pGS1736) (C) und pGEX-4T-TAF4 (pGS1731) (D) transformiert und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 kultiviert. Nach Entnahme einer Probe (-IPTG) wurde die Synthese des Fusionsproteins durch Zugabe von 72 mg/l IPTG und Kultivierung für 3 h bei 15°C induziert und es wurden 2% Ethanol (99%) zugesetzt. Nach Entnahme einer weiteren Probe (+IPTG) wurde aus den Zellen durch Ultraschallbehandlung und Zentrifugation ein Gesamtzelllysat (Lysat) hergestellt. Daraus und aus der unlöslichen Fraktion (Pellet) wurde eine Probe entnommen. Durch Bindung an GSH-Sepharose (Gebunden) wurde das jeweilige GST-Fusionsprotein aus dem Gesamtzelllysat (75 µl) isoliert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 4°C. Anschließend wurden die erhaltenen Pellets 3 x mit PBSKMT gewaschen. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. (E) GST-Sub2 wurde in dem Hefestamm GSY155, der mit dem Plasmid pGS1757 (YEpgAL-GST-SUB2) transformiert worden war, synthetisiert. In Selektivmedium mit 2% Glukose angezogene Zellen wurden in Medium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 30°C kultiviert. Die Synthese des Fusionsproteins wurde zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Die Zellen wurden für 4 h weiter kultiviert. Es wurde eine Probe entnommen und die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt (TCA). Nach dem Zellwandverdau wurden die Zellen mit 0,2% Tween 20 lysiert und durch Zentrifugieren ein Überstand (ÜS1) gewonnen. Aus der unlöslichen Fraktion wurde mit Hochsalz-PBS ein zweiter Überstand (ÜS2) extrahiert. Die Proben wurden durch Immunoblot-Analyse mit Erst-Antikörper gegen GST (1:2000) und anti-Kaninchen-Sekundäntikörper (1:1000) detektiert (links). Pro Ansatz wurden 200 µl der beiden Überstände für 1 h mit 30 µl GSH-Sepharose inkubiert. Nachdem die Pellets 3 x mit PBSKMT gewaschen worden waren, folgte eine SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau (rechts).

Obwohl mindestens die Hälfte des synthetisierten GST-Sub2 in der unlöslichen Fraktion verblieben war, waren die Mengen in den löslichen Fraktionen ÜS1 und 2 für die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien ausreichend. Durch die Behandlung mit Hochsalz-PBS wurde jedoch weniger extrahiert als im vorhergehenden Schritt. Im Anschluss wurden je 200 µl ÜS1 bzw. ÜS2 für 1 h bei 4°C mit GSH-Sepharose inkubiert. Aliquots davon wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Wie man sieht, ist es gelungen, GST-Sub2 aus beiden Lysaten zu isolieren, ohne dass es allzu viel Abbau gegeben hätte.

***In vitro*-Interaktionen rekombinanter Importine mit GST-Fusionsproteinen**

Rfc2, Rfc5, Rpc40, Fus3, Dbp2, Dbp3, Sub2, Taf4, Rrp3, Imp4 und Npl3 wurden unter den Aspekten der Bindung an ein Importin und der Auflösung dieser Interaktion durch Gsp1-GTP untersucht. Die entsprechenden GST-Fusionsproteine wurde in *E. coli* Rosetta Star synthetisiert und ein Komplettlysat (lösliche Fraktion) gewonnen. Die Importine wurden ebenfalls in *E. coli*-Stämmen als His₆-Fusion oder im Falle von Kap104 mit einem TEV-Protease-spaltbaren "GST-Tag" hergestellt und durch Affinitäts- und je nach Bedarf mit Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Zur Synthese von His₆- und GST-Gsp1Q71L-GTP wurde analog vorgegangen. Für den Bindungsversuch wurde das jeweilige Zielprotein aus Lysat an GSH-Sepharose gebunden, dann wurden verschiedene Importine zugegeben, gegebenenfalls ein Parallelansatz mit zusätzlichem His₆-Gsp1Q71L-GTP gemischt und die Proben durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert. Die Funktionalität der Transportrezeptoren wurde über ihre Affinität zu Gsp1-GTP kontrolliert (Abb. 30). Rfc5, Dbp3 und Npl3 zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen keinerlei Interaktion mit Kap114 und Kap120 (Daten nicht gezeigt) und wurden deshalb nicht weiter bearbeitet. Die schwachen Bindungen von Rpc40, Fus3 und Rrp3 an die gewählten Transportrezeptoren erwiesen sich nur als bedingt reproduzierbar (Daten nicht gezeigt) und werden daher als unspezifisch eingestuft. Die Ergebnisse der übrigen Interaktionsstudien werden nachstehend erläutert.

- **Die Funktionalität der Importine**

Ein Kennzeichen der Importine ist ihre Affinität zu Gsp1-GTP. Um nun zunächst ihre Funktionalität zu überprüfen, wurde GST-Gsp1Q71L-GTP an GSH-Sepharose gebunden und mit den Importinen inkubiert. Die erhaltenen Proben wurde mittels SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert (Abb. 30). Alle Importrezeptoren zeigen eine

deutliche Affinität zu Gsp1-GTP. Lediglich das Import-Adaptermolekül Srp1 und das Exportin Cse1, welche jedes für sich kaum mit Gsp1-GTP interagieren, zeigten keine Bindung. Die verwendeten Transportfaktoren sind also funktional.

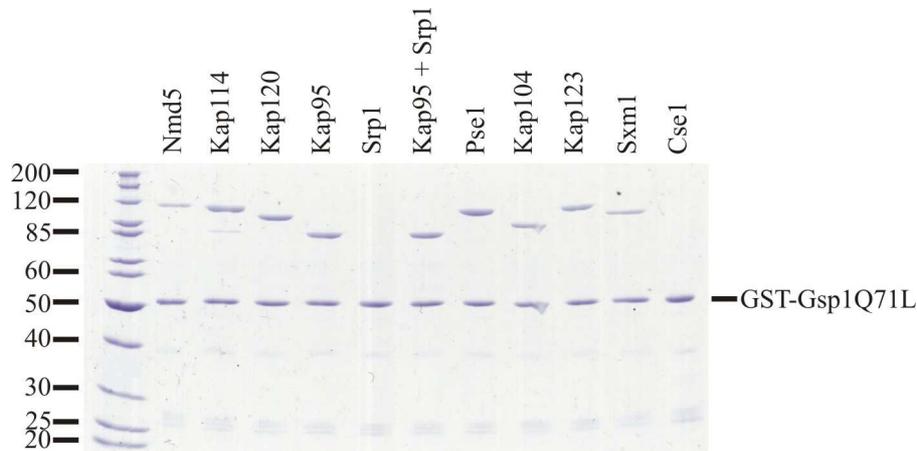


Abb. 30: Gsp1-GTP bindet *in vitro* an verschiedene Transportrezeptoren

Die verwendeten Transportfaktoren sowie Gsp1Q71L-GTP wurden in *E. coli* synthetisiert und anschließend durch Affinitäts-, in einigen Fällen auch durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Für den Bindungsversuch wurden zunächst 8 µg GST-Gsp1Q71L-GTP durch Inkubation für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurden zu den Ansätzen jeweils 12 µg der Transportfaktoren gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 3 x gewaschen und das gebundene Material mittels SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert.

- **Die Positivkontrolle: die Bindung von GST-Rpf1 an die Importine**

Neben der Überprüfung der Funktionalität der Transportrezeptoren wurde zusätzlich kontrolliert, ob die festgesetzten experimentellen Konditionen eine Komplexbildung mit dem Substrat zulassen. Bereits bekannt ist, welche Importine *in vitro* mit dem an der ribosomalen Biogenese beteiligten Rpf1 interagieren. Es handelt sich dabei um Kap120, Kap114, Kap95, Kap104 und Nmd5 (Caesar, 2003). Dieses Ergebnis sollte unter den ausgesuchten Versuchsbedingungen reproduziert werden. Hierzu wurde aus Zellen eines mit YEpGAL-GST-RPF1 transformierten Hefestamms ein Gesamtzelllysat gewonnen. Das darin enthaltene GST-Rpf1 wurde an GSH-Sepharose gebunden und diese Ansätze mit verschiedenen Importinen inkubiert. Wie Abb. 31 erkennen lässt, zeigen auch hier Kap120, Kap114, Kap95, Kap104 und Nmd5 die größte Affinität zu Rpf1. Eine schwächere Wechselwirkung weisen Pse1 und Sxm1 auf, überhaupt keine Interaktion gibt es bei Kap123 und der Negativkontrolle Cse1. Zusammengefasst bedeutet das also, dass die Versuchsbedingungen für diese Zwecke geeignet sind.

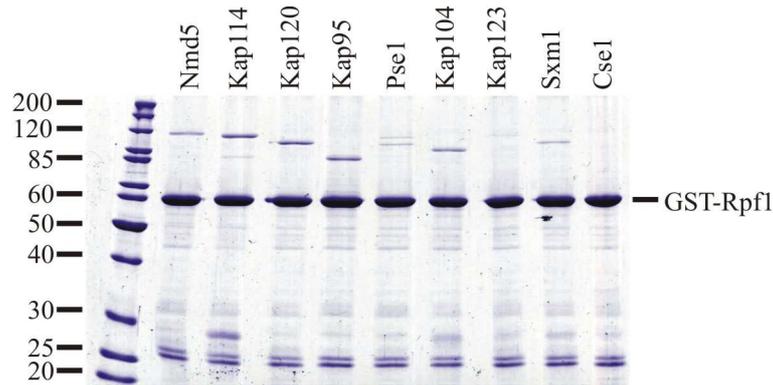


Abb. 31: Rpf1 bindet an verschiedene Transportrezeptoren

Die verwendeten Transportfaktoren wurden in *E. coli* synthetisiert und anschließend gereinigt. GST-Rpf1 wurde in *S. cerevisiae* synthetisiert. Aus den Zellen wurde ein Gesamtzelllysate hergestellt, aus dem das Fusionsprotein durch Inkubation der Ansätze für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurde zu den Ansätzen jeweils 12 µg der Transportfaktoren gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde 3 x gewaschen und das gebundene Material mittels SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert.

- **Die Bindung von GST-Dbp2 an verschiedene Importine**

Die mittels Co-Reinigung gefundene Interaktion von Kap120 und der nukleären und nukleolären RNA-Helikase Dbp2 (Barta und Iggo, 1995) sollte mit isolierten rekombinanten Proteinen verifiziert werden. GST-Dbp2 wurde in *E. coli* synthetisiert und aus dem Komplettlysate an GSH-Sepharose gebunden. Es wurden verschiedene gereinigte Importine zugegeben, parallel wurde zusätzlich His₆-Gsp1Q71L-GTP hinzugefügt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert. Die äußerst schwache Bindung an Kap120 ließ sich nicht in allen Fällen reproduzieren (Daten z.T. nicht gezeigt) und wird daher als unspezifisch eingestuft. Stattdessen wurde aber eine schwache Bindung an Kap114 nachgewiesen, welche durch Gsp1Q71L-GTP wieder aufgelöst wurde (Abb. 32). Dieser Sachverhalt ist ein Indiz für eine spezifische Bindung. Ansonsten gab es weder mit der Negativkontrolle Cse1 noch mit den übrigen Importinen eine Interaktion.

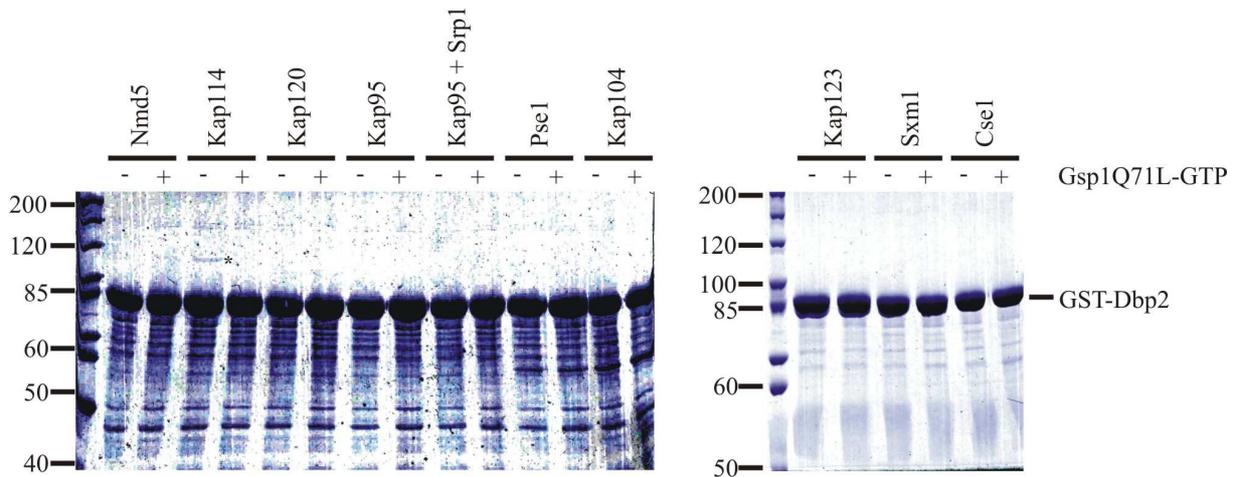


Abb. 32: Die Bindung von Importinen an Dbp2 und die Verdrängung durch Gsp1-GTP

Die verwendeten Transportfaktoren wurden in *E. coli* synthetisiert und anschließend gereinigt. GST-Dbp2 wurde in *E. coli* Rosetta Star synthetisiert. Aus den Zellen wurde ein Gesamtzelllysat hergestellt, aus dem das Fusionsprotein durch Inkubation der Ansätze für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurde zu den Ansätzen jeweils 12 µg der Transportfaktoren gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Parallel dazu wurde pro Transportrezeptor ein Ansatz mit zusätzlich 22,5 µg in *E. coli* synthetisiertem und gereinigtem His₆-Gsp1Q71L-GTP gemischt und ebenfalls für 1 h bei 4°C inkubiert. Es wurde 3 x gewaschen, die gebundenen Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert.

- **Die Bindung von GST-Sub2 an verschiedene Importine**

Die unter 3.3.1 gefundene Wechselwirkung von Kap114 und der nukleären TREX-Komplex-Untereinheit Sub2 (Sträßer *et al.*, 2002) wurde auf ihre Spezifität hin untersucht. Zunächst wurde in *S. cerevisiae* hergestelltes rekombinantes GST-Sub2 aus Komplettilysat an GSH-Sepharose gebunden. Es wurden die in Abb. 33 benannten Transportrezeptoren zugegeben bzw. in einem vergleichbaren Ansatz zusätzlich His₆-Gsp1Q71L-GTP. Die Proben wurden einer SDS-PAGE mit anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau unterzogen (A). Im Falle von Kap95 sowie Srp1 wurde außerdem eine Immunoblot-Analyse mit anti-Kap95- bzw. anti-Srp1-Antikörper (1:300 bzw. 1:5000) durchgeführt (B). Eine Bindung an Kap114 wurde nicht beobachtet. Auch die übrigen Transportrezeptoren inklusive der Negativkontrolle Cse1 zeigten nach SDS-PAGE mit anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau keine Wechselwirkung mit Sub2. Lediglich Srp1 interagiert mit dem GST-Fusionsprotein. Deshalb wurde seine Affinität zu Kap95 und Srp1 noch einmal näher untersucht. Von seinem Säuger-Homolog Importin α ist zwar bekannt, dass es in der Lage ist, auch allein ein Cargo zu transportieren (Kotera *et al.*, 2005), jedoch erfolgt der klassische NLS-Protein-Transport als ternärer Komplex mit Kap95 (Pemberton und Paschal, 2005). Deshalb wurden für beide Proteine unter den gleichen Bedingungen erneut Bindungsversuche durchgeführt und die Proben durch Immunoblotting analysiert.

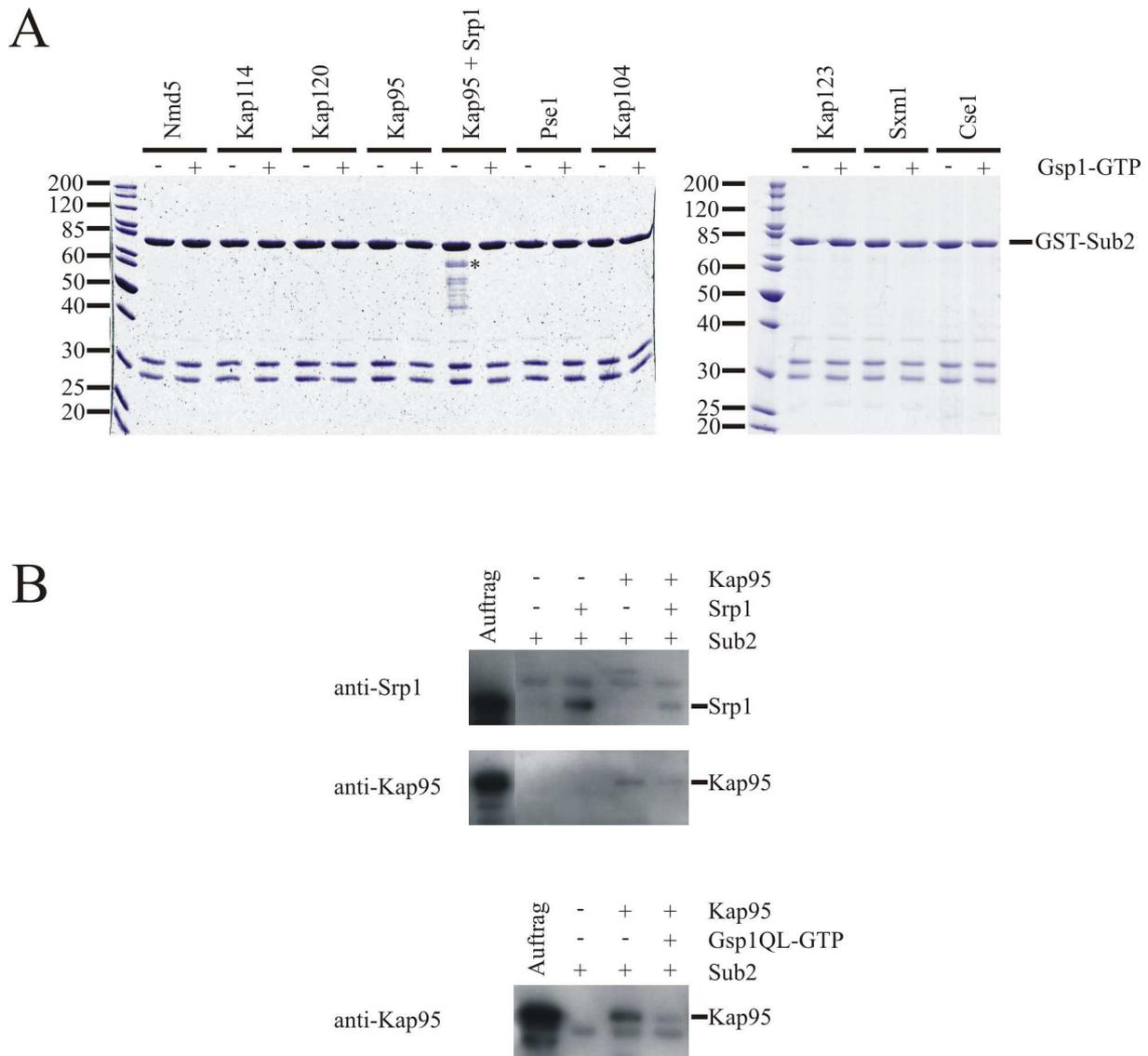


Abb. 33: Sub2 bindet *in vitro* an Kap95 und Srp1, jedoch nicht an die übrigen Transportrezeptoren

(A) Die verwendeten Proteine wurden bis auf GST-Sub2 in *E. coli* synthetisiert und gereinigt. GST-Sub2 wurde in *S. cerevisiae* hergestellt. Das Fusionsprotein wurde aus dem Gesamtzelllysat durch Inkubation für 1 h bei 4°C mit GSH-Sepharose extrahiert. Nach Waschen mit PBSKMT wurden zu den Ansätzen jeweils 12 µg der Transportfaktoren gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Parallel dazu wurde pro Transportrezeptor ein Ansatz mit zusätzlich 22,5 µg His₆-Gsp1Q71L-GTP gemischt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Ansätze wurden dann 3 x mit PBSKMT gewaschen, die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert. (B) Die benutzten Proteine wurden wie unter (A) beschrieben gewonnen. GST-Sub2 wurde an GSH-Sepharose gebunden, indem der Ansatz für 1 h bei 4°C inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurde zu den Ansätzen jeweils 12 µg der Transportfaktoren Srp1 und Kap95 gegeben und wiederum für 1 h bei 4°C inkubiert. Im letzten Fall wurde ein Parallelansatz mit 22,5 µg His₆-Gsp1Q71L-GTP gemischt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Alle Ansätze wurden 3 x gewaschen und die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert, um dann einer Immunoblot-Analyse mit Antikörpern gegen Srp1 (1:5000) und Kap95 (1:300) sowie anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) unterzogen zu werden.

In Abb. 33B erkennt man, dass sowohl Srp1 als auch Kap95 separat voneinander an Sub2 binden und bei Kap95 auch eine Verdrängung des Substrats durch Gsp1-GTP stattfindet, jedoch bildet sich kein trimerer Komplex aus Srp1, Kap95 und dem "Cargo", weil sich die beiden Transportfaktoren gegenseitig verdrängen. Das bedeutet, im Falle von Sub2 handelt es

sich nicht um einen klassischen NLS-Protein-Transport, jedoch spricht das erhaltene Ergebnis, dass Kap95 an Sub2 bindet und durch Gsp1-GTP wieder abgelöst wird, für einen Import durch Kap95. Um die hier gefundene Interaktion mit Srp1 näher charakterisieren zu können, müssen weitere Experimente folgen.

- **Die Bindung von GST-Taf4 an verschiedene Importine**

Die Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID Taf4 (Sanders und Weil, 2000) zeigte in den Co-Reinigungsexperimenten sowohl zu Kap114 als auch zu Kap120 eine Bindung. Auch diese Komplexe wurden auf ihre Spezifität überprüft. GST-Taf4 wurde in *E. coli* synthetisiert und ein Gesamtzelllysat hergestellt. Das Fusionsprotein wurde an GSH-Sepharose gebunden und anschließend mit verschiedenen Importinen inkubiert. In einem analogen Ansatz wurde His₆-Gsp1Q71L-GTP hinzugefügt (Abb. 34A). Kap95, Pse1, Kap104 und Sxm1 zeigten eine deutliche Bindung zu Taf4, bei Nmd5, Kap114 und Kap120 sind nur schwache Banden sichtbar. Die Proteinmengen wurden mit Hilfe der ImageQuant TL v 2003.03-Software quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 34B und Tabelle 19 dargestellt. Die Negativkontrolle Cse1 und Kap123 zeigten keine Bindung an Taf4. Kap120 wies mit 22% Bindung (bezogen auf 100% Bindung an Kap95) die niedrigste Bindung auf. Vergleichbar starke Wechselwirkungen hatten Nmd5 und Kap114 mit 43% bzw. 56% Bindung. Bei Sxm1 und Pse1 waren die Mengen an gebundenem Protein doppelt so groß und es ergaben sich Werte von 90 bzw. 93%. Die Bindung an Kap95 wurde 100% gesetzt, jedoch steigerte die Zugabe von Srp1 den Wert nur auf 117%. Die größte Bindung zeigte Kap104 mit 228%. Bis auf Kap120, bei dem das Hinzufügen von zusätzlichem His₆-Gsp1Q71L-GTP keine Wirkung hatte, war die Höhe der Ablösung mit 46 - 95 % sehr deutlich.

Zusammengefasst bedeutet das: Taf4 wird nicht durch klassischen NLS-Protein-Transport in den Zellkern importiert, da sonst die Stimulation durch zusätzlich zugegebenem Srp1 größer sein müsste. Wahrscheinlich handelt es sich bei Kap104 um den Hauptimportrezeptor. Bezogen auf die Stärke der Bindung könnten Kap95, Pse1, Sxm1, Nmd5 und Kap114 Nebenwege für den Taf4-Import darstellen, wobei die letzten beiden vernachlässigbar sind. Kap123 zeigte keine Wechselwirkung mit Taf4 und die Bindung durch Kap120 erwies sich im Zusammenhang mit dem Kerntransport als unspezifisch.

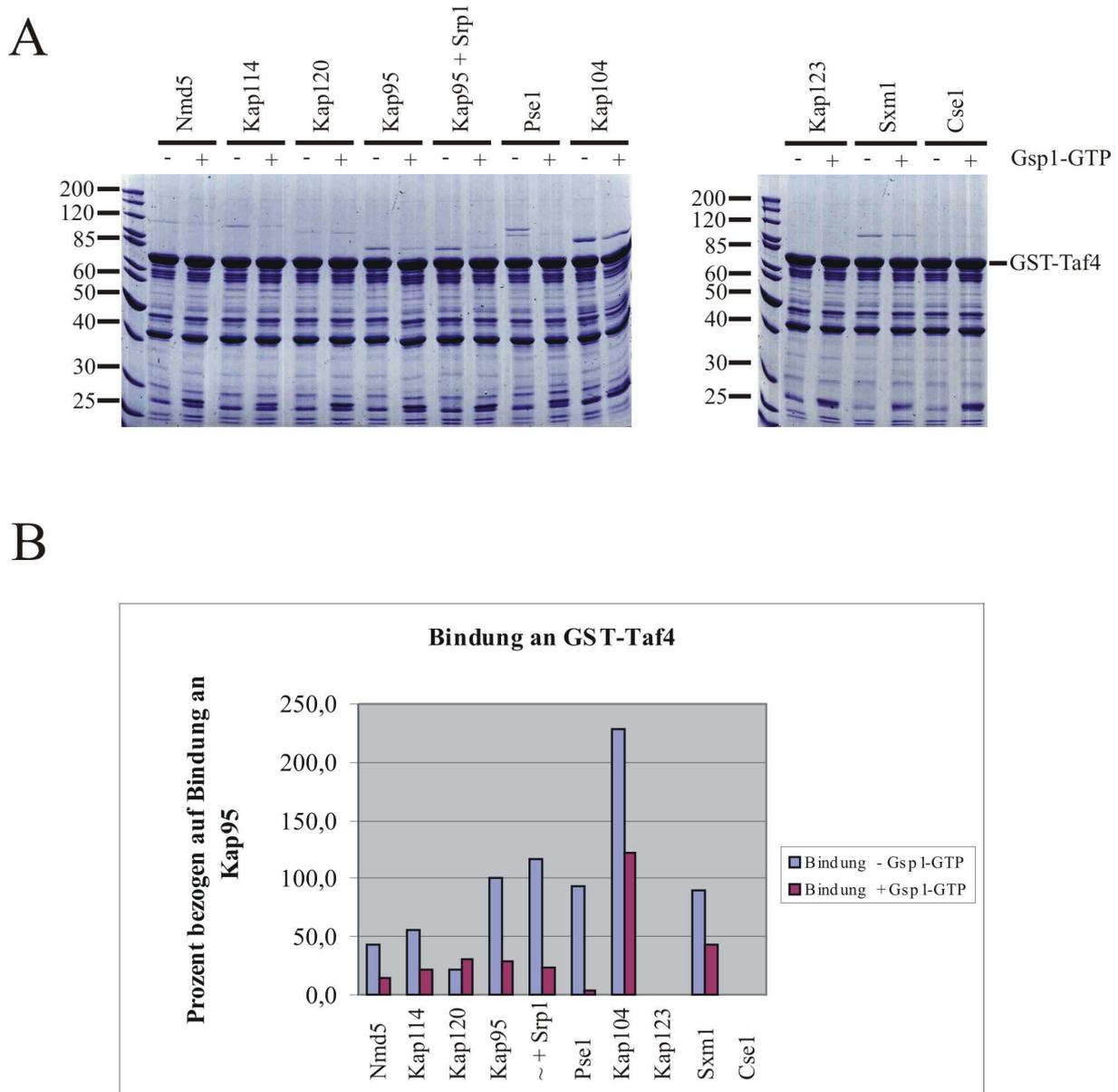


Abb. 34: Die Komplex-Bildung von Taf4 mit Importinen

(A) Die Transportfaktoren wurden in *E. coli* hergestellt und im Anschluss gereinigt. GST-Taf4 wurde in *E. coli* Rosetta Star synthetisiert. Das erhaltene Gesamtzelllysat wurde für 1 h bei 4°C mit GSH-Sepharose inkubiert, um so das Fusionsprotein an die Matrix zu binden. Nachdem die Ansätze 3 x mit PBSKMT gewaschen worden waren, wurden jeweils 12 µg der Transportfaktoren zugegeben und wieder für 1 h bei 4°C inkubiert. Parallel dazu wurde pro Transportrezeptor ein Ansatz mit zusätzlich 22,5 µg in *E. coli* synthetisiertem und gereinigtem His₆-Gsp1Q71L-GTP gemischt und wie oben beschrieben inkubiert. Es wurde 3 x gewaschen, die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE sowie Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert. (B) Die Intensität der Proteinbanden der Coomassie Brilliant Blau-gefärbten SDS-Gele wurde mit Hilfe der ImageQuant TL v 2003.03-Software quantifiziert und als Histogramm dargestellt. Dabei wurde die Bindung von Kap95 100% gesetzt und die Bindung der übrigen Transportrezeptoren darauf abgeglichen.

Tabelle 19: Quantifizierung der Bindung von Taf4 an Importin β -Homologe und der Verdrängung durch Gsp1-GTP

Mit Hilfe der ImageQuant TL v 2003.03-Software wurden die Proteinnengen der mit Taf4 interagierenden Transportrezeptoren auf dem in Abb. 34 gezeigten SDS-Gel bestimmt und in Prozentangaben umgewandelt. Der Wert für Kap95 wurde 100% gesetzt und die übrigen - sowohl die Bindung - Gsp1-GTP als auch die Bindung + Gsp1-GTP - wurden darauf abgestimmt (= Intensität der Bande bezogen auf die Intensität der Bande bei Kap95 ohne Zugabe von Gsp1Q71L-GTP). Die Ablösung meint den prozentualen Anteil der Differenz aus Bindung - Gsp1-GTP und Bindung + Gsp1-GTP bezogen auf die Bindung des Importins und errechnet sich aus der Formel: $100 - (\text{Bindung} + \text{Gsp1-GTP} [\%]) \times 100 / \text{Bindung} - \text{Gsp1-GTP} [\%]$.

Importin	Bindung - Gsp1-GTP [%]	Bindung + Gsp1-GTP [%]	Ablösung [%]
Nmd5	43	14	67
Kap114	56	21	62
Kap120	22	30	-38
Kap95	100	30	70
Kap95 + Srp1	117	23	80
Pse1	93	4	95
Kap104	228	123	46
Kap123	0	0	0
Sxm1	90	42	53
Cse1	0	0	0

- **Die Bindung von GST-Imp4 an verschiedene Importine**

Die Interaktion des nukleären und nukleolären Imp4, welches in die rRNA-Prozessierung involviert ist (Lee und Baserga, 1999), mit Kap114 wurde mit isolierten rekombinanten Proteinen verifiziert. Gleichzeitig wurde die Bindung zu einigen anderen Importin β -Homologen überprüft. GST-Imp4 wurde in *E. coli* hergestellt und aus den lysierten Zellen ein Komplettlysate gewonnen. Das Fusionsprotein wurde an GSH-Sepharose gebunden und mit den Importrezeptoren inkubiert. Zu einem gleichen Ansatz wurde jeweils His₆-Gsp1Q71L-GTP gegeben. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt (Abb. 35). Die Intensität der Bandenfärbung wurde mittels der ImageQuant TL v 2003.03-Software ermittelt und in Prozentangaben umgerechnet. Die Menge an interagierendem Kap95 wurde 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf abgeglichen. Cse1 als Negativkontrolle und Pse1 besaßen keine Affinität zu Imp4. Kap123 und Kap120 zeigten mit 9 und 25% nur eine geringe Wechselwirkung. Nmd5 und Sxm1 zeigten mit 79 bzw. 87% Bindung eine vergleichbar starke Bindung zu Imp4, ebenso wie Kap104, Kap114 und Kap95 mit jeweils 100% Bindung. Die Bindung von Kap95 wurde durch Zugabe von Srp1 jedoch nur unbedeutend erhöht (127%). Durch die Verdrängung mit Gsp1-GTP wurden die Werte der Bindung um 40 bis zu 100% reduziert.

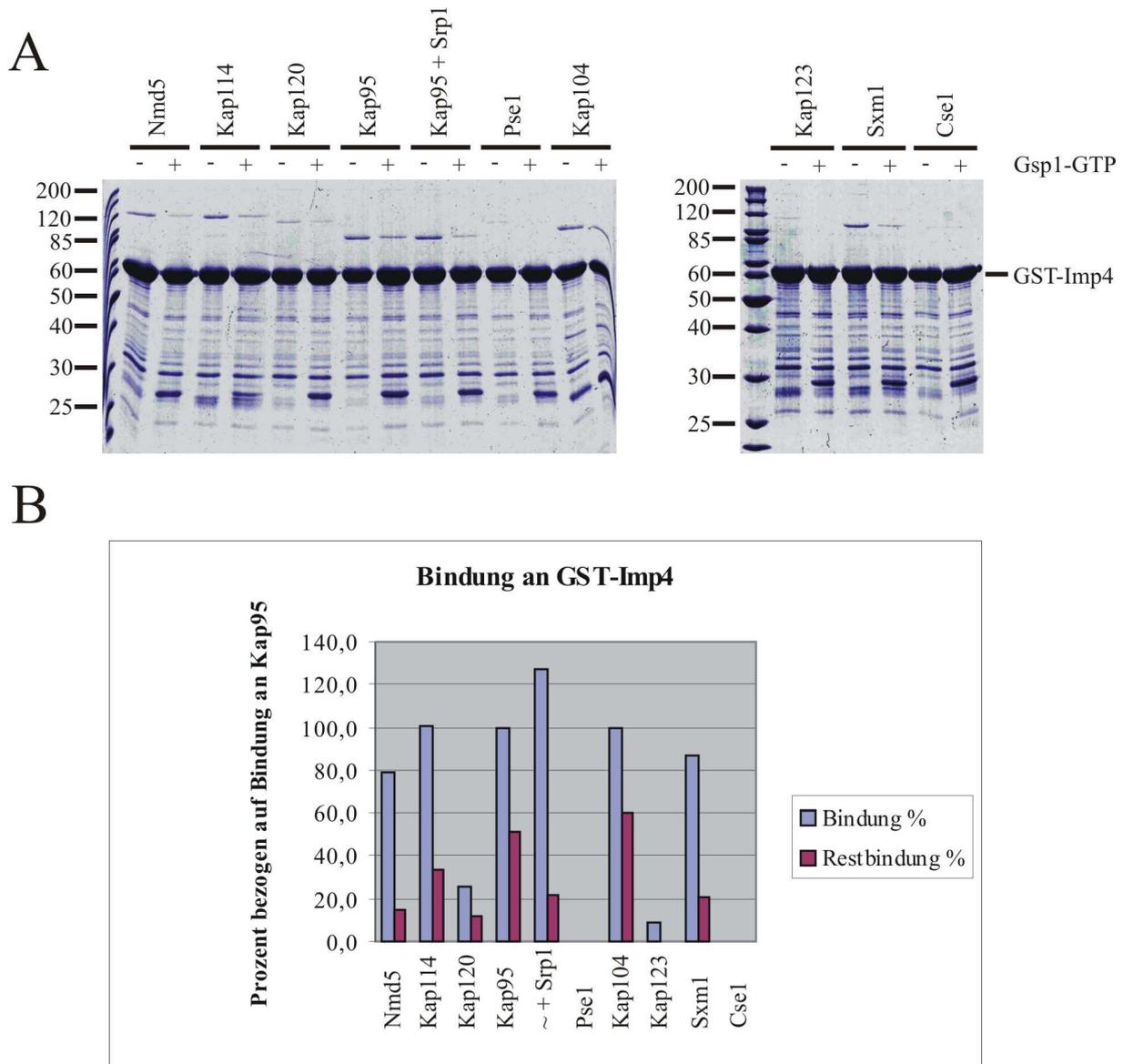


Abb. 35: In vitro-Bindung von Imp4 an verschiedene Importine

(A) Die verwendeten Importrezeptoren wurden in *E. coli* hergestellt und gereinigt. GST-Imp4 wurde in *E. coli* Rosetta Star synthetisiert. Das daraus gewonnene Gesamtzelllysate wurde für 1 h bei 4°C mit GSH-Sepharose inkubiert und so das Fusionsprotein gebunden. Die Ansätze wurden dreimal mit PBSKMT gewaschen, anschließend wurden jeweils 12 µg der Transportfaktoren zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Parallel dazu wurde pro Transportrezeptor der gleiche Ansatz mit zusätzlich 22,5 µg in *E. coli* synthetisiertem und gereinigtem His₆-Gsp1Q71L-GTP gemischt. Die Ansätze wurden gewaschen und die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert. Durch SDS-PAGE gefolgt von einer Färbung mit Coomassie Brilliant Blau wurden sie analysiert. (B) Die Intensität der Proteinbanden der Coomassie Brilliant Blau-gefärbten SDS-Gele wurde mit Hilfe der ImageQuant TL v 2003.03-Software bestimmt und in einem Histogramm dargestellt. Die Bindung von Kap95 wurde 100% gesetzt und die Bindungen der übrigen Importine darauf abgeglichen.

Das ist ein Indiz dafür, dass wahrscheinlich kein klassischer NLS-Protein-Transport stattfindet, da die Bindung von Kap95 durch Srp1 nicht in erwähnenswertem Maße erhöht wird. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Imp4 zu gleichen Teilen von Nmd5, Kap114, Kap95 allein, Kap104 und Sxm1 importiert werden könnte. Die Bindung an Kap120

und Kap123 ist vernachlässigbar, so dass diese Rezeptoren vermutlich keine oder nur Nebenwege untergeordneter Bedeutung für den Imp4-Import in den Zellkern darstellen.

Tabelle 20: Quantifizierung der Bindung von Imp4 an Importrezeptoren und der Verdrängung durch Gsp1-GTP

Mit Hilfe der ImageQuant TL v 2003.03-Software wurden die Proteinmengen der mit Imp4 wechselwirkenden Transportrezeptoren auf dem in Abb. 35 dargestellten SDS-Gel quantifiziert und in Prozentangaben umgeformt. Der Wert für Kap95 wurde 100% gesetzt und die übrigen - sowohl die Bindung - Gsp1-GTP als auch die Bindung + Gsp1-GTP - wurden darauf abgestimmt (= Intensität der Bande bezogen auf die Intensität der Bande bei Kap95 ohne Zugabe von Gsp1Q71L-GTP). Die Ablösung meint den prozentualen Anteil der Differenz aus Bindung - Gsp1-GTP und Bindung + Gsp1-GTP bezogen auf die Bindung des Importins und errechnet sich aus der Formel: $100 - (\text{Bindung} + \text{Gsp1-GTP} [\%] \times 100 / \text{Bindung} - \text{Gsp1-GTP} [\%])$.

Importin	Bindung - Gsp1-GTP [%]	Bindung + Gsp1-GTP [%]	Ablösung [%]
Nmd5	79	15	81
Kap114	100	33	67
Kap120	25	11	55
Kap95	100	51	49
Kap95 + Srp1	127	22	83
Pse1	0	0	0
Kap104	100	60	40
Kap123	9	0	100
Sxm1	87	21	76
Cse1	0	0	0

• **Die Bindung von GST-Rfc2 an verschiedene Importine**

Die Replikationsfaktor C-Untereinheit Rfc2 (Yao *et al.*, 2003) wurde auf ihre Bindung zu Importrezeptoren hin untersucht. Das GST-Fusionsprotein wurde in *E. coli* synthetisiert und aus den aufgeschlossenen Zellen ein Gesamtzelllysat hergestellt. GST-Rfc2 wurde an GSH-Sepharose gebunden und im Anschluss mit verschiedenen Importinen inkubiert. Zu einem entsprechenden Ansatz wurde außerdem His₆-Gsp1Q71L-GTP zugegeben. Die Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (Abb. 36A). Kap123 und die Negativkontrolle Cse1 zeigten keine Affinität. Bei Nmd5, Kap114, Kap120, Pse1 und Sxm1 sieht man im SDS-Gel jeweils eine schwache Bindung. Eine schon deutlichere Wechselwirkung ist bei Kap104 und Kap95 allein erkennbar. Fügt man jedoch zu Kap95 noch Srp1 hinzu, wird die Bindung erheblich gesteigert. Die Intensität der Bandenfärbung wurde quantifiziert (Abb. 36B und Tabelle 21). Bezogen auf die Stärke der Bindung von Kap95 zeigten Nmd5, Kap114, Kap120, Pse1 und Sxm1 mit jeweils ca. 20% Bindung wie bereits erwähnt sehr ähnliche Interaktionen mit Rfc2. Auch Kap104 und Kap95 zeigten mit 95 bzw. 100% Bindung annähernd gleiche Affinitäten zum Ziel-Protein. Durch die Zugabe von Srp1 zu Kap95 erhöhte sich seine Bindung an Rfc2 annähernd um den Faktor

7 auf 669%. Was die Verdrängung durch Gsp1-GTP anbelangt, so kann man sagen, dass bis auf Kap120 mit 9%, Kap104 mit 16% und Sxm1 mit 15% die übrigen Importrezeptoren recht stark durch die Interaktion mit Gsp1-GTP vom GST-Fusionsprotein abgelöst wurden (zwischen 50 und 92% Verdrängung).

Die starke Erhöhung der Wechselwirkung von Kap95 zu Rfc2 durch Srp1 weist auf einen klassischen NLS-Transport hin. Dabei stimulieren Srp1 und Kap95 gegenseitig ihre Affinität zum Substrat durch Bildung eines stabilen trimeren Komplexes. Dieser wird durch Bindung von Gsp1-GTP an Kap95 wieder aufgelöst. Der Sachverhalt wurde im Falle von Rfc2 näher beleuchtet. Dazu wurde ähnlich vorgegangen wie zuvor. GST-Rfc2 aus *E. coli*-Lysat wurde an GSH-Sepharose gebunden. Danach wurde mit Srp1 und Kap95 jeweils alleine und gemeinsam inkubiert. Durch Zugabe von His₆-Gsp1Q71L-GTP sollte der ternäre Komplex wieder disassemblieren. Für die gleiche Dauer wurde der Dreifach-Komplex lediglich mit Puffer inkubiert, um dessen Stabilität zu kontrollieren. Mit den Proben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die Proteine entweder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau oder Immunoblotting detektiert (Abb. 36C). Man sieht- im Falle von Srp1 nur in der Immunoblot-Analyse, da sich GST-Rfc2 mit ca. 66 kDa und Srp1 mit ca. 61 kDa im SDS-Gel überlagerten-, dass Srp1 und Kap95 unabhängig voneinander in der Lage waren, an Rfc2 zu binden. Beide erhöhten gegenseitig ihre Affinität zum Ziel-Protein und es bildete sich ein stabiler trimerer Komplex, der auch eine erneute Inkubation mit Puffer überdauerte. Erst das Hinzufügen von Gsp1-GTP löste den Komplex wieder auf. Das könnte bedeuten, dass Rfc2 wahrscheinlich über den klassischen NLS-Protein-Transportweg in den Nukleus importiert wird. Die Interaktionen mit den übrigen Transportrezeptoren sind vernachlässigbar gering und stellen daher vermutlich höchstens Nebenwege des nukleären Rfc2-Imports dar.

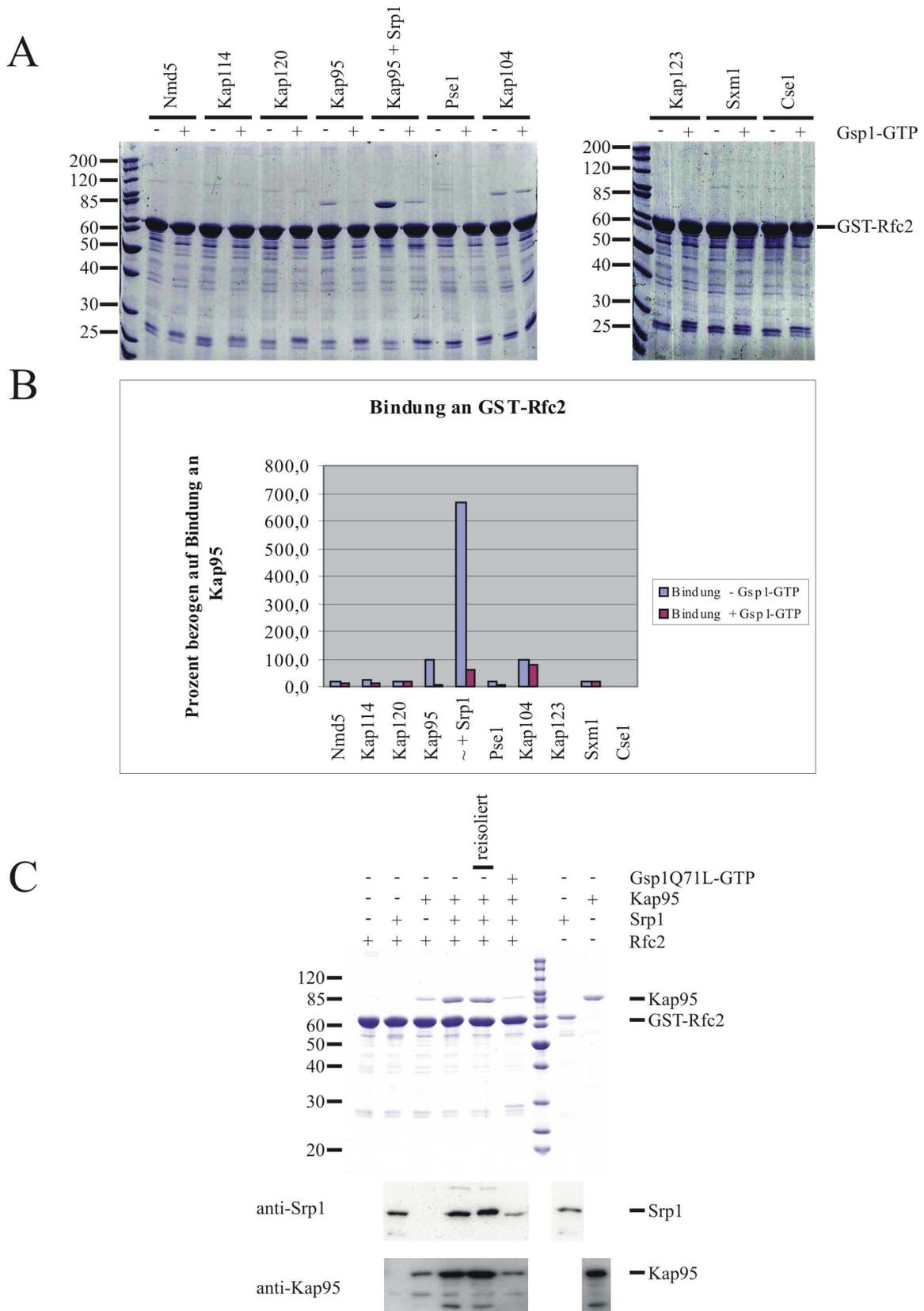


Abb. 36: Die Bindung von Rfc2 an verschiedene Importine und die Verdrängung durch Gsp1-GTP

(A) Die verwendeten Transportfaktoren wurden in *E. coli* synthetisiert und nachfolgend gereinigt. GST-Rfc2 wurde in *E. coli* Rosetta Star hergestellt und daraus ein Gesamtzelllysat gefertigt. Dieses wurde für 1 h bei 4°C mit GSH-Sepharose inkubiert und das Fusionsprotein an das Säulenmaterial gebunden. Nachdem die Ansätze mit PBSKMT gewaschen worden waren, wurden jeweils 12 µg der Transportfaktoren zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Gleichzeitig wurde pro Transportrezeptor ein zweiter Ansatz mit zusätzlichen 22,5 µg gereinigtem His₆-Gsp1Q71L-GTP aus *E. coli* gemischt und wie oben inkubiert. Die Ansätze wurden 3 x gewaschen, die

gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert. (B) Die Intensität der Proteinbanden der Coomassie Brilliant Blau-gefärbten SDS-Gele wurde mit Hilfe der ImageQuant TL v 2003.03-Software quantifiziert und als Histogramm dargestellt. Dabei wurde die Bindung von Kap95 100% gesetzt und die Bindung der übrigen Transportrezeptoren darauf abgeglichen. (C) Es wurden die gleichen Proteine wie unter (A) benutzt und GST-Rfc2 erneut wie oben beschrieben gebunden. Nach dem dreimaligen Waschen der Ansätze wurden 12 µg Kap95 oder Srp1 bzw. beides (in letztem Fall gab es drei Ansätze) zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Es wurde erneut 3 x gewaschen und von allen Ansätzen Proben entnommen. Die übrigen zwei Ansätze mit beiden Transportfaktoren wurden erneut inkubiert, allerdings bei Raumtemperatur für 30 min. Zu der einen Probe war zuvor lediglich PBSKMT hinzugefügt worden (reisoliert), die andere enthielt zusätzlich noch 22,5 g His₆-Gsp1Q71L-GTP. Die Ansätze wurden 3 x gewaschen und die gebundenen Proteine in SDS-Probenpuffer eluiert, um dann einer Immunoblot-Analyse mit Antikörpern gegen Srp1 (1:5000) und Kap95 (1:300) sowie anti-Kaninchen-Sekundäntikörper (1:1000) unterzogen zu werden.

Tabelle 21: Quantifizierung der Bindung von Rfc2 an verschiedene Importine und der Verdrängung durch Gsp1-GTP

Mittels der ImageQuant TL v 2003.03-Software wurden die Proteinmengen der an Rfc2 gebundenen Transportrezeptoren auf dem in Abb. 36 gezeigten SDS-Gel bestimmt und in Prozentangaben umgerechnet. Der Wert für Kap95 wurde 100% gesetzt und die übrigen - sowohl die Bindung - Gsp1-GTP als auch die Bindung + Gsp1-GTP - wurden darauf abgestimmt (= Intensität der Bande bezogen auf die Intensität der Bande bei Kap95 ohne Zugabe von Gsp1Q71L-GTP). Die Ablösung meint den prozentualen Anteil der Differenz aus Bindung - Gsp1-GTP und Bindung + Gsp1-GTP bezogen auf die Bindung des Importins und errechnet sich aus der Formel: $100 - (\text{Bindung} + \text{Gsp1-GTP} [\%] \times 100 / \text{Bindung} - \text{Gsp1-GTP} [\%])$.

Importin	Bindung - Gsp1-GTP [%]	Bindung + Gsp1-GTP [%]	Ablösung [%]
Nmd5	20	10	50
Kap114	26	13	50
Kap120	19	17	9
Kap95	100	8	92
Kap95 + Srp1	669	62	91
Pse1	20	5	73
Kap104	95	80	16
Kap123	0	0	0
Sxm1	19	16	15
Cse1	0	0	0

Der Einfluss von Srp1, Kap95 und Nup2 auf die Lokalisierung von Rfc2 sowie Sub2 *in vivo*

Beim klassischen NLS-Protein-Transport bildet sich ein trimerer Komplex aus dem Substrat, dem Importrezeptor Kap95 sowie dem Adaptermolekül Srp1, welches die Bindung zwischen beiden vermittelt (Pemberton und Paschal, 2005). Wenn der Komplex den NPC passiert hat, wird das Substrat freigesetzt, indem das Nukleoporin Nup2 an das Heterodimer Kap95/Srp1 bindet. Durch Interaktion mit Gsp1-GTP wird wiederum Kap95 von Srp1 abgelöst (Solsbacher *et al.*, 2000). Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Interaktionen von Rfc2 bzw. Sub2 zu Kap95 und Srp1 *in vitro* wurde vermutet, dass diese beiden Proteine eventuell eine klassische Kernlokalisierungssequenz besitzen. Um zu überprüfen, ob die beiden Proteine über den cNLS-Transport in den Nukleus importiert werden, wurden

Lokalisierungsstudien in *kap95*-, *srp1*- und *nup2*-Mutanten durchgeführt, welche einen Defekt in Bezug auf den NLS-Protein-Import haben. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die Lokalisierung eines Reporterproteins mit der NLS des SV40 T-Antigens untersucht (Hahn-Quintes, 2004; Kalderon *et al.*, 1984). Hefewildtypzellen und die temperatursensitiven Hefestämme GSY202 (*srp1-31*), GSY203 (*srp1-49*), GSY664 (*srp1-54*), GSY432 ($\Delta nup2$) und die *kap95*-Mutante GSY468 (*rsl1-1*) wurden mit den Plasmiden YCpGAL-NLS-GST-GFP, YCpGAL-GFP-RFC2 und YCpGAL-GFP-SUB2 transformiert. Mit Ausnahme des zuletzt genannten besitzen die Hefestämme eine genomische Mutation im *SRP1*- bzw. *KAP95*-Gen (Koepp *et al.*, 1996; Yano *et al.*, 1994), wohingegen *NUP2* in GSY432 komplett deletiert wurde (Loeb *et al.*, 1993). Die transformierten Stämme wurden bei 25°C zunächst in Selektivmedium mit Glukose, dann im gleichen Medium mit Raffinose solange inkubiert, bis die logarithmische Wachstumsphase erreicht war. Mit Galaktose wurde dann die Synthese GFP-Fusionsproteins induziert und die Zellen für weitere 2 h kultiviert. Um den Mutantenphänotyp zu induzieren, wurden die Zellen von 25°C (permissive Temperatur) auf 37°C (restriktive Temperatur) “geschiftet“ und erneut für 90 min inkubiert. Abb. 37 zeigt die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine in den verschiedenen Stämmen. Die Lokalisierung der Kontrolle SV40 NLS-GST-GFP entspricht weitestgehend den Literaturdaten (Hahn-Quintes, 2004). Im Wildtyp-Hefestamm war das Protein absolut kernständig. Die größte Misslokalisierung zeigte sich in der *srp1-31*-Mutante, das NLS-Protein befand sich vollständig im Cytoplasma. Die geringste, aber dennoch deutliche Misslokalisierung war im *srp1-49*-Stamm erkennbar. Das Ausmaß der Misslokalisierungen in den übrigen drei Stämmen lag dazwischen. Das bedeutet also, dass die ausgewählten Stämme und die Versuchsbedingungen geeignet waren, den Import von GFP-Sub2 und -Rfc2 zu untersuchen. Sub2 zeigte jedoch in keinem der Hefestämme eine Misslokalisierung, sondern war in allen Fällen weiterhin kernständig. Kombiniert mit den *in vitro*-Daten bedeutet das, dass Sub2 vermutlich nicht über den klassischen NLS-Import-Weg in den Zellkern transportiert wird. Ein Transport durch Kap95 kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise kompensieren andere Importine den eventuellen Import-Defekt in der *kap95*-Mutante.

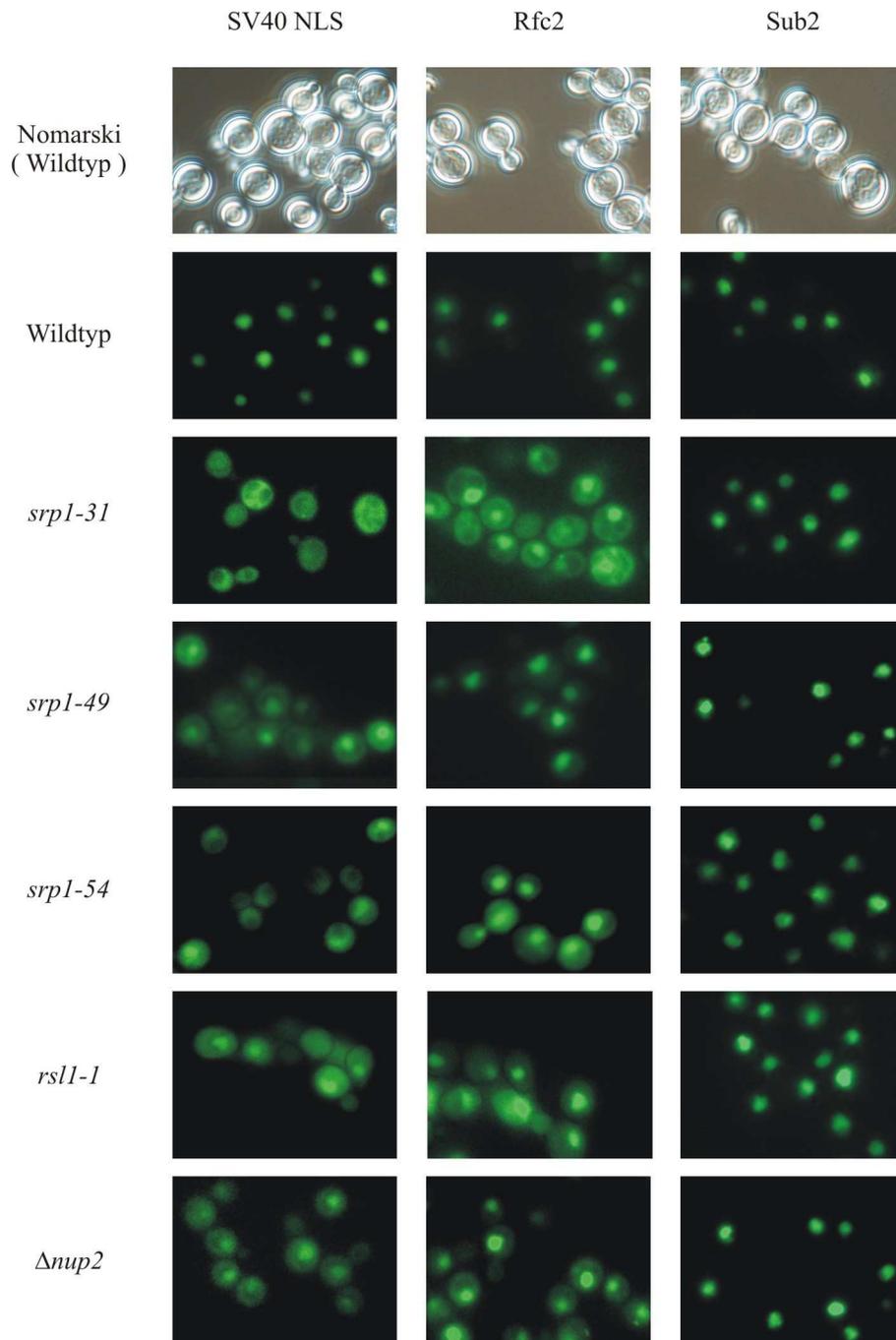


Abb. 37: Srp1, Kap95 und Nup2 sind am Import von Rfc2 in den Zellkern beteiligt

Wildtypzellen (GSY171) und Zellen der Hefestämme GSY202 (*srp1-31*), GSY203 (*srp1-49*), GSY664 (*srp1-54*), GSY468 (*rsl1-1*) und GSY432 ($\Delta nup2$) wurden mit den Plasmiden YCpGAL-NLS-GST-GFP (pGS422) als Kontrolle sowie YCpGAL-GFP-RFC2 (pGS1768) und YCpGAL-GFP-SUB2 (pGS1769) transformiert. Die Zellen wurden in Selektivmedium mit 2% Glukose kultiviert, im gleichen Medium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Expression der GFP-Fusionsproteine durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 2 h bei 25°C und anschließend für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Daneben wurden die Zellen mit der Nomarski-Optik betrachtet.

Bei Rfc2 wurden ähnliche Ergebnisse wie bei der SV40 NLS erhalten. Am schwächsten war die Misslokalisierung bei *srp1-49*, wo neben einer schwachen cytoplasmatischen Lokalisation

hauptsächlich ein recht starkes nukleäres Signal zu sehen war. Das cytoplasmatische Signal wurde vom $\Delta nup2$ - über den *rs11-1*- bis hin zum *srp1-54*-Stamm immer stärker und war schließlich in der *srp1-31*-Mutante am größten. Hier zeigte sich die Misslokalisierung sehr deutlich, auch wenn immer noch ein Kernsignal sichtbar war. Das bedeutet also, dass die *in vitro*-Daten der Bindungsstudien durch die *in vivo*-Ergebnisse der Lokalisierungsstudien bestätigt werden: die Mutationen bzw. Deletionen der drei am klassischen NLS-Protein-Import beteiligten Transportfaktoren Kap95, Srp1 und Nup2 führen in jedem Fall zu Misslokalisierungen. Dadurch wird untermauert, dass Rfc2 durch diesen Transportweg in den Zellkern geschleust wird.

Identifizierung der NLS von Rfc2

Über eine Sequenzanalyse wurde innerhalb der ersten 20 Aminosäurereste am N-Terminus von Rfc2 eine potenzielle Kernlokalisierungssequenz in Form von 4 aufeinander folgenden basischen Aminosäuren ermittelt (Abb. 38). Um ihre Funktionalität zu überprüfen, wurde zum einen eine N-terminale Deletion von Rfc2 hergestellt, der die ersten 15 Aminosäurereste fehlen. Dadurch wurde die potenzielle NLS entfernt. Zum anderen wurden die ersten 31 Aminosäurereste des N-Terminus untersucht (Abb. 38).

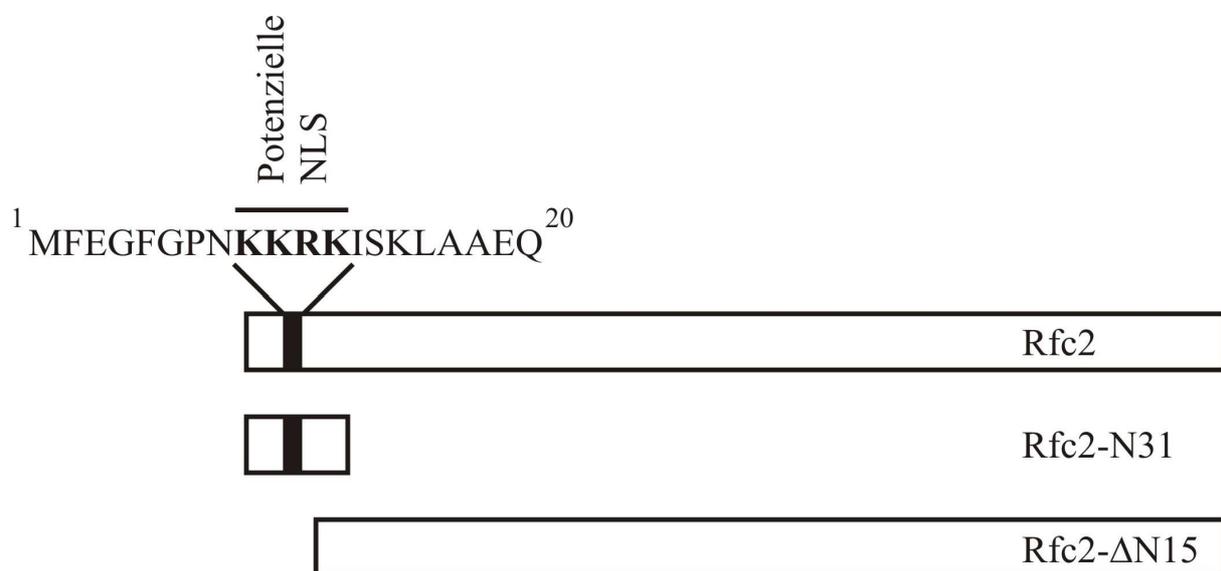
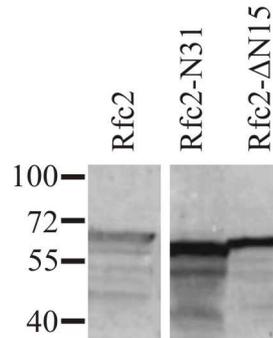


Abb. 38: Deletionen von Rfc2

Schematische Darstellung der Deletionen von Rfc2. Die potenzielle Kernlokalisierungssequenz (NLS) wird durch einen schwarzen Balken symbolisiert. Zusätzlich sind die ersten 20 Aminosäurereste des N-Terminus von Rfc2 im Einbuchstabencode angegeben (die basischen Aminosäurereste der potenziellen NLS sind in fettgedruckten Buchstaben aufgeführt).

Es wurden Plasmide mit einer bzw. zwei *GFP*-Gen-Kassetten kloniert, die für das jeweilige GFP-Fusionsprotein kodieren. Diese Plasmide sowie *YCpGAL-GFP-RFC2* wurde in Hefewildtypzellen transformiert. Die Synthese der GFP-Fusionsproteine erfolgte nach Galaktose-Induktion.

A



B

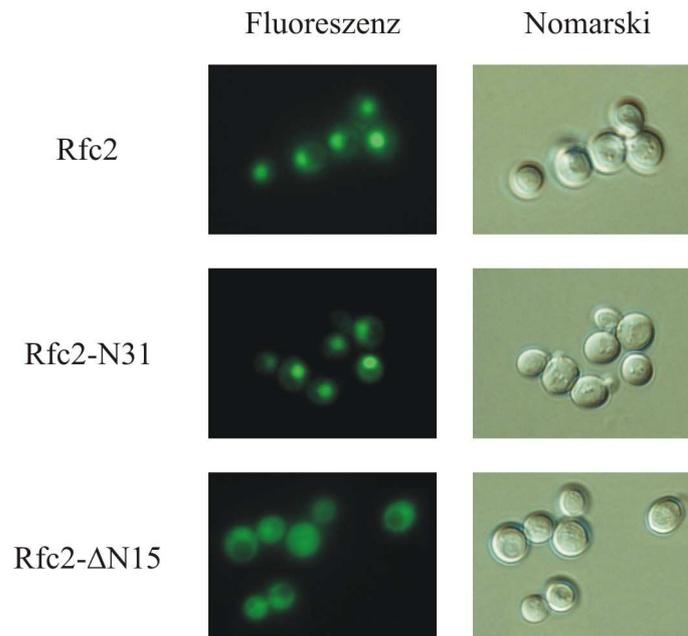


Abb. 39: Der N-Terminus von Rfc2 vermittelt dessen Import in den Nukleus

(A) Wildtypzellen (GSY171) wurden mit den Plasmiden *YCpGAL-GFP-RFC2* (pGS1768), *YCpGAL-GFP-RFC2-N31* (pGS1803) und *YCpGAL-GFP-RFC2-ΔN15* (pGS1804) transformiert. Aus den Zellen wurde mittels TCA-Fällung Gesamtzelllysate hergestellt. Diese wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und die GFP-Fusionsproteine mit einem GFP-spezifischen Antikörper (1:1000) sowie anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:1000) detektiert. (B) Die unter (A) beschriebenen Zellen wurden in Selektivmedium mit 2% Glukose kultiviert, im gleichen Medium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Expression der GFP-Fusionsproteine durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Daneben wurden die Zellen mit der Nomarski-Optik betrachtet.

In Abb. 39A ist eine Immunoblotanalyse der untersuchten Hefezellen gezeigt. Mittels TCA-Fällung wurden aus diesen Zellen Gesamtzelllysate gewonnen. Die Detektion erfolgte mit GFP-spezifischen Antikörpern. Die synthetisierten GFP-Fusionsproteine von Rfc2, Rfc2-N31 und Rfc2- Δ N15 besaßen die berechnete molare Masse.

In Abb. 39B ist die Lokalisierung von GFP-Rfc2, GFP-GFP-Rfc2-N31 und GFP-Rfc2- Δ N15 dargestellt. GFP-GFP-Rfc2-N31 war wie GFP-Rfc2 hauptsächlich im Zellkern zu finden. Die ersten 31 Aminosäurereste sind also ausreichend, damit das Protein in den Nukleus importiert wird. Werden die ersten 15 Aminosäurereste jedoch entfernt, verbleibt das Protein fast vollständig im Cytoplasma und der Import ist gestört. D. h. also, die ersten 15 Aminosäurereste sind notwendig für den Transport. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass es sich bei der vorhergesagten NLS um eine klassische Kernlokalisierungssequenz handelt.

4. Diskussion

4.1. Beurteilung der Qualität der Präparation der cytosolischen, unlöslichen und der Kernlysatfraktion

Die Herstellung von Lysaten und die Fraktionierung in die einzelnen Kompartimente der Zelle findet oft auf vergleichbaren Wegen statt (Rout und Blobel, 1993; Rout und Field, 2001; Rout und Kilmartin, 1990; Strambio-de-Castillia *et al.*, 1995; www.fhere.org/science/labs/hahn/methods/methods_index.html (Protokoll nach S. Hahn); www.mc.vanderbilt.edu/vumcdept/cellbio/wentelab/protocols/yeast_nuclei_prep.html (Protokoll nach S. Wente); www.plaza.ufl.edu/johnaris/Protocols/Yeast/YeastNuclei.pdf (Protokoll nach J. Aris)). Zunächst werden die jeweiligen Zellen bis zu einer vorgegebenen optischen Dichte kultiviert. In dieser Arbeit wurde anfänglich mit einer OD₆₀₀ von 0,3 - 1 gearbeitet (vgl. z. B. Protokoll nach J. Aris), später zeigte sich, dass sich auch eine OD₆₀₀ von 2 - 3 für die Zellpräparation eignete, womit die Materialausbeute erhöht wurde (vgl. auch Protokoll nach S. Hahn). Anschließend wurde die Hefezellwand mit einem geeigneten Enzym verdaut und entfernt, wobei sich herausstellte, dass eine Kombination der drei Enzyme Zymolyase, Mutanase und Glusulase (Protokoll nach S. Wente) für diesen Schritt nicht erforderlich war, sondern ein einzelnes Enzym (Zymolyase) ausreichte. Auch wenn dieser Schritt geändert wurde, in der Hauptsache entstammt die Vorgehensweise zur Präparation von Cytosol und Zelllysat dem Protokoll von Susan Wente. Die nachfolgende Zelllyse (Aufbrechen der Cytoplasmamembran) kann auf unterschiedliche Weisen erfolgen: mechanisch mit elektrischen Handhomogenisatoren (Rout und Kilmartin, 1990) sowie Potter-Elvehjem-Homogenisatoren (Protokoll nach J. Aris) oder chemisch-physikalisch mit Detergentien (Caesar, 2003). Frühere Experimente zeigten jedoch, dass Yrb1 durch eine Behandlung, bei der Tween 20 als Detergens eingesetzt wurde, verloren ging (Dr. Silvia Hahn-Quintes und Dr. Stefanie Caesar, persönliche Mitteilung), weshalb in dieser Arbeit auf die mechanische Lyse zurückgegriffen wurde.

Durch Zentrifugation wurde das Cytosol von der unlöslichen Zellfraktion abgetrennt. Zur Separation der Kerne wurde diese Fraktion auf ein Kissen von drei Schichten Sucrose/Polyvinylpyrrolidon- oder Ficoll-Lösung verschiedener Molarität gegeben. Während der anschließenden Zentrifugation wurden die Zellkerne von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt. Die Lyse der Nuklei erfolgte nach einer Methode zur Isolierung subnukleärer Kompartimente von *Trypanosoma brucei* (Rout und Field, 2001). Dabei werden die Kerne

durch Ultraschall aufgebrochen. Die Anwendung eines Detergens stellt eine zweite Möglichkeit dar (Rout und Kilmartin, 1990), war aber für die Zwecke dieser Arbeit wie oben bereits erwähnt ungeeignet. Die Zugabe von DNase I (Rout und Kilmartin, 1990; Strambio-de-Castilla *et al.*, 1995) verbesserte die experimentelle Handhabung des Kernlysats dahingehend, dass die freigesetzte DNA gespalten und damit deren zähflüssige Konsistenz aufgehoben wurde.

In Abb. 16 ist der Ablauf einer solchen Aufarbeitung in einer Westernblot-Analyse mit Yrb1, Rna1, Hta1 sowie Prp20 als Markerproteine gezeigt. In der SDS-PAGE-Analyse wiesen die intakten Zellen und das Zelllysats das gleiche Bandenmuster auf. Trotzdem war beim Lysat deutlich weniger Gesamtprotein vorhanden. Auf den Vorgang des Sphäroplastierens ist dies allerdings weniger zurückzuführen, da im Überstand nach dem Sphäroplastieren mit der Biorad-Methode (vgl. 2.8.5) bzw. durch SDS-PAGE kaum Protein nachgewiesen wurde. Die Verluste rührten vermutlich zum einen daher, dass durch die Viskosität der Zellsuspension ein Teil davon an Gefäßwänden und am Homogenisator hängen blieb, zum anderen durch die mechanische Beanspruchung bei der Lyse und die Aktivität von Proteasen Proteine abgebaut wurden. Degradation durch thermischen Stress kann ausgeschlossen werden, weil die Zellen nach dem Zellwandverdau ständig auf Eis gehalten wurden.

Eine auffällig starke Degradation gibt es bei Yrb1, einem Marker für das Cytosol. Dass es sich dabei um ein "empfindliches" Protein handelt wurde bereits erwähnt. Aber offensichtlich wirkte sich die mechanische Lyse weniger schädlich aus als die chemisch-physikalische. Der zweite cytosolische Marker Rna1 zeigte sich bis zur Zelllyse zunächst stabil und reduzierte sich lediglich wie der Gesamtproteingehalt auf ca. die Hälfte des Anfangswertes. Im Cytosol sollte die gesamte Menge an Rna1 wieder zu finden sein, jedoch halbierte sich der Wert nahezu. Möglicherweise wurde es von Proteasen abgebaut. In den übrigen die Kerne enthaltenden Fraktionen wurde es wie Yrb1 allerdings nicht detektiert. Das weist darauf hin, dass die Kontamination der Kernfraktion mit cytosolischen Komponenten gering bis nicht vorhanden war.

Als Marker für die Nuklei wurde das Histon Hta1 herangezogen. Dieses Protein kann nur eingeschränkt zur Überprüfung der Qualität der Zellaufarbeitung dienen. Hta1 liegt gebunden an DNA vor, so dass es bei der Abtrennung des Cytosols durch Zentrifugation in jedem Fall pelletiert. Auch in diesem Fall erkennt man, dass sich auf der Stufe des Zelllysats die Menge an Protein ungefähr halbierte und kein darüber hinausgehender Abbau des Histons stattgefunden hat. In der Cytosol-Fraktion wurde kein Hta1 nachgewiesen, was ein Indiz für ihre Reinheit ist. Auffällig ist jedoch der starke Abbau zwischen der Stufe des Zelllysats und

der unlöslichen Fraktion, der noch stärker ausgeprägt war als bei Rna1 und sich auf ca. 1/5 der Ursprungsmenge reduzierte. Auch hier lässt sich die Degradation auf Proteasen zurückführen, allerdings nur, wenn bereits an dieser Stelle Kerne lysiert und damit Histon freigesetzt worden war. Der erhöhte Proteingehalt der Kernfraktion im Vergleich zur unlöslichen Fraktion lässt sich vermutlich auf einen Pipettierfehler zurückführen, da es sich bei beiden um sehr hoch viskose Suspensionen handelte, die schlecht zu pipettieren waren. Aber zumindest scheint zwischen diesen beiden Stufen kein Abbau mehr stattgefunden zu haben, im Gegensatz zum Kernlysat selbst, wo sich der Proteingehalt stark reduziert hat. Als Gründe wären zum einen vorstellbar, dass die Ultraschallbehandlung dem Protein geschadet hat, zum anderen könnte die zugegebene DNase I, welche die DNA in Fragmente spaltet, die Histone für Proteasen besser zugänglich gemacht haben.

Bei dem löslichen Prp20 handelt es sich um den effektiveren nukleären Marker. Sein Abbau ging bis zur Zelllyse nicht über den sowieso schon vorhandenen hinaus. Allerdings wird bei der Separation von Cytosol und unlöslicher Fraktion ganz klar ersichtlich, dass das Cytosol verhältnismäßig stark mit Kernlysat kontaminiert war. Degradiert wurde das Protein an dieser Stelle jedoch nur wenig. Die Diskrepanz zwischen unlöslicher und Kernfraktion ist wieder auf einen Pipettierfehler zurückzuführen. Aber auch hier hat kein Abbau stattgefunden. Die Ultraschall-Behandlung zwecks Kernlyse hat dem Protein jedoch erheblich geschadet.

Zusammenfassend kann man also folgendes sagen: Die Kernfraktionen waren kaum bzw. nicht mit Cytosol kontaminiert, das Cytosol war merklich mit Kernlysat verunreinigt. Allerdings dürfte es schwierig sein, dieses Problem bei einer solch starken mechanischen Beanspruchung zu umgehen. Denn zum einen muss beim Zellwandverdau ein Kompromiss gefunden werden, wenn ein Teil der Zellen noch nicht ausreichend sphäroplastierte bzw. ein Teil schon "überverdaut" ist und schon von selbst lysiert, zum anderen werden bei der Lyse der Sphäroplasten durch mechanische Scherkräfte frühzeitig freigesetzte Kerne lysiert. Die große Bedeutung von gegenseitigen Kontaminationen liegt darin begründet, dass das cytosolische Protein Rna1 die GTPase-Aktivität von Gsp1 stimuliert und damit Exportkomplexe in der Kernfraktion dissoziieren würden. Bei Kontaminationen von Prp20 im Cytosol würde mit seiner Hilfe gebildetes Gsp1-GTP die Bildung von Importkomplexen verhindern. Dem kann man entgegenhalten, dass GTP vermutlich nur in der lebenden Zelle ausreichend zur Verfügung steht, so dass es eher unwahrscheinlich ist, dass Prp20 als Kontamination im Cytosol seiner Funktion, an Gsp1 gebundenes GDP gegen GTP auszutauschen, nachkommen kann. Folglich wären Importkomplexe trotzdem stabil. Die vorhandene Verunreinigung sollte sich also nicht allzu tiefgreifend auswirken. Gepaart mit

der kaum vorhandenen Kontamination des Kernlysats mit Cytosol war der Reinheitsgrad für diese Zwecke ausreichend.

Wenn man die Beanspruchung innerhalb der Aufarbeitung miteinander vergleichen möchte, so lässt sich sagen, dass sich die Lyse durch mechanische Scherkräfte für den Gesamtproteingehalt und die einzelnen Markerproteine wesentlich schlechter auswirkte als die Behandlung mit Ultraschall. Zu bedenken ist jedoch, dass der Aufschluss mit dem Homogenisator wesentlich länger dauerte und es auch mehr Verluste durch Anhaftung an Geräte und Gefäßwände gab. Die Degradation durch Ultraschall wirkte sich auf den Gesamtproteingehalt nicht wesentlich aus, es gab aber auch, wie bereits erläutert, Ausnahmen. Insgesamt bedeutet dies also, dass die in dieser Arbeit modifizierte Methode der Herstellung einer cytosolischen, unlöslichen und einer Kernlysatfraktion für die angestrebten Zwecke in Qualität, Ausbeute und Zeitaufwand zufriedenstellend war. In den nachfolgenden Kapiteln sollen nun die mit diesem Ausgangsmaterial erhaltenen Resultate erörtert werden.

4.2. Vergleich der experimentellen Methodik: “GST-Pulldown-Assay“, TAP-Bindungsversuche und Co-Reinigungsstudien mittels “TAP-Tag“

Die Vor- und Nachteile der in dieser Arbeit verwendeten Techniken sollen nachstehend erläutert werden. Es wurden folgende Methoden angewandt: im “GST-Pulldown-Assay“ wurde das Ausgangsprotein aus *E. coli* über einen “GST-Tag“ an eine Matrix gebunden und mit einer cytosolischen bzw. Kernlysat-Fraktion aus Hefe inkubiert (2.9.3). Bei der zweiten Technik wurden endogene Protein-Protein-Komplexe aus Hefe-Cytosol sowie -Kernlysat über einen “S-TEV-ZZ-Doppeltag“ zweifach gereinigt (TAP-Bindungsversuche; 2.9.5). In den Co-Reinigungsexperimenten wurden mit demselben “Tag“ Protein-Protein-Komplexe der cytosolischen und der unlöslichen Fraktion aus Hefe in einem einzigen Reinigungsschritt isoliert (2.9.6). Neben den in dieser Arbeit verwendeten “Tags“ existieren viele weitere wie FLAG, Strep oder das Calmodulin-bindende Peptid (CBP). Es ist nicht möglich zu sagen, welches der beste “Tag“ ist. Jeder hat Vor- und Nachteile, in Abhängigkeit von Kosten, Größe, Effizienz und Wirtssystem. Bei der Methode der Tandem-Affinitätsreinigung wird klassischerweise der “Protein A-Tag“ mit CBP und einer TEV-Protease-Spaltstelle kombiniert (Puig *et al.*, 2001), was sich als gute Vorgehensweise erwiesen hat. So identifizierten beispielsweise Gavin *et al.* in Hefe mit Hilfe dieses “Tags“ 232 Proteinkomplexe (Gavin *et al.*, 2002). In anderen Experimenten, bei denen der klassische “TAP-Tag“ durch Myc₉ und His₉ ersetzt wurde, erwies sich diese modifizierte Strategie als

die bessere (Graumann *et al.*, 2004). Für manche Proteine wurden mit diesem “Tag“ zusätzliche Interaktionspartner gefunden verglichen mit den Bindungsstudien von Ho *et al.*, bei denen ein einfacher Flag-Tag benutzt wurde (Ho *et al.*, 2002). In *Drosophila* zeigten sich FLAG und His als “TAP-Tag“ als besser geeignet als Protein A und CBP (Yang *et al.*, 2006). Im Säuger-System wurde die klassische Methode durch Einführung eines zusätzlichen Biotin-Restes optimiert (Drakas *et al.*, 2005). Auf der anderen Seite kann ein einfacher “Tag“ genauso gut funktionieren wie ein “TAP-Tag“. In einer Studie, bei der eine Calcium-abhängige Pflanzen-Proteinkinase isoliert wurde, zeigte sich der “Strep II-Tag“ als genauso effizient wie der “TAP-Tag“ (Witte *et al.*, 2004). Auch in dieser Arbeit hat sich die Komplexisolierung über nur einen “Tag“ (Co-Reinigungsexperimente) als geeigneter gegenüber der TAP-Methode (TAP-Bindungsversuche) erwiesen. Nachfolgend werden die Vor- und Nachteile der verwendeten Techniken unter verschiedenen Gesichtspunkten erörtert (Spezifität der Protein-Protein-Bindungen, Ausbeute, Optimierung der Versuchsbedingungen, Effizienz, natürliche Modifikationen der Ausgangsproteine).

Ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung von experimentellen Techniken ist die jeweilige Ausbeute, in diesem Fall die Anzahl physiologischer und damit spezifischer Protein-Protein-Komplexe, gegenüber der Menge an unnatürlichen Bindungen, also Artefakten. Eine Gefahr bei nicht spezifischen Wechselwirkungen besteht darin, dass diese Interaktionen mit wirklichen Bindungspartnern verhindern können, insbesondere, wenn letztere nur in geringer Zahl vorliegen. Ein Versuch, die unselektiven Bindungen zu umgehen, bestand darin, die cytosolische von der unlöslichen bzw. Kernlysat- Fraktion abzutrennen und so artifizielle Komplexe zu vermeiden. Grundsätzlich zeigte sich dieses Vorgehen nutzbringend, da Experimente mit den verschiedenen Fraktionen zum größten Teil jeweils zu unterschiedlichen Resultaten führten. Trotzdem über diesen Weg unnatürliche Komplexbildungen über die Grenzen der Kompartimentierungen der Zelle hinweg von vorneherein ausgeschlossen wurden, wurden dennoch z. B. bei den einfachen Co-Reinigungsexperimenten viele Proteine gefunden, von denen angenommen wird, dass es sich um unspezifisch interagierende handelt (vgl. 4.5). Besser sieht es diesbezüglich bei den TAP-Bindungsversuchen aus. Offensichtlich erhöht die doppelte Reinigung dieser TAP-Methode den Grad der “Reinheit“ zusätzlich. Desgleichen scheint es bei den “GST-Pulldown-Assays“ mit rekombinantem Ausgangsprotein und Inkubation mit Hefe-Cytosol bzw. -Kernlysat weniger unspezifische Interaktionen zu geben als bei der einfachen Co-Reinigung, jedoch wurden auch weniger potenzielle Bindungspartner entdeckt: mit GST-Yrb1 aus Kernlysat 21, aus Cytosol 4, bei GST-Cse1 entsprechend 3 und 4. Im Gegensatz dazu wurden 48 Proteine in Komplex mit Kap114 aus

der cytosolischen bzw. 56 aus der unlöslichen Fraktion sowie entsprechend 19 und 67 Proteine in Komplex mit Kap120 über die einfache Co-Reinigungsmethode nachgewiesen (Abb. 27 und Tabelle 15 - Tabelle 18; Liste der Proteine nicht vollständig). Für Cse1 wiederum wurde mit der zweifachen Reinigung (TAP-Bindungsversuche) aus Cytosol nur ein Protein gefunden (Abb. 24), für Yrb1 28 (Abb. 25 und Tabelle 14). Die Verwendung eines "Crosslinkers" in den TAP-Bindungsversuchen führte im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Rohila *et al.*, 2004) zu keinem Ergebnis. Mögliche Gründe für die schlechte Ausbeute der TAP-Bindungsversuche dieser Arbeit verglichen mit früheren Experimenten (Gavin *et al.*, 2002; Graumann *et al.*, 2004; Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999) sollen im Folgenden dargelegt werden. Vermutlich sind die für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine und den verwendeten "S-TEV-Z(Z)-Tag" notwendigen Bedingungen für einige Protein-Protein-Komplexe zu stringent, da beispielsweise auch der bekannte Interaktionspartner Xpo1 für Yrb1 (Maurer *et al.*, 2001) in den TAP-Bindungsversuchen nicht nachgewiesen wurde. Gepaart mit dem relativen großen Zeitaufwand und den massiven Verlusten an Ausgangsmaterial während der Experimente ist die Methode in diesem Zusammenhang als eher weniger effizient zu bezeichnen, zumal die benötigte Menge an TEV-Protease z. B. verglichen mit einer einfachen "Tag"-Abspaltung nach einer Proteinreinigung (TEV-Protease/Protein : 1/100 (m/m) (Greiner, 2001)) in den TAP-Bindungsversuchen sehr hoch war (TEV-Protease/Cse1 : 15/1 - 25/1 bzw. TEV-Protease/Yrb1 : 750/1 - 1100/1 (m/m)). Denkbar wäre in diesem Kontext möglicherweise auch eine Schädigung des Zielproteins durch diesen immensen Überschuss an Enzym. Eventuell führten daneben auch Proteasen zur Proteindegradation. Dazu kam noch, dass ein großer Teil des Zielproteins nicht mit dem Säulenmaterial interagiert und so zwangsläufig vor dem eigentlichen Bindungsversuch entfernt wurde. Das mag zum einen an den Versuchsbedingungen gelegen haben, zum anderen könnte auch die Kapazitäten des Säulenmaterials ausgeschöpft gewesen sein. Alles in allem bedeutet das, dass eine sehr hohe Menge Ausgangsmaterial benötigt wurde, um am Ende des Versuchs eine angemessene Menge des Zielproteins wieder finden zu können. Bezüglich der Versuchsbedingungen hatten die beiden anderen Techniken die Vorteile eindeutig auf ihrer Seite, allein schon weil kein proteolytisch wirkendes Enzym von außen zugegeben wurde, welches sein Wirkoptimum erst bei Raumtemperatur entfaltet. So war es möglich, die Temperatur bei der einfachen Co-Reinigung mittels "TAP-Tag" gleichmäßig auf 4°C zu halten. Gleichzeitig wurde die Inkubationszeit stark reduziert (TAP-Bindungsversuche: 1 h bei Raumtemperatur). Die TEV-Protease-Spaltung entfällt. Die

Versuchsbedingungen waren insgesamt vergleichsweise schonender. Ähnlich mild waren die Konditionen bei den "GST-Pulldown-Assays".

Ein Vorteil der TAP-Bindungsversuche gegenüber einfachen Bindungsexperimenten mit IgG-Sepharose kristallisierte sich aber auch in dieser Arbeit heraus. Vom Säulenmaterial abgelöstes IgG (leichte und schwere Kette), welches wirkliche Bindungspartner im SDS-Gel massiv überdecken kann, wird im zweiten Reinigungsschritt abgetrennt. Eine zweite Möglichkeit stellt dagegen eine Optimierung der Pufferbedingungen dar, so wie bei den Co-Reinigungsexperimenten geschehen. In diesem Fall waren die Analysenproben nur wenig kontaminiert.

Da sich die Methode der TAP-Bindungsversuche in dieser Arbeit als weniger brauchbar erwies, verlagerte man sich mehr auf die beiden übrigen Techniken. Eine Optimierungstrategie der einfachen Co-Reinigungsexperimente sowie der "GST-Pulldown-Assays" bestand im Austausch von PBSKMT durch W-Bindungspuffer. Diese Vorgehensweise führte bei beiden Methoden in allen Fällen zu einer Erhöhung der Ausbeute an potenziellen Interaktionspartnern. Aber nicht nur die Quantität, auch die Qualität der gefundenen Komplexe änderte sich. Das wird sehr deutlich im Vergleich zu früheren "Pulldown-Assays" mit GST-Yrb1, welches jedoch mit Hefe-Gesamtlysate inkubiert wurde (Maurer, 2001). Dabei wurde ebenfalls PBSKMT als Bindungspuffer benutzt. Erstaunlicherweise wurden außer Eno1/2 und Tef1 - deren Bindungen zum Zielprotein sind als unspezifisch einzuschätzen - keine Übereinstimmungen gefunden. Beispielsweise wurde in den früheren Studien - allerdings mit Yrb1-Fragmenten - eine *in vitro*-Interaktion zwischen Yrb1 und Prp20 sowie Sxm1 nachgewiesen, auf die es in dieser Arbeit keinerlei Hinweise gab. Möglicherweise waren die Bindungsstellen bei dem verkürzten Yrb1 besser zugänglich. In "GST-Pulldown-Assays" mit Kap120 und Gesamtlysate (Caesar, 2003) wurden wiederum mit PBSKMT nur zwei vermutlich unspezifische Interaktionspartner gefunden. Diese tauchten überhaupt nicht bei den Co-Reinigungen mit endogenem S-TEV-ZZ-Kap120 auf, wo die Ausbeuten wesentlich größer waren. Ähnlich sah der Fall bei Kap114 aus: in den "Pulldown-Assays" (Caesar, 2003) haben nur wenige Proteine gebunden und das spezifisch bindende Nap1 wurde nicht in den Co-Reinigungsexperimenten nachgewiesen.

An letzter Stelle sei ein nicht unerheblicher Faktor genannt, der Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht wenig beeinflusst. Es handelt sich dabei um natürliche Proteinmodifikationen durch den Organismus. Die geringere Ausbeute der "GST-Pulldown-Assays" mag damit zusammenhängen, dass es sich bei den Ausgangsproteinen um rekombinant in *E. coli* synthetisierte handelt, die nicht zwangsläufig so gefaltet und

modifiziert sein müssen wie die nativen aus *S. cerevisiae*. Nun können aber Sekundärstruktur und Modifikationen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Bindungen spielen, was ein Ausbleiben der Wechselwirkung zur Folge haben kann. Die möglichen Modifikationen sind jedoch bei allen Bindungsstudien, die mit Hilfe des "TAP-Tags" durchgeführt wurden, vorhanden, da mit den endogenen Hefeproteinen gearbeitet wurde. In Bezug auf Bindung spezifischer Interaktionspartner sind diese Experimente den "GST-Pulldown-Assays" also weit überlegen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass jede der drei in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Proteinbindung ihre Vor- und Nachteile hat. Der "GST-Pulldown-Assay" vereint den Vorzug einer ausreichend hohen Menge an Ausgangsprotein mit milden Versuchsbedingungen. Negativ können sich aber "falsche" Proteinfaltungen und fehlende Modifikationen auswirken. Bei der Methode der TAP-Bindungsversuche ist durch den doppelten Reinigungsschritt die Gefahr der unspezifischen Interaktionen im Vergleich zu anderen Techniken verringert. Allerdings zeigten sich die experimentellen Konditionen für einige Protein-Protein-Komplexe als zu stringent. Nachteilig wirkt sich auch der hohe Zeit- und Materialaufwand aus. Die Vorteile, die sich in anderen Systemen zeigten, waren in dieser Arbeit also eher gering. Die besten Ergebnisse lieferte hier die Co-Reinigung endogener Hefeproteine mittels "TAP-Tag". Diese Technik erwies sich als schnell bei der Beschaffung des Ausgangsmaterials und der Versuchsdurchführung, schonend bezüglich der experimentellen Bedingungen und effizient in Bezug auf die Ausbeute an potenziellen Bindungspartnern. Einziger Nachteil war eine vermutlich relative hohe Zahl an unspezifischen Interaktionen. Aufbauend auf dieser Methode wurden weitere Arbeiten durchgeführt, die zu aussagekräftigen Ergebnissen führten.

4.3. *In vitro* gefundene Interaktionspartner von Yrb1

4.3.1. Potenzielle Transportrezeptoren für Yrb1

In einem "GST-Pulldownassay", bei dem rekombinantes GST-Yrb1 mit Cytosol aus Hefewildtypzellen inkubiert wurde, wurden drei Proteine detektiert, die eine molare Masse von ca. 105 kDa, 115 kDa sowie 120 kDa besitzen, aber aus technischen Gründen nicht identifiziert werden konnten. Von ihrer Größe her könnte man vermuten, dass es sich dabei um Importin β -Homologe handelt, die ein Molekulargewicht von 95 - 142 kDa besitzen. Tatsächlich wurden bereits Interaktionen mit Xpo1 (Künzler *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2001) und Kap104 (Ho *et al.*, 2002) nachgewiesen. Trotz fehlender Leucin-reicher NES innerhalb

des Yrb1-Moleküls stellt Xpo1 einen Exportrezeptor für dieses Protein dar. Bei den gefundenen Proteinen könnte es sich also um diese beiden Transportrezeptoren handeln. Für Xpo1 spricht außerdem, dass für seine Bindung an Yrb1 Gsp1-GTP als Brückenmolekül erforderlich ist, dessen Zugabe entscheidend für das Auftreten des Proteins im Bindungsversuch war. Gleichzeitig spräche diese Notwendigkeit der Anwesenheit von Gsp1-GTP gegen eine Interaktion mit Kap104, da ein Importkomplex normalerweise durch Gsp1-GTP aufgelöst wird (Pemberton und Paschal, 2005). Nun liegt hier jedoch ein spezieller Fall vor, da Yrb1 seinerseits an Gsp1-GTP bindet (Masaya und Nishimoto, 2000; Maurer, 2001). Bei einem solchen Komplex könnte es sich also um ein Importin-Exportintermediat handeln, welches durch die GTPase-defiziente Gsp1-GTP-Mutante stabilisiert wird. Dennoch existiert bereits ein Modell eines unkonventionellen Imports für Yrb1 bzw. RanBP1. Es wurde nachgewiesen, dass das Protein *in vitro* einen ternären Komplex mit Kap95/Importin β und Gsp1-GDP/Ran-GDP bildet, dessen physiologische Funktion jedoch noch nicht geklärt wurde (Maurer, 2001; Plafker und Macara, 2000). Des Weiteren wurde für Importin β und RanBP1 keine Affinität zueinander nachgewiesen (Plafker und Macara, 2000). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit bei TAP-Bindungsstudien aus Hefecytosol ein Komplex bestehend aus Kap95 und Yrb1 isoliert (Abb. 25), welcher jedoch über eine Bindung der beiden Proteine an Gsp1-GTP zustande kommen könnte. Die gleichzeitige Anwesenheit von Gsp1-GTP wurde aber weder bestätigt noch komplett widerlegt. Da es sich jedoch um einen cytosolischen Komplex handelt und die Gsp1-GTP-Konzentration in diesem Kompartiment gering ist, sollte eine Teilnahme der GTPase am Komplex eher unwahrscheinlich sein. In "GST-Pulldown-Assays" mit rekombinanten Proteinen wurde eine deutliche, wenn auch nicht sehr starke Interaktion zwischen Kap95 und Yrb1 aufgezeigt. Eine physiologische Relevanz konnte aber auch in dieser Arbeit nicht belegt werden. Eine Hypothese, warum Yrb1 zwischen Cytosol und Zellkern pendelt, besagt, dass es den NPC von dort befindlichem Gsp1-GTP reinigen könnte, welches den ordnungsgemäßen Ablauf von Exportprozessen behindern würde (Plafker und Macara, 2000). Eine solche Theorie kann mit den soeben erwähnten Resultaten in Einklang gebracht werden, erfordert jedoch weitergehende Untersuchungen.

Neben Kap95 gibt es jedoch weitere Hinweise, mit welchen Importinen Yrb1 interagieren könnte. Auch Kap123 zeigte in "GST-Pulldown-Assays" bei gleichzeitiger Zugabe von Gsp1-GTP eine Interaktion mit Yrb1, wobei die GTPase vermutlich wieder als Adaptermolekül diente und sich auch hier wahrscheinlich ein Importin-Exportintermediat gebildet hat (Abb. 18). Daneben wurde Yrb1 bei einer Tandem-Affinitätsreinigung in Komplex mit Kap120 aus der unlöslichen Fraktion (Hefe) isoliert. Welche Rolle dabei Gsp1-GTP spielt, ist unklar. Und

schließlich wurde wiederum in Bindungsversuchen mit GST-Fusionsproteinen und Hefecytosol bzw. -Kernlysat eine Bindung von Yrb1 an Cse1 bei Anwesenheit der GTPase-defizienten Gsp1-GTP-Mutante nachgewiesen. Dieses Heterotrimer enthält zwar die typischen Komponenten eines Exportkomplexes, jedoch wurde zwischen Yrb1, Cse1 und nicht-mutiertem Gsp1-GTP keine Bindung nachgewiesen (Maurer *et al.*, 2001). Vermutlich handelt es sich also bei der in dieser Arbeit gefundenen eher um ein Artefakt.

Zusammengefasst bedeutet das also, dass in dieser Arbeit verschiedene Indizien für Interaktionen von Yrb1 mit Importin β -homologen Importinen und Exportinen aufgezeigt wurden, welche jedoch hinsichtlich ihrer physiologischen Bedeutung und Funktion nicht belegt und vertieft werden konnten.

4.3.2. Bekannte Komplexe mit Yrb1

In dieser Arbeit wurde in einem "GST-Pulldown-Assay" mit Kernlysat aus Hefewildtypzellen eine Bindung von Yrb1 an Rna1 und an Gsp1 nachgewiesen. Frühere Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf einen trimeren Komplex dieser drei Komponenten zu. So zeigten Schlenstedt *et al.* (1995), dass Yrb1 die GTP-Hydrolyse durch Gsp1 in Anwesenheit von Rna1 stimuliert. Analoges wurde im humanen System festgestellt (Bischoff *et al.*, 1995). Daraus lässt sich entnehmen, dass sich ein intermediäres Heterotrimer bildet. Ferner untersuchten Seewald *et al.* (2003) in Mutagenese-Experimenten die Bedeutung einzelner Aminosäurereste bei der Bindung des humanen Ran an RanBP1 bzw. an RanGAP. Ran dient dabei als Brückenmolekül, RanBP1 und RanGAP interagieren nicht miteinander. Das lässt vermuten, dass auch die in dieser Arbeit gefundene Interaktion von Yrb1, Gsp1 und Rna1 auf die gleiche Art und Weise zustande gekommen ist. Die Stabilität des sonst nur intermediär auftretenden Heterotrimers kann durch die fehlende GTPase-Aktivität der Gsp1Q71L-Mutante erklärt werden. Dass nun ein bekannter Komplex nachgewiesen wurde, lässt auf die Güte des experimentellen Ansatzes schließen.

4.3.3. Yrb1 interagiert *in vitro* mit Nbp35, Ded1 und verschiedenen ribosomalen Proteinen

Für Yrb1 wurde *in vitro* das Nukleotid-bindende Protein Nbp35 (35 kDa) als Bindungspartner entdeckt (Abb. 18). Dabei handelt es sich wie bei den Replikationsfaktor C-Untereinheiten Rfc1-4 um eine P-Schleifen-ATPase (Hausmann *et al.*, 2005). Obwohl für Yrb1 bislang nur eine Interaktion und gleichzeitige Stimulation der Funktion der GTPase Gsp1 nachgewiesen

wurde (Schlenstedt *et al.*, 1997; Solsbacher *et al.*, 1998), war es denkbar, dass Yrb1 eine analoge Rolle bei der ATPase Nbp35 spielt. In “GST-Pulldown-Assays“ mit rekombinantem GST-Nbp35 wurde jedoch keine Interaktion mit zugegebenem rekombinantem Yrb1 festgestellt. Ursache hierfür könnte sein, dass durch den zur Immobilisierung notwendigen “Tag“ die Bindungsstelle verdeckt wird, so dass Yrb1 an einer Interaktion sterisch behindert würde. Möglicherweise fehlen auch für eine Wechselwirkung notwendige Faktoren. Da es sich bei dem Protein um eine ATPase handelt (Hausmann *et al.*, 2005; Vitale *et al.*, 1996), lag die Vermutung nahe, dass NTPs zur Ausübung seiner Funktion notwendig sein könnten. Eine exogene Zugabe von ATP führte jedoch ebenfalls zu keiner Bindung. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten ein Zusammenspiel von Nbp35, der P-Schleifen-NTPase Cfd1 sowie dem Hydrogenase-artigen Nar1 bei der cytosolischen und nukleären Eisen-Schwefel-Protein-Biogenese sowie zusätzlich mit dem essenziellen Eisen-Schwefel-Protein Rli1 beim nukleären Export der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit (Hausmann *et al.*, 2005; Kispal *et al.*, 2005; Yarunin *et al.*, 2005). Welche genaue Funktion Rli1 beim ribosomalen Export spielt, wurde noch nicht geklärt. Jedoch könnte über diesen Weg eine hypothetische Verbindung zwischen Yrb1 und Nbp35 hergestellt werden. Es wurde nachgewiesen, dass temperatursensitive *yrb1*-Mutanten einen nukleären Exportdefekt bezüglich der kleinen ribosomalen Untereinheit zeigte (Moy und Silver, 2002). Nun wird dieser Effekt eher indirekt auf einen Zusammenbruch des Gsp1-GTP-Gradienten und damit des nukleocytoplasmatischen Transportsystems zurückgeführt. Dennoch ist die Möglichkeit eines direkten Zusammenhangs zwischen Yrb1 und dem ribosomalen Export nicht ganz auszuschließen. Es wurde nachgewiesen, dass Xpo1 bei der Translokation sowohl der großen als auch der kleinen Untereinheit ins Cytoplasma eine entscheidende Rolle spielt (Gadal *et al.*, 2001; Moy und Silver, 1999). Bei der großen Untereinheit fungiert Nmd3 als Adaptermolekül zwischen Substrat und Exportrezeptor (Gadal *et al.*, 2001). Bei der kleinen Untereinheit könnte Yrb2 diese Funktion ausüben, zumindest ist dieses Protein für den effizienten Export der kleinen Untereinheit notwendig (Moy und Silver, 2002). Da es sich hierbei um ein Yrb1-verwandtes, Gsp1-bindendes Protein handelt, wäre somit eine Rolle von Yrb1 dabei nicht von der Hand zu weisen. Es wurde bereits gezeigt, dass Yrb1 über Gsp1-GTP als Brückenmolekül durch Xpo1 exportiert wird (Maurer *et al.*, 2001), jedoch konnte seine Funktion im Nukleoplasma bislang nicht entschlüsselt werden. Möglicherweise erfüllt es beim ribosomalen Export eine Funktion im Zellkern. Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch der große Unterschied der Bindung ribosomaler Proteine an Yrb1 mit und ohne Zugabe von Gsp1Q71L-GTP (Abb. 18). Dabei könnte es sich um einen physiologischen Komplex aus

Yrb1, Gsp1-GTP, den ribosomalen Protein und gegebenenfalls Xpo1, dessen Anwesenheit nicht nachgewiesen wurde, handeln, allerdings könnte diese Interaktion auch lediglich ein Artefakt darstellen. Es wurde auch bewiesen, dass ATPasen und GTPasen am ribosomalen Exportprozess beteiligt sind, vielleicht, um zur Reifung der Untereinheiten notwendige Faktoren vor dem Transport zu entfernen (zusammengefasst in (Johnson *et al.*, 2002)). Fest steht zumindest, dass es sich sowohl bei Rli1 als auch bei Yrb1 um ein zwischen Kern und Cytoplasma hin- und her pendelndes Protein handelt. Bei Rli1 wird auch eine weitere Funktion bei der Initiation der Proteintranslation vermutet, da nachgewiesen wurde, dass es sowohl mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF3 sowie der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit direkt interagiert, als auch mit eIF2 und eIF5 indirekt (Kispal *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde auch eine Assoziation des Translationsinitiationsfaktors Ded1 mit der Prä-40S- und der Prä-60S-Untereinheit nachgewiesen (de la Cruz *et al.*, 1997), welches in dieser Arbeit in einem "GST-Pulldown-Assay" als *in vitro*-Bindungspartner von Yrb1 gefunden wurde. Auch eine Interaktion von Yrb1 mit dem Translationselongationsfaktor 1 bzw. 2 wurde in GST- bzw. TAP-Bindungsstudien gezeigt. Ein weiterer Hinweis für einen Zusammenhang von Yrb1 mit der Translation ist möglicherweise die *in vitro* gefundene Interaktion mit der Lysyl-tRNA-Synthase Krs1 (Lanker *et al.*, 1992) (Abb. 18).

Schließlich gibt es noch ein letztes Indiz für ein mögliches Zusammenspiel von Yrb1 mit ribosomalen Proteinen. Denn auch der bereits bekannte Importrezeptor einiger ribosomaler Proteine Kap123 (Schlenstedt *et al.*, 1997) wurde in dieser Arbeit in GST-Bindungsstudien (Abb. 18) an Yrb1 gebunden nachgewiesen.

Zusammengefasst kann man sagen: es gibt keinerlei eindeutige Beweise für eine tatsächliche Funktion von Yrb1 beim ribosomalen Transport. Jedoch gibt es verschiedene Indizien, die auf einen Zusammenhang bezüglich ribosomalen Imports, Exports oder Translationsinitiation bzw. -elongation hinweisen.

4.3.4. Andere *in vitro* gefundene Bindungspartner von Yrb1

Die übrigen Proteine, die in den *in vitro*-Studien dieser Arbeit an Yrb1 gebunden haben, sind vermutlich eher unspezifischer Natur, da es sich um in großer Zahl in der Zelle vorkommende Moleküle (Swaffield *et al.*, 1995) wie das Histon H4, die CTP-Synthase Ura7, die Alkoholdehydrogenase Adh1 und die ATPase Vma2 handelt und es ansonsten keinerlei Hinweise auf ein Zusammenspiel mit diesen Proteinen gibt. Auch bei den an der Proteinfaltung bzw. Stressantwort beteiligten Proteinen Ssa1, Ssa2, Ssb2, Sse1, Hsc82 und Hsp82 (Mukai *et al.*, 1993; Nathan *et al.*, 1997; Werner-Washburne *et al.*, 1987), welche im

in vitro-Komplex mit Yrb1 gefunden worden sind, handelt es sich um zahlreich in der Zelle vorkommende Proteine und die Interaktionen sind als eher unspezifisch einzustufen. Die eher in mittlerer Zahl in der Zelle vorhandenen Proteine Arf1 und Arf2 (Springer *et al.*, 1999), welche eine Funktion bei der Proteintranslokation zwischen ER und Golgi-Apparat ausüben, könnten möglicherweise durch eine Interaktion mit den oben genannten Komponenten der Proteinfaltungsmaschinerie zustande kommen.

4.4. *In vitro* gefundene Interaktionspartner von Cse1

4.4.1. Der Srp1/Cse1/Gsp1-Exportkomplex

Es wurde bereits gezeigt, dass der Importfaktor Srp1 in Komplex mit Cse1 und Gsp1-GTP wieder aus dem Kern ins Cytoplasma zurück transportiert wird (Künzler und Hurt, 1998; Solsbacher *et al.*, 1998). Durch "GST-Pulldown-Assays" mit rekombinantem GST-Cse1 und Cytosol bzw. Kernlysate aus Hefewildtypzellen sowie Zugabe von Gsp1-Q71L-GTP wurde der Komplex auch in dieser Arbeit mittels Immunoblot- und massenspektrometrischer Analyse nachgewiesen. Dass dieser Komplex auch in der cytosolischen Fraktion stabil war, wo er in Normalfall durch Zusammenwirken von Rna1 und Yrb1 disassembliert (Schlenstedt *et al.*, 1995), lässt sich durch die GTPase-Defizienz der Gsp1Q71L-Mutante erklären.

Des Weiteren wurde auch in einer Tandemaffinitätsreinigung mit Cytosol aus Hefezellen, deren endogenes Cse1-Protein einen "S-TEV-ZZ-Tag" enthielt, eine Interaktion zwischen Cse1 und Srp1 aufgezeigt. In diesem Fall wurde kein exogenes Gsp1Q71L-GTP zugegeben. Es kam also eventuell nur zu einer Bildung des Srp1/Cse1-Heterodimers, wobei die beiden Proteine aber nur eine geringe Affinität zueinander haben (Solsbacher *et al.*, 1998).

Mit diesen Ergebnissen wurde demnach gezeigt, dass die experimentellen Konditionen ausreichen, Komplexe mit möglichen Interaktionspartnern zu bilden. Dieser Sachverhalt kann als Indiz dafür dienen, dass es sich bei den übrigen gefundenen potenziellen Interaktionspartnern um spezifische Bindungen handelt.

4.4.2. Potenzielle Interaktionspartner von Cse1

Für Cse1 wurden Oms1 (Daten nicht gezeigt), Ypr115w, Yrb1 und Rex3 als potenzielle Bindungspartner gefunden (Abb. 19). Bei der Methyl-Transferase Oms1 handelt es sich um ein mitochondriales Protein und von Ypr115w ist keinerlei Funktion bekannt. Deshalb kann keine sinnvolle Verknüpfung zum nukleocytoplasmatischen Transport hergestellt werden. Die

Interaktion zu Yrb1, die vermutlich als artifiziell einzustufen ist, wurde bereits unter 4.3.1 erläutert. Die möglicherweise spezifische Bindung zu der Exonuklease Rex3 soll nun ausführlicher erörtert werden. Solsbacher *et al.* (1998) haben bereits gezeigt, dass eine Überexpression von *CSE1* den mRNA-Export blockiert. Als Erklärung könnte vielleicht folgende dienen: es ist bekannt, dass Rex3 im Zusammenspiel mit anderen Exonukleasen an der Prozessierung verschiedener snRNAs mitwirkt, welche für das Spleißen der Introns von der Prä-mRNA zur mRNA verantwortlich sind (van Hoof *et al.*, 2000). Angenommen bei Rex3 handelte es sich tatsächlich um ein Substrat von Cse1, so könnte eine Überexpression des *CSE1*-Gens durch das verstärkte Angebot an Transportrezeptor-Molekülen zu einer erhöhten Exportrate von Rex3 und damit zu einer Verringerung an gespleißter mRNA führen. In diesem Fall gäbe es also keinen direkten Zusammenhang zwischen Cse1 und dem mRNA-Export, sondern lediglich einen indirekten.

Es wird für Cse1 zusätzlich ein Mitwirken am Zellzyklus postuliert. So weist die *cse1-2*-Mutante bei restriktiver Temperatur Störungen bei der Chromosomensegregation und Zellzyklusarrest während der Mitose auf, was nachfolgend zu einer binukleären Morphologie führt (Schroeder *et al.*, 1999b; Xiao *et al.*, 1993). Beim humanen Homolog wurde sogar zusätzlich zur Zellproliferation und damit verbundener eventueller Tumorgenese ein Zusammenhang bei der Apoptose von Zellen nachgewiesen (Brinkmann, 1998; Scherf *et al.*, 1996). Ein unmittelbares Mitwirken von Cse1 bei der Mitose wurde in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt. Interessanterweise wurde aber nachgewiesen, dass das *Xenopus*-Homolog von Rex4, welches wie Rex3 zur Gruppe der 3'-Exonukleasen gehört, die in Bäckerhefe aus fünf verwandten Proteine besteht, in der Lage ist, einen Zellzyklusdefekt in Spalthefer zu kompensieren, wenn es in der entsprechenden Mutante exprimiert wird (Su und Maller, 1995). Möglicherweise gibt es also einen noch unerforschten Zusammenhang der 3'-Exonukleasen beim Zellzyklus. Und auch hier könnte Cse1 durch seine Exportfunktion als Regulator dienen.

4.5. *In vitro* gefundene Interaktionspartner von Kap114 und Kap120

Über eine modifizierte Version der Tandem-Affinitätsreinigung mit einer cytosolischen und einer unlöslichen Fraktion aus Hefewildtypzellen (Abb. 27) wurden Interaktionen zwischen Kap114 bzw. Kap120 Abf2, Ald4, Arg8, Atp3/7, Cbp6, Cyb2, Fmp26, Ggc1, Hfd1, Idp1, Ilv1/3/6, Lys12, Mdj1, Mgm101, Pda1, Pet9, Qcr2, Tuf1, Ura2 sowie Ym1030w gefunden.

Da es sich dabei um mitochondriale Proteine handelt, erschließt sich kein Zusammenhang zum nukleocytoplasmatischen Transport.

Viele andere Proteine wurden im Komplex mit Kap114 und Kap120 nachgewiesen, bei denen es sich vermutlich nicht um natürliche Interaktionspartner handelt. Zahlreich in der Zelle vorhandene Proteine zeigen oft unspezifische Interaktionen (Swaffield *et al.*, 1995) wie z. B. Apa1, Dhh1, Gfa1, Hom2, Lcb2, Tsa1 und Vma2, die in den *in vitro*-Studien dieser Arbeit gefunden wurden. Dazu gehören z. B. auch Translationsfaktoren wie Tif34 und Yef3 (Maurer, 2001; Swaffield *et al.*, 1995). Auch glykolytische Proteine (Tdh2/3, Ald6, Pfk2, Fba1) sowie andere Proteine des Kohlehydratstoffwechsels (Adh1, Mck1) sind in hoher Zahl vorhanden und deren Wechselwirkungen mit den in dieser Arbeit untersuchten Transportrezeptoren wahrscheinlich unspezifisch (Maurer, 2001; Swaffield *et al.*, 1995). Auch bei proteasomalen Proteinen (Rpn3/8/9/10/11/13, Rpt1/2/6) besteht eine gewisse Tendenz zu nicht spezifischen Wechselwirkungen (Swaffield *et al.*, 1995). Über den proteasomalen Import ist bereits bekannt, dass der 20 S-Kernkomplex in Form von inaktiven Vorläuferkomplex ebenso wie die 19 S-Basis- und Deckel-Komplexe über den klassischen NLS-Protein-Transportweg, also mit Hilfe von Srp1 und Kap95, in den Zellkern geschleust werden (Lehmann *et al.*, 2002; Wendler *et al.*, 2004). Denkbar ist dabei aber auch eine zusätzliche Mithilfe von Kap114 und Kap120. Wie auch an anderen Stellen erwähnt (4.6) ist es in *S. cerevisiae* nicht ungewöhnlich, wenn wichtige Proteine oder Proteinkomplexe über mehrere Wege in den Zellkern transportiert werden.

Bei einigen der gefundenen Proteine handelt es sich um Chaperone bzw. um Komponenten des ER-/Golgi-Systems (Scj1, Sis1, Ydj1, Gsf2, Erg26, Mpd2, Dpm1, Emp24, Gvp36, Anp1, Mnn11). Es ist anzunehmen, dass die genannten Wechselwirkungen mit den allgemeinen Prozessen der Proteinbiosynthese, -faltung, -modifikation und dem dazu nötigen Transport in Zusammenhang gebracht werden können und keine weiterführende Bedeutung haben.

Aminoacyl-tRNA-Synthasen wie Tys1, Grs1, Yhr020w und Ils1 erkennen und befestigen die entsprechende Aminosäure am jeweiligen tRNA-Molekül. Bei den in dieser Arbeit über TAP isolierten Komplexe zwischen Kap114 bzw. Kap120 und diesen Enzymen könnte es sich um tatsächliche Importkomplexe handeln, da diese Proteine neben ihrer cytosolischen Lokalisierung auch im Nukleus zu finden sind. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Interaktionen artifizieller Natur sind.

Die Spezifität der Bindungen zu den nicht bis wenig erforschten und nur in geringer Zahl in der Zelle vorliegenden Ypr118w, Ydr051 und Ypl247c wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Da aber alle drei Proteine sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus zu finden

sind, könnten Kap114 bzw. Kap120 auch in diesem Fall durchaus die physiologischen Importrezeptoren darstellen.

Manche der entdeckten Interaktionen können nicht wirklich erklärt werden, weil die entsprechenden Proteine weder besonders zahlreich sind, noch eine nukleäre Lokalisation besitzen. Sie können aber in Gruppen eingeteilt werden: Proteine der Nukleinsäure- (Prs4, Gua1, Ade4) bzw. Aminosäure-Biosynthese (Trp2, Lys12, Trp5, Thr4) sowie Enzyme, die bei der Zellwandorganisation eine Rolle spielen (Ktr3, Hoc1, Psa1). Auffällig ist, dass jeweils mindestens eines der genannten Proteine in großer Zahl vorliegt und so vermutlich artifizielle Komplexe bildet. Möglicherweise zeigen die übrigen Proteine einfach eine gewisse Affinität zu diesem reichlich vorhandenen Protein ihrer Gruppe.

Aktin macht eine große Menge der Gesamtproteinmenge in der Eukaryotenzelle aus (Alberts, 1990). Das könnte der Grund dafür sein, dass das Cytoskelett-bildende Protein Act1 an Kap114 und Kap120 gebunden gefunden wurde. Es handelt sich dabei vermutlich um eine unspezifische Interaktion.

In dieser Arbeit wurde eine *in vitro*-Interaktion von Kap120 zu folgenden ribosomalen Proteinen nachgewiesen: Rps3, Rps13, Rps15, Rps16b, Rps17a, Rps18b, Rps19a, Rps20, Rps24b und Rps26b der kleinen Untereinheit und Rpl12a, Rpl21b, Rpl26a und Rpl34b der großen Untereinheit. Bis auf Rps26b, Rpl12a, Rpl21b und Rpl34b lagen in eben dieser Interaktionsstudie die gleichen Proteine an Kap114 gebunden vor (Abb. 27). Mit Ausnahme von Rps3, Rps15, Rps19a, Rps24b und der oben genannten Proteine der großen Untereinheit außer Rpl21b wurde auch eine Bindung an Yrb1 gezeigt (Abb. 18 und Abb. 25). Möglicherweise werden diese Proteine als Komplex in den Zellkern transportiert. Kap114 und Kap120 könnten dabei eine Rolle spielen. Interessanterweise zeigte Kap120 *in vitro* auch eine direkte Interaktion mit Yrb1 (Abb. 27), was in diesem Kontext mit einem funktionellen Zusammenhang begründet werden könnte. Ein tatsächlicher Beweis für die Beteiligung von Kap120 am ribosomalen Import steht jedoch noch aus, zumal sich mit den ribosomalen Proteinen auch leicht unspezifische Interaktionen ausbilden können. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass für Kap120 das an der Ribosomenbiogenese beteiligte Rpf1 als erstes Imports substrat identifiziert wurde (Caesar *et al.*, 2006). Daneben wurde aber auch eine direkte Interaktion von Kap120 mit dem ribosomalen Protein Rpl3 gezeigt (Greiner, 2001). Bisherige Untersuchungen zeigten, dass in der Hefe *S. cerevisiae* insbesondere die Importfaktoren Pse1 und Kap123 am Import ribosomaler Proteine beteiligt sind (Rout *et al.*, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1997). Aber auch Kap95, Kap104, Nmd5, Sxm1 wiesen eine gewisse Affinität zu Rpl3 als Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit und zusätzlich noch Kap114 zu Rps5 als

Bestandteil der kleinen Untereinheit auf (Greiner, 2001). Es gibt also durchaus bereits Indizien für einen Zusammenhang zwischen Kap114 bzw. Kap120 und dem ribosomalen Import. Es wurde nicht geklärt, ob es sich bei den Interaktionen der Bindungsstudien in dieser Arbeit um spezifische oder unspezifische handelt, dennoch erklärt diese Bindung zumindest die Wechselwirkung der polysomalen Nuklease Mkt1 an Kap114. Die ribosomalen Proteine stellen damit also eine Brücke für die beiden Komponenten dar.

Belegt ist bereits der Transport des auch in dieser Arbeit gefundenen Histons H2B (Subtypen Htb1 und Htb2) durch Kap114 (Greiner, 2001; Mosammaparast *et al.*, 2001b). Ein Komplex bestehend aus H2A, H2B, Kap114 und dem Nukleosomassemblierungsprotein 1 wird dabei in den Zellkern geschleust (Mosammaparast *et al.*, 2005). Dass Htb2 auch in den Co-Reinigungsexperimenten endogener Hefepoteine mittels "TAP-Tag" aus Hefe-Cytosol und der unlöslichen Fraktion als Interaktionspartner für Kap114 entdeckt wurde, bürgt wiederum für die Güte dieser Versuchsreihe (vgl. 4.2).

Die Proteine Dbp2, Dbp3, Fus3, Imp4, Npl3, Rfc2, Rfc5, Rpc40, Rrp3, Sub2 und Taf4 wurden in zusätzlichen Bindungs- und Lokalisierungsstudien weiter erforscht. Die Resultate der Untersuchungen mit Dbp2, Imp4, Rfc2, Sub2 und Taf4 werden in Kapitel 4.6 und 4.7 vertiefend diskutiert. Nachstehend werden nun die Ergebnisse der Experimente mit den übrigen Proteinen erörtert. Rfc5, Dbp3 und Npl3 zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen der "GST-Pulldown-Assays" mit rekombinanten Proteinen keinerlei Wechselwirkungen mit Kap114 und 120 (Daten nicht gezeigt). Diese nicht-reproduzierbaren Interaktionen können auf in den *in vitro*-Bindungsstudien möglicherweise fehlende notwendige Faktoren zurückgeführt werden oder in den *in vivo*-Lokalisierungsstudien auf einen multiplen Transportweg, wie unter 4.6 und 4.7 dargelegt. Für Rfc5 gibt es eine offenkundige Erklärung: in seiner Funktion als Replikationsfaktor C-Untereinheit interagiert es mit Rfc2 (Yao *et al.*, 2003), dessen Bindung an Kap114 (Abb. 27) eindeutig gezeigt wurde. Es handelt sich also wahrscheinlich um eine indirekte Interaktion zwischen Kap114 und Rfc2. Dbp3 bindet wie Dbp2, Imp4, Rpc40 (Gavin *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006), Kap114 und Kap120 (diese Arbeit) an proteasomale Proteine. Mit Hilfe potenzieller "Brücken-Moleküle" kann die vermutlich unspezifische Interaktion zwischen Dbp3 und Kap114 und der möglicherweise artifizielle Komplex zwischen Dbp2 und Kap120 in den Co-Reinigungsexperimenten erklärt werden. Auch der Transkriptionsfaktor Pho4 könnte eine Verbindung zwischen Dbp3 bzw. Dbp2, welche beide mit diesem Protein wechselwirken (Graumann *et al.*, 2004), und damit mit Kap114 herstellen.

Für das mRNA-bindende Protein Npl3 ist bereits bekannt, dass es durch Mtr10 in den Zellkern transportiert wird (Pemberton *et al.*, 1997; Senger *et al.*, 1998). In Co-Reinigungsexperimenten zeigte sich zusätzlich eine Bindung zwischen Npl3 und Kap114. Es gab jedoch keine Wechselwirkungen in Interaktionsstudien mit rekombinanten Proteinen. Dieser Sachverhalt lässt sich dadurch erklären, dass Npl3 wie Sub2, welches ebenfalls in den Co-Reinigungsexperimenten an Kap114 gebunden hat, an der Transkription beteiligt sind (Lei und Silver, 2002a) und miteinander interagieren (Inoue *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise interagiert Npl3 (Hurt *et al.*, 2004) wie Yrb1 (Abb. 18) mit Ded1, welches an der Translationinitiation beteiligt ist. Unter Umständen gibt es über diesen Weg eine Verknüpfung der beiden Transportfaktoren.

Für Rpc40 wurde bereits eine Interaktion mit dem Importrezeptor Pdr6 gezeigt (Ho *et al.*, 2002). In dieser Arbeit ist es nicht gelungen, das Ergebnis aus den Co-Reinigungsexperimenten, d. h. eine Bindung an Kap114, auch in "GST-Pulldown-Assays" mit rekombinanten Proteinen zu zeigen oder eine Wechselwirkung mit einem anderen Importin β -Homologen nachzuweisen. Aber auch in diesem Fall gibt es Alternativen, wie eine solche artifizielle Interaktion zustande gekommen sein könnte. Wie bereits erwähnt, bildet Rpc40 wie Kap114 Bindungen zu einem proteasomalen Protein aus. Eine zweite Möglichkeit liefert die Interaktion von Rpc40 mit dem Histon Hhf1, welches mit den übrigen drei Histon-Typen den Nukleosomenkern ausbildet (Kornberg und Thomas, 1974). Kap114 wurde wiederum als nukleärer Importrezeptor von H2A nachgewiesen (s. o.). Allerdings wurde für Rpc40 auch wie für Sub2 und Npl3 eine Bindung zu Rrp6 belegt (Krogan *et al.*, 2004). Es gibt also verschiedene Wege, die Komplexbildungen zwischen Kap114 und Rpc40 zu begründen.

Die in den Co-Reinigungsexperimenten gefundene Interaktion zwischen Fus3 und Kap114 bzw. Kap120 wurden in Bindungsstudien mit den rekombinanten Proteinen nur zum Teil gezeigt. Es wird daher angenommen, dass es sich um keine direkte oder physiologische Bindung handelt. Bereits zuvor wurde nachgewiesen, dass Fus3 mit dem ribosomalen Protein Rpl25 interagiert (Ptacek *et al.*, 2005). Da die zwei Importrezeptoren Wechselwirkungen mit verschiedenen ribosomalen Proteinen zeigten, könnte über diese "Brücke" die Interaktion von Fus3 mit beiden Importinen erklärt werden. Eine andere Verbindung könnte das Fus3 bindende Histon Hta1 (Ptacek *et al.*, 2005) darstellen, das sowohl mit Kap114 (Greiner, 2001; Mosammaparast *et al.*, 2001b) als auch Kap120 (diese Arbeit, Abb. 27) interagiert. Überdies stellt die Interaktion von Fus3 (Collins *et al.*, 2007), Npl3 sowie Rpc40 mit Rrp6 eine andere Möglichkeit der "Überbrückung" dar. Daneben gibt es im Falle von Kap114 weitere

Alternativen, wie die eventuell artifizielle Komplexbildung mit Fus3 zustande kommen könnte. Zum einen zeigt Fus3 wie Kap114 eine Wechselwirkung mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor Sua7. Zum anderen gibt es Interaktionen von Fus3 mit Rfc1 und Rfc4 (Collins *et al.*, 2007), welche mit Rfc2 den Klammerlader ("Clamp-Loader") bei der DNA-Replikation bilden. Für Kap114 wurde in den Co-Reinigungsexperimenten und in den Bindungsstudien mit den rekombinanten Proteinen eine *in vitro*-Interaktion mit Rfc2 nachgewiesen (Abb. 27 und Abb. 36), eine schwache Wechselwirkung gab es auch mit Kap120 in den zuletzt genannten Experimenten (Abb. 36). Somit könnte Rfc2 also als "Brücke" dienen.

Die wahrscheinlich nicht natürliche Komplexbildung zwischen Rrp3 und Kap120 kann damit erklärt werden, dass Rrp3 mit Taf7 interagiert (Sanders *et al.*, 2002), welches wie Taf4 am TFIID-Komplex beteiligt ist. Für Taf4 wurde in dieser Arbeit eine Interaktion mit Kap120 gezeigt (Abb. 27 und Abb. 34).

Zusammenfassend kann man also sagen, dass mit der Methode der Co-Aufreinigung endogener Hefepoteine mittels "TAP-Tag" aus Hefe-Cytosol und der unlöslichen Fraktion sowohl unspezifisch einzustufende Wechselwirkungen als auch indirekte Protein-Protein-Interaktionen mit einem "Brückenmolekül" sowie physiologische Komplexe gefunden wurden. Da die Artefakte tatsächliche Interaktionen nicht überdecken und die Versuchsbedingungen schonend genug sind, natürlich vorkommende Protein-Protein-Bindungen zu erhalten, handelt es sich bei dieser Methode um einen guten Weg funktionelle Zusammenhänge zu untersuchen.

4.6. Potenzielle Importrezeptoren von Dbp2, Sub2, Imp4, Taf4 und Rfc2

Einige der in den Co-Reinigungsexperimenten gefundenen Interaktionen zu Kap114 und Kap120 wurden detaillierter untersucht. Gemäß dem Thema der Arbeit wurden hauptsächlich nukleäre Proteine oder solche mit einer Funktion, die auf eine nukleäre Lokalisation schließen lässt und über deren Transport in den Zellkern noch nichts bekannt ist, weiter bearbeitet. Dabei handelte es sich um Rpc40, Fus3, Dbp2, Sub2, Imp4, Taf4 und Rfc2. Es wurden Hefestämme hergestellt, in denen diese Proteine als GFP-Fusion synthetisiert wurden und *KAP114*, *KAP120* bzw. *KAP114*, *KAP120* und *NMD5* zusammen deletiert waren. Ziel war es, etwaige Misslokalisierungen zu zeigen und daraus auf mögliche Importrezeptoren zu schließen. Über diesen Weg wurde auch die Lokalisierungen von Taf4 und Imp4 in Wildtypzellen bestimmt, welche zuvor noch nicht mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht

wurden. Taf4 zeigte neben einer sehr schwach cytoplasmatischen hauptsächlich eine nukleäre Lokalisation, Imp4 war ausschließlich in Kern und Nukleolus zu finden. Angesichts der Rolle von Taf4 bei der Transkriptionsinitiation (Reese *et al.*, 2000; Sanders und Weil, 2000) und von Imp4 bei der Ribosomenbiogenese (Gérczei und Correll, 2004) kann dieses Ergebnis mit den bereits gezeigten Funktionen dieser Proteine in Einklang gebracht werden. Jedoch zeigte keiner der oben erwähnten k.o.-Stämme eine Misslokalisierung. Das könnte darauf zurück zu führen sein, dass noch andere Importine an den Transportprozessen beteiligt sind oder keines der untersuchten Importin β -Homologen ein Transportrezeptor dieser sieben Proteine darstellt und die in den Bindungsstudien gefundenen Interaktionen unspezifischer Natur waren. Deshalb wurden *in vitro*-Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. Dabei enthielten die potenziellen Substrate den "GST-Tag" nicht wie zuvor den "GFP-Tag" und auch den "S-TEV-ZZ-Tag" am C- sondern am N-Terminus. Gleichzeitig wurde die Gsp1-GTP-Abhängigkeit dieser Bindungen untersucht. Die Auflösung von Importkomplexe durch Gsp1-GTP stellt ein charakteristisches Merkmal der Importrezeptor-Substrat-Bindung dar und liefert ein Indiz für die Spezifität der Interaktionen. Fus3 und Rpc40 zeigten keine Interaktion zu den untersuchten Importrezeptoren. Die Gründe dafür sind vermutlich ähnlich den unten angeführten. Die Proteine wurden nicht weiter bearbeitet.

Obwohl Dbp2 anfänglich im Komplex mit Kap120 gefunden wurde (Co-Reinigungsexperimente), wurde diese Interaktion mit rekombinanten Proteinen nicht nachgewiesen, statt dessen eine äußerst schwache Bindung an Kap114, die Gsp1-GTP-abhängig ist. Eine mögliche Erklärung ist eine sterische Behinderung durch die jeweiligen "Tags". Vielleicht fehlen auch zusätzlich notwendige Faktoren, die bei Kap114 im TAP-Versuch während der Reinigung entfernt worden sein könnten bzw. im Falle von Kap120 beim "GST-Pulldown-Assay" mit rekombinant synthetisierten Proteinen nie vorhanden waren. Jedoch zeigten auch die *in vivo*-Versuche mit den k.o.-Mutanten keinen Einfluss dieser Importrezeptoren auf die Lokalisierung von Dbp2. Also sollte es neben Kap114 und Kap120 noch andere nukleäre Transportwege geben. Dazu kommt außerdem, dass essenzielle Proteine wie Dbp2 oftmals über mehrere Transportwege importiert werden, um seine korrekte Lokalisierung und damit auch seine Funktion zu gewährleisten. Zusammengefasst bedeutet dies vermutlich, dass durch fehlende unbekannte Faktoren in den Bindungsstudien und alternative noch nicht nachgewiesene Importwege in den Lokalisierungsstudien die tatsächlichen nukleären Importwege von Dbp2 nicht erfasst wurden.

Bei Sub2 gab es, wie bereits erwähnt, ebenfalls keine Misslokalisierung in den k.o.-Stämmen. In den Bindungsstudien mit isolierten rekombinanten Proteinen wurde abgesehen von Srp1

und Kap95 keine Interaktion mit einem der übrigen untersuchten Importine nachgewiesen. Handelte es sich um einen klassischen NLS-Protein-Import, sollten Srp1 allein nur wenig und Kap95 allein nicht an das Substrat binden, bei Zugabe beider Komponenten sollte jedoch eine starke Wechselwirkung zu sehen sein (Kooperativität der Bindung). Tatsächlich war es allerdings so, dass die zwei Importfaktoren für sich schon eine Interaktion zu Sub2 zeigten und bei Zugabe beider Proteine kaum eine Bindung zustande kam. Das lässt darauf schließen, dass es sich in diesem Fall nicht um einen klassischen NLS-Import handelt, was auch durch die *in vivo*-Daten bestätigt wird (s. u.). Da Srp1 alleine im Gegensatz zu Kap95 nicht in der Lage ist, ein Substrat zu importieren - der nukleäre Transport von CaMKV durch das Säugerhomolog Importin α (Kotera *et al.*, 2005) sei an dieser Stelle außer acht gelassen - wurde eine Gsp1-GTP-Abhängigkeit der Substrat-Importin-Komplexbildung nur für Kap95 überprüft, jedoch nicht im Falle von Srp1. Durch Zugabe von Gsp1-GTP wurde eine Ablösung des Substrats aus dem Komplex festgestellt. Das bedeutet, bei Kap95 alleine könnte es sich um einen möglichen Transportrezeptor von Sub2 handeln. Mutationen des *KAP95*- wie auch des *SRP1* und *NUP2*-Gens führten jedoch zu keinerlei Misslokalisationen. D. h. entweder handelt es sich bei Kap95 nicht um einen Importrezeptor von Sub2 oder ein möglicher Importdefekt wird durch andere Importine kompensiert. Die Co-Reinigungsstudien ergaben eine Interaktion mit Kap114, ein Ergebnis, welches jedoch mit den übrigen Methoden nicht gezeigt werden konnte. Aus diesen Studien wird also nicht wirklich ersichtlich, bei welchen Importinen es sich um Transportrezeptoren von Sub2 handelt und bei welchen nicht. Taf4 wurde in den TAP-Bindungsstudien sowohl in Komplex mit Kap114 als auch mit Kap120 gefunden. Auch für dieses Protein kam es allerdings zu keinerlei Misslokalisierung in den k.o.-Stämmen $\Delta kap114$, $\Delta kap120$ sowie $\Delta kap114 \Delta kap120 \Delta nmd5$. Die nachfolgenden Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen lieferten eine mögliche Erklärung für dieses Resultat. Kap120 zeigte zwar auch hier eine Bindung zu Taf4, jedoch kam es zu keiner Ablösung durch Gsp1-GTP. Daraus ist zu schließen, dass es sich wahrscheinlich nicht um eine spezifische Interaktion handelt, zumindest aber vermutlich um keine im Zusammenhang mit dem nukleocytoplasmatischen Transport. Dieses Faktum verdeutlicht, weshalb in der $\Delta kap120$ -Mutante kein Effekt zu sehen ist. Bei Kap120 handelt es sich also eher nicht um einen Importrezeptor für Taf4. Dafür kommen aber neben Kap114 noch einige andere dazu. Die größte Bindungsaffinität zum untersuchten Protein zeigte Kap104. Sxm1, Pse1 und Kap95 haben nur halb so stark an das potenzielle Substrat gebunden, Nmd5 und Kap114 nur noch zu einem Viertel. Eine Zugabe von Srp1 zu Kap95 und Taf4 erhöhte die Stärke der Interaktion nur unwesentlich. D. h. ein klassischer NLS-Protein-Import ist mit großer

Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Aber alle zuletzt genannten Importin β -Homologen wiesen eine starke bis sehr starke Gsp1-Abhängigkeit auf. Das lässt vermuten, dass es sich dabei um die Transportrezeptoren von Taf4 handelt. Wie bei vielen anderen Substraten wird das essenzielle Taf4 offensichtlich nicht nur von einem, sondern von mehreren Rezeptoren importiert (vgl. auch oben). Jedoch scheint es Abstufungen zu geben. Haupttransporter ist vermutlich Kap104 - obwohl die vergleichbar hohe Bindungsaffinität auch auf andere Effekte zurückgeführt werden kann -, wohingegen Kap114 und Nmd5 die schwächsten zu sein scheinen. Damit kann die fehlende Misslokalisierung in den beschriebenen k.o.-Stämmen erklärt werden. Zum einen ist Kap120 sehr wahrscheinlich kein Importrezeptor von Taf4 bzw. Kap114 und Nmd5 nur solche von ungeordneter Bedeutung. Zum anderen binden zahlreiche weitere Importine an Taf4. Der letzte Sachverhalt erschwert gleichzeitig die Überprüfung des Einflusses dieser Importine auf den nukleären Import in *in vivo*-Lokalisierungsstudien. Eine komplette oder auch nur fast vollständige Deletion der Importrezeptoren würde zu einem Stillstand vieler anderer für die Zelle überlebensnotweniger Stofftransportvorgänge führen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit keine weiteren *in vivo*-Lokalisierungsstudien durchgeführt.

Ähnlich sieht es bei Imp4 aus. Anfänglich wurde es in TAP-Bindungsversuchen als Bindungspartner von Kap114 gefunden. Aber auch hier führte die Deletion des *KAP114*-Gens zu keiner Misslokalisierung. Die *in vitro*-Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen lieferten eine eventuelle Erklärung. Kap114 zeigte in diesen Experimenten eine prägnante Bindung an Imp4, welches durch Zugabe von Gsp1-GTP deutlich abgelöst wurde. Das bedeutet: trotz des Negativ-Ergebnisses in den Lokalisierungsstudien könnte es sich bei Kap114 durchaus um einen Importrezeptor für Imp4 handeln. Allerdings gibt es auch in diesem Fall weitere potenzielle Transportrezeptoren: Nmd5, Kap95, Kap104 und Sxm1 zeigten eine vergleichbar starke Bindung an das essenzielle Imp4. Je nach Protein war ebenfalls eine mittlere bis sehr starke Gsp1-GTP-Abhängigkeit zu erkennen. Srp1 verstärkte die Bindung von Kap95 zu Imp4 unmerklich, ein klassischer NLS-Import ist eher unwahrscheinlich. Daneben zeigten Kap120 und Kap123 eine schwache Interaktion mit dem möglichen Substrat. Die Ablösung durch Gsp1-GTP war deutlich, so dass sie durchaus als Nebenwege beim nukleären Import angesehen werden könnten. Die Bindungen zu Nmd5, Kap114 und Kap120 zeigten also unbedingt Charakteristika derer zwischen Importinen und ihren Substraten. Dennoch war bei Deletion der drei entsprechenden Gene kein Effekt auf die Lokalisierung von Imp4 zu erkennen. Daran wird klar, dass eine Deletion nicht aller potenziellen Importrezeptoren nicht zu einer auch nur teilweisen Misslokalisierung führen

muss, wie oben bereits postuliert. Auch in diesem Fall war eine Deletion zumindest der möglichen Hauptimportrezeptoren zum Zwecke von *in vivo*-Lokalisierungsstudien aus bereits erwähnten Gründen nicht möglich und weitere Beweise für die Funktion der untersuchten Importin β -Homologen beim nukleären Import von Imp4 stehen noch aus. Interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch die Ähnlichkeit bezüglich der Importin β -Homolog-Bindung zu Rpf1 (diese Arbeit und (Caesar, 2003)), welches wie Imp4 an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist (Dunbar *et al.*, 2000). Möglicherweise werden beide Proteine zeitgleich oder sogar als Komplex in den Zellkern transportiert. Man beachte an dieser Stelle auch, dass in früheren Arbeiten das Importin β -Homolog zwecks Bindungsstudien mit einem "GST-Tag" versehen wurde (Caesar, 2003) und in dieser Arbeit das potenzielle Substrat. Im direkten Vergleich erkennt man, dass im Falle von Rpf1 für die jeweilige Interaktion nicht wirklich Unterschiede zu sehen sind. Das lässt vermuten, dass der "Bindungstag" die Wechselwirkungen zwischen Substrat und Rezeptor wahrscheinlich nicht stört und diese Experimente bezüglich der Versuchskonditionen mit früheren (Caesar, 2003) vergleichbar sind, die Grundvoraussetzung für den unmittelbaren Vergleich der potenziellen Transportwege von Rpf1 und Imp4. Parallelen werden in Folgendem sichtbar: Kap114, Kap104 und Kap95 zeigten prägnante Bindungen zu beiden Proteinen. Srp1 verstärkte die Interaktion mit Kap95 in keinem Fall, es handelt sich also vermutlich weder bei Rpf1 noch bei Imp4 um einen klassischen NLS-Protein-Import. Die Bindung zu Nmd5 war bei beiden Proteinen schwächer als zu den oben genannten. Pse1 und Kap123 interagierten nicht bis kaum merklich mit Rpf1 und Imp4. Geringfügige Abweichungen waren bei den Wechselwirkungen mit Kap120 und Sxm1 zu erkennen: Rpf1 interagierte stärker als Imp4 mit Kap120 und bei Sxm1 war es umgekehrt. Insgesamt sieht man also deutliche Analogien im Bindungsverhalten von Rpf1 und Imp4 zu den Importrezeptoren. Ein prägnanter Unterschied fällt lediglich in den *in vivo*-Lokalisierungsstudien auf. Während im Falle von Imp4 in der $\Delta kap114\Delta kap120\Delta nmd5$ -Deletionsmutante keine Misslokalisierung zu erkennen war (Abb. 28), sah man bei Rpf1 zwar bei den jeweiligen Einfach-Deletionsmutanten ebenfalls keine Misslokalisierung, jedoch war das GFP-Fusionsprotein in der Triple-Mutante eindeutig im Cytosol misslokalisiert (Caesar, 2003). Eine Erklärung für dieses Ergebnis liegt vermutlich auch in der zuletzt genannten Tatsache, dass Rpf1 *in vitro* stärker mit Kap120 interagiert und Imp4 mehr mit Sxm1. Möglicherweise wäre Imp4 in einer $\Delta kap114\Delta sxm1\Delta nmd5$ -Deletionsmutante misslokalisiert. Wahrscheinlicher ist aber, dass die oben genannten stärkeren Interaktionspartner Kap104 und Kap95 *in vivo* einen größeren Effekt zeigen als Sxm1. Das bleibt zu überprüfen.

Das essenzielle Rfc2 wurde zunächst in Co-Reinigungsstudien in Komplex mit Kap114 gefunden. Lokalisierungsstudien mit einer *KAP114*-deletierten Mutante führten jedoch zu keiner atypischen Verteilung von Rfc2 in der Zelle; diese stimmte mit der physiologischen, d. h. hauptsächlich nukleären überein. Auch die Deletion des *KAP120*- sowie des *NMD5*-Gens brachte keinen weiteren Aufschluss über den bzw. die primären Importwege von Rfc2. Auch diese beiden Rezeptoren übten unmittelbar keinen sichtbaren Effekt auf die Lokalisierung von Rfc2 aus. Eine Erklärung lieferten erst die daran angeschlossenen *in vitro*-Bindungsstudien mit den rekombinanten Proteinen. Darin ist zu sehen, dass zwar alle drei Importine an Rfc2 gebunden haben und die Komplexe durch Gsp1-GTP auch mehr oder weniger stark wieder aufgelöst wurden, es sich hierbei durchaus um Importrezeptoren von Rfc2 handeln könnte, diese jedoch wahrscheinlich nur Nebenwege darstellen. Die Bindung an den klassischen NLS-Protein-Transportkomplex bestehend aus Srp1 und Kap95 war um ein Vielfaches größer (ca. 30-fach). Auf die Kooperativität dieser Bindung wird in Kapitel 4.7.1 näher eingegangen. Dadurch wird klar, dass die Deletion von *NMD5*, *KAP114* und *KAP120* *in vivo* praktisch keine Auswirkung auf die Lokalisierung von Rfc2 haben konnte. Pse1 und Sxm1 zeigten ähnlich schwache Interaktionen wie Nmd5, Kap114 und Kap120. Die Ablösung durch Gsp1-GTP war im Falle von Pse1 relativ groß, bei Sxm1 nur sehr gering. Kap123 interagiert überhaupt nicht mit Rfc2. Die Bindung an Kap104 war andererseits etwa fünf Mal so stark wie die der schwachen Interaktionspartner und machte ca. 1/7 der Interaktion mit Srp1/Kap95 aus. Die Dissoziation durch Gsp1-GTP war wiederum gering. Wie bereits des Öfteren erwähnt, kann dies mit dem möglichen Fehlen eines zusätzlich notwendigen Faktors zusammenhängen. Rfc2 ist damit vermutlich ein weiteres Beispiel dafür, dass essenzielle Proteine oft über mehrere Transportwege in den Zellkern importiert werden, um das Überleben der Zelle auf verschiedene Arten abzusichern. Zusätzlich zu Rpf1 seien an dieser Stelle auch die ribosomalen Proteine Rps5 sowie Rpl3 und die "Core"-Histone genannt, welche ebenfalls über alternative Transportwege in den Zellkern importiert werden (Greiner, 2001; Mosammaparast *et al.*, 2001a; Mosammaparast *et al.*, 2001b). Auffällig ist aber auch die Tatsache, dass sowohl Imp4 als auch bei Taf4 und Rfc2 mindestens einen essenziellen Importrezeptor binden, was ein generelles Prinzip für den Import essenzieller Kernproteine zu sein scheint.

Auch dass Gsp1-GTP alleine des Öfteren nicht in der Lage ist, Importkomplexe vollständig zu dissoziieren, sondern dass weitere Faktoren notwendig sind, ist kein neues Phänomen. So ist für die Ablösung von Tbp1 von Kap114 zusätzlich TATA-enthaltende DNA notwendig (Pemberton *et al.*, 1999), im Fall der Dissoziation von Npl3 und Mtr10 mRNA (Senger *et al.*,

1998) bzw. bei Rpf1 von Kap120 rRNA (Dr. Stefanie Caesar, persönliche Mitteilung). Für Imp4 könnte eine Interaktion mit der Prä-rRNA notwendig sein. Neben anderen Proteinen vermittelt Imp4 die Interaktion zwischen der U3 snoRNA und der Prä-rRNA bei deren Prozessierung. Somit würde Imp4 nur bei Bedarf aus dem Importkomplex freigesetzt. In Analogie zu Tbp1 sollte ebenfalls die TATA-enhaltende DNA die Disassemblierung des Taf4/Rezeptor-Komplexes fördern, da beide Proteine an derselben funktionellen Einheit, dem allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIID, beteiligt sind. In einer Linie bleibend läge dann im Falle von der Replikationsfaktor C-Untereinheit Rfc2 nahe, dass die zu replizierende DNA eine unterstützende Wirkung auf die Auflösung des Substrat/Rezeptor-Komplexes haben könnte.

4.7. Rfc2 wird über den klassischen NLS-Importweg in den Zellkern transportiert

4.7.1. Rfc2 interagiert *in vitro* direkt mit den Transportfaktoren des klassischen Importweges und wird durch Bindung von Gsp1-GTP an Kap95 wieder von diesem Komplex abgelöst

Proteine, die eine klassische Kernlokalisierungssequenz (NLS) enthalten, werden in *S. cerevisiae* in einem trimeren Komplex zusammen mit Srp1 und Kap95 in den Zellkern importiert. Dabei dient Srp1 als Adapterprotein, welches das Substrat bindet, und Kap95 schleust den Importkomplex über den NPC in den Nukleus (Enenkel *et al.*, 1995). Bei dieser Interaktion handelt es sich um eine kooperative Bindung. Das bedeutet, dass Kap95 allein nicht und Srp1 allein nur schwach mit dem Substrat wechselwirkt und die Bindung erst durch die Anwesenheit aller Komponenten verstärkt wird. Man erklärt sich dies dadurch, dass Srp1 eine autoinhibitorische Sequenz (IBB) besitzt, welche die NLS-Bindungstasche in Abwesenheit von Kap95 abdeckt, so dass das Substrat an einer Bindung sterisch gehindert wird. Erst wenn Kap95 mit der IBB interagiert, liegt die Bindungsstelle frei und das NLS-Protein bindet an Srp1 (Kobe, 1999).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch die Replikationsfaktor C-Untereinheit Rfc2 *in vitro* einen ternären Komplex mit Srp1 und Kap95 bildet (Abb. 36). Die Interaktion von Rfc2 mit Srp1 allein ist schwächer als die des Heterotrimers; die sehr schwache Bindung von Kap95 an Rfc2 ist eher als unspezifisch einzuschätzen. Kap95 bestärkt demnach Srp1 in seiner

Fähigkeit, Rfc2 zu binden, was das Modell der Kooperativität der Bindung zum NLS-Protein bestätigt.

Ein zweites Kriterium des klassischen NLS-Transports ist die Auflösung des eingeschleusten Komplexes durch Gsp1-GTP (Floer *et al.*, 1997; Gilchrist *et al.*, 2002). Die kleine GTPase interagiert mit Kap95, welches vom trimeren Komplex abgelöst und auf diesem Weg wieder ins Cytoplasma rückgeführt wird. Auf diese Art wurde auch der Rfc2/Srp1/Kap95-Komplex dissoziiert. Nach Zugabe von Gsp1-GTP ging die Bindung sowohl von Srp1 als auch Kap95 an den Komplex in gleichem Maße auf ein Minimum zurück. Die Ablösbarkeit des NLS-Protein/Srp1-Heterodimers aus dem Komplex mit Kap95 wurde folglich nachgewiesen.

Auch Nup2 ist an der Disassemblierung des trimeren Transportkomplexes beteiligt. Es interagiert zwar nicht mit der NLS-Bindungsstelle von Srp1, beschleunigt jedoch die Freisetzung des Substrats durch seine höhere Affinität zu Srp1 (Hahn-Quintes, 2004; Solsbacher *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte *in vitro* keine Ablösung des NLS-Proteins durch Nup2 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da jedoch seine Beteiligung am Transportprozess von Rfc2 *in vivo* nachgewiesen wurde (4.7.4), ist anzunehmen, dass zur Auflösung des Importkomplexes das Zusammenwirken mit Gsp1-GTP oder weiterer Faktoren erforderlich ist.

Auch der Nukleotidaustauschfaktor Prp20 bildet mit Srp1 und Kap95 einen stabilen ternären Komplex, welcher wie der Komplex mit Rfc2 durch Gsp1-GTP wieder aufgelöst wird (Solsbacher *et al.*, 2000). Allerdings wird in diesem Fall das Heterotrimer komplett durch Zugabe von Nup2 aufgelöst, was bei dem Komplex mit Rfc2 keine Wirkung zeigte. Ein im Prinzip vergleichbares Ergebnis wurde bezüglich der Kooperativität der Bindung zwischen Substrat und Srp1/Kap95 erzielt, mit dem Unterschied, dass der Effekt im Falle von Prp20 wesentlich stärker ausgeprägt war. Analoge Resultate wurden mit der NLS des SV40 T-Antigens erhalten (Solsbacher *et al.*, 2000). Cdc6, ein Regulator bei der Bildung von DNA-Replikationskomplexen (Cocker *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1995), besitzt von den drei Proteinen die höchste Affinität zum Srp1/Kap95-Heterodimer (Hahn-Quintes, 2004). Deshalb konnte eine Kooperativität der Bindung nur am Cdc6-N50-Fragment nachgewiesen werden, nicht am Volle-Länge-Protein. Die Dissoziation des Importkomplexes durch Gsp1-GTP erfolgte nur teilweise, erst Nup2 löste den Komplex vollständig auf (Hahn-Quintes, 2004).

Ingesamt lässt sich also feststellen, dass beim nukleocytoplasmatischen Import verschiedener cNLS-tragender Proteine die gleichen Faktoren beteiligt sind, diese aber mit unterschiedlich ausgeprägten Affinitäten miteinander interagieren.

4.7.2. Mutationen des *SRP1*- und des *KAP95*-Gens führen zu Defekten beim nukleären Import von Rfc2

In dieser Arbeit wurde durch *in vivo*-Lokalisationsstudien nachgewiesen, dass der nukleocytoplasmatische Import der Replikationsfaktor C-Untereinheit von den Transportfaktoren Srp1 und Kap95 abhängig ist (Abb. 37). Dazu wurden Hefestämme benutzt, die genomische Mutationen innerhalb des *KAP95/RSL1*- bzw. des *SRP1*-Gens aufweisen (Hahn-Quintes, 2004; Koepf *et al.*, 1996; Yano *et al.*, 1994). Bei der Mutante *srp1-31* ist kurz vor der großen NLS-Bindungsstelle ein Aminosäurerest ausgetauscht, bei *srp1-49* innerhalb der großen Bindungsstelle und bei *srp1-54* innerhalb der Nup2-Bindungsstelle. Man könnte vermuten, dass sich die Punktmutation innerhalb der großen NLS-Bindungsstelle stärker auswirkt als die vor der Bindungsstelle, jedoch ist das Gegenteil der Fall: die Mutante *srp1-31* zeigt im Vergleich zu *srp1-49* die stärkere cytoplasmatische Misslokalisierung. Offensichtlich spielt die Region vor der Bindungsstelle ebenfalls eine gewisse Rolle und die Mutation innerhalb der Region wirkt sich nicht allzu gravierend auf den nukleären Import aus. Aber da es in beiden Fällen Misslokalisierungen gibt und unter Hinzuziehen der *in vitro*-Ergebnisse (Abb. 36) der Bindungsversuche mit isolierten rekombinanten Proteinen lässt sich schlussfolgern, dass Srp1 am nukleären Import von Rfc2 beteiligt ist. Die Punktmutation an der Nup2-Bindungsstelle hat einen ähnlich starken Effekt wie bei *srp1-31*. Das bedeutet, dass Nup2 *in vivo* beim Transport von Rfc2 in den Zellkern eine nicht unerhebliche Rolle spielt, auch wenn die Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsstudien dies nicht bestätigten (Daten nicht gezeigt). Jedoch bekräftigen diese Resultate das Modell, dass Nup2 das an Srp1 gebundene NLS-Protein - in diesem Fall Rfc2 - ablöst und der Importfaktor nach Export ins Cytoplasma so für einen erneuten Importzyklus zur Verfügung gestellt wird. Passiert dies nicht, akkumuliert Rfc2 sowie jedes andere NLS-Protein im Cytoplasma. Auch für die *KAP95*-Mutante *rs11-1* ist bereits bekannt, dass sie Defekte bezüglich des klassischen NLS-Proteintransports durch Srp1 und Kap95 aufweist. Hier wurde gezeigt, dass Rfc2 in dieser Mutante deutlich im Cytoplasma verbleibt und somit der Import von Rfc2 in der Mutante gestört ist. Insgesamt deutet das darauf hin, dass Rfc2, obwohl es aufgrund seiner Größe von 39,7 kDa grundsätzlich möglich wäre, wahrscheinlich nicht durch die Kernpore in den Nukleus diffundiert, sondern nur über den aktiven Transportmechanismus importiert wird. Zusammengefasst bedeutet das also, dass sowohl Srp1 und Kap95 als auch Nup2 am Importzyklus von Rfc2 beteiligt sind. Für Gsp1-GTP wurde nur ein Zusammenhang *in vitro* nachgewiesen. Demnach kann folgendes Modell aufgestellt werden: Kap95 bindet über Srp1 an Rfc2, schleust den Komplex durch den NPC in

den Kern, wo Gsp1-GTP an Kap95 bindet. Unter zusätzlichem Mitwirken von Nup2 wird der Komplex aufgelöst. Der Transportfaktor kann durch Cse1 wieder ins Cytoplasma rückgeführt werden.

Diese *in vivo*-Lokalisierungsdaten von Rfc2 in den *KAP95*- und *SRP1*-Mutanten ähneln stark denen der SV40 T-Antigen-NLS. Die größte cytoplasmatische Misslokalisierung gab es bei der Mutante *srp1-31*, gefolgt von *rs11-1* sowie *srp1-54* in etwa vergleichbarem Ausmaß und den geringsten, aber immer noch deutlichen Effekt gab es bei *srp1-49* (Hahn-Quintes, 2004). Anders sieht es nun bei Cdc6 und Prp20 aus. Zwar zeigte sich bei *rs11-1* sowie *srp1-54* eine deutliche cytoplasmatische Misslokalisierung, jedoch war bei *srp1-31* nur wenig bis kein Effekt, bei *srp1-49* überhaupt keine Misslokalisierung zu sehen (Hahn-Quintes, 2004). Zusammenfassend bedeutet das also, dass die Versuchsergebnisse zum klassischen NLS-Import in den Zellkern, wenn auch prinzipiell durch die gleichen Faktoren realisiert, bei verschiedenen Substraten durchaus unterschiedlich ausgeprägt sein können. Darauf deuteten auch bereits die Resultate der *in vitro*-Bindungsstudien hin, die nur zum Teil bei den einzelnen Proteinen übereinstimmten (4.7.1). Das lässt vermuten, dass zum einen die Bindungen der Substrate zu den jeweiligen Interaktionsstellen eine unterschiedliche Affinität haben und zum anderen weitere Faktoren in der Zelle eine Rolle spielen können.

4.7.3. Rfc2 besitzt am N-Terminus eine klassische Kernlokalisierungssequenz

Durch eine Analyse der Sequenz von Rfc2 wurde am N-Terminus eine potenzielle Kernlokalisierungssequenz (AS 9 - 12) vorhergesagt. Diese besteht aus den basischen Aminosäureresten KKRK, welche in der Lage sein könnten, mit den Tryptophan- und Asparaginresten der großen Bindungstasche von Srp1 zu interagieren. Durch *in vivo*-Untersuchungen zur Lokalisierung verschiedener Deletionen von Rfc2 wurde gezeigt, dass der nukleäre Import des Proteins hauptsächlich durch den Bereich AS 1 - 31 bewerkstelligt wird (Abb. 39). Diese Region ist ausreichend, um eine nukleäre Verteilung des Proteins zu gewährleisten. Eine Deletion des N-Terminus um die ersten 15 Aminosäurereste führte zu einer fast vollständigen Misslokalisierung von Rfc2 im Cytoplasma, was gleichbedeutend mit der Notwendigkeit dieses Bereiches für den Import ist. Für den dennoch in geringem Ausmaß vorhandenen Transport in den Zellkern gibt es diverse Erklärungsansätze. Zum einen könnten weitere Aminosäurereste außerhalb der untersuchten Sequenz an der Translokation in den Nukleus beteiligt sein. Zum anderen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass neben dem Heterodimer Srp1/Kap95 weitere Importin β -Homologe Transportrezeptoren *in vitro* mit Rfc2

interagieren (Abb. 36). Das ist ein Indiz dafür, dass *in vivo* auch andere Rezeptoren am Import des Substrats in den Zellkern beteiligt sein und über eine andere NLS an das Protein binden könnten. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass AS 1 - 31 ausreichend und AS 1 - 15 notwendig für den nukleären Import von Rfc2 sind. Es handelt sich dabei um eine monopartite Kernlokalisierungssequenz.

4.7.4. Nup2 ist am klassischen NLS-Transport von Rfc2 in den Nukleus beteiligt

Das Hefe-Nukleoporin Nup2 liegt in erster Linie mit der nukleären Korbstruktur des Kernporenkomplexes assoziiert vor (Solsbacher *et al.*, 2000) und ist sowohl für den effizienten Srp1/Kap95-vermittelten nukleären Protein-Import als auch für den effizienten nukleären Export von Srp1 erforderlich (Booth *et al.*, 1999; Hood *et al.*, 2000; Solsbacher *et al.*, 2000). Seine Interaktionsstelle ist eine andere als die für die NLS-Erkennung (Hahn-Quintes, 2004). Nup2 bindet Srp1 in einigen Fällen stärker als das NLS-Protein (Hahn-Quintes, 2004) und beschleunigt die Freisetzung des Substrats von Srp1. Nup2 selbst wird nur in Anwesenheit der Importin β -bindenden Domäne durch Cse1/Gsp1-GTP von Srp1 freigesetzt (Matsuura *et al.*, 2003; Solsbacher *et al.*, 2000). Dies führte zu einem Modell, bei dem Nup2 die Disassemblierung des Substrat/Transportrezeptor-Importkomplexes mit der nachfolgenden Rückführung von Srp1 ins Cytoplasma verbindet (Matsuura *et al.*, 2003; Solsbacher *et al.*, 2000). Für Cbp80, Clb2, Cdc45, Swi5, Prp20 und Cdc6 wurde bereits gezeigt, dass Nup2 am klassischen NLS-Protein-Import beteiligt ist (Gilchrist *et al.*, 2002; Hahn-Quintes, 2004). In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die vollständige Deletion des *NUP2*-Gens auf den nukleären Import von Rfc2 in der Hefezelle auswirkt (Abb. 37). In Lokalisierungsstudien wurde der nukleocytoplasmatische Transport dieses Proteins in Hefe-Wildtypzellen mit dem in einer $\Delta nup2$ -Mutante verglichen. Im Gegensatz zum Wildtyp mit dem hauptsächlich nukleären Signal ergab sich bei der Mutante ein eher cytoplasmatisches Signal. Das bedeutet, der Import von Rfc2 ist im zuletzt genannten Hefestamm gestört, woraus sich ableiten lässt, dass Nup2 für den Rfc2-Import notwendig ist. Aus den Experimenten wird jedoch nicht ersichtlich, ob die Misslokalisierung daher rührt, dass durch das Fehlen von Nup2 die Freisetzung des Substrats von Srp1 verzögert oder dessen Export verlangsamt wird.

4.8. Die Rolle von Rfc2/RFC2, Srp1/Importin α und Cse1/CAS bei der Mitose und der Pathogenese

Sowohl Cse1/CAS als auch Srp1/Importin α und Rfc2/RFC2 sind erwiesenermaßen am Fortschreiten des Zellzyklus beteiligt. Es wurde nachgewiesen, dass Hefezellen, die eine konditionelle Mutation von *SRP1* enthalten, mit einem G₂-Gehalt an DNA in der Mitose verbleiben. Diese Zellen zeigen anormale Strukturen und Ausrichtungen der mitotischen Spindel, abweichende Chromosomen- und Nukleussegregation und vom nukleären "DNA-Knäuel" ausstrahlende Chromatinfäden. Dieser Phänotyp deutet darauf hin, dass Srp1 für die normale Funktion der Mikrotubuli und der Spindelpolkörper sowie die nukleäre Integrität notwendig ist (Küssel und Frasch, 1995b; Yano *et al.*, 1994). Für den G₂/M-Phänotyp ist möglicherweise eine ausbleibende Degradation des mitotischen Cyclins Clb2 verantwortlich (Loeb *et al.*, 1995), wodurch die korrespondierenden Cyclin-abhängigen Kinasen aktiviert sowie die entsprechenden Schlüsselproteine phosphoryliert bleiben und der Zellzyklus nicht in die nächste Phase eintritt. Auch für Importin α wurde eine Beteiligung bei der Mitose nachgewiesen. Zu deren Beginn sind Importin α/β -Komplexe an die NLSs mehrerer Proteine gebunden, die die Bildung der mitotischen Spindel und die Anheftung der Chromosomen regulieren. Die Spindelasssemblierungsfaktoren sind somit blockiert. Durch Ran-GTP werden sie vermutlich freigesetzt und aktiviert (Ems-McClung *et al.*, 2004; Gruss *et al.*, 2001; Schatz *et al.*, 2003). In Analogie dazu wurde festgestellt, dass Mutationen des *Drosophila*-Homologs Pendulin zu abnormem hämatopoetischem Zellwachstum führen, weshalb dieses Protein als Blutzell-Tumorsuppressor angesehen wird (Küssel und Frasch, 1995a).

Deletionen von *CSE1* in Hefe haben Chromosomenmissegregationen und Zellzyklusarrest während der Mitose zur Folge (Schroeder *et al.*, 1999a; Xiao *et al.*, 1993). Für das humane Homolog CAS wurde gezeigt, dass es in der Interphase z. T. mit den Mikrotubuli assoziiert und während der Mitose mit der mitotischen Spindel, für deren korrekte Assemblierung und Funktion es notwendig ist. Scheinbar paradoxerweise spielt es gleichzeitig eine Rolle bei der Zellproliferation sowie bei der Zellapoptose (Scherf *et al.*, 1996). Gene, die diese beiden Vorgänge regulieren wie z. B. *MYC*, *P53* und *BLC2*, können auch als Onkogene fungieren, was auf eine mögliche Beteiligung von CAS bei Krebs hindeutet. Im Zusammenhang damit wurde eine erhöhte Expression von CAS bei Leukämie-, Kolon- und Brustkrebs-Zelllinien, bei follikulären Lymphomen, hepatozellulären Karzinomen, malignen Melanomen, multiformen Glioblastomen und Harnblasen-Karzinomen (Behrens *et al.*, 2003; Brinkmann, 1998) nachgewiesen. In Mäusen wurde ein Zusammenhang von *CSE1L* und der Embryogenese festgestellt, einem Prozess, der ebenfalls mit einer starken Zellproliferation

einhergeht. Homozygote *CSEIL*-“Knockout“-Mäuse ließen einen embryonalen letalen Phänotyp erkennen und waren nicht lebensfähig (Bera *et al.*, 2001). Dieses Protein scheint also für die natürliche Vermehrung von Zellen unerlässlich zu sein. Sind allerdings die Kontrollmechanismen außer Kraft gesetzt, die diesen Prozess regulieren, hat dies unbeschränkte Zellteilung zur Folge. In *Saccharomyces cerevisiae* wurden verschiedene Rfc2 enthaltende Komplexe nachgewiesen, die an der Aufrechterhaltung eines normalen Zellwachstums beteiligt sind. Elg1, welches mit RFC2-5 einen alternativen RFC-artigen Komplex bildet, ist für die Beibehaltung der genomischen Stabilität notwendig und seine Funktion ist mit der DNA-Replikation oder der “damage checkpoint“-Antwort verbunden (Ogiwara *et al.*, 2007). Es wurden weitere verwandte Klammerlader (“clamp loader“) identifiziert. Diese alternativen Klammerlader enthalten ebenfalls die Rfc2-5-Untereinheiten von RFC und ersetzen Rfc1 durch Rad24 für den DNA-“damage checkpoint“ (Bylund *et al.*, 2006; Naiki *et al.*, 2001; Naiki *et al.*, 2000) sowie durch Ctf18 für die Bildung der Schwesterchromatid-Kohäsion (Bylund *et al.*, 2006; Naiki *et al.*, 2001). In höheren Eukaryoten entsteht Krebs, wenn sich Mutationen ansammeln, die in einer einzelnen Zelle und in ihren Nachkommen Proto-Onkogene aktivieren und Tumorsuppressorgene inaktivieren. Die ungenaue Reparatur von DNA-Doppelstrang-Brüchen kann zu dieser Art genomischer Instabilität und nachfolgend zum Zelltod oder zur Entwicklung von Krebs führen. Es wurde gezeigt, dass in humanen Glioblastom-Zellen das *RFC2*-Gen häufig amplifiziert ist (Nakahara *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004) und die *RFC2*-Expression in Trophoblasten-Tumoren während der Schwangerschaft erhöht ist (Cui *et al.*, 2004). Daneben wurden RFC2 und RFC3 als c-MYC assoziierte Proteine identifiziert. Das c-MYC-Onkogen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der für die Induktion der zellulären Proliferation erforderlich ist. Neben seiner Funktion als mitogener Transkriptionsfaktor reguliert c-MYC die zelluläre Proliferation auch durch direkte Assoziation mit Proteinkomplexen, die in vielfältige synthetische Prozesse der Zellteilung involviert sind, z. B. DNA-Replikation/ -Reparatur und RNA-Prozessierung (Koch *et al.*, 2007). Für 19 renale Zellkarzinom-Zelllinien wurden mittels molekularer zytogenetischer Analyse die komplexen Muster der genomischen Imbalancen und Umstellungen dargelegt. Wiederauftretende Änderungen auf Chromosom 7 führten zu einer Erhöhung des RFC2-Gens. Weitere genomische “microarray“-Umstellungen führen zu einer Erhöhung von MYC. Diese Abweichungen könnten also wichtige Wege bei der renalen Krebspathogenese darstellen (Strefford *et al.*, 2005). Außerdem wurde eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die mit BRCA1 (“breast cancer susceptibility gene 2“) assoziiert sind und zusammen einen großen Komplex bilden. Neben verschiedenen

Tumorsuppressoren und DNA-Reparaturproteinen (MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM, RAD50-MRE11-Proteinkomplex) nimmt auch der Replikationsfaktor C an diesem Komplex teil. Es wurde gefunden, dass BRCA1, die BLM-Helicase und der RAD50-MRE11-Komplex in großen nukleären Foci co-lokalisieren, die PCNA enthalten, wenn die Zellen mit Wirkstoffen behandelt werden, die mit der DNA-Synthese interferieren. Man vermutet, dass BRCA1 als Koordinator vieler Vorgänge dient, die für die Erhaltung der genomischen Integrität während der DNA-Replikation erforderlich sind, und somit eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur spielt (Wang *et al.*, 2000). Die Deletion des *BRCA1*-Gens in Mäusen führte zu embryonaler Letalität (Gowen *et al.*, 1996; Hakem *et al.*, 1996) und zur Bildung von Brusttumoren (Xu *et al.*, 1996).

Es wird deutlich, dass sowohl Cse1/CAS und Srp1/Importin α als auch Rfc2/RFC2 in sehr komplexe Vorgänge beim Fortschreiten des Zellzyklus sowie der Tumorgenese involviert sind. Alle drei Proteine sind an der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beteiligt. Rfc2/RFC2 fungiert eher in der die Mitose vorbereitenden Phase, Srp1/Importin α und Cse1/CAS in der Mitose selbst. RFC2 und CAS wirken beide bei der Embryogenese mit. Alle drei Proteine lassen sich mit der Krebspathogenese in Zusammenhang bringen, so sind RFC2 und CAS beispielsweise in die Glioblastom- und Brustkrebsbildung involviert. In dieser Arbeit konnte allerdings kein direkter Zusammenhang zwischen Cse1 und Zellzyklusvorgängen und daraus eventuell resultierend zwischen CAS und der Tumorbildung festgestellt werden. Vielmehr kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlossen werden, dass Cse1 in seiner Funktion als Exportrezeptor daran beteiligt ist (Abb. 40). Cse1 exportiert Srp1 aus dem Nukleus zurück ins Cytoplasma. Dort steht es dann in genügendem Maße bereit, um in Komplex mit Kap95 den Zellzyklusfaktor Rfc2 in den Zellkern zu importieren, wo dieser wiederum seiner Rolle bei der Zellvermehrung gerecht werden kann. Ein analoges Modell wäre für das humane System denkbar. Für Importin α wurde bereits nachgewiesen, dass es Zellzyklusfaktoren wie das Retinoblastom-Genprodukt, p53 und BRCA1 in den Nukleus transportiert, welche alle drei mit der Genese verschiedener Tumoren in Zusammenhang gebracht werden (Kim *et al.*, 2000; Middeler *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). Zusammenfassend kann man also sagen, dass zwischen Cse1, Srp1 und Rfc2 eine logische Verknüpfung bezüglich Zellzyklus, Zellteilung und Zellvermehrung besteht.

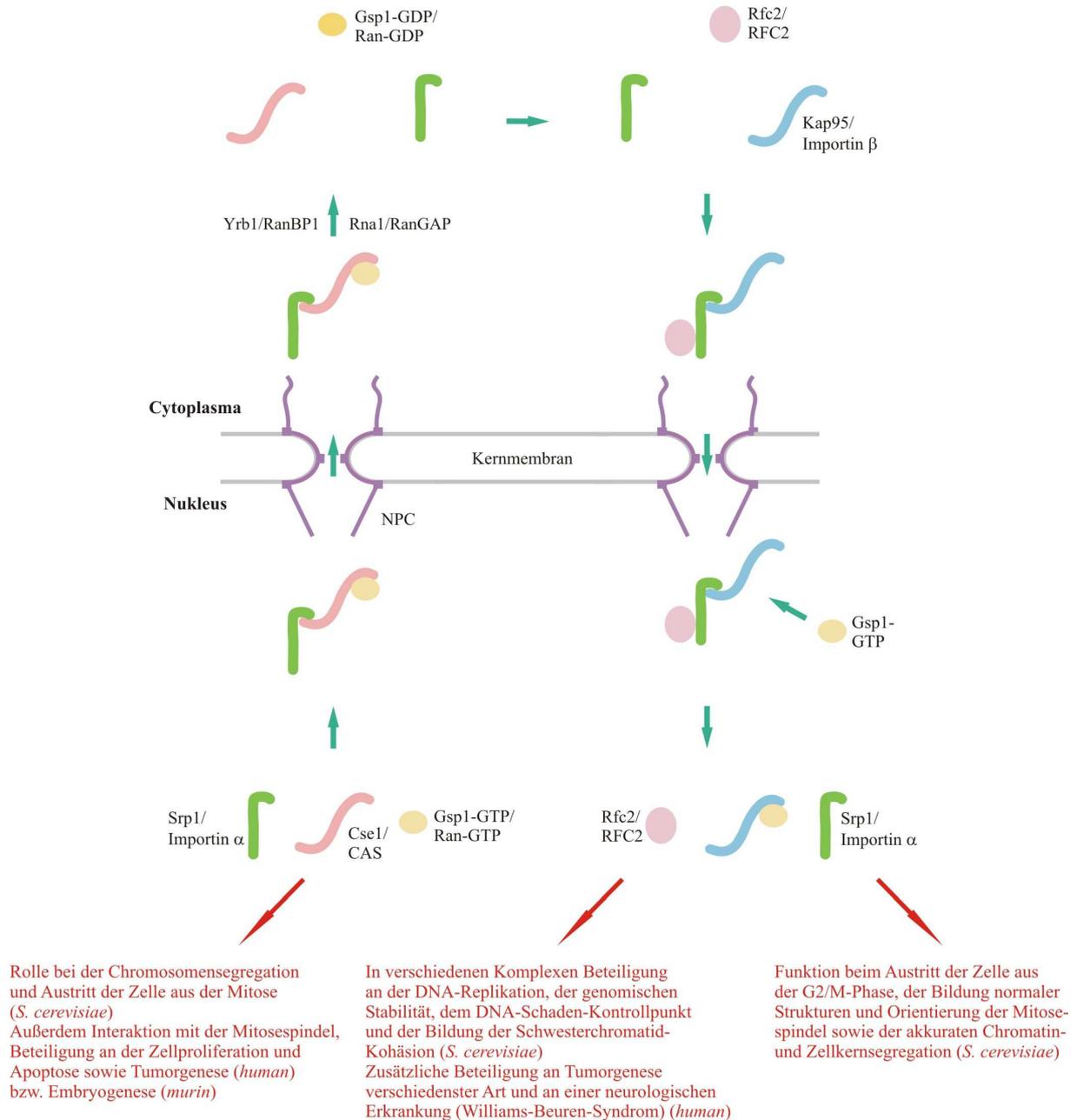


Abb. 40: Modell zur Verknüpfung von Cse1/CAS, Srp1/Importin α und Rfc2/RFC2 beim Zellzyklus

Cse1 exportiert Srp1 aus dem Zellkern, welches dann wiederum zur Verfügung steht, zusammen mit Kap95 sein Substrat Rfc2 in den Nukleus zu importieren. Dieses Protein ist an der DNA-Replikation, der genomischen Stabilität, dem DNA-Schaden-Kontrollpunkt und der Bildung der Schwesterchromatid-Bildung beteiligt, im Säuger zudem an der Tumorgenese. Über den dargestellten Weg wird in dieser Arbeit also, anders als in früheren Veröffentlichungen postuliert, nur ein mittelbarer Zusammenhang von Cse1 und Srp1 an der Zellvermehrung aufgewiesen. (Einschub: Das Williams-Beuren-Syndrom ist eine komplexe neurologische Entwicklungsstörung, die durch eine Mikrodeletion in der Region, die das *RFC2*-Gen enthält, hervorgerufen wird (Martindale *et al.*, 2000) und sich schon während der embryonalen Entwicklung bemerkbar macht.)

5. Zusammenfassung/ Summary

Der Transport von Proteinen in und aus dem Zellkern erfolgt in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe von 14 löslichen Importin β -homologen Transportrezeptoren und der RanGTPase (Gsp1), die den Ablauf der Translokation reguliert. In dieser Arbeit wurden die Importrezeptoren Kap95, Kap114 und Kap120, daneben der Exportfaktor Cse1 sowie das Adapterprotein Srp1 und der GTPase-Koaktivator Yrb1 biochemisch und molekularbiologisch untersucht. Nach Zellfraktionierung und Affinitätschromatographie wurden diverse Interaktionspartner für diese Proteine detektiert. Insbesondere die Replikationsfaktor C-Untereinheit Rfc2 wurde als Substrat für den heterodimeren Importkomplex Srp1/Kap95 (Importin α /Importin β) näher charakterisiert. Dieser Komplex schleust Substrate mit einem basischen klassischen Kernlokalisierungssignal (NLS) über den Kernporenkomplex in den Zellkern, wo er unter Mitwirkung von Gsp1-GTP und dem Nukleoporin Nup2 disassembliert. Rfc2 wurde zunächst als endogener Komplex mit Kap114 aus Hefe-Cytosol isoliert. Da jedoch die Deletion des *KAP114*-Gens keine Wirkung auf den nukleären Import des Proteins zeigte, wurde in Bindungsstudien mit rekombinant in *E. coli* hergestellten und gereinigten Proteinen die Affinität dieses Substrates zu verschiedenen Importrezeptoren untersucht. Es zeigten sich schwache bis mäßig starke Interaktionen zwischen Rfc2 und Kap114, Nmd5, Kap120, Kap95, Pse1, Kap104 sowie Sxm1. Eine starke Bindung an Srp1 wurde beobachtet, die auch Kap95 erfordert. In einer $\Delta nup2$ - sowie verschiedenen temperatursensitiven *SRP1*- und *KAP95*-Mutanten wurden *in vivo*-Defekte im Import von Rfc2 nachgewiesen. Somit wurde Rfc2 als ein klassisches Imports substrat für Importin α identifiziert. Vier basische Aminosäurereste im N-terminalen Bereich bilden ein monopartites klassisches Kernlokalisierungssignal.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* proteins are transported into and out of the nucleus by fourteen soluble Importin β -homologous transport receptors and the RanGTPase (Gsp1), that regulates the process of translocation. In this work the import receptors Kap95, Kap114 and Kap120, the export factor Cse1, the adaptor molecule Srp1 and the GTPase coactivator Yrb1 were examined in a biochemical and molecularbiological manner. Different interaction partners of these proteins were detected after cell fractionation and affinity chromatography. Especially the replication factor C subunit Rfc2 as a substrate for the heterodimeric import complex Srp1/Kap95 (Importin α /Importin β) was examined in more detail. This complex

channels a substrate with a basic classical nuclear localization signal (NLS) through the nuclear pore complex into the nucleus, where it disassembles under the influence of Gsp1-GTP and the nucleoporin Nup2. First Rfc2 was isolated in an endogenous complex with Kap114 from yeast cytosolic fraction. Deletion of the *KAP114* gene did not show any effect on the nuclear import of the protein, so that its affinity to different import receptors was investigated in binding studies with recombinant and purified proteins from *E. coli*. There were found weak to moderate interactions between Rfc2 and Kap114, Nmd5, Kap120, Kap95, Pse1, Kap104 as well as Sxm1. A strong interaction with Srp1, that requires Kap95, was observed. When *SRP1*, *KAP95* and *NUP2* genes were mutated or deleted in yeast cells, the strains showed defects in the import of Rfc2. By this way Rfc2 was identified as a classical import substrate of Importin α . Four basic amino acid residues at the N-terminus form a monopartite classical nuclear localization signal.

6. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (1998). Essential cell biology - An Introduction to the molecular biology of the cell.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson J.D. (1990). Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage edn).
- Allen, T. D., Cronshaw, A. D., Bagley, S., Kiseleva, E. und Goldberg, M. W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *Journ Cell Science* 113, 1651-1659.
- Andrade, M. A. und Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 11, 115-116.
- Barta, I. und Iggo, R. (1995). Autoregulation of expression of the yeast Dbp2p `DEAD-box' protein is mediated by sequences in the conserved *DBP2* intron. *EMBO J* 14, 3800-3808.
- Bayliss, R., Leung, S. W., Baker, R. P., B.B., Q., Corbett, A. H. und Stewart, M. (2002). Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *EMBO J* 21, 2843-2853.
- Behrens, P., Brinkmann, U. und Wellmann, A. (2003). CSE1L/CAS: Its role in proliferation and apoptosis. *Apoptosis* 8, 39-44.
- Beltrame, M. und Tollervey, D. (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S synthesis. *EMBO J* 14, 4350-4356.
- Bera, T. K., Bera, J., Brinkmann, U., Tessarollo, L. und Pastan, I. (2001). Cse1l is essential for early embryonic growth and development. *Mol Cell Biol* 21, 7020-7024.
- Bischoff, F. R. und Görlich, D. (1997). RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin β -related nuclear transport factors. *FEBS Lett* 419, 249-254.
- Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. und Ponstingl, H. (1994). RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2587-2591.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W. und Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J* 14, 705-715.
- Bond, A., Mangus, D. A., He, F. und Jacobson, A. (2001). Absence of Dbp2 alters both nonsense-mediated mRNA decay and rRNA processing. *M cell biol* 21, 7366-7379.
- Bonner, W., M. (1978). Protein migration and accumulation in nuclei. In Bush, H (ed), *The Cell Nucleus* 6, 97-148.
- Booth, J. W., Belanger, K. D., Sannella, M. I. und Davis, L. I. (1999). The yeast nucleoporin Nup2p is involved in nuclear export of importin α /Srp1p. *J Biol Chem* 274, 32360-32367.
- Brinkmann, U. (1998). CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene *CSE1*, in proliferation, apoptosis, and cancer. *Am J Hum Genetic* 62, 509-513.
- Brizzard, B. L., Chubet, R. G. und Vizard, D. L. (1994). Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *BioTechniques* 16, 730-735.
- Bylund, G. O., Majka, J. und Burgers, P. M. (2006). Overproduction and purification of RFC-related clamp loaders and PCNA-related clamps from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 409, 1-11.
- Cadwell, C., Yoon, H. J., Zebarjadian, Y. und Carbon, J. (1997). The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Mol Cell Biol* 17, 6175-6183.
- Caesar, S. (2003). Charakterisierung von Kap120p als Importrezeptor beim nukleocytoplasmatischen Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation zur Erlangung

- des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III -Chemie, Pharmazie und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes.
- Caesar, S., Greiner, M. und Schlenstedt, G. (2006). Kap120 functions as a nuclear import receptor for ribosome assembly factor Rpf1 in yeast. *M cell biol* 26, 3170-3180.
- Chávez, S., Beilharz, T., Rondón, A. G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J. Q., Lithgow, T. und Aguilera, A. (2000). A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 19, 5824-5834.
- Chen, S., West Jr., R. W., Johnsson, S. L., Gans, H., Kruger, B. und Ma, J. (1993). TSF3, a global regulatory protein that silences transcription of yeast *GAL* genes, also mediated repression by $\alpha 2$ repressor and is identical to SIN4. *Mol Cell Biol* 13, 831-840.
- Chi, N. C., Adam, E. J., Visser, G. D. und Adam, S. A. (1996). RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 in nuclear protein import. *J Cell Biol* 135, 559-569.
- Chi, N. C., Adam, E. J. H. und Adam, S. A. (1997). Different binding domains for Ran-GTP and Ran-GDP/RanBP1 on nuclear import factor p97. *J Biol Chem* 272, 6818-6822.
- Chong, S., Mersha, F. B., Comb, D. G., Scott, M. E., Landry, D., Vence, L. M., Perler, F. B., Benner, J., Kucera, R. B., Hirvonen, C. A., *et al.* (1997). Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* 192, 271-281.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. und Müller, C. W. (1999). Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α . *Nature* 399, 221-229.
- Cocker, J. H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K. und Diffley, J. F. X. (1996). An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes in budding yeast. *Nature* 379, 180-182.
- Collins, S. R., Miller, K. M., Maas, N. L., Roguev, A., Fillingham, J. und Chu, C. S. (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* 446, 806-810.
- Connelly, P. R., Varadarajan, R., Sturtevant, J. M. und Richards, F. M. (1990). Thermodynamics of protein-peptide interactions in the ribonuclease S system studied by titration calorimetry. *Biochemistry* 29, 6108-6114.
- Conti, E. und Kuriyan, J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . *Structure* 8, 329-338.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. und Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell* 94, 193-204.
- Cook, A., Fernandez, E., Lindner, D., Ebert, J., Schlenstedt, G. und Conti, E. (2005). The structure of the nuclear export receptor Cse1 in its cytosolic state reveals a closed conformation incompatible with cargo binding. *Mol Cell* 18, 355-367.
- Corbett, A. H., Koeppe, D. M., Schlenstedt, G., Lee, M. S., Hopper, A. K. und Silver, P. A. (1995). Rna1p, a Ran/TC4 GTPase activating protein is required for nuclear import. *J Cell Biol* 130, 1017-1026.
- Cros, J. F. und Palese, P. (2003). Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Research* 95, 3-12.
- Cui, J. Q., Shi, Y. F. und Zhou, H. J. (2004). Expression of RFC2 and PCNA in different gestational trophoblastic diseases. *Ai Zheng* 23, 196-200.
- Cullmann, G., Fien, K., Kobayashi, R. und Stillman, B. (1995). Characterisation of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 4661-4671.
- de la Cruz, J., Iost, I., Kressler, D. und Linder, P. (1997). The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 94, 5201-5206.

- de la Cruz, J., Kressler, D. und Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* 24, 192-198.
- Dragon, F., Gallagher, J. E. G., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., *et al.* (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-970.
- Drakas, R., Prisco, M. und Baserga, R. (2005). A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics* 5, 132-137.
- Dunbar, D. A., Dragon, F., Lee, S. J. und Baserga, S. J. (2000). A nucleolar protein related to ribosomal protein L7 is required for an early step in large ribosomal subunit biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13027-13032.
- Ems-McClung, S. W., Zheng, Y. und Walczak, C. E. (2004). Importin alpha/beta and Ran-GTP regulate XCTK2 microtubule binding through a bipartite nuclear localization signal. *Mol Biol Cell* 15, 46-57.
- Enekel, C., Blobel, G. und Rexach, M. (1995). Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* 270, 16499-16502.
- Fan, H. Y., Merker, R. J. und Klein, H. L. (2001). High-copy-number expression of Sub2p, a member of the RNA helicase superfamily, suppresses hpr1-mediated genomic instability. *Mol Cell Biol* 21, 5459-5470.
- Fatica, A. und Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Curr Opin In Biol* 14, 313-318.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. und Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475-483.
- Floer, M., Blobel, G. und Rexach, M. (1997). Disassembly of RanGTP-karyopherin β complex, an intermediate in nuclear protein import. *J Biol Chem* 272, 19538-19546.
- 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.
- Fried, H. M. und Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60, 1659-1688.
- Fuller-Pace, F. V. (1994). RNA helicases: modulators of RNA structure. *Trends Cell Biol* 4, 271-274.
- Gadal, O., Strauß, D., Kessl, J., Trumpower, B., Tollervey, D. und Hurt, E. (2001). Nuclear Export of 60S Ribosomal Subunits Depends on Xpo1p and Requires a Nuclear Export Sequence-Containing Factor, Nmd3p, That Associates with the Large Subunit Protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21, 3405-3415.
- Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S. und Dümpelfeld, B. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-636.
- Gavin, A. C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Gérczei, T. und Correll, C. C. (2004). Imp3p and Imp4p mediate formation of essential U3-precursor rRNA (pre-rRNA) duplexes, possibly to recruit the small subunit processome to the pre-rRNA. *PNAS* 101, 15301-15306.
- Gilchrist, D., Mykytka, B. und Rexach, M. (2002). Accelerating the rate of disassembly of karyopherin/cargo complexes. *J Biol Chem* 277, 18161-18172.
- Gilchrist, D. und Rexach, M. (2003). Molecular basis for the rapid dissociation of nuclear localization signals from karyopherin α in the nucleoplasm. *Journ Biol Chem* 278, 51937-51949.

- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. und Hartmann, E. (1996a). A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *EMBO J* 15, 1810-1817.
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E. und Prehn, S. (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* 5, 383-392.
- Görlich, D. und Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-670.
- Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U. und Bischoff, F. R. (1996b). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* 15, 5584-5594.
- Gowen, L. C., Johnson, B. L., Latour, A. M., Sulik, K. K. und Koller, B. H. (1996). Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* 12, 191-194.
- Graumann, J., Dunipace, L. A., Seol, J. H., McDonald, W. H., Yates, J. R., Wold, B. J. und Deshaies, R. J. (2004). Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast. *Molecular and Cellular Proteomics* 3, 226-237.
- Greiner, M. (2001). Untersuchungen zum Import von Histonen in den Zellkern von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III -Chemie, Pharmazie und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes.
- Greiner, M., Caesar, S. und Schlenstedt, G. (2004). The histones H2A/H2B and H3/H4 are imported into the yeast nucleus by different mechanisms. *Eur J Cell Biol* 83, 511-520.
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. und Mattaj, I. W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 104, 83-93.
- Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. und Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21^{WAF1/CIP1} complexed with human PCNA. *Cell* 87, 297-306.
- Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11, 394-403.
- Hahn-Quintes, S. (2004). Charakterisierung des klassischen Importweges von NLS-Proteinen in den Zellkern von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III - Chemie, Pharmazie und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes.
- Hakem, R., de la Pompa, J. L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmair, A., Billia, F., *et al.* (1996). The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 85, 1009-1023.
- Hampsey, M. (1998). Molecular Genetics of the RNA polymerase II general transcription machinery. *Micr Mol Biol Rev* 62, 465-503.
- Harreman, M. T. (2003). The auto-inhibitory function of importin alpha is essential *in vivo*. *J Biol Chem* 278, 5854-5863.
- Haushalter, K. A. und Kadonaga, J. T. (2003). Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 613-620.
- Hausmann, A., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Pierik, A., Mühlenhoff, U. und Lill, R. (2005). The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: An essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *PNAS* 102, 3266-3271.
- He, F. und Jacobson, A. (1995). Identification of a novel component of the nonsense-mediated mRNA decay pathway using an interacting protein screen. *Genes Dev* 9, 437-454.
- He, F., Peltz, S. W., Donahue, J. L., Rosbash, M. und Jacobson, A. (1993). Stabilization and ribosome association of unspliced pre-mRNA in a yeast *upf1* mutant. *Proc Natl Acad Sci* 90, 7034-7038.

- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L. und Adams, S. L. (2002). Systematic identification of protein complexes in *S. cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Doebeli, H., Gentz, R. und Stueber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adjustment. *Trends Cell Biol* 7, 139-142.
- Hodges, J. L., Leslie, J. H., Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. und Pemberton, L. (2005). Nuclear import of TFIIB is mediated by Kap114p, a karyopherin with multiple cargo-binding domains. *Mol Biol Cell* 16, 3200-3210.
- Hoelz, A. und Blobel, G. (2004). Popping out of the nucleus. *Nature* 432, 815-816.
- Hood, J. K., Casolari, J. M. und Silver, P. A. (2000). Nup2p is located on the nuclear side of the nuclear pore complex and coordinates Srp1p/importin- α export. *J Cell Sci* 113, 1471-1480.
- Hood, J. K., Hwang, W. W. und Silver, P. A. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* cyclin Clb2p is targeted to multiple subcellular locations by cis- and trans-acting determinants. *J Cell Sci* 114, 589-597.
- Hood, J. K. und Silver, P. A. (1998). Cse1p is required for export of Srp1p/importin- α from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 35142-35146.
- Hopper, A. K., Traglia, H. M. und Dunst, R. W. (1990). The yeast *RNAI* gene product necessary for RNA processing is located in the cytosol and apparently excluded from the nucleus. *J Cell Biol* 111, 309-321.
- Hughes, J. M. X. (1996). Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA. *J Mol Biol* 259, 645-654.
- Hurt, E., Luo, M. J., Röther, S., Reed, R. und Straesser, K. (2004). Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *PNAS* 101, 1858-1862.
- Inoue, K., Mizuno, T., Wada, K. und Hagiwara, M. (2000). Novel RING finger proteins, Air1p and Air2p, interact with Hmt1p and inhibit the arginine methylation of Npl3p. *J Biol Chem* 275, 32793-32799.
- Iovine, M. K. und Wenthe, S. R. (1997). A nuclear export signal in Kap95p is required for both recycling the import factor and interaction with the nucleoporin GLFG repeat regions of Nup116p and Nup100p. *J Cell Biol* 137, 797-811.
- Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C. und Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* 81, 269-278.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., Kobbe, C. v., Mattaj, I. W. und Görlich, D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J* 16, 6535-6547.
- Jäkel, S. und Görlich, D. (1998). Importin β , transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J* 17, 4491-4502.
- Jiang, Y. W. und Stillman, D. J. (1992). Involvement of the SIN4 global transcriptional regulator in the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 4503-4514.
- Jimeno, S., Luna, R., García-Rubio, M. und Aguilera, A. (2006). Tho1, a novel hnRNP, and Sub2 provide alternative pathways for mRNP biogenesis in yeast THO mutants. *Mol Cell Biol* 26, 4387-4398.
- Johnson, A., Yao, N. Y., Bowman, G. D., Kuriyan, J. und O'Donnell, M. (2006). The replication factor C clamp loader requires arginine finger sensors to drive DNA binding and proliferating cell nuclear antigen loading. *2006* 281, 35531-35543.

- Johnson, A. W., Lund, E. und Dahlberg, J. (2002). Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci* 27, 580-585.
- Kaffman, A. und O'Shea, E. K. (1999). Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 291-339.
- Kalab, P., Weis, K. und Heald, R. (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295, 2452-2456.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. und Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large T-antigen. *Nature* 311, 33-38.
- Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A., Kehlenbach, A., Guan, T. und Gerace, L. (1999). A Role for RanBP1 in the Release of CRM1 from the Nuclear Pore Complex in a Terminal Step of Nuclear Export. *Journ Cell Biol* 145, 645-657.
- Kelman, Z. und O'Donnell, M. (1995). Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucl Ac Res* 23, 3613-3620.
- Kendirgi, F., Rexer, Alcazar-Roman, Onighko und Wentz, S. (2005). Interactions between the Shuttling mRNA Export Factor Gle1 and the Nucleoporin hCG1: A Conserved Mechanism in the Export of Hsp70 mRNA. *Mol Biol Cell* 16, 4304-4315.
- Kim, I., Kim, D. und Han, S. (2000). Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53. *J Biol Chem* 275, 23139-23145.
- Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janáky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Rotte, C. und Lill, R. (2005). Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulfur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J* 24, 589-598.
- Kistler, A. L. und Guthrie, C. (2001). Deletion of MUD2, the yeast homologue of U2AF65, can bypass the requirement for sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes Dev* 15, 42-49.
- Kitajima, Y., Yatsuki, H., Zhang, R., Matsushashi, S. und Hori, K. (1994). A novel human homologue of a DEAD-box RNA helicase family. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 748-754.
- Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . *Nat Struct Biol* 6, 388-397.
- Koch, H. B., Zhang, R., Verdoodt, B., Bailey, A., Zhang, C. D., Yates, J. R., A., M. und Hermeking, H. (2007). Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle* 6, 205-217.
- Koepp, D. M., Wong, D. H., Corbett, A. H. und Silver, P. A. (1996). Dynamic localization of the nuclear import receptor and its interactions with transport factors. *J Cell Biol* 133, 1163-1176.
- Kornberg, R. D. und Thomas, J. O. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184, 865-868.
- Kotera, I., Sekimoto, T., Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Nagoshi, E., Sakagami, H., Kondo, H. und Yoneda, Y. (2005). Importin alpha transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin beta. *EMBO J* 24, 942-951.
- Kressler, D., Linder, P. und de La Cruz, J. (1999). Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7897-7912.
- Krishna, T. S. R., Kong, X., Gary, S., Burgers, P. M. und Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79, 1233-1243.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P. und Punna, T. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.
- Krogan, N. J., Peng, W. T., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadian, V., Richards, D. P., *et al.* (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell* 13, 225-239.

- Künzler, M., Gerstberger, T., Stutz, F., Bischoff, F. R. und Hurt, E. (2000). Yeast Ran-binding protein 1 (Yrb1) shuttles between the nucleus and cytoplasm and is exported from the nucleus via a CRM1 (XPO1)-dependent pathway. *Mol Cell Biol* 20, 4295-4308.
- Künzler, M. und Hurt, E. (2001). Targeting of Ran: variation on a common theme? *Journ Cell Sci* 114, 3233-3241.
- Künzler, M. und Hurt, E. C. (1998). Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Lett* 433, 185-190.
- Küssel, P. und Frasch, M. (1995a). Pendulin, a *Drosophila* protein with cell cycle-dependent nuclear localization, is required for normal cell proliferation. *J Cell Biol* 129, 1491-1507.
- Küssel, P. und Frasch, M. (1995b). Yeast Srp1, a nuclear protein related to *Drosophila* and mouse pendulin, is required for normal migration, division, and integrity of nuclei during mitosis. *Mol Gen Genet* 248, 351-363.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lahue, E., Heckathorn, J., Meyer, Z., Smith, J. und Wolfe, C. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Sub2 protein suppresses heterochromatic silencing at telomeres and subtelomeric genes. *Yeast* 22, 537-551.
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. L., Stewart, M., Devine, S. E. und Corbett, A. H. (2006). Classical nuclear localisation signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem Papers in Press*.
- Lanker, S., Bushman, J. L., Hinnebusch, A. G., Trachsel, H. und Mueller, P. P. (1992). Autoregulation of the yeast lysyl-tRNA synthetase gene *GCD5/KRS1* by translational and transcriptional control mechanisms. *Cell* 70, 647-657.
- Lee, S. J. und Baserga, S. J. (1999). Imp3p and Imp4p, two specific components of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein that are essential for pre-18S rRNA processing. *Mol Cell Biol* 19, 5441-5452.
- Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P. und Enenkel, C. (2002). 20 S Proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol* 317, 401-413.
- Lei, E. P. und Silver, P. A. (2002a). Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA. *Genes and Development* 16, 2761-2766.
- Lei, E. P. und Silver, P. A. (2002b). Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell* 2, 261-272.
- Liang, C., Weinreich, M. und Stillman, B. (1995). ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell* 81, 667-676.
- Libri, D., Graziani, N., Saguez, C. und Boulay, J. (2001). Multiple roles for the yeast SUB2/yUAP56 gene in splicing. *Genes Dev* 15, 36-41.
- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J. und Slonimski, P. P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121-122.
- Linder, P. und Stutz, F. (2001). mRNA export: Travelling with DEAD box proteins. *Curr Biol* 11, R961-963.
- Loeb, J. D. J., Davis, L. I. und Fink, G. R. (1993). *NUP2*, a novel yeast nucleoporin, has functional overlap with other proteins of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* 4, 209-222.
- Loeb, J. D. J., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P. A. und Fink, G. R. (1995). The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7647-7651.
- Lohman, T. M., Chao, K., Green, J. M., Sage, S. und Runyon, G. T. (1989). Large-scale purification and characterization of the *Escherichia coli* rep gene product. *J Biol Chem* 264, 10139-10147.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.

- Lopez, M. C., Sanchez, M., Ferminan, E. und Dominguez, A. (1998). Disruption of six *saccharomyces cerevisiae* genes from chromosome IV and basic phenotypic analysis of deletion mutants. *Yeast* *14*, 1199-1208.
- Macara, I. G. (2001). Transport in and out of the nucleus. *Micr Mol Biol Rev* *65*, 570-594.
- Martindale, D. W., Wilson, M. D., Burke, R. D., Chen, X., Duronio, V. und Koop, B. F. (2000). Comparative genomic sequence analysis of the Williams syndrome region (LIMK1-RFC2) of human chromosome 7q11.23. *Mamm Genome* *11*, 890-898.
- Masaya, O. und Nishimoto, T. (2000). Yrb1p interaction with the Gsp1 C terminus blocks Mog1p stimulation of GTP release from Gsp1p. *J Biol Chem* *275*, 32894-32900.
- Matson, S. W., Bean, D. W. und George, J. W. (1994). DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *Bioessays* *16*, 13-22.
- Matsuura, Y., Lange, A., Harreman, M. T., Corbett, A. H. und Stewart, M. (2003). Structural basis for Nup2p function in cargo release and karyopherin recycling in nuclear import. *EMBO J* *22*, 5358-5369.
- Matsuura, Y. und Stewart, M. (2004). Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* *432*, 872-877.
- Mattaj, I. W. und Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* *67*, 265-306.
- Maurer, P. (2001). Biochemische Untersuchungen zum Mechanismus des nucleocytoplasmatischen Transports in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III -Chemie, Pharmazie und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes.
- Maurer, P., Redd, M., Solsbacher, J., Bischoff, F. R., Greiner, M., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., Stade, K., Weis, K. und Schlenstedt, G. (2001). The nuclear export receptor Xpo1p forms distinct complexes with NES transport substrates and the yeast Ran binding protein 1 (Yrb1p). *Mol Biol Cell* *12*, 539-549.
- Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., A., T., Tschodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U. und Peters, R. (1997). The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* *14*, 1407-1417.
- Morehouse, H., Buratowski, R. M., Silver, P. A. und Buratowski, S. (1999). The importin/karyopherin Kap114 mediates the nuclear import of TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 12542-12547.
- Mortz, E., Krogh, T., Vorum, H. und Görg, A. (2001). Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, 1359-1363.
- Mosammaparast, N., Del Rosario, B. C. und Pemberton, L. (2005). Modulation of Histone Deposition by the Karyopherin Kap114. *Mol Cell Biol* *25*, 1764-1778.
- Mosammaparast, N., Ewart, C. S. und Pemberton, L. F. (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J* *21*, 6527-6538.
- Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. und Pemberton, L. F. (2001a). Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem* *277*, 862-868.
- Mosammaparast, N., Jackson, K. R., Guo, Y., Brame, C. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. und Pemberton, L. F. (2001b). Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol* *153*, 251-262.
- Mosammaparast, N. und Pemberton, L. (2004). Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol* *14*, 547-556.
- Moy, T. I. und Silver, P. A. (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the Ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev* *13*, 2118-2133.

- Moy, T. I. und Silver, P. A. (2002). Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *J Cell Sci* 115, 2985-2995.
- Muhrad, D. und Parker, R. (1999). Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA* 5, 1299-1307.
- Mukai, H., Kuno, T., Tanaka, H., Hirata, D., Miyakawa, T. und Tanaka, C. (1993). Isolation and characterization of SSE1 and SSE2, new members of the yeast HSP70 multigene family. *Gene* 132, 57-66.
- Myers, L. C. und Kornberg, R. D. (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 69, 729-749.
- Naiki, T., Kondo, T., Nakada, D., Matsumoto, K. und Sugimoto, K. (2001). Chl12 (Ctf18) forms a novel replication factor C-related complex and functions redundantly with Rad24 in the DNA replication checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 21, 5838.
- Naiki, T., Shimomura, T., Kondo, T., Matsumoto, K. und Sugimoto, K. (2000). Rfc5, in cooperation with rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 5888-5896.
- Nakahara, Y., Shiraishi, T., Okamoto, H., Mineta, T., Oishi, T., Sasaki, K. und Tabuchi, K. (2004). Detrended fluctuation analysis of genome-wide copy number profiles of glioblastomas using array-based comparative genomic hybridization. *Neuro-oncol* 6, 281-289.
- Nathan, D. F., Vos, M. H. und Lindquist, S. (1997). In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci* 94, 12949-12956.
- Nemergut, M. E., Mizzen, C. A., Stukenberg, T., Allis, C. D. und Macara, I. G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* 292, 1540-1543.
- O'Day, L., Chavanikamannil, F. und Abelson, J. (1996). 18S rRNA processing requires the RNA helicase-like protein Rrp3. *Nucl Ac Res* 24, 3201-3207.
- O'Donnell, M., Onrust, R., Dean, F. B., Chen, M. und Hurwitz, J. (1993). Homology in accessory proteins of replicative polymerases - *E. coli* to humans. *Nucl Ac Res* 21, 1-3.
- Oeffinger, M., Dlakic, M. und Tollervey, D. (2004). A pre-ribosome associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev* 18, 196-209.
- Ogiwara, H., Ui, A., Enomoto, T. und Seki, M. (2007). Role of Elg1 protein in double strand break repair. *Nucl Ac Res* 35, 353-362.
- Ohno, M., Fornerod, M. und Mattaj, I. W. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* 92, 327-336.
- Oliveira, C. C. und McCarthy, J. E. (1995). The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. A short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270, 8936-8943.
- Peifer, M., Berg, S. und Reynolds, A. B. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76, 789-791.
- Peltz, S., Brown, A. und Jacobson, A. (1993). mRNA destabilization triggered by premature translational termination depends on at least three *cis*-acting sequences elements and one *trans*-acting factor. *Genes Dev* 7, 1737-1754.
- Pemberton, L. F. und Paschal, B. M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6, 187-198.
- Pemberton, L. F., Rosenblum, J. S. und Blobel, G. (1999). Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J Cell Biol* 145, 1407-1417.
- Pemberton, L. F., Rosenblum, S. R. und Blobel, G. (1997). A distinct parallel pathway for the nuclear import of an mRNA-binding protein. *J Cell Biol* 139, 1645-1653.

- Piruat, J. I. und Aguilera, A. (1998). A novel yeast gene, *THO2*, is involved in RNA polymerase II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. *EMBO J* 17, 4859-4872.
- Plafker, K. und Macara, I. G. (2000). Facilitated nucleocytoplasmic shuttling of the Ran binding protein RanBP1. *Mol Cell Biol* 20, 3510-3521.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X. und Fasolo, J. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-684.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. und Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.
- Raines, R. T., McCormick, M., Van Oosbree, T. R. und Mierendorf, R. C. (2000). The S-tag fusion system for protein purification. *Methods in Enzymology* 326, 362-376.
- Reese, J. C., Zhang, Z. und Kurpad, H. (2000). Identification of a yeast transcription Factor IID subunit, TSG2/TAF48. *J Biol Chem* 275, 17391-17398.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Mann, M. und Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032.
- Rohila, J. S., Chen, M., Cerny, R. und Fromm, M. E. (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *The Plant Journal* 38, 172-181.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. und Chait, B. T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148, 635-652.
- Rout, M. P. und Blobel, G. (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 123, 771-783.
- Rout, M. P., Blobel, G. und Aitchison, J. D. (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 89, 715-725.
- Rout, M. P. und Field, M. C. (2001). Isolation and characterisation of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 276, 38261-38271.
- Rout, M. P. und Kilmartin, J. V. (1990). Components of the yeast spindle pole body. *J Cell Biol* 111, 1913-1927.
- Sakakida, Y., Miyamoto, Y., Nagoshi, E., Akashi, M., Nakamura, T., Mamine, T., Kasahara, M., Minami, Y., Yoneda, Y. und Takumi, T. (2005). Importin α/β mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2, through a bipartite nuclear localization signal. *J Biol Chem* 280, 13272-13278.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition edn (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanders, S. L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A. J. und Weil, P. A. (2002). Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol Cell Biol* 22, 4723-4738.
- Sanders, S. L. und Weil, P. A. (2000). Identification of two novel TAF subunits of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* TFIID complex. *J Biol Chem* 275, 13895-13900.
- Schatz, C. A., Santarella, R., Hoenger, A., Karsenti, E., Mattaj, I. W., Gruss, O. J. und Carazo-Salas, R. E. (2003). Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *EMBO J* 22, 2060-2070.
- Scherf, U., Pastan, I., Willingham, M. C. und Brinkmann, U. (1996). The human CAS protein which is homologous to the *CSE1* yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2670-2674.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Görlich, D., Ponstingl, H. und Bischoff, F. R. (1997). Yrb4p, a yeast Ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *EMBO J* 16, 6237-6249.

- Schlenstedt, G., Wong, D. H., Koepf, D. M. und Silver, P. A. (1995). Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *EMBO J* 14, 5367-5378.
- Schmid, S. R. und Linder, P. (1992). D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol* 6, 283-291.
- Schmidt, T. G. und Skerra, A. (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng* 6, 109-122.
- Schroeder, A. J., Chen, X. H., Xiao, Z. und Fitzgerald-Hayes, M. (1999a). Genetic evidence for interactions between yeast importin α (Srp1p) and its nuclear export receptor, Cse1p. *Mol Gen Genet* 261, 788-795.
- Schroeder, A. J., Chen, X. H., Xiao, Z. und Fitzgerald-Hayes, M. (1999b). Genetic evidence for interactions between yeast importin alpha (Srp1p) and its nuclear export receptor, Cse1p. *Mol Gen Genet* 261, 788-795.
- Seewald, M. J., Kraemer, A., Farkasovsky, M., Körner, C., Wittinghofer, A. und Vetter, I. (2003). Biochemical characterisation of the Ran-RanBP1-RanGAP system: Are RanBP proteins and the acidic tail of RanGAP required for the Ran-RanGAP GTPase reaction? *M cell biol* 23, 8124-8136.
- Selleck, W., Howley, R., Fang, Q., Podolny, V., Fried, M. G., Buratowski, S. und Tan, S. (2001). A histone fold TAF octamer within the yeast TFIID transcriptional coactivator. *Nat struct biol* 8, 695-700.
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F. R., Podtelejnikov, A., Mann, M. und Hurt, E. (1998). Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *EMBO J* 17, 2196-2207.
- Sharma, K. und Tollervey, D. (1999). Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 5' end of 18S rRNA is required for pre-rRNA processing. *Mol Cell Biol* 19.
- Shin, I., Rotty, J., Wu, F. Y. und Arteaga, C. L. (2005). Phosphorylation of p27^{Kip1} at Thr-157 interferes with its association with importin α during G₁ and prevents nuclear re-entry. *J Biol Chem* 280, 6055-6063.
- Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M. M., Nomura, M. und Goldfarb, D. S. (1996). *In vivo* nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol* 135, 329-339.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Bischoff, F. R. und Schlenstedt, G. (1998). Cse1p is involved in export of yeast importin α from the nucleus. *Mol Cell Biol* 18, 6805-6815.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Vogel, F. und Schlenstedt, G. (2000). Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin α . *Mol Cell Biol* 20, 8468-8479.
- Springer, S., Sang, A. und Schekman, R. (1999). A primer on vesicle budding. *Cell* 97, 145-148.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. und Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041-1050.
- Stage-Zimmermann, T., Schmidt, U. und Silver, P. A. (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit *in vivo*. *Mol Biol Cell* 11, 3777-3789.
- Stewart, M., Kent, H. M. und McCoy, A. J. (1998). Structural basis for molecular recognition between nuclear transport factor 2 (NTF2) and the GDP-bound form of the Ras-family GTPase Ran. *J Mol Biol* 277, 635-646.
- Stofko-Hahn, R. E., Carr, D. W. und Scott, J. D. (1992). A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 302, 274-278.
- Strambio-de-Castillia, C., Blobel, G. und Rout, M. P. (1995). Isolation and characterization of nuclear envelopes from the yeast *Saccharomyces*. *J Cell Biol* 131, 19-31.
- Sträßer, K. und Hurt, E. (2001). Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413, 648-652.

- Sträßer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R. und Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417, 304-308.
- Strefford, J. C., Stasevich, I., Lane, T. M., Lu, Y. J., Oliver, T. und Young, B. D. (2005). A combination of molecular cytogenetic analyses reveals complex genetic alterations in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 159, 1-9.
- Su, J. Y. und Maller, J. L. (1995). Cloning and expression of a *Xenopus* gene that prevents mitotic catastrophe in fission yeast. *Mol Gen Genet* 246, 387-396.
- Suntharalingam, M. und Wenthe, S. R. (2003). Peering through the pore: Nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell* 4, 775-789.
- Suzuki, T., Maruno, M., Wada, K., Kagawa, N., Fujimoto, Y., Hashimoto, N., Izumoto, S. und Yoshimine, T. (2004). Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system. *Brain Tumor Pathol* 21, 27-34.
- Suzuki, Y. und Craigie, R. (2007). The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nature Reviews* 5, 187-196.
- Swaffield, J. C., Melcher, K. und Johnston, S. A. (1995). A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein. *Nature* 374, 88-91.
- Tabb, M. M., Tongaonkar, P., Vu, L. und Nomura, M. (2000). Evidence for separable functions of Srp1p, the yeast homolog of Importin α (Karyopherin α): Role for Srp1p and Sts1p in protein degradation. *Mol Cell Biol* 20, 6062-6073.
- Thomas, R., Edwards, M. und Marks, R. (1996). Translocation of the retinoblastoma gene product during mitosis. *Exp Cell Res* 223, 227-232.
- Thuault, S., Gangloff, Y., Kirchner, J., Sanders, S., Werten, S., Romier, C., Weil, P. A. und Davidson, I. (2003). Functional analysis of the TFIID-specific yeast TAF4 (γ TAF_{II}48) reveals an unexpected organisation of its histone-fold domain. *J Biol Chem* 277, 45510-45517.
- Tyler, J. K. (2002). Chromatin assembly: Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent Nucleosome remodelling machines. *Eur Journ Biochem* 269.
- van Hoof, A., Lennertz, P. und Parker, R. (2000). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J* 19, 1357-1365.
- Vaughan, E. E., DeGiulio, J. V. und Dean, D. A. (2006). Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Curr Gene Ther* 6, 671-681.
- Venema, J. und Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Rev Genet* 33, 261-311.
- Vitale, G., Fabre, E. und Hurt, E. (1996). *NBP35* encodes an essential and evolutionary conserved protein in *Saccharomyces cerevisiae* with homology to a superfamily of bacterial ATPases. *Gene* 178, 97-106.
- Wang, C. Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J. und Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14, 927-939.
- Wang, H., Shao, N., Ding, Q., Cui, J., Reddy, E. und Rao, V. (1997). BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phospho-proteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene* 15, 143-157.
- Wehner, K. A. und Baserga, S. J. (2002). The sigma⁷⁰-like motif: a eukaryotic RNA binding domain unique to a superfamily of proteins required for ribosome biogenesis. *Mol Cell* 9, 329-339.

- Wehner, K. A., Gallagher, J. E. G. und Baserga, S. J. (2002). Components of an interdependent unit within the SSU processome regulate and mediate its activity. *Mol Cell Biol* 22, 7258-7267.
- Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: Nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112, 441-451.
- Weis, K., Ryder, U. und Lamond, A. I. (1996). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 α is essential for nuclear import. *EMBO J* 15, 1818-1825.
- Welch, E. und Jacobson, A. (1999). An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast *SPT10* mRNA. *EMBO J* 18, 6134-6145.
- Wendler, P., Lehmann, A., Janek, K., Baumgart, S. und Enenkel, C. (2004). The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin $\alpha\beta$ and proteasomal functions. *J Biol Chem* 279, 37751-37762.
- Weng, Y., Czaplinski, K. und Peltz, S. W. (1996). Identification and characterization of mutations in the *UPF1* gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 16, 5491-5506.
- Weng, Y., Czaplinski, K. und Peltz, S. W. (1998). ATP is a cofactor of the Upf1p protein that modulates its translation termination and RNA binding activities. *RNA* 4, 205-214.
- Werner-Washburne, M., Stone, D. E. und Craig, E. A. (1987). Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 2568-2577.
- West Jr., R. W., Kruger, B., Thomas, S., Ma, J. und Milgrom, E. (2000). *RLR1* (*THO2*), required for expressing *lacZ* fusions in yeast, is conserved from yeast to humans and is a suppressor of *SIN4*. *Gene* 243, 195-205.
- West Jr., R. W. und Milgrom, E. (2002). DEAD-box RNA helicase Sub2 is required for expression of *lacZ* fusions in *Saccharomyces cerevisiae* and is a dosage-dependent suppressor of *RLR1* (*THO2*). *Gene* 288, 19-27.
- Witte, C. P., Noel, L. D., Gielbert, J., E., P. J. und Romeis, T. (2004). Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol Biol* 55, 135-147.
- Xiao, Z., McGrew, J. T., Schroeder, A. J. und Fitzgerald-Hayes, M. (1993). *CSE1* and *CSE2*, two new genes required for accurate mitotic chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13, 4691-4702.
- Xu, X., Wagner, K. U., Larson, D., Weaver, Z., Li, C., Ried, T., Hennighausen, L., Wynshaw-Boris, A. und Deng, C. X. (1996). Conditional mutation of *Brcal* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet* 22, 37-43.
- Yang, P., Sampson, H. M. und Krause, H. M. (2006). A modified tandem affinity purification strategy identifies cofactors of the *Drosophila* nuclear receptor dHNF4. *Proteomics* 6, 927-935.
- Yano, R., Oakes, M. L., Tabb, M. M. und Normura, M. (1994). Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/ β -catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6880-6884.
- Yao, N., Coryell, L., Zhang, D., Georgescu, R. E., Finkelstein, J., Coman, M. M., Hingorani, M. M. und O'Donnell, M. (2003). Replication factor C clamp loader subunit arrangement within the circular pentamer and its attachment points to proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 278, 50744-50753.
- Yarunin, A., Govind Panse, V., Petfalski, E., Dez, C., Tollervey, D. und Hurt, E. (2005). Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *EMBO J* 24, 580-588.
- Yatherajam, G., Zhang, L., Kraemer, S. M. und Stargell, L. A. (2003). Protein-protein interaction map for yeast TFIID. *Nucl Ac Res* 31, 1252-1260.

-
- Zeghouf, M., Li, J., Butland, G., Borkowska, A., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Emili, A. und Greenblatt, J. F. (2004). Sequential peptide affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. *Journal of proteome research* 3, 463-468.
- Zhang, M. und Green, M. R. (2001). Identification and chracterization of yUAP/Sub2p, a yeast homologue of the essential human pre-mRNA splicing factor hUAP56. *Genes Dev* 15, 30-35.
- Zhu, H., Peterson, C. und Christman, M. F. (1995). *HPRI* encodes a global positive regulator of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 1698-1708.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Gabriel Schlenstedt angefertigt. Die experimentellen Arbeiten wurden von Oktober 2002 bis Mai 2007 durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Gabriel Schlenstedt für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und seine Unterstützung bei ihrer Durchführung durch viele Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen.

Herrn Prof. Richard Zimmermann danke ich für die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit. Des Weiteren danke ich ihm und allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für eine gute Zusammenarbeit, hilfreiche Tipps sowie eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei Frau Dr. Stefanie Caesar möchte ich mich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, ihr stets offenes Ohr und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken.

Herrn Prof. Albert Sickmann und Dr. René Zahedi (Würzburg) danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Proteinanalysen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Nastainczyk, Sabine Pelvay sowie Ramona Gölzer für die Herstellung der Proteinantikörper.

Dr. Markus Greiner danke ich besonders für seine Hilfe bei der Bedienung der “Äkta Explorer“ und seine unzähligen hilfreichen Anregungen im Labor.

Ich möchte mich bei Herrn Dipl. Biologen Karsten Mayr und Frau Silke Guthörl für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Und nicht zuletzt bedanke ich mich bei Frau Dr. Silvia Hahn, Frau Dipl. Biologin Isa Lobert, Herrn Dipl. Biologen Andrés Soto sowie Herrn Dipl. Biologen Yiming Chang für den Spaß im Labor und allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

