

Tag des Promotionskolloquiums:

15.07.2009

Dekan:

Prof. Dr.-Ing. S. Diebels

Vorsitz:

Prof. Dr. A.P. Cavalié

Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Schlenstedt

Prof. Dr. M.J. Schmitt

Prof. Dr. R. Zimmermann

**Charakterisierung neuer Interaktionspartner
von Kerntransportfaktoren in
*Sacharomyces 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

Isabell Lobert

Saarbrücken 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....
Abkürzungsverzeichnis
I Einleitung	1
1 Nukleocytoplasmatischer Transport.....	1
1.1 Der Kernporenkomplex (NPC)	2
1.2 Die Transportrezeptoren.....	7
1.3 Der Gsp1-GTPase Zyklus	12
1.4 Importprozesse	14
1.5 Exportprozesse	18
1.6 Regulation des nukleocytoplasmatischen Transports	28
2 Zellzyklus in <i>S. cerevisiae</i>	30
3 Zielsetzung dieser Arbeit	35
II Material und Methoden	36
1 Material	36
1.1 Geräte	36
1.2 Verbrauchsmaterial	37
1.3 Chemikalien und Biochemikalien	38
1.4 Enzyme.....	39
1.5 Oligonukleotide.....	40
1.6 Plasmide	42
1.7 Antikörper	47
2 Organismen	47
2.1 Bakterienstämme.....	47
2.2 Hefestämme.....	48
3 Nährmedien	50
3.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	51
3.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	52
4 Molekularbiologische Methoden.....	56
4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	56
4.2 Isolierung von DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	58
4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	60
4.4 Reinigung und Auftrennung von DNA	63
4.5 Enzymatische Modifikation von DNA.....	66
4.6 Transformation von Plasmid-DNA	69
5 Hefegenetische Methoden.....	72
5.1 Integration genomischer Modifikationen.....	72
5.2 <i>In vivo</i> -Interaktionsstudien.....	75

6	Mikroskopie	84
6.1	Direkte Fluoreszenzmikroskopie.....	84
6.2	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	85
7	Proteinbiochemische Methoden	87
7.1	Analytische Methoden.....	87
7.2	Synthese von Fusionsproteinen in <i>S. cerevisiae</i>	93
7.3	Synthese und Reinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	94
7.4	<i>In vitro</i> -Interaktionsstudien	101
III	Ergebnisse	102
1	Split-Ubiquitin Analysen.....	102
1.1	Interaktionen von Transportfaktoren mit Nukleoporinen	102
1.2	Charakterisierung der Nup2/Xpo1 Interaktion.....	106
1.3	Screens mit dem Split-Ubiquitin System	107
2	Zwei-Hybrid Analysen.....	108
2.1	Ergebnisse des Zwei-Hybrid Screens.....	108
2.2	Biochemische Charakterisierung der gefundenen Interaktionspartner	113
2.3	Lokalisierung der gefundenen Interaktionspartner in Hefezellen	117
2.4	<i>In vivo</i> -Interaktionen mit verschiedenen Transportfaktoren	124
2.5	<i>In vitro</i> -Interaktionen mit verschiedenen Transportfaktoren	128
2.6	Weitere Charakterisierung von Yra1.....	134
2.7	Weitere Charakterisierung von Hsl1	145
2.8	Kap114 und die Mitoseregulation	156
IV	Diskussion.....	164
1	Split-Ubiquitin-Analysen	164
1.1	Interaktionen des Nukleoporins Nup2 mit Transportfaktoren	165
1.2	Screens mit dem Split-Ubiquitin System	167
2	Zwei-Hybrid-Analysen.....	169
2.1	Nmd5 interagiert mit Nup1	170
2.2	Mak21 zeigt Bindungen an mehrere Importine.....	170
2.3	Das Importin Kap114	172
2.4	Arr1, Yjl103c und Nis1 interagieren <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> mit Kap114	173
2.5	Die Histon Methyltransferase Set2 interagiert mit Kap114.....	175
2.6	Sda1 zeigt eine Gsp1-unabhängige Interaktion mit Kap114.....	176
2.7	Das Adapterprotein Yra1	178
2.8	Die „Checkpoint“ Kinase Hsl1	188
2.9	Kap114 spielt wie Hsl1 und Nap1 eine Rolle in der Regulation des Morphogenese-„Checkpoints“	198
V	Zusammenfassung.....	203
	Summary	204
VI	Literaturverzeichnis.....	205
VII	Abbildungsverzeichnis	222
VIII	Tabellenverzeichnis.....	224

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
ADE	Adenin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
Cub	C-terminale Domäne des Ubiquitins
CuSO ₄	Kupfersulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOA	Fluor-Orotsäure
GDP	Guanosintriphosphat
Glc	Glukose
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	menschlicher Immunschwächevirus
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
IBB	Importin β-Bindungsdomäne
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria Bertani
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar, Mol pro Liter
Min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MW	Molekularmasse
NES	Kernexportsequenz
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NPC	Kernporenkomplex
Nub	N-terminale Domäne des Ubiquitins
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
ORF	"open reading frame", offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PBS	Phosphatpuffer
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

I Einleitung

Die Hefe als Modellorganismus

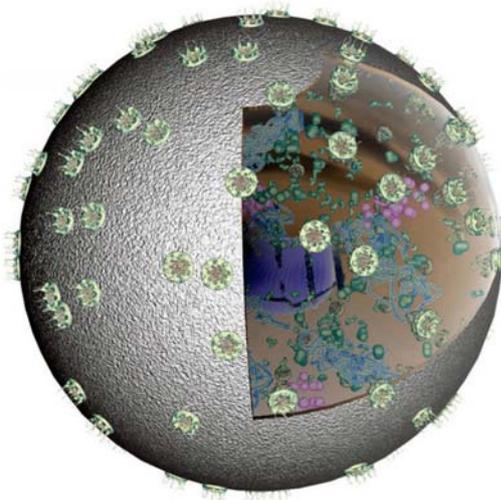
Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist eine einzellige Sprosshefe und gehört zu der Klasse der Schlauchpilze (Ascomyceten). Zudem ist sie ein Eukaryont und besitzt als solcher grundlegende Eigenschaften, die sie mit anderen Vertretern der systematischen Gruppe teilt. Sie besitzt eine Generationszeit von nur ca. 90 min und eines der einfachsten eukaryontischen Genome mit 2×10^7 Basenpaaren auf 16 Chromosomen (Humanes Genom: 3×10^9 Basenpaare auf 23 Chromosomen). Das gesamte Hefegenom ist sequenziert und in Datenbanken zugänglich (Goffeau *et al.*, 1996; Hieter *et al.*, 1996), und durch etablierte Methoden zur genetischen Manipulation ist es möglich auf einfache Weise Hefestämme mit bestimmten genetischen Eigenschaften zu erzeugen.

Viele biochemische Prozesse laufen in *S. cerevisiae* ähnlich ab wie in höheren eukaryontischen Zellen, viele der 6000 Gene der Hefe haben Orthologe im Genom höherer Eukaryonten und sind teilweise bis zum Menschen konserviert. Somit steht mit der Hefe *S. cerevisiae* ein effizientes Werkzeug für die Analyse eukaryontischer Zellen zur Verfügung, das erlaubt, grundlegende Funktionen des Lebens wie z.B. die Regulation des Zellteilungszyklus, die Translation oder den nukleocytoplasmatischen Transport in einem einfach zugänglichen Modellorganismus zu untersuchen.

1 Nukleocytoplasmatischer Transport

Die Zelle stellt als kleinste lebens- und vermehrungsfähige Einheit eine Art Elementarorganismus dar. Im Zuge der Evolution von Prokaryoten zu Eukaryoten ging mit einer Höherentwicklung auch eine Kompartimentierung der Zelle einher. Innere Membransysteme teilen die eukaryotische Zelle in spezifische Funktionsräume und ermöglichen einen gleichzeitigen Ablauf von verschiedenen Stoffwechselreaktionen unter den jeweils optimalen Bedingungen. Ein charakteristisches Merkmal ist die Ausbildung eines echten, von einer Doppelmembran umhüllten Zellkerns und damit eine Trennung der nukleären und cytoplasmatischen Kompartimente. Die Kernhülle besteht aus einer inneren

Kernmembran, die in Kontakt zum Chromatin steht, und einer äußeren Membran, die Bestandteil des Membransystems des rauhen endoplasmatischen Reticulums ist. Im Zellkern, dem genetischen Steuerzentrum, finden die DNA-Replikation und Transkription statt, während die Proteinsynthese im Cytoplasma erfolgt. Diese räumliche Trennung schafft Vorteile für die Koordination und Regulation von zellulären Prozessen, erfordert jedoch gleichzeitig einen nukleocytoplasmatischen Transportmechanismus, um alle Makromoleküle an ihren physiologischen Bestimmungsort zu transportieren. Der Transport von Makromolekülen wird durch die in der Kernhülle vorhandenen Kernporenkomplexe ermöglicht.



Import:

- ribosomale Proteine
- nukleäre Proteine
- Histone
- Transkriptionsfaktoren
- sn und rRNPs
- Replikationsfaktoren
- virale Genome

Export

- ribosomale Untereinheiten
- RNA (m,t,r,sn)
- virale RNPs

Abbildung 1: Nukleocytoplasmatischer Transport

Dargestellt sind der Zellkern mit eingebetteten Kernporenkomplexen und eine Übersicht der zu transportierenden Makromoleküle (nach Samir S. Patel, 2005)

1.1 Der Kernporenkomplex (NPC)

Kernporenkomplexe sind in die Doppelmembran der Kernhülle eingebettet und vermitteln den intrazellulären Transport von Proteinen und RNA zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma. Die Anzahl der NPCs eines Zellkerns variiert und ist abhängig von der Größe der Zelle und ihrer jeweiligen Aktivitätsrate. Eine Hefezelle weist 200 NPCs auf (Rout *et al.*, 1993), während eine proliferierende menschliche Zelle ungefähr 2000-4000 NPCs besitzt (Maul *et al.*, 1972).

1.1.1 Aufbau und Struktur des Kernporenkomplexes

Der Kernporenkomplex ist ein Multiproteinkomplex, der sich aus verschiedenen Nukleoporinen (Nups) zusammensetzt und eine molekulare Größe von ca. 60 MDa in *S. cerevisiae* und ca. 125 MDa in Vertebraten besitzt. Die Grundstruktur der Kernporenkomplexe ist von *S. cerevisiae* bis zu den höheren Eukaryonten hoch konserviert (Yang *et al.*, 1998). Charakteristisch für die Kernporenkomplexe ist eine oktagonale Symmetrie. Sie sind aufgebaut aus einem zentralen, in der Kernmembran verankerten Speichenring, an den sich auf der nukleären Seite der Kernkorb ("nuclear basket") anschließt, der ca. 90 nm in das Nukleoplasma hineinragt. Auf der cytoplasmatischen Seite besitzt der Ring ungefähr 50 nm lange, cytoplasmatische Fibrillen (Yang *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999). Abbildung 1A zeigt den Aufbau eines Vertebraten-NPCs, der neben einem äußeren und inneren Speichenring auch noch einen cytoplasmatischen und nukleären Ring besitzt. Der Speichenring-Komplex der Hefe ist insgesamt einfacher aufgebaut als der von höheren Metazoen. Er besteht aus dem Speichenring und einem äußeren mit der Membran interagierenden Ring, der zur Verankerung des Kernporenkomplexes in der Kernmembran dient (Yang *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999).

In der Mitte der Kernpore befindet sich ein ringförmiger, ca. 40 nm weiter Transportkanal, der vom zentralen Transporter umgeben ist und durch den die Translokation von Makromolekülen stattfindet. Eine zentrale Transporterstruktur ist zwar in vielen elektronenmikroskopischen Untersuchungen als zentrale Einheit zu sehen, aber das Vorhandensein des zentralen Transporters ist bis heute umstritten. Es wird noch diskutiert, ob es sich dabei um eine dynamische Änderung der Kernporenstruktur, um einen Transportkomplex während der Translokation oder um ein durch die Fixierung verursachtes Artefakt handelt (Stoffler *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Im Zentrum der Kernpore gibt es zusätzlich zu dem Transportkanal noch acht kleinere Peripheriekanäle, von denen angenommen wurde, dass sie die Diffusion von Ionen, Metaboliten und kleineren Makromolekülen vermitteln (Hinshaw *et al.*, 1992; Allen *et al.*, 2000).

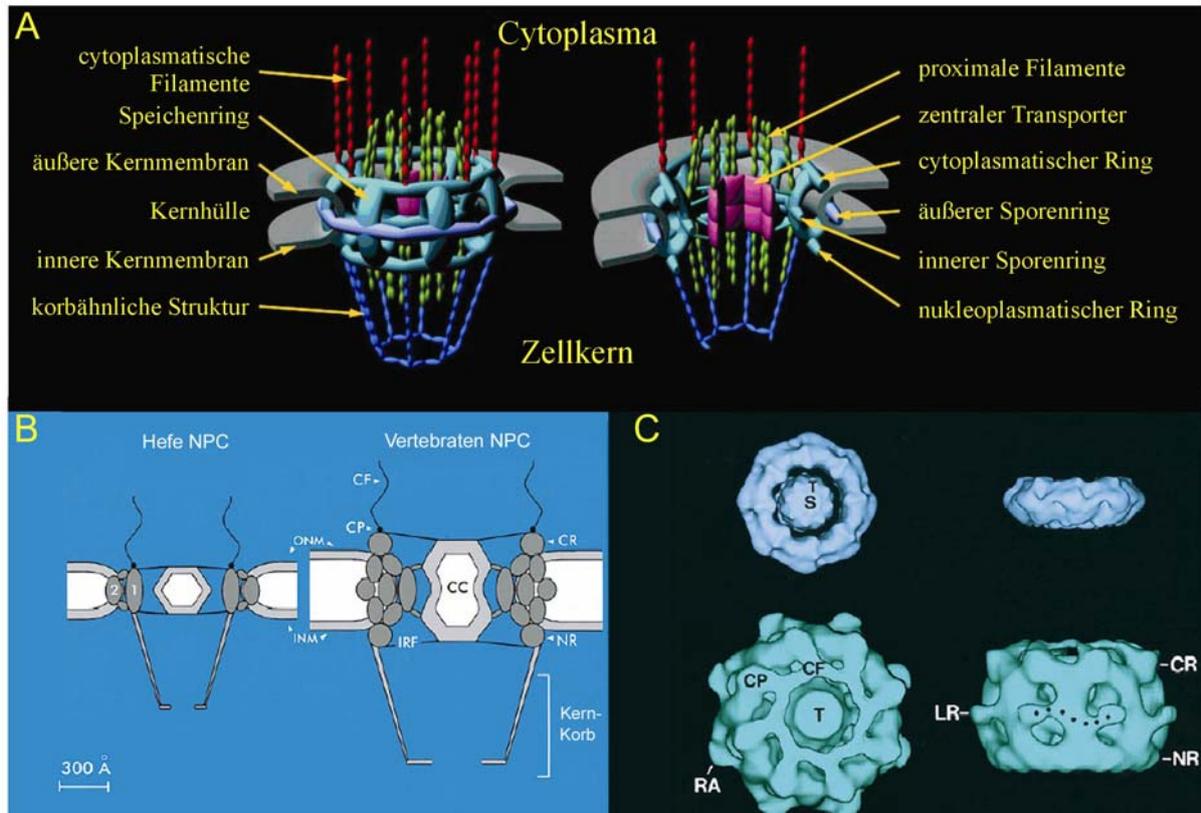


Abbildung 2: Struktureller Aufbau des Kernporenkomplexes

(A) Aufbau des Kernporenkomplexes von Vertebraten. (nach Rout und Aitchison, 2001)

(B) Idealisierter vertikaler Querschnitt durch die Kernporenkomplexe von Hefe und Vertebraten

1 und 2 = radiale Speichendomänen im Hefe-NPC; CF = Cytoplasmatische Filamente; CP = Cytoplasmatische Partikel; CR = Cytoplasmatischer Ring; IFR = innere Ringfilamente; CC = zentraler Kanal; NR = nukleärer Ring; ONM/INM = äußere und innere Kernmembran (nach Yang et al., 1998)

(C) Vergleichende 3D-Ansichten von oben und von der Seite des Hefe-NPCs (oben) und des Vertebraten-NPCs (unten). (T = Transporter; S = mögliche Substrate; CF = Cytoplasmatische Filamente; CP = Cytoplasmatische Partikel; CR = Cytoplasmatischer Ring; RA = radiale Arme; NR = nukleärer Ring; LR = Lumenring) (Yang et al., 1998).

Neuere Studien legen hier zum Teil widersprüchliche Modelle dar. Peters (2005) nimmt an, dass ein eigener enger Diffusionskanal im Zentrum der Kernpore existiert, durch den die passive Diffusion stattfindet, während Naim (2007) postuliert, dass die peripheren Kanäle als Diffusionskanäle fungieren.

1.1.2 Die Nukleoporine

Die Substrukturen der Kernporenkomplexe sind aus Nukleoporinen (Nups) aufgebaut. In der Hefe *S. cerevisiae* wurden ungefähr 30 verschiedene Nukleoporine identifiziert, von denen nur wenige essentiell sind (Rout *et al.*, 2000). Nach neueren Studien besteht der Kernporenkomplex der Vertebraten auch lediglich aus 30 verschiedenen Nukleoporinen und nicht wie bisher angenommen aus 50 (Cronshaw *et al.*, 2002). Aufgrund der achtfachen Rotationssymmetrie und der relativ geringen Anzahl von Proteinen, die die Kernporen aufbauen, wird davon ausgegangen, dass die meisten Nukleoporine in einer Kopienzahl von acht bzw. eines Vielfachen von acht pro Kernpore vorkommen. Es werden zwei Gruppen von Nukleoporinen unterschieden. Etwa die Hälfte der Nukleoporine besitzt FG (Phenylalanin-Glycin)-reiche Sequenzen, Wiederholungen (Repeats) der Aminosäureabfolge GLFG, FXFG oder FG. Nukleoporine mit "FG-Repeats" können mit Transportfaktoren interagieren und stellen vermutlich die Bindungsstellen der Transportfaktoren während der Translokation dar (Rexach und Blobel, 1995; Rout und Aitchison, 2001). Nukleoporine ohne "FG-Repeat"-Domänen bilden das Grundgerüst der Kernpore aus (Doye & Hurt, 1997) und bisher wurde für sie keine direkte Rolle beim nukleocytoplasmatischen Transport nachgewiesen.

Durch statistische Auswertung immunelektronenmikroskopischer Lokalisierung ist die Position vieler Nukleoporine ungefähr ermittelt worden. Es wurde gefunden, dass viele Nukleoporine sowohl auf der cytoplasmatischen als auch auf der nukleären Seite des NPC vorkommen. Einige weisen allerdings eine asymmetrische Lokalisierung auf. Nup1, Nup2 und Nup60 sind auf der nukleären Seite lokalisiert und Nup159, Nup42 und Nup82 auf der cytoplasmatischen Seite, was auf eine Beteiligung an der Kontrolle der Transportrichtung hinweist (Rout *et al.*, 2000). Nukleoporine wurden ursprünglich definiert als stabile, im Gefüge des NPC verankerte und immobile Proteine. Verschiedene Untersuchungen zeigen jedoch, dass manche Nukleoporine bzw. auch einzelne Domänen von Nukleoporinen durchaus mobil sind (Nakielny *et al.*, 1999; Dilworth *et al.*, 2001; Fahrenkrog *et al.*, 2002). Außerdem sprechen neuere Studien dem Kernporenkomplex auch eine aktivere Rolle im Kerntransport zu. Es wurde in Hefe gezeigt, dass der Kernporenkomplex durch Umstrukturierungen während der Mitose Transportwege kontrollieren kann (Makhnevych *et al.*, 2003). Auch scheint der NPC nicht nur den nukleocytoplasmatischen Transport zu vermitteln, sondern ebenfalls eine essentielle Rolle in anderen zellulären Prozessen (wie Regulation der Genexpression, Chromatin-Organisation und Apoptose) zu spielen (Fahrenkrog *et al.*, 2004).

1.1.3 Translokation durch den Kernporenkomplex

Nach Ribbeck und Görlich (2001) ist die Translokationskapazität von Kernporenkomplexen sehr hoch, ein einzelner Kernporenkomplex erlaubt 10^3 Translokationen pro Sekunde, wobei Im- und Export durch denselben Kernporenkomplex erfolgen (Mattaj & Englmeier, 1998). Es gibt zwei unterschiedliche Arten des Stofftransfers, die passive Diffusion, die nur für Ionen, Stoffwechselprodukte und kleinere Makromoleküle bis zu einer Größe von 50 kD möglich ist, und die erleichterte Translokation, die von löslichen Kerntransportfaktoren vermittelt wird und ermöglicht, dass größere Substrate schnell, effizient und auch gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden (Mattaj & Englmeier, 1998). Auch für kleine Makromoleküle und RNAs wurde nachgewiesen, dass ein effizienter Transport die Beteiligung von Transportfaktoren erfordert (Breeuwer & Goldfarb, 1990; Jäckel & Görlich, 1998), da die passive Diffusion nur langsam und ineffizient abläuft.

Die Translokation von Rezeptor-Substrat-Komplexen durch den Kernporenkomplex erfolgt durch zahlreiche Interaktionen niedriger Affinität der Transportfaktoren mit Nukleoporinen (Ribbeck & Görlich, 2001), wobei die Direktionalität des Transportes durch irreversible Schritte auf beiden Seiten des Kernporenkomplexes festgelegt wird (Nachury & Weiss, 1999). Der eigentliche Translokationsmechanismus durch die Kernpore ist bislang unklar und es wurden in den letzten Jahren mehrere Erklärungsmodelle entwickelt. Das Modell eines Affinitätsgradienten (Ben-Efraim & Gerace, 2001) bzw. das Assoziations-Dissoziationsmodell (Allen *et al.*, 2000) besagt, dass die Transportkomplexe sich entlang von Bindungsstellen mit zunehmender Affinität bewegen. In der gleichen Kernpore könnten sowohl Import- als auch Exportrouten vorhanden sein, die gleichzeitig benutzt werden könnten. Allerdings spricht die symmetrische Verteilung der meisten Nukleoporine gegen dieses Modell (Rout *et al.*, 2000). Andere Modelle setzen voraus, dass der zentrale Kanal des Kernporenkomplexes aus einem dichten Netz aus filamentösen, "FG-Repeats" enthaltenden Nukleoporinen besteht. Dieses Netz stellt die Diffusionsgrenze für Makromoleküle dar. Das Brownsche Affinitätsmodell (Rout *et al.*, 2000) nimmt an, dass sich die Transportrezeptoren aufgrund ihrer Affinität zu den FG-reichen Bindungsstellen der Nukleoporine in der Nähe des zentralen Kanals konzentrieren, um dann durch diesen zu diffundieren. Der zentrale Kanal stellt sich hier als eine Art Tor dar, das Moleküle, die nicht mit Nukleoporinen interagieren, entropisch ausschließt. Das Modell der selektiven Löslichkeit oder Siebmodell (Ribbeck & Görlich, 2001 und 2002) geht davon aus, dass die FG-Nukleoporine im zentralen Kanal durch die gegenseitige Anziehung der hydrophoben "FG-Repeats" ein Netzwerk (siebähnliche

Struktur) ausbilden, das als Permeabilitätsbarriere fungiert. Die Translokation von Transportkomplexen wird durch die Interaktionen der Transportrezeptoren mit den "FG-Repeats" der Nukleoporine möglich, da so die vorwiegend hydrophilen Transportsubstrate in der hydrophoben Matrix gelöst werden können. Das "oily -spaghetti" Modell (Macara *et al.* 2001) schlägt einen offenen NPC Kanal vor, der mit hydrophoben, nicht interagierenden "FG-Repeats" gefüllt ist, die von den translozierenden Rezeptor-Substrat Komplexen beiseite geschoben werden können, aber die Passage von anderen Molekülen verhindern.

Frey *et al.* (2006) haben mittlerweile gezeigt, dass FG-Nukleoporine ein Netzwerk mit gelartigen Eigenschaften ausbilden können. Außerdem legen neuere Studien dar, dass mehr als die Hälfte der FG-Domänen deletiert werden können, ohne die Lebensfähigkeit der Zellen zu beeinträchtigen, beobachtete Defekte betrafen immer spezifische Transportrouten und nicht generell den Im- oder Export. Die asymmetrisch lokalisierten FG-Domänen erwiesen sich ebenfalls als nicht essentiell (Strawn *et al.*, 2004). Zeitler und Weis (2004) generierten Kernporenkomplexe mit invertierter FG-Asymmetrie und es waren keine Transportdefekte nachweisbar. Diese Daten legen nahe, dass es unterschiedliche Transportrouten durch den NPC gibt, bei denen auch die Nukleoporine ohne "FG-Repeats" eine Rolle spielen könnten und dass die asymmetrische Verteilung der Nukleoporine für den nukleocytoplasmatischen Transport nicht zwingend erforderlich ist. Für das Verständnis der molekularen Mechanismen am Kernporenkomplex und seine Rolle bei der Regulation des nukleocytoplasmatischen Transports sind allerdings noch weitergehende Studien erforderlich.

1.2 Die Transportrezeptoren

Verschiedene Klassen von löslichen Transportrezeptoren vermitteln den nukleocytoplasmatischen Transport. Sie haben sich unabhängig voneinander entwickelt und weisen keine Sequenzhomologien auf. Alle Transportrezeptoren haben aber die Fähigkeit, direkt mit den Nukleoporinen zu interagieren und somit die Passage der Transportsubstrate durch den Kernporenkomplex zu erleichtern. Die größte Klasse von Transportrezeptoren ist die evolutionär hoch konservierte Familie der Importin- β - homologen Proteine. Sie vermitteln den Transport der meisten Proteine, ribosomaler Untereinheiten und mancher RNAs (Lei & Silver, 2002a; Macara 2001). Eine zweite, kleinere Klasse von Transportrezeptoren beinhaltet das Protein Ntf2 und mit ihm verwandte Proteine. Ntf2 vermittelt den Import der kleinen

GTPase Ran, deren homologes Protein in Hefe Gsp1 ist (Ribbeck *et al.*, 1998). In diese Gruppe gehört p15/Mtr2, ein Cofaktor im mRNA-Export (Katahira *et al.*, 1999). Es sind kleine Proteine mit hoher struktureller Ähnlichkeit, die charakteristischerweise entweder Homodimere wie Ntf2 oder heterodimere Komplexe mit strukturell ähnlichen Proteinen ausbilden. Die dritte Klasse von Transportrezeptoren stellt die NXF (nuclear export factor)-Familie dar, die den generellen mRNA-Export bewerkstelligen (Izaurrealde, 2002).

Die Importin- β -homologen Transportfaktoren besitzen alle ein Molekulargewicht von 90-130 kDa und einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 6, ihre Sequenzhomologie ist sehr gering ($< 20\%$) und teilweise auf den N-terminalen Bereich beschränkt. Allerdings zeigen sie eine hohe Strukturhomologie, alle Vertreter dieser Familie sind aus sich wiederholenden Strukturmotiven, den sogenannten "HEAT-Repeats" aufgebaut. "HEAT-Repeats" sind etwa 40 Aminosäuren lang und formieren sich zu zwei antiparallelen Helices, die über eine kurze "turn"-Region miteinander verbunden sind. Die aneinander gereihten "HEAT-Repeats" bilden eine superhelikale Struktur aus, die ausgedehnte Interaktionsflächen in den N- und C-terminalen Bereichen bereitstellt (Conti *et al.*, 2001). In Abbildung 3 ist exemplarisch die schematische Struktur mit den Interaktionsdomänen von Importin β dargestellt, dem zuerst entdeckten und am besten charakterisierten Transportrezeptor. Allen Transportfaktoren der Importin- β -Familie gemeinsam ist eine C-terminale Substratbindungsregion, ihre Fähigkeit direkt mit Nukleoporinen zu interagieren und eine N-terminale Bindungsdomäne für die GTPase Ran (Gsp1) (Görlich *et al.*, 1997). Die Assoziation mit Ran-GTP bzw. Gsp1-GTP hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Substratbindung und damit auf die Direktionalität des Transports. Die Transportfaktoren werden nach ihrer Funktion in Import- und Exportfaktoren gegliedert, wobei zwei Karyopherine (in Hefe Msn5 und im Säuger Importin13) sowohl Import als auch Export vermitteln können. Importine binden ihre Substrate nur in Abwesenheit von Ran-GTP, sie besitzen eine hohe Affinität zu Ran-GTP, was impliziert, dass ihre N-terminale Bindungsdomäne frei zugänglich für Ran-GTP ist (Görlich *et al.*, 1997). Die Bindung von Ran-GTP an den Importrezeptor führt durch eine Konformationsänderung zur Dissoziation des Substrats und damit zur Terminierung des Imports. Exportfaktoren hingegen benötigen die gleichzeitige Assoziation mit Ran-GTP, um ihre Substrate zu binden (Görlich *et al.*, 1997; Kutay *et al.*, 1997). Diese kooperative Bindung kommt ebenfalls durch Konformationsänderung der jeweiligen Interaktionsdomänen zustande.

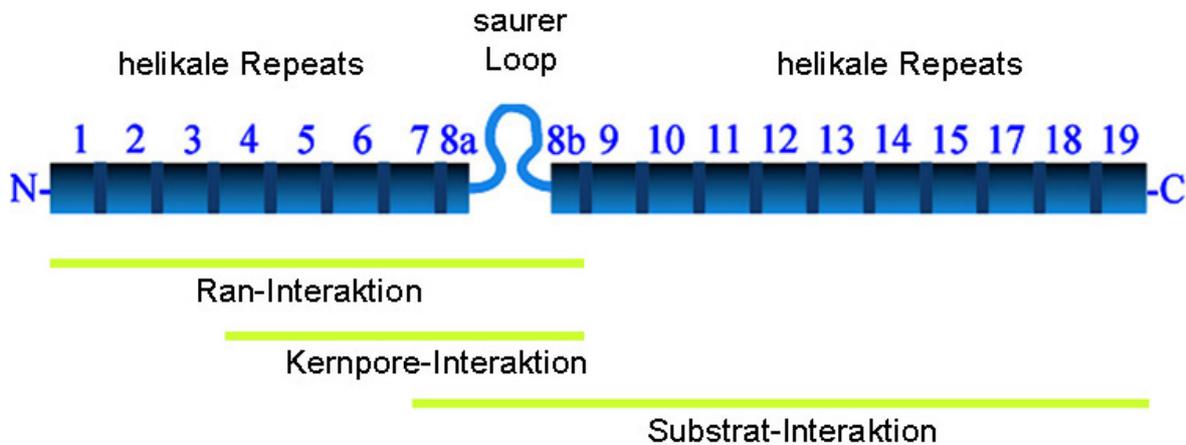


Abbildung 3: Schematische Struktur und Interaktionsdomänen von Importin β

Importin β besteht aus 19 sich wiederholenden Strukturmotiven, den "HEAT-Repeats". Die N-terminale Bindungsdomäne für Ran (Hefehomolog Gsp1) wird von "HEAT-repeat" 1-8 gebildet, die Interaktion mit dem Kernporenkomplex vermitteln "HEAT-repeat" 4-8 (Chi und Adam, 1997; Kutay *et al.*, 1997) und die C-terminale Substratbindungsregion umfasst "HEAT-repeat" 7-19 (Cingolani *et al.*, 1999).

Die Transportrezeptoren erkennen ihre Substrate zum größten Teil direkt über spezifische Signalsequenzen, in manchen Fällen sind aber auch zusätzliche Adapterproteine erforderlich. Im Säuger sind mittlerweile über 20 und in der Hefe *S. cerevisiae* 14 Mitglieder der Importin-β Familie beschrieben. Zehn davon fungieren als Importrezeptoren, drei als Exportrezeptoren und ein Protein (Msn5) wurde sowohl als Import- wie auch als Exportrezeptor charakterisiert. Tabelle 1 stellt eine Übersicht über die einzelnen Transportrezeptoren und ihre Substrate dar. Nur sehr wenige Transportrezeptoren sind für *S. cerevisiae* essentiell, dazu gehören die Importrezeptoren Kap95 (Koepp *et al.*, 1996) und Pse1 (Seedorf *et al.*, 1997) sowie die Exportrezeptoren Xpo1 (Adachi *et al.*, 1989) und Cse1 (Xiao *et al.*, 1993). Kristallisationsstudien von Importin β1 haben gezeigt, dass ein Karyopherin je nach Substrat verschiedene Bindungen eingehen kann. Dies impliziert, dass ein Transportrezeptor multiple Bindungsstellen besitzt und somit verschiedene Substrate, die keine Sequenzähnlichkeit zeigen, transportieren kann (Cingolani *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). Für Kap114 wurde *in vitro* ein Komplex mit Sua7, den Histonen H2A und H2B und Nap1 nachgewiesen und es wird angenommen, dass diese Proteine auch simultan in den Zellkern importiert werden können (Hodges *et al.*, 2005).

Tabelle 1: Die Transportrezeptoren in *S. cerevisiae* und ihre Substrate

Referenzen: (1) Enenkel *et al.*, 1995; (2) Aitchison *et al.*, 1996; (3) Kaffman *et al.*, 1998; (4) Rout *et al.*, 1997; (5) Chaves & Blobel, 2001; (6) Isoyama *et al.*, 2001; (7) Grosshans *et al.*, 2001; (8) Delahodde *et al.*, 2001; (9) Schlenstedt *et al.*, 1997; (10) Mosammaparast *et al.*, 2001a; (11) Pemberton *et al.*, 1999; (12) Mosammaparast *et al.*, 2001b; (13) Mosammaparast *et al.*, 2002; (14) Caesar *et al.*, 2006; (15) Ferrigno *et al.*, 1998; (16) Albertini *et al.*, 1998; (17) Polizotto & Cyert, 2001; (18) Rosenblum *et al.*, 1997; (19) Titov & Blobel, 1999; (20) Senger *et al.*, 1998; (21) Ferrezuelo *et al.*, 2002; (22) Yoshida & Blobel, 2001; (23) Kaffmann *et al.*, 1998; (24) De Vit & Johnston, 1999; (25) Jaquenoud *et al.*, 2002; (26) Boustany & Cyert, 2002; (27) Mahanty *et al.*, 1999; (28) Solsbacher *et al.*, 1998; (29) Shulga *et al.*, 1999; (30) Jensen *et al.*, 2000; (31) Yan *et al.*, 1998; (32) Ferrigno *et al.*, 1998; (33) Maurer *et al.*, 2001; (34) Hellmuth *et al.*, 1998; (35) Greiner *et al.*, 2004 (36) Sydorskyy *et al.*, 2003

SRP¹: signal recognition partikel

Import-rezeptor	Säuger-Homolog	Substrate	Knock out
Kap95 (Rsl1)	Importin β	NLS-Proteine zusammen mit Srp1 (Importin α) (1)	-
Kap104	Transportin	mRNA bindende Proteine Nab2 und Hrp1 (2) Histone H2A und H2B (35)	+
Pse1 (Kap121)	Importin 5	Pho4 (3) ribosomale Proteine (4) Histone H2A und H2B (35) Spo12 (5), Yap1 (6), SRP ¹ (7) Pdr1 (8)	-
Kap123 (Yrb4)	Importin 4	ribosomale Proteine (4,9) SRP ¹ (7) Histone H3 und H4 (10) H2A und H2B (35)	+
Kap114	Importin 9	TATA bindendes Protein Tbp1 (11) Histone H2A und H2B (12, 35) Histonchaperon Nap1 (13) Rpf1 (14)	+
Nmd5 (Kap119)	Importin 7,8	MAP-Kinase Hog1 (15) Transkriptionsfaktoren TFIIS (16) und Crz1 (17), Rpf1 (14)	+
Sxm1 (Kap108)	Importin 7,8	Lhp1 (18) ribosomale Proteine (36)	+
Pdr6 (Kap122)	Importin 13	Toa1 und Toa2 (19)	+

Einleitung

Import-rezeptor	Säuger-Homolog	Substrate	Knock out
Mtr10 (Kap111)		Npl3 (20) Tlc1 (21)	+
Kap120	Importin 11	Rpf1 (14)	+
Msn5 (Kap142)		Replication Protein A (22)	+
Export-rezeptor			
Msn5 (Kap142)	Exportin 5	Phosphorylierte Proteine Pho4 (23), Mig1 (24); Cdh1 (25); Crz1 (26); Ste5(27)	+
Cse1 (Kap109)	CAS	Adapterprotein Srp1 (28)	-
Xpo1 (Kap124)	CRM1/ XPO1	Ssb1 (29), Ace2 (30) , Yap1 (31) , Hog1 (32) Yrb1 (33)	-
Los1 (Kap127)	Exportin-t	tRNA (34)	+

Zudem besitzen viele Proteine, vor allem solche mit essentiellen Funktionen im Zellkern, verschiedene, redundante Importrouten.

Schließlich haben neuere Studien auch gezeigt, dass die Karyopherine neben dem nukleocytoplasmatischen Transport auch noch andere Funktionen besitzen. Es wurde für Importin β gezeigt, dass es eine Rolle bei der Regulation der Mikrotubuli und der Zusammensetzung des Kernporenkomplexes spielt (Wiese *et al.*, 2001; Nachury *et al.*, 2001). Für Crm1 wurde eine regulatorische Funktion während der S-Phase des Zellzyklus nachgewiesen (Yamaguchi & Newport, 2003).

1.3 Der Gsp1-GTPase Zyklus

Das Protein Ran (Gsp1 in *S. cerevisiae*) ist eine Schlüsselkomponente des nucleocytoplasmatischen Transportes. Es bestimmt sowohl die Richtung des Transportes als auch die Interaktion der Transportfaktoren mit ihren Substraten (Corbett & Silver, 1997; Izaurralde & Adam, 1998; Mattaj & Englmeier, 1998). Mutationen in Ran gehen mit Defekten im bidirektionalen Transport einher (Schlenstedt *et al.*, 1995; Moore, 1998). Ran gehört zur Superfamilie der Ras-ähnlichen GTPasen, kommt jedoch im Gegensatz zu diesen sehr häufig und überwiegend im Kern vor (~ 90%) (Ren *et al.*, 1993). Die kleine GTPase (25 kDa) ist evolutionär hoch konserviert, das Hefeprotein Gsp1 und das Ran höherer Eukaryonten zeigen eine Homologie von über 80%. Wie andere GTPasen wechselt Ran zwischen der GTP- und GDP-beladenen Form und besitzt aber nur eine geringe intrinsische GTP-Hydrolyse- und Nukleotidaustauschaktivität. Es benötigt zur Steuerung seiner Aktivität spezifische Regulatoren. Bisher sind zwei Enzyme bekannt, die den Gsp1 (Ran)-Zyklus steuern (Abbildung 4). Der nukleäre, mit Chromatin assoziierte GDP/GTP Austauschfaktor Prp20 (im Säuger RCC1) vermittelt im Kern den Austausch von gebundenem GDP zu GTP (Bischoff & Ponstingl, 1991). Die GTP-Hydrolyse von Gsp1-GTP zu Gsp1-GDP wird durch das im Cytoplasma lokalisierte, GTPase-aktivierende Protein Rna1 (im Säuger RanGAP) katalysiert und durch Gsp1-bindende Proteine wie Yrb1 (Säugerhomolog RanBP1) verstärkt. Sowohl Rna1 als auch Yrb1 besitzen eine NES und werden über Xpo1 aus dem Zellkern exportiert (Feng *et al.*, 1999; Maurer *et al.*, 2001). Das Säugerprotein RanGAP ist kovalent mit den cytoplasmatischen Fibrillen des Kernporenkomplexes verknüpft (Mahajan *et al.*, 1997). Die exklusive Lokalisierung von Prp20 (GEF) im Kern wird durch die Assoziation mit Chromatin gewährleistet (Ohtsubo *et al.*, 1989). Diese asymmetrische Verteilung der beiden antagonistisch wirkenden Gsp1-Regulatoren führt zu hohen Gsp1-GTP Konzentrationen im Kern, und niedrigen Gsp1-GTP Konzentrationen im Cytoplasma. Mit Hilfe des resultierenden Gsp1-GTP-Gradienten wird vermutlich der gerichtete Transport über den NPC reguliert (Görlich *et al.*, 1996). Für dieses Modell spricht, dass es *in vitro* möglich ist durch eine Umkehrung des Gradienten die Transportrichtung ebenfalls umzukehren. (Nachury & Weis, 1999). Auch wurde ein solcher Gradient mittels spezieller mikroskopischer Techniken sowohl im zellfreien *Xenopus*-System als auch in intakten somatischen Zellen visualisiert und der Konzentrationsunterschied zwischen nukleärem und cytoplasmatischen RanGTP wurde auf 200:1 geschätzt (Kahlab *et al.*, 2002).

Importkomplexe werden im Cytoplasma in Abwesenheit von Gsp1-GTP gebildet und in den Kern transportiert. Dort werden die Substrate durch Gsp1-GTP Bindung an die Importrezeptoren freigesetzt und Gsp1-GTP wird im Komplex mit den Importrezeptoren aus dem Kern exportiert. Außerdem wird Gsp1-GTP in Assoziation mit Exportfaktoren und deren Substraten aus dem Kern exportiert und im Cytoplasma als Gsp1-GDP freigesetzt. Der Rücktransport in den Zellkern wird von dem Transportfaktor Ntf2 vermittelt, der im Cytoplasma ausschließlich Gsp1-GDP bindet (Ribbeck *et al.*, 1998). Der Reimport von Ran-GDP ist hoch effizient, es wurde gezeigt, dass pro Sekunde 2500 Ntf2 Homodimere durch die Kernpore wandern (Ribbeck *et al.*, 1998).

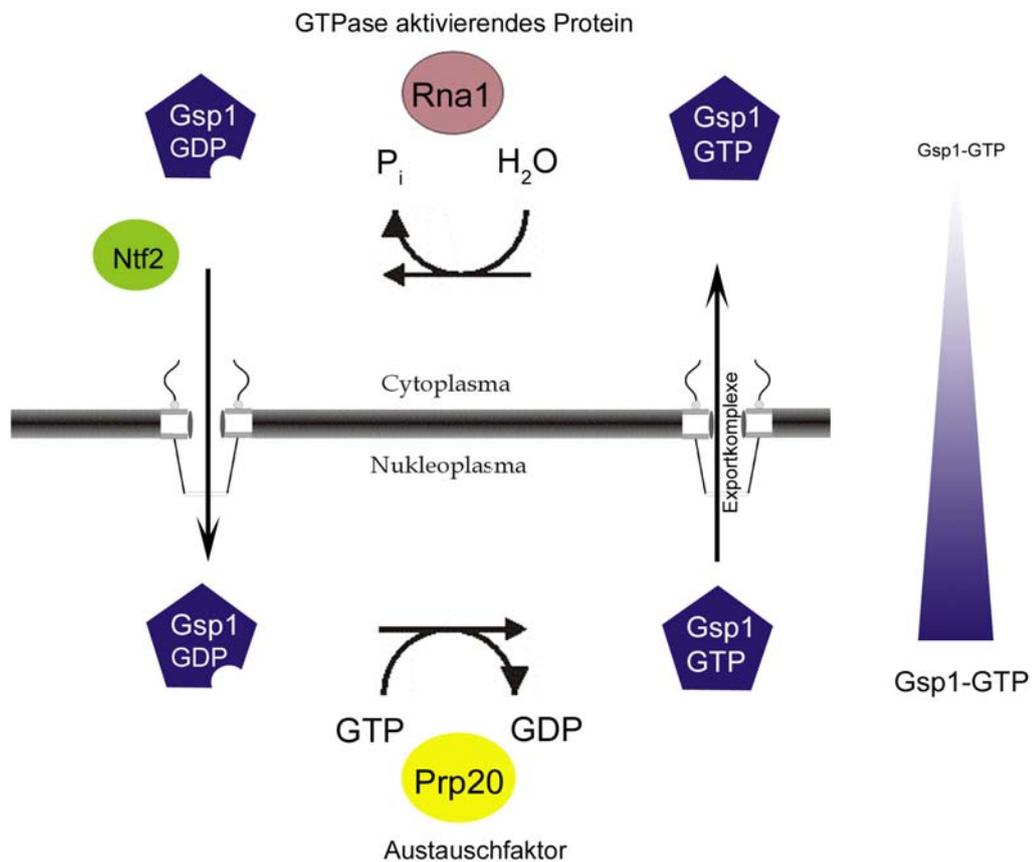


Abbildung 4: Der Gsp1-GTPase Zyklus und der resultierende Gsp1-GTP Gradient

Exportkomplexe werden in Assoziation mit Gsp1-GTP ins Cytoplasma transportiert. Das GTPase aktivierende Protein Rna1 (GAP) katalysiert die Hydrolyse von GTP zu GDP und der Kerntransportfaktor Ntf2 vermittelt den Rücktransport von Gsp1-GDP in den Zellkern. Dort wird durch den GDP/GTP Austauschfaktor Prp20 (GEF) Gsp1-GDP wieder zu Gsp1-GTP umgewandelt. Aus diesem Zyklus resultiert ein Gsp1-GTP-Gradient mit hohen Konzentrationen von Gsp1-GTP im Zellkern und niedrigen im Cytoplasma.

Der nukleocytoplasmatische Transport ist ein energieabhängiger Prozess, wobei die Translokation der Rezeptor-Substrat-Komplexe an sich nicht auf eine GTP-Hydrolyse angewiesen ist (Dahlberg & Lund, 1998), die GTP-Hydrolyse von Gsp1-GTP im Cytoplasma pro Import-Export-Zyklus dient zur Aufrechterhaltung des Gsp1-GTP Gradienten.

Ran hat neben seiner bedeutenden Rolle beim nukleocytoplasmatischen Transport auch Funktionen bei der Progression des Zellzyklus, der nukleären Organisation und der Zusammensetzung der Kernporenkomplexe. Bei Säugern, die im Gegensatz zu *S. cerevisiae* eine offene Mitose haben, konnte gezeigt werden dass sowohl Ran-GTP als auch Transportfaktoren der Importin- β Familie Funktionen bei der Mikrotubuli- und Spindelorganisation (Wiese *et al.*, 2001; Nachury *et al.*, 2001), der Regulation der S-Phase (Yamaguchi & Newport, 2003) sowie der Zusammensetzung der Kernporenkomplexe innehaben (Ryan *et al.*, 2003) (Review: Mosammaparast & Permberton, 2004).

1.4 Importprozesse

Die erleichterte Translokation großer Makromoleküle erfordert Signalsequenzen und erfolgt durch lösliche Kerntransportfaktoren, die spezifisch an ihre jeweiligen Substrate binden. Der Importkomplex transloziert dann durch den NPC und das Substrat wird im Kern freigesetzt.

Importfaktoren erkennen ihre Substrate über Kernlokalisierungssequenzen (NLS). Als erste Erkennungssequenzen für den Import von Proteinen wurden die einfache monopartite NLS, die aus einem kurzen Abschnitt basischer Aminosäurereste ähnlich der SV40-NLS besteht (Kalderon *et al.*, 1984b), und die zweigeteilte (bipartite) NLS identifiziert. Ein Beispiel für die bipartite NLS findet sich in Nukleoplasmin, sie ist aus zwei Clustern basischer Aminosäurereste, die etwa zehn Reste voneinander getrennt sind, aufgebaut (Robbins *et al.*, 1991). Außer diesen beiden klassischen Kernlokalisierungssequenzen sind mittlerweile eine Vielzahl von Erkennungssequenzen identifiziert worden, die zum Teil komplex aufgebaut sind und keine definierte Konsensussequenz zeigen. Es wird angenommen, dass generelle Merkmale wie Länge, Ladung, Hydrophobizität und die Stellung wichtiger Aminosäurereste eine Rolle spielen (Fried *et al.*, 2003). Kürzlich wurde eine konservierte neue NLS charakterisiert, die das Histon H2A und Asr1 tragen und die von den fünf Importinen Kap95, Kap123, Pse1 und Kap104 erkannt wird (Fries *et al.*, 2007).

In Tabelle 2 sind Beispiele für Erkennungssequenzen aufgeführt, wobei teilweise Konsensussequenzen und Signalsequenzen verschiedener Substrate dargestellt sind.

Tabelle 2: Signalsequenzen für den Import

Importsignal	Aminosäuresequenz	Referenz
Klassische monopartite NLS	B ₄ , P(B ₃ x), Pxx(B ₃ x), B ₃ (H/P)	(Macara, 2001)
SV40 T-Antigen monopartite NLS	<u>PKKKRKV</u>	(Kalderon <i>et al.</i> , 1984a)
Klassische bipartite NLS	BBx ₁₀ (B ₃ x ₂)	(Macara, 2001)
Nukleoplasmin bipartite NLS	<u>KRPAATKKAGQAKKKKLD</u>	(Robbins <i>et al.</i> , 1991)
hnRNP A1 M9-Domäne	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPY GGGGQYFAKPRNQGGY	(Siomi <i>et al.</i> , 1995)
Ribosomale L23a NLS BIB-Domäne	VHSHKKKKIRTSPFRRPKTLRL RRQPKYRRKSAPRRNK	(Jäckel <i>et al.</i> , 1998)
Rpl25 NLS	MAPSAKATAAKKAVVKGTTNGK KALKVRTSATFRLPKTLKLA	(Schaap <i>et al.</i> , 1991)
SmB NLS	KKERLVRDKKEKKQAQKQTKL RKEKEKKPGKIAKPNTANAK	(Bordonne <i>et al.</i> , 2000)
Virale NLS	RxxRRx _{1,2} RBR	(Truant <i>et al.</i> , 1999)
Konsensussequenz neuer konservierter NLS	R/KxxL(x) _n V/YxxV/lxK/RxxxK/R	(Fries <i>et al.</i> 2007)

B = basischer Aminosäurerest (K oder R) x = beliebiger Aminosäurerest Aminosäure in Klammern = beliebige Reihenfolge Aminosäure durch Schrägstrich getrennt = alternative Möglichkeiten tiefgestellte Zahlen = Anzahl der Aminosäurereste

In Abbildung 5 sind verschiedene Importrouten dargestellt. Beim klassischen NLS-abhängigen Import fungiert als Transportrezeptor ein Heterodimer aus Srp1 (Hefehomolog von Importin α) und Kap95 (Hefehomolog von Importin β). Srp1 ist als Adapterprotein für die Erkennung und Bindung des NLS-Proteins notwendig, während Kap95 die Bindung an die Nukleoporine des NPC und die Translokation vermittelt (Görlich *et al.*, 1994; Görlich *et al.*, 1995; Solsbacher *et al.*, 2000). Srp1 bindet über seine stark basische, aminoternale IBB-Domäne an Kap95 und dadurch wird die NLS Bindungsstelle zur Interaktion mit dem NLS-Substrat freigelegt (Cingolani *et al.*, 1999).

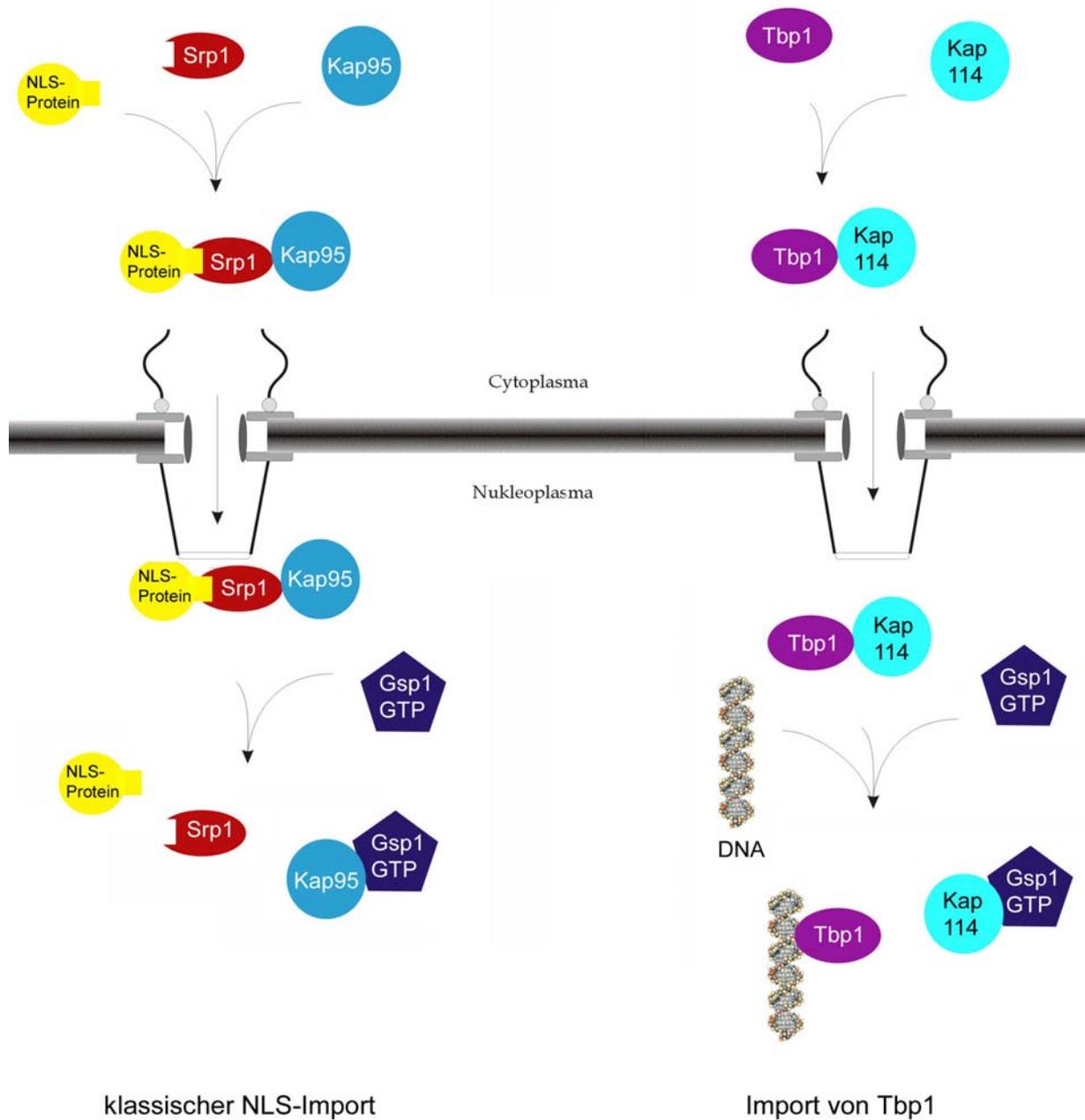


Abbildung 5: Importwege in den Zellkern

Der klassische NLS-Import erfordert ein Heterodimer aus dem Adapterprotein Srp1 (Importin α) und Kap95 (Importin β). Nach Translokation durch die Kernpore wird der Importkomplex im Zellkern durch Bindung von Gsp1-GTP an Kap95 dissoziiert. Der Import von Tbp1 erfolgt über Kap114, das direkt an sein Substrat bindet. Nach Translokation durch die Kernpore reicht die Bindung von Gsp1-GTP alleine nicht aus, um den dimeren Importkomplex aufzulösen, erst bei gleichzeitiger Anwesenheit von DNA wird der Komplex dissoziiert und der Import terminiert.

Mittlerweile wurde in Säugern das Nukleoporin Nup50 als weiterer Cofaktor im Importin α / Importin β vermittelten Import identifiziert (Lindsay *et al.*, 2002) und zumindest für ein Substrat wurde gezeigt, dass Importin α auch unabhängig von Importin β Import vermitteln kann (Kotera *et al.*, 2005).

In Hefe binden alle anderen Importfaktoren außer Kap95 ihre Substrate direkt ohne Adapterprotein. Höhere Eukaryonten besitzen zum einen mehrere Isoformen des Adapterproteins Importin α , die gewebe- und entwicklungsspezifisch exprimiert werden und verschiedene Bindungsspezifitäten zeigen, und zum anderen noch weitere Adapterproteine, die am Import beteiligt sind.

Der Import von UsnRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) beispielsweise erfordert Importin β und als Adapterprotein Snurportin1 (Palacios *et al.*, 1997; Huber *et al.*, 1998). Importin β bildet auch Importkomplexe mit anderen Transportfaktoren, das Histon H1 wird z.B. von dem Dimer Importin β / Importin 7 in den Kern transportiert (Jäkel *et al.*, 1999).

Ribosomale Proteine weisen Kernlokalisierungssequenzen auf, die zwar eine Häufung von basischen und hydrophoben Aminosäureresten zeigen, die jedoch nicht mit der klassischen NLS übereinstimmen (Timmers *et al.*, 1999). Das L23A der Säuger besitzt einen 39 AS langen, basischen Abschnitt als Erkennungssequenz und wird von mehreren Transportrezeptoren (Importin β , Transportin, Importin 5 und 7), die alle an die gleiche Region binden, importiert (Jäkel & Görlich, 1998). Das ribosomale Hefeprotein Rpl25 besitzt am C-Terminus eine zweigeteilte NLS (Schaap *et al.*, 1991) und wird von Kap123 und Pse1 in den Kern transportiert. Kap123 und Pse1 fungieren als Importfaktoren für einige ribosomale Proteine und besitzen teilweise überlappende Substratspezifitäten (Rout *et al.*, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1997). Für essentielle Proteine wie z.B. ribosomale Proteine oder Histone existieren oft mehrere, alternative Importrouten, wobei jeweils ein beteiligter Importfaktor ebenfalls essentiell ist.

Ein weiteres gut charakterisiertes Importsignal ist die M9-Domäne von hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) in höheren Eukaryonten. Das Sequenzmotiv ist etwa 36 AS lang, reich an Glycin und aromatischen Aminosäureresten und als Importer für Proteine mit M9 Domäne wurde Transportin identifiziert (Fridell *et al.*, 1997). Das Hefehomolog von Transportin, Kap104, vermittelt den Import der hnRNP Proteine Nab2 und Hrp1, die als Signalsequenz RG reiche Sequenzen tragen, die keine Homologie zur M9-Domäne aufweisen.

Die Termination des Imports erfolgt im Allgemeinen nach der Translokation des Importkomplexes in den Kern durch Bindung von Gsp1-GTP an den jeweiligen Importfaktor,

wodurch das Substrat im Kern freigesetzt wird. In der Hefe *S. cerevisiae* wurde auch eine Rolle des Nukleoporins Nup2 bei der Termination des klassischen NLS-Imports nachgewiesen. Nup2, ein FG-Nukleoporin, das auf der nukleären Seite des NPC lokalisiert ist, bindet an Srp1 und verdrängt damit das NLS-Protein aus dem trimeren Importkomplex (Solsbacher *et al.*, 2000).

Es existieren auch noch andere Faktoren, die die Freisetzung substratspezifisch stimulieren, es handelt sich dabei meist um Nukleinsäuren, die als Bindungspartner für das jeweilige Substrat fungieren. Die Freisetzung der RNA-bindenden Proteine Nab2 und Hpr1 von Kap104 erfordert RNA und Gsp1-GTP (Lee & Aitchison, 1999). Ebenso erfolgt eine vollständige Dissoziation des Importkomplexes aus Npl3 und Mtr10 nur durch Gsp1-GTP und RNA (Senger *et al.*, 1998). Für das Säugerprotein hnRNP A1 wurde gezeigt, dass *in vitro* Ran-GTP alleine zwar ausreichend ist, um es von seinem Importer Transportin freizusetzen, *in vivo* jedoch zusätzlich prä-mRNA benötigt wird (Siomi *et al.*, 1997).

In Abbildung 5 ist der Import des TATA-bindenden Proteins Tbp1 durch den Transportfaktor Kap114 dargestellt, auch dieser Importkomplex wird nur dann vollständig dissoziiert, wenn außer Gsp1-GTP auch DNA, die TATA Sequenzen enthält, vorhanden ist (Pemberton *et al.*, 1999). Somit spielen die Transportfaktoren auch beim intranukleären Transport eine Rolle und können ihre Substrate zielgerichtet am jeweiligen Wirkungsort freisetzen.

Nach der Dissoziation der Importkomplexe werden die Importfaktoren in Assoziation mit Gsp1-GTP aus dem Zellkern exportiert und können dann ihre Funktion erneut ausüben.

1.5 Exportprozesse

1.5.1 Export durch Importin β homologe Transportfaktoren

Alle Exportfaktoren der Importin β -Familie binden ihre Substrate nur bei gleichzeitiger Assoziation von Gsp1-GTP (Ran-GTP). Der trimere Exportkomplex transloziert durch den Kern und wird dann im Cytoplasma von weiteren Faktoren dissoziiert.

Analog zum Import existieren auch für den Export spezifische Signalsequenzen wie die NES (nuclear export sequence), die Exportsubstrate kennzeichnen. Dieses Leucin-reiche Sequenzmotiv wurde in zwei unterschiedlichen Proteinen entdeckt, im zellulären cAMP abhängigen Proteinkinaseinhibitor (PKI) und dem Rev-Protein des Retrovirus HIV1. Diese beiden Sequenzen und das Konsensusmotiv der NES sind in Tabelle 3 angegeben, die vier

Leucinreste sind essentiell für die Funktionalität der NES (Bogerd *et al.*, 1999). Eine Datenbank für nukleäre Export Signale wurden von la Cour *et al.* (2003) zusammengetragen.

Tabelle 3: Signalsequenzen für den Export

Exportsignal	Aminosäuresequenz	Referenz
Leucinreiche NES Konsensussequenz	L-x ₂₋₃ -(L,I,M,F,M)-x ₂₋₃ -L-x-(L,I,V)	(Bogerd <i>et al.</i> , 1999)
PKI-NES	ELALKLAGLDIN	(Wen <i>et al.</i> , 1995)
HIV1-Rev-NES	LQLPPLERLTLD	(Fischer <i>et al.</i> , 1995)

x = beliebiger Aminosäurerest

Als Exporter für NES-Proteine fungiert Xpo1 (CRM1), das direkt mit der Leucinreichen NES interagiert (Fukuda *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Zudem transportiert Crm1 einige Substrate mit Hilfe von Adapterproteinen, die eine NES tragen. In Vertebraten werden die UsnRNPs über das Adapterprotein PHAX (phosphorylierter Adapter für RNA Export) CRM1-abhängig exportiert (Ohno *et al.*, 2000). Retroviren wie HIV1 rekrutieren Crm1 mit Hilfe NES-haltiger Adapterproteine (HIV1-Rev) für den Export ungespleißter mRNAs und umgehen auf diese Weise die zellulären Prozessierungskontrollen (Askjaer *et al.*, 1998; Popa *et al.*, 2002).

In Hefe dient Nmd3 als Adapterprotein für den Export der großen ribosomalen 60S Untereinheit (Gadal *et al.*, 2001). In den Export der 40S Untereinheit ist Xpo1 nachweislich auch involviert, aber es wurde bisher weder ein Adapter identifiziert, noch eine direkte Rolle von Xpo1 gezeigt (Roquette *et al.*, 2005). Ebenfalls ein Xpo1 Substrat in Hefe und Vertebraten ist das Signalerkennungspartikel SRP1, wobei noch unklar ist, ob die Interaktion direkt oder über ein Adapterprotein erfolgt (Hutten & Kehlenbach, 2007). Es wurden mittlerweile auch Cofaktoren des NES-abhängigen Exports identifiziert. Das Hefeprotein Yrb2 (und RanBP3 der Vertebraten) bindet direkt und ausschließlich an Xpo1 und bildet stabile quartäre Komplexe mit Xpo1, Gsp1-GTP und dem Exportsubstrat. Es wird angenommen, dass die Bindung von RanBP3 an Crm1 eine Konformation stabilisiert, an die beide, das NES-Substrat und Ran-GTP, binden können. (Englmeier *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 2001).

Es scheinen auch noch Substrate mit anderen Exportsignalen zu existieren, die von Xpo1 (CRM1) erkannt werden. Snurportin1, der Importer der UsnRNPs wird über CRM1 exportiert

und zeigt die Bindung mit der höchsten Affinität, besitzt aber kein NES-Sequenzmotiv (Paraskeva *et al.*, 1999). In Hefe wurde gezeigt, dass Yrb1 von Xpo1 aus dem Kern transportiert wird und dafür die gesamte Ran-Bindungsdomäne notwendig ist (Maurer *et al.*, 2001; Künzler *et al.*, 2001).

Importfaktoren translozieren in Assoziation mit Gsp1-GTP zurück ins Cytoplasma, das Adapterprotein Srp1 (Importin α) benötigt hingegen für den Rücktransport einen spezifischen Exportfaktor, Cse1 (CAS). Es kommt zu einer kooperativen Komplexbildung von Srp1 mit Cse1 und Gsp1-GTP und anschließendem Export über den NPC (Abbildung 6). Cse1 zeigt erst dann eine starke Affinität zu Srp1, wenn das NLS-Protein freigesetzt ist, so wird ein vorzeitiger Export verhindert (Kutay *et al.*, 1997; Solsbacher *et al.*, 1998).

Viele RNAs liegen im Kern als RNP Partikel mit einer Vielzahl gebundener Proteine vor, wobei sowohl die RNA als auch die bindenden Proteine Transportsignale tragen können. Es wurde nachgewiesen, dass jede RNA Species (mRNA, rRNA, tRNA und snRNA) ihren eigenen spezifischen Exportweg besitzt (Jarmolowski *et al.*, 1994). Der Exportfaktor Los1 (Exportin t) ist für den Export der tRNA zuständig, er interagiert als einziger bisher bekannter Transportfaktor direkt mit RNA. (Arts *et al.*, 1998a ; Kutay *et al.*, 1998). Möglicherweise wird bereits im Kern die Struktur der RNA überprüft, da die korrekte Prozessierung der tRNA für den Export benötigt wird und reife tRNAs im Gegensatz zu prä-tRNAs effizienter transportiert werden (Arts *et al.*, 1998b, Lipowsky *et al.*, 1999). Da Los1 allerdings nicht essentiell ist und eine Deletion von *LOS1* nur zu einem schwachen Exportdefekt führt, muss noch eine alternative Exportroute für tRNA existieren. In höheren Eukaryonten wurde ein neuer Exportfaktor, Exportin 5, identifiziert, der RNAs mit Minihelix-Exportmotiven exportiert, hauptsächlich prä-micro RNAs, die als ca. 22 Nukleotide lange, endogene, nicht kodierende RNA Moleküle eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionalen Genregulation spielen (Bohnsack *et al.*, 2004). Exportin 5 ist ebenfalls für den Export des Elongationsfaktors eEF1/tRNA Komplexes verantwortlich, es bindet wie Transportin direkt an tRNA und eEF-1A wird über aminoacylierte tRNA an den Exportkomplex rekrutiert (Bohnsack *et al.*, 2002; Calado *et al.*, 2002). Die Deletionen von Msn5, dem Hefehomologen von Exportin 5, sowie allen bisher bekannten Exportfaktoren und einigen Importfaktoren der Hefe zeigte keine Beeinträchtigung des tRNA-Exports (Feng & Hopper, 2002). Obwohl es Hinweise auf andere Proteine wie beispielsweise Cca1, welches das terminale CCA an die tRNA anhängt, gibt, die eine Rolle im Los1-unabhängigen tRNA Export spielen (Feng & Hopper, 2002; Großhans *et al.*, 2000), konnte ein alternativer Exportweg bisher nicht identifiziert werden.

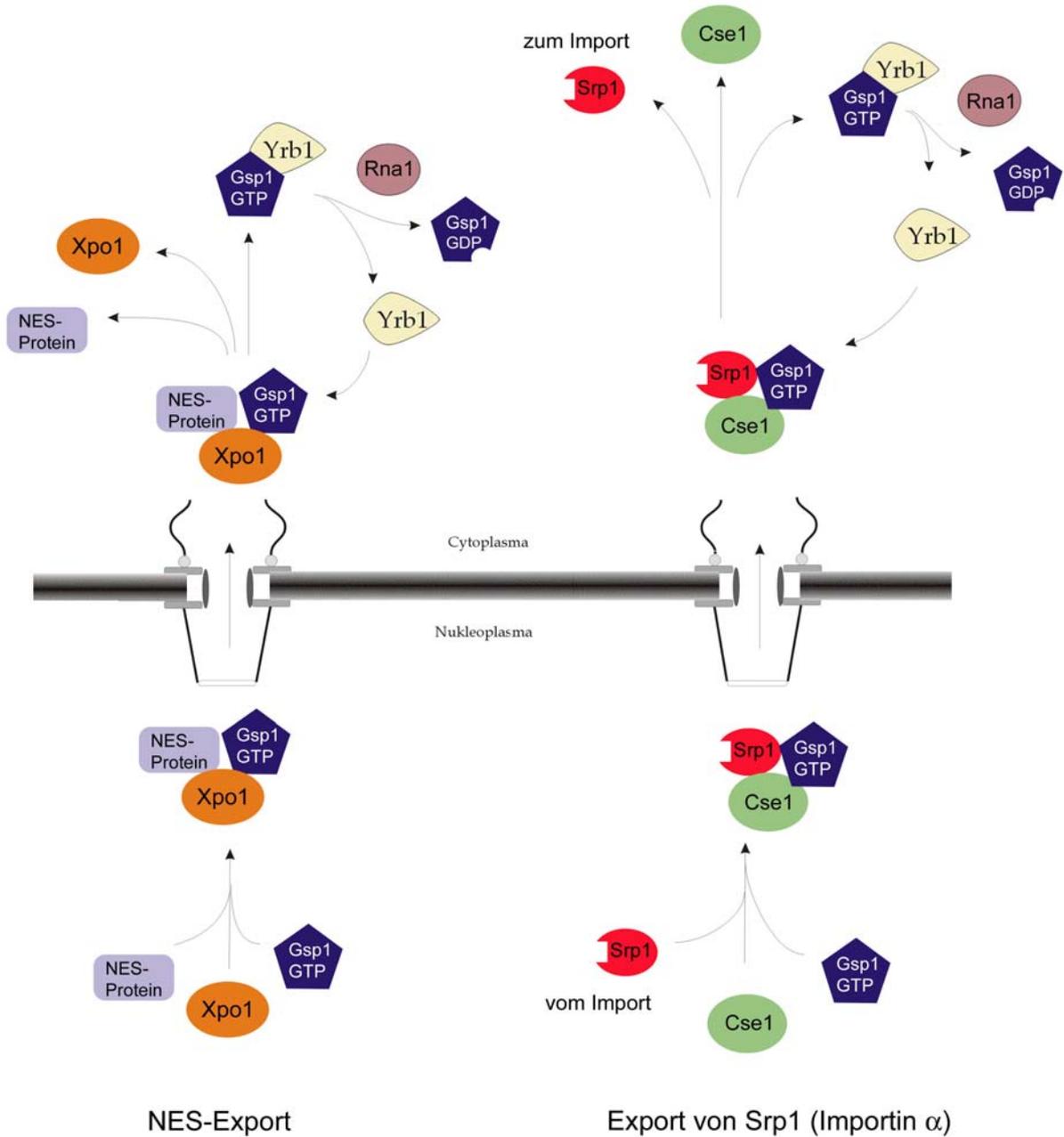


Abbildung 6: Exportwege aus dem Zellkern

Exportfaktoren benötigen die gleichzeitige Assoziation mit Gsp1-GTP, um ihre Substrate zu binden. Als Exportin für Proteine, die ein NES-Signal tragen, fungiert Xpo1, während Cse1 das Adapterprotein Srp1 (Importin α) wieder exportiert, damit es für einen erneuten Import zur Verfügung steht. Sämtliche Exportkomplexe werden im Cytoplasma durch den Dissoziationsfaktor Yrb1 und das GTPase aktivierende Protein Rna1 dissoziiert, wobei die Hydrolyse von Gsp1-GTP zu Gsp1-GDP von Rna1 katalysiert wird.

Die Termination des Exports erfolgt nach Translokation der trimeren Exportkomplexe durch den NPC im Cytoplasma. Aufgrund der hohen kinetischen Stabilität der Exportkomplexe, die daher rührt, dass die Transportfaktoren sowohl die intrinsische GTPase-Aktivität von Gsp1 (Ran) als auch die GTPase-Aktivierung durch Rna1 (RanGAP1) hemmen (Floer & Blobel, 1996; Schlenstedt *et al.*, 1997), sind spezifische Dissoziationsfaktoren erforderlich. Somit wird eine vorzeitige Dissoziation des Exportkomplexes im Kern verhindert. Der cytoplasmatische Dissoziationsfaktor Yrb1 (RanBP1) bildet ein Dissoziationsintermediat mit Gsp1-GTP und dem Transportrezeptor und erhöht die GTPase-Aktivität von Gsp1 (Schlenstedt *et al.*, 1995; Bischoff & Görlich 1997). Das ebenfalls im Cytoplasma lokalisierte GTPase aktivierende Protein Rna1 katalysiert dann die irreversible Hydrolyse des von Gsp1 gebundenen GTP zu GDP und der Exportkomplex wird aufgelöst (Abbildung 6).

1.5.2 Export der mRNA

Eine neu synthetisierte Vorläufer mRNA wird vor dem Export zahlreichen Prozessierungsschritten, wie der Bildung einer 5'-Kappe, Spleißen, sowie Trimmen und Polyadenylieren des 3'Endes, unterzogen. Die Formation eines exportkompetenten RNP-Komplexes erfordert eine dynamische Umgestaltung von Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen, die schließlich in der Dissoziation von "nuclear retention"-Faktoren und in der Assoziation von Signalen, die notwendig für die Bindung der Exportmaschinerie sind, münden. Eine Reihe von Faktoren, darunter zahlreiche mRNA-bindende Proteine, Nukleoporine und ATPasen/RNA-Helikasen sind in den mRNA-Export involviert (Tabelle 4). Obwohl maßgeblich für den Kerntransport aller nicht kodierenden RNAs verantwortlich, sind die Transportfaktoren der Importin β Familie- und mit ihnen auch das Ran-GTPase System im Allgemeinen nicht in den Export von mRNA involviert (Neville & Rosbash, 1999; Clouse *et al.*, 2001). Alle bislang identifizierten mRNA Transportfaktoren gehören der evolutiv konservierten NXF (nuclear export factor)-Familie an und üben ihre Funktion in Assoziation mit einem Kofaktor aus (Herold *et al.*, 2000). NXF-Proteine zeigen eine ähnliche Domänenstruktur, sie besitzen eine N-terminale Leucin-reiche Region (LRR), eine Zentraldomäne, die Ähnlichkeit mit der Struktur des Importfaktors Ntf2 aufweist und eine C-terminale Region, die eine UBA (Ubiquitin assoziierende)-Domäne darstellt.

Die am besten charakterisierten Mitglieder der NXF-Familie sind die Proteine Mex67 in *S. cerevisiae* und sein Pendant in Vertebraten TAP/NXF1, die mit den Kofaktoren Mtr2 bzw. p15/Nxt1 maßgeblich am mRNA-Export beteiligt sind.

Die LRR-Domäne und die N-terminale Region der NXF-Rezeptoren sind für die Bindung an mRNA zuständig (Liker *et al.*, 2000; Zolotukhin *et al.*, 2002). Die zentrale Ntf2-ähnliche Domäne ist die Bindungsstelle der beiden Kofaktoren Mtr2 bzw. p15, die wiederum die Bindung an den NPC vermitteln (Katahira *et al.*, 1999). Die UBA-Domäne stellt eine weitere Bindungsstelle für FG-Nukleoporine dar (Katahira *et al.*, 1999, Bachi *et al.*, 2000). Weder TAP noch Mex67 haben eine hohe Affinität zu RNA und ihre Interaktion mit mRNA wird vor allem über Adapterproteine vermittelt (Katahira *et al.*, 1999). Der bekannteste Adapter ist das essentielle Protein Yra1 in Hefe oder Aly in Vertebraten, sie gehören zur evolutiv stark konservierten REF (RNA und Exportfaktor bindende Proteine)-Familie der hnRNP ähnlichen Proteine. Yra1 ist erforderlich für den mRNA-Export (Strässer *et al.*, 2000), es bindet an mRNA und interagiert direkt mit dem Exportfaktor Mex67, Mex67 wird über Yra1 an das mRNP rekrutiert (Zenklusen *et al.*, 2001).

Einige hnRNP-Proteine wie Npl3, Nab2, Hrb1 oder Hrp1 sind essentiell für den mRNA-Export in Hefe. Neuere Studien zeigen, dass das SR Protein Npl3 ebenfalls direkt mit Mex67 interagiert und als zusätzlicher Adapter für den Exportfaktor fungiert (Gilbert *et al.*, 2004). Bisher gibt es keinen Hinweis, dass die anderen mRNA-bindenden Proteine eine direkte Rolle bei der Rekrutierung von Mex67 spielen, wahrscheinlich sind sie passive Substrate und tragen indirekt zum Export bei, indem sie für eine korrekte Prozessierung und Verpackung der mRNA verantwortlich sind (Rodriguez *et al.*, 2004). Im Verlauf der Translokation der mRNPs, die im partiell entfaltenen Zustand und beginnend mit dem 5'-Ende stattfindet, kommt es zu massiven Umstrukturierungen. Viele Proteine dissoziieren und verbleiben im Kern, andere Proteine werden mit der mRNA ins Cytoplasma transportiert, dort abgelöst und reimportiert. In *S. cerevisiae* sind bisher etliche zwischen den Kompartimenten pendelnde, mRNA-bindende Proteine bekannt. Dazu gehören der Exportrezeptor Mex67-Mtr2 (Santos-Rosa *et al.*, 1998), die Kappenproteine Cbp80 und Cbp20 (Shen *et al.*, 2000), das Poly(A)-Bindepotein Pab1 (Minvielle-Sebastia *et al.*, 1997), Hrp1 (Kessler *et al.*, 1997), Nab2 (Lee & Aitchison, 1999), Npl3 (Lee *et al.*, 1996) und Dbp5 (Hodge *et al.*, 1999). Das DEAD-Box Protein Dbp5 spielt eine zentrale Rolle beim mRNA-Export. Es assoziiert bereits während der Transkription mit der mRNA und wird aufgrund seiner ATPase- und RNA-Helikaseaktivität als treibende Kraft hinter der Translokation und den Umstrukturierungen des mRNPs angesehen. Dbp5 interagiert mit den cytoplasmatischen Fibrillen des NPC durch direkte

Bindung an Nup159 und Gle1, es ist an der Ablösung der mRNPs vom NPC beteiligt und trägt damit zur Direktionalität des mRNA-Exports bei (Snay-Hodges *et al.*, 1998, Hodges *et al.*, 1999, Strahm *et al.*, 1999). Als gegenwärtiges Modell gilt die Vorstellung, dass an den NPC gebundenes Dbp5 die Energie der ATP-Hydrolyse dazu nutzt, um das mRNP durch den Kanal des NPC zu ziehen (Cole & Scarcelli, 2006).

Tabelle 4: mRNA-Exportfaktoren und ihre Funktion

n.i. = nicht identifiziert, modifiziert nach Rodriguez *et al.*, 2004; Referenzen siehe Text

Typ	Hefe	Säugerhomolog	Funktion in Hefe
Export-rezeptoren	Mex67-Mtr2	TAP-p15	mRNA-Export vermittelt Interaktion zwischen mRNA und Nukleoporinen
Adapter-proteine	Yra1/REF	Aly/REF	koppelt Transkription und Export (TREX), bindet naszierende RNA, Sub2 und Mex67
	Npl3		bindet mRNA während der Transkription, interagiert mit Mex67
	Sus1-Thp1-Sac3		dirigiert den SAGA Transkriptions-Initiations-Komplex an die Exportmaschinerie
	Nab2, Hpr1, Hrb1		pendelnde mRNA-bindende Proteine, essentiell für RNA-Verpackung und Export
		9G8, Srp20	SR (Ser-Arg-reiche) Spleißfaktoren
THO-Komplex	Hpr1,Tho2, Mft1,Thp2	Hpr1, Tho2, n.i., n.i.	Elongation der Transkription, rekrutiert Sub2 und Yra1
ATPase/ RNA Helikase	Sub2	UAP56	rekrutiert die Adapterproteine an das mRNP, interagiert mit Hpr1 (THO) und Yra1
	Dbp5	DBP5	Frühe mRNP Formation und Freisetzung der mRNP vom NPC
Nukleoporine	Nup159	Nup214	bindet Mex67 und Dbp5
	Nup116, Nup1	Nup98, Nup153	binden Mex67, essentiell für mRNA-Export
	Nup1, Nup60		binden Sac3-Thp Komplex
	Gle1, Gle2	Gle1, Gle2/Rae1	erforderlich für mRNA-Export Gle1 bindet an Dbp5

Hohe Anforderungen an die Exportmaschinerie werden nicht nur aufgrund des Umfangs und der Komplexität der Transportfaktoren gestellt, sondern sie muss zusätzlich noch in der Lage sein zwischen unreifen und vollständig prozessierten Transkripten zu unterscheiden. Deshalb ist die Exportmaschinerie eng mit der Transkription und Prozessierung verknüpft, wodurch ein hohes Maß an Kontrolle und Regulation möglich ist (Reed & Hurt, 2002; Stutz & Izaurralde, 2003). Eine bedeutende Rolle spielt hierbei laut Studien in *S. cerevisiae* der an der Transkriptionselongation beteiligte heterotetramere THO-Komplex (Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2) (Rondón *et al.*, 2003). Dieser Komplex wandert mit der RNA-Polymerase II über das Gen und rekrutiert hierbei die RNA-Helikase Sub2 (UAP56 in Vertebraten) durch direkte Interaktion mit Hpr1 (Zenklusen *et al.*, 2002). Sub2 wurde ursprünglich als Spleißfaktor identifiziert (Zhang & Green, 2001), wird allerdings über den THO-Komplex auch auf intronlose RNA geladen und rekrutiert seinerseits den Exportadapter Yra1, welcher die RNA daraufhin direkt bindet (Sträßer & Hurt, 2000; Zenklusen *et al.*, 2002). Auf diese Weise kommt der sogenannte TREX-Komplex zustande, der die Transkription mit dem Export verbindet und dessen Existenz auch in humanen Zellen nachgewiesen wurde (Sträßer *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002). Durch Binden des Exportfaktors Mex67 an Yra1 wird Sub2 dann vor dem Export aus dem Komplex verdrängt (Reed & Hurt, 2002; Sträßer & Hurt, 2001).

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass nicht alle mRNAs über einen einzigen linearen Exportweg, der durch den THO-Komplex, Sub2, Yra1 und Mex67 definiert ist, exportiert werden. Sub2 interagiert außerdem noch mit einem weiteren Exportfaktor Sac3, der einen stabilen Komplex mit Thp1 bildet, das wie der THO-Komplex an der Transkriptionselongation beteiligt ist (Gallardo *et al.*, 2001). Sowohl Thp1 als auch Sac3 sind in den mRNA-Export involviert und Sac3 interagiert mit dem Exportfaktor Mex67 und den Nukleoporinen Nup1 und Nup60, die am nukleären Korb lokalisiert sind (Fischer *et al.*, 2002). Neueren Hinweisen zufolge bindet Sac3 die primären Transkripte in einem sehr frühen Stadium, vermittelt über Sus1, eine funktionale Komponente des SAGA-Histonacetylase-Komplexes, der an der Transkriptionsinitiation beteiligt ist (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Ob Thp1-Sac3 und der TREX-Komplex an unterschiedliche mRNAs binden oder nacheinander an dasselbe Transkript rekrutiert werden, wird noch kontrovers diskutiert. Neben der Transkription spielt auch die korrekte mRNA-Prozessierung eine maßgebliche Rolle beim RNA-Export und auch in Hefezellen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des Spleißens am RNA-Export (Lei & Silver, 2002b).

Umfangreiche Indizien legen zudem nahe, dass eine korrekte 3'-Prozessierung und Polyadenylierung generell für den Export aller mRNAs erforderlich ist. Die 3'-Prozessierung

erhöht die Effizienz des mRNA-Exports erheblich, was auch hier auf eine Rekrutierung von Exportfaktoren hinweist (Brotsky & Silver, 2000). Die mRNA-Assoziation von Yra1 korreliert mit der 3'-Prozessierung (Lei & Silver, 2002b) und es werden auch weitere Faktoren, die in den mRNA-Export involviert sind, auf diesem Weg an die Transkripte gebunden. Hrp1, eine Komponente des Spaltungskomplexes, erkennt spezifisch das Polyadenylierungssignal (Kessler *et al.*, 1997), Nab2 und Pab1 regulieren die Länge des Poly(A)-Schwanzes (Hector *et al.*, 2002) und die Bindung multipler Moleküle des Poly(A)-Bindungsproteins Pab1 ist erforderlich für den Export (Brune *et al.*, 2005).

Exportfaktoren werden somit über verschiedene Mechanismen auf die prä-mRNA transferiert, wobei die Mechanismen zwischen den einzelnen Organismen und mRNAs variieren. Bei intronlosen Transkripten (5% der humanen und 95% der *S. cerevisiae* Gene; Goffeau *et al.*, 1996, Venter *et al.*, 2001) spielt die Rekrutierung mittels Transkription und 3'-Prozessierung vermutlich eine bedeutendere Rolle (Abruzzi *et al.*, 2004). Es wird auch eine spontane Bindung der Exportfaktoren an so genannte RNA-Identitätselemente diskutiert (Ohno *et al.*, 2002). Die Existenz von Identitätselementen würde erklären, weshalb weder die Transkription noch die Prozessierung unverzichtbar für den mRNA-Export sind (Fried & Kutay, 2003).

Über spezifische Kontrollmechanismen und die inhibierende Wirkung mancher Prozessierungsfaktoren wird der Export der Transkripte solange aktiv verhindert, bis alle Reifungsprozesse abgeschlossen sind. Der Phosphorylierungszyklus von Npl3 scheint hier eine regulatorische Rolle zu spielen. Npl3 wird phosphoryliert an die wachsende mRNA gebunden, interagiert mit Mex67 aber nur in der unphosphorylierten Form. Die Phosphatase Glc7, die ebenfalls essentiell für den mRNA-Export ist, koordiniert die Dephosphorylierung von Npl3 mit der Freisetzung des RNP von der 3'-Prozessierungsmaschinerie und der Rekrutierung von Mex67 (Gilbert *et al.*, 2004). Nach der Translokation wird Npl3 im Cytoplasma wiederum phosphoryliert, was zur Dissoziation von Mex67 vom RNP führt (Gilbert *et al.*, 2004).

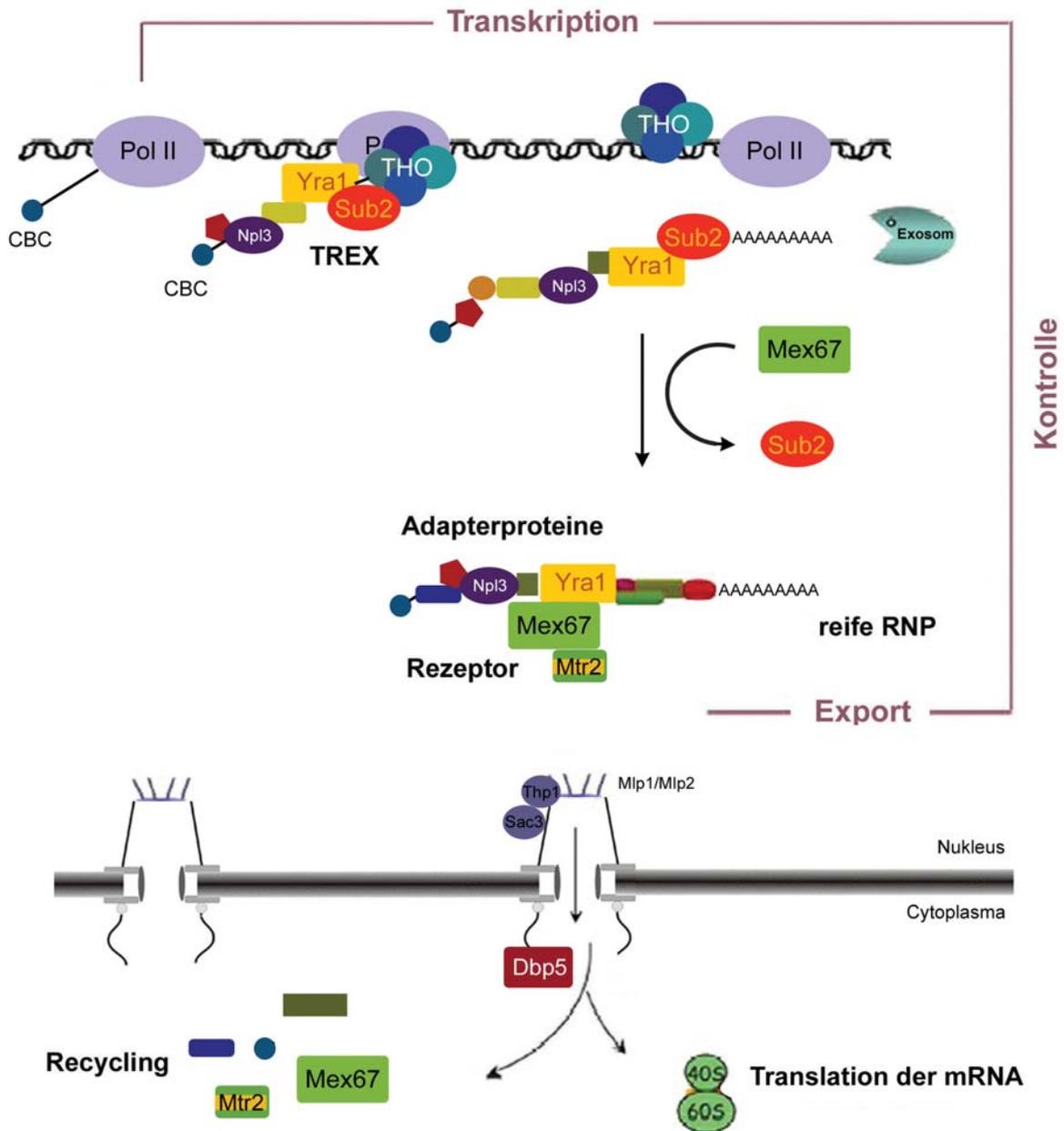


Abbildung 7: mRNA-Export

Der mRNA-Export ist mit der Transkription und der Prozessierung gekoppelt. In Hefe assoziiert der THO-Komplex während der Elongation mit der Transkriptionsmaschinerie und rekrutiert die beiden Exportadaptoren Sub2 und Yra1 (TREX-Komplex). Die frühe mRNP-Assemblierung wird einer Qualitätskontrolle durch das nukleäre Exosom unterzogen. Yra1 rekrutiert dann den Exportfaktor Mex67 an das mRNP und Mex67 vermittelt mit seinem Cofaktor Mtr2 die Translokation durch den NPC. Der Sac3-Thp1 Komplex interagiert in einem frühen Stadium mit dem mRNP (nicht gezeigt), bindet den Exportfaktor Mex67 und dirigiert die Komplexe zur nukleären Peripherie. Dbp5, das ebenfalls bereits im Kern an den mRNP gebunden wird (nicht gezeigt) und mit den cytoplasmatischen Fibrillen des NPC interagiert, ist vermutlich für die Direktionalität des mRNA-Exports verantwortlich. Eine weitere mRNA-Qualitätskontrolle findet vor dem Export durch die Mlp-Proteine statt. Der mRNA-Exportweg ist evolutiv stark konserviert. (modifiziert nach Rodriguez *et al.*, 2004).

Eine weitere wichtige Aufgabe der mRNA-Exportmaschinerie ist die RNA-Qualitätskontrolle. Fehlerhafte RNAs akkumulieren meist schon am Ort der Transkription und werden dort von dem nukleären Exosom abgebaut, es wurde eine Verbindung des TREX-Komplexes mit dem Exosom gezeigt (Jensen *et al.*, 2003; Galy *et al.*, 2004). Eine weitere Qualitätskontrolle findet vor dem Export durch die beiden am nukleären Korb des NPC lokalisierten Proteine Mpl1 und Mpl2 (Tpr in Säugern) statt. Es wurde nachgewiesen, dass sie ungespleißte RNA im Kern zurückhalten und somit verhindern, dass nicht funktionale Transkripte das Cytoplasma erreichen (Galy *et al.*, 2004). Neueren Hinweisen zufolge spielen die Mlp (myosin like proteins) Proteine eine generelle Rolle in der RNA-Qualitätskontrolle, im gegenwärtigen Modell stellt man sich die Mlp-Proteine als eine Art Filter vor, die vorzugsweise mit korrekt assemblierten mRNPs interagieren (Vinciguerra & Stutz, 2004).

Es werden mittlerweile parallele mRNA-Exporttrouten vermutet, und unterschiedliche Exportbedingungen für den generellen und den stressinduzierten mRNA-Export wurden bereits gezeigt (Krebber *et al.*, 1999; Farago *et al.*, 2003). Neuere Studien schreiben Mex67 ebenfalls eine Funktion bei der Autoregulation der Yra1-Expression zu, sowie eine generelle Rolle bei der mRNA-Translation (Dong *et al.*, 2007). Der mRNA-Export ist in seiner gesamten Komplexität bisher nur in Ansätzen verstanden und es wird noch einiger Forschung bedürfen, um alle Zusammenhänge aufzuklären.

1.6 Regulation des nukleocytoplasmatischen Transports

Eine Vielzahl spezifischer Mechanismen reguliert den nukleocytoplasmatischen Transport im Hinblick auf Umweltsignale, den Zellzyklus, Gentranskription und DNA-Replikation. Diese Regulationsmechanismen lassen sich allgemein in zwei Kategorien einteilen: In Mechanismen, die direkt die Bindung von Transportrezeptor und Substrat beeinflussen und solche, die die Regulation der Interaktionen von Rezeptoren und Nukleoporinen umfassen. Die am besten charakterisierte Form der Transportregulation beruht auf der Modifikation oder Maskierung einer NLS oder NES, um den Im- oder Export zu verhindern. Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Acetylierungen können die Bindung eines Substrats an sein Karyopherin entweder verstärken oder inhibieren (Kaffmann & O'Shea, 1999) und auch die Methylierung scheint ein Schlüsselfaktor beim Import einiger NLS zu sein (Smith *et al.*, 2004). Ein Beispiel für intramolekulares Maskieren ist die Verteilung des

Hefetranskriptionsfaktors Pho4, die auf Substratphosphorylierung beruht (Kaffmann *et al.*, 1998). Bei niedrigem Phosphatgehalt liegt Pho4 unphosphoryliert vor, interagiert mit Pse1, wird in den Zellkern importiert und übt seine transkriptionale Aktivierungsfunktion aus. Bei hohem Phosphatgehalt wird Pho4 phosphoryliert, was zu einer Inhibition der Pse1-Pho4 Interaktion führt und zur Stimulierung der Bindung an Msn5, was im darauf folgenden Export resultiert. Msn5 scheint in Hefe der bedeutendste Transportrezeptor für phosphorylierte Substrate zu sein (Mosammaparast & Pemberton, 2004). Ein intermolekulares Maskieren liegt vor, wenn die NLS bzw. NES durch Bindung anderer Proteine, Liganden oder auch RNA verdeckt wird (Poon *et al.*, 2005). p53, ein Transkriptionsfaktor, der in die Tumorsuppression involviert ist, pendelt dynamisch zwischen Cytoplasma und Zellkern. Bei Zellstress bildet p53 Tetramere, was zum einen die Fähigkeit DNA zu binden und die Transkription zu aktivieren stimuliert und zum anderen dazu führt, dass die NES maskiert ist und p53 somit im Nukleus verbleibt (Stommel *et al.*, 1999). Ein anderer Mechanismus zur Transportregulation ist die cytoplasmatische und nukleoplasmatische Retention, bei der ein Transportsignale enthaltendes Substrat durch Bindung an spezifische Faktoren im Cytoplasma oder Nukleoplasma zurückgehalten wird.

Zusätzlich zu diesen Regulationsmöglichkeiten mehren sich die Belege, dass auch der NPC eine Rolle bei der Modulierung der Transportraten innehat. Änderungen in der Zellphysiologie könnten zu Permeabilitätsänderungen durch molekulare Reorganisation des NPC führen (Lusk *et al.*, 2004). In Hefe wurde bereits gezeigt, dass der Pse1-vermittelte Import zellzyklusspezifisch über Umstrukturierung des NPC reguliert wird. In der Interphase des Zellzyklus ist Nup53 an das benachbarte Nukleoporin Nup170 gebunden und Pse1 kann mit seinen Substraten ungehindert den NPC passieren. Nach dem Eintritt in die Mitosephase wird Nup53 phosphoryliert, was die Interaktion mit Nup170 unterbindet und zu einer molekularen Umstrukturierung führt. Daraus resultierend wird die KBD (Karyopherin-Bindungsdomäne) für Pse1 von Nup53 exponiert, Pse1 bindet an Nup53 und der Pse1-vermittelte Import wird blockiert (Makhnevych *et al.*, 2003). Diese Studie ist die erste, die eine Transportinhibition eines Nukleoporins beschreibt und sie eröffnet eine kompliziertere Rolle des NPC im nukleocytoplasmatischen Transport als bisher angenommen.

2 Zellzyklus in *S. cerevisiae*

Der Zellteilungszyklus der Hefe *S. cerevisiae* wird wie in allen Eukaryonten in vier Phasen unterteilt (Abbildung 8, Lew *et al.* 1997). In der Synthese (S)-Phase wird die DNA repliziert, in der Mitose (M-Phase) werden die Schwesterchromatiden auf die Tochter- und die Mutterzelle aufgeteilt. Die S- und die M-Phase werden jeweils durch eine G-Phase (*gap*) voneinander getrennt. Die G1-Phase ist die Wachstumsphase der Zelle, an deren Ende der Startpunkt liegt, an dem aufgrund von Umwelt- (Nährstoffangebot, Paarungspartner) und zelleigener (Größe der Zelle) Bedingungen entschieden wird, ob ein Eintritt in den Zellzyklus erfolgt. START ist dabei definiert als der Punkt, an dem die Zelle nicht mehr arretierbar ist und unweigerlich in die S-Phase eintritt (Hartwell *et al.*, 1974). Während der folgenden S-Phase wird die DNA repliziert, es erfolgt die Verdopplung des Spindelpolkörpers. Der Beginn der S-Phase ist mikroskopisch durch die Ausbildung eines "bud" (Knospe) zu erkennen. Nach der G2-Phase kann die Zelle in die eigentliche Teilungsphase -die Mitosephase- eintreten. Die M-Phase wird in mehrere Unterabschnitte gegliedert (Pro-, Meta-, Ana- und Telophase), die durch genau definierte Abläufe gekennzeichnet sind: die Kondensation der Chromosomen, die Trennung der Spindelpolkörper, die den Centriolen in höheren Eukaryonten entsprechen, und der Beginn der Spindelbildung in der Prophase, die Auflösung der Kernhülle und die Ausbildung von Kinetochoren in der Prometaphase, die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene in der Metaphase, die Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase und schließlich die Bildung neuer Kernmembranen und die Dekondensierung der Chromosomen in der Telophase. Erst anschließend erfolgt eine Trennung der restlichen Zellbestandteile während der Cytokinese (Scholey *et al.*, 2003). Besonderheiten des Zellzyklus von *S. cerevisiae* sind zum einen die Erhaltung des Nukleus und der Nukleoli während der Mitose, man spricht dabei von einer Endomitose, und die fehlende Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialplatte. Viele durchlaufene Teilungen, ein unzureichendes Nährstoffangebot oder andere ungünstige Lebensbedingungen können zum Übertritt der Zelle in eine Ruhephase, die so genannte G0- Phase führen.

Um die korrekte Teilung der Zelle zu gewährleisten, ist der Zyklus einer hoch komplexen Regulation unterworfen. Die zentrale Rolle bei dieser Steuerung wird von cyklinabhängigen Proteinkinasen (CDKs, cyclin dependent kinases) übernommen, deren katalytische Untereinheiten bis hin zum Menschen konserviert sind. In den meisten Organismen ist die Proteinkinase Cdc2 (cell division cycle) für die eigentliche Mitose verantwortlich. In *S. cerevisiae* ist dies die essentielle Proteinkinase Cdc28, die auch außerhalb der Mitose eine

entscheidende Rolle spielt (Mendenhall & Hodge, 1998). CDKs phosphorylieren ihre Substrate überwiegend an einem S/T-P Motiv (Langan *et al.* 1989). Sie steuern zusammen mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, die einzelnen Schritte des Zellzyklus. Die Cycline regulieren dabei die Aktivität der CDKs und verleihen ihnen die Spezifität. Die Regulation von Aktivierung und Inaktivierung der CDK-Cyclin Komplexe beruht zum einen auf der Periodizität der Cyclinexpression, zum anderen auf ihrem zellzyklusgesteuerten, ubiquitinabhängigen Abbau (Abbildung 8). Außerdem werden die CDK-Cyclin Komplexe selbst durch aktivierende bzw. inhibierende Phosphorylierungen sowie durch CDK-Inhibitorproteine (CKIs) gesteuert (Amon *et al.*, 1992; Russell *et al.*, 1989; Thuret *et al.*, 1996).

Die Cycline der Hefe werden in zwei Klassen unterteilt, die G1-Cycline Cln1-3, die vorwiegend das Geschehen am Ende der G1 Phase regulieren, und die B-Typ Cycline Clb1-6, die in drei Stufen vom Start bis zur M-Phase exprimiert werden (Mendenhall & Hodge, 1998). Cln3 ist das einzige Cyclin, das nicht zyklisch transkribiert wird. Cdc28-Clb2 wird auch als Mitosis Promoting Faktor (MPF) bezeichnet, er agiert an der Grenze von G2 und M und ist für den eigentlichen Eintritt in die Mitose verantwortlich (Mendenhall & Hodge, 1998).

Die Regulation der Mitose ist sehr komplex und erfordert ein ganzes Netzwerk an Proteinen, die jeweils bestimmte Funktionen im Verlauf des Zellzyklus innehaben. Dauer und Abfolge der Zellzyklusphasen werden von Steuerungsmechanismen, an so genannten Kontrollpunkten („Checkpoint“) überwacht, die dafür sorgen, dass erst dann der nächste Schritt des Zellzyklus erfolgt, wenn der vorhergehende erfolgreich abgeschlossen ist. An solchen „Checkpoint“ besteht dann die Möglichkeit einer Unterbrechung (Arretierung) des Zellzyklus oder auch der Apoptose, des eingeleiteten programmierten Zelltodes, der mittlerweile auch für die Hefe nachgewiesen wurde (Madeo *et al.*, 2002).

Der Morphogenese „Checkpoint“ am G2 „Checkpoint“, auf den hier näher eingegangen wird, verbindet die morphologischen Ereignisse an G2 mit der räumlichen und zeitlichen Kontrolle des Mitoseeintritts. Der Eintritt in die Mitose ist kontrolliert von der Aktivität des Clb(1-4)/Cdc28 Komplexes, vor allem von Clb2/Cdc28, der von der Kinase Swe1 (*S. cerevisiae* Homologes von Wee1) über eine inhibitorische Phosphorylierung am Tyr19 gesteuert wird. Es wird angenommen, dass Swe1 den Mitoseeintritt so lange verzögert, bis eine kritische Zellgröße erreicht ist (Kellogg *et al.*, 2003), oder Defekte in der "bud" Formation von dem Morphogenese „Checkpoint“ angezeigt werden (Lew *et al.*, 2003).

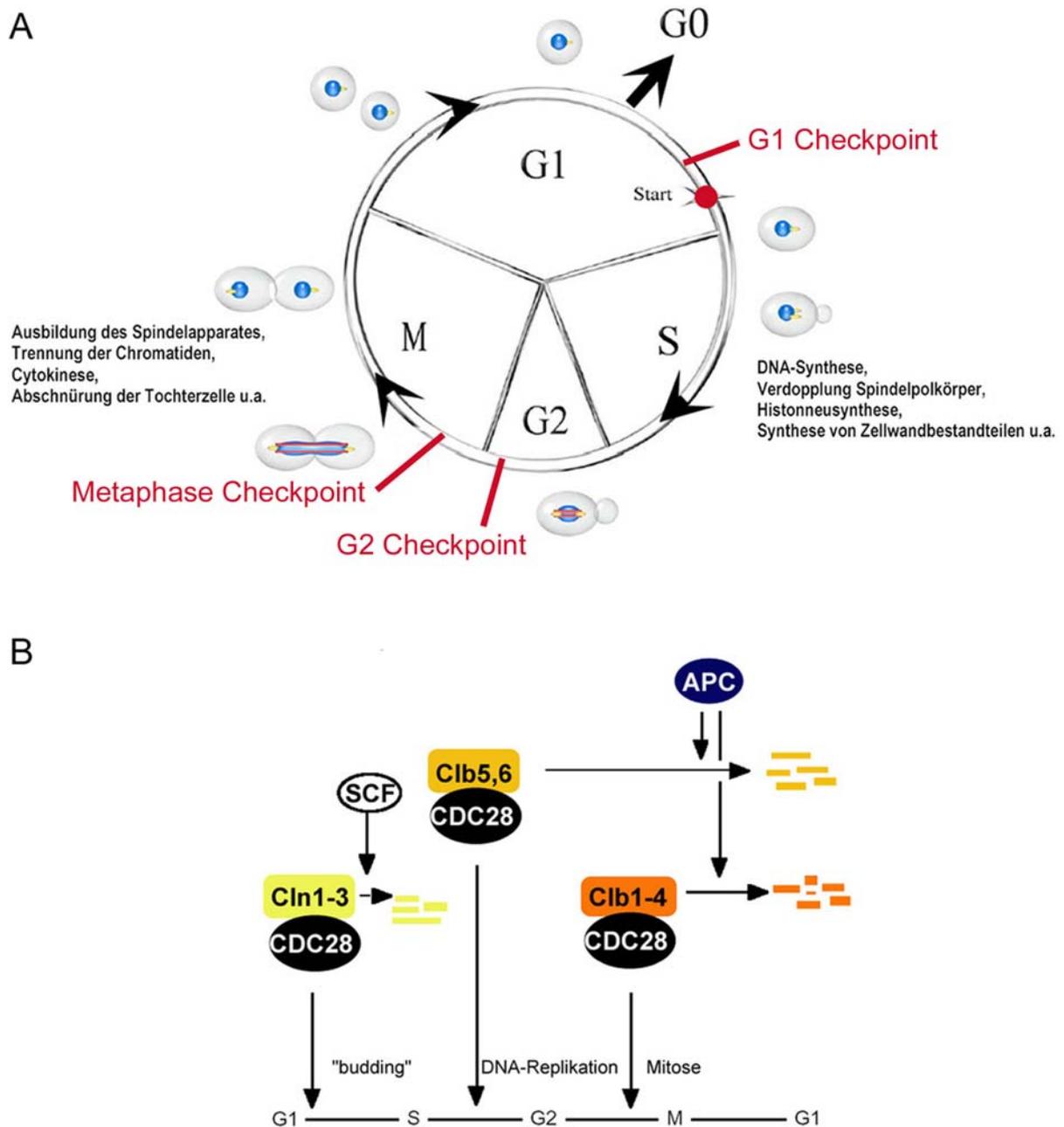


Abbildung 8: Der Zellzyklus in *S. cerevisiae*

A Der Zellzyklus der Hefe wird in die vier Phasen G1, S, G2 (Interphase) und M (Mitose) eingeteilt. Einige Faktoren wie ungünstige Lebensbedingungen und viele durchlaufene Teilungen verhindern den Eintritt in einen neuen Zyklus und führen in die sogenannte G0-Phase (Ruhephase). Es existieren drei Kontrollpunkte so genannte "Checkpoints", an denen der korrekte Ablauf des Zellzyklus überprüft wird, und dann gegebenenfalls verzögert oder angehalten werden kann.

B Einzelne Schritte des Zellzyklus wie "budding", DNA-Replikation, und auch die Mitose werden von der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28 in Assoziation mit ihren Cyclinen gesteuert. Für ein korrektes Fortschreiten des Zellzyklus müssen die Cdc28-Komplexe zu gegebenen Zeitpunkten inaktiviert werden, dies geschieht unter anderem durch den Abbau der aktivierenden Cycline. Der Cyclin Abbau wird von zwei Ubiquitin-Ligase Komplexen, dem Skp1/Cullin/F-Box Komplex (SCF) und dem Anaphase Promoting Komplex (APC oder auch Cyclosom) vermittelt.

Einige Anforderungen sind kritisch, um die Swe1-Stabilität zu regulieren, einmal die Phosphorylierung durch Clb2/Cdc28, die vor allem im Zellkern stattfindet und erforderlich für die folgenden Phosphorylierungen ist, und die Aktivität der „Checkpoint“-Kinase Hsl1 und der beiden Kinasen Cla4 und Cdc5 (Sakchaisri *et al.*, 2004; Asano *et al.*, 2005). Dreh- und Angelpunkt sind hierbei die Septine, von denen man annimmt, dass sie als Sensor für das Erscheinen eines "buds" fungieren (Lew *et al.*, 2003). Septine sind konservierte, Filament formende und GTP-bindende Proteine (in *S. cerevisiae* kodiert durch *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12* und *SHS1*), die als Septinring an der Knospungsstelle vor Erscheinen des "buds" assemblieren und dort bis zur Cytokinese verbleiben (Hanrahan & Snyder, 2003). Die Proteinkinase Gin4 und Cla4 sowie Nap1 sind für die Organisation des Septin-Baugerüsts verantwortlich (Longtine *et al.*, 2000; Barral *et al.*, 1999). Nap1 wurde während der Mitose im Komplex mit Gin4 und den Septinen nachgewiesen (Mortensen *et al.*, 2000) und interagiert außerdem mit dem Zyklin Clb2 (Kellogg *et al.*, 1995a). Elm1, eine weitere Kinase, die ebenfalls mit den Septinen assembliert, ist für die Aktivierung von Gin4 verantwortlich (Asano *et al.*, 2006). Die „Checkpoint“-Kinase Hsl1, die autoinhibitorisch inaktiv gehalten wird (Hanrahan & Snyder, 2003), bindet an den korrekt assemblierten Septinring, der sich nach dem Erscheinen des "buds" umstrukturiert, er erscheint dann als sanduhrförmige Manschette und die Septine werden immobil (Theesfeld *et al.*, 2003). Hsl1 wird durch Bindung an die Septine und durch deren Strukturänderung aktiviert, phosphoryliert sich autokatalytisch und rekrutiert Hsl7 an den "bud neck" (Longtine *et al.*, 2000; Hanrahan & Snyder, 2003; Theesfeld *et al.*, 2003). Hsl7 wiederum rekrutiert Swe1, das zuvor nukleär lokalisiert war, an den "bud neck" und erleichtert somit die räumlich kontrollierte Swe1-Phosphorylierung und den anschließenden Ubiquitin-abhängigen Abbau (Lew *et al.*, 2003). Swe1 wird von Cla4, Cdc5 und anscheinend auch noch anderen Kinasen hyperphosphoryliert und die Lokalisierung von Cdc5 an den "bud neck" erfordert ebenfalls Hsl1 und Hsl7 (Asano *et al.*, 2005). Defekte in der Septinassemblierung oder Formation des "buds" resultieren in einer Hypophosphorylierung und Stabilisierung von Swe1 und als Ergebnis in einer Swe1-abhängigen Inhibition von Clb/Cdc28. Diese Swe1-vermittelte G2-Verzögerung führt phänotypisch zu verlängerten "buds", da die Zelle nicht in der Lage ist, den Wechsel vom polarisierten zum isotrophen Wachstum des "bud" zu vollziehen. Demnach ist die Phosphorylierung und die darauf folgende Degradation von Swe1 entscheidend für die korrekte Aktivierung von Clb/Cdc28 und den zeitgerechten Eintritt in die Mitose (Lew *et al.*, 2003).

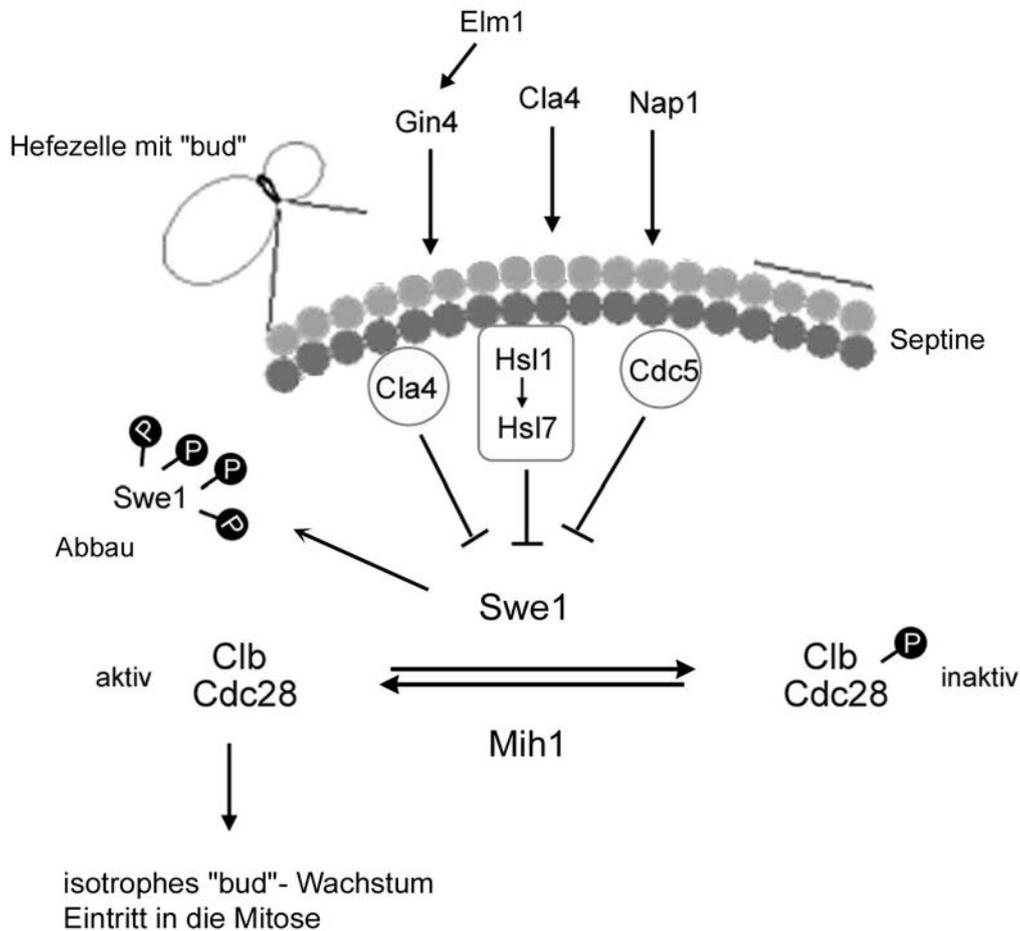


Abbildung 9: Der Morphogenese „Checkpoint“ bei *S. cerevisiae*

Zusammengestellt nach Longtine *et al.* (2000) und Sakchaisri *et al.* (2004)

Die Kinasen Elm1, Gin4, Cla4 und Nap1 sind verantwortlich für die korrekte Organisation des Septin-Baugerüsts. Die „Checkpoint“-Kinase Hsl1 bindet an den korrekt assemblierten Septinring, wird aktiviert und rekrutiert Hsl7 an den "bud neck". Hsl7 wiederum rekrutiert Swe1, das dann von den beiden Kinasen Cla4 und Cdc5 hyperphosphoryliert wird und darauf folgend ubiquitinabhängig abgebaut wird. Dies ist entscheidend für die Aktivierung von Clb/Cdc28, der Wechsel zu isotropem "bud"-Wachstum findet daraufhin statt und der eigentliche Eintritt in die Mitose kann beginnen.

Neueren Studien zufolge wird dieser „Checkpoint“ auch genutzt, um auf Umweltveränderungen zu reagieren. So konnte gezeigt werden, dass sowohl erhöhte Osmolarität als auch ein stressinduzierter hoher Ca^{2+} -Spiegel eine Verzögerung in den Mitoseeintritt induzieren. Angriffspunkt ist in beiden Fällen die „Checkpoint“-Kinase Hsl1 über deren Inaktivierung eine Stabilisierung von Swe1 und daraus folgend ein G2-Arrest erreicht wird (Clotet *et al.*, 2006; Mizunuma *et al.*, 2001).

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Der nucleocytoplasmatische Transport stellt einen zentralen Bestandteil der zellulären Vorgänge dar. Mit Hilfe einer Vielzahl von Faktoren wird der Import und Export von verschiedensten Molekülen zwischen Zellkern und Cytoplasma aufrechterhalten. Viele Details des Transportes und der daran beteiligten Elemente sind jedoch noch unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Split-Ubiquitin System, ein vor allem für Membranproteine verwendetes System, zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen *in vivo* für Studien an Kerntransportfaktoren weiter etabliert werden.

Mittels eines Zwei-Hybrid Screens sollten neue, bislang unbekannte Interaktionspartner für die Importine Kap114 (Histone Hta1 und Htb1 und TATA-bindendes Protein Tbp1), Kap123 (ribosomale Proteine), Nmd5 (MAP-Kinase Hog1, Transkriptionsfaktoren TFIIS und Crz1) und Sxm1 (Lhp1) detektiert werden. Die gefundenen, potentiellen Imports substrate sollten weitergehend biochemisch und *in vivo* charakterisiert werden. Es sollten Studien durchgeführt werden bezüglich ihrer Interaktionen mit Gsp1-GTP und anderen Kerntransportfaktoren, ihrer Lokalisierung in der Zelle und etwaiger Transportwege. Mögliche Funktionen der detektierten Substrate sollten untersucht werden um so als ein weiteres Mosaikstück zum Verständnis der mechanistischen Details des nukleocytoplasmatischen Transports beizutragen.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

- Äkta Explorer 100 (Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Autoklav (Schütt, Göttingen)
- Autoklav-Schutzhandschuhe (Bel-art-products, Pequannuch, USA)
- Behälter für Flüssigstickstoff (Isotherm KGW, Pequannuch, USA)
- Brutschränke (Heraeus, Hanau)
- Eismaschine (Ziegra, Isernhagen)
- Elektrophoresekammern für Agarose-Gele (Eigenbau der Werkstatt Biochemie, Göttingen)
- Entwicklermaschine Gevomatic 60 (Agfa-Gevaert, München)
- Feinwaagen (Sartorius, Göttingen)
- Gilson-Pipetten (Abimed, Düsseldorf)
- GS-6KR Zentrifuge (Bactifuge) (Beckman, München)
- Inkubationsschüttler
- Kühlzentrifuge, Modell J-21 C (Beckman, München)
- Rotoren für die Kühlzentrifuge (Beckman, München, JA-10 bis 17.700 x g und JA-20, bis 48.400 x g)
- Kühlzentrifuge 5402 (Eppendorf, Hamburg)
- Magnetrührer (Heidolph, Schwabach)
- Mikroskope mit Software:
 - Routinemikroskop Axioskop (Durchlicht, Auflichtfluoreszenz, Zeiss, Jena) mit gekühlter CCD-Kamera (Visitron Systems) und Software (Metamorph, Adobe Photoshop)
 - Binokulares Mikroskop Axiolab für Hellfeld (Zeiss, Jena)
- Mikrowellenherd
- Milliporewasseranlage Milli-Q (Waters-Millipore, Milford, USA)
- Mini-PROTEANII 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 Blotten von SDS-Gelen) (BioRad, München)
- L80 Ultrazentrifuge (Beckman, München)
- PCR-Maschine (Gene AMP PCR System 2400, Perkin Elmer)
- pH-Meter pH 537 (WTW, Weilheim)
- Photometer Ultrospec 3.000 (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Replica-Plater 8x6 (Sigma-Aldrich, München)
- Spannungsgeräte EPS 3500 (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Spannungsgerät Power PAC 300 (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Speed-Vac (Bachhofer, Reutlingen)
- Sterilbank (Fröbel, Wasserburg)
- Thermostat 5320 (Heizblock) (Eppendorf, Hamburg)
- Tiefkühltruhe GFL (-80°C) (Schütt, Göttingen)
- Tischzentrifuge 5415C mit Standardrotor (Eppendorf, Hamburg)
- Ultraschallgerät mit Micro - und Macrotip (Fröbel, Wasserburg)
- UV-Tisch (Konrad Bender, Wiesloch)
- Vortex-Mixer (Scientific Industries, Bohemia N.Y., USA)
- Wasserbäder, temperierbar (Julabo, Seelbach)
- Wipptische (Fröbel, Wasserburg)

1.2 Verbrauchsmaterial

- Chromatographie-Säulen „disposable chromatography columns“ (BioRad, München)
- Einmalspitzen (Sarstedt, Nürnberg)
- Filterpapiere (Schleich & Schüll, Dassel)
- „high-pure PCR product purification kits“ (Roche, Mannheim)
- Immobilon-P Transfermembran (Dicke 0,45 µm) (Millipore Co., Bedford)
- JETSTAR Kit (Genomed, Bad Oeynhausen)
- Küvetten (1,5 ml Halbmikro) (Brand, Wertheim)
- Mikrotiterplatten (96-Loch Platten) (Sarstedt, Nürnberg)
- MonoS HR5/5-Säule (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Objektträger ca. 76 x 26 mm und Deckgläser (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
- IF slides ICN Biochemicals

- PD10-Gelfiltrationssäulen (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Petrischalen mit Nocken: 94/16mm (Greiner & Söhne, Nürtingen)
- Plastikröhrchen: 15 ml und 50 ml (Greiner & Söhne, Nürtingen)
- Reaktionsgefäße: 1,5 und 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße PCR (Greiner bio-one, Nürtingen)
- Reaktionsgefäß mit Sterilfiltereinsatz aus Celluloseacetat 0,22 μm (Spin-X) (Corning Incorporated, N.Y, USA)
- Röntgenfilme X-Omat AR (Kodak, München)
- Sterilfilter: 0,2 μm (Schleicher und Schüll, Dassel)
- Ultrazentrifugenröhrchen, Polycarbonat (Beckman, München)
- Vivaspin 15, Vivaspin 4 und Vivaspin 500 (Vivascience, Binbrook Lincoln, UK)
- Whatman 3MM-Papier
- Zentrifugenbecher: JA 10 und JA 20, Polypropylen (Beckman, München)

1.3 Chemikalien und Biochemikalien

- **Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg:** Glutathion Sepharose 4B, „prestained“-Molekulargewichts-Standard broad-range,
- **Bio-Rad, München:** „Kaleidoscope Prestained SDS-PAGE Standards“ („*broad range*“)
- **bts, St. Leon-Rot** X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid), 5'-FOA (5'-Fluororotsäure)
- **Difco Laboratories, Detroit, USA:** Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Bacto- Hefeextrakt, Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids)
- **GibcoBRL:** Agarose, 10 kDa Proteinleiter, 1 kb DNA-Leiter
- **MBI Fermentas:** dNTP-Mix (10 mM), PageRuler Prestained Protein Ladder
- **Origene Technologies, Inc, Rockville, USA:** „DupLexA two-hybrid-system“
- **Riedel-de-Haen, Hannover:** Aceton, Essigsäure, Trichloressigsäure
- **Roche, Mannheim:** PCR Nukleotid-Mix mit je 10 mM dNTPs, DTT
- **Roth, Karlsruhe:** Rotiphorese Gel 30
- **Serva, Heidelberg:** Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue, Ethanol, SDS, Ponceau S, Sulfo Link Kit

- **Sigma-Aldrich, München:** alle verwendeten Aminosäuren, Adeninsulfat, *para*-Aminobenzoessäure, Ampicillin, BSA, DAPI, D-Glucose, DMF, DMSO, Formamid, Formaldehyd, Galaktose, *myo*-Inositol, Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), Lachssperma-DNA, Natriumazid, PEG 3300, PEG 8000, Peroxidase-gekoppelte Anti-IgG-Antikörper, Poly-L-Lysin (Hydrobromid, Molekulargewicht 134.600-246.000 Da; P-1399), 2-Mercaptoethanol, Proteinmolekulargewichtsstandard, äquibriertes Phenol, Raffinose, säuregewaschene Glasperlen („*glass beads*“, 425 - 600 microns), Uracil
- **Qiagen, Hilden:** Nickel-NTA-Agarose, Anti-Tetra-His-Antikörper-POD gekoppelt

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

1.4 Enzyme

- alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche, Mannheim)
- Expand High-Fidelity DNA-Polymerase (Roche, Mannheim)
- Klenow-Enzym (DNA-Polymerase I „large fragment“) (Roche, Mannheim)
- *Pwo*-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim)
- Restriktionsendonukleasen (Roche, New England Biolabs, MBI Fermentas)
- RNase A (Roche, Mannheim)
- T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas)
- T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim)
- *Taq*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas)
- Zymolyase-100 T aus *Arthrobacter luteus* (ICN, USA)

1.5 Oligonukleotide

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

Oligo Nr.	Name	Sequenz 5'→3'
420	<i>GFP</i> Fusion Test -	CATAACCTTCGGGCATGGCACTC
424	<i>TRP1</i> knock-out Test+	GTGCATGGAGATGAGTCGTGGCA
425	<i>HIS3</i> knock-out Test +	GGCGCTATCACGTGCCGTAGTCG
545	<i>SET2</i> -581- <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCCTTGAGAATGAAAGAAAAGCG
522	<i>NAPI</i> F1 KO +	GGAGGATTTAGTGAGCCCAGTGGGACCAAGAGCA AAGCGCGGATCCCCGGGTAAATTAA
523	<i>NAPI</i> R1 KO -	TATATGAATACGGTTATGACCACTCTTGCGAAGTG CGTTGGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
546	<i>SET2</i> 3' <i>Xho</i> I/ <i>Ava</i> I -	CGCTCGAGCTTATTACAAATCGCAATTACA
547	<i>ARR1</i> -51 <i>Bam</i> HI +	CGCGGATCCCTAACGGTAACAAATGATCAAATTC
548	<i>ARR1</i> 3' <i>Xho</i> I/ <i>Ava</i> I -	CGCTCGAGGGCGAAGGTATCTGACCGTAAT
558	<i>MAK21</i> F2 +	CTGCCGACGATTATGCTCAATATTTAGATCAAGAT TCAGACCGGATCCCCGGGTAAATTAA
559	<i>MAK21</i> R1 -	CAAATTTCTGTTTTCTTATTTAATTTACAACACC GAAGTGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
560	<i>MAK21</i> Test +	CCTAAGCTGGACGCAATTGATGA
561	<i>SET2</i> F2 +	CATCAACAAGGATGTCTTCTCCTCCACCTTCAACA TCATCACGGATCCCCGGGTAAATTAA
562	<i>SET2</i> R1 +	CTTCCTTTGGGACAGAAAACGTGAAACAAGCCCC AAATATGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
563	<i>SET2</i> Test +	CGGTCTCCCAGTCCCAAAGACTA
564	<i>YRA1</i> F2 +	GAAGATCTGGACAAGGAAATGGCGGACTATTTTCG AAAAGAAACGGATCCCCGGGTAAATTAA
565	<i>YRA1</i> R1 -	TTTCCGAGTTTCATTATGTATTAGTTTCCAGAAAA TTTAAAGGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
566	<i>YRA1</i> Test +	CTGTTGAAAGATTTAACGGCTCT
567	<i>HSL1</i> F2 +	AATGATGATGTGGAGAGAGTAATTCGAAATGCCG GACGTTACGGATCCCCGGGTAAATTAA
568	<i>HSL1</i> R1 -	GTTCTTTTAAACTATGTTTTCTCACGCCTGTCCATT CGGTCTCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
569	<i>HSL1</i> Test +	GCTACTAAGGCATCCAAGAATCA
570	<i>NISI</i> F2 +	CCGACAGTCAAGACGATAGTATACTTAGTAGCGA CCCCTTTCGGATCCCCGGGTAAATTAA
571	<i>NISI</i> R1 -	GATGTCTAAGGCTATGCAATGGCTATGCAATCCA GGGGGGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
572	<i>NISI</i> Test +	CCCCTAGTGTGTTGTACCACCCA
573	<i>YJL103c</i> F2 +	CAATTCTCGTAATGGGACAATTTTTACCAATTTTT GAAATGGACCGGATCCCCGGGTAAATTAA
574	<i>YJL103c</i> R1 -	GAATGCATATAAAAACCTGTAATCAGTAATAAGCC CAAAAATAGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
575	<i>YJL103c</i> Test +	CTATTAGACCGCACCTCCTTTAT
576	<i>ARR1</i> F2 +	ATTAGCCTCAAGCATTTCAATTAAGGTCTTTTCGTC AAAATTACGGATCCCCGGGTAAATTAA

Oligo Nr.	Name	Sequenz 5'→3'
577	<i>ARR1</i> R1 -	ATATTAACAATAAGAAAGACAATGTTGCGCTGTG CTTACAGGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
578	<i>ARR1</i> Test +	GGTGACTTTAATGGGGAACTTGA
579	<i>SDAI</i> F2 +	GTGTTACGTGCACACATCACCAAACAAAAGAAGA AGGGGTATCGGATCCCCGGGTAAATTAA
580	<i>SDAI</i> R1 -	GTCTCATAACAGTTGGAGAGATGAATGTATCTGTG TATATGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
581	<i>SDAI</i> Test +	GGGTATCCACAAACAAGACAAGC
625	<i>YRA1 BamHI</i> ATG +	CGCGGATCCATGTCTGCTAACTTAGATAAATC
626	<i>YRA1</i> Stop <i>XhoI/AvaI</i> -	GCGCTCGAGTTATTTCTTTTCGAAATAGTCCG
627	<i>YRA1</i> 5' <i>XbaI</i> +	GCTCTAGAGGCCGCCAAATTTATCCTTTTT
628	<i>YRA1</i> no stop <i>BamHI</i> -	CGCGGATCCTTTTCTTTTCGAAATAGTCCGCC
629	<i>GFP</i> (pFA6) <i>BamHI</i> +	GCTGAAGCTTCGTACGCTGCA
630	<i>GFP</i> (pFA6) 3' <i>BglII</i> -	GCTCCGGATCAAGATTGTAC
646	<i>NMD5</i> F1 KO +	CGTCTGGATATTTGACACAATTTTGATTTTGACGA AGACATTTTCGGATCCCCGGGTAAATTAA
647	<i>HSL1</i> ATG <i>BamHI</i> +	CGCGGATCCATGACTGGTCACGTTTCAAAAAC
648	<i>HSL1</i> 5' <i>HindIII</i> -	GCGAAGCTTCACGCCTGTCCATTTCGGTTCTC
651	<i>HSL1</i> F1 KO +	GATTTGCGGGACAAAAATACTGATAAATAAATC AACAAACCCGGATCCCCGGGTAAATTA
675	<i>SWE1</i> F1 KO +	CTGGGGAAAAGTAAACACACACAGGCGCACACGA GAACAGCGGATCCCCGGGTAAATTAA
676	<i>SWE1</i> R1 KO -	GGATTATTTATAACAATGCGCCCCATAAGCACGTGT GGGAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
677	<i>SWE1</i> Test +	GAAATTGCAGCGAACGTTGTG
678	<i>SWE1</i> 3' <i>XhoI/AvaI</i> -	CGCTCGAGCTACCGGACTGCAATTACAC
679	<i>NAPI</i> Test +	GACCACGCAGAAGGCTGCGAGAT
715	<i>HSL1-N BamHI</i> + As 496	CGCGGATCCGGCCTAAGGAGCGAGAACAATG
716	<i>HSL1-N+2H BamHI</i> + AS 785	CGCGGATCCACCAAATGAGAAAAATCAATTC
717	<i>HSL1-C</i> Stop <i>HindIII</i> - As 496	GCGAAGCTTCTAGCCTGTATTATTGGCAGTTTTG
718	<i>HSL1-C+2H</i> Stop <i>HindIII</i> - As 786	GCGAAGCTTCTATTTGGTTGGATACTCCGGGCC

1.6 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete und hergestellte Plasmide

pGS-Nr.	Marker	Beschreibung	Herkunft/Referenz
1	<i>AMP^r</i>	pBluescript (pBS-KS ⁺)	Fa. Stratagene, TX, USA
10	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T-1	Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg
40	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pRS313	Laborkollektion
41	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314	Laborkollektion
42	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS315	Laborkollektion
43	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	pRS316	Laborkollektion
139	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YE _p GAL-GST	Laborkollektion
267	<i>AMP^r</i>	pQE9- <i>His₆-SRP1</i>	Laborkollektion
371	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YC _p - <i>GAL-SGFP</i>	Laborkollektion
468	<i>AMP^r</i>	pQE9- <i>His₆-GSP1Q71L</i>	K. Weis
581	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	pRS306- <i>Nup2-GFP</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- <i>TEV-(XhoI)</i>	Laborkollektion
885	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>SRP1</i>	Laborkollektion
886	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>KAP95</i>	Laborkollektion
889	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>CSE1</i>	Laborkollektion
890	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>XPO1</i>	Laborkollektion
893	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>GSP1</i>	Laborkollektion
897	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG-Bam	Laborkollektion
898	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG-Bam	Laborkollektion
913	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui</i>	Diplomarbeit IL
914	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nua</i>	Diplomarbeit IL
916	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui-SRP1</i>	Diplomarbeit IL

Material und Methoden

pGS-Nr.	Marker	Beschreibung	Herkunft/Referenz
917	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nua-SRP1</i>	Diplomarbeit IL
919	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui-KAP95</i>	Diplomarbeit IL
922	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui-CSE1</i>	Diplomarbeit IL
925	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui-XPO1</i>	Diplomarbeit IL
928	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui-GSP1</i>	Diplomarbeit IL
931	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui-YRB1</i>	Diplomarbeit IL
943	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui-GUK1</i>	Diplomarbeit IL
1419	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pRS314-pCUP1- <i>Nui-NUP2</i>	Diplomarbeit IL
945	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	315-MET- <i>STE14-CubRUra3</i>	Diplomarbeit IL
946	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS315- <i>SRP1-Cub-RUra3</i>	Diplomarbeit IL
947	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS315- <i>KAP95-Cub-RUra3</i>	Diplomarbeit IL
948	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS315- <i>CSE1-Cub-RUra3</i>	Diplomarbeit IL
949	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS315- <i>XPO1-Cub-RUra3</i>	Diplomarbeit IL
950	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS315- <i>GSP1-Cub-RUra3</i>	Diplomarbeit IL
951	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS15- <i>YRB1-Cub-RUra3</i>	Diplomarbeit IL
952	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS305- <i>SEC63-Cub-Rura3</i>	Diplomarbeit IL
1420	<i>AMP^r</i> <i>LEU2</i>	pRS315- <i>NUP2-Cub-RUra3</i>	Diplomarbeit IL
1006	<i>AMP^r</i>	pQE9- <i>His₆-PSE1</i>	Laborkollektion
1012	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>MTR10</i>	Laborkollektion
1013	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>KAP104</i>	Laborkollektion
1015	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>PDR6</i>	Laborkollektion
1016	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>PSE1</i>	Laborkollektion
1017	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>YRB4</i>	Laborkollektion
1018	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>KAP114</i>	Laborkollektion

Material und Methoden

pGS-Nr.	Marker	Beschreibung	Herkunft/Referenz
1020	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>KAP120</i>	Laborkollektion
1021	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>NMD5</i>	Laborkollektion
1022	<i>AMP^r</i> <i>HIS3</i>	pEG- <i>MSN5</i>	Laborkollektion
1071	<i>AMP^r</i>	pQE60- <i>YRB4-His₆</i>	Laborkollektion
1073	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	pRS316- <i>KAP114</i>	Laborkollektion
1090	<i>AMP^r</i>	pQE60- <i>NMD5-His₆</i>	Laborkollektion
1190	<i>AMP^r</i>	pQE30- <i>His₆-KAP114</i>	Laborkollektion
1441	<i>AMP^r</i>	pQE60- <i>KAP120-HIS₆</i>	Laborkollektion
1532	<i>AMP^r</i> <i>Trp1</i>	pFA6a- <i>TRP1</i>	Longtine <i>et al.</i> , (1998)
1533	<i>AMP^r</i> <i>His3</i>	pFA6a- <i>HIS3MX6</i>	Longtine <i>et al.</i> , (1998)
1535	<i>AMP^r</i> <i>Trp1</i>	pFA6a- <i>GFP(S65T)-TRP1</i>	Longtine <i>et al.</i> , (1998)
1536	<i>AMP^r</i> <i>His3</i>	pFA6a- <i>GFP(S65T)-HIS3MX6</i>	Longtine <i>et al.</i> , (1998)
1688	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>SET2-2H</i> (aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03, gefischt mit pEG- <i>KAP114</i>)	diese Arbeit
1689	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>YRA1-2H</i> (aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03, gefischt mit pEG- <i>KAP114</i>)	diese Arbeit
1690	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>HSL1-2H</i> (aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03, gefischt mit pEG- <i>KAP114</i>)	diese Arbeit
1691	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>NIS1-2H</i> (aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03, gefischt mit pEG- <i>KAP114</i>)	diese Arbeit
1692	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>YJL103c-2H</i> (aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03, gefischt mit pEG- <i>KAP114</i>)	diese Arbeit
1693	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>ARR1-2H</i> (aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03, gefischt mit pEG- <i>KAP114</i>)	diese Arbeit
1694	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>SDA1-2H</i> (aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03, gefischt mit pEG- <i>KAP114</i>)	diese Arbeit
1695	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>MAK21-2H</i> (aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03, gefischt mit pEG- <i>SXM1</i>)	diese Arbeit
1696	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-SET2-2H</i> Vektor: pGS10 <i>BamHI/XhoI</i> Insert: PCR Set2 von gDNA Oligos 545/546 <i>AvaI/BamHI</i>	diese Arbeit

Material und Methoden

pGS-Nr.	Marker	Beschreibung	Herkunft/Referenz
1697	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-YRA1-2H</i> Vektor: pGS10 <i>EcoRI</i> Insert: pGS1689 <i>EcoRI</i> (1.000 kb)	diese Arbeit
1698	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-HSL1-2H</i> Vektor: pGS10 <i>EcoRI</i> Insert: pGS1690 <i>EcoRI</i> <i>partiell</i> (840 kb)	diese Arbeit
1699	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-NIS1-2H</i> Vektor: pGS10 <i>EcoRI</i> Insert: pGS1691 <i>EcoRI</i> (1.325 kb)	diese Arbeit
1700	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-YJL103c-2H</i> Vektor: pGS10 <i>EcoRI</i> Insert: pGS1692 <i>EcoRI</i> <i>partiell</i> (1.600 kb)	diese Arbeit
1701	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-ARR1-2H</i> Vektor: pGS10 <i>BamHI/XhoI</i> Insert: PCR Arr1 von gDNA Oligos 547/548 <i>AvaI/BamHI</i>	diese Arbeit
1702	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YEpGAL- <i>GST-SDA1-2H</i> Vektor: pGS139 <i>BamHI/SalI</i> Insert: PCR Sda1 <i>AvaI/BamHI</i>	diese Arbeit
1703	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-NUP1-2H</i> Vektor: pGS10 <i>SmaI/EcoRI</i> Insert: aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03 <i>Ecl136II/EcoRI</i> (1.860 kb)	diese Arbeit
1704	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-MAK21-2H</i> Vektor: pGS10 <i>EcoRI</i> Insert: pGS1695 <i>EcoRI</i> (980 kb)	diese Arbeit
1705	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>TEV-GST-YRA1</i> Vektor: pGS804 <i>BamHI/EcoRI</i> Insert: PCR Yra1 von cDNA Oligos 625/626 <i>AvaI/BamHI</i>	diese Arbeit
1706	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>NUP1-2H</i> Vektor: pGS898 <i>Xho/Klenow/EcoRI</i> Insert: aus pJG4-5 Library Midiprep 03.06.03 <i>Ecl136/EcoRI</i> (1.860bp)	diese Arbeit
1707	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>YRA1</i> Vektor: pGS898 <i>BamHI/XhoI</i> Insert: pGS1705 <i>BamHI/XhoI</i>	diese Arbeit
1708	<i>AMP^r</i>	BS- <i>HSL1</i> Vektor: pGS1 <i>BamHI/HindIII</i> Insert: PCR Hsl1 von gDNA Oligos 647/648 <i>BamHI/HindIII</i>	diese Arbeit

Material und Methoden

pGS-Nr.	Marker	Beschreibung	Herkunft/Referenz
1709	<i>AMP^r</i> <i>TRP1</i>	pJG- <i>HSL1</i> Vektor: pGS898 <i>BamHI/XhoI</i> Insert: pGS1708 <i>BamHI/XhoI</i>	diese Arbeit
1710	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YCpGAL- <i>GFP-HSL1</i> Vektor: pGS371 <i>BamHI/HindIII</i> Insert: PCR Hsl1 von gDNA Oligos 647/648 <i>BamHI/HindIII</i>	diese Arbeit
1711	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YCpGAL- <i>GFP-HSL1-2H</i> Vektor: pGS371 <i>BamHI/SalI</i> Insert: pGS1698 <i>BamHI/SalI</i>	diese Arbeit
1712	<i>AMP^r</i>	pGEX-4T- <i>GST-HSL1</i> Vektor: pGS804 <i>BamHI/XhoI</i> Insert: pGS1708 <i>BamHI/XhoI</i>	diese Arbeit
1713	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	pRS316- <i>YRA1-BamHI</i> Vektor: pGS43 <i>XbaI/BamHI</i> Insert: PCR Yra1 von gDNA Oligos 627/628 <i>XbaI/BamHI</i>	diese Arbeit
1714	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	pRS316- <i>YRA1-GFP</i> Vektor: pGS1713 <i>BamHI</i> Insert: PCR von pGS1535 Oligos 629/630 <i>BamHI/BglII</i>	diese Arbeit
2032	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YCpGAL- <i>GFP-HSL1-N</i> Vektor: pGS371 <i>BamHI/HindIII</i> Insert: PCR Hsl1 von gDNA Oligos 647/717 <i>BamHI/HindIII</i>	diese Arbeit
2033	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YCpGAL- <i>GFP-HSL1-N+2H</i> Vektor: pGS371 <i>BamHI/HindIII</i> Insert: PCR Hsl1 von gDNA Oligos 647/718 <i>BamHI/HindIII</i>	diese Arbeit
2034	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YCpGAL- <i>GFP-HSL1-C</i> Vektor: pGS371 <i>BamHI/HindIII</i> Insert: PCR Hsl1 von gDNA Oligos 648/716 <i>BamHI/HindIII</i>	diese Arbeit
2035	<i>AMP^r</i> <i>URA3</i>	YCpGAL- <i>GFP-HSL1-C+2H</i> Vektor: pGS371 <i>BamHI/HindIII</i> Insert: PCR Hsl1 von gDNA Oligos 648/715 <i>BamHI/HindIII</i>	diese Arbeit

1.7 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antigen	Verdünnung für		Typ	Herkunft
	Western Blot	Immunfluoreszenz		
GFP	-	1:1000	affinitäts-gereinigter, polyklonaler Antikörper	Clontech, Palo Alto, USA
GFP	1:1000	-		T. Hoffmann, UdS
GST	1:1000	-		M. Greiner, UdS
Nop1p	-	1:1000		Aris und Blobel (1988)
His ₄	1:1000	-		Qiagen, Hilden
HA	1:1000	-		Roche, Mannheim
LexA	1:1000	-		Santa Cruz, Kalifornien
Kaninchen-IgG	1:1000	-	POD-gekoppelter Antikörper	Sigma-Aldrich, München
Kaninchen-IgG	-	1:1000	FITC-gekoppelter Antikörper	Jackson Immunoresearch Lab
Maus-IgG	-	1:1000	TexasRed-gekoppelter Antikörper	Jackson Immunoresearch Lab
Maus-IgG	1:1000	-	POD-gekoppelter Antikörper	Sigma-Aldrich, München

2 Organismen

2.1 Bakterienstämme

- *E. coli* JM101 $F' traD36 proA^+ proB^+ laqI^q lacZ\Delta M15/supE thi-1\Delta(lac-proAB)$ (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)
- *E. coli* BL21 (DE3) $B F^- dcm ompT hsdS(r_B^- m_B^-) gal1 (DE3) endA Tet^r \lambda (DE3) [pLysS Cam^R]$ (Studier *et al.* 1990)
- *E. coli* KC8 $pyrF leuB600 trpC hisB463$ (Origene, Rockville, USA)

2.2 Hefestämme

Tabelle 8: Aus der Laborkollektion verwendete Hefestämme

GSY-Nr.	alternative Bezeichnung, Genotyp	Paarungstyp	Herkunft
155	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i>	a	Laborkollektion, PSY684 A. Corbett
168	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i> <i>LexA op::LEU2 EGY48</i>	α	Fa. Origene Technologies, Inc, Rockville, USA
170	<i>ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100</i>	a	Laborkollektion, W303
171	<i>ura3-1 leu2-3,112 trp1Δ63 ade2-1 his3-11,15; can1-100</i>	α	Laborkollektion, W303
271	<i>ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 ADE2 HIS3 rna1-1</i>	a	Laborkollektion ACY107, A. Corbett
272	<i>ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 HIS3 ADE2 LYS2 prp20-1</i>	α	Laborkollektion ACY107, A. Corbett
394	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 kap123::TRP1</i>	α	Schlenstedt <i>et al.</i> (1997)
497	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 nmd5::TRP1</i>	α	Laborkollektion
503	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 kap114::LEU2</i>	α	Laborkollektion
508	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 sxm1::HIS3</i>	α	Laborkollektion
519	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 sxm1::HIS3 kap114::LEU2</i>	α	Laborkollektion
531	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 nmd5::TRP1 kap114::LEU2</i>	α	Laborkollektion
549	<i>ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 pse1-1 kap123::HIS3</i>	a	Laborkoll., M. Seedorf
550	<i>ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 HIS3 pse1-1</i>	a	Laborkoll., M. Seedorf
662	<i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ63 ade2-1 can1-100 ts srp1-31 (NOY 612)</i>	α	M. Nomura, Univ. of California, Irvine
663	<i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ63 ade2-1 can1-100 ts srp1-49 (NOY 613)</i>	α	M. Nomura, Univ. of California, Irvine
664	<i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ63 ade2-1 can1-100 ts srp1-54 (NOY 672)</i>	a	M. Nomura, Univ. of California, Irvine
839	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 kap123::TRP1 kap114::LEU2</i>	α	Laborkollektion
843	<i>ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 HIS3 pse1-1 kap114::LEU2</i>	a	Laborkollektion
904	<i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 kap104-16 kap114::LEU2</i>	α	Laborkollektion

Tabelle 9: In dieser Arbeit hergestellte Hefestämme

Mutante/ Stammbezeichnung	Transformation von	Test
GSY 1193 <i>MAK21-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (24.11.03) Oligos 558/559 in GSY155	PCR Oligos 420/560 Immunblot
GSY 1194 <i>sxm1::HIS3 MAK21-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (24.11.03) Oligos 558/559 in GSY508	PCR Oligos 420/560 Immunblot
GSY 1195 <i>sxm1::HIS3 kap114::LEU2 MAK21-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (18.03.04) Oligos 558/559 in GSY519	PCR Oligos 420/560 Immunblot
GSY 1197 <i>kap114::LEU2 SET2-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (24.11.03) Oligos 561/562 in GSY503	PCR Oligos 420/563 Immunblot
GSY 1198 <i>pse1-1 kap114::LEU2 SET2-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (18.03.04) Oligos 561/562 in GSY843	PCR Oligos 420/563 Immunblot
GSY 1199 <i>YRA1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (24.11.03) Oligos 564/565 in GSY155	PCR Oligos 420/566 Immunblot
GSY 1200 <i>kap114::LEU2 YRA1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (29.01.04) Oligos 564/565 in GSY503	PCR Oligos 420/566 Immunblot
GSY 1201 <i>pse1-1 kap114::LEU2 YRA1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (18.03.04) Oligos 564/565 in GSY843	PCR Oligos 420/566 Immunblot
GSY 1202 <i>HSL1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (15.01.04) Oligos 567/568 in GSY155	PCR Oligos 420/569
GSY 1203 <i>kap114::LEU2 HSL1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (29.01.04) Oligos 567/568 in GSY503	PCR Oligos 420/569
GSY 1204 <i>pse1-1 kap114::LEU2 HSL1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (18.03.04) Oligos 567/568 in GSY843	PCR Oligos 420/569
GSY 1205 <i>SDA1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (29.01.04) Oligos 579/580 in GSY155	PCR Oligos 420/581 Immunblot
GSY 1206 <i>kap114::LEU2 SDA1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (24.11.03) Oligos 579/580 in GSY503	PCR Oligos 420/581 Immunblot

Mutante/ Stammbezeichnung	Transformation von	Test
GSY 1207 <i>hsl1::TRP1</i>	LT PCR von pGS1532 (27.01.05) Oligos 568/651 in GSY155	PCR Integr. Oligos 424/648 KO Oligos 569/648
GSY 1208 <i>kap114::LEU2</i> <i>hsl1::TRP1</i>	LT PCR von pGS1532 (22.02.05) Oligos 568/651 in GSY503	PCR Integr. Oligos 424/648 KO Oligos 569/648
GSY 1209 <i>pse1-1</i> <i>kap114::LEU2</i> <i>hsl1::TRP1</i>	LT PCR von pGS1532 (27.01.05) Oligos 568/651 in GSY843	PCR Integr. Oligos 424/648 KO Oligos 569/648
GSY 1210 <i>kap114::LEU2</i> <i>hsl1::TRP1</i> <i>swe1::HIS3</i>	LT PCR von pGS1533 (19.05.05) Oligos 675/676 in GSY1208	PCR Integr. Oligos 425/678 KO Oligos 667/678
GSY 1211 <i>nmd5::TRP1</i> <i>hsl1::HIS3</i>	LT PCR von pGS1533 (03.06.05) Oligos 568/651 in GSY497	PCR Integr. Oligos 425/648 KO Oligos 569/648
GSY 1212 <i>kap123::TRP1</i> <i>hsl1::HIS3</i>	LT PCR von pGS1533 (03.06.05) Oligos 568/651 in GSY394	PCR Integr. Oligos 425/648 KO Oligos 569/648
GSY 1213 <i>nap1::HIS3</i>	LT PCR von pGS1533 (11.04.05) Oligos 522/523 in GSY155	PCR Integr. Oligos 425/256 KO Oligos 256/679
GSY 1214 <i>kap114::LEU2</i> <i>nap1::HIS3</i>	LT PCR von pGS1533 (11.04.05) Oligos 522/523 in GSY503	PCR Integr. Oligos 425/256 KO Oligos 256/679
GSY 1215 <i>pse1-1</i> <i>kap114::LEU2</i> <i>nmd5::TRP1</i>	LT PCR von pGS1532 (20.01.05) Oligos 386/646 in GSY843	PCR Integr. Oligos 424/429 KO Oligos 387/429
GSY 1218 <i>pse1-1</i> <i>kap114::LEU2</i> <i>SDA1-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (26.04.04) Oligos 579/580 in GSY843	PCR Oligos 420/581 Immunblot
GSY 1219 <i>pse1-1</i> <i>kap114::LEU2</i> <i>MAK21-GFP TRP1</i>	LT PCR von pGS1535 (26.04.04) Oligos 558/559 in GSY843	PCR Oligos 420/560 Immunblot

3 Nährmedien

Alle Flüssigmedien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei RT gelagert. Medien für Agarplatten wurden nach dem Autoklavieren abgekühlt und in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden sie bei 4°C im Kühlraum gelagert und vor Gebrauch auf RT erwärmt.

3.1 Kultivierung von *E.coli*

<u>LB-Medium:</u> (Sambrook et al., 1989)	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest.} autoklaviert	
<u>LB-Ampicillin-Platten:</u>	Bacto-Agar	15 g
	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	1 M NaOH	1 ml
	in 1 l H ₂ O _{bidest.} autoklaviert nach dem Abkühlen Zugabe von 1 ml Ampicillin-Lösung	
<u>TB-Medium:</u>	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 Kalium- phosphatpuffer (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 Antibiotikallösung pro 1 l Medium zugesetzt.

Ampicillin-Lösung:	Ampicillin	100,0 mg/ml
	in H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	
Kanamycin-Lösung:	Kanamycin	25,0 mg/ml
	in H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	
Chloramphenicol-Lösung:	Chloramphenicol	34,0 mg/ml
	in Ethanol, sterilfiltriert	

Die Stammlösungen der Antibiotika wurden in 1 ml-Aliquots bei -20°C gelagert.

-Trp-Selektivplatten:

A: Bacto-Agar	15,0 g
in 0,8 l H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
B: K ₂ HPO ₄	10,5 g
KH ₂ PO ₄	4,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
Na ₃ -Citrat	0,5 g
in 160 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
C: MgSO ₄	2,0 g
in 10 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
D: Uracil	40,0 mg
in 10 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
E: Histidin	40,0 mg
in 10 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
F: Leucin	40,0 mg
in 10 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
G: D-Glukose	20,0 g
in 100 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
H: Kanamycin	0,5 g
in 10 ml H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	
I: Thiaminhydrochlorid	10,0 g
in 10 ml H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	

Lösungen A und B wurden nach dem Abkühlen vereinigt und je 1 ml Lösung C, 10 ml Lösung D, 10 ml Lösung E, 10 ml Lösung F, 10 ml Lösung G, 1 ml Lösung H und 1 ml Lösung I zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Platten gegossen.

3.2 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.}	
autoklavieren	

Material und Methoden

<u>YPD-Platten:</u>	Bacto-Pepton	20 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	10 g
	Dextrose	20 g
	Bacto-Agar	20 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest.} autoklavieren	
<u>YPD_{ADE}-Platten:</u>	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.} autoklavieren	
<u>Selektivmedium:</u>	„Yeast Nitrogen Base“	6,7 g
	Aminosäure-Mix (-2, -4 oder -7)	2,0 g
	Aminosäurelösungen (außer Histidin 3ml)	10,0 ml
	in 0,9 l H ₂ O _{bidest.} autoklavieren	
	Kohlenhydratlösung	100,0ml
	Zugabe nach dem Autoklavieren	
<u>Selektivplatten:</u>	A: Bacto-Agar	20,0 g
	in 0,75 l H ₂ O _{bidest.} , autoklavieren	
	B: „Yeast Nitrogen Base“	6,7 g
	Aminosäure-Mix (-2, -4 oder -7)	2,0 g
	Aminosäurelösungen (außer Histidin 3ml)	10,0 ml
	in 0,15 l H ₂ O _{bidest.} autoklavieren	
	C: Kohlenhydratlösung	100,0ml
	Zugabe nach dem Autoklavieren	

Den Selektivmedien bzw. -platten wurden als Kohlenhydratquelle entweder D-Glukose, Galaktose oder Raffinose (20%ige Stammlösung) zugegeben.

Material und Methoden

Für die Interaktionsassays des Split-Ubiquitin Systems wurden zur Induktion des Kupfer sensitiven Promotors Selektivplatten hergestellt, die zusätzlich CuSO_4 (Endkonzentration 0,2 mM) enthielten

<u>FOA-Platten:</u>	A: Bacto-Agar	20,0 g
	in 0,75 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, autoklaviert	
	B: „Yeast Nitrogen Base“	6,7 g
	Aminosäure-Mix	2,0 g
	(-4 oder-7)	
	Aminosäurelösungen	10,0 ml
	(außer Histidin 3ml)	
	Uracil	50,0 mg
5'-FOA	1,0 g	
in 0,15 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ unter Erwärmen gelöst, sterilfiltriert		

Lösung A wurde nach dem Autoklavieren abgekühlt und danach Lösung B und 100 ml Glucose zugegeben.

Zum Nachweis von Proteininteraktionen über das Zwei-Hybrid-System wurden X-Gal-haltige Selektivplatten verwendet.

<u>X-Gal-Platten:</u>	A: Bacto-Agar	20,0 g
	in 650 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, autoklaviert	
	B: „Yeast Nitrogen Base“	6,7 g
	Aminosäuremix -4	2,0 g
	Leucin-Lösung (100 mM)	10,0 ml
	in 150 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, autoklaviert	
	C: D-Glukose bzw. D-Galaktose	20,0 g
	in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, autoklaviert	
	D: Na_2HPO_4	7,0 g
	NaH_2PO_4	3,0 g
in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, autoklaviert		
E: X-Gal	80,0 mg	
in 0,8 ml N,N-Dimethylformamid		

Die Lösungen A, B, C und D wurden nach Abkühlen vereinigt und gemischt. Danach wurde Lösung E zugegeben.

Aminosäure-Mix

5 g	Adeninsulfat	10 g	L-Histidin
1 g	para-Aminobenzoesäure	10 g	L-Isoleucin
10 g	<i>myo</i> -Inositol	50 g	L-Leucin
10 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	Tryptophan
10 g	L-Glutamat	10 g	Tyrosin
10 g	L-Glycin	10 g	L-Valin

Die eingewogenen Aminosäuren wurden in einem Mörser mit dem Pistill gut durchmischt.

Zur Herstellung der Aminosäuremische -2, -4 und -7 wurden jeweils folgende Aminosäuren ausgelassen:

Aminosäure-Mix -2	L-Uracil und L-Leucin
Aminosäure-Mix -4	L-Uracil, L-Histidin, L-Tryptophan und L-Leucin
Aminosäure-Mix -7	L-Uracil, L-Histidin, L-Tryptophan, L-Leucin, L-Methionin, L-Lysin und L-Adenin

Einem Nährmedium fehlende Aminosäuren wurden durch die entsprechende Zugabe der in Tabelle 10 aufgeführten Aminosäurelösungen ergänzt.

Tabelle 10: Eingesetzte Aminosäurelösungen

Aminosäure	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 Lagerung der Aminosäurelösungen erfolgte bei 4°C, lediglich L-Uracil- und L-Adenin- wurden bei RT gelagert.

4 Molekularbiologische Methoden

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

4.1.1 Plasmidminipräparation

GTE-Lösung:	Glucose	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	
Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol: (25: 24: 1)	Phenol (TE-Puffer pH 7,9 gesättigt)	125 ml
	Chloroform	120 ml
	Isoamylalkohol	5 ml
	Hydrochinolin	125 mg
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 erfolgte mittels alkalischer Lyse nach der modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979). 2 ml TB-Medium + 2 µl Ampicillin (Endkonzentration 0,1 mg/ml) wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C auf dem Roller für mindestens 6 Stunden oder über Nacht inkubiert. Die dicht gewachsene Bakterienkultur wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 15 s bei 15800 x g geerntet. Das Zellpellet wurde dann in 100 µl GTE-Lösung durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl frisch angesetzter 1% SDS/0,2 M NaOH-Lösung wurden die resuspendierten Zellen durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Dabei lysierte die Zellwand der Bakterien durch SDS, und die DNA wurde durch Natriumhydroxid denaturiert.

Nach dem Neutralisieren des pH-Wertes durch Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 wurde die DNA mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und anschließendem Vortexen extrahiert. Zellmembranreste, chromosomale DNA, RNA und denaturierte Proteine präzipitierten mit dem Natriumsalz des Dodecylsulfats und wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 15800 x g und RT abgetrennt. 400 µl der oberen wässrigen Phase mit der darin enthaltenen renaturierten Plasmid-DNA wurden vorsichtig abgenommen, die DNA mit 1 ml 96% Ethanol gefällt, für 1 min bei RT inkubiert und anschließend bei 15800 x g für 2 min zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 750 µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach dem Trocknen in der Speed-Vac wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer pH 8,0/RNase A-Lösung (Endkonzentration 50 µg/ml) aufgenommen, für 3 min bei 55°C gelöst sowie für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei 4°C.

4.1.2 Plasmidmidipräparation

Lösung E1: (Zellresuspendierung)	Tris EDTA pH auf 8,0 mit HCl eingestellt RNase A	50 mM 10 mM 100 µg/ml
Lösung E2: (Zellyse)	NaOH SDS	200 mM 1 % (w/v)
Lösung E3: (Neutralisation)	K-Acetat pH auf 5,5 mit Essigsäure eingestellt	3,1 M
Lösung E4: (Äquilibrierung der Säulen)	NaCl Na-Acetat Triton X-100 pH auf 5,0 mit Essigsäure eingestellt	600 mM 100 mM 0,15 %
Lösung E5: (Waschen der Säulen)	NaCl Na-Acetat pH auf 5,0 mit Essigsäure eingestellt	800 mM 100 mM
Lösung E6: (Elution der DNA)	NaCl Tris pH auf 8,5 mit HCl eingestellt	250 mM 100 mM

Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem JETSTAR Kit unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen nach dem Protokoll des Herstellers. Bei diesem Kit werden die Bakterienzellen mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt und anschließend die DNA über eine Anionenaustauschsäule gereinigt.

Es wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µl Ampicillin (Endkonzentration 0,1 mg/ml) mit einer Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Rotationsschüttler bis zur stationären Wachstumsphase inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in der Bactifuge geerntet (10 min, 4 °C; 913 x g). Das Zellpellet wurde in 4 ml Lösung E1 resuspendiert und die Zellsuspension anschließend durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 lysiert. Nach dem Mischen mit einer Glaspipette und Inkubation für 5 min bei RT wurden 4 ml Lösung E3 zur Neutralisation hinzugefügt, es wurde vorsichtig gemischt und für 10 min bei 20°C und 23700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, sterilfiltriert und dann auf die mit 10 ml Lösung E4 äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml Lösung E5 gewaschen und die gereinigte DNA mit 5 ml Lösung E6 eluiert. Die eluierte DNA wurde mit 5 ml kaltem Isopropanol versetzt und für 30 min bei 4°C und 23700 x g zentrifugiert. Das präzipitierte DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70% Ethanol versetzt und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 15800 x g wurde das Pellet in der Speed-Vac getrocknet und in 100 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

Alle Plasmidmidipräparationen wurden auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml eingestellt und bei -4°C gelagert.

4.2 Isolierung von DNA aus *S. cerevisiae*

4.2.1 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

STET-Puffer:	Saccharose	8 % (w/v)
	Tris pH 8,0	50 mM
	EDTA	50 mM
	Triton X-100	5 % (v/v)
	in H ₂ O _{bidest.} sterilfiltriert	

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte nach Robzyk und Kassir (1992). 2 ml einer über Nacht in dem entsprechenden Selektivmedium dicht gewachsene Zellkultur wurde durch Zentrifugation für 5 sec bei 15800 x g geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 µl STET-Puffer resuspendiert und die Zellen nach Zugabe von 0,2 g Glasperlen durch 5-minütiges Vortexen mechanisch aufgeschlossen. Nach erneuter Zugabe von 100 µl STET-Puffer wurde der Ansatz zur Denaturierung der DNA für 3 min bei 95°C gekocht und dann für 1 min zur Renaturierung auf Eis gestellt. Anschließend wurde für 4 min bei 4°C und 15800 x g zentrifugiert, 100 µl des Überstandes mit der renaturierten Plasmid-DNA abgenommen und in einem frischen Eppendorfreaktionsgefäß mit 50 µl 7,5 M NH₄-Acetat gemischt. Danach wurde der Ansatz für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert, anschließend für 10 min bei 15.800 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde in 200 µl 96% Ethanol aufgenommen, gevortext und die DNA wurde für 15 min bei -80 °C gefällt. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 15800 x g und 4°C wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Speed-Vac getrocknet und in 20 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

Für anschließende Transformationen zur Amplifizierung in *E. coli* KC8-Zellen wurden 5 µl eingesetzt.

4.2.2 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	

2 ml einer über Nacht in YPD-Medium bei entsprechender Temperatur (25 bzw. 30°C) dicht gewachsene Zellkultur wurde durch Zentrifugation für 5 sec bei 15800 x g geerntet. Das Zellpellet wurde in 200 µl H₂O_{bidest} resuspendiert, dann wurden 200 µl „Cracking-Puffer“, 0,2 g Glasperlen und 400 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol zugegeben und die Zellen wurden durch 5-minütiges Vortexen mechanisch aufgeschlossen. Der Ansatz wurde für 5 min bei 15800 x g zentrifugiert, 200 µl des klaren Überstandes wurden abgenommen und 50 µl 7,5 M NH₄-Acetat und 500 µl 96%igem Ethanol zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation

bei RT wurde erneut für 5 min bei 15800 x g zentrifugiert, das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Speed-Vac getrocknet und in 20 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen. Zur analytischen PCR wurde 1µl der DNA eingesetzt.

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.1 PCR zur Klonierung von DNA Fragmenten

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erlaubt in aufeinanderfolgenden Zyklen die *in vitro* Amplifikation eines definierten DNA-Fragments. Die automatisierte Vermehrung der doppelsträngigen DNA-Matrize findet mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase statt. Dabei sind die DNA-Matrize, Puffer, dNTPs, DNA-Polymerase und zwei Oligonukleotide (Primer) wesentliche Komponenten der PCR. Die Sequenz der Oligonukleotide ist so gewählt, dass sie komplementär zu jeweils einem der Bereiche ist, die die zu vermehrende DNA flankieren. Ein Temperaturzyklus lässt sich in drei Abschnitte gliedern:

- (a) Denaturierung der doppelsträngigen DNA
- (b) Anlagerung der Primer an die denaturierte Matrizen-DNA ("Annealing")
- (c) Verlängerung der Primer durch eine hitzestabile Polymerase mit der zu der Matrizen-DNA komplementären Sequenz ("Elongation").

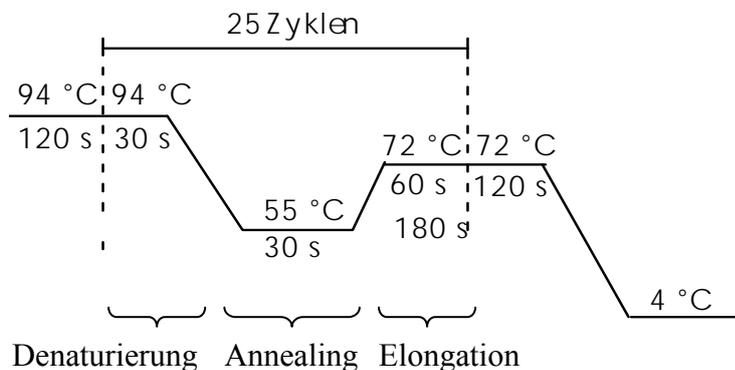


Abbildung 10: PCR-Programm zur Amplifikation von DNA

Die Methode der PCR wurde eingesetzt, um die Gene der zu untersuchenden Proteine zu amplifizieren, gegebenenfalls Leseraster oder geeignete Restriktionsschnittstellen an den Enden der Nukleotidsequenz einzufügen, um sie danach in verschiedene Vektorsysteme klonieren zu können. Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST), His₆ oder dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) wurden auf diese Art und Weise hergestellt.

Die PCR-Reaktion wurde unter Verwendung der in Tabelle 5 dargestellten Oligonukleotide mit Plasmid-DNA, genomischer oder cDNA aus *S. cerevisiae* als Matrize durchgeführt.

Es wurde die Pwo-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* verwendet, die sich durch erhöhte Thermostabilität und ihre 3'→5'-Exonukleaseaktivität („Proof-Reading“) auszeichnet und die eine sehr geringe Fehlerrate von ca. $3,2 \times 10^{-6}$ aufweist (im Vergleich zu $2,6 \times 10^{-5}$ bei der Taq-DNA-Polymerase). Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide wurde bei Bedarf nach ihrer jeweiligen T_m angepasst, die Elongationszeit richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Fragmente (pro 1000 bp 1 min) und die Elongationstemperatur entsprach dem Reaktionsoptimum der Pwo bei 72°C. Die Anzahl der Amplifikationszyklen betrug bei Plasmid-DNA 25 und bei genomischer DNA 35.

Die Ansätze wurden jeweils nach dem folgenden Schema pipettiert:

10 x Pwo-Puffer	10 µl
25 mM MgSO ₄	8 µl
10 mM dNTPs	2 µl
upstream primer 50 µM	1 µl
downstream primer 50 µM	1 µl
Plasmid-DNA (Verdünnung 1:20) bzw. genomische DNA	0,5 µl 1 µl
Pwo Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 100 µl

Nach der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot (4 µl) auf ein Agarosegel aufgetragen und die Amplifikation überprüft. Danach wurde der PCR-Ansatz über den „High Pure PCR Product Purification Kit“ gereinigt und die DNA-Fragmente konnten dann mit Restriktionsendonukleasen präparativ verdaut werden.

4.3.2 PCR zur Integration genomischer Modifikationen

Diese PCR wurde verwendet, um eine Gen-Kassette aus den von Longtine *et al.* (1998) hergestellten Plasmiden mit Hilfe bispezifischer Oligonukleotide zu amplifizieren. Diese bispezifischen Oligonukleotide sind nur zu einem kleinen Teil zur DNA-Sequenz der Plasmide homolog, während ein größerer Teil homolog zu dem jeweiligen Zielgen im Hefegenom ist. Das amplifizierte PCR Produkt wurde dann in *S. cerevisiae* transformiert und durch homologe Rekombination ins Genom integriert. GFP-Fusionsproteine und Deletionsmutanten wurden auf diese Art und Weise hergestellt.

Als Polymerase wurde das Enzym „Expand high fidelity“, ein Enzym-Mix aus Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und Pwo-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*,

eingesetzt. Dieses Enzym verbindet die hohe Prozessivität und Ausbeute der *Taq*-DNA-Polymerase mit der geringen Fehlerrate der *Pwo*-DNA-Polymerase. Als Matrizen-DNA dienten die Plasmide pFA6a-*TRP1*, pFA6a-*HIS3MX6*, pFA6a-*GFP(S65T)-TRP1* von Longtine *et al.* (1998), es wurden 35 Amplifikationszyklen durchgeführt, wobei die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide jeweils nach ihrer T_m optimiert wurde. Die Elongationszeit betrug 2 min. Die Ansätze wurden nach dem folgenden Schema pipettiert:

PCR Ansatz:

10-fach Puffer P1	10 μ l
dNTPs (10 mM jedes Nukleotids)	2 μ l
upstream primer 50 μ M	1 μ l
downstream primer 50 μ M	1 μ
Matrizen-DNA	0,5 μ l
Expand-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 100 μ l

Nach der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot (4 μ l) auf ein Agarosegel aufgetragen und die Amplifikation überprüft. Danach wurde der PCR-Ansatz über den „High Pure PCR Product Purification Kit“ aufgereinigt und die DNA-Fragmente wurden dann für die Transformation in die entsprechenden Hefestämme eingesetzt.

4.3.3 PCR zur Überprüfung genomischer Modifikationen

Es wurde überprüft, ob sich die PCR-Fragmente nach ihrer Transformation stabil ins Hefegenom integriert hatten und das Wildtypgen ausgetauscht wurde. Hierzu wurden Kontroll-PCRs mit genomischer DNA aus Hefe durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte im Prinzip unter den oben beschriebenen Bedingungen, der PCR Ansatz betrug 50 μ l und die Elongationszeit wurde jeweils an die Größe des zu amplifizierenden Fragmentes angepasst. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden 10 μ l des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert.

4.4 Reinigung und Auftrennung von DNA

4.4.1 Extraktion der DNA mit Phenol/Chloroform

Proteinhaltige Verunreinigungen können aus einer Nukleinsäurepräparation durch Extraktion mit Phenol/Chloroform und Chloroform entfernt werden. Bei den üblichen Salzkonzentrationen befindet sich die wässrige Phase oben, die organische Phase aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol unten. Die zu extrahierende DNA-Lösung wurde mit $\frac{1}{9}$ Volumen an 3 M Natriumacetat pH 5,2 (bei geringen Volumen wurde mit TE-Puffer pH 8,0 auf 100 μ l aufgefüllt) und mit einem Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und durch Vortexen emulgiert. Die obere Phase mit der DNA wurde nach Zentrifugation (2 min bei 15800 x g) abgenommen. Die denaturierten Proteine befanden sich hauptsächlich in der Interphase. Die obere Phase wurde mit einem Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gut gemischt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der DNA wurde abgenommen und eine Ethanolpräzipitation durchgeführt.

4.4.2 Präzipitation der DNA mit Ethanol

Die Lösung wurde zur Fällung der DNA mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumenanteilen 96% Ethanol versetzt und durch Vortexen gemischt.

Die Präzipitation erfolgte entweder für 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C . Der Ansatz wurde zentrifugiert (10 min bei 4°C und 15800 x g) und das Pellet mit 200 μ l 70% Ethanol zur Entfernung von Salzen gewaschen und erneut zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend in der Speed-Vac getrocknet und in einem geeigneten Volumen an TE-Puffer pH 8.0 aufgenommen.

4.4.3 PEG-Fällung von DNA

Verunreinigungen der DNA mit RNA-Resten, Proteinen oder niedermolekularen Substanzen wurden mit dem DNA-fällenden Polyethylenglycol (PEG) abgetrennt. Die zu fällende DNA-Lösung wurde zentrifugiert (2 min bei 15800 x g) und der Überstand mit $\frac{1}{4}$ Volumen an 4 M NaCl versetzt, gemischt und nach Zugabe von einem Volumen an 13% PEG 8000 (bezogen auf DNA mit Salz) erneut gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 20 min bei 15800 x g und 4°C zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 200 μ l kaltem

70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in der Speed-Vac getrocknet. Die DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen an TE-Puffer pH 8,0 oder H₂O_{bidest} aufgenommen.

4.4.4 “High Pure PCR Product Purification Kit”

Mit diesem ursprünglich für PCR-Proben entwickelten Kit lassen sich DNA Lösungen vor weiteren Reaktionsschritten von Salzen, Proteinen oder Nukleotiden trennen.

Diese Reinigungsmethode nutzt aus, dass die Nukleinsäuren in Gegenwart eines chaotropen Salzes spezifisch an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen binden.

Die DNA Lösung wurde mit 500 µl Bindungspuffer versetzt, durch Vortexen gemischt und in das obere Reservoir eines Filtrationsgefäßes mit Auffanggefäß pipettiert. Dann wurde die Probe für 30 s bei 15800 x g zentrifugiert, der Durchfluss abgesaugt, 500 µl Waschpuffer zugegeben, erneut zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Filtereinsatz wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer nach 1-minütiger Inkubation bei RT durch Zentrifugation (30 s bei 15800 x g) eluiert.

Bindungspuffer	Guanidin-Thiocyanat	3 M
	Tris-HCl pH 6,6	10 mM
	Ethanol	5 % (v/v)
Waschpuffer	NaCl	20 mM
	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
	Ethanol	80 % (v/v)
Elutionspuffer	Tris-HCl pH 8,5	10 mM
	EDTA	1 mM

4.4.5 Quantifizierung und Reinheitskontrolle von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch über ihre optische Dichte (OD) bestimmt. Eine Wellenlänge von 260 nm stellt das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren (RNA und DNA) dar, wobei 1 OD₂₆₀ 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Lösung wurde auf eine gemessene optische Dichte von kleiner als 1,0 verdünnt und die Konzentration der DNA in der Lösung konnte dann aus der gemessenen optischen Dichte und dem Verdünnungsfaktor bestimmt werden.

$$\text{DNA-Konzentration (in } \mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Mögliche Verunreinigungen der DNA-Lösung können über den Quotient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ dargestellt werden. Eine nicht verunreinigte DNA-Lösung entspricht dem Wert 1,8-2. Ein niedrigerer Wert deutet auf eine Verunreinigung durch Proteine, die bei 280 nm absorbieren, hin, ein höherer Wert hingegen auf eine Verunreinigung durch RNA, da diese aufgrund ihres niedrigeren Ordnungsgrades eine höhere optische Dichte bei 260 nm aufweist.

4.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

analytische und präparative 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.	

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Es wurden üblicherweise Agarosegele mit einer Agarose-Konzentration von 1% (w/v) benutzt. 1,2 g Agarose wurden in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und in 120 ml TAE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Nun wurden 6 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben, die Agarose-Lösung in eine horizontale Flachbettkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt.

Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde der Taschenkamm entfernt, das Agarosegel in der Flachbettkammer in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer

überschichtet. Die mit DNA-Probenpuffer versetzte DNA wurde in die Taschen des Gels aufgetragen und durch Anlegen einer Spannung von 150-200 mA aufgetrennt. Die Gele wurden unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm analysiert oder im Image Master VDS fotografiert. Ethidiumbromid hat die Eigenschaft zwischen den Basenpaaren der DNA sequenzunabhängig zu interkalieren; mit UV-Licht ist es zu einer Fluoreszenz bei ca. 590 nm anzuregen. Die DNA-Moleküle erscheinen als lila-rot fluoreszierende Banden. Um die DNA-Größe von linearen Fragmenten bestimmen zu können, wurde ein DNA-Längenstandard in einem Bereich von ca. 200 bp bis 12.000 bp gleichzeitig mit der zu analysierenden Probe aufgetragen.

Isolierung von DNA aus dem Agarosegel

Nach einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, einzelne DNA-Banden zu isolieren. Das Agarosegel wurde nach Beendigung der Elektrophorese auf einen UV-Tisch gelegt, die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht bei 366 nm mit einer sterilen Rasierklinge zügig ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,22 µm Sterilfiltereinsatz überführt. Nach einer Zentrifugation (15 min bei 15800 x g) wurde das Volumen des flüssigen Filtrates mit Hilfe einer Pipette bestimmt und zur Fällung der DNA im Überstand 1/9 Volumen an 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen an 96 %igem Ethanol zugegeben und gevortext. Die DNA wurde entweder über Nacht bei -20°C oder für 30 min bei -80°C gefällt. Anschließend wurde für 10 min bei 4°C und 15800 x g zentrifugiert und mit 100-200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min bei 4°C und 15800 x g) wurde das Pellet in der Speed-Vac getrocknet und in 10 µl TE-Puffer pH 8,0 resuspendiert.

4.5 Enzymatische Modifikation von DNA

4.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die analytischen und präparativen Restriktionsspaltungen von Plasmid-DNA erfolgten entsprechend den optimierten Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Enzyme nach Angaben der Hersteller. Zur analytischen Spaltung wurden 1 µl „Miniprep“-DNA (entspricht ca. 0,5-1 µg) in einem Gesamtvolumen von 10 µl und je 1 Unit des oder der jeweiligen Enzyme eingesetzt. Für präparative Spaltungen wurden 4 µl (entspricht ca.

2-4 µg) DNA in einem Gesamtvolumen von 40 µl und je 10 Units des oder der jeweiligen Enzyme eingesetzt. Der Restriktionsverdau von Plasmid DNA erfolgte durch mindestens einstündige Inkubation, während PCR Produkte über Nacht gespalten wurden. Falls weitere Reaktionen in demselben Ansatz durchgeführt werden sollten, wurde die enzymatische Reaktion durch Hitzebehandlung des Enzyms nach Angaben des Herstellers inaktiviert. Zum Stoppen der Enzymreaktion wurde nach der Inkubationszeit 1/6-Volumen DNA-Probenpuffer zugegeben und die Vollständigkeit des Verdaus wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

4.5.2 Behandlung mit alkalischer Phosphatase zur Dephosphorylierung von DNA

Die 5'-terminalen Phosphatgruppen der linearisierten Vektor-DNA wurden durch die Behandlung mit der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm entfernt, um die Religation (Ringschluss) der Vektor-DNA zu verhindern und die Insertion des gewünschten DNA-Fragmentes über kompatible Enden zu begünstigen. Pro präparativen Restriktionsansatz wurde 0,5 - 1 µl alkalische Phosphatase (Stammlösung 1 U/µl) eingesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1/6-Volumen DNA-Probenpuffer zugegeben und die Vektor-DNA über Agarosegel-Gelelektrophorese gereinigt.

4.5.3 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden Enden nach Restriktionsverdau wurde die mit dem PCR-Kit gereinigte und gespaltene Plasmid-DNA mit dem Klenow Fragment der DNA-Polymerase I behandelt. Dieses katalysiert in Anwesenheit von Desoxynukleosidphosphaten (dNTP's) das Auffüllen in 5' → 3' Richtung. Nach der Hitzeinaktivierung des Restriktionsverdaus wurde folgender Ansatz pipettiert:

präparativer DNA-Restriktionsverdau	40 µl
H ₂ O _{bidest.}	3 µl
2 mM dNTPs	4 µl
BSA (1 mg/ml)	1 µl
Klenow-Enzym (1 U/µl)	2 µl
Gesamt	<hr/> 50 µl

Er wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 30-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Für weitere Reaktionen konnte der Ansatz nach der Klenow-Behandlung erneut mit dem PCR-Kit aufgereinigt werden.

4.5.4 Ligation

Ligationspuffer (10 x)	Tris-HCl pH 7,8	400 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	100 mM
	ATP	5 mM

Zwischen der 5'-Phosphat-Gruppe eines DNA-Doppelstranges und einer freien 3'-OH-Gruppe eines anderen oder auch des gleichen DNA-Moleküls lässt sich mit Hilfe der T4-DNA-Ligase eine kovalente Esterbindung knüpfen. Die Wahrscheinlichkeit und Effizienz der Ligation wird erhöht, wenn die zu verknüpfenden DNA-Enden komplementäre Sequenzüberhänge besitzen und sich so aneinander anlagern können. Die Sequenzüberhänge entstehen nach Spaltung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Die Ligation der vorbereiteten Vektor-DNA und der Insert-DNA erfolgte nach folgendem Schema.

	Ligationsansatz Vektor mit Insert	Ligationsansatz Vektor ohne Insert
Vektor-DNA (50-100 ng/μl)	1 μl	1 μl
Insert-DNA (50-100 ng/μl)	2 μl	-
TE-Puffer pH 8	-	2 μl
Ligationspuffer 10 x	1 μl	1 μl
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	0,5 μl	0,5 μl
H ₂ O _{bidest.}	<u>5,5 μl</u>	<u>5,5 μl</u>
Gesamtvolumen	10 μl	10 μl

Die Ligation erfolgte während der Inkubation für mindestens 2 h bei RT. Der Ligationsansatz des Vektors ohne Insert-DNA gibt den Hintergrund der Zirkularisierung der Vektor-DNA an. Wurden Vektor und Insert mit stumpfen Enden oder ein Vektor mit PCR-Insert ligiert, so erfolgte die Ligation über Nacht bei 25°C mit 0,2 μl Ligase.

4.6 Transformation von Plasmid-DNA

4.6.1 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 %
	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	

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Hanahan (1983). 10 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium im 2 l Schüttelkolben angeimpft und für ca. 2 h bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 in dem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wurde die Kultur in einen Zentrifugenbecher überführt, für 5 min auf Eis gestellt und zentrifugiert (10 min bei 4° C und 6370 x g). Das Zellpellet wurde in 80 ml Puffer 1 auf Eis resuspendiert und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 6370 x g und 4°C wurde das Zellpellet in 8 ml Puffer 2 resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen hatten eine Transformationseffizienz von etwa 10⁷ Kolonien pro µg Plasmid-DNA (pBluescript).

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

Pro Ansatz wurden 100 µl einer Suspension kompetenter *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Dann wurde ein halber Ligationsansatz (5 µl) bzw. 0,2-1 µl Plasmid-DNA zugegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 90 s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort für 1 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe

von 0,5 ml LB-Medium und einer Inkubation unter Rollen für 30-60 min bei 37°C wurden die Zellen durch 2-minütige Zentrifugation (3390 x g) konzentriert. Bei Transformation von Plasmid-DNA ist ein Konzentrieren nicht notwendig. Dann wurde bis auf ein Restvolumen von ca. 50 µl abgesaugt, auf LB-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei jeder Transformation wurde ein Ansatz kompetenter Zellen ohne DNA mitgeführt, um Kontaminationen der Zellen auszuschließen.

4.6.2 Elektroporation von *E. coli*

Diese Methode wurde aufgrund ihrer hohen Transformationseffizienz zur Retransformation der aus Hefe isolierten Plasmid-DNA der cDNA- Library verwendet.

Präparation elektrokompetenter *E. coli* KC8 Zellen

Die *E. coli* Zellen wurden auf LB/Kan-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 250 ml LB Kan-Medium wurde mit einigen Kolonien angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD von 0,5 kultiviert. Dann wurden die Zellen für 30 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 2280 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (10 min bei 2280 x g) und Resuspension in 5 ml 10% Glycerin. Nach der dritten Zentrifugation (10 min bei 2280 x g) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml 10% Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden in 50 µl-Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert oder sofort weiterverwendet.

Elektroporation

Zu je 1 µl der aus Hefe isolierten Plasmid-DNA, wurden je 50 µl elektrokompetente KC8-Zellen gegeben (auf Eis arbeiten!). Die DNA und die Zellen wurden gemischt und in vorgekühlte Elektroporator-Küvetten übertragen. Dabei musste der Küvettenboden vollständig benetzt sein. Anschließend wurden die Proben im Elektroporator einem Elektroschock von 2,5 kV für 5 ms ausgesetzt. Direkt nach dem Elektroschock wurden die Proben mit je 1 ml LB-Medium gemischt, in Inkubationsröhrchen übertragen und für eine Stunde bei 37°C auf dem Roller inkubiert. Danach wurden die Zellen anzentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 50 µl abgesaugt und die verbleibende Probenmenge auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Um die Zellen zu selektieren, die das Zielplasmid enthalten, wurden die Zellen auf *E. coli* Minimal-Platten (-Trp) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei jeder Transformation wurde ein

Ansatz kompetenter Zellen ohne DNA mitgeführt, um Kontaminationen der Zellen auszuschließen.

Im Anschluss wurden DNA-Minipräparationen von mindestens drei Kolonien durchgeführt, da die Hefezellen aus denen die Plasmide isoliert wurden, mehr als ein Plasmid enthielten. Über *EcoRI/XhoI*-Verdau wurde das Restriktionsmuster der untersuchten Kolonien sowie das Vorhandensein eines Inserts der cDNA-Library überprüft.

4.6.3 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 Präparation kompetenter Hefezellen nach Ito *et al.* (1983) wurde pro Transformationsansatz eine 5 ml Kultur in YPD-Medium oder Selektivmedium mit einer Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 25°C (temperatursensitive Stämme) oder 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (5 min bei 913 x g) und das Zellpellet wurde im halben Ursprungsvolumen 0,1 M LiOAc/TE pH 7,5 resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Danach wurden die Zellen in 1/100 des Ursprungsvolumen 0,1 M LiOAc/TE pH 7,5 resuspendiert. Die kompetenten Zellen konnten bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden.

Transformation von DNA in Hefezellen

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

Für Hefetransformationen wurden pro Ansatz 5 µl Lachssperma-DNA (5 mg/ml) bei 95°C für 3 min denaturiert und danach sofort für 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 1 µg der zu

transformierenden Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines gereinigten PCR-Produktes und 50 µl kompetente Hefezellen hinzupipettiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA mitgeführt. Nach Zugabe von 350 µl PEG-Lösung und kurzem Vortexen erfolgte eine Inkubation auf dem Roller für 30 - 45 min bei 25°C (temperatursensitive Stämme) bzw. 30°C. Anschließend wurden 35 µl DMSO zugesetzt, gut gemischt und für 15 bzw. 5 min (temperatursensitive Stämme) ein Hitzeschock durch Inkubation bei 42°C durchgeführt. Daraufhin wurden die Zellen für 3 min bei 720 x g zentrifugiert, das Zellpellet wurde in 0,5 ml YPD-Medium resuspendiert und für 60 min bei 25°C (temperatursensitive Stämme) bzw. 30°C unter Rollen inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen mit 500 µl TE-Puffer pH 7,5 gewaschen, anschließend in 50 µl TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen und auf die jeweiligen Selektivplatten ausplattiert. Die Platten wurden 2 - 3 Tage bei 30°C oder etwa 5 Tage bei 25°C (temperatursensitive Stämme) im Brutschrank bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert. Zur dauerhaften Lagerung der transformierten Hefestämme wurden diese in Glycerin bei -80°C eingefroren (Glycerinstocks). Dazu wurden die ausgestrichenen Zellen von den Hefepplatten abgestrichen und in 200-750 µl 50% Glycerin resuspendiert.

5 Hefegenetische Methoden

5.1 Integration genomischer Modifikationen

Mit der Methode nach Longtine *et al.* (1998) sind PCR-vermittelte Modifikationen chromosomaler Gene möglich. Ein in die Hefezelle transformiertes, lineares DNA Fragment wird mittels homologer Rekombination in den entsprechenden Sequenzabschnitt auf dem Hefechromosom integriert. Auf diese Art und Weise können Gene deletiert werden oder zwecks Überexpressionsstudien der endogene Promotor eines Gens durch den induzierbaren *GALI*-Promotor ersetzt werden. Ebenso ist es möglich, Sequenzen für Protein "Tags" stabil zu integrieren, so dass Fusionsproteine in der Hefezelle unter ihrem endogenen Promotor exprimiert werden. Es können C- oder N-terminale Fusionen mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*, mit einer Mutante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP S65T) aus *Aequorea victoria* und dem Influenzavirus Hämagglutinin (HA)-Epitop kreiert werden.

Grundlage dieser Methode bilden die von Longtine *et al.* (1998) konstruierten Plasmide, die jeweils eine Genkassette besitzen, in der das ins Genom zu integrierende Element sowie der jeweilige selektierbare Marker enthalten sind. Alle Modifikationen konnten in Verbindung

mit drei verschiedenen Markern ins Genom integriert werden, dem *S. cerevisiae TRP1*-Gen, dem *S. pombe his5⁺*-Gen (Wach *et al.*, 1997) oder dem *E.coli kanMX6*-Modul (Wach *et al.*, 1994). Zur Amplifikation der zu integrierenden DNA-Elemente per PCR wurden bispezifische Oligonukleotide gestaltet, deren 3'-Region (ca. 20 bp) komplementär zu einem kurzen, konstanten Abschnitt des gewählten Plasmids ist und deren 5'-Region (ca. 40 bp) zu einem Abschnitt des Hefegenoms homolog ist. Es werden so mittels einer PCR lineare DNA-Fragmente hergestellt, die die zu integrierenden Elemente enthielten, flankiert von DNA-Sequenzen, die zu einem entsprechenden Abschnitt des Hefegenoms homolog sind. Diese wurden dann in einen Hefestamm transformiert. Im Zellkern der Hefe kommt es zur Rekombination zwischen den homologen Sequenzabschnitten und infolgedessen zum Einbau der zu integrierenden Elemente.

Je nach Wahl der zum Hefegenom homologen DNA-Sequenz können unterschiedliche Modifikationen durchgeführt werden. Wird der „forward-primer“ (F1) so gewählt, dass er genau vor dem Startkodon eines Gens endet und der „reverse-primer“ (R1) so, dass er komplementär zu der Sequenz nach dem Stopkodon ist, so wird das Gen gegen das eingebrachte DNA-Fragment ausgetauscht und somit deletiert. Kombiniert man den gleichen „R1-Primer“ mit einem „forward-primer“ (F2), der zu einem Abschnitt unmittelbar vor dem Stopkodon eines Gens homolog ist, wird das transformierte PCR-Fragment an dieser Stelle eingebaut und es entsteht eine C-terminale Fusion des Zielgens mit dem eingebrachten Element (Abbildung 11). Desweiteren können „forward-primer“ und „reverse-primer“ so gewählt werden, dass die gesamte Promotorregion eines Gens ausgetauscht wird oder der „reverse-primer“ wird komplementär zu einem Abschnitt innerhalb der kodierenden Sequenz eines Gens gewählt, was dann zu entsprechend verkürzten Genprodukten führt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels der Methode nach Longtine *et al.* (1998) sowohl Deletionen von verschiedenen Genen hergestellt als auch C-terminale Fusionen von Proteinen mit GFP (S65T) stabil in das Hefegenom integriert. Es wurden jeweils PCRs mit den in Tabelle 5 aufgelisteten Oligonukleotiden und den Matrizen-Plasmiden pFA6a-*TRP1* (pGS1532), pFA6a-*His3MX6* (pGS1533) oder pFA6a-*GFP(S65T)-TRP1* (pGS1535) durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit dem „PCR-Kit“ gereinigt und in die verschiedenen Hefestämme transformiert. Die Stämme, die das gewünschte Genelement integriert hatten, wurden über die jeweiligen miteingebrachten Marker selektiert. In Abbildung 11 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit den jeweiligen Genkassetten und die allgemeine Methodik nach Longtine dargestellt.

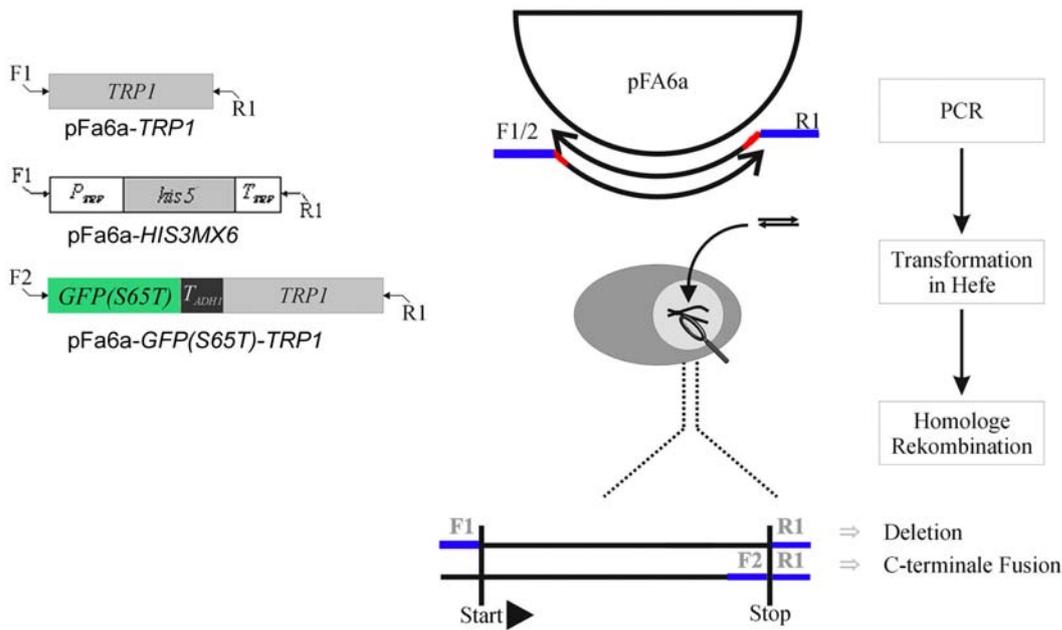


Abbildung 11: PCR-basierte Methode zur Gen-Deletion und Modifikation

Die allgemeine Arbeitsmethodik nach Longtine *et al.* (1998), die Lage der Oligonukleotide auf dem Hefechromosom bei Gendeletion bzw. einer C-terminalen Fusion und die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit ihren Genkassetten sind dargestellt. Erläuterungen im Text.

Überprüfung genomischer Modifikationen

Es wurde jeweils mit unterschiedlichen Methoden getestet, ob die genomischen Modifikationen stabil ins Genom integriert waren, folglich die betreffenden Gene deletiert waren oder die gewünschten Fusionsproteine korrekt synthetisiert wurden.

Zuerst wurde eine Test-PCR durchgeführt, mit der die Integration der Genelemente nachgewiesen wurde. Dazu wurde von allen selektierten Hefestämmen die genomische DNA isoliert und als Matrize eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sich ein „primer“ innerhalb der kodierenden Sequenz des Markers und der andere „primer“ innerhalb einer unveränderten Sequenz des modifizierten Gens anlagerte. Nur wenn das Genelement auch in dem richtigen Locus integriert war, wurde ein PCR Produkt synthetisiert. Zur Überprüfung von Gendeletionen wurde mit einer weiteren PCR, in der Oligonukleotide zur Amplifikation eines Fragmentes des betreffenden Gens eingesetzt wurden, die tatsächliche Deletion des betreffenden Gens nachgewiesen.

Zum anderen wurden über Immunblotanalysen sowohl die korrekte Synthese eines Fusionsproteins als auch die Deletion eines Gens nachgewiesen. Dazu wurden von den jeweiligen Hefestämmen Lysate für Immunblots hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch einen Immunblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Zudem konnte die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine durch direkte oder indirekte Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen und somit überprüft werden.

5.2 *In vivo*-Interaktionsstudien

5.2.1 Das Zwei-Hybrid System

Mit Hilfe von Zwei-Hybrid Systemen lassen sich potentielle Interaktionen von löslichen Proteinen *in vivo* untersuchen und nachweisen.

Das Zwei-Hybrid System beruht auf der Tatsache, dass eukaryontische Transkriptionsaktivatoren modular aufgebaut sind. Sie besitzen sowohl eine DNA-bindende Domäne als auch eine Aktivierungsdomäne und nur beide zusammen sind in der Lage, die Transkription zu starten. Potentiell interagierende Proteine können als Fusion mit der DNA-bindenden Domäne (Köder, „bait“) bzw. der Aktivierungsdomäne (Fisch, „fish“) exprimiert werden und eine Interaktion wird über die Transkription von Reporter genen dargestellt (Abbildung 12).

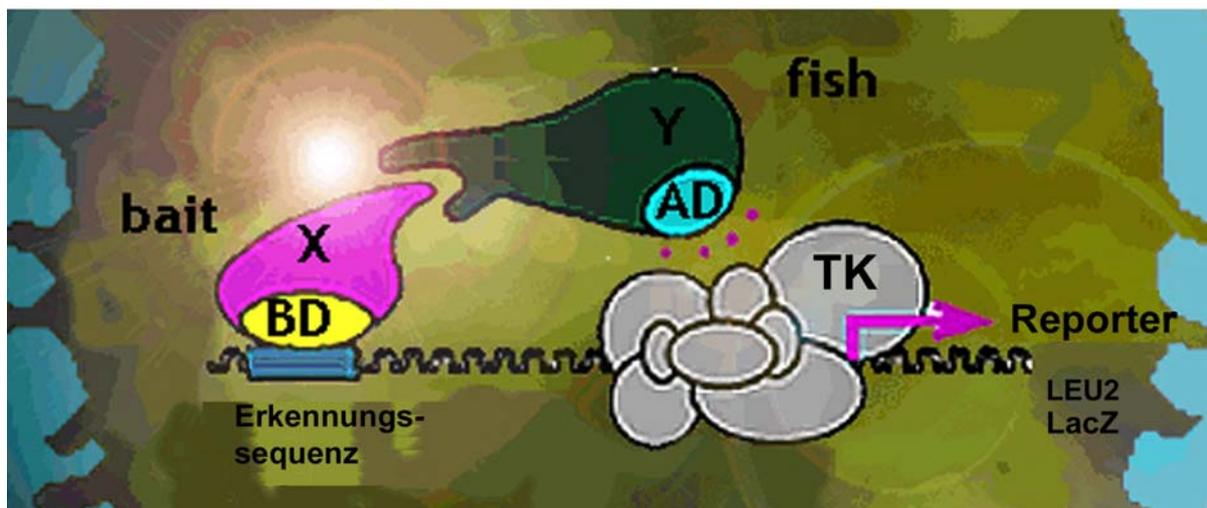


Abbildung 12 : Das Zwei-Hybrid System

bait, fish = Köder, Fisch
BD = DNA Bindungsdomäne
AD = Aktivierungsdomäne

X, Y = potentiell interagierende Proteine
TK = Transkriptionskomplex
Reporter = Reporter gen

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels der Zwei-Hybrid-Technik wurde das „DupLEX-A two-hybrid-system“ verwendet (Abbildung 4). Als DNA-bindende Domäne fungierte das LexA Protein aus *E. coli*, dessen eigentliche Funktion die Repression der SOS-Antwort nach DNA Schaden ist (Sancar *et al.*, 1982). Die LexA DNA-bindende Domäne wird vom Plasmid pEG202 codiert und sie steht unter dem konstitutiven *ADHI*-Promotor. Als Transkriptionsaktivierungsdomäne wurde das azidische B42, ebenfalls aus *E. coli*, eingesetzt. Die B42-Fusionen stehen unter der Kontrolle des induzierbaren *GALI* Promotors und werden von dem Plasmid pJG4-5 codiert. Die zu untersuchenden Kerntransportfaktoren wurden als LexA-Fusionen konstitutiv exprimiert, sie dienten als Köder. Mögliche Interaktionspartner bzw. eine cDNA-Library wurden als Fusionen der Aktivierungsdomäne B42 verwendet. Zum Nachweis der Interaktionen der Fusionsproteine steht ein duales Reportersystem zur Verfügung, zwei verschiedene Reportergene werden in gleicher Weise durch den LexA/B42-Komplex induziert. In dem eingesetzten Hefestamm GSY168 (EGY48) ist ein Leucin-Reporter integriert. Das *LEU2*-Gen, das einen Defekt im Leucin-Syntheseweg der Zellen komplementiert, steht unter der Kontrolle von sechs LexA-Operatoren. Das plasmidcodierte LexA - Fusionsprotein bindet an die LexA-Operatoren, die Transkription wird jedoch erst gestartet, wenn nach Interaktion mit einer B42 Fusion ein funktionsfähiger Transkriptionsaktivator gebildet wird. Die Interaktion zeigt sich dann als Wachstum auf Leucin-defizienten Platten.

Der zweite Reporter befindet sich auf dem Plasmid pSH18-34. Es enthält die codierenden Sequenzen des *LacZ*-Gens, die unter der Kontrolle von acht LexA - Operatoren stehen und eine hohe Sensitivität besitzen. Das Genprodukt des *LacZ*-Gens ist die β -Galaktosidase, deren Funktion es ist, Laktose zu Glukose und Galaktose zu hydrolysieren. Die Aktivität der β -Galaktosidase kann durch einen Farbttest nachgewiesen werden, indem die Enzymreaktion mit einem unphysiologischen Substrat detektiert wird. *In vivo* dient dazu X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid), das den Agarplatten zugesetzt wird und nach Hydrolyse durch die β -Galaktosidase einen schwer löslichen Indigofarbstoff bildet, der die Hefezellen blau färbt. *In vitro* kann ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid) als Substrat verwendet werden. Als Endprodukt entsteht dabei Nitrophenol, das das Zelllysat gelb färbt. Bei diesem Nachweis sind quantitative Aktivitätsbestimmungen der β -Galaktosidase durch Bestimmung der optischen Dichte möglich.

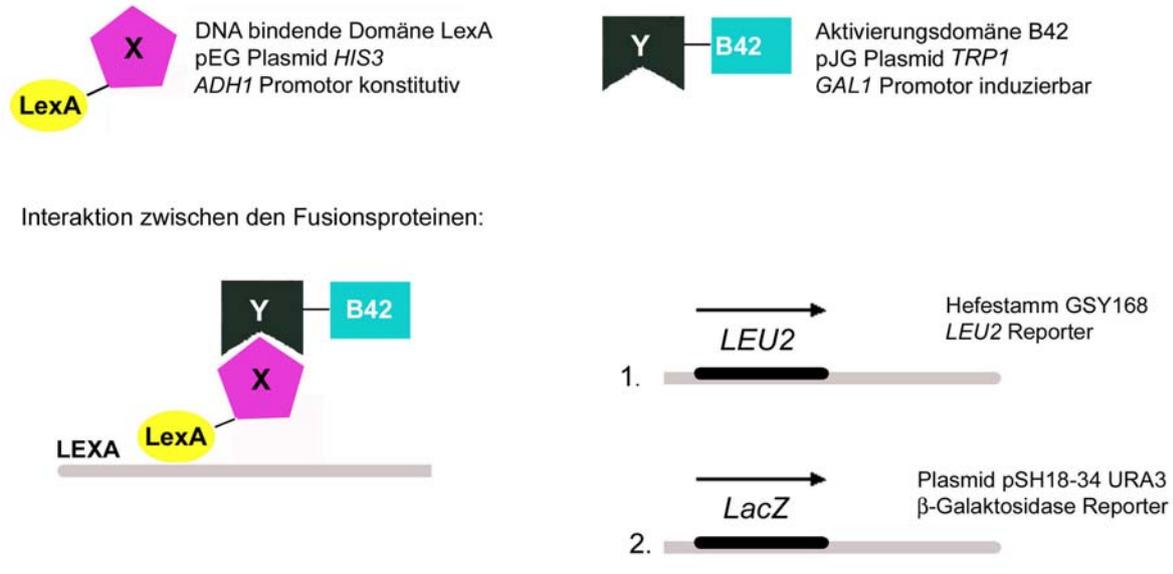


Abbildung 13: Das Funktionsprinzips des DupLEX-A-Systems

Zum Nachweis von Interaktionen mittels dieses Zwei-Hybrid Systems werden potentiell interagierende Proteine als Fusion der DNA bindenden Domäne LexA bzw. als Fusion der Aktivierungsdomäne B42 exprimiert. Eine Interaktion der beiden Fusionsproteine wird über ein duales Reportersystem nachgewiesen. Zum einen besitzt der verwendete Hefestamm einen integrierten *LEU2* Reporter, der Interaktionen als Wachstum auf Leucin-defizienten Platten darstellt. Zum anderen trägt er zusätzlich das Plasmid pSH18-34, das für die β -Galaktosidase kodiert. Eine Interaktion zeigt sich hierbei als Blaufärbung der Hefezellen auf X-Gal-haltigen Agarplatten.

Durchführung eines Zwei-Hybridscreens

Die Gensequenzen der als Köder dienenden Proteine wurden in den LexA-Vektor pEG202 (*HIS3* Marker) kloniert und in den Hefestamm EGY48, der bereits ein *LacZ*-Reporterplasmid (*URA3* Marker) enthielt, transformiert. Vor der Durchführung des Screens wurde die Synthese der LexA-Fusionsproteine per Immunblot überprüft und kontrolliert, ob es zu einer Autoaktivierung, d.h. zu einer Transkription der Reportergene allein durch die Expression der LexA-Fusionen kam.

Dann wurde eine mit der B42-Aktivierungsdomäne fusionierte cDNA-Genbank (Vektor pJG4-5, *TRP1* Marker) aus *S. cerevisiae* in die einzelnen Hefestämme mit den jeweiligen LexA-Fusionen transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf Ura/His/Trp/Leu-Selektivplatten ausplattiert, die Galaktose enthielten, um die Expression der B42-Fusionsproteine zu induzieren. Nur wenn es zu einer Interaktion beider Fusionsproteine kam, wurde das *LEU2*-Reportergen transkribiert und die Hefezellen waren in der Lage zu wachsen. Positive Kolonien wurden abermals über Leucin-Wachstumsassays und mit X-Gal-Plattenassays getestet. Aus positiven Klonen wurden die pJG4-5 Genbank-Plasmide isoliert,

in *E. coli* KC8 amplifiziert und die DNA erneut isoliert. Nach Überprüfung der Insertgröße durch Restriktionsverdau wurden die Plasmide erneut in den Ausgangshefestamm transformiert (Retransformation) und auf -Leu- und X-Gal-Platten getestet. Waren die Interaktionen zwischen der LexA-Fusion und der gefischten B42-Fusion reproduzierbar, wurde das Genbankplasmid sequenziert und eine Datenbankrecherche durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle der Interaktionsspezifität wurden die jeweiligen B42-Fusionen mit weiteren LexA-Fusionen getestet.

Abbildung 14 zeigt den Screenverlauf in Form eines Flussdiagramms.

Interaktionsassays des Zwei-Hybrid Systems

a) Interaktionsassay im diploiden Hefestamm

Alle pEG-Plasmide (LexA-Fusionen) wurden in den Stamm GSY168 (Mat α) und alle pJG-Plasmide (B42-Fusionen) in den Stamm GSY170 (Mat a) transformiert. Durch Kreuzung dieser beiden Hefestämme ("mating") wurden diploide Stämme erzeugt, die beide Plasmide besaßen und für die Interaktionsassays verwendet wurden.

Die zu testenden Stämme wurden zuerst auf entsprechenden Selektivmedien ausgestrichen. Die „bait“-Stämme (GSY168 + pEG-Plasmid) enthielten zusätzlich das Plasmid pSH18-34 als Reporterplasmid und wurden auf -Ura/His-Glc-Platten ausgestrichen. Die „fish“-Stämme (GSY170 + pJG-Insert) wurden auf -Trp-Glc-Platten ausgestrichen. Alle Stämme wuchsen für 2-3 Tage bei 30°C. Von jedem Stamm wurde in etwa die gleiche Zellmenge entnommen und in einem Eppendorfgefäß in H₂O_{bidest.} suspendiert. Die Menge an Zellen und H₂O richtete sich nach dem Versuchsumfang. Pro Mikrotiterfeld wurden 40 µl Zellsuspension benötigt. Nach Vorbereitung der Mikrotiterplatten (50 µl H₂O_{bidest.} pro Feld) wurden alle Kombinationen von LexA mit B42 zum "mating" in die einzelnen Mikrotiterfelder pipettiert (je 40 µl Zelllösung). Danach wurden die Lösungen mit dem Replikator gemischt, auf YPD-Platten gestempelt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Zur Selektion der diploiden Stämme wurden die Zellen anschließend durch Replika-Plattierung auf -Ura/Trp/His-Platten übertragen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Ergebnis wuchsen nur die Stämme, die beide eingebrachten Plasmide besaßen. Von diesen Stämmen wurden jeweils gleiche Zellmengen in 150 µl H₂O_{bidest.} (Mikrotiterplatten) suspendiert und ein Leucin-Wachstumsassay sowie ein X-Gal-Plattenassay durchgeführt.

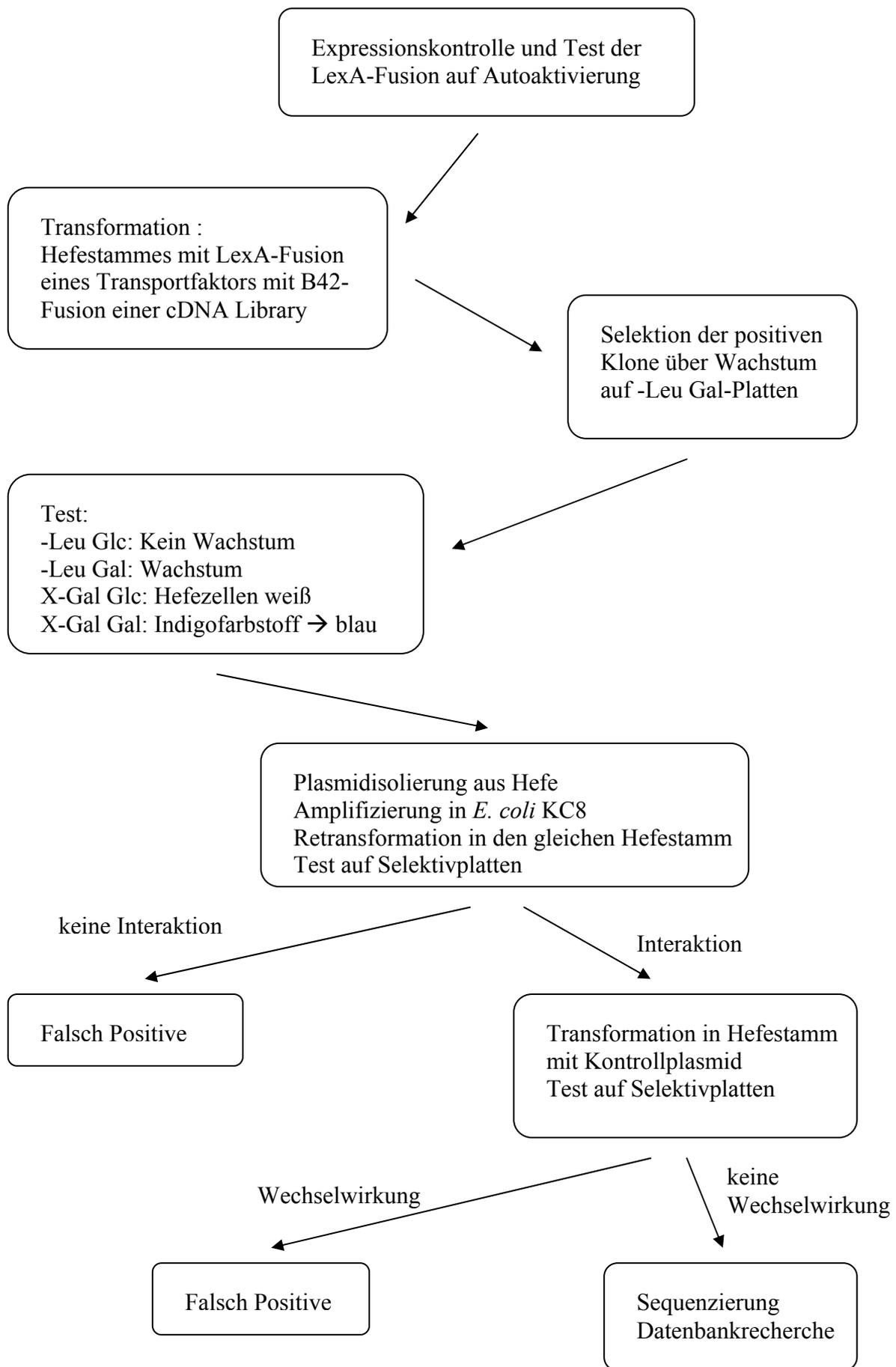


Abbildung 14: Flussdiagramm des Zwei-Hybrid Screenverlaufs

b) Interaktionsassay im haploiden Hefestamm

Diese Methode wurde angewandt, um die im Zwei-Hybrid Screen detektierten Interaktionen zu testen. Die isolierte DNA der gefischten pJG-Plasmide (B42-Fusionen) wurde in die verschiedenen Ausgangsstämme mit den jeweiligen pEG-Plasmiden (LexA-Fusionen) transformiert und es wurden jeweils mindestens drei parallele Transformanden getestet. Von jedem Klon wurden jeweils gleiche Zellmengen in einer Mikrotiterplatte in 150 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert und ein Leucin Wachstumsassay sowie ein X-Gal-Plattenassay durchgeführt.

Leucin-Wachstumsassay

Die zu testenden Stämme wurden als Zellsuspension aus einer Mikrotiterplatte mit einem „Replica-Plater“ auf Leucin-defiziente Selektivplatten (Ura/Trp/His/Leu), die entweder Glukose oder Galaktose als C-Quelle enthielten, gestempelt. Eine Interaktion der beiden Fusionsproteine und damit die Expression des *LEU2*-Reportergens wurde durch Wachstum auf den Galaktose-haltigen Platten nachgewiesen, während sich auf den Glukose-haltigen Platten, die als Negativkontrolle dienen, kein Wachstum zeigen sollte.

X-Gal-Plattenassay

Z-Puffer:	Na_2HPO_4	60 mM
	NaH_2PO_4	40 mM
	KCl	10 mM
	MgSO_4	1 mM
	2-Mercaptoethanol	50 mM
	in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, sterilfiltriert	
X-Gal-Lösung:	X-Gal	100 mg
	in N,N-Dimethylformamid	

Die zu testenden Stämme wurden als Zellsuspension aus einer Mikrotiterplatte mit einem „Replica-Plater“ auf X-Gal-haltige Selektivplatten (Ura/Trp/His/X-Gal), die entweder Glukose oder Galaktose als C-Quelle enthielten, gestempelt. Im Falle einer Interaktion der beiden Fusionsproteine wird das β -Galaktosidasegen exprimiert und die β -Galaktosidase setzt X-Gal in den Zellen zu einem Indigofarbstoff um, der die Kolonien blau färbt. Bei einer spezifischen Interaktion ist eine Blaufärbung nur auf den Galaktose-haltigen Platten nachzuweisen, wobei der Grad der Blaufärbung mit der Stärke der Interaktion korreliert.

5.2.2 Das Split-Ubiquitin System

Mit Hilfe der Split-Ubiquitin Methode können Interaktionen zwischen Proteinen in der lebenden Zelle untersucht werden (Johnsson & Varshavsky, 1994). Sie hat gegenüber dem Zwei-Hybrid System den Vorteil, dass die zu untersuchenden Interaktionen nicht im Nukleus stattfinden müssen und wurde vor allem zur Untersuchung der Interaktionen von Membranproteinen etabliert. Das Split-Ubiquitin System basiert auf der Tatsache, dass Ubiquitin, das in seine N- und C-terminalen Domänen getrennt wurde, in der Lage ist, seine Ausgangsstruktur wiederherzustellen. Zur Durchführung der Experimente wird Ubiquitin genetisch in seine beiden Subdomänen Nub (N-terminale Hälfte) und Cub (C-terminale Hälfte) getrennt. Werden beide Hälften Nub und Cub in einer Zelle einzeln koexprimiert, so reassoziieren sie *in vivo* zum quasi nativen Ubiquitin. Cub wird an seinem C-terminalen Ende mit einem Reporterprotein fusioniert, über das die Reassoziation nachgewiesen werden kann. Die Ubiquitin-spezifischen Prozessierungsproteasen, die sowohl im Kern als auch im Cytoplasma vorkommen, erkennen intaktes Ubiquitin und spalten jedes C-terminal gebundene Polypeptid vom Cub ab, das Reporterprotein wird freigesetzt und erlaubt so einen unmittelbaren Nachweis der Nub- und Cub-Reassoziation.

Zwei Mutanten des Nub wurden von der Arbeitsgruppe Johnsson (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) hergestellt. Nua und Nug tragen ein Alanin bzw. ein Glycin in Position 13 von Nub. Beide haben eine geringere Affinität zu Cub als der Wildtyp Nub (Nui), der ein Isoleucin an dieser Position trägt. Diese Mutanten können nur dann mit Cub zu Ubiquitin reassoziieren, wenn beide Ubiquitinhälften an Proteine gebunden werden, die in enger räumlicher Nähe zueinander liegen bzw. miteinander interagieren. Unter diesen Umständen interagiert Nua stärker mit Cub als Nug (Johnsson & Varshavsky, 1994, Abbildung 15). Es wurde bereits gezeigt, dass das Split-Ubiquitin System ebenfalls in der Lage ist die transienten Interaktionen der Kerntransportfaktoren darzustellen, allerdings war dies bis auf eine Ausnahme (Nua-Srp1/ Cse1-CubRUra3) nur mit dem Wildtyp Nui möglich. Da die Nua- und Nug-Mutanten verminderte Reassoziationseigenschaften besitzen, können mit diesen Mutanten Interaktionen von Membranproteinen, die stabile und langlebige Komplexe bilden, nachgewiesen werden, die Interaktionen der Kerntransportfaktoren aber sind zu kurzlebig, um natives Ubiquitin zu rekonstituieren (Lobert, 2000).

Zum Nachweis der Reassoziation der beiden Ubiquitinhälften bzw. Interaktion der fusionierten Proteine werden verschiedene Reportersysteme verwendet. Mit Hilfe des Dha (Dehydrofolatreduktase-Hämagglutinin)-"Tag" ist ein Nachweis über Immunblotting mit Antikörpern gegen HA möglich (Johnsson & Varshavsky, 1994). Eine andere Möglichkeit ist

ein Transkriptionsfaktor, der nach Freisetzung ein Gen aktiviert, dessen Produkt nachgewiesen werden kann (Stragljär, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde als Reporterprotein Ura3 (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase) verwendet, ein Enzym, das in den Nukleotidstoffwechsel involviert ist. Es katalysiert den 6. Schritt der Pyrimidinbiosynthese - die Umwandlung von Orotidin zu UMP unter Abspaltung von CO₂. Das verwendete Enzym trägt am N-Terminus als Modifikation einen primär destabilisierenden Rest (Arg, R). Über diesen Rest wurde es mit dem C-terminalen Ende des Cub fusioniert und als Fusionsprotein Cub-RUra3 exprimiert. Das Fusionsprotein ist funktional und damit in der Lage, eine *URA3* Mutation in einem Hefestamm zu komplementieren.

Zur Untersuchung der Interaktionen der Kerntransportfaktoren wurden deren kodierende Sequenzen als Cub-RUra3-Fusionen unter dem jeweiligen eigenen Promotor und als Nui-Fusionen unter dem *CUPI*-Promotor, der durch Zugabe von Kupfer induziert wird, kloniert. Die unterschiedlichen Promotoren wurden gewählt um sicher zu stellen, dass die Nui-Fusionen in höherer Konzentration vorliegen als die Cub-Fusionen, so dass im Falle einer Interaktion die vollständige Abspaltung des Reporterproteins RUra3 gewährleistet ist. Die Synthese aller Fusionsproteine wurde immunologisch mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Dann wurde jeweils eine Nui-Fusion eines Transportfaktors und eine Cub-Fusion eines anderen Transportfaktors in einem *URA3* defizienten Hefestamm koexprimiert. Interagieren die beiden Faktoren miteinander, so werden die beiden Ubiquitinhälften Nub und Cub in räumliche Nähe zueinander gebracht und reassoziieren zu nativem Ubiquitin. Das Reporterprotein wird von den Ubiquitin-spezifischen Proteasen freigesetzt und aufgrund seines destabilisierenden N-terminalen Arginins schnell abgebaut. Findet keine Interaktion zwischen den beiden Transportfaktoren statt, bleiben die Nub- und Cub-Subdomänen getrennt, das Reporterprotein bleibt an Cub gebunden und aktiv.

Die Selektion erfolgte über Wachstum der Hefezellen auf -Ura-Platten. Zusätzlich wurde eine Gegenselektion mit FOA durchgeführt, da die Expression von *URA3* in Hefe in Gegenwart von FOA letal ist. FOA (5-Fluor-Orotsäure) ist ein synthetischer Hemmstoff der DNA-Synthese, ein Pyrimidinanalogon, das in der Zelle in 5-Fluordesoxyuridylat umgewandelt wird. Letzteres blockiert das Enzym Thymidylat-Synthetase, wodurch die DNA-Synthese zum Erliegen kommt.

Findet eine Interaktion zwischen den untersuchten Kerntransportfaktoren statt, sind die Hefezellen nicht in der Lage, auf -Ura-Platten zu wachsen, zugleich sind sie jedoch FOA-

resistent und wachsen auf FOA-Platten. Interagieren die beiden Faktoren nicht, wird *URA3* exprimiert, die Hefezellen können auf -Ura-Platten wachsen und sind FOA-sensitiv.

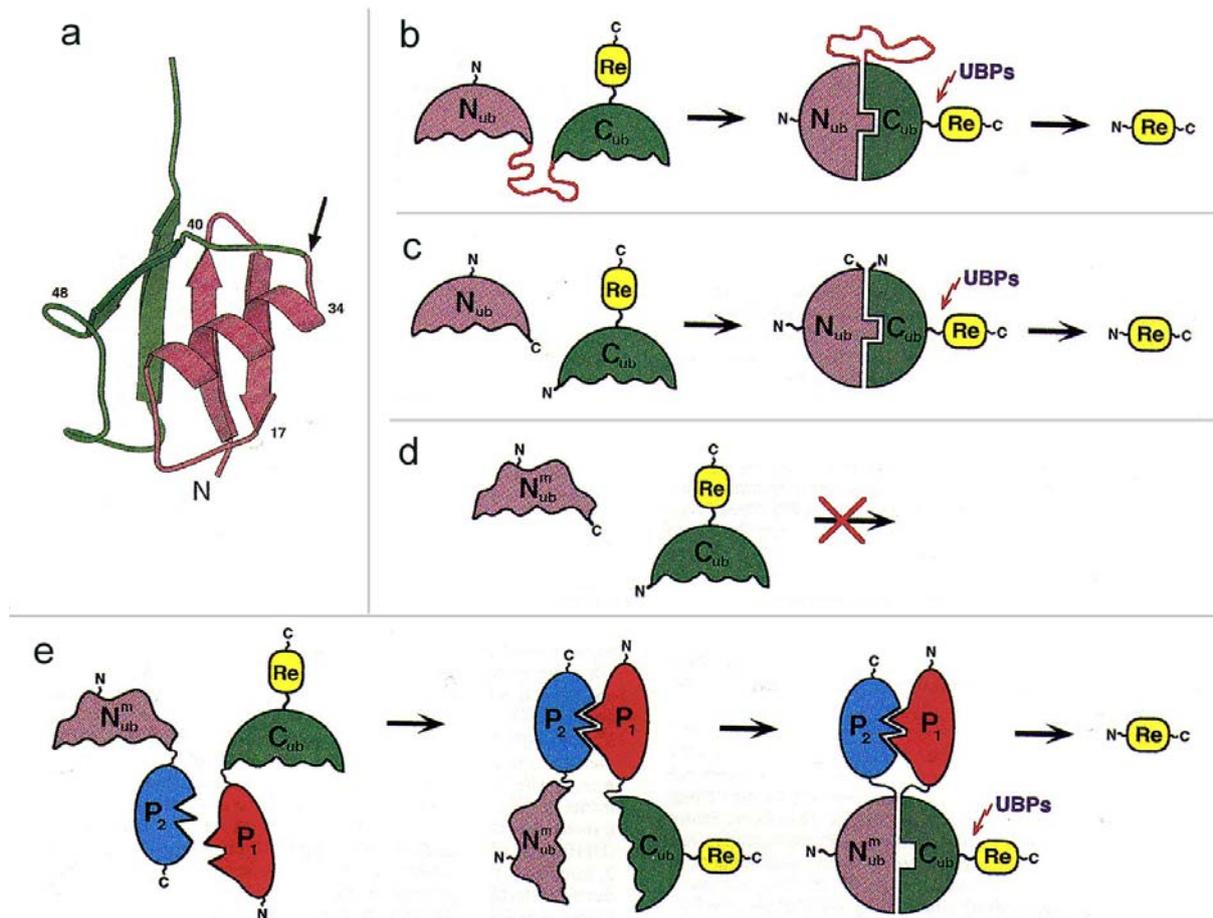


Abbildung 15: Das Split-Ubiquitin System

(a) Bänder-Strukturmodell des Ubiquitins. Die Subdomänen sind in grün bzw. rosa dargestellt. Der Pfeil bezeichnet die Stelle, an der eine Trennung oder eine Insertion stattgefunden hat. Ile13, die Stelle der Mutationen bei Nua und Nug, liegt im zweiten β -Faltblatt und interagiert mit der hydrophoben Seite der α -Helix.

(b) Ein neues Ubiquitin-Konstrukt trägt eine Insertion zwischen der N-terminalen (Nub) und der C-terminalen (Cub) Subdomäne von Ubiquitin und ist mit einem Reporterprotein (Re) verknüpft. Die Insertion hatte keinen messbaren Einfluß auf die Faltung des Ubiquitins. Korrekt gefaltetes Ubiquitin ist die Voraussetzung für die Spaltung des Fusionsproduktes durch Ub-spezifische Proteasen. Das Reporterprotein wird daraufhin freigesetzt.

(c) Wurden Nub und Cub einzeln in einer Zelle koexprimiert, so wurde eine Reassoziations *in vivo* zum quasi nativen Ubiquitin beobachtet.

(d) Bei Mutanten, die durch den Austausch einer einzigen Aminosäure in Position 13 des Nub entstanden waren, konnte keine Reassoziations beobachtet werden. Die instabile Konformation des Nub ist in der Graphik durch veränderte Gestalt der Nub^m Subdomäne dargestellt.

(e) Wurden an beide Hälften des Ubiquitins jeweils zwei Polypeptidketten P₁ und P₂ gebunden, die *in vivo* miteinander interagieren, so konnte das mutierte Nub-Fragment mit dem Cub zum funktionalen Ubiquitin reassoziieren. Die geringere Stabilität der Ub-Konformation wird durch eine Lücke zwischen den Untereinheiten dargestellt.

Abbildung nach Johnson & Varshavsky (1994).

Interaktionsassays des Split-Uiquitin Systems

Die Cub-Vektoren wurden in den Hefestamm GSY171 (Mat α) und die Nub-Vektoren in den Hefestamm GSY170 (Mat a) transformiert. Durch Kreuzung dieser beiden Hefestämme ("mating") wurden diploide Stämme erzeugt, die beide Plasmide (Cub und Nub) besaßen und für die Interaktionsassays verwendet wurden.

Zur Durchführung der Interaktionsassays wurden die zu testenden Stämme zuerst auf den entsprechenden Selektivmedien ausgestrichen (GSY171 + Cub-Plasmid auf -Leu-Platten und GSY170 + Nub-Plasmid auf -Trp-Platten). Die Stämme wurden für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Dann wurde von jedem Stamm in etwa die gleiche Zellmenge abgestrichen und in einem Eppendorfggefäß in H₂O_{bidest.} suspendiert. Die Menge an Zellen und H₂O richtete sich nach dem Versuchsumfang. Pro Mikrotiterfeld wurden 40 µl Zellsuspension benötigt.

Nach Vorbereitung der Mikrotiterplatten (50 µl H₂O_{bidest.} pro Feld) wurden alle Kombinationen von Cub mit Nub zum "mating" in die einzelnen Mikrotiterfelder pipettiert (je 40 µl der Cub- und Nub-Stämme). Danach wurden die Lösungen mit dem Replikator gemischt, auf YPD-Platten gestempelt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Zur Selektion der diploiden Stämme wurden die Zellen anschließend durch Replika-Plattierung auf -Trp-Leu-Platten übertragen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Ergebnis wuchsen nur die Stämme, die beide eingebrachten Plasmide besaßen. Von diesen Stämmen wurden jeweils gleiche Zellmengen in 150 µl H₂O_{bidest.} (Mikrotiterplatten) suspendiert, 1:10 Verdünnungen hergestellt und beides für den Interaktionsassay auf folgende Platten gestempelt: -Trp-Leu-Platten (Wachstumskontrolle), -Trp-Leu-Ura-CuSO₄, -Trp-Leu-FOA - mit und ohne CuSO₄. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert (FOA-Platten für 5 Tage bei 25°C) und ausgewertet. Eine Interaktion der beiden Fusionsproteine wurde über fehlendes Wachstum auf -Ura Platten und FOA-Resistenz nachgewiesen.

6 Mikroskopie

6.1 Direkte Fluoreszenzmikroskopie

Fusionsproteine mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* wurden in lebenden Hefezellen mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Die Gene dieser Fusionsproteine wurden entweder nach der Methode von Longtine *et al.* (1998) (vgl. 5.1) stabil in das Hefegenom integriert, standen somit unter dem endogen Promotor und wurden konstitutiv exprimiert, oder sie waren plasmidkodiert, standen unter der

Kontrolle des *GALI*-Promotors und wurden induziert. Hefestämme, deren Fusionsproteine plasmidkodiert vorlagen, wurden im Selektivmedium mit 2% Glukose angezogen, in dem gleichen Selektivmedium mit 2% Raffinose 1:200 verdünnt und über Nacht auf dem Rotationsschüttler bei 250 Upm und 30°C bzw. 25°C kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 wurde durch Zugabe von 2% Galaktoselösung die Synthese des GFP-Fusionsproteins induziert und die Hefekultur für 1-4 Stunden weiter inkubiert. Hefestämme, deren Fusionen in das Genom integriert waren, wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in dem jeweiligen Selektivmedium kultiviert. Temperatursensitive Stämme, bei denen sich der Phänotyp erst nach einem Temperaturshift ausprägt, wurden bei der permissiven Temperatur von 25°C kultiviert. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurde ein Teil der Kultur zur Kontrolle weiterhin bei 25°C, der andere Teil bei der restriktiven Temperatur von 37°C für 1-2 h kultiviert und danach wurden Proben entnommen.

6 µl Zellsuspension wurden auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und mittels Mikroskopie analysiert. Mit einer digitalen Kamera wurde sowohl das Fluoreszenzsignal des GFP-Fusionsproteins als auch mittels Nomarski-Optik das lichtmikroskopische Bild der jeweiligen Hefezelle aufgenommen.

6.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

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, die plasmidkodierte GFP-Fusionen unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors besaßen, wurden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben kultiviert.

Alle anderen Hefestämme wurden über Nacht in den entsprechenden Medien und bei der jeweiligen Temperatur auf dem Roller bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Bei temperatursensitiven Stämmen erfolgte zur Ausprägung des Phänotyps ab einer OD_{600} von 0,5 eine 1-2 stündige Inkubation bei der restriktiven Temperatur von 37°C. Dann wurde jeweils 5 ml Zellkultur entnommen, zur Fixierung mit 0,6 ml 37%igem Formaldehyd versetzt und für 1 h unter den Bedingungen der Zellanzucht weiter inkubiert. Temperatursensitive Stämme nach dem Temperaturshift wurden bei 30°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 3000 Upm (720 x g) und 4°C geerntet. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 5 ml PBS/Sorbitol gewaschen, in 1 ml PBS/Sorbitol resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Dann wurde 2 µl Zymolyase-100T (10 mg/ml) zugegeben und die Zellwand für 30 min bei 30°C unter langsamem Rollen verdaut. Die Ausbildung der Sphäroplasten wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls wurde die Inkubationszeit verlängert. Dann wurden sie durch eine 5 minütige Zentrifugation bei RT und 3000 Upm (720 x g) geerntet, mit 1 ml PBS/Sorbitol gewaschen und in 100 bis 200 µl PBS/Sorbitol aufgenommen. Eine Lagerung der Sphäroplasten in diesem Stadium war bei 4°C für mehrere Tage möglich.

Für die Immunfluoreszenz wurden mehrlöchrige Objektträger verwendet, die mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden, dazu wurde jedes Loch für 30 s mit je 30 µl 0,2% Poly-L-Lysin inkubiert, dreimal mit $H_2O_{bidest.}$ gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde auf jedes Loch 30 µl Zellsuspension aufgetragen, für 30 sec inkubiert und die überschüssigen, ungebundenen Zellen abgesaugt. Zur Permeabilisierung der gebundenen Zellen wurden die Objektträger zuerst für 6 min in Methanol (-20°C) und dann für 30 sec in Aceton (-20°C) inkubiert und an der Luft getrocknet. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde jedes Loch mit 30 µl BSA/PBS überschichtet und für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Absaugen des BSA/PBS erfolgte die Inkubation mit 22 µl des jeweiligen Erstantikörpers (in BSA/PBS verdünnt) über Nacht bei RT lichtgeschützt in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Zellen wiederum dreimal mit BSA/PBS gewaschen und für mindestens 5 h mit dem ebenfalls in BSA/PBS verdünnten FITC-konjugierten Zweitantikörper unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde einmal mit BSA/PBS gewaschen und mit 30 µl DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, 1 µg/ml) für 30 s inkubiert und danach wiederum dreimal mit BSA/PBS gewaschen. DAPI wurde verwendet,

um die DNA der Zellen anzufärben und somit den Zellkern zu detektieren. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit Antibleichreagens überschichtet, 24 mm x 60 mm große Deckgläser aufgelegt und die Ränder mit farblosem Nagellack abgedichtet. Die Lagerung der Immunfluoreszenz-Objektträger erfolgte bei -20°C.

7 Proteinbiochemische Methoden

7.1 Analytische Methoden

7.1.1 Präparation von Hefelysaten für Immunblot-Analysen

Die Hefekulturen wurden in 5-10 ml des entsprechenden Mediums bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0-1,5 auf dem Roller bei 25°C (temperatursensitive Stämme) bzw. 30°C kultiviert. Dann wurden 4 OD-Einheiten aus der Kultur entnommen und die Zellen durch Zentrifugation für 5 min, bei 1.430 x g und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 1 ml NaOH (0,25 M) mit 1% (v/v) β-Mercaptoethanol resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 160 µl kalte Trichloressigsäure (50% (w/v)) zugegeben, gemischt und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 5200 x g wurde das erhaltene Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen und in der Speed-Vac getrocknet. Danach wurde es in 95 µl SDS-Probenpuffer mit 5 µl Tris-Base resuspendiert und für 10 min bei 95°C inkubiert. 10 µl dieser Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunblot analysiert.

7.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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.}	

Material und Methoden

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

Das anionische Detergens SDS besetzt alle hydrophoben Gruppen innerhalb eines Proteins über seine lipophile Kohlenwasserstoffkette, so dass die Polypeptidkette durch SDS negativ geladen und ihre Eigenladung überdeckt wird. In SDS-Polyacrylamidgelen trennen sich Proteine daher ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht. Durch ein diskontinuierliches Puffersystem (Laemmli, 1970) wird die Trennung der Proteinbanden verbessert. Das SDS-Gel besteht aus einem kürzeren Sammelgel und einen längerem Trenngel. Die Proteinproben werden auf das niederprozentige Sammelgel aufgetragen und konzentrieren sich nach Anlegen einer elektrischen Spannung am Übergang von Sammelgel zu Trenngel zu einer scharfen Bande. Im Trenngel werden die Proteine dann nach der von ihrem Molekulargewicht abhängigen elektrophoretischen Beweglichkeit aufgetrennt.

Die SDS-Gele wurden nach dem in der Tabelle 14 dargestellten Schema in einer BioRad-Gelgießapparatur (Gelgröße 7 cm x 8 cm x 0,75 oder 1 mm) gegossen.

Tabelle 11: Pipettierschema für SDS-Gele

%iges-Trenngel		8	10	11	12,5	15	16	4%iges Sammelgel
H ₂ O bidest	(ml)	2,33	2,00	1,82	1,60	1,15	1,00	1,525
30% AA (w/v) 0,8% BAA (w/v)	(ml)	1,32	1,65	1,83	2,05	2,50	2,67	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)	(µl)	50						25,0
10% AMPS (w/v)	(µl)	25						12,5
TEMED	(µl)	2,5						2,5
Gesamtvolumen	(ml)	4,98						2,515

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erzeugen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde das Isopropanol wieder entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Taschen eingeführt.

Zum Auftragen der Proteinproben wurden diese mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C gekocht, und anzentrifugiert (1 min bei 15800 x g). Die Gele wurden in die Kammer eingesetzt, die Apparatur mit 1-fach Laufpuffer (160 ml 5 x Laufpuffer + 640 ml H₂O bidest) gefüllt und die vorbereiteten Proben aufgetragen. Die Proteine wurden bei 100 - 200 V von der Kathode hin zur Anode aufgetrennt, der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard mit aufgetragen. Bei anschließender Färbung der Gele mit Coomassie wurde ein 10 kDa-Proteinstandard verwendet, im Falle eines Transfers auf eine PVDF-Membran und folgender Immundetektion wurde ein „prestained“ Proteinstandard verwendet, der eine Kontrolle des Proteintransfers nach dem Transfer-Vorgang erlaubt. Die Kopplung der Farbstoffe an die Markerproteine zeigte gewisse Schwankungen, so dass sich jeweils Chargen-spezifische Werte ergaben.

Coomassie-Färbung

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	400 ml
	Eisessig	100 ml
	H ₂ O _{bidest.}	480 ml
	Glycerin	20ml
Entfärber 2:	Methanol	100 ml
	Eisessig	50 ml
	H ₂ O _{bidest.}	830 ml
	Glycerin	20ml

Zur Färbung und Fixierung der aufgetrennten Proteine wurde das Gel nach erfolgter SDS-PAGE für 15-30 min bei RT in der Coomassie-Färbelösung auf der Wippe inkubiert. Danach wurde das Gel für 1 h in Entfärber 1 und anschließend über Nacht in Entfärber 2 auf der Wippe bei RT entfärbt. Nachdem der Gelhintergrund entfärbt war, wurde das Gel zur Dokumentation eingescannt, anschließend für 30 min in 10%iger Glycerinlösung inkubiert und in einem Rahmen zwischen Zellophanfolie getrocknet.

7.1.3 Immunblotanalyse

Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Transferpuffer:	Glycin	7,2 g
	Tris	1,5 g
	H ₂ O _{bidest.}	1000,0 ml

Die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden für eine immunologische Detektion auf PVDF-Membrane transferiert. Hierfür wurde die PVDF-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten, zur Aktivierung mit 100% Methanol benetzt, mit Wasser abgespült und in Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurden Filterpapiere auf Gelgröße zurechtgeschnitten und kurz in Transferpuffer getaucht. In einer Plastikhalterung wurde der Blot in folgender Reihenfolge zusammgebaut: übereinander wurden ein in Transferpuffer vollgetränkter Schwamm, Filterpapier, das Gel mit links unten herausgeschnittener Ecke nach rechts unten und die PVDF-Membran mit der ebenfalls markierten Ecke gelegt. Die Luftblasen wurden mit einer Glaspipette entfernt. Schließlich wurden noch ein Filterpapier und ein Schwamm darüber gelegt. Die Plastikhalterung wurde geschlossen und in eine Tank-Blot-Apparatur (Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell) so eingesetzt, dass sich das Gel auf der Kathoden- und die Membran auf der Anodenseite befanden. Der Transfer fand dann für 45 - 60 min bei 100 V unter Kühlen und Rühren statt.

Immunologischer Nachweis von transferierten Proteinen

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)	25,00 ml
	Tween20	625,00 µl
	H ₂ O _{bidest.}	225,00 ml

Blockierungslösung:	Magermilchpulver	2,50 g
	PBS (10 x)	5,00 ml
	H ₂ O _{bidest.}	45,00 ml

Nach erfolgtem Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran durch Inkubation mit ca. 15 ml Blockierungslösung für 1 h bei RT auf der Wippe blockiert. Danach wurde der erste Antikörper (in Blockierungslösung verdünnt) auf die Membran gegeben und für 2 h bei RT oder über Nacht im Kühlraum bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurde der Blot nacheinander für 2 min in 1 x PBS, zweimal für 5 min in 1 x PBST und noch einmal für 2 min in 1 x PBS gewaschen. Dann wurde die Membran für 1 h auf der Wippe mit dem zweiten Antikörper (1:1000 in Blockierungslösung verdünnt) inkubiert. Der zweite Antikörper erkennt den F_c-Teil des Primärantikörpers und an ihn ist eine Peroxidase gekoppelt. Der gebildete Komplex aus dem jeweiligen Protein, dem Primärantikörper und dem Sekundärantikörper wurde nach erneutem Waschen mit PBS/PBST (s.o.) mittels des ECL (enhanced chemiluminescence)-Detektionssystems nachgewiesen. Hierzu wurden je 3 ml der ECL-Lösung 1 und 2 des Kits vereinigt, die Membran für 2 min darin inkubiert, mit Filterpapier getrocknet und in eine Plastiktüte gelegt. Nun wurden Röntgenfilme unterschiedlich lange exponiert (1 s bis zu 30 min), um die entstandene Chemilumineszenz zu visualisieren.

7.1.4 Quantifizierung von Proteinen

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Das Bio-Rad-Protein-Assay zur Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) wurde verwendet, um den Gesamtproteingehalt von Zelllysaten zu bestimmen oder um die Proteinkonzentration im Eluat von Affinitätssäulen abzuschätzen. Durch Bindung der Proteine an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verändert sich das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm auf 595 nm und mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes kann darüber die Proteinkonzentration bestimmt werden. Zur Durchführung des Tests wurden 790 µl H₂O_{bidest.} mit 10 µl der zu untersuchenden Proteinlösung und 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde die optische Dichte der Lösung bei 595 nm photometrisch bestimmt und die gemessenen Werte mit einer Eichgerade aus in gleicher Weise angesetzten, verschiedenen Verdünnungen einer BSA-Lösung bekannter Konzentration verglichen.

Proteinkonzentrationsbestimmung mittels OD₂₈₀-Messung

Die Proteinkonzentration von Lösungen gereinigter Proteine wurde photometrisch über die optische Dichte bei 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge besitzen die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin ein Absorptionsmaximum. Somit steht die Absorption einer Lösung im direkten Zusammenhang mit der Anzahl der aromatischen Reste der Proteinsequenz. Mit Hilfe der Software Lasergene (Fa. DNASTAR, Inc, Madison, USA) kann anhand einer bekannten Proteinsequenz aus der Anzahl der vorhandenen aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsfaktor (F) ermittelt werden. Die Proteinkonzentration wurde dann nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Konzentration [mg/ml]} = \text{OD}_{280} \times F$$

Die Proteinlösungen wurden zur Messung jeweils so eingesetzt, dass die OD₂₈₀ unter 1,0 lag und der Verdünnungsfaktor gegebenenfalls mitberechnet.

Acetonpräzipitation von Proteinen

Die Proteinlösung wurde mit fünf Volumenteilen eiskaltem Aceton versetzt, auf dem Vortexer gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt. Anschließend wurde bei 14000 Upm (15800 x g) für 30 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann in der SpeedVac getrocknet und zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert.

7.1.5 Umpufferung und Entsalzung von Proteinen

Zum Entsalzen und Umpuffern von Proteinen wurden PD10- oder NAP5-Gelfiltrationssäulen verwendet, die bereits mit Sephadex G-25 vorgepackt waren. Je nach dem Volumen der Proteinlösung wurden PD10-Säulen mit einem maximalen Auftragsvolumen von 2,5 ml oder NAP5-Säulen mit 500 µl Fassungsvermögen benutzt. Zuerst wurde die Säule bei 4°C mit 10 ml des gewünschten, vorgekühlten Puffers äquilibriert, dann wurde die Proteinlösung aufgetragen, beginnend mit der Fraktion der höchsten Proteinkonzentration. Die Elution erfolgte durch kontinuierliche Zugabe des gewünschten Puffers über die Säule und es wurden jeweils 8 Fraktionen zu je 1 ml (PD10-Säulen) oder 250 µl (NAP5-Säule) gesammelt. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt, dann wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

7.2 Synthese von Fusionsproteinen 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	

Zur Synthese von Proteinen in *S. cerevisiae* wurde der Expressionsvektor YEpGAL-*GST* (*URA3* Marker) verwendet, in den die für die entsprechenden Proteine kodierende Gene bzw. Genfragmente kloniert wurden. Die jeweiligen Expressionsvektoren wurden in den Wildtyphefestamm GSY155 transformiert, auf Selektivplatten ausplattiert und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Dann wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt, indem mit dem Hefestamm 5 ml des Selektivmediums mit 2% Glukose angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Rollen kultiviert wurde. Anschließend wurde die Vorkultur in dem entsprechenden Selektivmedium mit 2% Raffinose auf eine OD₆₀₀ von 0,03 - 0,05 verdünnt und über Nacht auf dem Rotationsschüttler bei 250 Upm und 30°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 wurde durch Zugabe von 2% Galaktoselösung die Synthese des GST-Fusionsproteins induziert und die Hefekultur für 4-6 Stunden weiter inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 4420 x g geerntet, mit PBS/Sorbitol gewaschen und konnten dann bei -80°C gelagert werden. Vor und nach der Galaktose Induktion wurde die OD₆₀₀ der Kultur gemessen, 4 OD-Einheiten entnommen und eine Präparation der Hefelysate für Immunblot-Analysen durchgeführt.

Zur Herstellung des Lysats wurde 1 g Zellfeuchtmasse in 5 ml Tris-SO₄-Puffer aufgenommen und für 10 min auf dem Roller bei 30°C inkubiert. Dann wurde für 5 min bei 4° C und 2060 x g zentrifugiert und das Pellet in 5 ml PBS/Sorbitol resuspendiert. Der Zelllösung wurde 50 µl DTT (10 mM), 10 µl PLAC und 100 µl Zymolyase-100T (10 mg/ml) zugesetzt und sie wurde für 2 h bei 30°C unter Rollen inkubiert. Durch Phasenkontrastmikroskopie wurde überprüft, ob die Zellwände vollständig verdaut waren, dann wurden 50 µl 10% Tween (v/v) zugesetzt und der Ansatz für 90 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 15 min bei 2060 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand (Ü1) abgenommen, das Pellet in 5 ml kaltem Hochsalz-PBS-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand (Ü2) abgenommen und das Pellet in 5 ml PBS-Puffer aufgenommen. Von beiden Überständen und dem Pellet wurden Proben entnommen, zum einen wurde der Proteingehalt mittels der Bradford-Methode bestimmt, zum anderen wurden sie zur Immunblotanalyse mit 2fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert.

Um die Menge an Fusionsprotein in den beiden Überständen abzuschätzen, wurde mit je 200 µl der Überstände ein analytischer Bindungsversuch an die Affinitätsmatrix, in diesem Fall GSH-Sepharose, durchgeführt. Um die Effizienz der Proteinsynthese zu überprüfen, wurden diese Ansätze mit den Proben der beiden Überstände und denen, die vor und nach der Galaktose-Induktion entnommen wurden, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunblot analysiert.

Nach den jeweiligen Probeentnahmen wurden die Überstände aliquotiert und zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Überstände wurden dann bei -80°C gelagert.

7.3 Synthese und Reinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

Die zu synthetisierenden Proteine wurden als Fusionen mit GST oder His₆ in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert, dieser wurde in einen geeigneten *E. coli* Stamm transformiert, in dem das Fusionsprotein dann synthetisiert wurde. Der "Tag" diente dazu, das Fusionsprotein an einem geeigneten, Matrix-gekoppelten Bindungspartner zu immobilisieren. Das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein 26 kDa Protein aus dem Cytoplasma des Spulwurms *Schistosoma japonicum*. Aufgrund der Bindungsaffinität von GST an Glutathion lässt sich das Fusionsprotein aus dem Zelllysat gewinnen und wurde so direkt für *in vitro*-Interaktionsassays eingesetzt oder über Affinitätschromatographie mit GSH-Sepharosesäulen aufgereinigt. Fusionsproteine mit His₆ wurden mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt. Die

kovalent an die Säulenmatrix verknüpften Ni²⁺-NTA-Moleküle bilden einen Metall-Chelat-Komplex, an den die His₆-Fusionsproteine binden. Durch anschließendes Waschen der Matrix wurden Verunreinigungen entfernt und das Protein wurde dann spezifisch eluiert. In dieser Weise gereinigte Proteine wurden direkt verwendet oder, falls der Reinheitsgrad nicht ausreichend war, eine Ionenaustauschchromatographie angeschlossen.

Zellanzucht, Synthese des Proteins und Zellaufschluss

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

Der entsprechende Expressionsvektor wurde in einen geeigneten *E. coli* Stamm transformiert. Nach Möglichkeit wurde für die Synthese von Proteinen der Stamm *E. coli* BL21 verwendet, da er proteasedefizient ist und zusätzlich das Plasmid pLysS besitzt, welches für ein Lysozym ähnliches Protein codiert, das durch Einfrieren und Auftauen der Zellen aktiviert wird. Der Stamm M15 besaß als zusätzliches Plasmid pREP4, das die Basalexpression des lac-Operons herabsetzte. Dieser Stamm wurde verwendet, wenn durch das synthetisierte Protein das Bakterienwachstum gehemmt wurde. Falls in keinem dieser beiden Stämme eine Synthese des gewünschten Proteins möglich war, wurde der Stamm JM101 eingesetzt.

Für jedes Protein wurden zunächst im kleinen Ansatz die optimalen Synthesebedingungen bezüglich des Bakterienstammes, der Temperatur und Dauer der Synthese ermittelt. In der Regel wurde für 1 h bei 37°C induziert, falls das Protein jedoch verstärkt abgebaut wurde oder infolge von Fehlfaltung unlöslich war, wurde die Synthesetemperatur auf 30°C oder 15°C gesenkt, was eine geringere Proteinmenge jedoch eine bessere Proteinqualität zur Folge hatte. Die Dauer der Synthese wurde dann auf bis zu 3 h erhöht.

Es wurde eine Kultur von LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einem Transformationsansatz angeimpft und bei 37°C auf dem Rotationsschüttler bei 250 Upm über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur im gleichen Medium 1:20 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 weiter inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von 72 mg/l (0,3 mM) IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid) die Expression des unter der Kontrolle des lac-Operons stehenden Gens induziert. Die Kultur wurde nun unter den zuvor ermittelten

optimalen Induktionsbedingungen kultiviert. Danach wurden die Bakterienzellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 4420 x g und 4°C geerntet und anschließend in 35 ml/l Zellkultur eines geeigneten Puffers (für GST-Fusionsproteine PBSKM-Puffer und für His₆-Fusionsproteine Lysepuffer) resuspendiert.

Nach Zugabe von 10 µl PLAC, das den proteolytischen Abbau inhibiert, erfolgte der Zellaufschluss in BL21-Zellen durch Einfrieren, anschließendes Auftauen und Inkubation des Lysates auf Eis für 10 min. Danach wurde zur Entfernung von Membranresten, DNA und nicht lysierten Zellen eine Zentrifugation für 1 h bei 4°C und 361000 x g durchgeführt. Die Zellyse der anderen *E. coli* Stämme erfolgte mittels dreimaliger Ultraschallbehandlung für 1 min, wobei das Lysat zwischen jeder Beschallung für 3 min auf Eis inkubiert wurde. Nach dem Ultraschallaufschluss wurde das Lysat für 30 min bei 4°C und 48400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann durch einen 0,22 µm-Filter filtriert und das Lysat wurde entweder weiteren Reinigungsschritten unterzogen oder bei -80°C gelagert.

Analytischer Bindungsversuch an Affinitätsmatrix

Dieser analytische Bindungsversuch wurde durchgeführt, um die Bindung des jeweiligen Fusionsproteins aus dem Lysat an die entsprechende Affinitätsmatrix und auch den vorhandenen Reinheitsgrad des Proteins zu überprüfen.

Hierzu wurden 60 µl des entsprechenden Säulenmaterials (für GST-Fusionsproteine Glutathion-Sepharose 4B und für His₆-Fusionen Ni-NTA-Agarose) mit dem entsprechenden Puffer (PBSKM für GST-Fusionen und Lyse-Puffer für His₆-Fusionen) dreimal gewaschen und danach in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen mit 50-500 µl Zellysat für 1 h bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zur Sedimentation des Säulenmaterials anzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Säulenmaterial dreimal mit je 1 ml der jeweiligen Puffer (PBSKMT bei GST-Fusionsproteinen und Waschpuffer bei His₆-Fusionsproteinen) gewaschen. Dann wurden die Proben zur Analyse mittels SDS-PAGE mit 30 µl 2-fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert.

Um den Verlauf der Proteinsynthese und -reinigung zu dokumentieren wurden auf ein SDS-Gel jeweils äquivalente Mengen der Kultur vor und nach der Induktion durch IPTG, Überstand und Pellet von der Zentrifugation nach erfolgter Zellyse und die Fraktionen des analytischen Bindungsversuchs aufgetragen und mittels Coomassie Färbung analysiert.

Abbildung 16 zeigt beispielhaft die Synthese verschiedener GST-Fusionsproteine in *E. coli*.

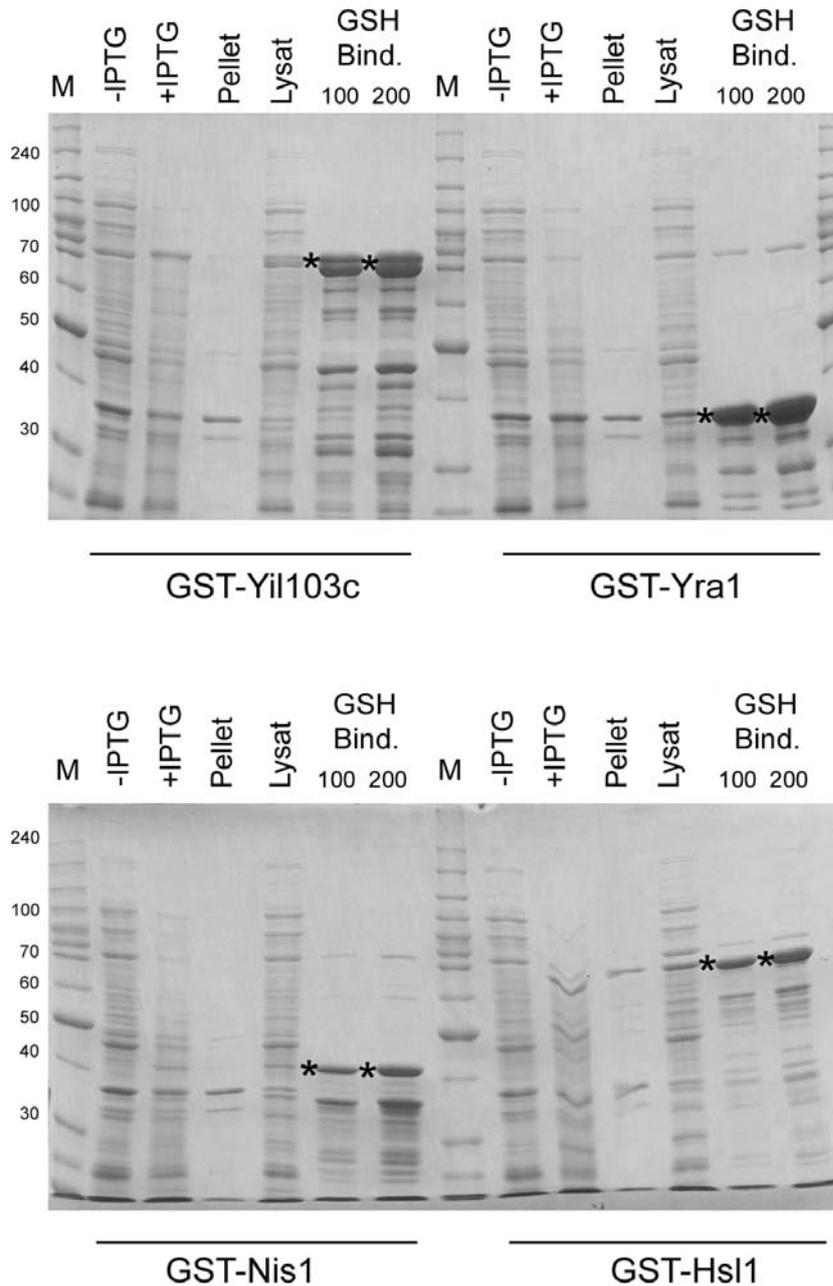


Abbildung 16: Synthese von GST-Fusionsproteinen mit Yjl103c, Yra1, Nis1 und Hsl1

E. coli BL21 Zellen wurden mit pGEX-4T-*YJL103c*, pGEX-4T-*YRA1*, pGEX-4T-*NIS1* und pGEX-4T-*HSL1* transformiert und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 kultiviert. Nach einer Probenentnahme (-IPTG) wurde die Synthese der Fusionsproteine durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert und die Stämme für 3 h bei 15°C kultiviert. Nach Entnahme einer weiteren Probe (+IPTG) wurde aus den Zellen durch Ultraschallbehandlung und Zentrifugation (Pellet) ein Gesamtzelllysat (Lysat) hergestellt. Zur Bindung der Fusionsproteine an GSH-Sepharose wurden je 100 bzw. 200 μl Gesamtzelllysat eingesetzt und mit 60 μl GSH Sepharose für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurden die Proben dann mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Angaben der Proteinstandards (M) sind in kDa.

Affinitätschromatographie

Verwendete Puffer für die Reinigung von His₆-Fusionsproteinen an Ni-NTA-Agarose-Säulen

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	

Verwendete Puffer für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen an GSH-Sepharose Säulen

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
	Tween 20	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	

Zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde eine Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose Säulen durchgeführt und His₆-Fusionen wurden mittels Ni-NTA-Agarose-Säulen chromatographisch gereinigt.

Pro 35 ml Zellysat wurden 3 ml des entsprechenden Säulenmaterials (für GST-Fusionsproteine Glutathion-Sepharose 4B und für His₆-Fusionen Ni-NTA-Agarose) jeweils dreimal mit PBSKM bzw. mit Lyse-Puffer gewaschen und danach mit dem jeweiligen Lysat für 1 h bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz in eine Chromatographie-Säule („disposable chromatography columns“) überführt, der entsprechende Puffer (PBSKM bzw. Lyse-Puffer) zugegeben und eine Fritte auf das Säulenmaterial gesetzt. Danach erfolgte ein Waschschrift bei 4°C mit 50 ml des entsprechenden Puffers (PBSKMT bzw. Wasch-Puffer). Das an das Säulenmaterial gebundene Fusionsprotein wurde anschließend bei 4°C durch Zugabe von GSH- bzw. Ni-TA Elutionspuffer in 8 Fraktionen zu je 1 ml eluiert. Um die Reinheit und Menge des eluierten Proteins zu bestimmen, wurden von allen Fraktionen 10 µl entnommen und eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt. Die das eluierte Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden mit Hilfe des Bioradassays ermittelt. Das Glutathion bzw. Imidazol wurde aus diesen Fraktionen durch eine Entsalzung mittels PD10-Säulen entfernt, die Proteinlösung zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Ionenaustauschchromatographie

Falls ein affinitätschromatographisch gereinigtes Protein nicht den gewünschten Reinheitsgrad besaß, wurde als zusätzliche Reinigung eine Ionenaustauschchromatographie mit hochauflösenden Ionenaustauscher-Säulen (Kationen MonoS, Anionen MonoQ) angeschlossen. Da jedes Protein entsprechend seines isoelektrischen Punktes (IP) eine bestimmte Ladung besitzt, wurden Proteine, deren IP unter 7 lag, mittels Anionenaustauschchromatographie und Proteine, die einen IP über 7 aufwiesen, über Kationenaustauschchromatographie gereinigt. In dieser Arbeit wurden Proteine mit IP >7 gereinigt und somit die Kationenaustauschchromatographie verwendet.

Kationenaustauschchromatographie

Puffer 0 MonoS:	K_2HPO_4	25 mM
	KH_2PO_4	25 mM
	in $H_2O_{\text{bidest.}}$, pH 6,8, sterilfiltriert	
Puffer A MonoS:	K_2HPO_4	25 mM
	KH_2PO_4	25 mM
	KCl	10 mM
	$MgCl_2$	1 mM
	β -Mercaptoethanol	2 mM
	in $H_2O_{\text{bidest.}}$, pH 6,8, sterilfiltriert	
Puffer B MonoS:	K_2HPO_4	25 mM
	KH_2PO_4	25 mM
	KCl	1 M
	$MgCl_2$	1 mM
	β -Mercaptoethanol	2 mM
	in $H_2O_{\text{bidest.}}$, pH 6,8, sterilfiltriert	

Die Salzkonzentration der zu reinigenden Fusionsproteine wurde auf < 50 mM gesenkt, indem die Proteinlösung entweder in Puffer 0 MonoS verdünnt oder mittels einer PD10-Säule umgepuffert wurde. Der Auftrag der Proteine auf eine MonoS/MonoQ HR5/5 mit 1 ml Säulenvolumen erfolgte über einen 50 ml „superloop“ mit Hilfe der Äkta Explorer 100. Danach wurden durch einen Waschschrift mit 5 ml Puffer A MonoS alle ungebundenen Proteine von der Säule entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen Salzgradient, der durch kontinuierliche Zugabe von Puffer B MonoS erzeugt wird. Zunächst wurde über 20 ml der Anteil von Puffer B MonoS kontinuierlich von 0% auf 50% erhöht, und dann über weitere 10 ml auf 100% erhöht. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 5 ml Puffer B MonoS gewaschen und mit 5 ml Puffer A MonoS reäquilibriert. Während des gesamten Gradienten wurde der Säulendurchlauf in 1 ml-Fractionen gesammelt und der Proteingehalt der einzelnen Fractionen durch ständige Messung der OD_{280} ermittelt. Somit wurde ein Elutionsprofil erstellt, anhand dessen die Protein enthaltenden Fractionen direkt ermittelt wurden. Von diesen Fractionen wurden 10 μ l entnommen und zur Reinheitskontrolle eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung durchgeführt. Die Fractionen wurden dann vereinigt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

7.4 *In vitro*-Interaktionsstudien

Protein-Protein-Interaktionen wurden *in vitro* mittels „pull-down-assays“ analysiert. Die Proteine wurden in *E. coli* oder *S. cerevisiae* synthetisiert und als Lysat oder in gereinigter Form eingesetzt. Die GST-Fusionsproteine wurden an GSH-Sepharose vorgebunden und mit ihren potentiellen Interaktionspartnern inkubiert. Dann wurden mit einem Waschschrift alle ungebundenen Proteine entfernt und danach die potentiell gebildeten Komplexe eluiert.

Pro Ansatz wurden 60 µl GSH-Sepharose in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß dreimal mit PBSKMT (vgl. 7.3) gewaschen und in 100 µl PBSKM (vgl. 7.3) aufgenommen. Dann wurden 10 µg eines gereinigten GST-Fusionsproteins oder in etwa vergleichbare Mengen *E. coli*- oder Hefelysat, das ein GST-Fusionsprotein enthielt, zugegeben und falls erforderlich auf ein Gesamtvolumen von 400 µl mit PBSKM aufgefüllt. Danach wurden die Ansätze für mindestens 1 h bei 4°C auf dem Roller inkubiert und anschließend dreimal mit je 1 ml PBSKMT gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 12 µg eines anderen Proteins ohne GST-Tag oder auch mit mehreren anderen Proteinen, die auf Interaktion untersucht werden sollten, in einem Gesamtvolumen von 400 µl für mindestens 1 h bei 4°C auf dem Roller. Anschließend wurde erneut dreimal mit je 1 ml PBSKMT gewaschen und entweder ein weiteres Protein in der beschriebenen Art und Weise zugegeben oder die gebundenen Proteine mit 30 µl 2-fach SDS-Probenpuffer und Inkubation für 5 min bei 95°C auf dem Heizblock eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung analysiert.

Falls auch die nicht gebundenen Proteine oder die Ablösung der an das GST-Fusionsprotein gebundenen Proteine durch Gsp1-GTP analysiert werden sollten, wurde der Ansatz nach der Inkubation anzentrifugiert, die Überstände abgenommen, eine Acetonpräzipitation durchgeführt und diese Proben ebenfalls mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

III Ergebnisse

1 Split-Ubiquitin Analysen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein neues System, das Split-Ubiquitin System, zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen *in vivo* zu etablieren und durch Screenmethoden neue Interaktionspartner für Kerntransportfaktoren zu finden.

Das Split-Ubiquitin System basiert auf der Tatsache, dass Ubiquitin, das in seine N - und C-terminalen Domänen getrennt wurde, in der Lage ist, seine Ausgangsstruktur wiederherzustellen. Die C-terminale Domäne von Ubiquitin (Cub), gefolgt von einem Reporterprotein (RUra3), wird mit einem Transportfaktor fusioniert. Die N-terminale Domäne von Ubiquitin (Nui) wird mit dem N-Terminus von anderen Transportfaktoren verknüpft. Dann werden beide Fusionen in Hefezellen koexprimiert. Im Falle einer Interaktion der untersuchten Transportfaktoren kommt es zu einer Reassoziierung der beiden Ubiquitinhälften zu quasi nativem Ubiquitin. Daraufhin wird das Reporterprotein durch Ubiquitin-spezifische Proteasen abgespalten und aufgrund seines N-terminalen Arginin-(R)-Restes rasch abgebaut. Die Hefezellen sind dann nicht mehr in der Lage, auf Uracil-defizienten Platten zu wachsen, und sie sind FOA-resistent (Johnsson und Varshavsky, 1994).

Das Split-Ubiquitin-System wurde bisher vor allem zum Nachweis von Interaktionen von Membranproteinen verwendet. Es wurde bereits gezeigt, dass dieses System auch die transienten Interaktionen von löslichen Kerntransportfaktoren darstellen kann (Lobert, 2000).

1.1 Interaktionen von Transportfaktoren mit Nukleoporinen

Es wurde weiter untersucht, ob es mit dem Split-Ubiquitin System möglich ist, Interaktionen von Nukleoporinen (stationäre Phase des Kerntransportes) mit Kerntransportfaktoren (mobile Phase des Kerntransportes) darzustellen. Dazu wurde zunächst das gut charakterisierte Nukleoporin Nup2 verwendet. Nup2 wurde als Nui-Fusion mit dem *CUPI*-Promotor kloniert, transformiert und mit verschiedenen CubRUra3-Fusionen auf Interaktionen getestet. Ebenso wurde es als Cub-Fusion unter seinem eigenen Promotor in den Vektor pRS315 (*LEU2*) kloniert und gegen verschiedene Nui-Fusionen getestet. Abbildung 17 zeigt den Interaktionstest von Nup2 als Nui- bzw. als CubRUra3-Fusion.

Nui-Nup2: Als Kontrollen wurden der Leervektor pRS315 und die Cub-Fusion des ER-Membranproteins Sec63 eingesetzt, beide zeigten keine Wechselwirkungen mit Nui-Nup2. Sehr starke Interaktionen ließen sich mit Srp1-, Kap95- und Cse1-CubRUra3 nachweisen, eine etwas schwächere Interaktion zeigte Gsp1-CubRUra3. Desweiteren ließ sich eine Interaktion mit Xpo1-CubRUra3 detektieren, allerdings ist eine mögliche Funktion dieses Komplexes noch unbekannt. Der Dissoziationsfaktor Yrb1 zeigte keine Wechselwirkung mit Nup2.

Nup2-CubRUra3: Die beiden Kontrollen, der Leervektor pRS314 und Nui alleine zeigten keinerlei unspezifische Wechselwirkungen. Schwache Interaktionen wurden mit Nui-Guk1, das als Negativkontrolle dienen sollte, und Nui-Yrb1 nachgewiesen, wobei noch unklar ist, ob es sich hier um unspezifische Interaktionen handelt oder ob Nup2 evtl. eine Rolle beim Yrb1 Import spielt. Auch mit der Cub-Fusion von Nup2 wurden die zuvor beschriebenen Interaktionen mit Nui-Kap95, -Gsp1, -Cse1, -Xpo1 und -Srp1 nachvollzogen. Mit der Mutante Nua-Srp1 konnte die Interaktion nicht mehr gezeigt werden. Es wurde außerdem eine Interaktion mit Nui-Nup2 detektiert, wobei unklar ist, ob es aufgrund der engen räumlichen Nähe zu dieser Interaktion kommt oder ob Nup2 in der Lage ist Dimere zu bilden. Desweiteren ergaben die Untersuchungen eine relativ starke Interaktion mit Nui-Prp20.

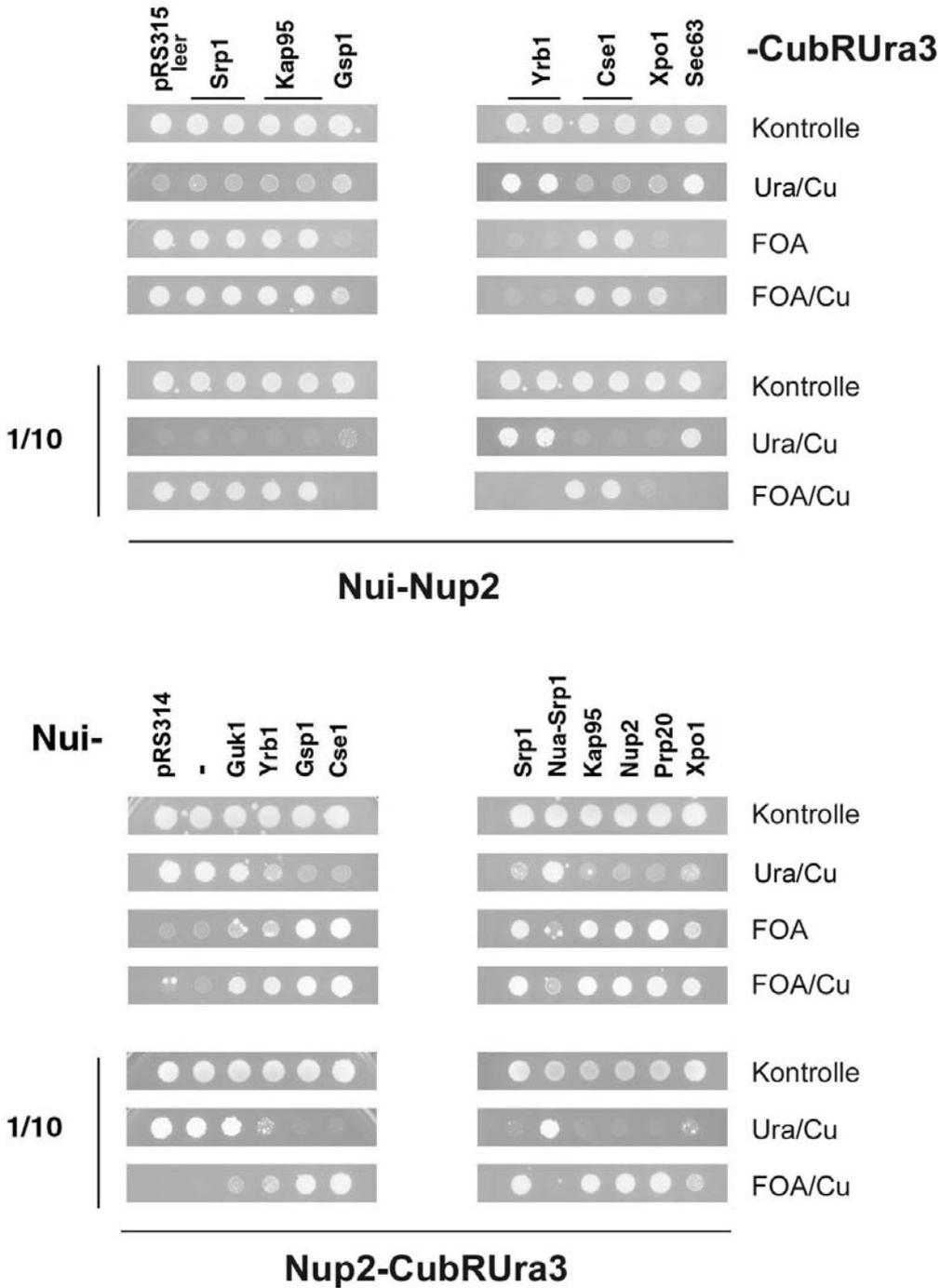


Abbildung 17: Interaktionstest von Nup2 mit Nui- bzw. CubRUra3-Fusionen

Die zu testenden Stämme wurden auf Leu-Platten (Cub-Fusionen) und auf Trp-Platten (Nui-Fusionen) ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden sie in Mikrotiterplatten übertragen, kombiniert, mit dem Replikator auf YPD-Platten gestempelt und für 1 Tag bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen auf Trp-Leu-Platten repliziert und für 1 Tag bei 30°C auf Diploide selektiert. Anschließend wurden jeweils gleiche Zellmengen unverdünnt oder 1:10 verdünnt in Mikrotiterplatten übertragen und mit dem Replikator auf Trp-Leu-Platten (Wachstumskontrolle), Trp-Leu-Ura-CuSO₄-Platten (Ura/Cu), Trp-Leu-FOA-CuSO₄-Platten (FOA/Cu) und Trp-Leu-FOA-Platten (FOA) übertragen. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C (FOA-Platten für 5 Tage bei 25°C) inkubiert und ausgewertet.

Eine Interaktion ist über fehlendes Wachstum auf Ura/Cu Platten und FOA Resistenz nachzuweisen

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Interaktionen von Nui-Nup2 bzw. Nup2-CubRUra3 zum Vergleich gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass sich mit Nup2 sowohl als Nui-, als auch als CubRUra3-Fusion die gleichen Interaktionen nachweisen lassen. Dies lässt den Schluss zu, dass das Split-Ubiquitin System grundsätzlich in der Lage ist, Interaktionen von löslichen Kerntransportfaktoren mit Nukleoporinen zu identifizieren.

Tabelle 12: Vergleich der Interaktionstests von Nui-Nup2 und Nup2-CubRUra3

Nui-Nup2

	Ura/Cu	FOA/Cu
pRS315	-	++
Srp1-Cub	-	++
Kap95-Cub	-	++
Gsp1-Cub	(-)	(+)
Yrb1-Cub	+	-
Cse1-Cub	-	++
Xpo1-Cub	-	(+)
Sec63-Cub	+	-

Nup2-CubRUra3

	Ura/Cu	FOA/Cu
pRS314	+	-
Nui	+	-
Nui-Srp1	-	++
Nua-Srp1	+	-
Nui-Kap95	-	++
Nui-Gsp1	-	++
Nui-Yrb1	-	(+)
Nui-Cse1	-	++
Nui-Xpo1	-	+
Nui-Nup2	-	++
Nui-Prp20	-	++
Nui-Guk1	+	(+)

Mit dem Split-Ubiquitin System wurde, außer der Bestätigung einer Reihe von bekannten Interaktionen zwischen Transportfaktoren, eine noch nicht beschriebene Interaktion zwischen dem Nukleoporin Nup2 und dem Exportin Xpo1 detektiert (Abbildung 17). Xpo1 ist der Exportrezeptor für Proteine, die ein NES-Signal tragen (Stade *et al.*, 1997) und für Nup2 wurde bisher lediglich eine Rolle beim klassischen NLS-Import und beim Export von Importin α (Srp1) gezeigt (Hood *et al.*, 2000; Solsbacher *et al.*, 2000).

1.2 Charakterisierung der Nup2/Xpo1 Interaktion

1.2.1 Nup2 bindet *in vitro* an Xpo1 und Gsp1

Die Interaktion zwischen Xpo1 und Nup2 wurde weiter untersucht und sollte mit aus *E. coli* gereinigten Komponenten durch *in vitro*-Bindungsversuche bestätigt werden. Dazu wurde Gsp1 als GST-Fusion sowie Xpo1 und Nup2 als His₆-Fusion in *E. coli* synthetisiert und anschließend gereinigt. Es wurde hier eine mutierte Form des Gsp1p eingesetzt (Q71L), die nicht in der Lage ist, gebundenes GTP zu hydrolysieren. Für den Bindungsversuch wurde GST-Gsp1QL-GTP an GSH-Sepharose immobilisiert und dann mit His₆-Xpo1 und His₆-Nup2 inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen Materials wurden die Proteine in den gebildeten Komplexen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 18).

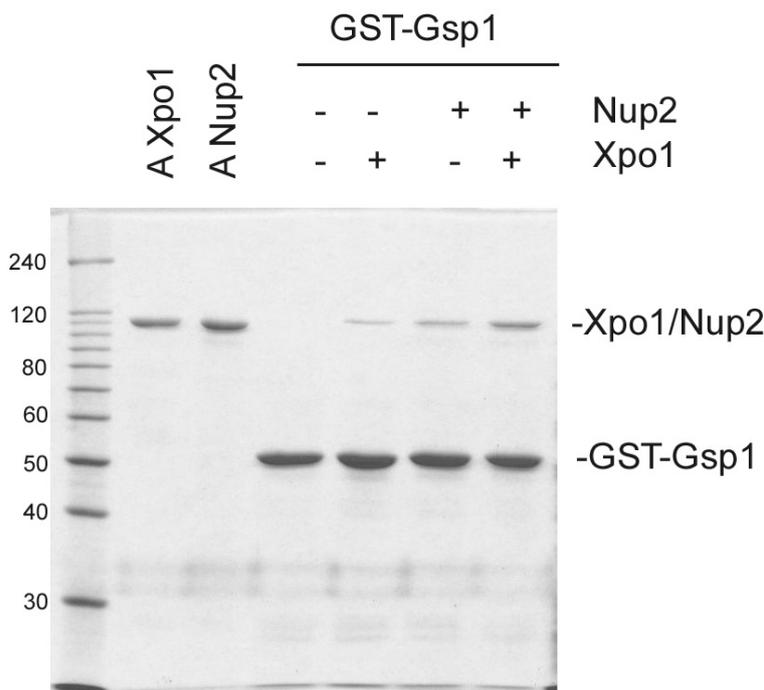


Abbildung 18: Xpo1 und Nup2 bilden einen Komplex mit Gsp1-GTP

GST-Gsp1Q71L, His₆-Xpo1 und His₆-Nup2 wurden in *E. coli* JM101 bzw. BL21 synthetisiert und gereinigt. Pro Ansatz wurden 10 µg GST-Gsp1 mit 60 µl GSH-Sepharose für 1 h unter Rollen bei 4°C inkubiert. Gebundenes GST-Gsp1p-GTP wurde dreimal mit PBSKMT-Puffer gewaschen und weiter mit je 12 µg His₆-Xpo1 bzw. His₆-Nup2 für 1 h unter Rollen bei 4°C inkubiert. Danach wurde erneut gewaschen, die gebundenen Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert.

A= Auftrag

Sowohl Xpo1 als auch Nup2, welche im SDS-Gel ein gleiches Migrationsverhalten aufweisen, zeigten schwache Interaktionen mit Gsp1 alleine. Diese Interaktionen beruhen auf dem Vorhandensein von unterschiedlichen Gsp1-Bindungsdomänen in beiden Proteinen. Bei gleichzeitiger Zugabe von Xpo1 und Nup2 zu Gsp1 zeigte sich ein deutlicher additiver Effekt (Abbildung 18). Dies ist offensichtlich auf die Ausbildung eines Xpo1/Gsp1-GTP/Nup2 Komplexes zurückzuführen, was durch eine Immunblotanalyse bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Die durch das Split-Ubiquitin System gefundene *in vivo*-Interaktion zwischen Xpo1 und Nup2 wurde somit durch *in vitro*-Bindungsassays bestätigt.

1.2.2 *In vivo* Lokalisierung von Nup2 in *xpo1-1*-Mutanten

Aufgrund der zwischenzeitlichen Klassifizierung von Nup2 als ein mobiles Nukleoporin (Dilworth *et al.*, 2001, 2005) wurde untersucht, ob Nup2 in der exportdefizienten *xpo1-1*-Mutante eine veränderte Lokalisierung aufweist. Dazu wurde das Plasmid pRS306-*NUP2-GFP* in den Wildtypstamm und die *xpo1-1*-Mutante integriert und die Lokalisierung von Nup2 wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Nup2 zeigte sowohl im Wildtyp als auch in der *xpo1-1*-Mutante bei permissiver und restriktiver Temperatur die für Nukleoporine typische Ringfärbung, die den Kernporenkomplex anzeigt und ein schwaches nukleäres Signal (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle des exportdefizienten Phänotyps der *xpo1-1*-Mutante wurde die Lokalisierung des cytoplasmatischen Dissoziationsfaktors Yrb1, der über Xpo1 exportiert wird (Maurer *et al.*, 2001), überprüft. Es zeigte sich bereits bei permissiver Temperatur eine nukleäre Misslokalisierung von Yrb1 (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass sich eine Rolle von Xpo1 bei der Lokalisierung des Nukleoporins Nup2 unter diesen Versuchsbedingungen nicht zeigen lässt.

1.3 Screens mit dem Split-Ubiquitin System

Auf Basis des Split-Ubiquitin Systems wurde versucht neue Interaktionspartner für Xpo1, Cse1 und Srp1 zu finden. Zum einen wurden mit einer 2 μ -Genbank Überexpressionsscreens mit dem Interaktionspaar Nua-Srp1/Cse1-CubRUra3 durchgeführt mit dem Ziel, dass ein überexprimierter möglicher Interaktionspartner von Srp1 oder Cse1 diese Interaktion kompetiert und dadurch detektiert werden kann. Zum anderen wurden Nui-Genbanken verwendet, um ausgehend von einer CubRUra3-Fusion direkt nach neuen Interaktionspartnern zu suchen.

Beide Screenmethoden erwiesen sich jedoch als ungeeignet neue, transiente Interaktionen von Kerntransportfaktoren zu detektieren. Es war nicht möglich die Srp1/Cse1 Interaktion zu kompetieren, auch nicht durch Überexpression bereits bekannter Interaktionspartner. Auch Versuche mit anderen Interaktionspaaren führten zu den gleichen negativen Ergebnissen.

Es zeigte sich ebenfalls, dass die Nui-Fusionen der Nui-Genbank, die von der Firma GPC (München) bereitgestellt wurde, alleine Interaktionen hervorriefen. Es wurde versucht diese unspezifischen Wechselwirkungen durch stringendere Screenbedingungen zu vermeiden, was aber nicht zufriedenstellend gelang. Deshalb wurde für die Suche nach neuen Interaktionspartnern auf das etablierte Zwei-Hybrid System zurückgegriffen

2 Zwei-Hybrid Analysen

2.1 Ergebnisse des Zwei-Hybrid Screens

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, neue Interaktionspartner für die Importrezeptoren Kap114, Kap123, Nmd5 und Sxm1 zu finden. Diese wurden in den LexA-Vektor pEG202 kloniert und in den Hefestamm EGY48, der bereits das *lacZ*-Reporterplasmid enthielt, transformiert. Die Expression der LexA-Fusionsproteine wurde per Immunblot nachgewiesen und es zeigte sich eine unterschiedliche Expression der einzelnen Fusionen (Abbildung 19).

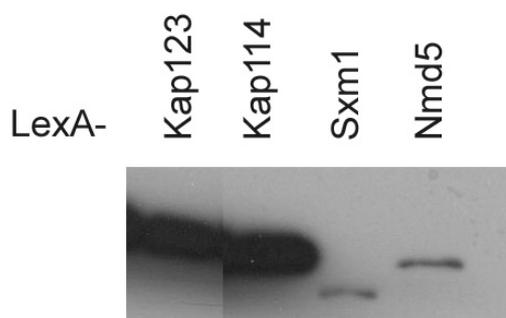


Abbildung 19: Immunologischer Nachweis der LexA-Fusionsproteine

Der Hefestamm EGY48 wurde mit pEG-*KAP123*, pEG-*KAP114*, pEG-*NMD5* und pEG-*SXM1* transformiert. Die Transformanten wurden kultiviert und Proben wurden entnommen. Die Fusionsproteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblotanalyse mit anti-LexA Primärantikörpern (1:1000) und anti-Maus spezifischen Sekundärantikörpern (1:1000) nachgewiesen.

Vor der Durchführung des Screens (vgl. Abbildung 14) wurde untersucht, ob es zu einer Autoaktivierung, d.h. zu einer Transkription der Reportergene allein durch die Expression der LexA-Fusionen kommt. Es wurden keine autoaktivierenden Reaktionen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Dann wurden die einzelnen Stämme mit einer pJG-DNA Genbank (Fusionen mit der sauren B42 Domäne aus *E. coli*) aus *S. cerevisiae* transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf Galaktose-haltigen -Leu-Selektivplatten ausplattiert, um die Expression der B42-Fusionsproteine zu induzieren. Nur wenn es zu einer Interaktion beider Fusionsproteine kommt, wird das *LEU2*-Reporter gen aktiviert und die Hefezellen sind in der Lage zu wachsen. Positive Kolonien wurden abermals über -Leu-Wachstumsassays und mit X-Gal-Plattenassays getestet. Als Kontrolle wurden jeweils Glukose-haltige Platten eingesetzt, auf denen sich keine Interaktionen zeigen sollten. Aus positiven Kolonien wurden die pJG4-5 Genbank-Plasmide isoliert und in *E. coli* amplifiziert. Nach Überprüfung der Insertgröße durch Restriktionsverdau wurden die Plasmide erneut in den Ausgangshefestamm transformiert (Retransformation) und auf -Leu- und X-Gal-Platten getestet (Abbildung 20).

Es wurden ca. 2×10^6 Kolonien benötigt, um das gesamte Hefegenom abzudecken, was bei allen 4 Screens erreicht wurde (Tabelle 13). Für Kap123 wurden 64 positive Kolonien auf -Leu-Platten selektiert, für Kap114 waren es 172, für Sxm1 90 Kolonien und für Nmd5 196 Kolonien. Nach einem weiteren Test durch Leucin-Wachstumsassays und X-Gal-Plattenassays zeigte sich in 11 Hefestämmen mit Kap123 eine Interaktion, in 13 mit Kap114, in 17 mit Sxm1 und in 110 mit Nmd5, von denen mit 20 Hefestämmen, mit denen die stärksten Interaktionen nachgewiesen wurden, weitergearbeitet wurde. Nach der Retransformation und abermaligem Test auf den Selektivplatten zeigten sich noch in zwei Hefestämmen mit Kap123 reproduzierbare Interaktionen, in 7 mit Kap114, in 8 mit Sxm1 und in 14 mit Nmd5.

Tabelle 13: Screenzusammenfassung

LexA-Fusion	Kolonien gesamt	Positive Kolonien	Positive Nach Test	Positive nach Retrofo	Nach Sequenzierung
Kap123	$1,6 \times 10^6$	64	11	2	-
Kap114	$3,3 \times 10^6$	172	13	7	7
Sxm1	$3,9 \times 10^6$	90	17	8	1
Nmd5	$4,7 \times 10^6$	196	110 / 20	14	1

Die pJG-DNA Genbank-Plasmide wurden sequenziert und eine Datenbankrecherche durchgeführt. Nach den Ergebnissen der Recherche wurde aufgrund der Lokalisierung oder bereits beschriebener Interaktionen mit am Kerntransport beteiligten Faktoren abgewogen, welche Interaktionen näher charakterisiert werden sollten. Daraufhin wurde mit sieben Interaktionspartnern von Kap114 und mit jeweils einem von Sxm1 und Nmd5 weitergearbeitet (Tabelle 13).

Tabelle 14: Ergebnisse der Sequenzierung und Literaturrecherche

AS = Aminosäuren; ges. = gesamt; Chr. = Chromosom; Lok. = Lokalisation; + = lebensfähig; - = letal; -/+ : je nach Stammhintergrund ; "bud neck" = Knospungszone; NPC = Kernporenkomplex; N = Nukleus; NO = Nukleolus; C = Cytoplasma ; (1) Ito *et al.*, 2001; (2) Gavin *et al.*, 2002; (3) Neville *et al.*, 1997; (4) Pemberton *et al.*, 1999; (5) Titov und Blobel, 1999; (6) Rosenblum *et al.*, 1997; (7) Albertini *et al.*, 1998; (8) Belanger *et al.*, 1994; (9) Krogan *et al.*, 2006, (10) Fischer *et al.*, 2002, (11) Zimmermann *et al.*, 2001

Transport-faktor	Protein (AS)	Chr.	Lok.	Funktion / Biologischer Prozess	beschriebene Interaktionen	knock out
Kap114	Set2 (579-733; ges. 733)	X	N	Histonmethylierung, Regulation der Transkription	Yra1 (9)	+
	Yra1 (133-226; ges. 226)	IV	N	mRNA-Export	Nap1 (2) Pse1 (2) Sda1 (9) Set2 (9) Nup1,2 (10)	-
	Hsl1 (499-781, ges. 1518)	XI	bud neck	Proteinkinase, Zellzyklusregulation		+
	Nis1 (81-110; ges. 407)	XIV	N/ bud neck	Unbekannt, Regulation der Mitose	Nap1 (1,2, 9) Nup116 (2)	+
	Yjl103c (20-393; ges. 618)	X	?	Unbekannt, putativer Transkriptionsregulator		+
	Arr1 (51-295; ges. 295)	XVI	N	RNA-Polymerase II Transkriptionsfaktor- aktivität		+
	Sda1 (467-767; ges. 767)	VII	N	Unbekannt, Zellzyklus Actincytoskelettbiogenese	Nap1 (2,11) Yra1 (9)	-
Nmd5	Nup1 (260-876; ges. 1076)	XV	NPC	nukleocytoplasmatischer Transport	Kap95, 104 (3), 114 (4), Pdr6 (5), Sxm1 (6), Nmd5 (7), Srp1 (8), Yra1 (10)	-/+
Sxm1	Mak21 (950-1026; ges. 1026)	IV	N/ NO	Zusammensetzung und Erhaltung der großen ribosomalen UE		-

Abbildung 20 zeigt die *in vivo*-Interaktionen nach der Retransformation von den näher zu charakterisierenden Interaktionspartnern der Importine Kap114, Sxm1 und Nmd5. Die Interaktionen von LexA-Kap114 mit den 7 gefundenen B42-Genbank-Fusionen waren sowohl auf den -Leu-Platten nach Galaktoseinduktion und bis auf Yjl103c auch auf den X-Gal-Platten detektierbar. Die unterschiedliche Stärke der Blaufärbung korrelierte dabei mit der Stärke der Interaktion. Die Interaktion zwischen LexA-Sxm1 und B42-Mak21 war nur auf X-Gal-Platten zu detektieren. Eine starke Interaktion zeigte sich zwischen LexA-Nmd5 und B42-Nup1 in beiden Assays. Alle pJG-Genbankplasmide wurden in einen Hefestamm mit einem pEG-Leerplasmid transformiert und mit den beschriebenen Assays getestet. Es zeigte sich keine Autoaktivierung (Daten nicht gezeigt).

Desweiteren wurden die B42-Fusionen, die mit LexA-Kap114 interagieren, in die beiden LexA-Sxm1- bzw. LexA-Nmd5-tragenden Hefestämme transformiert und auf Selektivplatten getestet, um die Spezifität der Interaktionen zu prüfen. Die für Kap114 gefundenen Interaktionspartner (Set2, Yra1, Hsl1, Nis1, Yjl103c, und Arr1) zeigten keine Interaktionen mit Sxm1 und Nmd5, so dass davon auszugehen ist, dass diese Interaktionen spezifisch für Kap114 sind (Daten nicht gezeigt).

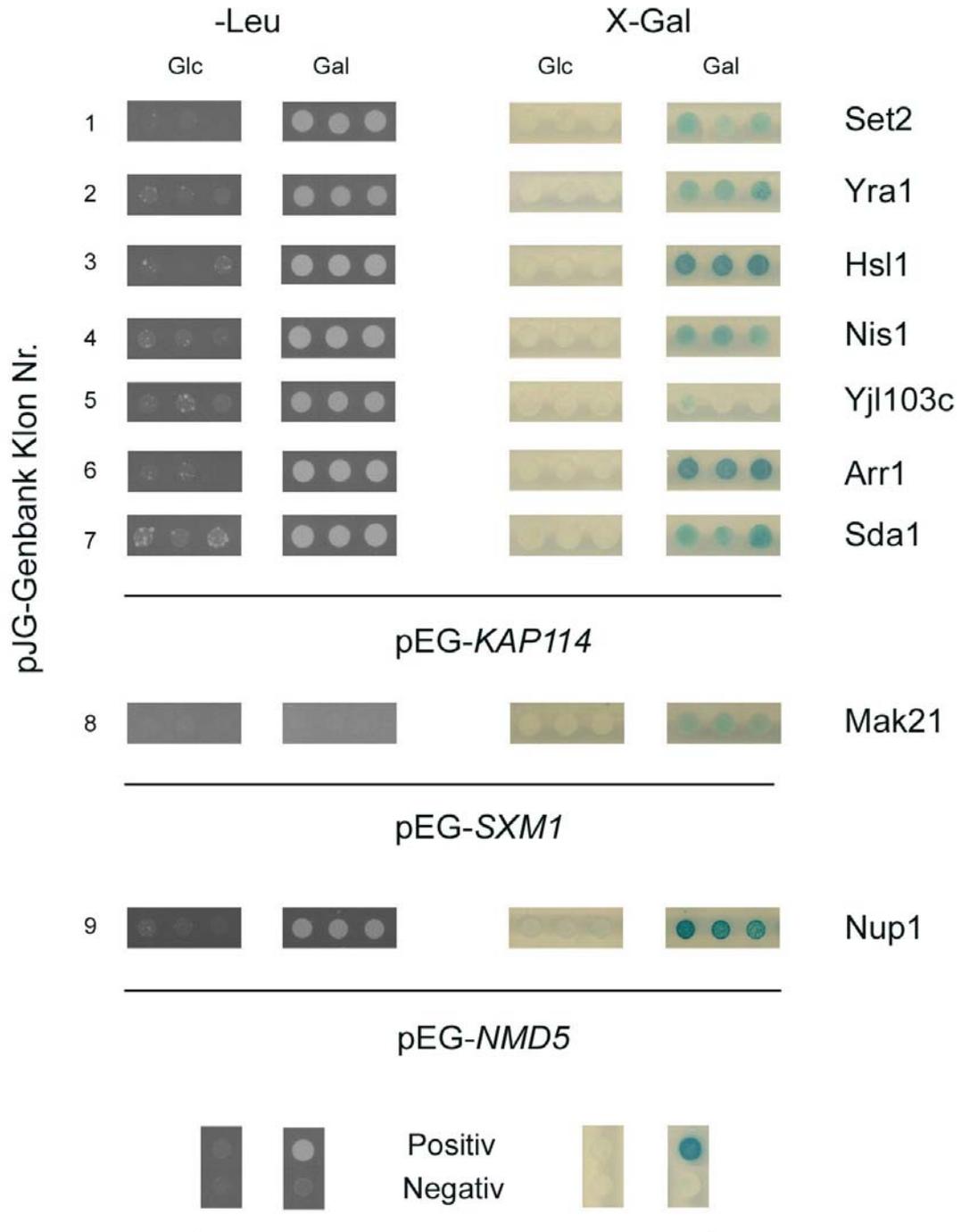


Abbildung 20: Test der Genbankklone auf Interaktion mit Kap114, Sxm1 und Nmd5

Die pJG-Genbank-Plasmide wurden aus positiven Hefestämmen, die das Plasmid pEG-KAP114, pEG-SXM1 bzw. pEG-NMD5 sowie ein Reporterplasmid mit dem β -Galaktosidase Reportergen enthielten, isoliert und in *E. coli* KC8 transformiert. Nach DNA-Minipräparation wurden die isolierten pJG-Plasmide in den gleichen Hefestamm retransformiert. Die Interaktionen der Fusionsproteine in den erhaltenen Hefestämmen wurden durch Leucin-Wachstumsassays und X-Gal-Plattenassays für jeweils drei Transformanten auf Glukose- und Galaktose-Platten untersucht.

2.2 Biochemische Charakterisierung der gefundenen Interaktionspartner

2.2.1 *In vitro*-Interaktionen mit Importinen

Zur weiteren Charakterisierung der gefundenen Interaktionspartner wurde untersucht, ob die Interaktionen auch *in vitro* nachweisbar sind. Dazu wurden die im Zwei-Hybrid System interagierenden Proteinbereiche in *E. coli* als GST-Fusionen synthetisiert. Nach Induktion und Zellyse wurden Gesamtzelllysate durch Zentrifugation gewonnen. Mit 100 oder 200 μ l Lysat wurden Bindungsversuche durchgeführt. Alle Proteine waren induzierbar und löslich und konnten aus den Lysaten ohne weitere Reinigung für Bindungsversuche verwendet werden (Abbildung 16).

Die Transportfaktoren Kap114, Sxm1 und Nmd5 wurden in *E. coli* als His₆-Fusionen synthetisiert und gereinigt. Für die Bindungsversuche wurden die GST-Fusionsproteine an GSH-Sepharose immobilisiert und mit ihren entsprechenden Interaktionspartnern als His₆-Fusion inkubiert. Nach dem Entfernen des ungebundenen Materials wurden die gebildeten Komplexe eluiert und durch SDS-PAGE analysiert. Abbildung 21 zeigt die *in vitro*-Interaktionen der GST-Fusionen mit Kap114, Nmd5 und Sxm1. Die stärksten Interaktionen von Kap114 ließen sich mit Hsl1 und Nis1 nachweisen, aber auch die Interaktionen von Yra1, Yjl103c, Set2 und Arr1 waren nach Coomassiefärbung nachweisbar. Auch die Interaktionen von Nup1 mit Nmd5 und Mak21 mit Sxm1 ließen sich biochemisch nachweisen, wenn auch sehr schwach. GST-Sda1 wurde in *S. cerevisiae* synthetisiert, da es sich für *E. coli* Zellen als toxisch erwies, und es zeigte sich im Bindungsversuch eine Interaktion mit Kap114 (siehe Abbildung 27).

Ein Kontrollbindungsversuch von GST alleine mit den His₆-Fusionen der einzelnen Transportfaktoren zeigte wie erwartet keine Bindungen.

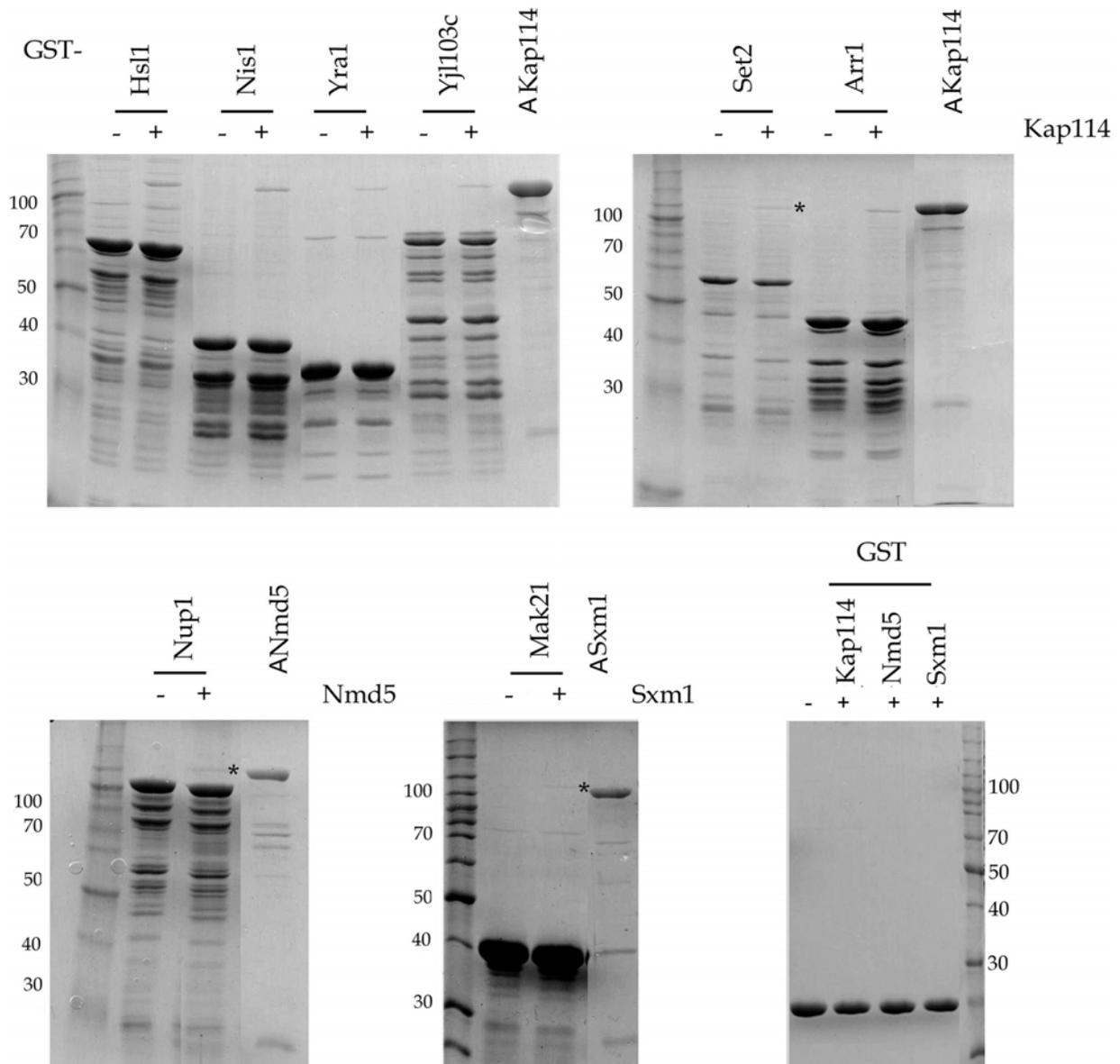


Abbildung 21: Hsl1, Nis1, Yra1, Yjl103c, Set2 und Arr1 binden *in vitro* an Kap114, Nup1 bindet an Nmd5 und Mak21 an Sxm1

Kap114, Nmd5 und Sxm1 wurden als His₆-Fusionen in *E. coli* synthetisiert und gereinigt. Die Zwei-Hybrid Fragmente von Hsl1, Nis1, Yra1, Yjl103c, Set2, Arr1 und Nup1 wurden als GST-Fusionen in *E. coli* BL21 synthetisiert. Aus den Zellen wurde ein Gesamtzelllysat hergestellt, aus dem die Fusionsproteine durch Inkubation für 1 h bei 4°C unter Rollen an GSH-Sepharose gebunden wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurden die Ansätze mit jeweils 12 µg His₆-Kap114 bzw. His₆-Nmd5 bzw. His₆-Sxm1 versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal gewaschen, die gebundenen Proteine mit SDS- Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Die Angaben der Proteinstandards sind in kDa.

A= Auftrag

2.2.2 Die Gsp1-Abhängigkeit der Interaktionen

Ein charakteristisches Merkmal der Importfaktoren der Importin β Familie ist die Bindung an Gsp1(Ran)-GTP. Während Exportfaktoren ihre Substrate im Kern nur bei gleichzeitiger Assoziation mit Gsp1-GTP binden können, werden bei Importfaktoren durch Bindung an Gsp1-GTP gebundene Substrate im Kern freigesetzt. Dieses unterschiedliche Bindungsverhalten der Import- und Exportfaktoren spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des nukleocytoplasmatischen Transports.

Da es sich bei den gefundenen Proteinen um potentielle Substrate von Importinen handelt und diese Importkomplexe im Kern durch Bindung von Gsp1-GTP dissoziiert werden müssten, wurde als nächstes untersucht, ob die Interaktionen eine Abhängigkeit von Gsp1-GTP zeigen. Mit Gsp1-GTP assoziierte Importine sollten nicht mehr oder nur vermindert in der Lage sein, ihre Substrate zu binden. Dazu wurden Bindungsversuche durchgeführt, bei denen Kap114, Sxm1 und Nmd5 zunächst mit Gsp1-GTP bzw. als Kontrolle mit Gsp1-GDP vorinkubiert und dann mit den immobilisierten GST-Fusionsproteinen inkubiert wurden. Die Importine wurden durch Immunblotanalyse nachgewiesen. Abbildung 22 zeigt die Gsp1-GTP-Abhängigkeit der Kap114-Interaktionen. Die Bindung von Kap114, das mit Gsp1-GTP vorinkubiert wurde, ist bei Hsl1, Nis1 und Yjl103c signifikant geringer als bei der Kontrolle, die mit Gsp1-GDP vorinkubiert wurde. Bei Yra1 und Arr1 wurden bei mit Gsp1-GTP vorinkubiertem Kap114 keine Interaktionen mehr nachgewiesen. Lediglich die Bindungen von Set2 und Sda1 an Kap114 zeigten keine Gsp1-GTP-Sensitivität. Auch die Nup1/Nmd5-Interaktion war Gsp1-GTP-abhängig, während die Sxm1/Mak21-Interaktion keine Abhängigkeit von Gsp1-GTP zeigte (Daten nicht gezeigt). Mit Ausnahme von Kap114/Set2, Kap114/Sda1 und Sxm1/Mak21 erfüllen alle durch den Zwei-Hybrid Screen gefundenen Interaktionen die Kriterien einer Importin/Importsubstrat-Interaktion, d.h. sie sind spezifisch und Gsp1-sensitiv.

Ergebnisse

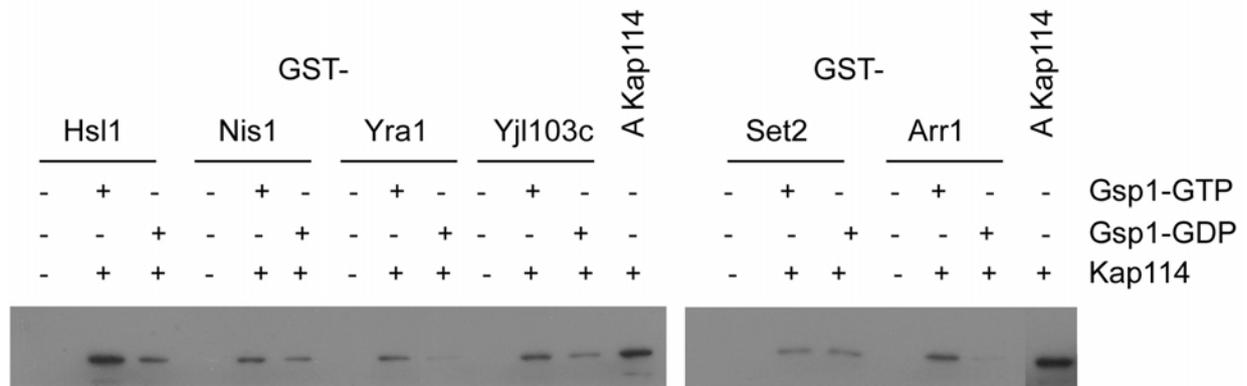


Abbildung 22: Die Bindungen von Hsl1, Nis1, Yra1, Yjl103c und Arr1 an Kap114 sind Gsp1-abhängig

Kap114 wurde als His6-Fusion in *E. coli* synthetisiert und anschließend gereinigt. Die Zwei-Hybrid Fragmente von Hsl1, Nis1, Yra1, Yjl103c, Set2 und Arr1 wurden als GST-Fusionen in *E. coli* BL21 synthetisiert. Aus den Zellen wurden Gesamtzelllysate hergestellt, aus denen die Fusionsproteine durch Inkubation für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT-Puffer wurde zu den Ansätzen jeweils 12 µg His6-Kap114, das mit 18 µg His6-Gsp1pQ71L-GTP bzw. His6-Gsp1pQ71L-GDP vorinkubiert wurde, gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal gewaschen, die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden sie auf eine PVDF Membran transferiert und über Immundetektion mit HRP-gekoppelten His6-spezifischen Antikörpern (1:1000) analysiert. A= Auftrag

Die bisherigen Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Zusammenfassung der *in vivo*- und *in vitro*-Interaktionen

Interaktionspartner	<i>in vivo</i> Zwei-Hybrid	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> Gsp1-GTP-abhängig
Von Kap114: Yra1, Hsl1, Nis1, Yjl103c, Arr1	+	+	+
Set2	+	+	-
Sda1	+	+	-
Von Nmd5: Nup1	+	+	+
Von Sxm1: Mak21	+	+	-

2.3 Lokalisierung der gefundenen Interaktionspartner in Hefezellen

Die gefundenen Interaktionspartner wurden *in vivo* analysiert, indem ihre Lokalisierung im Wildtyp und in Deletionsmutanten der einzelnen Transportfaktoren getestet wurde. Wenn es sich um Transportsubstrate handelt, sollten die im Zwei-Hybrid Screen identifizierten Proteine in Wildtypzellen größtenteils nukleär lokalisiert sein, was für Set2, Yra1, Nis1, Arr1, Sda1 und Mak21 bereits gezeigt wurde (Tabelle 14). Eine Akkumulation der GFP-Fusionsproteine im Cytoplasma von Deletionsmutanten zeigt dann eine Abhängigkeit für den Kernimport von den entsprechenden Importinen. Es wurde zunächst untersucht, ob die potentiellen Imports substrate, die mit Kap114 gefunden wurden, eine Misslokalisierung in der Mutante $\Delta kap114$ zeigen. Das mit Sxm1 gefundene Mak21 wurde im Deletionsstamm $\Delta sxm1$ lokalisiert. Da sowohl Yra1 als auch Sda1 und Mak21 für die Zelle lebenswichtige Proteine sind, aber weder Kap114 noch Sxm1 essentielle Importine darstellen, ist anzunehmen, dass es noch andere Importwege für diese Proteine geben muss. Pse1 ist ein essentieller Importfaktor und da einige Substrate *in vitro* eine Interaktion mit Pse1 zeigten (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28), wurde ebenfalls die $pse1-1/\Delta kap114$ Doppelmutante untersucht.

Set2, Yra1, Hsl1, Nis1, Yjl103c, Arr1, Sda1 und Mak21 wurden als C-terminale GFP-Fusionsproteine mittels der PCR-basierten Methode nach Longtine *et al.* (1998) sowohl in Wildtypzellen als auch in verschiedene Deletionsmutanten integriert. Die Selektion war über den eingebrachten Marker möglich. Zudem wurde jede Integration mittels Immunblot mit GFP-Antikörper und mittels einer Test-PCR, die die Integration in den korrekten Locus anzeigt, überprüft (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 23 zeigt den immunologischen Nachweis einiger GFP-Fusionsproteine. Alle Proteine wanderten im SDS-Gel entsprechend ihrer berechneten molekularen Masse.

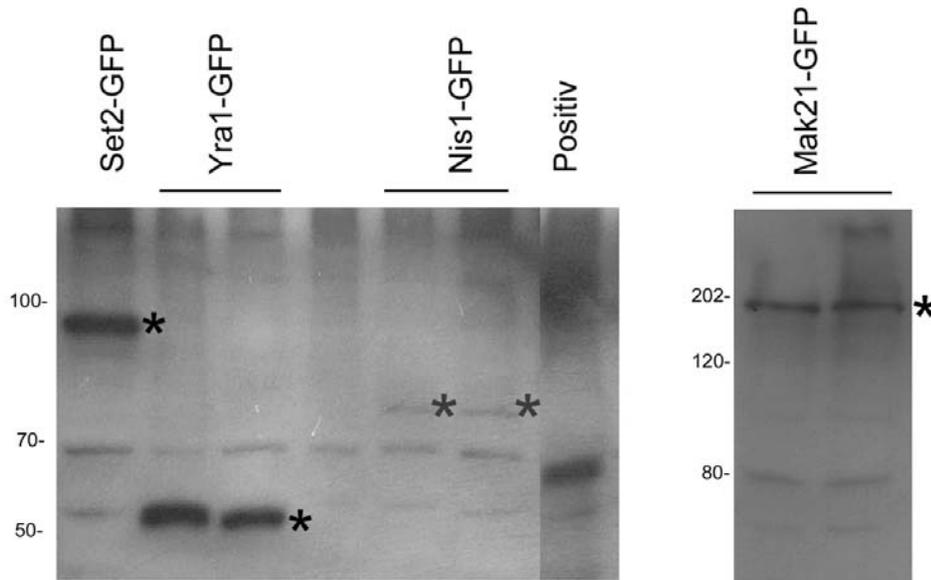
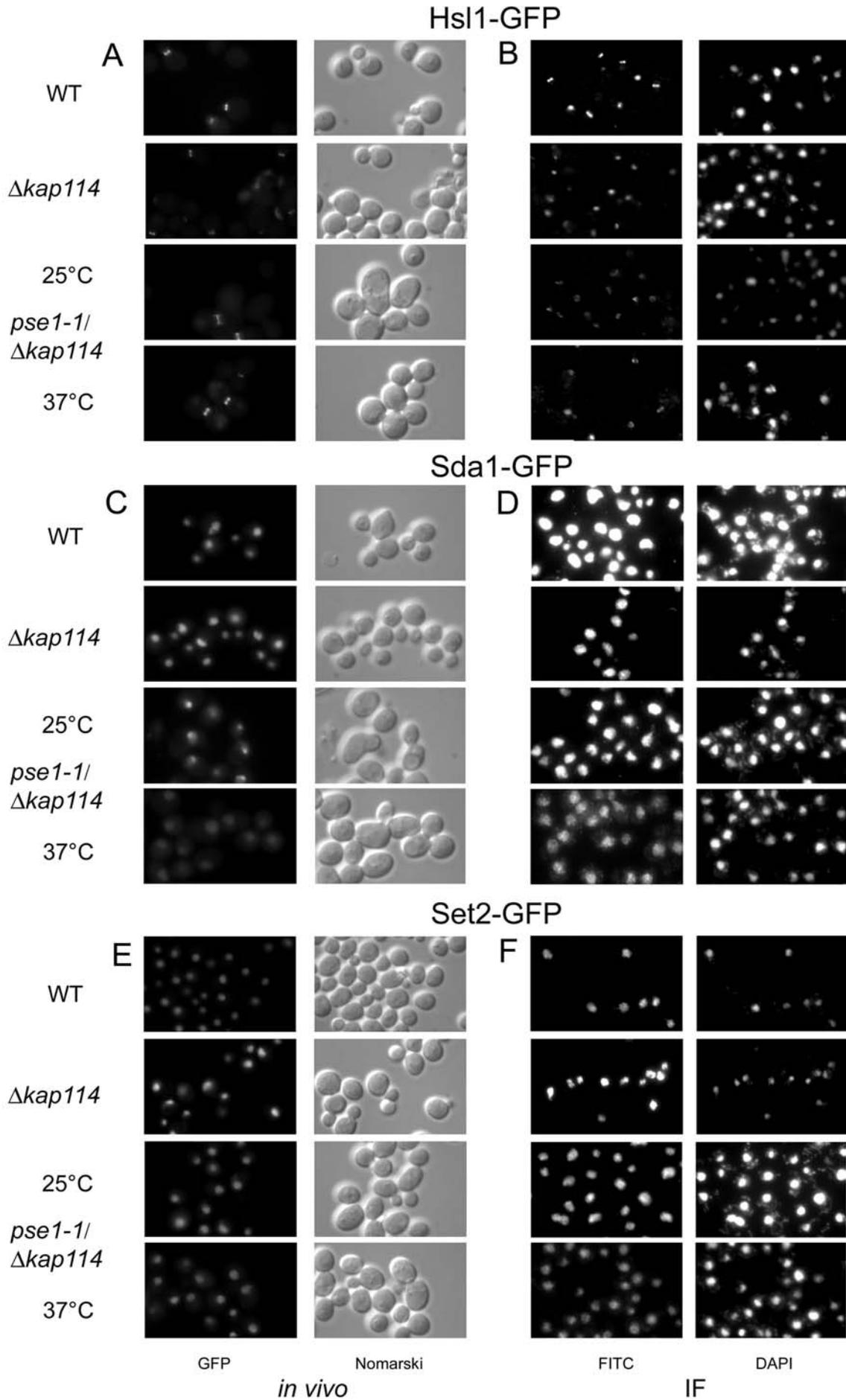


Abbildung 23: Immunologischer Nachweis von chromosomal kodierten GFP-Fusionsproteinen

GFP wurde mittels der Longtine-Methodik als C-terminale Fusion von Set2, Yra1, Nis1 und Mak21 in Wildtypzellen integriert. Die Transformanden wurden in Selektivmedium kultiviert und Proben wurden entnommen. Die Fusionsproteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblotanalyse mit anti-GFP Primärantikörpern (1:1000) und Kaninchen-IgG-spezifischen Sekundärantikörpern (1:1000) nachgewiesen. Positive Banden sind mit einem * markiert.

Für die Lokalisierung der einzelnen GFP-Fusionsproteine wurden die Stämme bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurden die temperatursensitiven Mutanten *pse1-1/Δkap114* zur funktionalen Inaktivierung für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde dann mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* analysiert, während der andere Teil für die indirekte Immunfluoreszenz mit Formaldehyd fixiert und mit affinitätsgereinigten, polyklonalen, gegen GFP gerichteten Antikörpern analysiert wurde. In Abbildung 24 und Abbildung 25 sind die Ergebnisse der *in vivo*-Fluoreszenz und der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt.



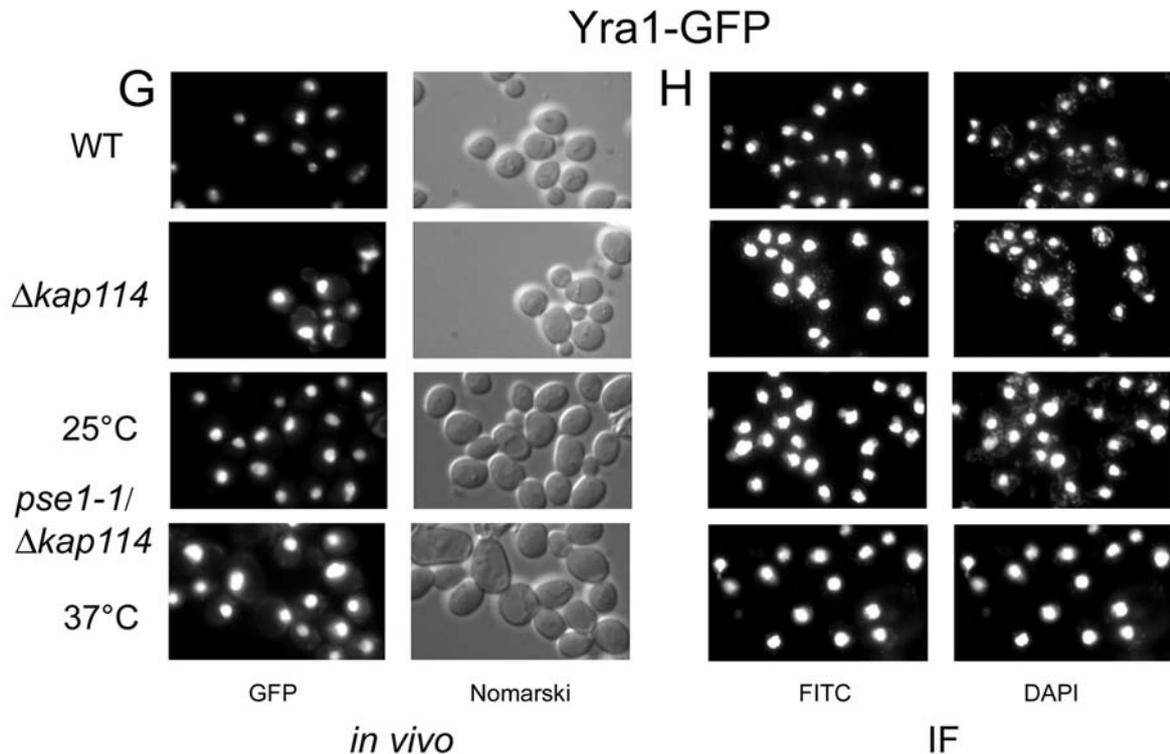


Abbildung 24: Die Lokalisierung von Hsl1, Set2, Sda1 und Yra1 im Wildtyp und in verschiedenen Transportmutanten

GFP wurde als Fusion der angegebenen Gene in den Wildtyp (WT) und in die Mutanten $\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap114$ integriert. Die Zellen wurden bei 25°C in Selektivmedium kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Hälfte der Kultur der temperatursensitiven Mutante $pse1-1/\Delta kap114$ für 1,5 h bei 37°C kultiviert.

(A, C, E und G) Die Lokalisierung der Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Hefezellen wurden über die Nomarski-Optik dargestellt.

(B, D, F und H) Die Zellen wurden für die indirekte Immunfluoreszenz mit Formaldehyd fixiert und nach Zymolyaseverdau wurden die GFP-Fusionsproteine dann durch Inkubation mit GFP-spezifischen Antikörpern (1:1000) und FITC-gekoppelten Kaninchen-IgG (1:1000) lokalisiert. Die DNA der Zellen wurde mit DAPI angefärbt.

Hsl1 wurde im Zwei-Hybrid Screen mit Kap114 gefunden und zeigte im Bindungsversuch eine Gsp1-GTP-abhängige Bindung an Kap114. Hsl1 ist in der Sprossungszone ("bud neck") einer sich teilenden Hefezelle lokalisiert. Dies konnte sowohl *in vivo* als auch mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden. Hsl1 war nur in Zellen nachweisbar, die sich in Teilung befanden. Hsl1 ist ein niedrig exprimiertes Protein, das während der Mitose am Septin-Baugerüst rekrutiert und aktiviert wird (Longtine *et al.*, 2000) und anscheinend nur dann nachweisbar ist, wenn es sich am "bud neck" konzentriert. Die Hsl1-Konzentration schwankt zellzyklusabhängig, Hsl1 wird in der späten M-Phase bis G1 vom APC („Anaphase

Promoting Complex“) abgebaut und ist in der S-, G2- und frühen M-Phase vorhanden, wenn die APC Aktivität gering ist (Burton und Solomon, 2000).

Es wurde keine Misslokalisierung bezüglich der "bud necks" in der *Δkap114*-Mutante festgestellt. In der *pse1-1/Δkap114* Doppelmutante lokalisierte Hsl1 in der Mehrzahl der Zellen ebenfalls am "bud neck", einige Zellen zeigten jedoch *in vivo* eine punktförmige Hsl1-Lokalisierung an der Plasmamembran (Daten nicht gezeigt). Diese Lokalisierung ließ sich mittels Immunfluoreszenz nicht detektieren, was evtl. mit der Fixierung der Zellen zusammenhängen könnte (Abbildung 24 A, B).

Sda1 wurde ebenfalls in dem Screen als Bindungspartner von Kap114 identifiziert und zeigte im Bindungsversuch eine Gsp1-GTP-unabhängige Bindung an Kap114. Sda1 ist im Nukleus lokalisiert, was sowohl *in vivo* als auch mittels Immunfluoreszenz nachweisbar war. Es zeigte sich keine Misslokalisierung im *Δkap114*-Deletionsstamm. In der *pse1-1/Δkap114*-Doppelmutante war nach Ausprägung des Phänotyps *in vivo* nur noch ein schwaches Kernsignal nachzuweisen und in der Immunfluoreszenz zeigte sich ein sehr schwaches cytoplasmatisches Signal, was darauf hindeutet, dass Sda1 in dieser Mutante zu einem geringen Teil misslokalisiert vorliegt (Abbildung 24 C, D).

Auch Set2 wurde mit Kap114 gefunden und zeigte im Bindungsversuch eine Gsp1-GTP-unabhängige Bindung an Kap114. Set2 ist nukleär lokalisiert, was sowohl *in vivo* als auch mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte. Es war keine Misslokalisierung in den beiden Mutanten *Δkap114* und *pse1-1/Δkap114* nachzuweisen (Abbildung 24 E, F).

Yra1 wurde ebenso als potentielles Substrat von Kap114 gefunden und zeigte eine substratspezifische Gsp1-GTP-abhängige Bindung an Kap114 im Bindungsversuch. Yra1, das in den mRNA-Export involviert ist, wurde wie erwartet im Nukleus nachgewiesen. Diese nukleäre Lokalisierung zeigte sich in der Immunfluoreszenz auch in den Mutanten *Δkap114* und *pse1-1/Δkap11*. *In vivo* war Yra1 in dem Stamm *Δkap114* nukleär lokalisiert, zeigte allerdings in der Doppelmutante *pse1-1/Δkap114* bei 37°C eine sehr leichte cytoplasmatische Lokalisierung, wobei Yra1 zum größten Teil weiterhin im Nukleus verblieb (Abbildung 24 G, H). Dies deutet darauf hin, dass Pse1 und Kap114 eine Rolle als Importin für Yra1 spielen, dass es aber zumindest noch einen alternativen Transportweg geben muss. Es könnte mit der Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenz zusammenhängen, dass die geringfügige Misslokalisierung mit dieser Methode nicht nachzuweisen war.

Mak21 wurde im Zwei-Hybrid Screen als Interaktionspartner von Sxm1 identifiziert und zeigte im Bindungsversuch eine Gsp1-GTP-unabhängige Bindung an Sxm1. Mak21 wurde im Nucleolus lokalisiert. Dies ist in Abbildung 25C gezeigt, in der eine Doppelfärbung mit dem

nukleolären Markerprotein Nop1 dargestellt ist. Die GFP- und die Nop1-Signale sind deckungsgleich, während DAPI den Zellkern ohne Nukleolus anfärbt. Mak21 wurde im Stamm $\Delta sxm1$ lokalisiert und zudem in den Mutanten $\Delta sxm1/\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap114$, da Mak21 *in vitro* eine Bindung an Kap114 und an Pse1 zeigte (siehe Abbildung 27). In der $\Delta sxm1$ -Mutante wurde *in vivo* eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Nukleus nachgewiesen, was aber mittels Immunfluoreszenz nicht nachvollzogen werden konnte. In keiner der untersuchten Deletionsmutanten konnte eine cytoplasmatische Misslokalisierung und somit ein Importdefekt von Mak21 detektiert werden (Abbildung 25A, B).

Die Fusionsproteine von Nis1, Arr1 und Yjl103c mit GFP waren weder *in vivo* noch mittels Immunfluoreszenz detektierbar (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise waren die GFP-Fusionsproteine nicht funktional und wurden degradiert oder im Fall von Nis1 war das Expressionsniveau zu gering (Abbildung 23). Somit war eine Lokalisierung dieser Proteine nicht möglich.

Keines der im Zwei-Hybrid Screen gefundenen potentiellen Substrate, die mittels GFP-Fusionen lokalisiert wurden, zeigte eine klare Misslokalisierung in den Transportmutanten.

Da Hsl1 ein Protein ist, das während des Zellzyklus unterschiedlich lokalisiert und nur in der Teilungsphase der Zellen nachweisbar ist, war es schwierig eine etwaige Misslokalisierung darzustellen. Es ist bisher nicht bekannt, ob Hsl1 im Laufe des Zellzyklus auch in den Kern importiert wird, was bei am Zellzyklus beteiligten Proteinen keine Seltenheit ist.

Sda1, Yra1 und Mak21 sind essentielle Proteine. Daher ist es für die Zelle lebenswichtig diese Proteine an ihrem Funktionsort sicherzustellen. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass es mehrere Transportwege für diese Proteine gibt, was bei essentiellen Proteinen schon oft beobachtet wurde (Mosammaparast *et al.*, 2000b; Greiner *et al.*, 2004 und Caesar *et al.*, 2006). Da Doppelmutanten mit $pse1-1$ keine Misslokalisierung zeigten, scheint es noch parallele Transportwege zu geben und es müssten weitere Mehrfachmutanten analysiert werden, um eine Misslokalisierung zu detektieren. Um zunächst zu testen, welche Transportfaktoren noch eine Rolle beim Import der untersuchten Proteine spielen könnten, wurden weitere Zwei-Hybrid Assays mit den im Screen gefundenen Proteinfragmenten und den Transportfaktoren durchgeführt.

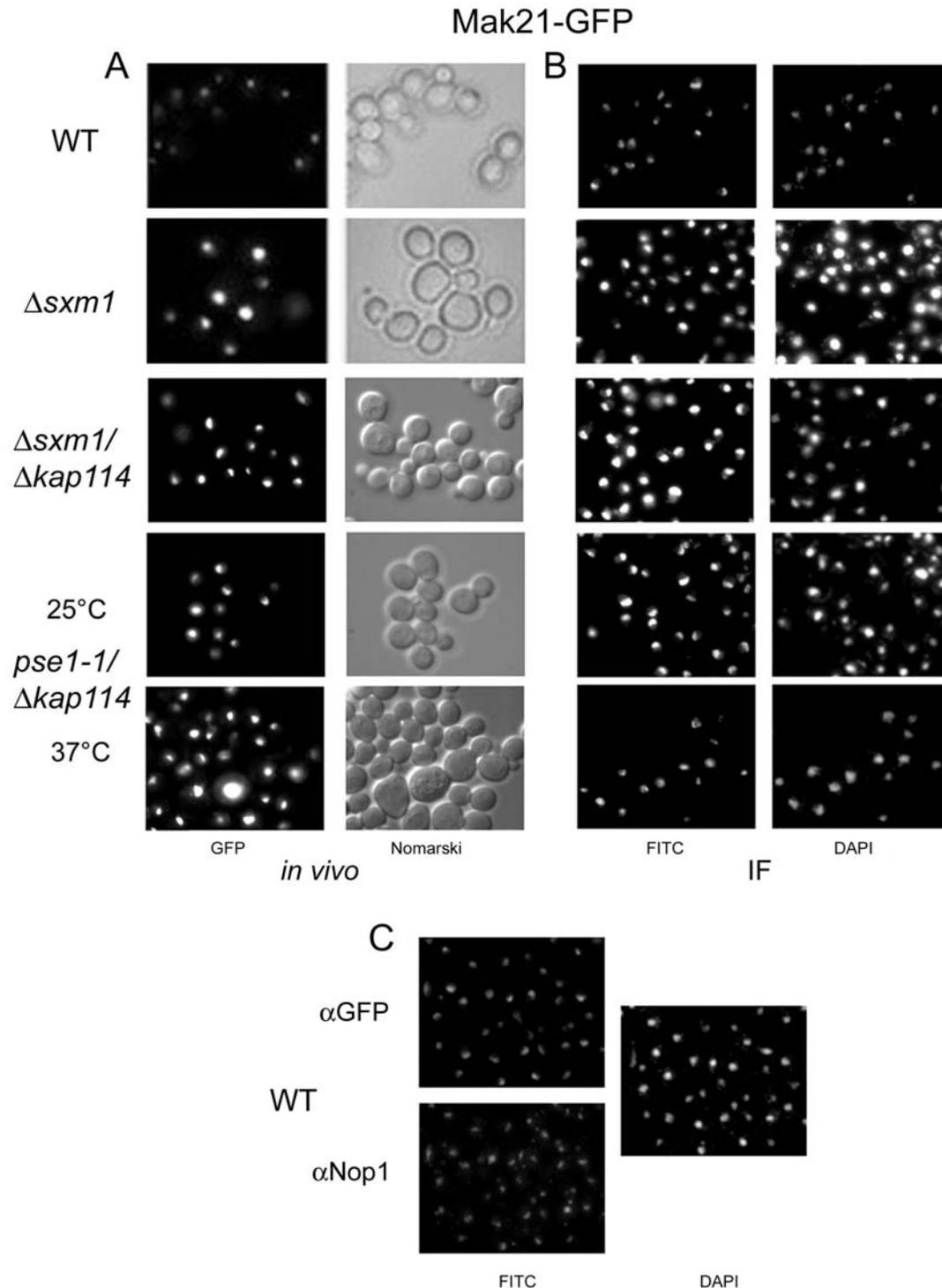


Abbildung 25: Lokalisierung von Mak21-GFP

GFP wurde mittels der Longtine-Methodik als Fusion von Mak21 in den Wildtyp (WT) und in die Mutanten $\Delta sxm1$, $pse1-1/\Delta kap114$ integriert. Die Zellen wurden bei 25°C in Selektivmedium kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die temperatursensitiven Mutante $pse1-1/\Delta kap114$ für 1,5 Stunden jeweils bei 25°C und 37°C kultiviert. (A) Es wurden Proben entnommen und Mak21-GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Hefezellen wurden über die Nomarski-Optik dargestellt. (B, C) Die Zellen wurden für die indirekte Immunfluoreszenz mit Formaldehyd fixiert und nach einem Zymolyaseverdau wurden die GFP-Fusionsproteine durch Inkubation mit GFP-spezifischen Antikörpern (1:1000) und FITC-gekoppelten Kaninchen-IgG (1:1000) lokalisiert. Die DNA der Zellen wurde mit DAPI angefärbt. (C) Zur Lokalisierung des Nukleolus wurde zusätzlich das nukleoläre Protein Nop1 durch gleichzeitige Inkubation mit Nop1-spezifischen Antikörpern (1:1000) und Texas Red-gekoppelten Anti-Maus IgG (1:1000) nachgewiesen.

2.4 *In vivo*-Interaktionen mit verschiedenen Transportfaktoren

Die im Zwei-Hybrid Screen gefundenen B42-Fusionen, Fragmente von Yra1, Set2, Sda1 und Hsl1 und die B42-Fusion des volle Länge Proteins Hsl1 (Hsl1vL), wurden in weiteren Zwei-Hybrid Assays gegen die LexA-Fusionen aller bekannten Importin- β homologen Transportfaktoren auf Interaktionen getestet. Diese *in vivo*-Untersuchungen sind in Abbildung 26 dargestellt.

Eine Interaktion stellt sich nach Galaktoseinduktion der B42-Fusionen als Wachstum auf den -Leu-Gal Platten und als Blaufärbung auf den X-Gal/Gal Platten dar. Als Negativkontrolle wurde der LexA-Leervektor gegen die jeweiligen B42-Fusionen getestet. Als Positivkontrolle diente das Interaktionspaar B42-Rpf1/LexA-Kap120, von dem eine Zwei-Hybrid Interaktion bekannt ist (Caesar *et al.*, 2006). Um den Hintergrund der unspezifischen Wechselwirkungen zu bestimmen, wurden alle LexA-Fusionen der Transportfaktoren gegen den B42-Leervektor getestet (Abbildung 26 H). Es zeigten sich keine Wechselwirkungen auf den X-Gal/Gal Platten. Auf den X-Gal/Glc Platten zeigte Xpo1 blaue Kolonienfärbung (sowohl beim Leervektor als auch mit allen anderen B42-Fusionen), was darauf hinweist, dass diese Fusion unspezifisch reagiert. Auf den -Leu-Gal und -Leu-Glc Platten war als unspezifische Wechselwirkung eindeutiges Wachstum bei Msn5 und Kap104 zu detektieren.

Als Kontrolle zur Funktionalität der Transportfaktoren wurde zusätzlich ein Zwei-Hybrid Assay mit B42-Gsp1 durchgeführt, da Gsp1 in der Lage ist an alle Transportfaktoren zu binden. Die Überexpression von Gsp1 durch den *GALI*-Promotor war für die Zellen toxisch. Die Expression der B42-Gsp1 Fusion wurde durch Zugabe von Glukose zu den Gal-Platten erniedrigt, wodurch alle Interaktionen mit den Transportfaktoren nachweisbar waren (Abbildung 26 G).

Yra1 wurde im Screen mit Kap114 gefunden und zeigte auch hier eine starke Interaktion mit Kap114 und zudem eine sehr schwache mit Pse1 (schwache Blaufärbung auf den X-Gal/Gal Platten)(Abbildung 26 A). Set2 und Sda1, die ebenfalls mit Kap114 gefunden wurden, zeigten eine deutliche Interaktion mit Kap114 sowohl im Leu-Wachstumsassay als auch im X-Gal Test. Eine Interaktion mit Pse1 war nur auf den Leu-Gal Platten zu detektieren (Abbildung 26 B, F).

Mak21, das als Bindungspartner von Sxm1 identifiziert wurde, interagiert mit fast allen untersuchten Importfaktoren; Kap95, Pse1, Kap104, Kap123, Pdr6, Mtr10, Sxm1, Msn5, Nmd5 und auch mit Srp1 (Abbildung 26 C). Daraus ist zu schließen, dass es sich hier um unspezifische Interaktionen handelt. Mak21 ist ein großes Protein (117 kDa) und es wurde nur

ein Bruchteil (11 kDa) im Zwei-Hybrid Screen identifiziert. Es könnte sein, dass es sich hier um eine sehr bindungsaktive Sequenz handelt, die aber im komplett gefalteten Protein nicht zugänglich ist.

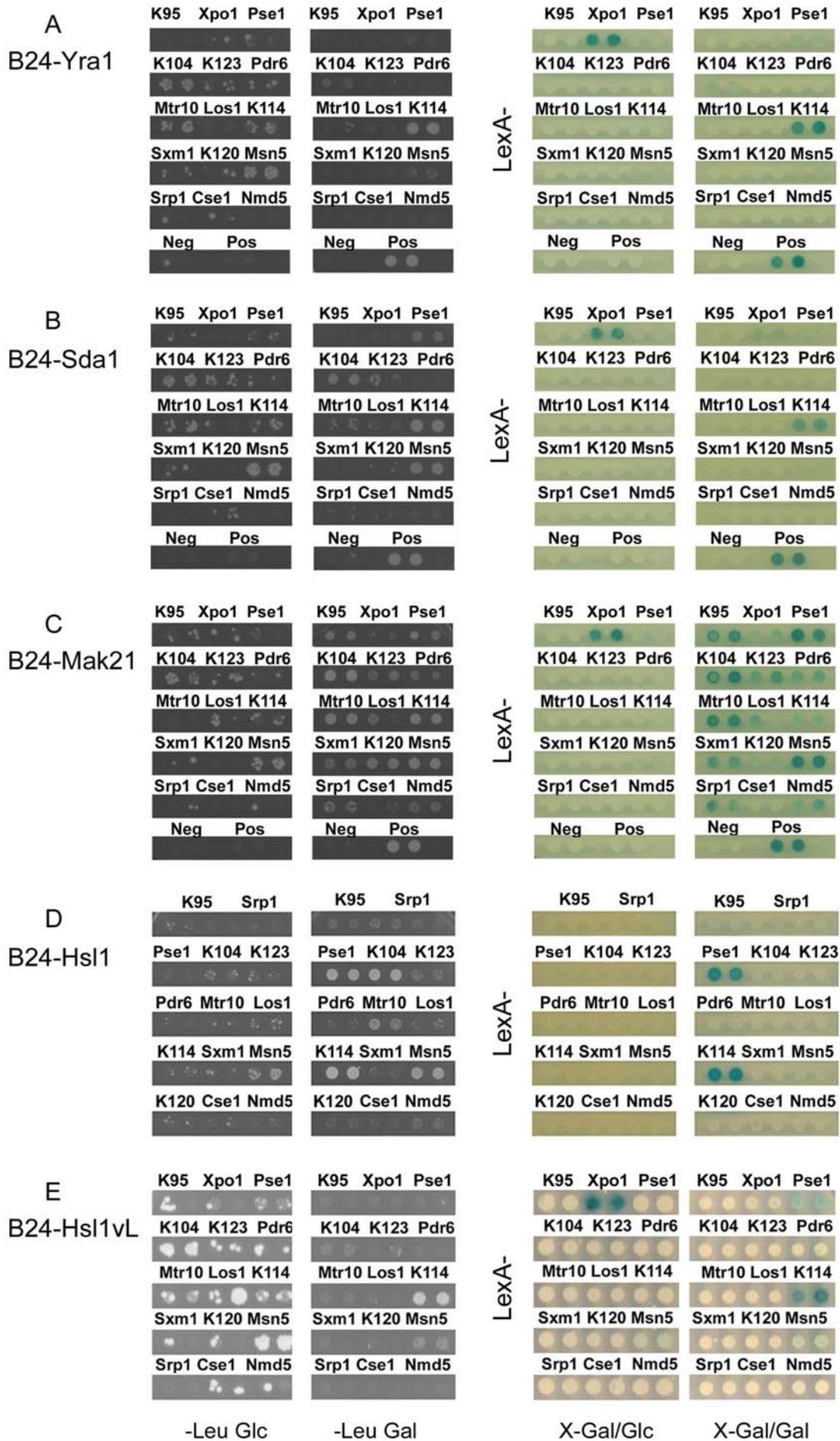
Hsl1 wurde im Screen als Interaktionspartner von Kap114 ermittelt und in beiden Assays war eine sehr starke Interaktion mit Kap114 und mit Pse1 nachweisbar. Im Leu-Wachstumsassay ließ sich zudem eine Interaktion von Hsl1 mit den Importfaktoren Mtr10 und Kap104 nachweisen (Abbildung 26 D).

HSL1 und *YRA1* wurden als vollständiger ORF in den pJG-Vektor kloniert und die B42-Fusionen gegen die LexA-Fusionen der Transportfaktoren getestet. Die Überexpression von Yra1vL durch den *GALI*-Promotor war ebenso toxisch wie die von Gsp1, die Hefezellen wuchsen auf den Gal-Platten nicht mehr. Es wurde versucht, die Expression von Yra1vL durch Zugabe von Glukose zu den Gal-Platten zu erniedrigen, aber es war trotz mehrfacher Experimente nicht möglich, die Interaktionen auf den X-Gal/Gal Platten darzustellen. Lediglich über den Leu-Wachstumsassay waren Interaktionen mit Kap114 und etwas schwächer mit Pse1 für Yra1vL nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Hsl1vL zeigte die gleichen Interaktionen wie das Hsl1-Zwei-Hybrid-Fragment, auf den -Leu-Glc Platten war zwar unspezifisches Wachstum zu verzeichnen, aber auf den -Leu-Gal Platten zeigte sich als eindeutige Interaktion nur Kap114. Auf den X-Gal/Gal Platten war wiederum eine starke Interaktion mit Kap114 nachzuweisen und eine schwächere mit Pse1 (Abbildung 26 E). Hsl1 ist wie Mak21 ein sehr großes Protein (170 kDa) und es wurde im Screen ein Fragment aus dem mittleren Bereich gefunden, dessen Funktion bisher noch unbekannt ist. Daher war es wichtig nachzuweisen, dass die Bindungseigenschaften des Zwei-Hybrid-Fragmentes und die des gesamten Proteins deckungsgleich sind.

Die Zwei-Hybrid Assays demonstrierten, dass die Interaktionen von Yra1, Set2, Sda1 und Hsl1 mit Kap114 sehr spezifisch sind und dass Pse1 ebenfalls mit diesen vier Proteinen interagiert, was auf eine Rolle von Pse1 beim Import dieser Proteine hindeutet. Es ergaben sich allerdings keine Hinweise auf einen weiteren Transportfaktor, der am Import beteiligt sein könnte.

Ergebnisse



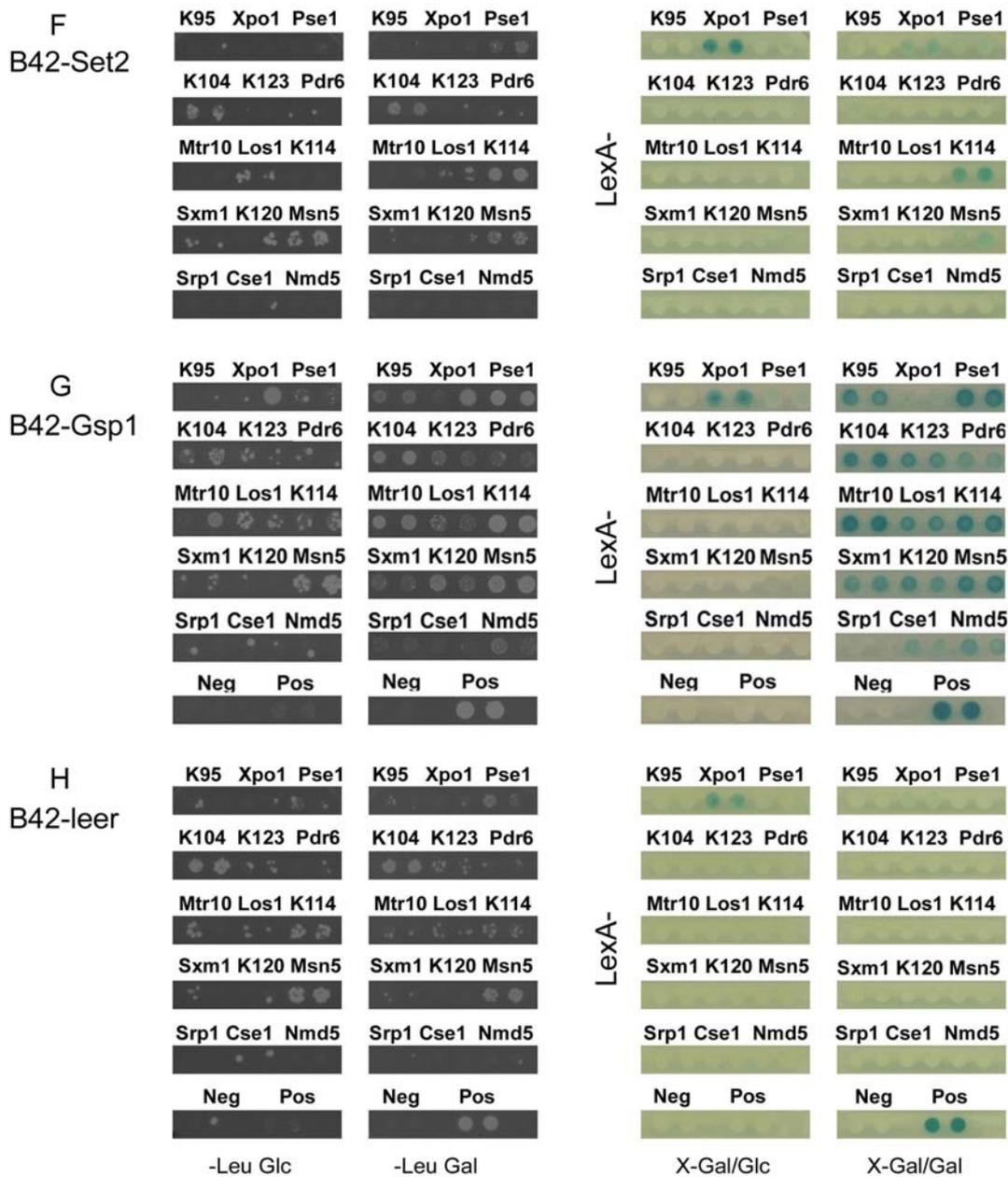


Abbildung 26: Zwei-Hybrid Assays von B42-Yra1, -Mak21, -Sda1, -Set2 und -Hsl1 gegen LexA-Fusionen mit Transportfaktoren

Die im Zwei-Hybrid Screen gefundenen B42-Fusionen von Yra1(A), Sda1(B), Mak21(C) Hsl1(D), Set2(F) und B42-Hsl1 volle Länge (E) wurden in den Stamm GSY170 MAT α transformiert und auf Selektivplatten ausgestrichen. Transportfaktoren wurden als LexA-Fusionen in einen MAT α Hefestamm transformiert, der die Zwei-Hybrid-Reportergene *LEU2* und *LacZ* trägt. Danach wurden die Zellen in Mikrotiterplatten verpaart, mit dem Replikator auf YPD-Platten gestempelt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zwecks Selektion auf Diploide auf Selektivplatten repliziert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils gleiche Zellmengen in Mikrotiterplatten übertragen und mit dem Replikator auf die jeweiligen Selektivplatten gestempelt. Dann wurde für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die B42-Fusionen stehen unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors und eine Interaktion zwischen den untersuchten Faktoren zeigt sich auf den -Leu-Gal-Platten durch Wachstum und auf den X-Gal/Gal-Platten durch Blaufärbung. Die Glukoseplatten dienten als Negativkontrolle. (H) Ebenfalls eine Negativkontrolle stellt der Assay mit dem B42-Leervektor dar (G) Als Positivkontrolle wurde ein Assay mit B42-Gsp1 durchgeführt. Die B42-Gsp1 Expression wurde durch Zugabe von 500 μ l Glucose erniedrigt.

neg = Negativkontrolle pEG-Leer gegen jeweilige pJG-Fusion

pos = Positivkontrolle B42-Rpf1/LexA-Kap120

K = Kap (Karyopherin)

2.5 *In vitro*-Interaktionen mit verschiedenen Transportfaktoren

Um Hinweise auf weitere mögliche Transportwege der identifizierten Substrate zu bekommen, wurden *in vitro*-Bindungsversuche mit verschiedenen Transportfaktoren durchgeführt. Dazu wurden die im Zwei-Hybrid Screen erhaltenen Proteinbereiche als GST-Fusion in den Vektor pGEX-4T kloniert und in *E. coli* synthetisiert. Das Zwei-Hybrid Fragment von *SDA1* war für die *E. coli* Zellen toxisch und wurde deshalb in *S. cerevisiae* synthetisiert. Die verwendeten Transportfaktoren wurden in *E. coli* als His₆-Fusionen synthetisiert und gereinigt. Für die Bindungsversuche wurden die GST-Fusionsproteine an GSH-Sepharose immobilisiert und mit ihren entsprechenden Interaktionspartnern als His₆-Fusion inkubiert. Nach dem Entfernen des ungebundenen Materials wurden die gebildeten Komplexe eluiert und durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung analysiert. Als Negativkontrolle wurde GST ohne Fusionsprotein eingesetzt und als Positivkontrolle GST-Gsp1. Abbildung 27 zeigt den Bindungsversuch von GST-Yra1, -Set2, -Mak21 und -Sda1 mit verschiedenen Transportfaktoren. Es wurden jeweils die Importfaktoren Kap114, Pse1, Nmd5, Kap95, Kap95/Srp1 (Abbildung 27), Kap104, Kap120, Kap123, Sxm1 und Srp1 sowie das Exportin Xpo1 (Daten nicht gezeigt) untersucht. Alle untersuchten GST-Fusionsproteine (mit Ausnahme der Negativkontrolle) zeigten wie erwartet eine Interaktion mit Kap114. Auch Mak21, das mit Sxm1 gefunden wurde, interagiert mit Kap114. Pse1 zeigte die erwartete Interaktion mit Gsp1 und zusätzlich eine sehr schwache Bindung an Set2, Mak21 und Sda1. Mit Yra1 konnte in diesem Experiment keine Bindung an Pse1 dargestellt werden, in anderen Experimenten zeigte sich eine schwache Bindung (siehe Abbildung 44). Mit Nmd5 wurde die erwartete Bindung mit Gsp1 und weiterhin eine schwache Bindung an Yra1, Set2 und Mak21 nachgewiesen. Das Importin Kap95 alleine zeigte eine starke Bindung an Gsp1 und sehr schwache Bindungen an Yra1 und Set2 (Abbildung 27). Mit dem Adapterprotein Srp1 wiederum wurde eine sehr starke Interaktion mit Mak21 detektiert (Daten nicht gezeigt). Wurde der Bindungsversuch mit Srp1 und Kap95 zusammen durchgeführt, war die Bindung von Mak21 an Srp1 gleich stark, jetzt interagiert aber auch Kap95 sehr stark über Srp1. Yra1, Set2 und auch Sda1 zeigten eine schwache Bindung allerdings nur an Kap95 und nicht an Srp1 (Abbildung 27). Für den Exportfaktor Xpo1 ließ sich lediglich eine sehr schwache Interaktion mit Gsp1 nachweisen. Kap123 interagiert mit der Positivkontrolle und insgesamt sehr schwach mit Yra1, Set2 und Mak21. Kap104 zeigte lediglich die erwartete Bindung an Gsp1 (Daten nicht gezeigt). Mit den beiden Transportfaktoren Sxm1 und Kap120 ließen sich in den durchgeführten Experimenten keine spezifischen Bindungen nachweisen (Daten nicht gezeigt).

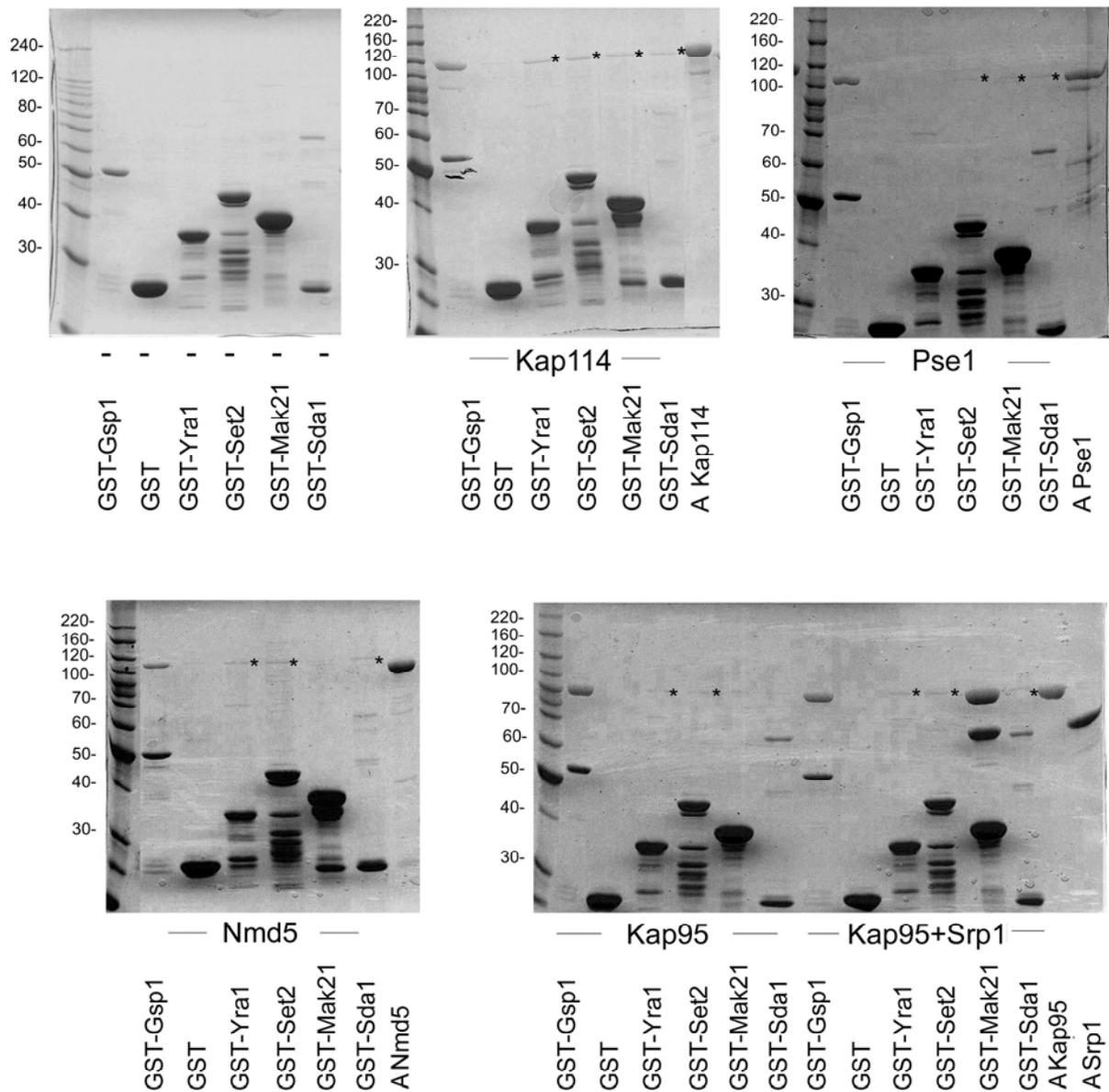


Abbildung 27: Bindungsversuche von GST-Yra1, -Set2, -Mak21 und -Sda1 mit verschiedenen Transportfaktoren

Kap114, Pse1, Nmd5, Kap95 und Srp1 wurden als His₆-Fusionen in *E. coli* synthetisiert und gereinigt. Die Zwei-Hybrid Fragmente von Yra1, Set2 und Mak21 wurden in *E. coli* BL21 als GST-Fusionen synthetisiert. Das Zwei-Hybrid Fragment von Sda1 wurde in *S. cerevisiae* synthetisiert. Aus den Zellen wurde ein Gesamtzelllysate hergestellt, aus dem die Fusionsproteine durch Inkubation für 1 h bei 4°C unter Rollen an GSH-Sepharose gebunden wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurden die Ansätze mit jeweils 12 µg der His₆-Fusionen der verschiedenen Transportfaktoren versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal gewaschen, die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wurde der Bindungsversuch mit in *E. coli* synthetisiertem und gereinigtem GST bzw. GST-Gsp1 durchgeführt. Die Angaben der Proteinstandards sind in kDa.

A= Auftrag

In Abbildung 28 ist der Bindungsversuch von GST-Hsl1 mit verschiedenen Transportfaktoren dargestellt. Hsl1 interagierte mit Kap95, Nmd5, Pse1, und Kap114. Mit Kap120, Kap104 und Kap123 ließen sich keine Interaktionen detektieren.

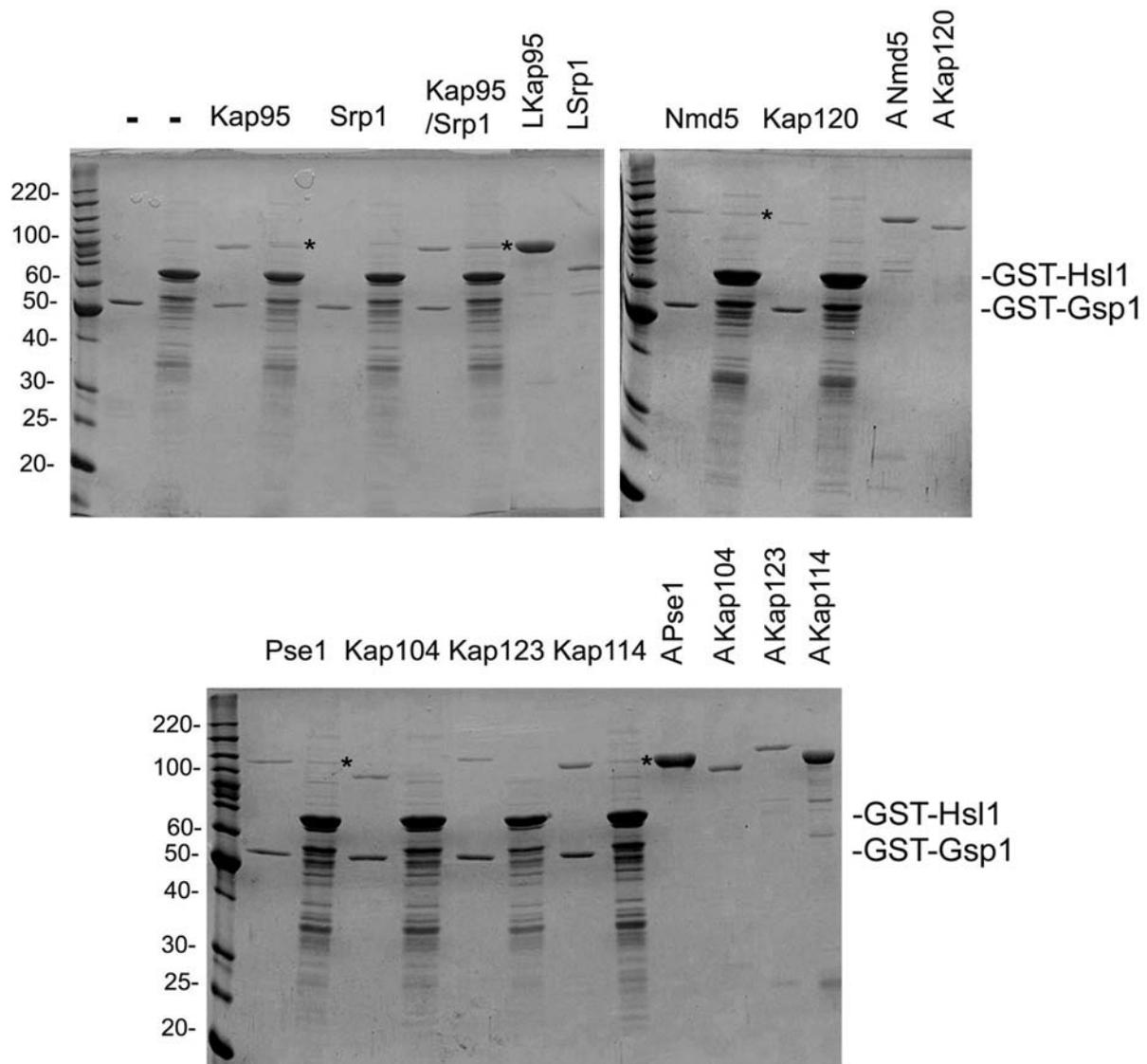


Abbildung 28: Hsl1 bindet an verschiedene Transportfaktoren

Die Transportfaktoren wurden als His₆-Fusion in *E. coli* synthetisiert und gereinigt. Das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 wurde in *E. coli* BL21 als GST-Fusion synthetisiert. Aus den Zellen wurde ein Gesamtzelllysate hergestellt, aus dem das Fusionsprotein durch Inkubation für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurden die Ansätze mit jeweils 12 µg der His₆-Fusionen der Transportfaktoren versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal gewaschen, die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Als Positivkontrolle wurde der Bindungsversuch mit in *E. coli* synthetisiertem und gereinigtem GST-Gsp1 durchgeführt. Die Angaben der Proteinstandards sind in kDa.

A= Auftrag

Tabelle 16 stellt einen Überblick über die erhaltenen Resultate dar.

Tabelle 16: Bindungsversuche der GST-Fusionen mit verschiedenen Transportfaktoren

++: starke Interaktion +: Interaktion (+): schwache Interaktion ((+)): sehr schwache Interaktion

	GST	GST-Gsp1	GST-Yra1	GST-Set2	GST-Mak21	GST-Sda1	GST-Hsl1
Kap114	-	++	+	+	+	+	+
Pse1	-	+	-	((+))	((+))	((+))	+
Nmd5	-	+	(+)	(+)	-	(+)	+
Kap95	-	++	(+)	(+)	-	-	(+)
Srp1	-	-	-	-	++	-	-
Kap95/Srp1	-	++	(+)	(+)	++	(+)	(+)
Xpo1	-	(+)	-	-	-	-	-
Kap123	-	++	((+))	((+))	((+))	-	-
Kap104	-	+	-	-	-	-	-
Kap120	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Sxm1	+	++	+	+	+	+	+

Abgesehen von Mak21 zeigte keines der untersuchten Fusionsproteine *in vitro* eine starke Bindung an einen Transportfaktor, die einen Hinweis auf weitere Importwege geben könnte. Die schwachen Bindungen der Importfaktoren deuten auf eine niedrige Affinität zu den Partnerproteinen hin. Die *in vitro*-Interaktionen sind jedoch signifikant und wenigstens für Yra1 und Hsl1 spezifisch, da eine Gsp1-Abhängigkeit besteht (siehe Tabelle 15).

Die Mak21/Srp1 Interaktion wurde näher untersucht, um herauszufinden, ob Mak21 evtl. über den klassischen NLS Importweg mit Srp1 und Kap95 in den Zellkern transportiert wird. Dazu wurde Mak21 mittels der Longtine-Methode als GFP-Fusion in die temperatursensitiven *srp1*-Mutanten *srp1-31*, *srp1-49* und *srp1-54* integriert. Diese *srp1*-Mutanten besitzen jeweils eine Punktmutation und bei restriktiver Temperatur ist die Funktion von Srp1 als Adapterprotein und somit der klassische NLS-Import gestört.

Mak21-GFP wurde dann mittels *in vivo*-Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert. Es zeigte sich bei keiner der untersuchten *srp1*-Mutanten eine cytoplasmatische Misslokalisierung. Während Mak21 im Wildtyp ausschließlich im Nukleolus lokalisiert war, zeigten die verschiedenen *srp1*-Mutanten eher eine nukleäre Akkumulation (Abbildung 29).

Da nur ein kleiner Bereich (11 kDa) von Mak21 im Zwei-Hybrid Screen identifiziert und untersucht wurde, handelt es sich hier anscheinend um eine NLS ähnliche Sequenz, die sehr stark an Srp1 bindet, jedoch im gefalteten Protein so möglicherweise nicht zugänglich ist.

Auch im Zwei-Hybrid Assay ließen sich Mak21-Interaktionen mit fast allen untersuchten Transportfaktoren nachweisen, so dass davon ausgegangen wurde, dass es sich hier um ein sehr bindungsaktives Fragment mit NLS-ähnlicher Sequenz handelt und die detektierten Interaktionen eher als unspezifisch anzusehen sind.

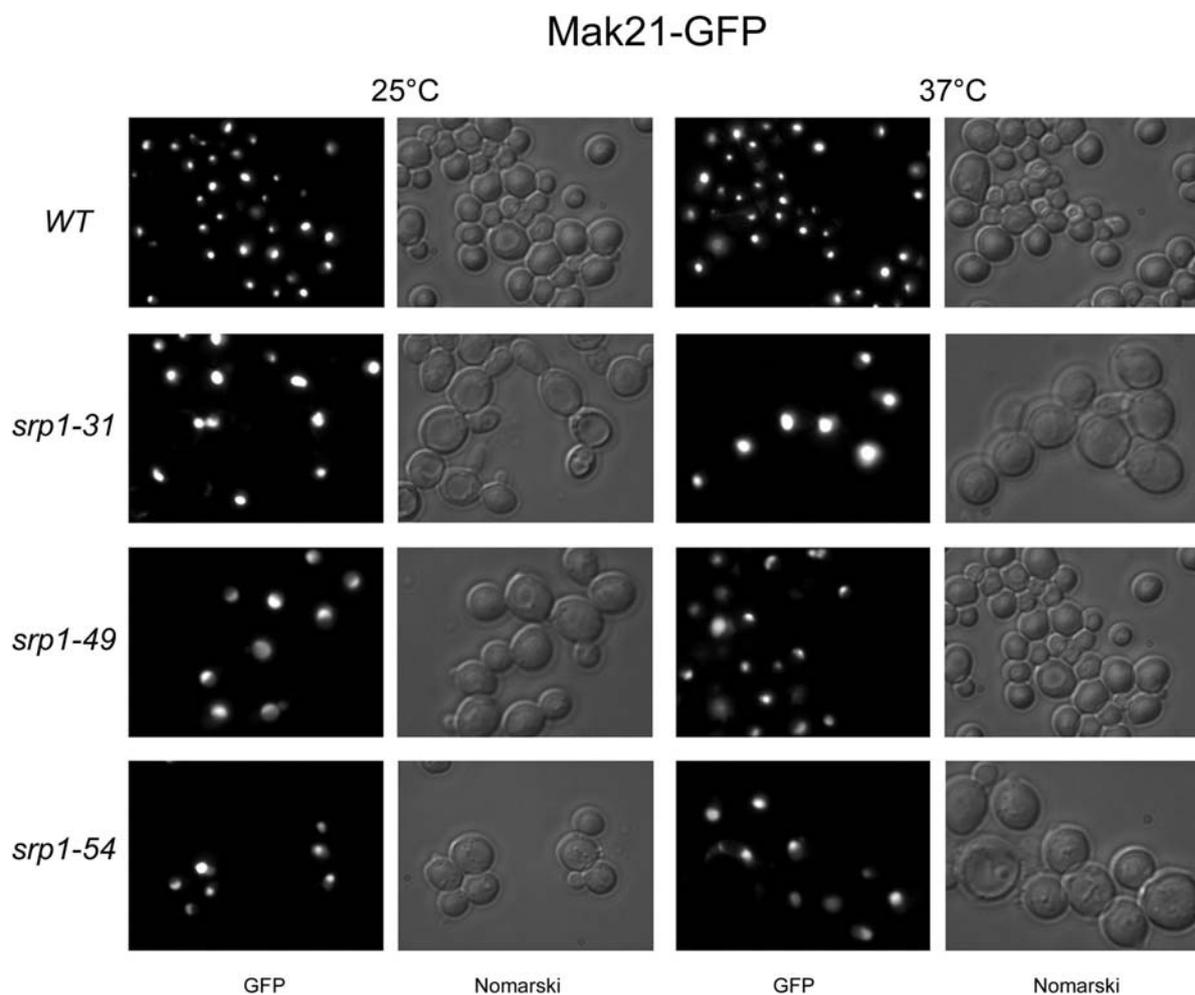


Abbildung 29: Lokalisierung von GFP-Mak21 in *srp1*-Mutanten

GFP wurde mittels der Longtine-Methode als Fusion von Mak21 in den Wildtyp und in die Mutanten *srp1-31*, *srp1-49* und *srp1-54* integriert. Die Zellen wurden bei 25°C in Selektivmedium kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurden die temperatursensitiven *srp1*-Mutanten für 1,5 h bei 37°C kultiviert. Es wurden jeweils Proben genommen und GFP-Mak21 mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Hefezellen wurden über die Nomarski-Optik dargestellt.

Die bisherigen Experimente sind als Zusammenfassung in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

	Set2	Yra1	Hsi1	Nis1	Yjl103	Arr1	Sda1	Mak21	Nup1
Gefunden mit	Kap114								
Gsp1-abhängige Interaktion <i>in vitro</i>	-	+	+	+	+	+	-	Sxm1	Nmd5
<i>in vivo</i> -Interaktionen (Zwei-Hybrid)	Kap114 (Pse1)	Kap114 (Pse1)	Kap114, Pse1 (Kap104)	/	/	/	Kap114 (Pse1)	Kap95, Pse1 Kap104 Kap123, Pdr6, Mfr10 Sxm1, Nmd5 Msn5, Srp1	/
<i>in vitro</i> -Interaktionen (Bindungsversuch)	Kap114 (Pse1) (Nmd5) (Kap95) (Kap123)	Kap114 (Nmd5) (Kap95) (Kap123)	Kap114 Pse1 Nmd5 Kap95	/	/	/	Kap114 (Pse1) (Nmd5) (Kap95)	Kap114 (Pse1), Nmd5 Kap95/Srp1 Srp1 (Kap123)	/
Lokalisierung (<i>in vivo</i> und IF)	Nukleus Nukleus Nukleus / /	Nukleus Nukleus Nukleus / /	bud neck bud neck bud neck / /	Lokalisierung über Longtine-Integration nicht möglich.		Nukleus Nukleus N>>C / /	Nukleolus / Nukleolus N>>NO N>>NO	/ / / / /	

/ nicht durchgeführt (...) schwache Interaktion N Nukleus NO Nukleolus C Cytoplasma

2.6 Weitere Charakterisierung von Yra1

Yra1 gehört zur evolutionär hochkonservierten REF-Familie (RNA und Exportfaktor bindende Proteine). Yra1 koppelt die RNA-Transkription mit dem mRNA-Export, indem es den Exportfaktor Mex67 an die RNA rekrutiert (Sträßer, 2000). Die Domänenstruktur von Yra1 ist in Abbildung 30 dargestellt.

Die RNA-Bindungsdomäne ist nicht essentiell und nach bisherigen Erkenntnissen sind die Hefezellen lebensfähig, wenn nur die N-terminale Region (N-Box + N-vr Bereich) oder die C-terminale Region (C-Box + C-vr Bereich) vorhanden ist (Zenklusen, 2001).

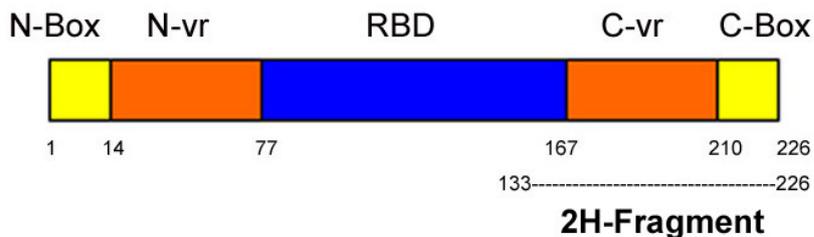


Abbildung 30: Domänenstruktur von Yra1

Yra1 besteht aus einer zentralen RNA-Bindungsdomäne (RBD), zwei hochkonservierten N- und C-terminalen Bereichen (N- und C-Box), die von zwei variablen Bereichen (N-vr und C-vr) getrennt werden. Das identifizierte Zwei-Hybrid-Fragment von Yra1 beinhaltet den C-terminalen Bereich C-vr und C-Box und einen kleinen Teil der RNA-Bindungsdomäne.

Um Yra1 näher zu charakterisieren und um die Bindungseigenschaften des C-terminalen Zwei-Hybrid-Fragmentes mit denen des gesamten Proteins zu vergleichen, wurde das vollständige Protein als GST-Fusion in *E. coli*-Zellen synthetisiert (Yra1vL). Nach Induktion und Zellyse wurde sowohl ein Gesamtzelllysat durch Zentrifugation gewonnen als auch GST-Yra1 weiter gereinigt. Mit GST-Yra1vL wurden mit in *E. coli* als His₆-Fusionen synthetisierten und gereinigten Transportfaktoren Bindungsversuche durchgeführt.

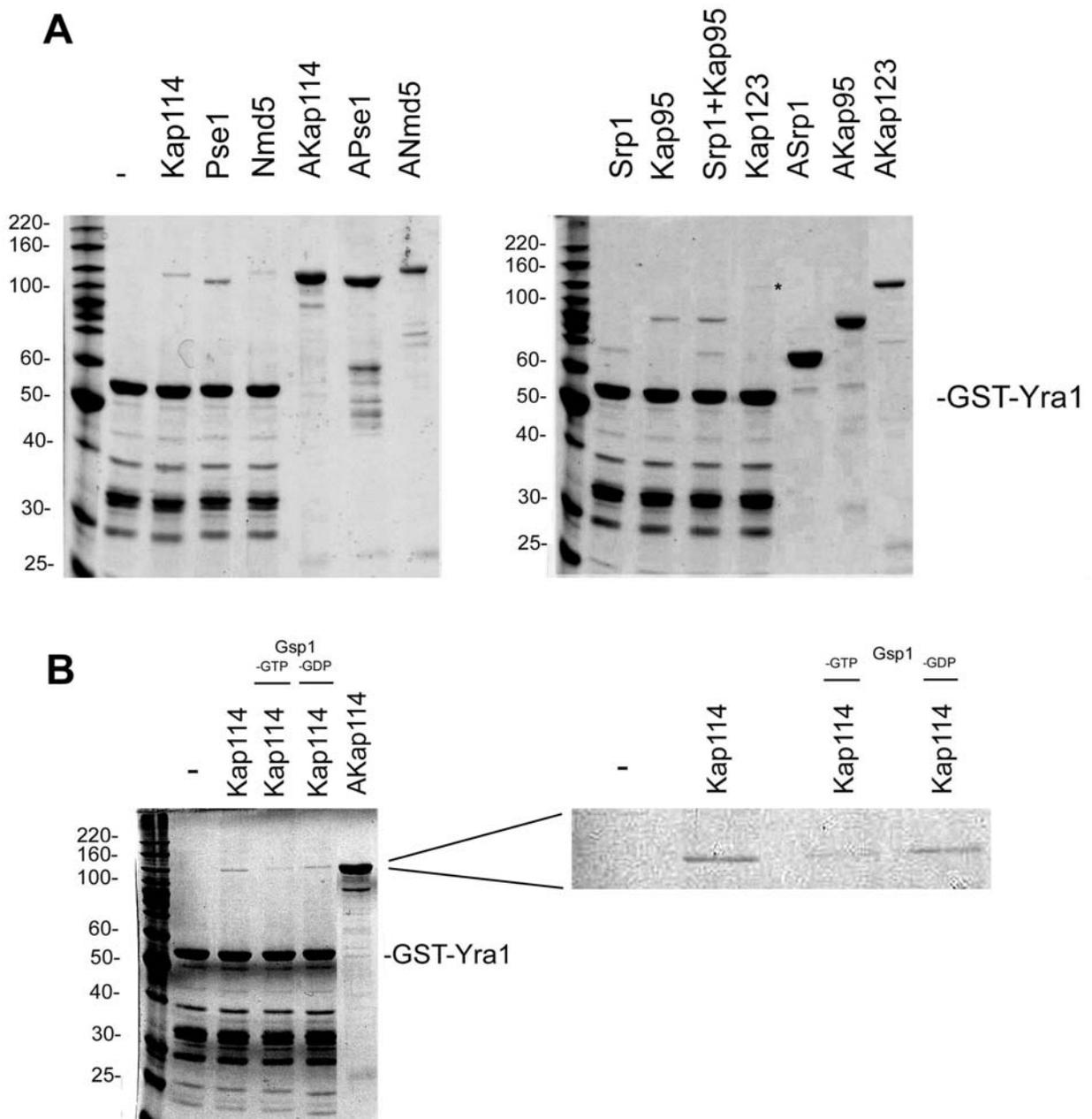


Abbildung 31: Bindungsversuch von GST-Yra1L mit verschiedenen Transportfaktoren und Gsp1-Abhängigkeit der Kap114-Bindung

(A) Die Transportfaktoren wurden als His₆-Fusion in *E. coli* synthetisiert und gereinigt. Yra1 wurde als komplettes Protein als GST-Fusion in *E. coli* BL21 synthetisiert (Yra1vL). Aus den Zellen wurde ein Gesamtzelllysat hergestellt, aus dem das Fusionsprotein durch Inkubation für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurden die Ansätze mit jeweils 12 µg der His₆-Fusionen der Transportfaktoren versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal gewaschen, die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

(B) GST-Yra1 wurde aus dem Gesamtzelllysat durch Inkubation für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT-Puffer wurde zu den Ansätzen jeweils 12 µg His₆-Kap114, das mit 18 µg His₆-Gsp1pQ71L-GTP bzw. His₆-Gsp1pQ71L-GDP vorinkubiert wurde, gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal gewaschen, die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Die Angaben der Proteinstandards sind in kDa. Ein Gelabschnitt ist vergrößert dargestellt.

Yra1 wurde im Zwei-Hybrid Screen als Bindungspartner von Kap114 identifiziert und das Zwei-Hybrid Fragment von Yra1 zeigte im Bindungsversuch eine Gsp1-abhängige Bindung an Kap114 (Abbildung 22) und weitere Interaktionen mit Nmd5, Kap95 und Kap123 (Abbildung 27). Mit Pse1 wurde *in vivo* eine schwache Interaktion nachgewiesen (Abbildung 26). Alle Transportfaktoren, die mit dem Zwei-Hybrid Fragment von Yra1 interagiert hatten (Tabelle 16), wurden im Bindungsversuch auch auf Interaktion mit dem vollständigen Protein Yra1 getestet.

Es wurde eine *in vitro* Interaktion von GST-Yra1vL mit Kap114 nachgewiesen, die etwas stärker war als die Interaktion mit dem GST-Yra1 Zwei-Hybrid Fragment (Abbildung 31A). Yra1vL zeigte im Gegensatz zum Zwei-Hybrid Fragment eine klare Interaktion mit Pse1. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindungsstelle für Pse1 vor allem im N-terminalen Bereich von Yra1 liegt. Von Zenklusen *et al.* (2001) wurde in diesem Bereich bereits eine NLS detektiert.

Es wurden ebenfalls Interaktionen mit Srp1 und Kap95 nachgewiesen, die stärker ausgeprägt waren als die des C-terminalen Fragments. Mit Nmd5 und Kap123 wurden ebenfalls schwache Bindungen nachgewiesen (Abbildung 31A). Das gereinigte GST-Yra1vL zeigte das gleiche Bindungsverhalten wie GST-Yra1vL aus dem Gesamtzelllysat (Daten nicht gezeigt).

Abgesehen von der Interaktion mit Pse1 ließen sich mit GST-Yra1vL die gleichen Interaktionen nachweisen wie sie in Tabelle 16 für das Zwei-Hybrid Fragment dargestellt sind, wenn auch zum Teil in stärkerer Ausprägung. Yra1 zeigte demzufolge als komplettes Protein ähnliche Bindungseigenschaften wie das C-terminale Fragment. Es ist somit anzunehmen, dass sich nicht nur im N-Terminus, sondern auch im C-Terminus eine NLS befindet.

Weiterhin wurde die Gsp1-Abhängigkeit der Kap114-Bindung des kompletten Yra1 Proteins überprüft. Dazu wurden Bindungsversuche durchgeführt, bei denen Kap114 zunächst mit Gsp1-GTP bzw. als Kontrolle mit Gsp1-GDP vorinkubiert und dann mit dem immobilisierten GST-Yra1vL inkubiert wurde. Abbildung 31B zeigt, dass auch die Bindung von GST-Yra1vL an Kap114 Gsp1-GTP sensitiv ist. Kap114, das mit Gsp1-GTP vorinkubiert wurde, bindet Gst-Yra1vL schwächer als die Kontrolle. Im Gegensatz zu dem Zwei-Hybrid-Fragment, bei dem sich nach Gsp1-GTP-Vorinkubation keine Kap114-Bindung mehr zeigte (Abbildung 22), wurde mit dem gesamten Yra1 Protein immer noch eine Kap114-Bindung nachgewiesen. Es bedarf hier anscheinend noch weiterer Faktoren, um den Komplex vollständig zu dissoziieren. Wegen der deutlichen Interaktion von Yra1vL mit Kap95 und Srp1 wurde auch hier auf Gsp1-Abhängigkeit getestet und es zeigte sich, dass die Bindung nicht Gsp1-GTP sensitiv war

(Daten nicht gezeigt). Zudem wurde beim Bindungsversuch mit Srp1 und Kap95 keine kooperative Bindung nachgewiesen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Yra1vL zwar *in vitro* an Srp1 und Kap 95 binden kann, aber wahrscheinlich nicht über den klassischen NLS Weg importiert wird.

2.6.1 Identifizierung neuer Bindungspartner von Yra1

Die Interaktion von Yra1 mit Kap114 zeigte sich in unterschiedlicher Ausprägung. Während sie *in vivo* über Zwei-Hybrid Assays sehr stark war, wurde sie *in vitro* mittels Bindungsversuchen nur schwach nachgewiesen. Deshalb wurde untersucht, ob eventuell noch weitere Faktoren für diese Bindung notwendig sind. Dazu wurde GST-Yra1vL an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Hefegesamtzelllysaten, einer gereinigten Cytosolfraktion und einer gereinigten Kernfraktion inkubiert, einmal mit und einmal ohne Zugabe von Kap114. Abbildung 32A zeigt, dass die Yra1/Kap114 Interaktion unter diesen Versuchsbedingungen durch Zugabe von verschiedenen Zellfraktionen nicht verstärkt wird. Allerdings zeigte der Bindungsversuch mit der gereinigten Kernfraktion, dass zahlreiche Proteine aus dem Zellkern an Yra1 binden (Abbildung 32A). Da Yra1 eine Rolle beim mRNA-Export spielt und eine Komponente des TREX-Komplexes ist, der mRNA-Transkription und Export miteinander koppelt (Sträßer *et al.*, 2002), sind eine Reihe von Interaktionspartnern im Zellkern bekannt. Es scheint, dass besonders im hochmolekularen Bereich einige noch nicht beschriebene Proteine gebunden hatten. Der Bindungsversuch von GST-Yra1 wurde mit verschiedenen Konzentrationen der Kernfraktion wiederholt. Es zeigte sich bei allen Ansätzen das gleiche Bandenmuster. Die Probe mit 0,4 mg Kernfraktion wurde massenspektrometrisch von unserem Kooperationspartner Dr. Albert Sickmann (Universität Würzburg) analysiert (Abbildung 32B).

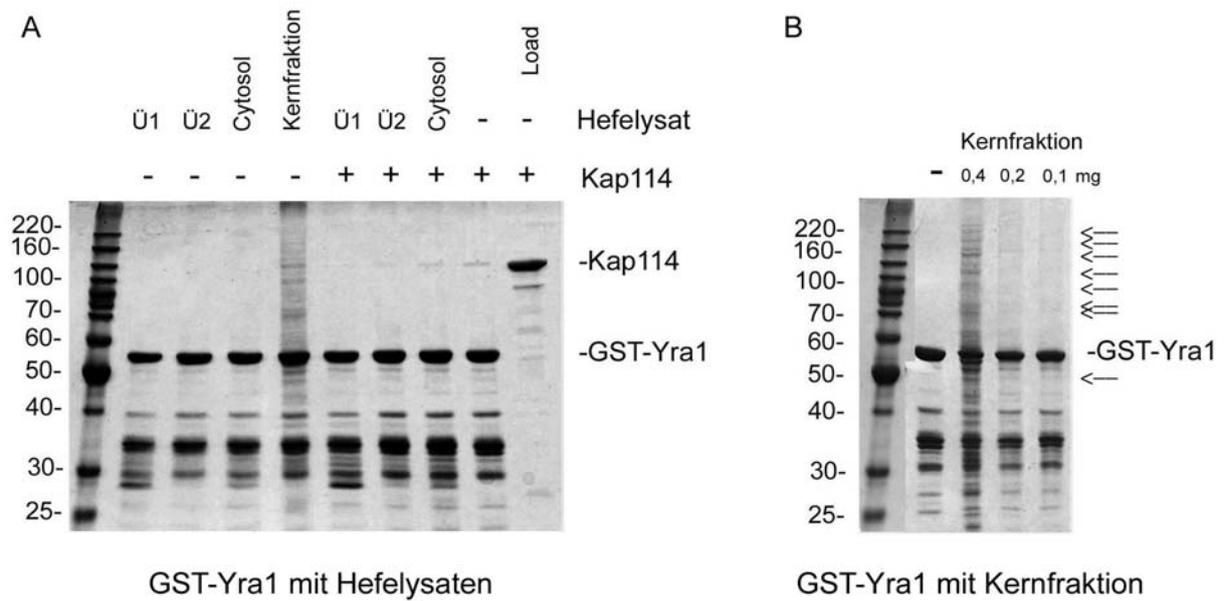


Abbildung 32: Bindungsassay von GST-Yra1 mit Hefelysaten

(A) Volle-Länge Yra1 wurde als GST-Fusion in *E. coli* BL21-Zellen synthetisiert. Aus den Zellen wurde ein Lysat hergestellt, aus dem das Fusionsprotein durch Inkubation für 1 h bei 4°C an GSH-Sepharose gebunden wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-KMT wurden die Ansätze mit verschiedenen Hefelysaten (Ü1 und Ü2), gereinigter Cytosolfraktion und gereinigter Kernfraktion einmal ohne und einmal mit Zugabe von Kap114 für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Säulenmaterial dreimal mit PBS-KMT gewaschen, die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert.

(B) An GSH-Sepharose gebundenes GST-Yra1 wurde mit gereinigter Kernfraktion verschiedener Konzentrationen bei 4°C für 1 h inkubiert. Danach wurde das Säulenmaterial dreimal mit PBS-KMT gewaschen, die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert. Die Angaben der Proteinstandards sind in kDa. An Yra1 bindende Proteine aus der Kernfraktion sind mit einem Pfeil markiert. Sie wurden von der Arbeitsgruppe Sickmann massenspektrometrisch analysiert.

In Tabelle 18 sind die nach massenspektrometrischer Analyse gefundenen Interaktionspartner von Yra1 aufgeführt. Es wurden nur die Proteine aufgelistet, die aufgrund ihrer Lokalisierung im Nukleus oder Nukleolus in einem Zusammenhang mit Yra1 stehen könnten. Desweiteren wurden mehrfach ribosomale Proteine, die bekanntermaßen bei solchen Experimenten als unspezifische Bindungen auftreten (Brent und Finley, 1997; Gavin *et al.*, 2002), cytoplasmatische Proteinkinasen und Enzyme der Glykolyse gefunden.

Tabelle 18: Bindungspartner von Yra1 nach massenspektrometrischer Analyse

Lok. = Lokalisation; + = lebensfähig; - = letal

N = Nukleus; NO = Nukleolus; NE = Nuclear Envelope (Kernhülle); C = Cytoplasma

Bereits beschriebene Interaktionen von Yra1 sind jeweils unterstrichen (Ohne Quellenangabe).

Bereits beschriebene Interaktionen der gefundenen Proteine untereinander sind in blau dargestellt.

(1) Ho *et al.*, (2002); (2) Gavin *et al.*, (2006); (3) Krogan *et al.*, (2006); (4) Kashyap *et al.*, (2005); (5) Krogan *et al.*, (2004); (6) Yoshida und Blobel (2001); (7) Dragon *et al.*, (2002); (8) Grandi *et al.*, (2002); (9) Gadai *et al.*, (2002); (10) Ito *et al.*, (2001); (11) Uetz *et al.*, (2000); (12) Gavin *et al.*, (2002); Collins *et al.*, (2007)

Protein	Größe (kDa)	Lok.	Funktion/ biologischer Prozess	beschriebene Interaktionen	knock out
Fpr4	44	N NO	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase Ribosomenbiogenese Nukleosomen-Assemblierung		+
Has1	57	NE NO	RNA-Helikase rRNA-Prozessierung Ribosomenbiogenese	Mak21 (2,3,12) <u>Cka1</u> (1) Srp1 (1) <u>Nop6</u> (1) <u>Nop58</u> (8) <u>Mtr4</u> (3) <u>Rrp5</u> (2,3)	-
Hmo1	27	C N NO	Komponente des Polymerase I- Transkriptionssystems Aufrechterhaltung der Telomere	<u>Nop6</u> (1) <u>Isw1</u> (2) <u>Yra1</u> (3) <u>Rrp5</u> (3) Srp1 (10) Msn5 (11)	+
Isw1	131	N	ATPase Aktivität Chromatin Remodelierung Transkriptionale Regulation		+
Kem1	175	C	5'-3' Exonuclease mRNA-Abbau	<u>Yra1</u> (3,4)	+
Kre33	119	NO	Unbekannt Ribosomenbiogenese	Hsl1 (2) <u>Ela1</u> (1) <u>Cka1</u> (1) <u>Nop6</u> (1) <u>Nop58</u> (2,8) <u>Mus81</u> (1) <u>Has1</u> (13) <u>Rrp5</u> (13) <u>Nop58</u> (2,8)	-
Mtr4	122	N NO	RNA-Helikase mRNA-Export Cofaktor des Exosom Komplexes	<u>Yra1</u> (3) Mak21 (3) <u>Has1</u> (3)	-
Nop58	57	NO	U3 snoRNP Protein Prozessierung der 20S prä-rRNA Ribosomenbiogenese	<u>Sik1</u> (2,5,7) <u>Rpa49</u> (5) Srp1 (5) <u>Nop6</u> (1) <u>Utp15</u> (2,7,8) <u>Has1</u> (8) <u>Kre33</u> (2,8)	-

Ergebnisse

Protein	Größe (kDa)	Lok.	Funktion/ biologischer Prozess	beschriebene Interaktionen	knock out
Rpa135	135	N NO	RNA-Polymerase I Untereinheit Transkription von Polymerase I Promotor	Rpb5 (5) Rpr49 (4) Msn5 (6)	-
Rpa49	47	NO	Untereinheit der RNA-Polymerase I Ribosomenbiogenese Transkription	Rpb5 (2,3,5) Nop58 (4) Hmo1 (9)	+
Rpb5	25	N NO	Untereinheit der RNA Polymerase Transkription	Rpa49 (2,5) Rpa149 (2,3,5)	-
Rrp5	193	NO	U3 snoRNP-Protein rRNA-Prozessierung Ribosomenbiogenese	Cka1 (1) Nop6 (1,2,8) Mak21 (2,3,5) Nop58 (2,7,8) Has1 (2,3) Hmo1 (3) Yra1 (3)	-
Sik1	57	N NO	U3 snoRNP-Protein Ribosomenbiogenese rRNA-Modifikation	Nop58 (2,5,7,8) Cka1 (1) Top2 (1) Srp1 (3) Kap95 (3)	-
Utp15	58	NO	U3 snoRNP Protein Prozessierung der 20S pre-rRNA Ribosomenbiogenese	Yra1 (3)	-

Es wurden elf potentielle Interaktionspartner identifiziert, die im Nukleolus lokalisiert sind, vier davon (Rrp5, Sik1, Utp5, Nop58) sind U3 snoRNP-Proteine und acht (Rrp5, Kre33, Sik1, Has1, Utp15, Fpr4, Rpa49 und Nop58) spielen eine Rolle bei der Ribosomenbiogenese oder/und der rRNA-Prozessierung. Von fast allen dieser Proteine sind Interaktionen untereinander bereits beschrieben (Tabelle 18). Mehrere der gefundenen Interaktionspartner (Rrp5, Kre33, Sik1 und Has1) interagieren außerdem mit Nop6 (nukleolär, unbekannte Funktion) und der Cka1 (nukleär, α -Untereinheit der CK2). Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass Yra1 auch im Nukleolus eine Funktion innerhalb der rRNA-Prozessierung und/oder der Ribosomenbiogenese ausübt.

Außerdem wurde noch das cytoplasmatische Protein Kem1 gefunden, das eine Rolle beim mRNA-Abbau spielt und einen Hinweis darauf gibt, dass Yra1 evtl. teilweise ins Cytoplasma gelangt.

2.6.2 Der Import von Yra1 ist abhängig von Gsp1

Da keine der untersuchten Transportmutanten *in vivo* eine klare cytoplasmatische Misslokalisierung von Yra1 zeigte (Abbildung 24), wurde zunächst untersucht, ob der Import von Yra1 Gsp1-abhängig ist.

YRA1 wurde dazu als GFP-Fusion unter der Kontrolle des eigenen Promotors in das Plasmid pRS316 kloniert. Dieses Plasmid wurde dann in die Mutanten $\Delta kap114$, *pse1-1*/ $\Delta kap114$, *rna1-1* und *prp20-1* transformiert. Die verschiedenen Hefestämme wurden durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 33).

Die nukleäre Lokalisation von Yra1-GFP zeigte sich im Wildtyp, in der $\Delta kap114$ -Mutante und in der *pse1-1*/ $\Delta kap114$ -Mutante, was auch bereits mit chromosomalem Yra1-GFP beobachtet wurde (Abbildung 24). Um die Gsp1-GTP-Abhängigkeit des Imports zu untersuchen, wurden die Mutanten der beiden Gsp1-Regulatoren Rna1 und Prp20 untersucht. Eine Mutation in einem dieser Proteine bringt den Gsp1-GTP-Gradienten zum Erliegen, der Voraussetzung für den gerichteten Transport ist. In den beiden Mutanten *rna1-1* und *prp20-1* wurde eine klare cytoplasmatische Akkumulation von Yra1 nachgewiesen (Abbildung 33). Daraus ist zu schließen, dass der Import von Yra1 in den Zellkern auf einen intakten Gsp1-GTP Gradienten angewiesen ist. Es wurde somit auch *in vivo* gezeigt, dass Yra1 Gsp1-abhängig importiert wird.

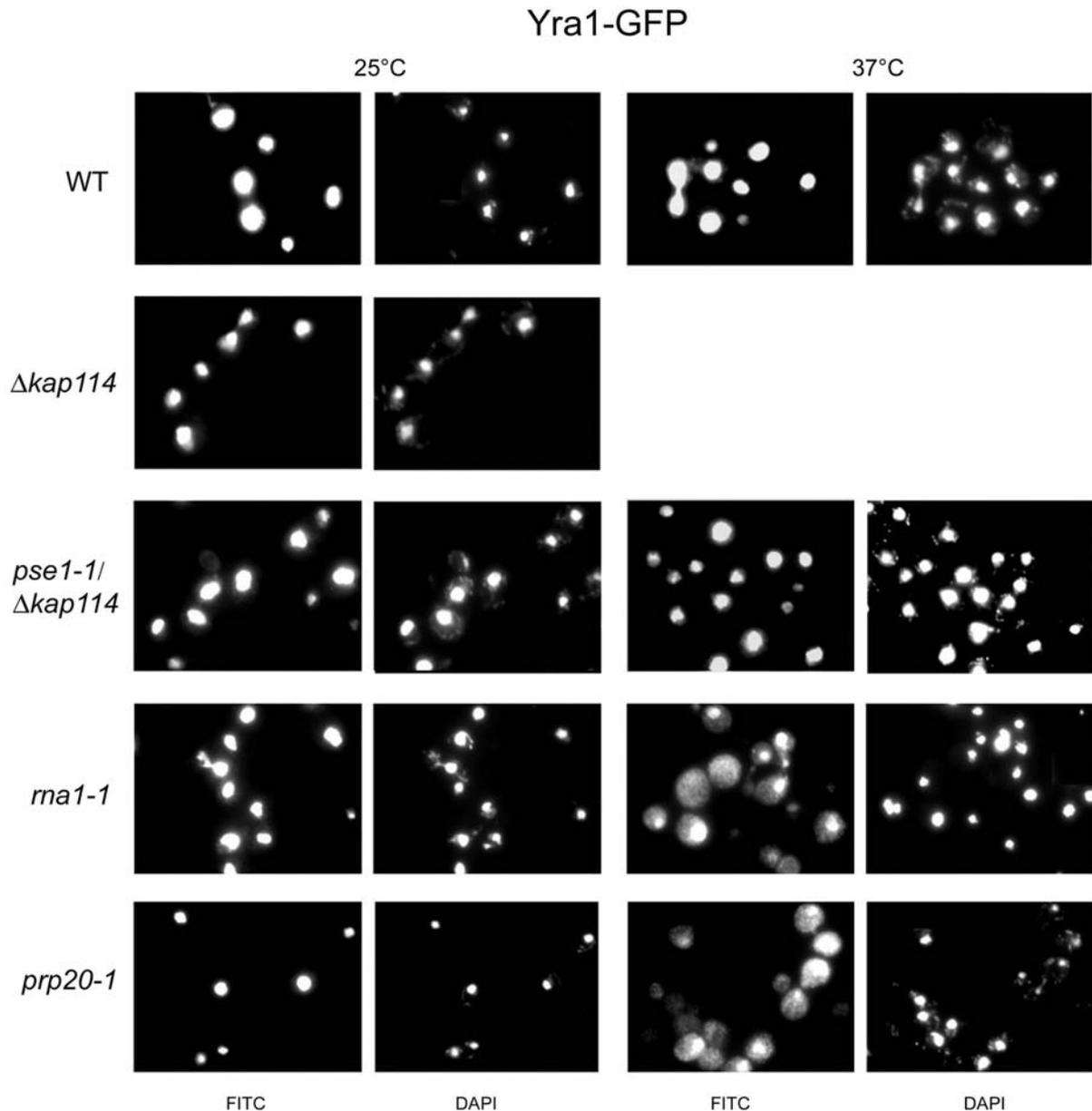


Abbildung 33: Der Import von Yra1 in den Zellkern ist abhängig von Gsp1

Das Plasmid pRS316-YRA1-GFP wurde in den Wildtyp (WT) und in die Transportmutanten $\Delta kap114$, *pse1-1/Δkap114*, *rna1-1* und *prp20-1* transformiert. Dann wurden die Stämme in Selektivmedium bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurden die temperatursensitiven Mutanten für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für die indirekte Immunfluoreszenz mit Formaldehyd fixiert. Nach Zymolyaseverdau der Zellwand wurden die GFP-Fusionen dann durch Inkubation mit GFP-spezifischen Antikörpern (1:1000) und FITC-gekoppelten Kaninchen-IgG (1:1000) lokalisiert. Die DNA der Zellen wurde mit DAPI angefärbt.

2.6.3 Yra1 wird von Pse1 und Kap123 in den Zellkern importiert

Um herauszufinden über welchen Transportweg Yra1 in den Zellkern gelangt, wurden weitere Transportmutanten bezüglich ihrer Lokalisierung von Yra1-GFP untersucht. Das Plasmid pRS316-*YRA1-GFP* wurde in verschiedene transportdefiziente Hefestämme transformiert und mittels Immunblotanalyse wurde die Synthese von Yra1-GFP in allen verwendeten Hefestämmen überprüft (Daten nicht gezeigt). Dann wurde die Lokalisierung von Yra1-GFP mit Hilfe der Immunfluoreszenz analysiert.

Die untersuchten Einfachmutanten *pse1-1*, *Anmd5* und Δ *kap123* zeigten eine nukleäre Lokalisierung von Yra1-GFP (Daten nicht gezeigt). Da mit Srp1 und Kap95 im Bindungsversuch mit Yra1 eine Interaktion nachgewiesen wurde, wurden auch die drei temperatursensitiven *srp1*-Mutanten untersucht. Sowohl bei permissiver als auch bei restriktiver Temperatur wurde Yra1 im Zellkern detektiert (Abbildung 34), was wiederum den Schluss nahe legt, dass Yra1 nicht über den klassischen NLS Weg importiert wird.

Bei der Doppelmutante *pse1-1*/ Δ *kap123* war Yra1-GFP bereits bei der permissiven Temperatur im Cytoplasma nachzuweisen, nach vollständiger Ausprägung des Phänotyps war die Misslokalisierung vergleichbar mit der der *prp20-1*-Mutante. In den beiden Doppelmutanten Δ *nmd5*/ Δ *kap114* und Δ *kap123*/ Δ *kap114* zeigte sich lediglich eine leichte cytoplasmatische Lokalisierung (Abbildung 34).

Diese Experimente belegen, dass Yra1 hauptsächlich über Pse1 und Kap123 in den Zellkern transportiert wird. Beide Importine besitzen überlappende Substratspezifitäten (beide importieren unter anderem auch ribosomale Proteine) und erst wenn beide deletiert sind, zeigt sich eine deutliche Misslokalisierung von Yra1. Die Misslokalisierung ist nicht ganz vollständig, was darauf hinweist, dass es noch andere "backup"-Importwege für Yra1 gibt. Die bisherigen Experimente und die beobachtete leichte Misslokalisierung in den Δ *nmd5*/ Δ *kap114* und Δ *kap123*/ Δ *kap114* Mutanten legen nahe, dass auch Kap114 und Nmd5 in den Import von Yra1 involviert sind.

Zusammenfassend lässt sich aus den bisherigen Ergebnissen schließen, dass Yra1 über mehrere Importwege in den Zellkern transportiert wird. Der hauptsächliche Import wird durch Pse1 vermittelt, Kap123 kann den Import ebenfalls übernehmen und Kap114 und Nmd5 scheinen als Importine zu fungieren, die zusätzliche Nebenwege darstellen.

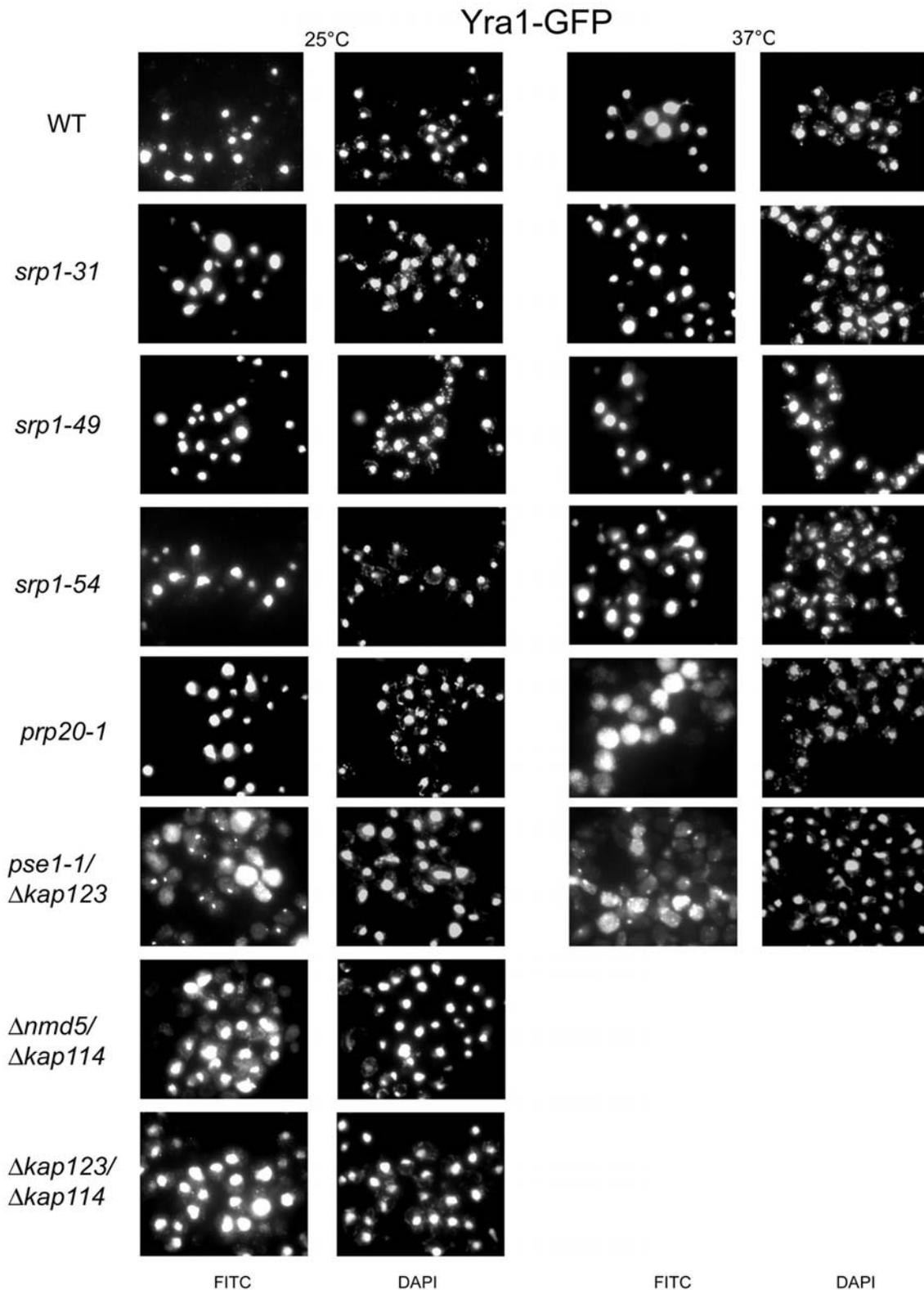


Abbildung 34: Der Import von Yra1 in den Zellkern erfordert Pse1 und Kap123

Das Plasmid pRS316-YRA1-GFP wurde in den Wildtyp (WT) und in die Transportmutanten *srp1-31*, *srp1-49*, *srp1-54*, *prp20-1*, *pse1-1/Δkap123*, *Δnmd5/Δkap114*, *Δkap123/Δkap114* transformiert. Dann wurden die verschiedenen Stämme in Selektivmedium bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurden die temperatursensitiven Mutanten für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie mit GFP-spezifischen Antikörpern (1:1000) und FITC-gekoppeltem Kaninchen-IgG (1:1000) analysiert. Die DNA der Zellen wurde mit DAPI angefärbt.

Tabelle 19: Lokalisierung von Yra1 in verschiedenen Transportmutanten:

Hefestamm	Lokalisierung von Yra1-GFP	
	25°C	37°C
WT	Nukleus	Nukleus
$\Delta kap114$	Nukleus	-
<i>pse1-1</i>	Nukleus	Nukleus
$\Delta nmd5$	Nukleus	-
$\Delta kap123$	Nukleus	-
<i>pse1-1/\Delta kap114</i>	Nukleus	Nukleus
$\Delta nmd5/\Delta kap114$	Nukleus + leicht cytoplasmatisch	-
$\Delta kap123/\Delta kap114$	Nukleus + leicht cytoplasmatisch	-
$\Delta kap104/\Delta kap114$	Nukleus	-
<i>srp1-31</i>	Nukleus	Nukleus
<i>srp1-49</i>	Nukleus	Nukleus
<i>srp1-54</i>	Nukleus	Nukleus
<i>rna1-1</i>	Nukleus	Cytoplasma
<i>prp20-1</i>	Nukleus	Cytoplasma
<i>pse1/\Delta kap123</i>	Cytoplasma	Cytoplasma

2.7 Weitere Charakterisierung von Hsl1

Hsl1 ist eine große, nicht essentielle Proteinkinase, die eine Rolle bei der Mitoseregulation spielt (Ma *et al.*, 1996). Eine Signalkaskade von mehreren Proteinen, unter anderem Gin4, Cla1, Nap1, Hsl1, Hsl7 und Swe1 bewirken den Übergang in die Mitose, von der Rekrutierung des Septin Baugerüsts bis hin zur Aktivierung des Clb(1-4)/Cdc28-Komplexes, dessen Aktivierung den eigentlichen Eintritt in die Mitose markiert (Longtine *et al.*, 2000). Hsl1 fungiert dabei als molekularer Mechanismus, um komplexe morphologische Strukturen, wie den Aufbau des Septingerüsts, aufzuzeigen. Hsl1 bindet nach der Formierung des "bud" an das korrekt assemblierte Septingerüst, wird aktiviert und hemmt dann Swe1, was zu einer Aktivierung des Clb(1-4)/Cdc28-Komplexes führt. Wird eines oder mehrere Proteine dieser Kaskade deletiert, kommt es zu einem verzögerten Eintritt in die Mitose, phänotypisch erkennbar an verlängerten "buds" der Hefezellen. Der phänotypische Effekt ist umso ausgeprägter, je mehr Proteine deletiert sind. Die Deletion von Swe1 setzt diesen Kontrollmechanismus außer Kraft. Bei Fehlen von Swe1 ist der Clb(1-4)/Cdc28-Komplex aktiv und der Eintritt in die Mitose findet statt (Longtine *et al.*, 2000; Barral *et al.*, 1999).

Abbildung 35 stellt die Domänenstruktur von Hsl1 dar. Hsl1 ist eine große Proteinkinase (1518 AS-Reste) mit einer N-terminalen katalytischen Kinasedomäne und einem langen C-terminalen Fragment. Der C-Terminus vermittelt die Bindung an die Septine und spielt auch eine Rolle bei der Autoregulation von Hsl1. Eine autoinhibitorische Domäne (ID) innerhalb des C-Terminus bindet an die Kinase von Hsl1 und hält die Kinase damit inaktiv. Erst nach der Bindung an die Septine wird die katalytische Region wieder zugänglich und Hsl1 ist als Kinase aktiv (Hanrahan & Snyder, 2003).

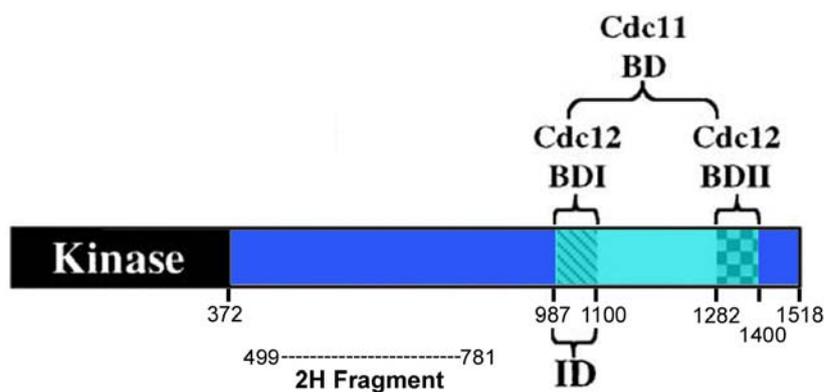


Abbildung 35: Domänenstruktur von Hsl1

Hsl1 ist eine Proteinkinase (1518 AS-Reste) mit einer N-terminalen katalytischen Kinasedomäne und einem langen C-terminalen Fragment. Der C-Terminus vermittelt die Bindung an die Septine, dort befindet sich eine Bindungsdomäne (BD) für Cdc11 und zwei Bindungsdomänen für Cdc12 (BDI und II), die mit der Cdc11-Bindungsregion teilweise überlappen. Außerdem fungiert die erste Bindungsdomäne von Cdc12 auch als inhibitorische Domäne (ID), sie ist in der Lage die Kinase von Hsl1 zu binden und damit die Kinase zu inaktivieren. Erst mit der Bindung der Septine Cdc11 und Cdc12 wird diese Autoinaktivierung wieder aufgehoben. Für die korrekte Lokalisierung an den "bud neck" ist die zweite Bindungsdomäne von Cdc12 verantwortlich. Das identifizierte Zwei-Hybrid (2H)-Fragment besteht aus dem vorderen Teil des C-terminalen Fragments, dessen Funktion bislang ungeklärt ist.

Hsl1 wurde im Zwei-Hybrid Screen mit Kap114 gefunden. Das Zwei-Hybrid Fragment zeigte *in vitro* eine Gsp1-GTP-abhängige Interaktion mit Kap114 (Abbildung 22) und unter anderem Interaktionen mit Pse1, Nmd5 und Kap95 (Abbildung 28). *In vivo* wurden mittels Zwei-Hybrid Assays Interaktionen von Hsl1-2H und Hsl1vL mit Kap114 und Pse1 nachgewiesen (Abbildung 26). Hsl1 war sowohl im Wildtyp als auch in den Deletionsmutanten $\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap114$ am "bud neck" einer sich teilenden Hefezelle lokalisiert (Abbildung 24). Bisher gibt es außer einer bereits beschriebenen Interaktion mit dem nukleären Protein Kre33 (Gavin *et al.*, 2002) keine Hinweise darauf, dass Hsl1 während des Zellzyklus in den Kern

importiert wird. Es stellt sich somit die Frage, welche Funktion Kap114 im Zusammenhang mit Hsl1 spielt, ob es als Importfaktor fungiert oder eine bisher nicht geklärte Rolle in der Mitoseregulation spielt. Da es aufgrund der unterschiedlichen und zudem geringen Expression von Hsl1 schwierig ist, eine etwaige kurzzeitige Kernlokalisierung überhaupt nachzuweisen, wurde Hsl1 als volle Länge Protein und als Zwei-Hybrid Fragment in den Vektor YCpGAL-SGFP kloniert und unter dem *GALI*- Promotor als GFP-Fusion im Wildtyp und in den bereits zuvor untersuchten Deletionsstämmen $\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap114$ exprimiert.

Da Pse1 und Kap123 teilweise überlappende Substratspezifitäten besitzen (z.B. ribosomale Proteine (Rout *et al.*, 1997) oder der Import von Yra1, diese Arbeit) wurde auch die Doppelmutante $pse1-1/\Delta kap123$ bezüglich ihrer Lokalisierung von Hsl1vL und des Zwei-Hybrid-Fragmentes von Hsl1 untersucht (Abbildung 36). Die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

GFP-Hsl1vL war sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten $\Delta kap114$, $pse1-1/\Delta kap114$, und $pse1-1/\Delta kap123$ hauptsächlich am "bud neck" konzentriert, es war aber auch eine Lokalisierung an der Plasmamembran nachzuweisen. Eine Kernakkumulation war in keinem der untersuchten Stämme zu beobachten. Allerdings zeigten viele Zellen phänotypisch verlängerte "buds". Dieses Phänomen trat in milder Form im Wildtyp und in der $\Delta kap114$ -Mutante auf und war im $pse1-1/\Delta kap114$ -Deletionsstamm verstärkt nachzuweisen, während die Doppelmutante $pse1-1/\Delta kap123$ wiederum einen milderen Phänotyp zeigte. Nach dem Temperaturwechsel zu 37°C zeigte sich im Wildtyp, in der $pse1-1/\Delta kap114$ - und der $pse1-1/\Delta kap123$ -Mutante ein ähnliches Bild bezüglich der Lokalisierung von Hsl1vL, allerdings war Hsl1 nur noch in sehr geringem Maße nachzuweisen. Unter Hitzeeinwirkung wird Hsl1 in der Zelle anscheinend relativ schnell abgebaut (Abbildung 36).

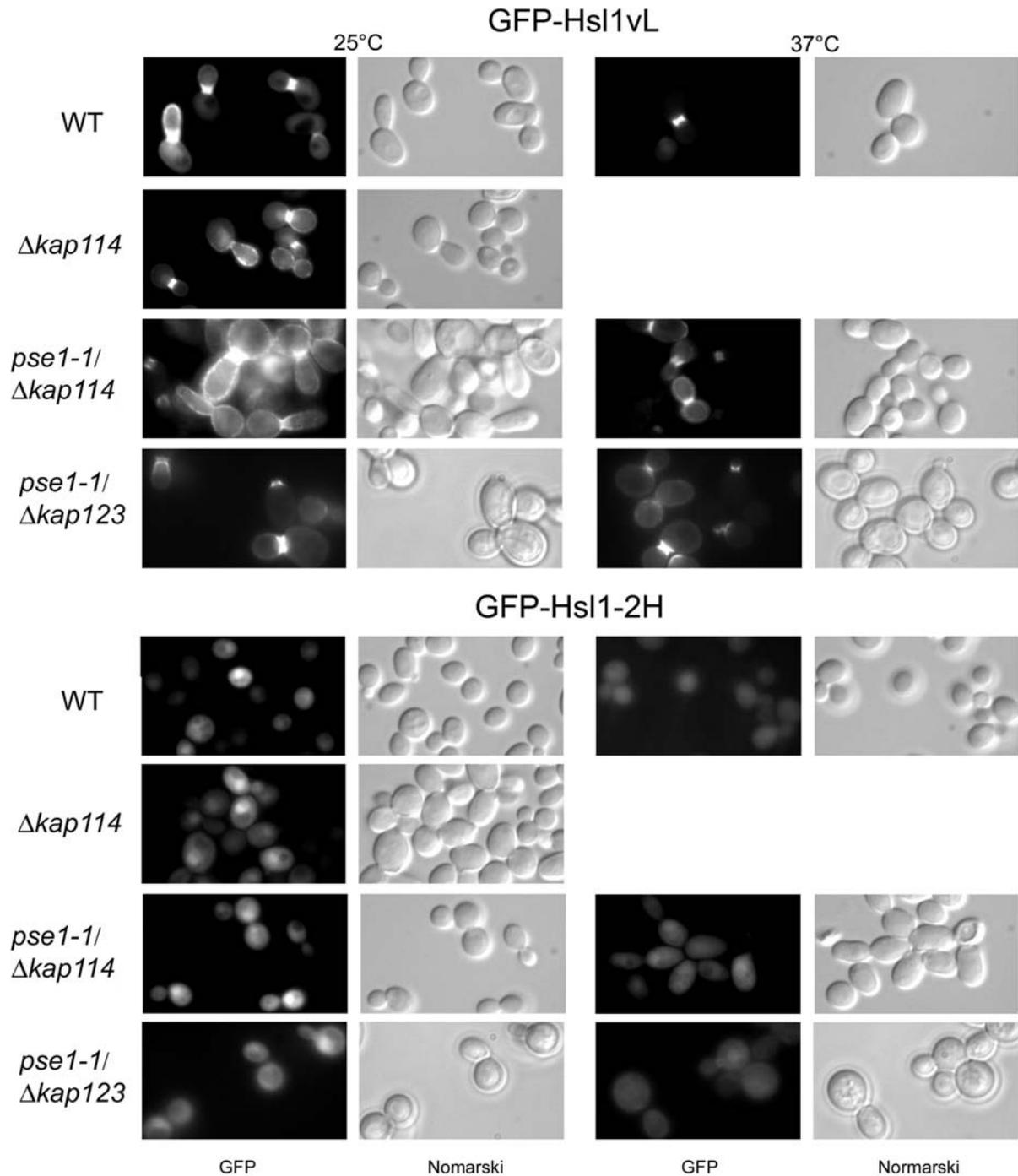


Abbildung 36: Hsl1 und das Hsl1-Zwei-Hybrid Fragment sind unterschiedlich lokalisiert

Die Plasmide YCpGAL-*GFP-Hsl1vL* bzw. YCpGAL-*GFP-Hsl1-2H* wurden in den Wildtyp (WT) und in die angegebenen Mutanten transformiert. Die Stämme wurden in Selektivmedium mit 2% Glukose angezogen, in Selektivmedium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Synthese der Fusionsproteine durch Zugabe von 2% Galaktose für 2,5 h induziert. Die temperatursensitiven Mutanten wurden nach 1 h Galaktose-Induktion für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Zur *in vivo*-Lokalisierung wurden jeweils Proben entnommen und die Lokalisierung der Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Hefezellen wurden mittels Nomarski-Optik dargestellt.

Das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 zeigte eine vollkommen andere Lokalisierung als das Gesamtprotein. Es war im Wildtyp und in den $\Delta kap114$ -, $pse1-1/\Delta kap114$ - und $pse1-1/\Delta kap123$ -Mutanten cytoplasmatisch und teilweise auch im Kern lokalisiert. Nach Inkubation bei 37°C konnte diese Kernlokalisierung nicht mehr nachgewiesen werden. Vermutlich lag dies an einem viel schwächeren GFP-Signal, da auch das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 bei 37°C abgebaut wurde. Alle untersuchten Hefestämme zeigten den Phänotyp des Wildtyps, es traten keine verlängerten "buds" auf (Abbildung 36).

Eine Überexpression von *HSL1* scheint den gleichen Effekt zu haben wie eine *HSL1*-Deletion. Der Eintritt in die Mitose ist gestört und es kommt phänotypisch zu verlängerten "buds". Um zu überprüfen, ob der Phänotyp der verlängerten "buds" ursächlich von der Hsl1vL-Überexpression herrührt und ob es möglich ist, ihn noch zu verstärken, wurde das gleiche Experiment mit einer fünfstündigen Gal-Induktion im Vergleich zu einer zweieinhalbstündigen durchgeführt. Abbildung 37 zeigt die Lokalisierung von Hsl1vL und dem Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 sowie den Phänotyp der Hefezellen nach fünfstündiger Überexpression. Hsl1vL zeigte die gleiche Lokalisierung am "bud neck" und an der Plasmamembran wie im vorherigen Experiment. Es war in allen untersuchten Stämmen Wildtyp, $\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap114$ eine Verstärkung des Phänotyps zu beobachten. Deutlich mehr Zellen wiesen verlängerte "buds" auf, wobei die $pse1-1/\Delta kap114$ -Mutante den auffälligsten Phänotyp zeigte. Auch wurde wieder beobachtet, dass Hsl1 bei 37°C schnell abgebaut wurde. Das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 war wie zuvor im Cytoplasma und teilweise im Kern lokalisiert und die Hefezellen zeigten keine phänotypischen Veränderungen.

Hsl1vL konnte in den bisherigen Experimenten auch nach einer verstärkten Expression nicht eindeutig im Nukleus nachgewiesen werden. Das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1, das nicht mehr am "bud neck" lokalisiert, da es keine Septin-Bindungsregion besitzt, war teilweise im Kern nachzuweisen. Eine Möglichkeit wäre, dass Hsl1 im Laufe des Zellzyklus aktiv in den Kern importiert und wieder exportiert wird. Falls Hsl1vL eine NES besitzt und zwischen Zellkern und Cytoplasma pendelt, wird eine kurzzeitige Kernakkumulation evtl. nicht nachzuweisen sein. Das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 wurde demnach im Kern nachgewiesen, da es diese NES Sequenz nicht besitzt. Bei einer Sequenzanalyse wurden NES-ähnliche Sequenzen in der C-terminalen Region von Hsl1 gefunden. Da Xpo1 das Exportin für NES-tragende Proteine ist, wurde untersucht, ob Hsl1vL in der exportdefizienten Mutante $xpo1-1$ im Kern nachzuweisen ist. Dazu wurde GFP-Hsl1vL unter dem *GALI* Promotor in der Mutante $xpo1-1$ exprimiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert.

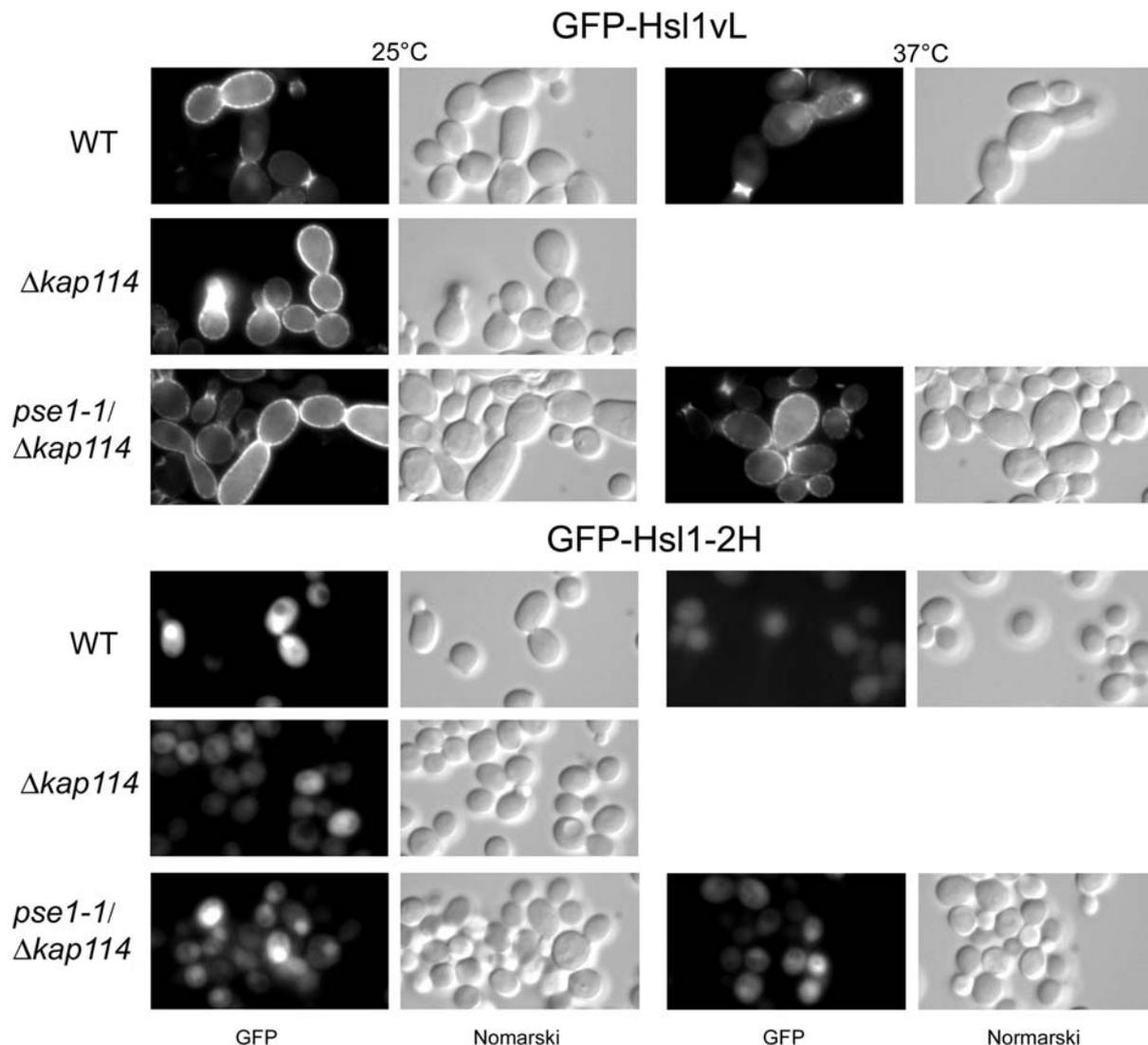


Abbildung 37: Überexpression von Hsl1vL führt phänotypisch zu verlängerten "buds"

Die Plasmide YCpGAL-*GFP-HSL1* bzw. YCpGAL-*GFP-HSL1-2H* wurden in den Wildtyp (WT) und in die Transportmutanten $\Delta kap114$ und *pse1-1/Δkap114* transformiert. Die Stämme wurden in Selektivmedium mit 2% Glukose angezogen, danach in Selektivmedium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Synthese der Fusionsproteine durch Zugabe von 2% Galaktose für 5 h induziert. Die temperatursensitiven Mutanten wurden nach der Galaktose-Induktion für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Es wurden Proben entnommen und die Hsl1-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* lokalisiert. Die Hefezellen wurden mittels Nomarski-Optik dargestellt.

Hsl1vL war sowohl im Wildtyp als auch in der $\Delta kap114$ - und *xpo1-1*-Deletionsmutante am "bud neck" und an der Plasmamembran lokalisiert. In allen drei Hefestämmen wurde an vereinzelt Zellen ein sehr schwaches GFP-Hsl1vL Signal in einem Areal in der Zelle beobachtet, das evtl. den Zellkern darstellen könnte (Abbildung 38)

Nach Inkubation bei restriktiver Temperatur wurde Hsl1 wiederum schnell abgebaut und war nur noch schwach nachzuweisen. Es zeigte sich keine verstärkte Kernakkumulation von Hsl1vL in *xpo1-1*-Zellen.

Msn5 ist ein Kerntransportfaktor, der sowohl den Import als auch den Export von Proteinen vermittelt und somit als alternatives Exportin für Hsl1 in Frage kommt. Hsl1vL und das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 wurden in den beiden Exportmutanten *xpo1-1* und Δ *msn5* mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert. Weder Hsl1vL noch das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 wurde in den beiden exportdefizienten Mutanten verstärkt im Kern nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass Hsl1, sofern es in den Zellkern importiert wird, nicht ausschließlich über Xpo1 oder Msn5 exportiert wird.

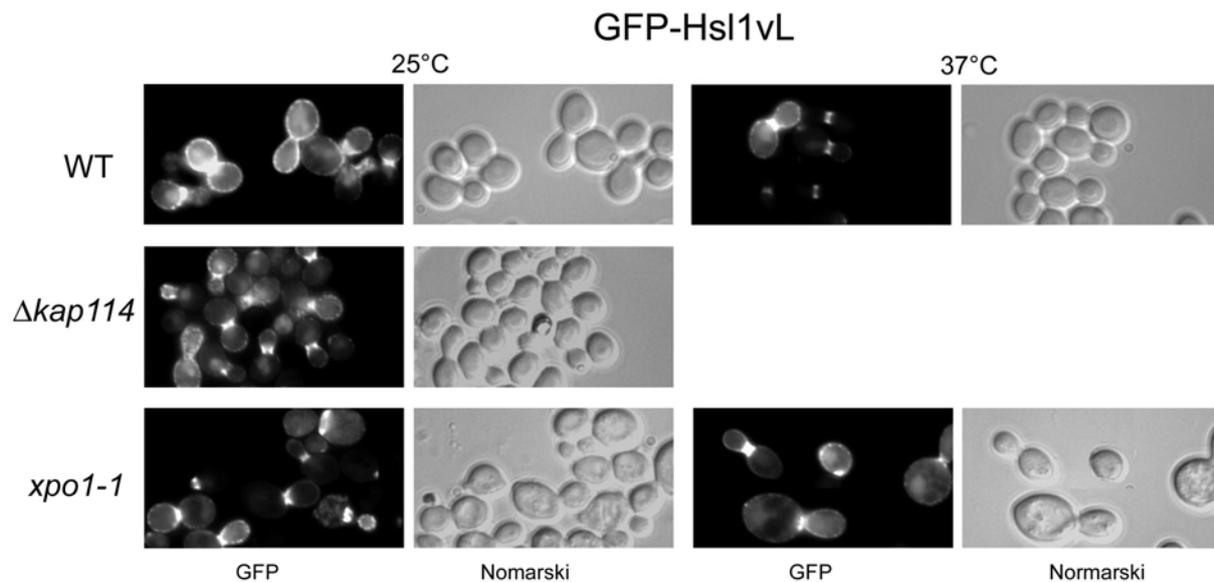


Abbildung 38: Lokalisierung von GFP-Hsl1 in der exportdefizienten Mutante *xpo1-1*

Das Plasmid YCpGAL-*GFP-HSL1* wurde in den Wildtyp (WT) und in die Transportmutanten Δ *kap114* und *xpo1-1* transformiert. Dann wurden die verschiedenen Stämme in Selektivmedium mit 2% Glukose angezogen, danach in Selektivmedium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Synthese der Fusionsproteine durch Zugabe von 2% Galaktose für 2,5 h induziert. Die temperatursensitive Mutante *xpo1-1* wurde nach 1 h Galaktose-Induktion für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Es wurden Proben entnommen und das Hsl1-Fusionsprotein mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* lokalisiert. Die Hefezellen wurden mittels Nomarski-Optik dargestellt.

Um auf anderem Wege herauszufinden, ob Hsl1vL in den Kern importiert wird und ob es eine NLS und eine NES besitzt, wurde die Lokalisierung verschiedener Deletionsfragmente von Hsl1 überprüft. Die Deletionen N (N-Terminus bis Anfang des gefundenen Zwei-Hybrid-Fragments), N+2H (N-Terminus bis Ende des gefundenen Zwei-Hybrid-Fragments), C+2H (C-Terminus bis Anfang des gefundenen Zwei-Hybrid-Fragments) und C (C-Terminus ohne Zwei-Hybrid-Fragment) wurden per PCR hergestellt (Abbildung 39). Die Fragmente wurden in den Vektor YCpGAL-SGFP kloniert und in den Wildtyp und die *Δkap114*- und *pse1-1/Δkap114*-Mutanten transformiert. Die Synthese der GFP-Fusionsproteine wurde in Gesamtzelllysaten mittels SDS-PAGE und anschließender Immundetektion nachgewiesen (Abbildung 39). Dann wurden die GFP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert.

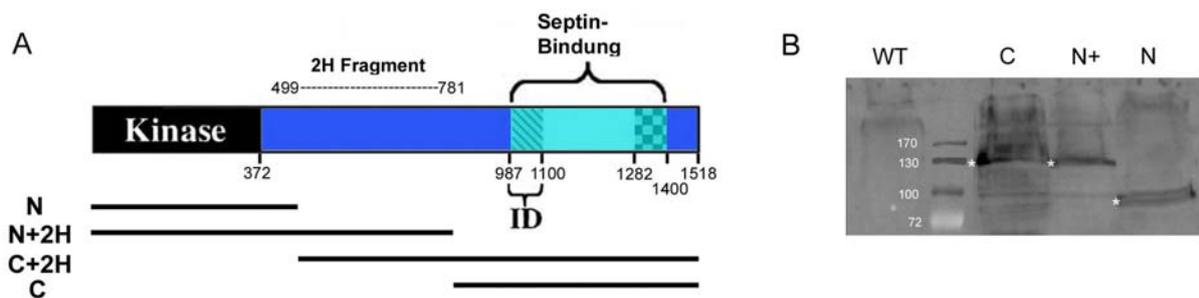


Abbildung 39: Deletionsfragmente von Hsl1

A) Mittels PCR wurden verschiedene Deletionen von Hsl1 hergestellt. N besitzt die katalytische Kinase- und den vorderen C-terminalen Teil bis zum Anfang des Zwei-Hybrid-Fragments. N+2H besteht aus der Kinase- und dem Zwei-Hybrid-Fragment. C+2H umfasst den C-Terminus mit der Septinbindungsregion und dem Zwei-Hybrid-Fragment, und C besteht aus dem C-Terminus ohne das Zwei-Hybrid-Fragment. ID: Inhibitorische Domäne.

B) Die *HSL1*-Fragmente wurden in den Vektor YCpGAL-SGFP kloniert und in den Wildtyp transformiert. Dann wurden die verschiedenen Stämme in Selektivmedium mit 2% Glukose angezogen, danach in Selektivmedium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Synthese der Fusionsproteine durch Zugabe von 2% Galaktose für 2 ½ h induziert. Es wurden Proben entnommen, für Immunblotanalysen präpariert und die Fusionsproteine wurden dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblotanalyse mit anti-GFP Primärantikörpern (1:1000) und anti-Kaninchen-spezifischen Sekundärantikörpern (1:1000) nachgewiesen.

Das N-terminale Fragment von Hsl1, das die Kinaseregion beinhaltet, zeigte im Wildtyp und in der Importmutante $\Delta kap114$ ausschließlich ein GFP-Signal im Kern (Abbildung 40). In der temperatursensitiven $pse1-1/\Delta kap114$ -Mutante wurde nach Ausprägung des Phänotyps auch ein schwaches cytoplasmatisches Signal nachgewiesen. Für das N+2H Fragment, das neben der Kinaseregion auch das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 besitzt, war außer der Kernakkumulation auch eine schwache cytoplasmatische Lokalisierung erkennbar. Diese Lokalisierung trat im Wildtyp und in den untersuchten Transportmutanten $\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap114$ auf, wobei das Signal nach funktionaler Inaktivierung von Pse1 bei 37°C stärker cytoplasmatisch war (Abbildung 41). Alle Hefezellen zeigten den Phänotyp des Wildtyps, es traten keine verlängerten "buds" auf (Abbildung 40 und 41). Dieses Ergebnis zeigt, dass Hsl1 in der N-terminalen Domäne eine NLS besitzt und in den Kern importiert werden kann.

Die C-terminalen Fragmente von Hsl1 wiesen eine Lokalisierung auf, die äquivalent war mit der von Hsl1vL. Sowohl Hsl1-C, das vor allem aus der Septinbindungsregion besteht, als auch Hsl1-C+2H mit zusätzlichem Zwei-Hybrid Fragment wurden im Wildtyp und in den beiden Mutanten $\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap114$ am "bud neck" und der Plasmamembran nachgewiesen. Es zeigte sich ein milder Phänotyp bezüglich der verlängerten "buds", lediglich in der $pse1-1/\Delta kap114$ -Mutante traten bei Hsl1-C-2H nach der Ausprägung des Phänotyps vermehrt Zellen mit verlängerten "buds" auf (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurde die Gsp1-Abhängigkeit des Imports der beiden N-terminalen Fragmente von Hsl1 untersucht. Dazu wurde deren Lokalisierung in der temperatursensitiven $rna1-1$ -Mutante analysiert (Abbildung 40 und 41). Nach der funktionalen Inaktivierung des Gsp1-Regulators Rna1 durch Inkubation bei der restriktiven Temperatur kann der Gsp1-GTP-Gradient nicht aufrechterhalten werden und somit ist ein gerichteter Transport nicht mehr möglich (Corbett *et al.*, 1995; Akhtar *et al.* 2001). Beide N-terminalen Fragmente von Hsl1 zeigten nach der Ausprägung des Phänotyps eine deutliche cytoplasmatische Misslokalisierung, was darauf hinweist, dass es sich hier um gerichteten, Gsp1- und Importin-abhängigen Transport handelt. In der Doppelmutante $pse1-1/\Delta kap123$ wurde ebenfalls eine cytoplasmatische Misslokalisierung für beide N-terminalen Fragmente nachgewiesen. Diese zeigte sich bei Hsl1-N+2H in stärkerer Ausprägung, war aber auch hier nicht vollständig (Abbildung 41). Daraus ist zu schließen, dass die beiden Importine Pse1 und Kap123 in den Import der Fragmente involviert sind, es aber anscheinend noch andere verantwortliche Importfaktoren geben muss.

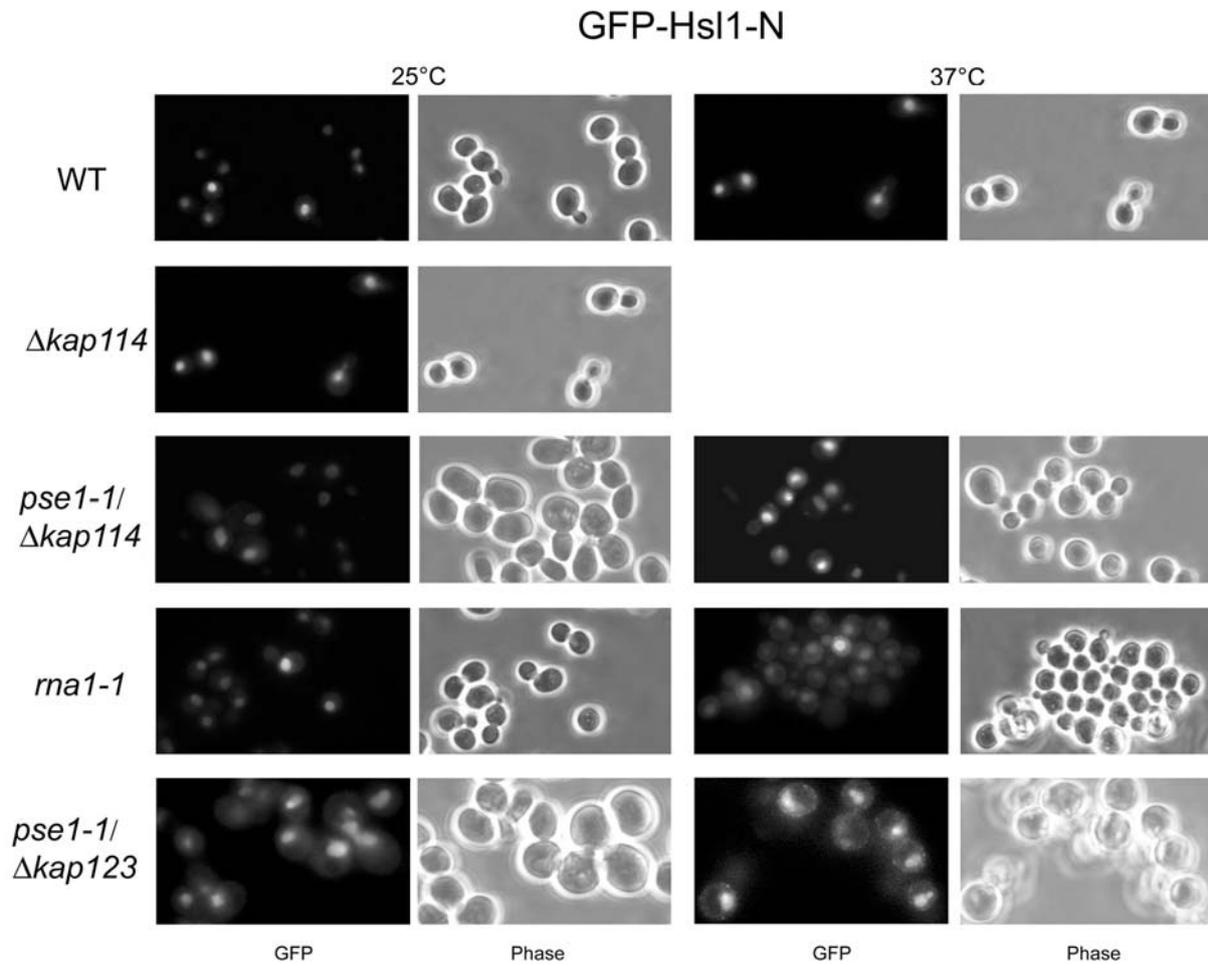


Abbildung 40: Hsl1 besitzt eine NLS in der N-terminalen Kinaseregion und der Import von Hsl1-N ist Gsp1-abhängig

Der Vektor YCpGAL-*GFP-HSL1-N* wurde in den Wildtyp (WT) und die angegebenen Transportmutanten transformiert. Die Stämme wurden in Selektivmedium mit 2% Glukose angezogen, danach in Selektivmedium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Synthese der Fusionsproteine durch Zugabe von 2% Galaktose für 2,5 h induziert. Die temperatursensitiven Mutanten wurden nach 1 h Galaktose-Induktion für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Es wurden Proben entnommen und die GFP-Fusionen der Fragmente mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* lokalisiert. Die Hefezellen wurden über Phasenkontrast dargestellt.

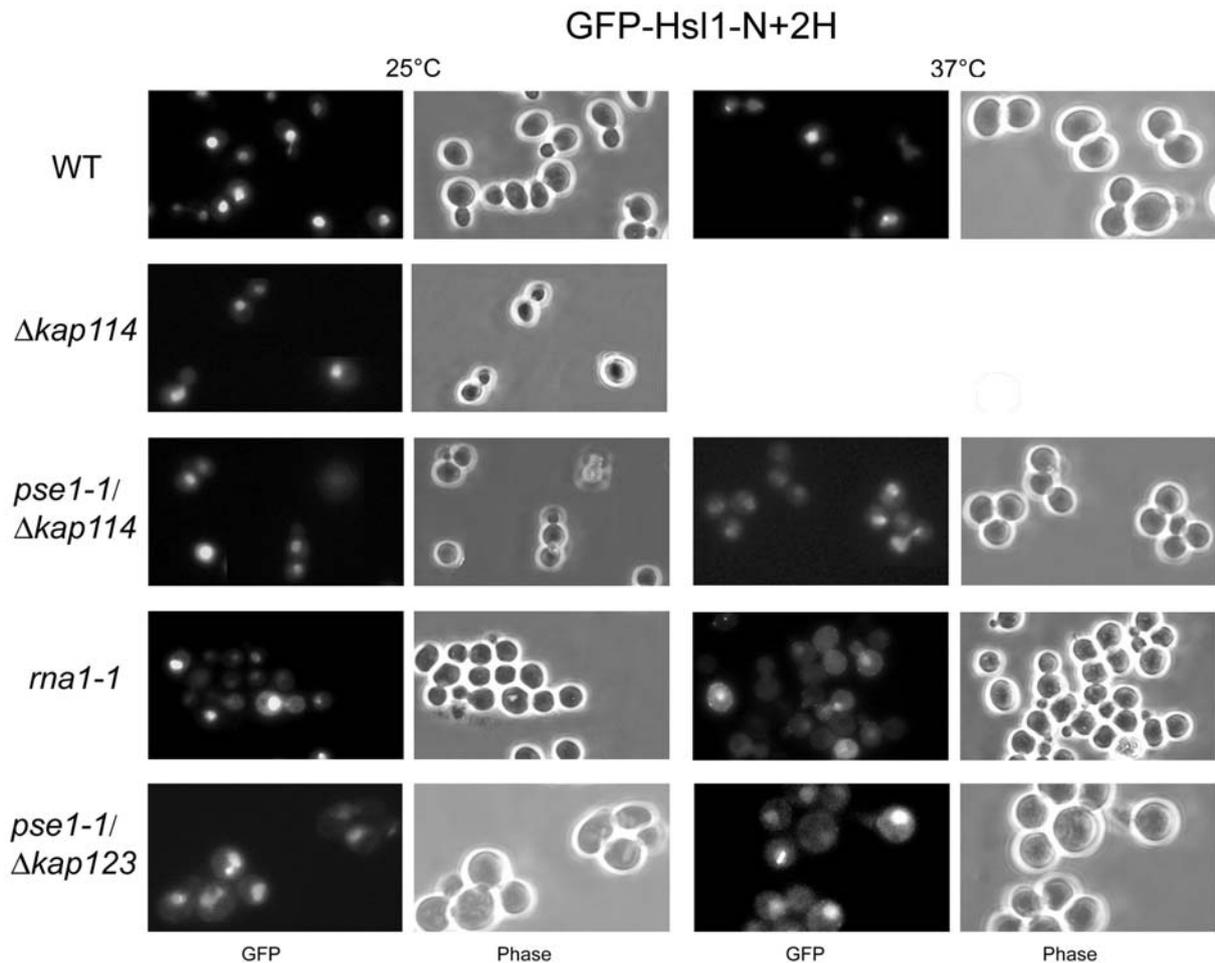


Abbildung 41: Hsl1-N+2H wird Gsp1-abhängig importiert und Pse1 und Kap123 sind in diesen Import involviert

Der Vektor YCpGAL-*GFP-HSL1-N+2H* wurde in den Wildtyp (WT) und die angegebenen Transportmutanten transformiert. Die Stämme wurden in Selektivmedium mit 2% Glukose angezogen, danach in Selektivmedium mit 2% Raffinose verdünnt und über Nacht bei 25°C kultiviert. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Synthese der Fusionsproteine durch Zugabe von 2% Galaktose für 2,5 h induziert. Die temperatursensitiven Mutanten wurden nach 1 h Galaktose-Induktion für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Es wurden Proben entnommen und die GFP-Fusionen der Fragmente mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* lokalisiert. Die Hefezellen wurden über Phasenkontrast dargestellt.

2.8 Kap114 und die Mitoseregulation

Eine andere Möglichkeit, warum Kap114 mit Hsl1 interagiert und im Zwei-Hybrid Screen gefunden wurde, ist, dass es eine bisher nicht bekannte Funktion bei der Mitoseregulation ausübt und wie Hsl1 Bestandteil der Signalkaskade ist. Wenn dies der Fall wäre, müsste eine $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Doppelmutante eine Verstärkung des Phänotyps der verlängerten "buds" bewirken. Zudem sollte eine zusätzliche Swe1-Deletion in dem $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Stamm diesen Phänotyp vollständig unterbinden.

Es wurden verschiedene Deletionsstämme bezüglich ihres Phänotyps untersucht. Von $\Delta hsl1$ und $\Delta nap1$ ist bekannt, dass diese Deletionen einen milden Phänotyp im Hinblick auf die verlängerten "buds" hervorrufen (Longtine *et al.*, 2000). Von beiden Stämmen wurde die jeweilige $\Delta kap114$ -Doppelmutante untersucht. Zusätzlich wurde die Dreifachmutante $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta swe1$ analysiert, die den Phänotyp des Wildtyps zeigen sollte. Desweiteren wurde die Deletionsmutante $pse1-1/\Delta hsl1/\Delta kap114$ untersucht, da Hsl1 *in vivo* und *in vitro*-Interaktionen mit Pse1 zeigte und der veränderte Phänotyp nach *HSL1*-Überexpression verstärkt in dieser Mutante auftrat. Als Negativkontrolle wurde die Doppelmutante $\Delta hsl1/\Delta kap123$ verwendet. Nach einer weiteren Deletion des Importins Kap123 sollte sich der milde Hsl1-Phänotyp nicht verstärken. Es wurde ebenfalls die Dreifachmutante $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$ analysiert, die, falls alle drei Proteine innerhalb der Signalkaskade agieren, einen sehr ausgeprägten Phänotyp zeigen sollte.

Die verschiedenen Deletionsmutanten wurden über die Methode von Longtine *et al.* (1998) hergestellt. Die Gendelektionen wurden auf DNA-Ebene durch Isolierung der genomischen DNA und anschließende PCR, die die Integration des Markers in den korrekten Genlocus anzeigt, überprüft. Zudem wurde mit einer zweiten PCR nachgewiesen, dass die jeweiligen Gene deletiert sind (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 42 ist der Phänotyp der verschiedenen Deletionsmutanten dargestellt. Als Kontrolle ist zum einen der Wildtyp und zum anderen die $kap114$ -Mutante, die ebenfalls den Phänotyp des Wildtyps aufweist, abgebildet. Sowohl in der $\Delta hsl1$ - als auch in der $\Delta nap1$ -Mutante traten vereinzelt Zellen mit verlängerten "buds" auf, die Mehrzahl der Zellen zeigte allerdings ein normales Wachstumsverhalten. In der $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Doppelmutante kam es zu einer eindeutigen Verstärkung des veränderten Phänotyps, deutlich mehr Zellen zeigten eine Mitoseverzögerung und damit einhergehend verlängerte "buds".

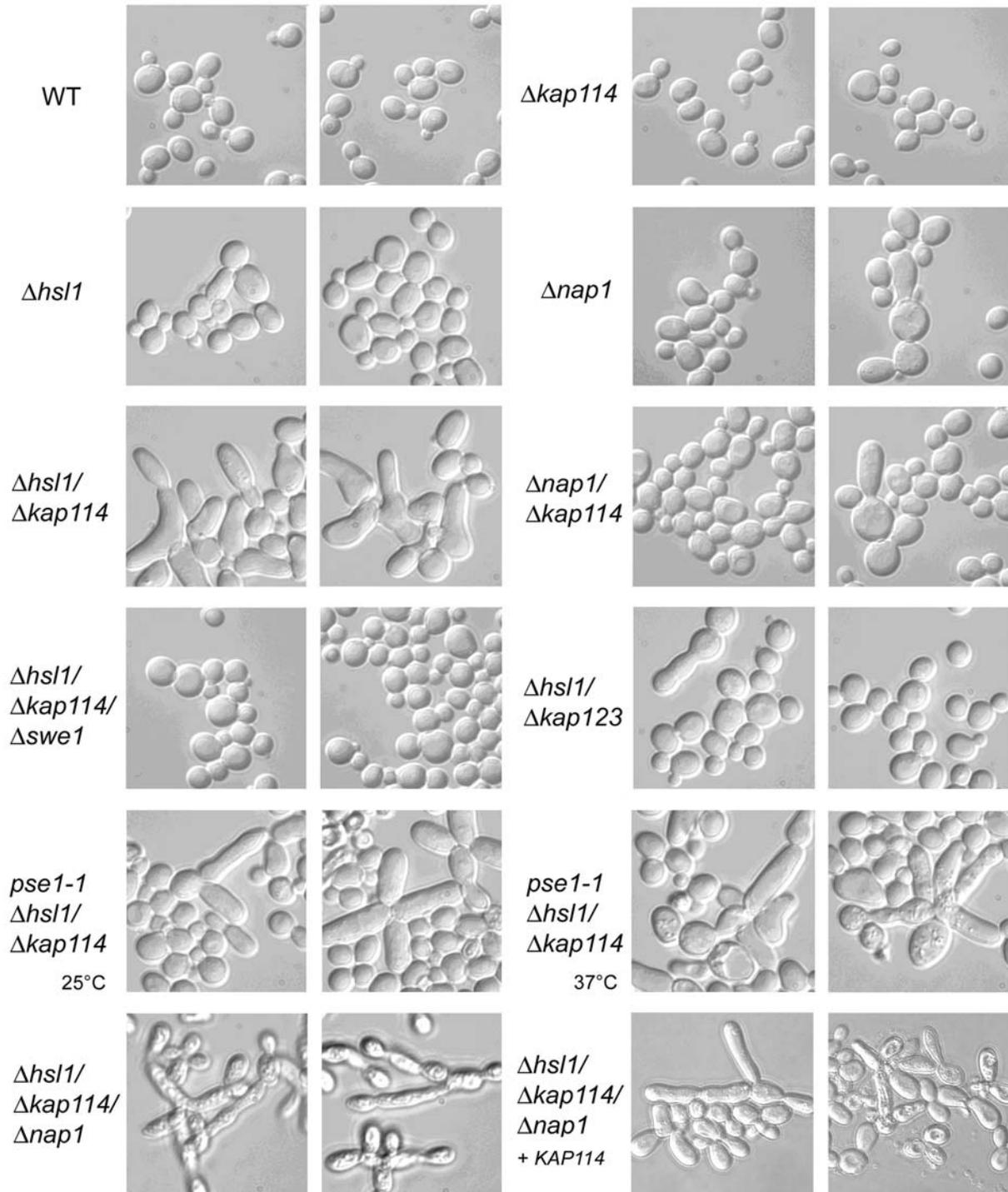


Abbildung 42: Effekte der *pse1-1*, *Δhsl1*, *Δnap1* und *Δkap114* Mutationen auf die "bud"- Morphologie der Hefezellen

Die angegebenen Deletionsmutanten wurden bei 30°C (*pse1-1/Δhsl1/Δkap114* bei 25°C) in den entsprechenden Selektivmedien angezogen. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurden Proben entnommen und der Phänotyp der Hefezellen mittels Nomarski-Optik analysiert. Die temperatursensitive Mutante *pse1-1/Δhsl1/Δkap114* wurde zudem für 1,5 h bei 37°C kultiviert.

Nach einer zusätzlichen *SWE1*-Deletion in diesem Stamm war bei allen Zellen nur noch der Phänotyp des Wildtyps nachzuweisen. In der Doppelmutante $\Delta nap1/\Delta kap114$ kam es ebenfalls zu einer Zunahme an Zellen mit verlängerten "buds", allerdings nur in einem geringen Ausmaß. Die Negativkontrolle $\Delta hsl1/\Delta kap123$ zeigte den gleichen milden Phänotyp wie die $\Delta hsl1$ -Einfachmutante. Einen sehr deutlichen Effekt zeigte die temperatursensitive *pse1-1*/ $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Mutante. Bei 25°C war der Phänotyp ähnlich der des $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Deletionsstammes und bei 37°C schien sich der Phänotyp der verlängerten "buds" noch zu verstärken, was aber auch mit dem Hitzestress zusammenhängen könnte. Die Dreifachmutante $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$ zeigte den markantesten Phänotyp. Zum einen besaßen viele Zellen verlängerte "buds", zum anderen waren die "buds" teilweise verzweigt und drei- bis vierfach länger als die Mutterzelle. Auch wurde eine Veränderung der Zellwand beobachtet, die Zellen zeigten sich plissiert. Durch das Einbringen eines *KAP114*-Plasmids in die Dreifachmutante $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$ wurde der Phänotyp etwas abgemildert, aber er war immer noch in einem stärkeren Ausmaß nachzuweisen als in allen anderen untersuchten Mutanten.

Diese Ergebnisse belegen, dass Kap114 eine Funktion bei der Mitoseregulation ausübt und anscheinend auch innerhalb der Signalkaskade agiert. Ob Pse1 in diesem Zusammenhang auch eine Rolle spielt, konnte mit diesem Experiment nicht abschließend geklärt werden.

Um eine quantitative Aussage bezüglich des veränderten Phänotyps der einzelnen Hefestämme treffen zu können, wurde das Experiment wiederholt und von jedem Hefestamm mindestens 500 Zellen analysiert. Es wurde der prozentuale Anteil an Zellen mit großem "bud" (large budded), die sich kurz vor oder in der Mitose befanden, und an Zellen mit verlängertem "bud" bestimmt (Abbildung 43). Zellen mit verlängertem "bud" wurden als solche bestimmt, wenn der "bud" mindestens zweimal so lang wie die Mutterzelle war.

Im Wildtyp traten keine Zellen mit verlängertem "bud" auf, der Anteil an Zellen, die sich kurz vor oder in der Mitose befanden, belief sich auf 16%. Die $\Delta kap114$ -Mutante zeigte den gleichen Phänotyp, keine Zellen mit verlängertem "bud" und der Anteil an Zellen mit großem "bud" betrug 18%. Im $\Delta hsl1$ -Deletionsstamm besaßen 20% der Zellen einen großen "bud" und 3% zeigten einen verlängerten "bud". Der Phänotyp der verlängerten "buds" war hier nur schwach ausgeprägt. In der $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Doppelmutante war ein deutlicher Anstieg von Zellen, die sich im letzten Abschnitt der Mitose befanden, auf 36% zu verzeichnen. Außerdem traten dreimal so viele Zellen mit verlängertem "bud" auf (9%) als in der $\Delta hsl1$ -Einfachmutante. In der temperatursensitiven Dreifachmutante *pse1-1*/ $\Delta hsl1/\Delta kap114$

wurde bei permissiver Temperatur nochmals ein Anstieg der Zellen, die einen großen "bud" besaßen, auf 53% beobachtet. Der Anteil an Zellen, die verlängerte "buds" besaßen, lag bei 10% und war damit vergleichbar mit der $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Mutante. Bei restriktiver Temperatur blieb die Anzahl an Zellen, die einen großen "bud" zeigten, in etwa gleich (56%), dafür erhöhte sich der Anteil an Zellen mit verlängertem "bud" deutlich auf 17%. Wurde *Swe1* in dem $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Stamm zusätzlich deletiert, traten keine Zellen mit verlängerten "buds" mehr auf, der Anteil an Zellen mit großem "bud" blieb leicht erhöht bei 23%. Es wurden als Negativkontrollen die beiden Stämme $\Delta hsl1/\Delta kap123$ und $\Delta hsl1/\Delta nmd5$ untersucht. Der Anteil an Zellen kurz vor der Mitose war bei beiden in etwa gleich (10% bzw. 12%). Verlängerte "buds" zeigten in der $\Delta hsl1/\Delta kap123$ -Mutante nur 0,5% der Zellen und im $\Delta hsl1/\Delta nmd5$ -Deletionsstamm 4%. Die $\Delta nap1$ -Einfachmutante zeigte einen sehr milden Phänotyp bezüglich der verlängerten "buds", lediglich 1% der Zellen wiesen welche auf, und vergleichbar mit dem Wildtyp besaßen 17% der Zellen einen großen bud. Bei der Doppelmutante $\Delta nap1/\Delta kap114$ war wiederum ein deutlicher Anstieg an Zellen zu verzeichnen, die kurz vor oder in der Mitose waren (33%), während der Anteil an Zellen mit verlängertem "bud" gleich blieb (1%). In der Dreifachmutante $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$ war in 25% der Zellen die Mitose verzögert und es wurden teilweise sehr lange und auch verzweigte "buds" beobachtet. Nur noch 20% der Zellen zeigten einen großen "bud".

Mit der Quantifizierung wurden die qualitativen Ergebnisse des vorherigen Experiments bestätigt. Es wurde gezeigt, dass die zusätzliche Deletion von *KAP114* im $\Delta hsl1$ -Stamm die Anzahl der Zellen mit verlängertem "bud" um ein Dreifaches erhöht und den Anteil an Zellen, die sich im letzten Mitoseabschnitt befinden, verdoppelt. Eine weitere Deletion von *SWE1* in dieser $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Mutante unterbindet den Phänotyp der verlängerten "buds" vollständig. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass *Kap114* Teil der Signalkaskade ist, die in der Hemmung von *Swe1* mündet. *Pse1* scheint in diesem Zusammenhang evtl. auch eine Rolle zu spielen, der Anteil an Zellen mit großem "bud" ist gegenüber der $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Mutante nochmals um ein anderthalbfaches erhöht, sowohl bei permissiver als auch bei restriktiver Temperatur. Bei restriktiver Temperatur erhöht sich zudem der Anteil an Zellen mit verlängerten "buds" um fast das Doppelte, was aber auch am Hitzestress der Zellen liegen könnte.

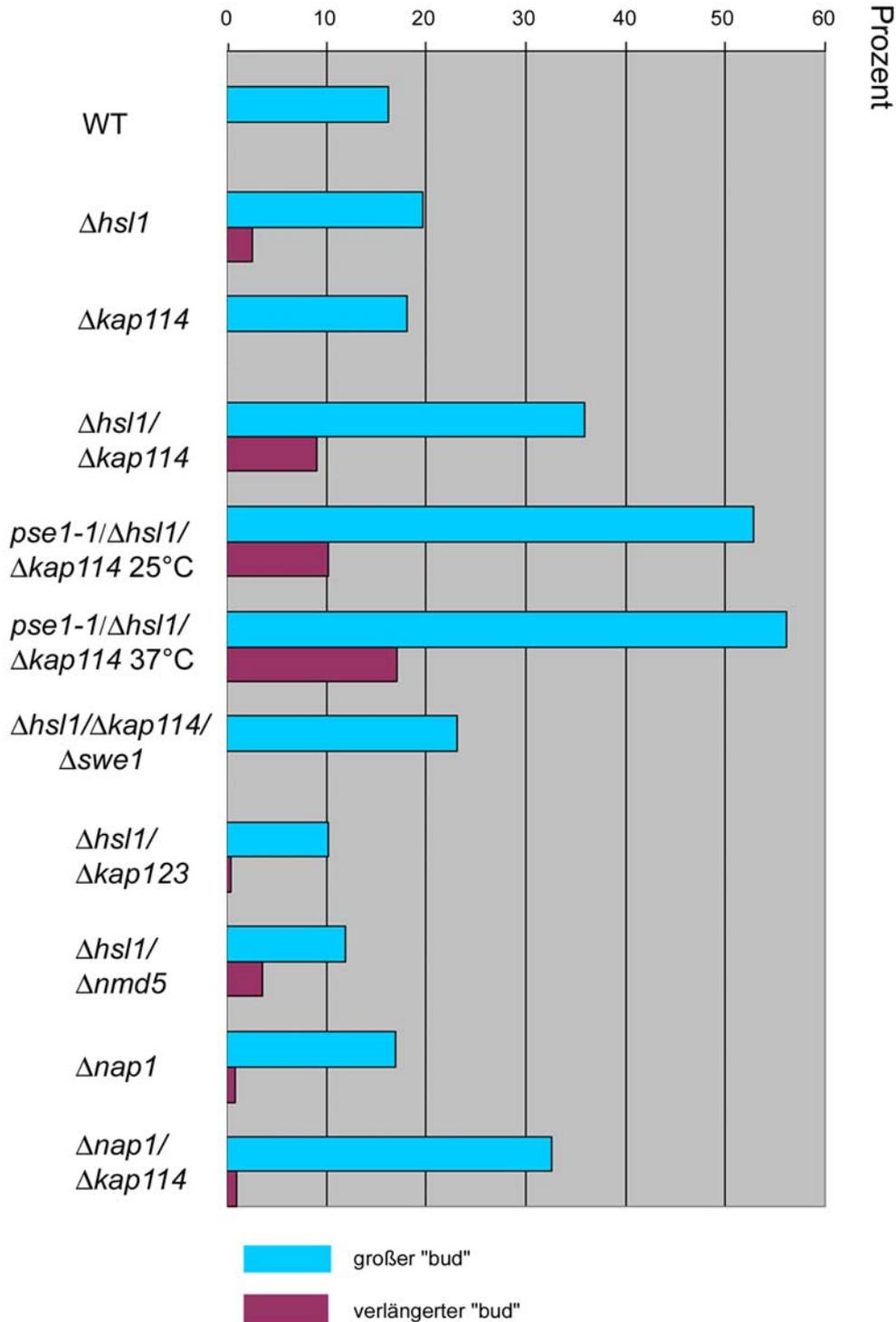


Abbildung 43: Quantifizierung der "bud"-Morphologie in Deletionsmutanten

Die angegebenen Deletionsmutanten wurden über Nacht bei 30°C (*pse1-1/ $\Delta hsl1/\Delta kap114$* bei 25°C) in den jeweiligen Selektivmedien angezogen. Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurden Proben entnommen und der Phänotyp der Hefezellen mittels Nomarski-Optik analysiert. Die temperatursensitive Mutante *pse1-1/ $\Delta hsl1/\Delta kap114$* wurde vor einer weiteren Probenentnahme für 1,5 Stunden bei 37°C kultiviert. Es wurden von jedem Hefestamm mindestens 500 Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil an Zellen mit verlängerten "bud" (mindestens zweimal so lang wie die Mutterzelle) und an Zellen, die einen großen "bud" besaßen (kurz vor oder in der Mitose), bestimmt.

Nap1 agiert wie Hsl1 innerhalb der Signalkaskade, die zum Mitoseeintritt führt (Barral *et al.*, 1999). Auch hier ist bei der Doppelmutante $\Delta nap1/kap114$ ein Anstieg der Zellfraktion, die einen großen "bud" tragen, um das Doppelte gegenüber der $\Delta nap1$ -Mutante zu verzeichnen. In der Dreifachmutante $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$ erhöhte sich die Anzahl der Zellen mit verlängerten "buds" um das achtfache gegenüber der $\Delta hsl1$ -Einfachmutante, der Anteil an Zellen mit großem "bud" war in etwa gleich (Abbildung 43).

Eine Interaktion von Kap114 und Nap1 wurde bereits *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen, wobei die Kap114/Nap1-Bindung Gsp1-GTP-unabhängig ist. Nap1 fungiert in der Regulation der Mitose, indem es die Gestaltung des "bud" kontrolliert und ist unter anderem auch in den Import der Histone H2A und H2B involviert (Mosammaparast *et al.*, 2002).

Da Hsl1 ebenso wie Nap1 eine Rolle bei der Mitoseregulation spielt und potentiell auch in den Zellkern importiert wird, wurde als nächstes untersucht, ob Hsl1vL und das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 mit Nap1 interagieren und ob diese Interaktion einen Einfluss auf die Bindung mit Kap114 zeigt. Auch von Yra1 wurde bereits mehrfach eine Interaktion mit Nap1 beschrieben (Gavin *et al.*, 2002 und 2006; Kashyap *et al.*, 2005). Deshalb wurden Yra1vL und das Zwei-Hybrid Fragment von Yra1 ebenfalls auf Interaktion mit Nap1 untersucht.

Die Zwei-Hybrid-Fragmente von Hsl1 und Yra1 sowie Hsl1 und Yra1 als volle-Länge-Protein wurden in *E. coli* als GST-Fusionen synthetisiert. Mit dem jeweiligen Gesamtzellysate und den in *E. coli* als His₆-Fusionen synthetisierten und gereinigten Transportfaktoren Kap114, Pse1 und Nap1 wurden Bindungsversuche durchgeführt.

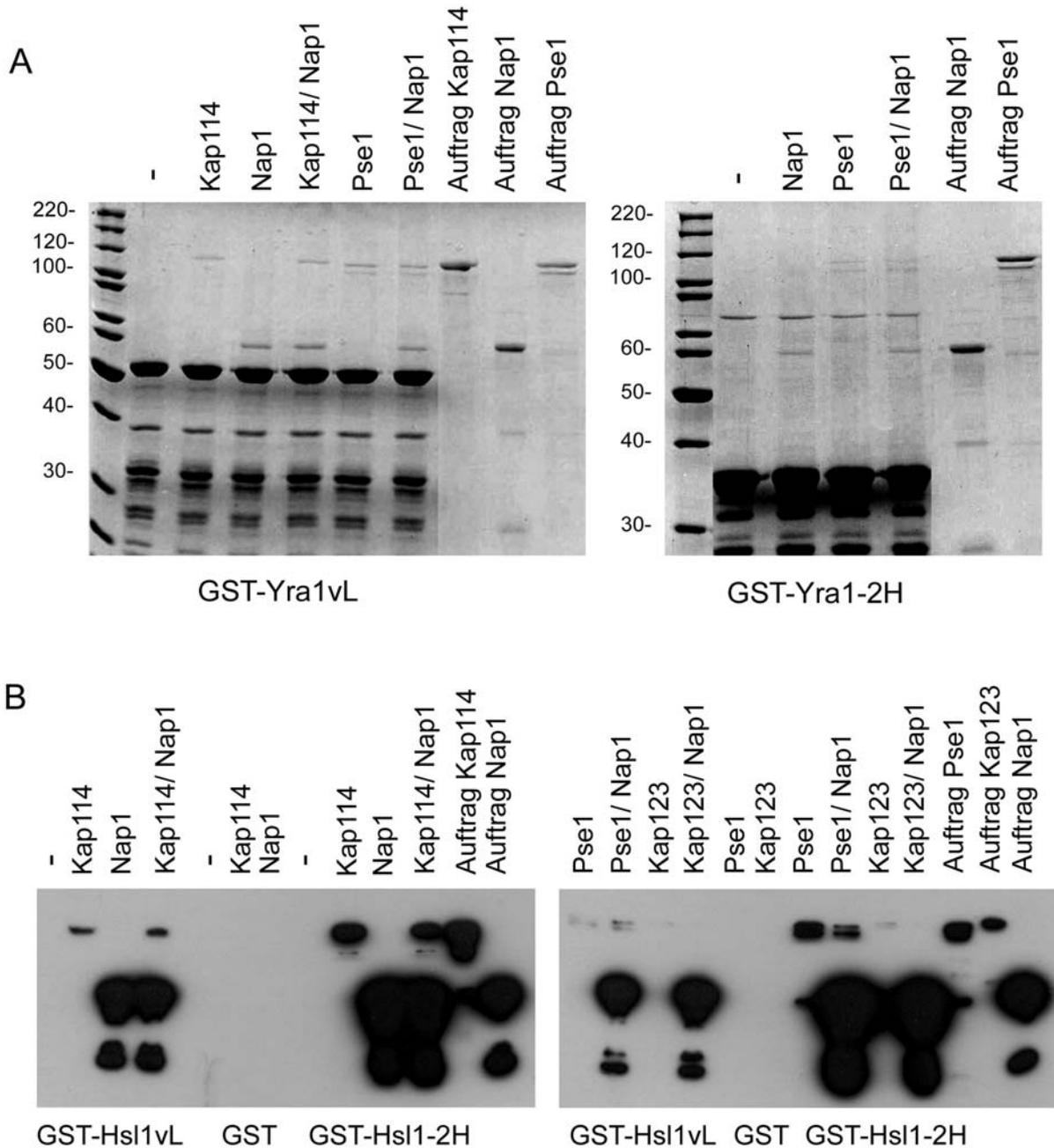


Abbildung 44: Yra1 und Hsl1 bilden einen Komplex mit Kap114 bzw. Pse1 und Nap1

Kap114, Pse1, Kap123 und Nap1 wurden als His₆-Fusionen in *E. coli* synthetisiert und gereinigt. Das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 und Yra1 sowie Hsl1 und Yra1 als volle Länge Protein wurden in *E. coli* BL21 als GST-Fusionen synthetisiert. Aus den Zellen wurde ein Gesamtzelllysat hergestellt, aus dem die Fusionsproteine durch Inkubation für 1 h bei 4°C unter Rollen an GSH-Sepharose gebunden wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBSKMT wurden die Ansätze mit jeweils 12 µg der His₆-Fusionsproteine versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. (A) Danach wurden die Proben dreimal gewaschen, die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Die Angaben der Proteinstandards sind in kDa.

(B) Die Eluate des Bindungsversuches wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die gebundenen Proteine wurden durch Immundetektion mit anti-Penta-His-Antikörpern (1:1000) analysiert. Als Negativkontrolle wurde der Bindungsversuch mit in *E. coli* synthetisiertem und gereinigtem GST durchgeführt.

In Abbildung 44 ist der Bindungsversuch für Yra1 und Hsl1 dargestellt. Yra1vL bindet an Kap114 und an Nap1 sowie an beide gleichzeitig. Auch war sowohl eine alleinige als auch eine gleichzeitige Bindung von Pse1 und Nap1 an Yra1 zu beobachten. Das Zwei-Hybrid Fragment von Yra1 zeigte ebenfalls eine Bindung an Pse1 und Nap1 und an beide zusammen, wobei sich beide Interaktionen verglichen mit Yra1vL in schwächerer Ausprägung zeigten. Hsl1vL und das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 wurden im Komplex mit Kap114, Nap1 und beiden zusammen nachgewiesen. Das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 zeigte hierbei die stärkere Interaktion. Auch Pse1 und Nap1 konnten einzeln und gleichzeitig sowohl an Hsl1vL als auch an das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 binden, wobei die Interaktion des Zwei-Hybrid-Fragmentes von Hsl1 stärker ausgeprägt war. Bei Pse1 zeigte sich bei Hsl1vL eine etwas stärkere Bindung ohne Nap1 und bei dem Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 wurde die Bindung durch Nap1 eher abgeschwächt. Mit Kap123 wurde nur eine sehr schwache Interaktion nachgewiesen, im Komplex mit Nap1 war es nicht nachzuweisen. Die Negativkontrolle GST zeigte keine unspezifischen Wechselwirkungen (Abbildung 44).

Die Bindungen von Kap114, Pse1 und Nap1 an Yra1vL und Hsl1vL waren weder kooperativ noch kompetitiv, so dass zu vermuten ist, dass Yra1 und Hsl1 unterschiedliche Bindungsstellen für die Transportfaktoren Kap114 und Pse1 sowie für Nap1 besitzen. Die Zwei-Hybrid-Fragmente von Yra1 und Hsl1 zeigten prinzipiell die gleichen Bindungseigenschaften wie die vollständigen Proteine, lediglich die Stärke der Interaktionen war unterschiedlich. Dieses Ergebnis impliziert, dass die Bindungsregionen für die Transportfaktoren Pse1 und Kap114 und die für Nap1 nahe beieinander liegen.

Zusammenfassend lässt sich aus dem Experiment schließen, dass sowohl Yra1 als auch Hsl1 in der Lage sind, einen Komplex mit Kap114 und Nap1 bzw. mit Pse1 und Nap1 zu bilden.

Im Fall von Hsl1 könnten diese Komplexe sowohl im Zellkern als auch in der Mitoseregulation eine Rolle spielen.

IV Diskussion

1 Split-Ubiquitin-Analysen

Das Split-Ubiquitin System stellt eine vielversprechende *in vivo* Methode dar, die einige Restriktionen anderer Systeme überwinden kann. Im Split-Ubiquitin System werden die beiden Subdomänen Cub und Nub des Ubiquitin mit zu untersuchenden Proteinen fusioniert. Eine Interaktion der Proteine führt zur Reassoziierung der Subdomänen und zur Rekonstitution von Ubiquitin. Der Nachweis einer Interaktion wird durch das irreversible Abspalten des Reporterproteins durch Ubiquitin-spezifische Proteasen vermittelt, die sowohl im Kern als auch im Cytoplasma vorkommen, so dass das System nicht auf ein Kompartiment beschränkt ist. Ursprünglich entwickelt, um Interaktionen von Membranproteinen darstellen zu können (Johnsson & Varshavsky, 1994), wird das Split-Ubiquitin System mittlerweile auf vielfältige Art und Weise genutzt. Es können damit auch Interaktionen von löslichen, nukleären oder cytosolischen Proteinen und, da der Nachweis der Interaktion nicht wie beim Zwei-Hybrid System über die Transkription erfolgt, zudem transkriptionsaktivierende oder -hemmende Faktoren untersucht werden (Laser *et al.*, 2000; Lehming, 2002; Lobert, 2000). Zudem wurde nachgewiesen, dass auch *in vivo*-Konformationsstudien eines Proteins mit dem Split-Ubiquitin System möglich sind (Raquet *et al.*, 2001).

Mehrere Reportersysteme stehen zur Verfügung, neben dem R-URA3 basierten System, wurde R-GFP, das in allen eukaryotischen Organismen verwendet werden kann, eingesetzt (Laser *et al.*, 2000). Auch wurde R-Gpt2 als Reportersystem etabliert, das ermöglicht dieses System bei Säugerzellen anzuwenden (Rojo-Niersbach, 2000). Als Transaktivator wurde der von Stagljar *et al.* (1998) bereits beschriebene, künstliche Transkriptionsfaktor LexA-VP16 verwendet, was die Nutzung aller für den konventionellen Zwei-Hybrid Screen entwickelten Hefestämme möglich macht. Diese Version, die als membranbasiertes Split-Ubiquitin-Zwei Hybrid-System (MbYTH) bezeichnet wird, war bisher auf Membranproteine beschränkt. Diese Restriktion wurde aufgehoben, indem kürzlich eine neue Variante entwickelt wurde, die es ermöglicht lösliche Proteine zu untersuchen (siehe Diskussion 1.2; Möckli *et al.*, 2007).

Basierend auf dem Split-Ubiquitin System sind Screens zur Detektion neuer Interaktionspartner mittlerweile für Membranproteine etabliert, und auch für lösliche Proteine wurden bisher einige beschrieben (Lehming, 2002; Möckli *et al.*, 2007).

1.1 Interaktionen des Nukleoporins Nup2 mit Transportfaktoren

Mit dem Split-Ubiquitin System sollte untersucht werden, ob es möglich ist, Interaktionen von Nukleoporinen als stationäre Phase des Kerntransportes mit Kerntransportfaktoren als mobile Phase des Kerntransportes darzustellen. Dazu wurde das Nukleoporin Nup2 verwendet, das sich mittlerweile als einzigartig unter den Nukleoporinen erwiesen hat. Das Nukleoporin Nup2 überwindet die klassische Teilung zwischen mobiler und stationärer Phase des nukleocytoplasmatischen Transports (Dilworth *et al.*, 2005). Es besitzt einige Charakteristika, die mit der ursprünglichen Klassifizierung als Nukleoporin einhergehen, wie "FG-Repeats" und die typische Ringfärbung der Kernhülle unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es gab allerdings auch Forschungsergebnisse, die nahelegen, dass Nup2 kein typisches Nukleoporin ist. So konnte Nup2 nicht mit NPCs angereichert werden (Rout & Blobel, 1993) und das subzelluläre Fraktionsprofil von Nup2 ähnelt eher dem der Transportfaktoren (Rout *et al.*, 2000). Dilworth *et al.* (2001) wiesen nach, dass Nup2 mobil ist, und Gsp1-GTP abhängig sowohl mit den cytoplasmatischen Fibrillen als auch mit der korbähnlichen Struktur des NPC interagiert. Nup2 ist in den nukleocytoplasmatischen Transport involviert, indem es den NLS-abhängigen Import und den Export von Srp1 koordiniert (Hood *et al.*, 2000; Solsbacher *et al.*, 2000). Neueren Studien zufolge kommt Nup2 auch eine Rolle bei der Chromatin-Organisation und der Transkriptionskontrolle zu (Dilworth *et al.*, 2005).

Mit dem Split-Ubiquitin System wurden Interaktionen von Nup2 sowohl als Nui- als auch als CubRUra3-Fusion mit Faktoren des nukleocytoplasmatischen Transports untersucht (Abbildung 17). Die bereits beschriebenen Interaktionen mit Srp1, Kap95, Cse1 und Gsp1 wurden mit beiden Nup2-Fusionsproteinen bestätigt. Nup2 dissoziiert den NLS-Protein/Srp1/Kap95 Importkomplex durch Bindung an Srp1 und es wurde nachgewiesen, dass sich der Exportkomplex Srp1/Cse1/Gsp1 an Nup2 bilden kann (Hood *et al.*, 2000; Solsbacher *et al.*, 2000). Da die Interaktion von Nup2 und Srp1 mit der Mutante Nua-Srp1 nicht mehr nachzuweisen war, scheint die Interaktion von Nup2 mit den Kerntransportfaktoren ebenso transient zu sein wie die der Kerntransportfaktoren untereinander.

Der Dissoziationsfaktor Yrb1 zeigte nur als Nui-Fusion eine leichte Interaktion mit Nup2-CubRUra3. Da hier auch eine leichte Interaktion mit der Kontrolle Nui-Guk1 zu verzeichnen war, handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Wechselwirkung. Auch interagierte Nup2 mit sich selbst, wobei unklar ist, ob es aufgrund der engen räumlichen Nähe und der Mobilität von Nup2 zu dieser Interaktion kommt oder ob Nup2 in der Lage ist Dimere zu bilden. Desweiteren ergaben die Untersuchungen eine relativ starke Interaktion mit Nui-

Prp20 (Abbildung 17). Eine genetische Interaktion zwischen Nup2 und Prp20 wurde bereits nachgewiesen (Booth *et al.*, 1999). Neuere Studien belegen, dass Nup2 mit Chromatin gebundenem Prp20 interagiert und beide in der NPC-vermittelten Transkriptionskontrolle fungieren (Dilworth *et al.* 2005). Einige Transportfaktoren zeigen „Boundary-Aktivität“, d.h. sie sind in der Lage Reportergene, die sich in stillgelegten Domänen befinden, spezifisch zu aktivieren. Nup2 kommt dabei eine Schlüsselrolle zu, indem es über die Interaktion mit Kerntransportfaktoren Chromatin an den NPC rekrutiert, und auf diese Weise die Transkription kontrollieren kann (Ishii *et al.*, 2002; Dilworth *et al.*, 2005).

Eine bisher noch nicht beschriebene Interaktion mit Xpo1 wurde in beiden Nup2-Assays (Nui- und CubRUra3-Fusion) detektiert (Abbildung 17). Xpo1 (Crm1) ist der bedeutendste Exportfaktor mit einer breiten Substratpalette. Er exportiert Substrate mit dem NES-Exportsignal und ist erforderlich für den Export von vielen RNAs. Unabhängig von der Exportfunktion koordiniert Crm1 zumindest in höheren Eukaryonten auch regulatorische und strukturelle Prozesse in der Mitose (Hutten & Kehlenbach, 2007). Die mittels dem Split-Ubiquitin System gefundene *in vivo*-Interaktion zwischen Xpo1 und Nup2 wurde durch *in vitro*-Bindungsassays bestätigt (Abbildung 18). Nup2 besitzt eine von den Transportrezeptoren verschiedene Gsp1p-GTP-Bindungsdomäne (Dingwall *et al.*, 1995) und es wurde gezeigt, dass Nup2 und Xpo1 einen Komplex mit Gsp1-GTP ausbilden. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass Nup2 eine Rolle beim Xpo1-vermittelten Export spielt, aber es wurde bereits von Booth *et al.* (1999) nachgewiesen, dass der NES-Export in *nup2*-Mutanten nicht beeinträchtigt ist. Die Interaktion zwischen Xpo1 und Nup2 könnte den Export aufgrund der Mobilität von Nup2 zwar beschleunigen, sie ist aber nicht zwingend notwendig. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Exportfaktor Xpo1 eine Rolle bei der Lokalisierung des mobilen Nukleoporins Nup2 spielt. Dies konnte aber nicht nachgewiesen werden, da Nup2 in der *xpo1-1*-Mutante eine unveränderte Lokalisierung zeigte.

Casolari *et al.* (2004) unternahmen eine genomweite Analyse der DNA-Bindungsmuster verschiedener Faktoren des nukleocytoplasmatischen Transports. Sie wiesen nach, dass die Transportfaktoren Kap95, Cse1 und Xpo1 und die Nukleoporine Nup2, Nup60 und Nup116 bevorzugt an hochexprimierte Gene binden und somit zumindest manche Gene am NPC aktiviert werden. Ishii *et al.* (2002) screenen nach Faktoren die eine „Boundary“-Aktivität besitzen, und fanden u.a. die Exportfaktoren Cse1, Los1 und Mex67. Sie zeigten außerdem, dass die „Boundary“-Aktivität über Nup2 vermittelt wurde, da sie in der *NUP2*-Deletionsmutante nicht mehr vorhanden war. Möglicherweise spielt Xpo1 ebenfalls in Assoziation mit Nup2 eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle, dies würde eine direkte

Interaktion von Nup2 mit Xpo1 erklären. Auch die anderen detektierten Interaktionen von Nup2 mit Kap95 und Cse1 könnten nicht nur im Zusammenhang mit der Rolle von Nup2 beim Im- und Export von Srp1 stehen, sondern darüber hinaus auch eine Funktion dieser Faktoren bei der Transkriptionskontrolle darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es grundsätzlich möglich ist, mit dem Split-Ubiquitin System die Interaktionen zwischen löslichen Kerntransportfaktoren und Nup2 darzustellen und nach neuen Interaktionspartnern für Nup2 zu screenen. Da Nup2 nicht als klassisches Nukleoporin eingeordnet werden kann, lässt sich aus diesen Experimenten nicht schließen, dass die Interaktionen der anderen Nukleoporene als stationäre Phase des Kerntransports ebenfalls nachzuweisen sind. Ein ähnliches Szenario bietet die Translokation von Proteinen durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Hier wurde bereits die transiente Interaktion des Membranproteins Sec62 mit der Signalsequenz eines zu transportierenden Proteins über das Split-Ubiquitin System nachgewiesen (Dünnwald *et al.*, 1999), es kann also angenommen werden, dass derartige Interaktionen prinzipiell darstellbar sind.

1.2 Screens mit dem Split-Ubiquitin System

Der Ansatz eines 2 μ -Überexpressionsscreens auf Basis des Split-Ubiquitin Systems erwies sich für Kerntransportfaktoren als experimentell nicht durchführbar. Bei Membranproteinen, die stabile, langlebige Komplexe bilden, ist eine Kompetition der Interaktionen nachweisbar (Wittke *et al.*, 1999), und in diesem Fall könnte ein derart gestalteter Screen neue Interaktionspartner detektieren. Aufgrund der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Überexpressionsscreens und der zahlreichen Überexpressionstests ist davon auszugehen, dass eine Kompetition der sehr transienten Interaktionen von Kerntransportfaktoren mit einem 2 μ Plasmid in dieser Form nicht möglich ist. Eine Möglichkeit wäre, durch Kupfertitration die Expression der Nui-Fusion soweit herabzusetzen, dass die Interaktion mit dem Cub-Fusionsprotein gerade noch nachweisbar ist und dadurch evtl. kompetierbar wird. Allerdings bestünde dadurch auch die Schwierigkeit, dass mit vermehrten falschen Positiven zu rechnen ist.

Ein ähnliches Problem war mit der Nui-Genbank zu verzeichnen. Unter dem sehr starken konstitutiven ADH-Promotor scheint das Nui alleine in der Lage zu sein, unspezifische Wechselwirkungen hervorzurufen. In den zuvor durchgeführten Interaktionstests, in denen Nui unter der Kontrolle des *CUPI*-Promotors stand, kam es nicht zu unspezifischen Interaktionen. Da man um transiente Interaktionen nachweisen zu können mit der Wildtypvariante Nui arbeiten muss, die im Prinzip auch selbständig mit Cub-Fusionen zu Ubiquitin reassoziieren kann, ist dieser Hintergrund ein allgemeines Problem der Nui-Genbanken.

Zwei R_{Ura3} basierte Split-Ubiquitin Screens mit löslichen, im Kern lokalisierten Proteinen wurden bisher veröffentlicht, es wurden jeweils neue Interaktionspartner mittels der Nui-Genbank für den transkriptionalen Aktivator Gal4 und den Repressor Tup1 gefunden (Laser *et al.*, 2000; Lehming, 2002). Bei diesen Screens wurden die Screenbedingungen restriktiver gestaltet, indem die Cub-Fusionen dem *CUPI*-Promotor unterstellt wurden. Durch diese erhöhte Expression wurden unspezifische Wechselwirkungen vermindert. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen dies, da bei Xpo1-CubR_{Ura3}, das von einem 2 μ Plasmid exprimiert wurde, weniger unspezifische Interaktionen auftraten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es prinzipiell möglich ist, mit Kerntransportfaktoren, deren Expression erhöht werden kann, mit dem Split-Ubiquitin System zu screenen. Dies ist aber nicht mit allen Faktoren des nucleocytoplasmatischen Transports möglich, da eine Überexpression toxisch wirken kann und die Hefezellen auch in der Lage sind, die Expression herunter zu regulieren. Die Expression des zu untersuchenden Kerntransportfaktors müsste genau eingestellt und überprüft werden. Hinzu kommt, dass es bei Screens mit Selektion über FOA-Resistenz allgemein das Problem mit vermehrten falschen Positiven aufgrund unspezifischen Wachstums in Gegenwart von FOA gibt (Petascheck *et al.*, 2001).

Eine andere Möglichkeit stringenter zu screenen, wäre die Verwendung der Nuv-Variante, die ein Valin anstatt des Wildtyp Isoleucin trägt und deren Affinität zum Cub zwischen der des Wildtyps und Nua liegt (Johnsson & Varshavsky, 1994). Falls die Affinität des Nuv ausreicht, um die transienten Interaktionen der Kerntransportfaktoren nachzuweisen, wäre es somit möglich, ein feineres Raster einzuführen und unspezifische Interaktionen zu vermindern.

Eine neue Version des Split-Ubiquitin Systems wurde kürzlich veröffentlicht, das cytoY2H (cytosolic yeast Two-hybrid system). Es wurde vor allem entwickelt, um die Restriktionen des klassischen Zwei-Hybrid Systems bezüglich transkriptional aktiver Proteine zu überwinden. Als Reporterprotein wurde der Transkriptionsfaktor LexA-VP16 verwendet. Der Köder wird in diesem System über eine kurze Fusion mit den integralen Membranprotein

Ost4 an die ER-Membran verankert, um den Eintritt in den Kern zu verhindern. Das zweite, lösliche Protein bzw. die Genbank wird mit der Mutante Nug fusioniert, die keine intrinsische Affinität zu Cub mehr hat. Im Falle einer Interaktion der beiden Fusionsproteine wird der Transkriptionsfaktor abgespalten und aktiviert im Kern die Transkription der Reportergene (*HIS3*, *ADE2*, *LacZ*) (Möckli *et al.*, 2007). Das cytoY2H könnte das Problem der unspezifischen Wechselwirkungen, die in den Screens mit den Kerntransportfaktoren nur aufgrund der räumlichen Nähe von Cub und Nui zustande kamen, lösen. Ob es allerdings in der Lage ist, alle Interaktionen der Kerntransportfaktoren darzustellen, wäre zu untersuchen. Die Membranverankerung und die damit einhergehende sterische Behinderung könnten ein Problem darstellen und es ist fraglich, ob Exportkomplexe, die normalerweise im Cytoplasma dissoziiert werden, überhaupt nachweisbar wären.

2 Zwei-Hybrid-Analysen

Das Zwei-Hybrid System stellt sich für die Kerntransportfaktoren allgemein als das etabliertere und einfacher zu handhabende System dar. Allerdings ist auch hier eine ähnliche Restriktion wie die des cytoY2H bezüglich der Importkomplexe vorhanden. Da Importkomplexe nach der Translokation durch den NPC im Kern dissoziiert werden, die Interaktion aber im Kern stattfinden muss, um über Zwei-Hybrid nachgewiesen zu werden, wurde anfangs nicht erwartet, dass diese Interaktionen mittels Zwei-Hybrid detektiert werden können. Mittlerweile wurden einige Importkomplexe wie beispielweise Srp1/Kap95 (Künzler & Hurt 1998; Pohl 1999) oder Kap120/Rpf1 (Caesar *et al.*, 2006) mittels Zwei-Hybrid nachgewiesen. Die Nachweisbarkeit hängt hier wahrscheinlich von der Halbwertszeit der Importkomplexe im Kern ab.

In dieser Arbeit wurden mittels Zwei-Hybrid Screens verschiedene Interaktionspartner von Kerntransportfaktoren gefunden, einige davon zeigen die Charakteristika von Importsubstraten.

2.1 Nmd5 interagiert mit Nup1

Für das Importin Nmd5 sind bereits einige Importsubstrate beschrieben worden, wie die MAP-Kinase Hog1, die Transkriptionsfaktoren TFIIS und Crz1 und Rpf1 (Referenzen, Tabelle 1). Auch wurde Nmd5 *in vitro* im Komplex mit Gsp1 nachgewiesen (Albertini *et al.*, 1998; Greiner *et al.*, 2004). Es wurde bereits gezeigt, dass aus einem Zellextrakt die Nukleoporine Nup159, Nup2 und Nup1 an Nmd5 binden (Albertini *et al.*, 1998). Da alle drei Nukleoporine zu den FG-Nups gehören und Nup159 an den cytoplasmatischen Fibrillen und Nup1 und Nup2 an der korbähnlichen Struktur lokalisiert sind, stellen diese Interaktionen wahrscheinlich die Andockstellen von Nmd5 an den NPC dar. Die Interaktion von Nmd5 mit Nup1 zeigte sich in dieser Arbeit Gsp1-GTP abhängig, was darauf hindeutet, dass Importkomplexe mit Nmd5 an Nup1 binden können, das Substrat freigesetzt wird und sich der Exportkomplex Nmd5/Gsp1-GTP an Nup1 bilden kann. Dieses Modell steht im Einklang mit gegenwärtigen Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass Transportkomplexe im Allgemeinen am oder zumindest in der Nähe des NPC gebildet werden (Fahrenkrog *et al.*, 2004).

2.2 Mak21 zeigt Bindungen an mehrere Importine

Mak21 wurde mit dem Transportfaktor Sxm1 gefunden. Sxm1 wurde aufgrund eines synthetischen Fitness-Screens mit einer *kap123*-Mutante ebenso wie Pse1 und Nmd5 eine Rolle beim Import ribosomaler Proteine zugewiesen (Sydorsky *et al.*, 2003). Ein weiteres Importsubstrat ist das multifunktionale RNA-Bindungsprotein Lhp1 (Rosenblum *et al.*, 1997 und 1998). Mak21/Noc1 ist ein Bestandteil des 66S prä-ribosomalen Partikels, es ist erforderlich für die Biogenese der großen ribosomalen Untereinheit und scheint in den Export von prä-Ribosomen involviert zu sein. Außerdem ist es verantwortlich für die Aufrechterhaltung von dsRNA Viren (Edskes *et al.*, 1998; Milkereit *et al.*, 2001). Mak21 ist ein essentielles Protein, eine Überexpression führt zu einem Defekt im Transport der 60S Untereinheit, aber die rRNA Prozessierung ist nicht gestört, während Mak21-Mutanten Defekte in beiden Prozessen zeigen. Noc-Proteine haben eine dynamische, intranukleäre Lokalisation, sie pendeln zwischen Nukleolus und Kern, eine notwendige Voraussetzung für den intranukleären Transport von prä-ribosomalen Partikeln. Mak21 wurde in dieser Arbeit

im Nukleolus lokalisiert und durch andere Arbeitsgruppen wurde mittlerweile nachgewiesen, dass Mak21 zu 80% im Nukleolus residiert, ähnlich wie die RNA-Polymerase II (Milkereit *et al.*, 2001). Diese Verteilung ist abhängig von Noc2, das sowohl mit Mak21 (Noc1) im Nukleolus als auch mit Noc3 im Nukleus einen heteromeren Komplex bildet. Es wird angenommen, dass Mak21 (evtl. im Komplex mit Noc2) für den Export der Präribosomen aus dem Nukleolus verantwortlich ist und Noc3 (evtl. im Komplex mit Noc2) für den Export ins Cytoplasma (Milkereit *et al.*, 2001). Dafür spricht auch, dass α -helikale Strukturen in den Noc-Proteinen nachgewiesen wurden, die den "HEAT-Repeats" der Transportfaktoren ähneln (Dlakić *et al.*, 2004).

Im Screen wurde der äußere Teil des C-Terminus von Mak21 gefunden (Aminosäurereste 956-1026) und da Mak21-2H mit den Importfaktoren Sxm1, Kap114, Pse1 und Nmd5 interagiert sowie eine sehr starke Bindung an Srp1 und Srp1/Kap95 zeigte (Abbildung 27), wurde vermutet, dass es sich hier um eine NLS-ähnliche Sequenz handelt. In der Tat besitzt Mak21 am C-Terminus eine lysinreiche Region, von der postuliert wurde, dass sie für die nukleäre Lokalisierung verantwortlich ist (Milkereit *et al.*, 2001). Diese C-terminale Region von Mak21 ist hochreaktiv, was sich auch darin zeigte, dass sich mit allen untersuchten Importfaktoren im Two-Hybrid Assay eine Interaktion nachweisen ließ (Abbildung 26). Hier war die Interaktion mit Kap95 und Srp1 allerdings nicht ausgeprägter als die der anderen Importer. Jedoch kann ein substanzieller Teil dieser Region deletiert werden ohne die Funktionalität des Proteins zu zerstören. Eine Deletion von 64 Aminosäureresten des C-Terminus führt zwar zu leichten Funktionsbeeinträchtigungen, aber es können bis zu 121 Aminosäurereste deletiert werden bevor es zum vollständigen Funktionsverlust kommt (Milkereit *et al.*, 2001). Edskes *et al.* (1998) zeigten, dass *MAK21 Δ 827* eine *MAK21*- Mutante nicht mehr komplementieren kann und misslokalisiert im Nukleus und zu einem geringen Teil auch im Cytoplasma vorliegt. Dies spricht dafür, dass zumindest die Nukleolus Lokalisierung von dieser Region abhängt, evtl. weil sie die Noc2 Bindungsregion darstellt.

Die untersuchten Transportfaktoren Sxm1, Kap114, Pse1 und Srp1, die *in vivo* und *in vitro* eine Interaktion mit Mak21 zeigten, sind nicht alleine für den Import von Mak21 verantwortlich, da in keiner der untersuchten Transportmutanten eine cytoplasmatische Misslokalisierung gezeigt werden konnte (Abbildung 25 und 29). Da Mak21 ein essentielles Protein ist gibt es vermutlich auch hier redundante Transportwege und es müssten zumindest Dreifachmutanten kreiert werden um eine Misslokalisierung evtl. nachweisen zu können. Da substanzielle Teile der postulierten NLS ohne Funktionsverlust deletiert werden können,

scheint es noch eine zweite NLS in Mak21 zu geben, möglicherweise nutzt das Protein deshalb mehrere Importine.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Sxm1 in den intranukleären Transport von prä-ribosomalen Partikeln involviert ist und dass es sich bei der Mak21/Sxm1-Wechselwirkung um eine echte Interaktion handelt. Dazu würde passen, dass Sxm1 als Importin für ribosomale Proteine fungiert (Sydorsky *et al.*, 2003), sich die Interaktion mit Mak21 in dieser Arbeit als Gsp1-GTP unabhängig zeigte und sich in der *sxm1*-Mtante *in vivo* eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Nukleus nachweisen ließ (Abbildung 25). Da sich diese Verschiebung auch in den *srp1*-Mutanten zeigte (Abbildung 29), könnte evtl. auch Srp1 eine Rolle beim intranukleären Transport spielen. Mit den Daten dieser Arbeit lässt sich das allerdings nicht belegen. Da es sich bei dem gefundenen Fragment von Mak21 um ein kurzes Stück des C-Terminus handelt, dessen Funktion unbekannt ist und der ohne große Funktionsbeeinträchtigung deletiert werden kann, könnte es sich genauso gut um unspezifische Wechselwirkungen handeln, die dadurch zustande kommen, dass dieses Fragment mit NLS ähnlichen Sequenzen hoch reaktiv ist und vielleicht in einem korrekt gefalteten Protein so gar nicht zugänglich wäre. Hier würden weitere Bindungsstudien mit dem gesamten Protein und Lokalisierungen in Mehrfachmutanten mit Nop1-Doppelfärbung Aufschluss bringen.

2.3 Das Importin Kap114

Kap114, mit dem alle im Folgenden diskutierten Proteine gefunden wurden, ist ein nicht essentielles Importin, das vorwiegend im Kern, aber auch im Cytoplasma lokalisiert ist (Pemberton *et al.*, 1999). Kap114 weist mehrere Besonderheiten auf, zum einen stellt es sich als Hauptimportweg mehrerer essentieller Proteine wie der Transkriptionsfaktoren Tbp1 und Sua7 und der Histone H2A und H2B dar, die alle noch andere Importrouten nutzen können (Pemberton *et al.*, 1999; Mosammaparast *et al.*, 2001b; Greiner *et al.*, 2004; Hodges *et al.*, 2005). Zum anderen wurde für Kap114 mehrfach nachgewiesen, dass es in der intranukleären Zielfindung eine Rolle spielt. So ist für die Dissoziation seiner Importkomplexe Gsp1-GTP alleine nicht ausreichend sondern es werden zusätzliche Faktoren, wie DNA bei Histonen bzw. DNA, die eine TATA-Sequenz besitzt, bei Tbp1, benötigt (Greiner *et al.*, 2004; Pemberton *et al.*, 1999). Desweiteren wird angenommen, dass Kap114 mehrere Proteine

simultan in den Zellkern transportiert, da es multiple Substratbindungsdomänen besitzt. Tbp1 und Sua7, zwei Komponenten des Präinitiationskomplexes, interagieren im Cytoplasma miteinander und es wird vermutet, dass sie zusammen importiert werden. Auch wurde ein Komplex aus Kap114 mit Sua7, Nap1 und den Histonen H2A und H2B nachgewiesen (Hodges *et al.*, 2005). Ein Koimport würde die Freisetzung der Substrate im gleichen nukleären Kompartiment sicherstellen. Die Bindung des Histonchaperons Nap1 ist nicht notwendig für den Import von H2A und H2B, da auch eine direkte Bindung an Kap114 möglich ist. Nap1 prädestiniert aber Kap114 als Histonimportin, indem es die Bindungsaffinität von Kap114 für H2A und H2B erhöht und die der anderen involvierten Importine inhibiert (Mosammaparast *et al.*, 2002). Es gibt zumindest zwei Konformationen dieses trimeren Komplexes. Werden die Histone über Nap1 gebunden, ist der Komplex nicht sensitiv gegenüber Gsp1-GTP. Findet eine direkte Bindung von Kap114 an die Histone statt, über die dann Nap1 bindet, so ist der Komplex Gsp1-GTP sensitiv. Nach neueren Studien spielt das Importin Kap114 auch eine Rolle bei der Ablage der Histone an die DNA und moduliert somit die Funktion von Nap1 bei der Assemblierung des Chromatins. Diesem Modell zufolge importiert Kap114 H2A und H2B im Komplex mit Nap1 in den Kern, eine Freisetzung findet allerdings erst bei erhöhter Gsp1-GTP Konzentration statt, auch weitere Faktoren werden postuliert. Möglicherweise fungieren hier die Histone H3 und H4, von denen bekannt ist, dass sie vor H2A und H2B mit der DNA assemblieren (Mosammaparast *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit mit Kap114 gefundenen Proteine scheinen unterschiedliche Bindungsstellen für Kap114 zu besitzen. Von den im Kern lokalisierten Proteinen Set2, Yra1, Arr1 und Sda1 wurden C-terminale Fragmente gefunden, was darauf hindeutet, dass Kap114 in seiner Funktion als Importin zumindest diese Substrate an deren C-Terminus bindet. Die Proteinkinasen Hsl1 und Nis1, die beide an den "bud neck" rekrutiert werden und in der Mitosesignalkaskade fungieren, interagieren über ihr mittleres Fragment mit Kap114.

2.4 Arr1, Yjl103c und Nis1 interagieren *in vivo* und *in vitro* mit Kap114

Yjl103c, dem mittlerweile der Name Gsm1 gegeben wurde, ist ein Protein mit putativen Zink-Klustern und unbekannter Funktion. Aufgrund einer Sequenzanalyse und seiner

Expressionsmuster wird angenommen, dass Gsm1 in die Regulation des Energiemetabolismus involviert ist.

Von Arr1, das auch als Yap8 bezeichnet wird, wurde bisher gezeigt, dass es für die transkriptionale Aktivierung von Genen, die Halbmetall-Toleranz vermitteln, verantwortlich ist. Arr1 vermittelt die Expression der Arsen-Entgiftungsgene *ARC2* und *ARC3*. Es wurde nachgewiesen, dass Arr1 konstitutiv an den *ARC3*-Promotor gebunden ist und spezifische Cystein-Reste für seine Funktion erforderlich sind. Man geht davon aus, dass diese Cystein-Reste direkt an As(III) binden und die damit einhergehende Konformationsänderung von Arr1 zur Genexpression führt (Wysocki *et al.*, 2004).

Nis1 wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls über einen Zwei-Hybrid Screen gefunden und zwar über das Septin-Gen *SHS1* als Köder. Es wurde gezeigt, dass Nis1 mit allen Septinen über das Zwei-Hybrid System interagiert, ebenso mit den Kinasen Gin4 und Kcc4, die Komponenten des mitotischen Signalnetzwerkes sind (Iwase & Toh-e, 2001). Desweiteren wurde eine physikalische Interaktion mit Nap1 detektiert und gezeigt, dass die Stabilität des Proteins Nis1 von Nap1 abhängig ist. Nis1 wird während des Zellzyklus phosphoryliert, ist im Nukleus lokalisiert und wird in der G2/M-Phase septinabhängig an den "bud neck" rekrutiert. Weder eine Überexpression noch eine Deletion von Nis1 führten zu einer phänotypischen Veränderung (Iwase & Toh-e, 2001). Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Nis1 eine nicht-essentielle Rolle bei der mitotischen Signaltransduktion spielt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Arr1, Yjl103c und Nis1 *in vivo* und *in vitro* mit Kap114 interagieren (Abbildung 21 und 26) und die Bindung aller drei Proteine Gsp1-GTP abhängig ist (Abbildung 22). Die substratspezifischste Gsp1-Abhängigkeit zeigte Arr1, das im Beisein von Gsp1-GTP keine Bindung mehr an Kap114 aufwies. Sowohl bei Yjl103c als auch bei Nis1 war noch eine schwache Bindung zu verzeichnen. Da aufgrund fehlender Funktionalität bzw. zu geringem Expressionsniveau bei Nis1 die GFP-Fusionsproteine von Arr1, Yjl103c und Nis1 nicht lokalisiert werden konnten, liegen keine Daten für diese Proteine bezüglich evtl. Misslokalisierungen vor. Es lässt sich aufgrund der vorhandenen Ergebnisse allenfalls mutmaßen, dass Kap114 als Importin für diese Proteine fungiert. Allerdings wurde mit Nis1 neben Hsl1 ein weiteres Protein gefunden, das eine Rolle bei der mitotischen Signalkaskade bei G2/M spielt, was als Hinweis zu werten ist, dass Kap114 neben seiner Funktion als Importin auch eine Rolle bei der Mitose innehat.

2.5 Die Histon Methyltransferase Set2 interagiert mit Kap114

Set2 ist ein nicht essentielles Protein, das gering exprimiert wird und im Zellkern lokalisiert ist. Set2 besitzt Histon-Methyltransferase-Aktivität, es methyliert spezifisch das Lys36 von Histon H3 mittels seiner SET-Domäne (Strahl *et al.*, 2003). Es wurde nachgewiesen, dass Set2 die Transkription reprimiert und somit die H3-Methylierung eine Rolle bei der Repression der Genexpression spielt (Strahl *et al.*, 2002). Weitere Studien zeigten eine Interaktion von Set2 mit der hyperphosphorylierten RNA-Polymerase II, die die Transkriptionselongation vermittelt. Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass diese Interaktion Voraussetzung für die Methylierung von H3 ist, was darauf hinweist, dass sowohl Set2 als auch die H3-Methylierung in die Transkriptionselongation involviert sind. Mutmaßlich kann Set2 je nach Genkontext auch eine Transkriptionsaktivierende Rolle spielen (Xiao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Schaft *et al.*, 2003). Es ist noch völlig unklar, wie Set2 oder die H3-Methylierung am Prozess der Elongation partizipieren. Neuere Studien postulieren die H3-Methylierung, die unter den Eukaryonten hoch konserviert ist, als molekularen Marker, um regulatorische Sequenzen von kodierenden und nicht regulatorischen, intergenischen Sequenzen genomweit zu unterscheiden (Rao *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde in einem Zwei-Hybrid Screen mit Kap114 ein C-terminales Fragment von Set2 ohne die katalytische SET-Domäne gefunden. Dieses Set2-Fragment zeigte eine Gsp1-GTP-unabhängige *in vitro* Interaktion mit Kap114 (Abbildung 22) und im Zwei-Hybrid Assay *in vivo* eine Interaktion mit Kap114 und Pse1 (Abbildung 26). Weder Pse1 noch Kap114 sind jedoch ausschließlich für den Import von Set2 verantwortlich, da die Lokalisierung von Set2 auch in der Doppelmutante ein Kernsignal ergab. Kap114 könnte auch hier für eine intranukleäre Zielfindung verantwortlich sein. Dafür spricht auch, dass Gsp1-GTP alleine nicht ausreicht um die Interaktion zu unterbinden, eine Dissoziation könnte nur im Beisein von Histon H3 und/oder DNA stattfinden. Es wurde nachgewiesen, dass eine DNA-gebundene nukleosomale Struktur für die Histon-Methyltransferase Aktivität von Set2 erforderlich ist (Strahl *et al.*, 2002). Set2 scheint außerdem nur zu einem Teil (5%) mit der RNA-Polymerase II assoziiert zu sein und liegt ansonsten als unkomplexiertes Homodimer vor (Schaft *et al.*, 2003). Möglicherweise ist Kap114 für den zielgerichteten Import verantwortlich. Set2 könnte evtl. im Komplex mit H2A und H2B importiert werden und so direkt zu seinem Substrat H3 gebracht werden. Es existieren ebenfalls noch andere Importrouten. Da Pse1 beteiligt ist und Pse1 mit Kap123 eine überlappende Substratspezifität zeigt und sich nach neueren Studien Kap123 als das hauptsächlichste Importin für das Histon H3

darstellt (Blackwell *et al.*, 2007), könnte Kap123 auch am Import von Set2 beteiligt sein. Vielleicht ist das Fragment von Set2 nicht ausreichend, um eine Bindung mit Kap123 einzugehen. Eine Lokalisierung in der Dreifachmutante *pse1-1/Δkap123/Δkap114* würde hier Aufklärung liefern.

2.6 Sda1 zeigt eine Gsp1-unabhängige Interaktion mit Kap114

Sda1, ein bis zum Menschen hoch konserviertes, essentielles Protein, ist im Zellkern lokalisiert und wurde bisher in Zusammenhang mit der Organisation des Aktincytoskeletts gebracht (*severe depolymerization of actin*) (Buscemi *et al.*, 2000). Es besitzt drei putative bipartite NLS-Sequenzen, zwei davon im C-Terminus. Ebenfalls C-terminal befindet sich eine konservierte acidische Region. Buscemi *et al.* (2000) wiesen nach, dass temperatursensitive Sda1-Mutanten sowohl die "bud"-Formation als auch die DNA-Replikation blockieren und dass dieser Zellzyklusarrest unabhängig vom Morphogenese „Checkpoint“, der über Swe1 vermittelt wird, stattfindet. Da trotz normalem Aktinegehalt in diesen Mutanten kein polymerisiertes Aktin mehr detektiert werden konnte und die Verteilung des Aktins während des Zellzyklus Defekte zeigte, wurde eine Rolle für Sda1 in der Organisation des Cytoskeletts postuliert. Da Sda1 allerdings im Kern lokalisiert ist, wurde eine eventuelle transkriptionale Regulation vermutet. Zimmermann *et al.* (2001) konnten nicht bestätigen, dass Sda1 eine Rolle bei der Assemblierung des Aktincytoskeletts spielt. Sie wiesen nach, dass Sda1 für die Passage durch G1 und START erforderlich ist. Bei einem Funktionsverlust von Sda1 verblieben die Zellen ohne "bud", zeigten kein Wachstum mehr (im Gegensatz zu *cdc28*- und G1-Zyklin-Mutanten) und keine DNA-Replikation, waren jedoch in der Lage, auf "mating"-Pheromon zu antworten, was impliziert, dass dieser Zellzyklusarrest vor START stattfindet. Mutiertes Sda1 scheint nicht in der Lage zu sein, die verstärkte Produktion von rRNA und Proteinen, die in dieser Phase des Zellzyklus notwendig ist, zu vermitteln. Desweiteren bindet Sda1 *in vivo* und *in vitro* Nap1, was darauf hindeutet, dass Nap1 evtl. auch in G1 eine Rolle spielt. Eine synthetische Letalität bei Deletion von *NAP1* im Stamm *Δcln1/Δcln2* untermauert diese These (Zimmermann *et al.*, 2001). Neueren Studien zufolge kommt Sda1 noch eine weitere Funktion in der Ribosomenbiogenese und dem Ribosomenexport zu (Dez *et al.*, 2006). Es wurde nachgewiesen, dass Sda1, das wie die Transportfaktoren aus "HEAT-Repeats" aufgebaut ist, mit späten 60S-Partikeln assoziiert und an ihrer Prozessierung und

Assemblierung beteiligt ist. Außerdem zeigen *sda1*-Mutanten schnell einen Ribosomen-Export-Defekt, der allerdings bei der 40S-Untereinheit auch als indirekter Effekt auftreten könnte. Die Autoren charakterisieren einen Überwachungs- und Abbaupfad für ribosomale Untereinheiten, die aufgrund von defektem Sda1 nicht exportiert werden. Dieser Prozess findet bevorzugt in einer subnukleären Struktur, den sogenannten NO-bodies, statt und wird unter anderem von dem Exosom vermittelt (Dez *et al.*, 2006). Sda1 scheint also ebenso wie Nap1 unterschiedliche Funktionen im Laufe des Zellzyklus wahrzunehmen.

In dieser Arbeit wurde mit Kap114 das C-terminale Fragment von Sda1 mit zwei putativen bipartiten NLS-Sequenzen gefunden. Sda1 zeigte *in vitro* eine Gsp1-GTP unabhängige Interaktion mit Kap114 und im Zwei-Hybrid Assay interagiert es mit Kap114 sowie in geringerem Ausmaß auch mit Pse1 (Abbildung 26). Trotz der putativen NLS-Sequenzen wurde im Bindungsversuch nur eine sehr schwache Bindung von Sda1 an Kap95 detektiert, wenn es zusammen mit Srp1 inkubiert wurde (Abbildung 27) und die Zwei-Hybrid Assays zeigten keine Interaktion. Diesen Daten zufolge wird Sda1 nicht oder nur in einem geringen Ausmaß über den NLS-abhängigen Importweg in den Zellkern gebracht. Sda1 wurde im Wildtyp im Zellkern lokalisiert und zeigt in der Doppelmutante *pse1-1/Δkap114* eine leichte cytoplasmatische Misslokalisierung, es wurde auch eine schwache Bindung *in vitro* zwischen Pse1 und Sda1 detektiert (Abbildung 24 und 27). Dies impliziert, dass Pse1 und Kap114 in den Import involviert sind, es aber auch noch andere Importrouten gibt. Ähnlich wie bei Set2 würde auch hier die Dreifachmutante *pse1-1/Δkap123/Δkap114* evtl. zu einer klaren Aussage führen. Auch bei Sda1 könnte es sich um eine intranukleäre Zielfindung mittels Kap114 handeln, bei der zur Dissoziation des Komplexes weitere Faktoren benötigt werden. Diese Faktoren könnten DNA oder auch rRNA sein, da Sda1 vermutlich in transkriptionellen Signalwegen fungiert und sich auch als Komponente der späten 60S prä-Ribosomen darstellt (Zimmermann *et al.*, 2001; Dez *et al.*, 2006). Möglicherweise spielt bei der Dissoziation auch Nap1 eine Rolle, ebenso möglich wäre ein Koimport von Sda1 und Nap1. Weitere *in vitro*-Bindungsversuche mit verschiedenen möglichen Dissoziationsfaktoren und die Lokalisierung der Kap114-Bindungsstelle von Sda1 könnten diesen Sachverhalt klären.

2.7 Das Adapterprotein Yra1

Das essentielle, nukleäre Protein Yra1 gehört zur evolutionär hochkonservierten REF-Familie (RNA und Exportfaktor bindende Proteine). Das Säugerhomolog Aly kann Yra1 größtenteils ersetzen (Strässer & Hurt, 2000) und sein nicht essentielles Hefehomolog Yra2 besitzt teilweise überlappende Funktion (Kashyap *et al.*, 2004). Yra1 fungiert als Adapterprotein im mRNA Export, es ist Teil des TREX-Komplexes, der Transkription und Export koppelt, wird von Sub2 an das RNP rekrutiert und ist verantwortlich für die Assoziation des Exportfaktors Mex67 (Strässer *et al.*, 2002). Wann Yra1 im Verlauf des mRNA-Exports von dem RNP dissoziiert, ist bisher noch unklar. Im Gegensatz zu Aly, das erwiesenermaßen zwischen Zellkern und Cytoplasma pendelt (Rodrigues *et al.*, 2001), wird von Yra1 bisher angenommen, dass es im Zellkern verbleibt. Dafür spricht seine nukleäre Lokalisation, die sich auch unverändert in der Importmutante *nup49-313* zeigt und die nicht vorhandene Clusterung in *Anup133* Zellen, die auf fehlende Assoziation mit der Kernpore schließen lässt. Allerdings geben Heterokaryonassays und immunoelektronenmikroskopische Aufnahmen, die Yra1 in Assoziation mit den cytoplasmatischen Fibrillen und der korbähnlichen Struktur zeigen, Hinweise darauf, dass möglicherweise ein Teil von Yra1 pendelt (Strässer & Hurt, 2000; Zenklusen *et al.*, 2001).

Yra1 besteht aus einer hochkonservierten N- und C-Box, zwei variablen N-vr und C-vr Domänen sowie einer zentralen RNA-Bindungsdomäne (RBD) (Abbildung 30). Die beiden variablen N-vr und C-vr Domänen vermitteln die Bindung an RNA und Mex67, während die RBD, die zwar nicht essentiell und auch nicht notwendig für die RNA-Bindung ist, möglicherweise eine strukturelle Rolle innehat oder Interaktionen mit am Export involvierten Faktoren vermittelt, da *yra1- Δ rbd* einen RNA-Exportdefekt zeigt und teilweise misslokalisiert im Cytoplasma vorliegt. Allerdings benötigen die Hefezellen zum Überleben lediglich die N-terminale (N-Box + N-vr Bereich) oder die C-terminale Region (C-Box + C-vr Bereich) (Zenklusen *et al.*, 2001).

Neuere Studien deckten eine weitere Rolle für Yra1 in der DNA-Replikation auf, in der es unabhängig von seiner Funktion als mRNA-Exporter fungiert. Die Autoren mutmaßen, dass dies die essentielle Funktion von Yra1 darstellt. Sie wiesen nach, dass *yra1-1*-Mutanten, im Gegensatz zu anderen TREX-Mutanten, Defekte im Eintritt in die S-Phase zeigen. Yra1 rekrutiert über seine C-Box Dia2, ein Protein, das wichtig für die DNA-Replikation und Genomstabilität ist, an Chromatin (Swaminathan *et al.*, 2007).

Es ist schon länger bekannt, dass eine Überexpression von *Yra1* zu einem G1-Arrest führt und dass *Yra1* einer Autoregulation unterliegt, in die das sehr lange Intron von *Yra1* sequenzunabhängig involviert ist (Zenklusen *et al.*, 2001; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2002). Dong *et al.* (2007) fanden heraus, dass die Autoregulation von Yra1 über Export und Ecd3-vermittelten Abbau der Yra1 prä-mRNA stattfindet. Bei hoher Yra1-Konzentration im Kern wird Yra1 zu seinem Gen rekrutiert, lagert sich an das wachsende RNP an, bindet Mex67, unterbindet somit das Spleißen und begleitet die mRNA zum Export. Mex67 fungiert hier nicht als mRNA-Exporter, sondern rekrutiert über seine funktionale NES Xpo1, und ein Xpo1-abhängiger Export und dem folgend ein Edc3-vermittelter Abbau der prä-mRNA, für den das Intron erforderlich ist, findet statt. Die Autoregulation von Yra1 ähnelt dem REV-vermittelten Export ungespleißter mRNAs zur HIV-Replikation, so dass angenommen wird, dass REV die gleichen zellulären Pfade benutzt wie Yra1.

2.7.1 Yra1 besitzt eine zweite C-terminale NLS

Zenklusen *et al.* (2001) haben bereits im N-terminalen Bereich von Yra1 eine NLS detektiert. Wird die N-terminale Region deletiert, ist ein Großteil von Yra1 misslokalisiert im Cytoplasma zu finden, ein Teil ist aber immer noch nukleär lokalisiert. Aufgrund der Sequenz von Yra1 wurde eine zweite putative NLS in der Cvr-Domäne vermutet (Portmann *et al.*, 1997; Strässer & Hurt, 2000).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Yra1 eine zweite C-terminale NLS besitzt. Ein C-terminales Fragment von Yra1, das noch einen kleinen Teil der RBD beinhaltet, wurde in einem Zwei-Hybrid Screen mit Kap114 gefunden. Das gleiche Fragment zeigte im Bindungsversuch eine substratspezifische Gsp1-abhängige Interaktion mit Kap114 (Abbildung 22), desweiteren schwache Interaktionen mit Nmd5, Kap95 und Kap123 (Abbildung 27). Mit Pse1 wurde reproduzierbar eine Interaktion nachgewiesen (Abbildung 44), diese Interaktion ist allerdings sehr schwach, sie ist nicht in allen durchgeführten Bindungsversuchen detektierbar (Abbildung 27). *In vivo* wurde von allen Transportfaktoren mittels eines Zwei-Hybrid Assays nur eine starke Interaktion mit Kap114 und eine sehr schwache mit Pse1 nachgewiesen (Abbildung 26), was darauf hinweist, dass Kap114 evtl. spezifisch mit der zweiten C-terminalen NLS interagiert. Es war nicht möglich, die Interaktionen von Yra1 *in vivo* darzustellen, da eine Expression von *YRA1* über den *GALI*-Promotor toxisch war. Nach Reprimierung der Expression durch Glukosezugabe zu den Gal-

Platten waren nur über den Leu-Wachstumsassay Interaktionen von Yra1vL mit Kap114 und Pse1 zu detektieren, wobei auch hier Kap114 das stärkere Signal zeigte. Möglicherweise stört die N-terminale B42-Fusion die effiziente Bindung von Pse1 an die N-terminale NLS. Diese Two-Hybrid Assays zeigen außerdem, dass nur das gesamte Yra1-Protein bei Überexpression toxisch wirkt und nicht das C-terminale Fragment, folglich haben das N- und C-terminale Fragment, obwohl sie sich ersetzen können, durchaus auch unterschiedliche Funktionen.

Die Interaktion zwischen Yra1 und Kap114 ist direkt und wurde durch Zugabe von Hefelysate nicht verstärkt (Abbildung 32), wobei unklar bleibt, warum sie *in vivo* in viel stärkerer Ausprägung nachzuweisen ist als im Bindungsversuch. Yra1 zeigte als komplettes Protein ähnliche Bindungseigenschaften wie das C-terminale Fragment. Die Interaktionen mit Kap114 und Nmd5 waren in gleicher Ausprägung nachweisbar, Kap123 war sehr schwach zu detektieren, während Pse1 eine sehr deutliche Interaktion mit Yra1vL zeigte (Abbildung 31). Dies deutet darauf hin, dass Pse1 bevorzugt an die N-terminale NLS von Yra1 bindet. Eine Bindung der N-terminalen Yra1-Fragmente 1-77 und 14-77 mit GST-Pse1 wurde bereits nachgewiesen (Zenklusen *et al.*, 2001). Ebenfalls wurde ein Komplex von Yra1 mit Pse1 und mit Kap123 von Kashyap *et al.* (2005) mittels Affinitätschromatographie nachgewiesen, es wurde hier eine C-terminale Fusion von Yra1 mit dem HA-Tag verwendet und sowohl Pse1 als auch Kap123 zeigten eine starke Interaktion. Möglicherweise stört die in dieser Arbeit verwendete N-terminale GST- bzw. B42-Fusion die Interaktion von Yra1 mit Kap123.

Im Bindungsversuch wurde außerdem eine Interaktion von Yra1-2H mit Kap95 und Yra1vL mit Kap95 und Srp1 detektiert. Da diese Interaktionen aber keine Gsp1-GTP Abhängigkeit zeigten, *in vivo* im Zwei-Hybrid Assay nicht nachzuweisen waren (Abbildung 26) und sich keinerlei Misslokalisierung von Yra1 in *srp1*-Mutanten zeigte (Abbildung 34), ist davon auszugehen, dass Yra1 zwar *in vitro* an Kap95 und Srp1 bindet, aber nicht auf dem klassischen NLS-abhängigen Weg transportiert wird.

Ein Unterschied bezüglich der Gsp1-GTP-Abhängigkeit der Yra1/Kap114-Interaktion zeigte sich zwischen Yra1-2H und Yra1vL. Während nach Zugabe von Gsp1-GTP das Zwei-Hybrid Fragment keine Bindung an Kap114 zeigte (Abbildung 22), wurde mit dem volle Länge Protein eine zwar schwächere, aber immer noch vorhandene Bindung nachgewiesen (Abbildung 31). Es besteht die Möglichkeit, dass *in vivo* Gsp1-GTP alleine nicht ausreicht, um den Importkomplex zu dissoziieren und die RNA- Bindungsdomäne von Yra1 entweder eine strukturelle Rolle spielt oder evtl. weitere Dissoziationsfaktoren bindet. Da das Zwei-Hybrid Fragment diese Domäne nicht besitzt, ist Gsp1-GTP alleine hier ausreichend.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass Yra1 eine zweite C-terminale NLS besitzt, was sich auch mit der Tatsache deckt, dass das C- bzw. N-terminale Fragment von Yra1 zum Überleben der Hefezellen ausreicht. Ebenso spricht dafür, dass N-terminale Deletionen von Yra1 nicht vollständig misslokalisiert im Cytoplasma vorliegen (Zenklusen *et al.*, 2001). Pse1 bindet bevorzugt an die N-terminale NLS, während Kap114 und auch Nmd5 möglicherweise spezifisch mit der C-terminalen NLS interagieren.

In Abbildung 45 ist zusammenfassend die Domänenstruktur von Yra1 mit den jeweils bisher bekannten und in dieser Arbeit ermittelten Bindungsbereichen dargestellt.

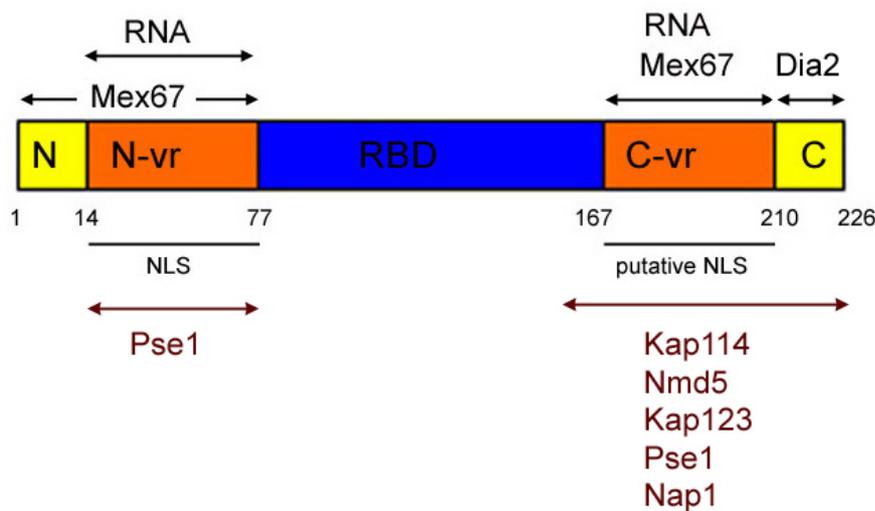


Abbildung 45: Bindungsdomänen von Yra1

Dargestellt ist die Domänenstruktur von Yra1 mit den jeweiligen Bindungsdomänen. Mex67 bindet an den gesamten N-terminalen Bereich und an C-vr, während RNA an den N- und C-terminalen variablen Bereich bindet. Über seine C-Box interagiert Yra1 mit Dia2 und rekrutiert es an Chromatin (Swaminathan *et al.*, 2007). Die variable N-terminale Region N-vr stellt eine NLS dar, an die Pse1 bindet (Zenklusen *et al.*, 2001). In dem C-terminalen variablen Bereich wurde aufgrund der Sequenz eine NLS vermutet (Strässer & Hurt, 2000) und in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das 2H-Fragment von Yra1 (133-226) mit den Importinen Kap114, Nmd5, Kap123 und Pse1 sowie mit dem Histonchaperon Nap1 interagiert. Vermutlich ist die verantwortliche Bindungsregion hier C-vr, da die C-Box in der Rekrutierung von Dia2 und somit in der DNA-Replikation eine Rolle spielt (Swaminathan *et al.*, 2007). Der Import von Yra1 wird folglich über die zwei NLS-Bereiche der beiden variablen Regionen vermittelt.

2.7.2 Yra1 wird hauptsächlich von Pse1 und Kap123 in den Kern transportiert

In dieser Arbeit wurde *in vivo* gezeigt, dass der Import von Yra1 Gsp1-GTP abhängig ist. In den beiden temperatursensitiven Mutanten *rna1-1* und *prp20-1*, bei denen durch Zusammenbruch des Gsp1-GTP Gradienten kein gerichteter Transport mehr möglich ist, liegt Yra1 bei restriktiver Temperatur misslokalisiert im Cytoplasma vor. Es wurde die Lokalisierung von Yra1 in verschiedenen Transportmutanten untersucht. Es zeigte sich keine Auswirkung in der Lokalisierung von Yra1 in den Einzelmutanten $\Delta kap114$, *pse1-1*, $\Delta kap123$, $\Delta nmd5$, *srp1-31*, *srp1-49*, *srp1-54* und den Doppelmutanten, *pse1-1/\Delta kap114* und $\Delta kap104/\Delta kap114$. In den beiden Doppelmutanten $\Delta nmd5/\Delta kap114$ und $\Delta kap123/\Delta kap114$ war eine leichte cytoplasmatische Lokalisierung von Yra1-GFP zu verzeichnen, aber größtenteils blieb es nukleär lokalisiert (Abbildung 34). Die Transportmutante *pse1-1/\Delta kap123* zeigte eine nahezu vollständige Misslokalisierung von Yra1-GFP bereits bei permissiver Temperatur (Abbildung 34). Auffallend war hier, dass in mehreren Zellen Spots zu sehen waren, die reproduzierbar auftraten, deren Lokalisierung aber nicht genau zugeordnet werden konnte. Yra1 wird demzufolge hauptsächlich über Pse1 und Kap123 Gsp1-GTP- abhängig in den Kern transportiert. Kap114 und Nmd5 scheinen Nebenwege darzustellen, die Yra1 evtl. auch an einen anderen Funktionsort bringen könnten. Zenklusen *et al.* (2001) zeigten bereits die Misslokalisierung des N-terminalen Yra1-Fragments in der gleichen Transportmutante, allerdings verblieb ein Teil des Fragments immer noch im Kern, was darauf hinweist, dass noch andere Importine involviert sind, die auch an die N-terminale NLS binden. Warum sich die Misslokalisierung des gesamten Yra1-Proteins in einem viel ausgeprägteren Maße zeigte als die des N-terminalen Fragments, bleibt eine offene Frage. Möglicherweise pendelt ein Teil von Yra1 zwischen Kern und Cytoplasma, der Import wird von mehreren Importinen vermittelt und die C-terminale Domäne ist in den Export involviert, somit würde ein N-terminales Fragment teilweise im Kern verbleiben.

Näheren Aufschluss über die Rolle von Kap114 im Import von Yra1 und auch der anderen Proteine Set2 und Sda1 hätte die Dreifachmutante *pse1-1/\Delta kap123/\Delta kap114* geben können. Es wurde deshalb mehrfach versucht, diese mittels der Longtine-Methodik bzw. des plasmidvermittelten Genaustausches herzustellen. Es war nicht möglich, diese Dreifachmutante zu kreieren, es fand zwar jeweils eine Integration des Markers an der richtigen Stelle statt, was über PCR überprüft wurde, aber das betroffenen Gen wurde trotzdem nicht deletiert. Während der Rekombination kam es gleichzeitig auch zu einer Genduplikation, mit der die Hefezellen die jeweilige, zusätzliche Deletion umgingen. Vielleicht ist es hinter einem anderen Stammeshintergrund möglich, die Dreifachmutante

pse1-1/Δkap123/Δkap114 herzustellen oder aber diese Kombination ist für die Hefezellen letal. Möglicherweise spielt Kap114 mit den beiden Importinen Pse1 und Kap123 eine gemeinsame Rolle beim Import verschiedener Proteine wie bspw. auch Set2 und Sda1 und eine Deletion aller drei Transportfaktoren ist für die Hefezellen auch bei permissiver Temperatur nicht mehr kompensierbar.

2.7.3 Neue Interaktionspartner von Yra1 weisen auf eine Rolle bei der Ribosomenbiogenese hin

Mittels Affinitätsreinigung und anschließender Massenspektrometrie wurden einige neue Interaktionspartner von Yra1 aus der Kernfraktion eines Hefelysats identifiziert (Abbildung 32). Bei diesem Experiment konnten keine bekannten Interaktionspartner von Yra1 wie Mex67 oder Sub2 identifiziert werden. Auch Kap114 und die beiden hauptsächlichen Importine von Yra1 Kap123 und Pse1 wurden nicht nachgewiesen. Kashyap *et al.* (2004) identifizierten mittels Immunaффinitätschromatographie Komplexe mit Yra1-3xHA, sie detektierten mehrere rRNA-prozessierende Proteine sowie Kap123 und Pse1, aber auch sie fanden weder Mex67 noch Sub2. Experimentelle Unterschiede zu dieser Arbeit sind zum einen die Verwendung von Kernlysat und zum anderen, dass Yra1 N-terminal mit GST fusioniert wurde. Da sowohl Pse1, Kap123 und auch Mex67 zwischen Kern und Cytoplasma pendeln, war möglicherweise die Menge dieser Proteine im Kernlysat nicht ausreichend um eine Bindung an Yra1 zu erzielen. Möglicherweise könnte das N-terminale GST die bevorzugte Bindung von Pse1 an die Nvr von Yra1 beeinträchtigen und es wurde deshalb nicht in nachweisbarer Menge aus dem Kernlysat gebunden.

In dieser Arbeit wurden elf potentielle Interaktionspartner identifiziert, die unter anderem im Nukleolus lokalisiert sind. Die Proteine Rpa49, Rpa135 und Rpb5, von denen die beiden letzten essentiell sind, sind Bestandteile der RNA-Polymerase I, die für die Transkription der rRNA und snRNA im Nukleolus verantwortlich ist. Hmo1 bindet ebenfalls die RNA-Polymerase I und ist an der Regulation der Transkription beteiligt. Vier der ermittelten Interaktionspartner, die Proteine Rrp5, Sik1, Utp5 und Nop58, sind U3snoRNP-Proteine und somit verantwortlich für die rRNA-Prozessierung, U3snoRNPs sind beteiligt an der Reifung der 18S rRNA (Venema & Tollervey, 1995). Die acht ebenfalls identifizierten Proteine Rrp5, Kre33, Sik1, Has1, Utp15, Fpr4, Rpa49 und Nop58 spielen eine Rolle bei der Ribosomenbiogenese oder/und der rRNA-Prozessierung. Von fast allen dieser Proteine sind

Interaktionen untereinander bereits beschrieben (Tabelle 18), so dass angenommen werden kann, dass sie zusammen in einer Art Netzwerk bei der rRNA-Prozessierung und Ribosomenbiogenese fungieren (Tabelle 18).

Mehrere der gefundenen Interaktionspartner (Rrp5, Kre33, Sik1 und Has1) interagieren außerdem mit Nop6 (nukleolär, unbekannte Funktion) und der Cka1 (nukleär, α -Untereinheit der CK2), auch Yra1 wurde bereits im Komplex mit Cka1 bzw. Nop6 massenpektrometrisch identifiziert (Ho *et al.*, 2002). Im Verlauf dieser Arbeit wurden von Krogan *et al.* (2006) mittels Tandem-Affinitätsreinigung (TAP) und anschließender Massenspektrometrie die Interaktionen von Yra1 mit Rrp5, Mtr4, Utp15 und Hmo1 auch detektiert. Ebenfalls über Affinitätsreinigung wiesen Kashyap *et al.* (2004) Interaktionen von Yra1 mit Proteinen (u.a. Nop2, Nop12, Nop13), die an der rRNA-Prozessierung beteiligt sind, nach.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die der anderen Arbeitsgruppen lassen den Schluss zu, dass Yra1 neben seiner Funktion im mRNA-Export ebenfalls eine Rolle in der rRNA-Prozessierung und der Ribosomenbiogenese spielt. Möglicherweise ist der zielgerichtete Import von Yra1 in den Nukleolus eine Funktion von Kap114.

Die detektierte Interaktion von Yra1 mit dem cytoplasmatischen Protein Kem1, die von Kashyap *et al.* (2004) und Krogan *et al.* (2006) ebenso nachgewiesen wurde, lässt den Schluss zu, dass Yra1 zumindest teilweise doch zwischen Zellkern und Cytoplasma pendelt, da die Interaktion aufgrund der Lokalisierung von Kem1 nur außerhalb des Zellkerns stattfinden kann. Kem1 ist eine konservierte 5'-3'-Exonuclease, die unter anderem in den mRNA-Abbau und die Ribosomenreifung involviert ist. Edc3, das für das Entfernen des "Cap" der mRNA zuständig ist und von dem kürzlich gezeigt wurde, dass es den Abbau der Yra1 prä-mRNA im Rahmen der Autoregulation von Yra1 vermittelt, zeigt eine Interaktion mit Kem1 (Fromont-Racine *et al.*, 2000; Gavin *et al.*, 2006). Möglicherweise begleitet Yra1 seine prä-mRNA, die zum Edc3-vermittelten Abbau bestimmt ist, ins Cytoplasma, verbleibt aber in seiner Funktion als normaler mRNA-Exportfaktor im Zellkern. Dies würde bedeuten, dass nur ein kleiner Teil von Yra1 pendelt und dieser Sachverhalt würde die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Lokalisierung von Yra1 erklären.

2.7.4 Yra1 bildet einen Komplex mit Nap1 und dem Importin Kap114 bzw. Pse1

Von Yra1 wurde bereits mehrfach eine Interaktion mit Nap1 beschrieben (Gavin *et al.*, 2002 und 2006; Kashyap *et al.*, 2005), jedoch bisher ohne funktionalen Hintergrund. Nap1 ist ein

nicht essentielles Protein mit einer Vielfalt scheinbar nicht verwandter Funktionen und einer Vielzahl von Interaktionspartnern, die sehr unterschiedliche Funktionen in der Zelle innehaben (Zlatanova *et al.*, 2007). Es ist involviert in den Import der Histone H2A und H2B und dient dabei als Chaperon, das spezifisch Kap114 für die Interaktion mit H2A und H2B prädestiniert (Mosammaparast *et al.*, 2002). Nap1 ist ein Protein, das sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma eine Rolle spielt, wobei bisher ungeklärt ist, ob diese Funktionen miteinander in einem Zusammenhang stehen. Im Kern ist es an der Chromatinzusammensetzung beteiligt und auch involviert in die Transkriptionsinitiation durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren sowie in die Elongation, indem es die Nukleosomenzusammensetzung moduliert (Zlatanova *et al.*, 2007). Desweiteren fungiert Nap1 in der Regulation der Mitose, auf die in der Diskussion von Hsl1 näher eingegangen wird. Nap1 ist hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert, transloziert aber während der S-Phase in den Nukleus. Es wurden sowohl eine NLS als auch eine NES identifiziert, der genaue Transportmechanismus ist allerdings noch unbekannt. Kap114 ist in den Import und Xpo1 in den Export involviert, aber beide sind nicht die einzigen Transportrouten für Nap1 (Mosammaparast *et al.*, 2002; Zlatanova *et al.*, 2007). Die Regulation der Lokalisierung von Nap1 erfolgt vermutlich über Phosphorylierungszyklen. Es wurde nachgewiesen, dass Nap1 an drei Stellen von der CK2 reversibel phosphoryliert wird, was sowohl den Import verstärkt als auch eine Rolle in der Progression der S-Phase spielt (Calvert *et al.*, 2008).

Kürzliche Studien deckten eine Funktion von Nap1 in der Transkriptionselongation in Zusammenhang mit Yra1 auf und stellten damit eine Verbindung zwischen der Chromatinstrukturierung und der mRNP-Biogenese her. Del Rosario *et al.* (2008) wiesen nach, dass Nap1 mit Yra1 genetisch und physikalisch interagiert und mit Komponenten des TREX-Komplexes sowie dem mRNA-Exportfaktor Mex67 eine genetische Interaktion zeigt. Die jeweiligen Doppelmutanten mit Nap1 wiesen alle einen verstärkten Phänotyp hinsichtlich der verlängerten "bud"-Morphologie auf, was darauf hinweist, dass auch die nukleäre Funktion von Nap1 die "bud"-Gestaltung reguliert. Nap1 ist weder in den Import von Yra1 noch in den mRNA-Export involviert, sondern es assoziiert abhängig von Yra1 mit Chromatin. Ihrem Modell zufolge rekrutiert Yra1 Nap1 an transkribierte Gene, wo es sowohl im Reassemblieren der Nukleosomen nach der Transkription als auch vermutlich in der Dissoziation von H2A und H2B von der DNA vor der Transkription fungiert.

In dieser Arbeit wurde ein Komplex von Yra1 mit Kap114 und Nap1 bzw. mit Pse1 und Nap1 nachgewiesen. Sowohl Yra1^{vL} als auch das C-terminale Zwei-Hybrid-Fragment von Yra1 zeigten diese Interaktion, wobei die Interaktion von Pse1 mit Yra1-2H weitaus schwächer

nachzuweisen war (Abbildung 44), was damit im Einklang steht, dass Pse1 bevorzugt an die N-terminale NLS bindet. Die Bindungen von Kap114, Pse1 und Nap1 an Yra1-2H und YravL waren weder kooperativ noch kompetitiv, so dass Yra1 möglicherweise unterschiedliche Bindungsstellen für die Transportfaktoren Kap114 und Pse1 sowie für das Histonchaperon Nap1 besitzt und, da das Zwei-Hybrid-Fragment die gleichen Bindungseigenschaften zeigt, dass diese Bindungsregionen nahe beieinander liegen. Eine Interaktion von Pse1 und Nap1 wurde noch nicht beschrieben, von Kap114 und Nap1 ist bekannt, dass sie unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe bilden können (Mosammaparast *et al.*, 2005), so dass hier auch die Möglichkeit besteht, dass Nap1 und Kap114 dieselbe Bindungsstelle von Yra1 besetzen, Nap1 aber über Kap114 bindet und umgekehrt.

Dieser Komplex könnte das fehlende Puzzleteil im Import von Nap1 sein. Möglicherweise wird Nap1 im Komplex mit Yra1 in den Zellkern importiert und kann dabei die beiden Importine Kap114 und Pse1 verwenden. Da von Kap114 bekannt ist, dass es in der Lage ist, mehrere Substrate gleichzeitig zu transportieren, bestände die Möglichkeit eines Coimports von Nap1 und Yra1 mit weiteren Proteinen. Gegebenenfalls wird Nap1 in dieser Konstellation ohne die beiden Histone H2A und H2B importiert, damit es seine Funktion bei der Nukleosomenumstrukturierung im Kern wahrnehmen kann. Diesem Modell zufolge wird Nap1 nicht nur von Yra1 an transkribierte Gene rekrutiert, sondern über Yra1 coimportiert, so dass beide Proteine gleichzeitig am Zielort vorhanden sind und ihre jeweilige Funktion erfüllen können. Da Pse1 das Hauptimportin für Yra1 ist, wird dieser Cotransport vermutlich größtenteils von Pse1 vermittelt, wobei eine direkte Interaktion zwischen Nap1 und Pse1 bisher nicht beschrieben wurde. Kap114 besitzt somit mehrere Möglichkeiten, Nap1 zu importieren, einmal im Komplex mit Sua7 und den über Nap1 gebundenen Histonen H2A und H2B (Hodges *et al.*, 2005) und zum anderen im Komplex mit Yra1. Es wäre interessant zu erfahren, ob auch noch andere Proteine mit Nap1 und Yra1 coimportiert werden und auf welche Art und Weise dieser Komplex im Kern dissoziiert wird.

Eventuell wird Nap1 analog zu seinen unterschiedlichen Funktionen im Zellkern in unterschiedlich zusammengesetzten Komplexen importiert, um dann zielgerichtet am jeweiligen Wirkungsort freigesetzt zu werden. Anzumerken wäre hier auch, dass von Sda1, das in dieser Arbeit ebenfalls über Kap114 gefunden wurde und eine Rolle bei der Zellzyklusregulation und wie mutmaßlich auch Yra1 in der Ribosomenbiogenese spielt, Interaktionen sowohl mit Nap1 (Zimmermann *et al.*, 2001) als auch mit Yra1 (Krogan *et al.*, 2006) bereits nachgewiesen wurden.

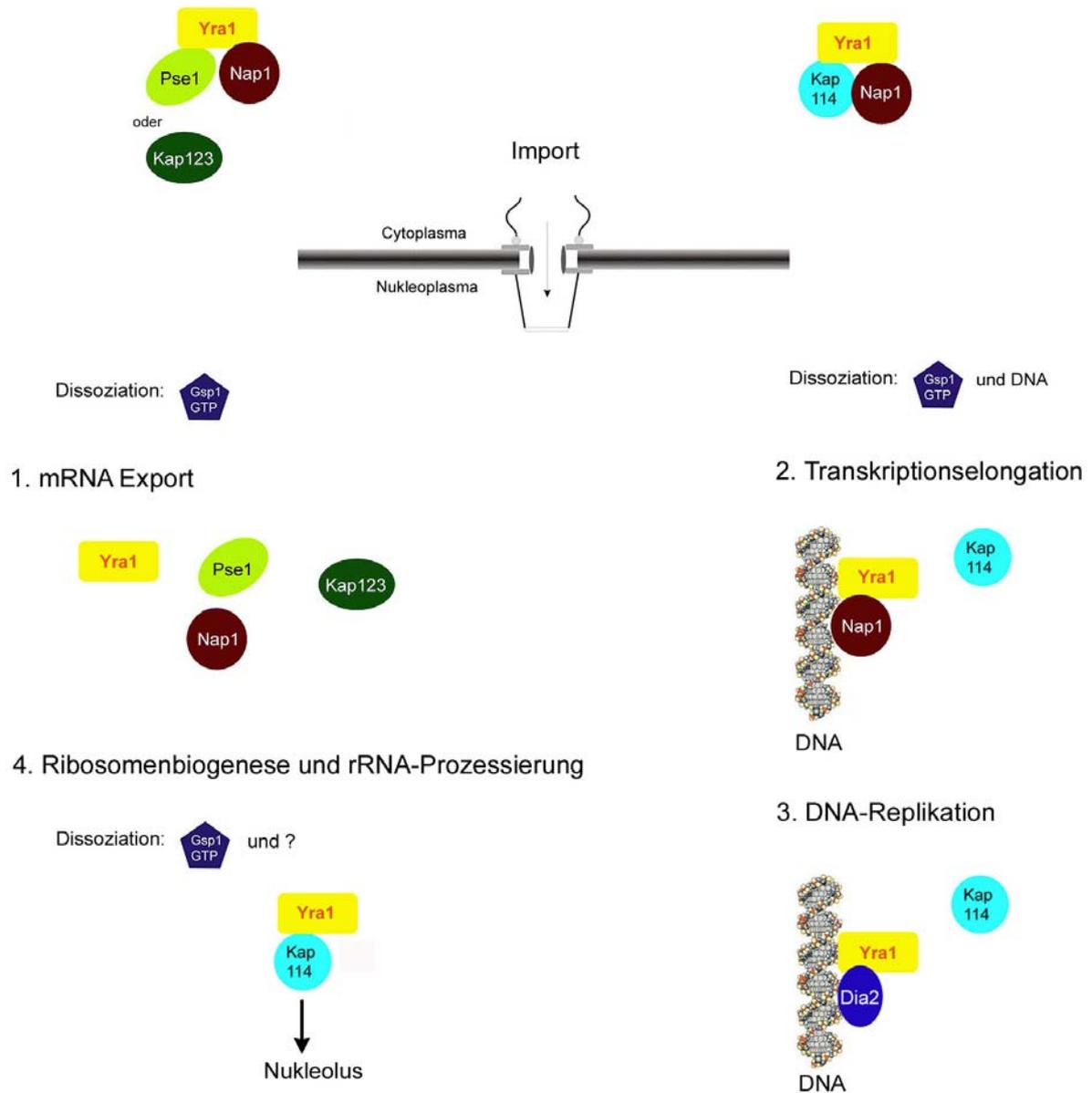


Abbildung 46: Modell: Verschiedene Möglichkeiten des Yra1 Imports und der intranukleären Zielfindung

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und von Zenklusen *et al.* (2001) findet der hauptsächliche Import von Yra1 über die Importine Pse1 und Kap123 statt. Kap114 stellt neben Nmd5 lediglich einen Nebenweg dar, wobei Kap114 an der intranukleären Zielfindung beteiligt sein könnte. Das Modell sieht folgende Szenarien vor: Yra1 wird vornehmlich über Pse1 möglicherweise im Komplex mit Nap1 importiert. Zur Dissoziation dieses Komplexes im Zellkern ist vermutlich Gsp1-GTP alleine ausreichend und Yra1 kann seine Funktion im mRNA-Export wahrnehmen. Kap114, von dem bereits gezeigt wurde, dass es an der nukleären Zielfindung von Tbp1 beteiligt ist, könnte diese Funktion auch für Yra1 übernehmen. Durch den Dissoziationsmechanismus der neben Gsp1-GTP auch DNA erfordert könnte Yra1 an die DNA rekrutiert werden, einmal im Komplex mit Nap1, da beide in der Transkriptionselongation fungieren und zum anderen alleine, wo es dann Dia2 an Chromatin rekrutiert und seine Funktion in der DNA-Replikation ausüben kann. Desweiteren scheint Yra1 eine Rolle bei der Ribosomenbiogenese und rRNA-Prozessierung zu spielen und auch der Import in den Nukleolus könnte über Kap114 erfolgen und die Dissoziation dieses Komplexes würde neben Gsp1-GTP noch einen weiteren, bisher unbekanntem Faktor erfordern.

2.8 Die „Checkpoint“-Kinase Hsl1

Hsl1 ist eine mit Nim1 verwandte, hoch konservierte, große (170 kD), nicht essentielle Proteinkinase, die in die Regulation des Zellzyklus involviert ist. Hsl1 fungiert als so genannte „Checkpoint“-Kinase am Morphogenese „Checkpoint“, es bindet nach dem Erscheinen des "buds" an die Septine, wird daraufhin durch Autophosphorylierung aktiviert und rekrutiert Hsl7 an den "bud neck", das wiederum Swe1 rekrutiert. Swe1 wird daraufhin hyperphosphoryliert und abgebaut, was zur Aktivierung des Clb/Cdc28 Komplexes führt und somit zum Eintritt in die Mitose. Störungen dieser Signalkaskade bspw. durch Defekte in der Septinassemblierung oder der "bud"-Formation führen zu einer Stabilisierung von Swe1 und als Ergebnis zu einer Swe1-abhängigen Inhibition von Clb/Cdc28. Daraus folgt ein verzögerter Eintritt in die Mitose, der sich phänotypisch an verlängerten "buds" der Hefezellen nachweisen lässt.

Hsl1 ist auch der Angriffspunkt der Zelle bei Reaktionen auf Umweltveränderungen und der Integration von Stresssignalen, sowohl eine erhöhte Osmolarität als auch ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel führen über Hsl1 zu einem G2-Arrest (Clotet *et al.*, 2006; Mizunuma *et al.*, 2001).

Hsl1 besitzt eine N-terminale katalytische Domäne und ein langes, nicht katalytisches C-terminales Fragment, das die Bindung an die Septine und Hsl7 vermittelt. Hsl1 wird durch Autoinhibition reguliert, erst durch Bindung an die Septine wird die N-terminale, katalytische Region freigesetzt (Abbildung 35). Die ohnehin niedrige Konzentration von Hsl1 schwankt zellzyklusabhängig und wird sowohl transkriptional als auch über Degradation kontrolliert, während der von Hsl7 konstant ist. Es wurde nachgewiesen, dass das mRNA-Kontingent von Hsl1 und auch Gin4 ein periodisches Muster zeigen mit einem Höhepunkt in G1/S (Tanaka & Nojima, 1996; Okuzaki *et al.*, 1997). Desweiteren besitzt Hsl1 in seinem C-Terminus eine Destruction- und eine KEN-Box, die es als Substrat des Anaphase-Promoting Komplexes (APC, eine E3 Ligase des ubiquitinabhängigen Abbauweges) kennzeichnen und beide für den Umsatz von Hsl1 verantwortlich sind. Hsl1 ist in der S-, G2- und frühen M-Phase vorhanden, wenn die Aktivität des APC gering ist, und wird von der späten M-Phase bis zu G1 hin abgebaut, wenn die APC-Aktivität hoch ist (Burton & Solomon, 2001).

Eine weitere, Swe1-unabhängige Funktion besitzt Hsl1 in der Rekrutierung von Dynein an die Mikrotubuli. Zusammen mit den Kinasen Elm1 und Gin4 triggert Hsl1 die Akkumulation von Dynein an die Mikrotubuli des "bud neck", eine Voraussetzung für die korrekte Spindelorientierung (Grava *et al.*, 2006).

Ursprünglich wurde *HSL1* (Histon synthetic lethal) wie auch *HSL7* in einem synthetisch letalen Screen mit dem N-terminal deletierten Histon H3 gefunden, wobei der genaue Zusammenhang bisher ungeklärt ist. Es wurde angenommen, dass dieser Phänotyp vor allem über die Aktivität von Cdc28 reguliert wird (Ma *et al.*, 1996). Ebenfalls wurde bereits nachgewiesen, dass N-terminale Deletionen in den Histonen H3 und H4 einen G2-Arrest bewirken (Morgan *et al.*, 1991). Neueren Studien zufolge spielen in diesem Zusammenhang Histon-modulierende Proteine eine Hauptrolle. Sowohl die Histonmethyltransferase Set1 als auch die Histonacetyltransferase Gcn5 und die Histondeacetylase Rpd3, die als transkriptionale Regulatoren fungieren, bewirken eine Swe1-abhängige, synthetische Letalität in den Deletionsmutanten von *HSL1* und *HSL7*. Es wird vermutet, dass diese Chromatin-modifizierenden Proteine die Inaktivierung von Cdc28 und somit den Morphogenese-„Checkpoint“ umgehen können (Ruault & Pillus, 2006).

2.8.1 Hsl1 interagiert mit den Importinen Kap114 und Pse1 und bildet mit beiden einen Komplex mit Nap1

Im Zwei-Hybrid Screen mit Kap114 wurde ein Fragment von Hsl1 gefunden, das zwischen der Kinasedomäne und der Septinbindungsregion liegt und dessen Funktion bislang ungeklärt ist. Dieses Zwei-Hybrid Fragment zeigte *in vitro* eine Gsp1-GTP-abhängige Interaktion mit Kap114 (Abbildung 22), allerdings verblieb in Anwesenheit von Gsp1-GTP eine verminderte Bindung, so dass zur Dissoziation dieses Komplexes evtl. weitere Faktoren nötig sind. Außerdem wurden Interaktionen mit Pse1, Nmd5 und Kap95 detektiert (Abbildung 28), die Interaktion mit Kap123 ist sehr schwach und konnte nur mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 44). Mit dem vollständigen Hsl1-Protein wurden die Interaktionen mit Kap114 und Pse1 bestätigt, wenn auch in abgeschwächter Form (Abbildung 44). *In vivo* zeigte das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 sehr ausgeprägte Interaktionen mit Kap114 und Pse1, während Hsl1vL eine fast ebenso starke Interaktion mit Kap114, aber eine schwächere mit Pse1 zeigte (Abbildung 26). Desweiteren wurde nachgewiesen, dass sowohl Hsl-2H als auch Hsl1vL einen Komplex mit Kap114 bzw. Pse1 und Nap1 bilden (Abbildung 44). Die Bindungen von Kap114 und Nap1 an das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 bzw. Hsl1vL waren weder kooperativ noch kompetitiv, so dass Hsl1 wie Yra1 entweder unterschiedliche, nahe beieinander liegende Bindungsregionen für das Importin Kap114 und das Histonchaperon Nap1 besitzt oder Nap1 und Kap114 dieselbe Bindungsstelle besetzen,

aber beide kooperativ binden können. Es ist bekannt, dass Kap114 mit Nap1 und den Histonen H2A und H2B zwei unterschiedliche Komplexe bildet. Bei einer Bindung von Nap1 über die Histone an Kap114 ist dieser Komplex Gsp1-GTP-sensitiv, während der Komplex resistent gegenüber Gsp1-GTP ist wenn die Histone über Nap1 an Kap114 binden ist (Mosammaparast *et al.*, 2005). Möglicherweise kann Kap114 auch mit Nap1 und Hsl1 unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe bilden, einhergehend mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Gsp1-GTP.

Da es bislang keinen Nachweis für eine Pse1-Nap1 Interaktion gibt und die Bindung von Nap1 die Interaktion von Pse1 in geringem Maße beeinflusst (Verstärkung bei Hsl1vL und Abschwächung bei Hsl1-2H), ist eher davon auszugehen, dass Hsl1 verschiedene, nahe beieinander liegende Bindungsstellen für Pse1 und Nap1 besitzt. Dafür spricht auch, dass Nap1 in seiner Funktion als Histonchaperon die Bindung von Pse1 und Kap123 an die Histone H2A und H2B inhibiert (Mosammaparast *et al.*, 2002). Die ohnehin nur sehr schwach nachzuweisende Interaktion von Hsl1-2H mit Kap123 ist im Komplex mit Nap1 nicht mehr zu detektieren (Abbildung 44).

Von Nap1, das neben seiner nukleären Funktionen auch bei der Septinorganisation und der Mitoseregulation eine Rolle spielt, wurde kürzlich nachgewiesen, dass die Progression des Zellzyklus nicht von der cytoplasmatischen Lokalisierung von Nap1, sondern von dessen nukleocytoplasmatischem Pendeln abhängt (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 2003). Über Komplementationsassays wurde gezeigt, dass der Phänotyp eines Clb2-abhängigen $\Delta nap1$ -Stammes (temperatursensitives Wachstum und verlängerte "buds") mit dem Wildtyp *NAP1*-Plasmid komplementiert werden konnte, aber nicht mit Nap1- Δ NES, Nap1 mit einer mutierten NES oder mit *NAP1 Δ C*, das vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert ist. Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von *NAP1- Δ NES* das normale Zellwachstum inhibiert und dass die Doppelmutante $\Delta nap1/\Delta kap114$ im Gegensatz zu den jeweiligen Einfachmutanten verlangsamtes Wachstum zeigt. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass der nukleäre Export von Nap1 essentiell für seine mitotischen Funktionen ist und dass Nap1 eventuell in den Import von Proteinen involviert ist, die wichtig für das Zellwachstum sind (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 2003). Nap1 wird vorwiegend in der S-Phase, in der auch die Histonsynthese stattfindet in den Zellkern transportiert. Die Regulation der Lokalisierung wird über Phosphorylierungszyklen gesteuert und diese Zyklen sollen ebenfalls wichtig für die Progression des Zellzyklus sein (Calvert *et al.*, 2008). Eine Interaktion über biochemische Aktivität zwischen Nap1 und Hsl1 wurde bereits dargelegt, wobei die Funktion allerdings unklar ist (Ptacek *et al.*, 2005).

Aufgrund der Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsstudien und der Zwei-Hybrid Assays dieser Arbeit könnte ein Import von Hsl1 über Kap114 und Pse1 vermutet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass zumindest ein Teil von Hsl1, das in der S-Phase des Zellzyklus erscheint, ebenso wie Nap1 pendelt und dass der Import im Komplex mit Nap1 erfolgt. Interessant ist auch die Frage, in welcher Konformation Hsl1 *in vivo* von den Importinen und dem Histonchaperon Nap1 gebunden wird. Da Hsl1 über Autoinhibition reguliert wird, ist es unklar, in welcher Konformation die Fusionsproteine GST-Hsl1 und GFP-Hsl1 vorliegen. Möglicherweise fungieren Nap1 und die Importine Kap114 bzw. Pse1 als Chaperone, die Hsl1 vor der Inaktivierung schützen, damit die Kinasefunktion von Hsl1 auch im Kern eine Funktion ausüben kann. Im Allgemeinen waren die Interaktionen des Zwei-Hybrid-Fragments von Hsl1 stärker ausgeprägt als die des vollständigen Proteins, was darauf hinweist, dass in dem Zwei-Hybrid Fragment die Bindungsdomänen exponierter vorliegen. Gegebenenfalls existieren zwei Konformationszustände für Hsl1, entweder liegt es inaktiv vor und wird erst durch Bindung an die Septine aktiviert oder es wird durch die Importer Kap114 bzw. Pse1 und Nap1 vor dieser autoinhibitorischen Konformation geschützt.

In vitro-Bindungsstudien von Hsl1 mit Kap114 bzw. Pse1 und Nap1 sowie der inhibitorischen Domäne von Hsl1 könnten diese Frage ansatzweise klären. Die Bindungsdomänen von Hsl1 wurden mittels Zwei-Hybrid-Interaktionen ermittelt (Hanrahan & Snyder, 2003), möglicherweise würde eine Überexpression von Kap114 und/oder Nap1 die Interaktion der Kinasedomäne mit der inhibitorischen Domäne von Hsl1 kompetieren.

2.8.2 Die Lokalisierung von Hsl1 ist abhängig von seiner Septinbindungsdomäne

GFP-Hsl1 wurde in dieser Arbeit genomintegriert mittels Fluoreszenzmikroskopie am "bud neck" einer sich teilenden Zelle lokalisiert (Abbildung 24). Eine Expression von *GFP-HSL1* unter dem *GAL1*-Promotor zeigte eine Lokalisierung am "bud neck" und der Plasmamembran. Diese Lokalisierung ließ sich im Wildtyp und zudem in den Transportmutanten $\Delta kap114$, $pse1-1/\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap123$ nachweisen (Abbildung 36). Von Hsl1-HA wurde bereits nachgewiesen, dass es als Ring an der "bud"-Seite des "bud neck" lokalisiert (Barral *et al.*, 1999). Das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1, das weder die katalytische noch die Septinbindungsdomäne von Hsl1 besitzt, war größtenteils im Cytoplasma und teilweise im Kern lokalisiert. Auch diese Lokalisierung war durchgängig in allen untersuchten Mutanten ($\Delta kap114$, $pse1-1/\Delta kap114$ und $pse1-1/\Delta kap123$) zu verzeichnen (Abbildung 36). Die beiden

anderen untersuchten Fragmente von Hsl1, die die Septinbindungsdomäne besaßen (Hsl1-C, Hsl1-C+2H), zeigten wie der Wildtyp in allen untersuchten Hefestämmen eine Lokalisierung am "bud neck" (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, dass Hsl1 durch die Bindung an die Septine an den "bud neck" rekrutiert wird und dass die Kerntransportfaktoren Kap114 und Pse1 bei der direkten Lokalisierung von Hsl1 keine Rolle spielen. Hanrahan & Snyder (2003) wiesen in ihren Bindungsstudien nach, dass die Cdc12-Bindungsdomäne II von Hsl1 (Abbildung 35) für eine korrekte Lokalisierung an den "bud neck" zwingend erforderlich ist.

Auffällig bei allen Experimenten war, dass sowohl Hsl1 als auch das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 unter Hitzeeinwirkung bei 37°C abgebaut wurden, was teilweise die Lokalisierung von Hsl1 in den temperatursensitiven Mutanten erschwerte. Diese Beobachtung wurde von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls gemacht (Mizunuma *et al.*, 2001). Möglicherweise liegt auch hier ein allgemeiner Mechanismus zugrunde, mit dem die Hefezellen auf den Hitzeschock reagieren.

2.8.3 Das N-terminale Fragment von Hsl1 besitzt eine NLS und der Import ist Gsp1-abhängig

Die Tatsache, dass die Kinase Hsl1 mit dem Importin Kap114 gefunden wurde, eine substratspezifische Interaktion mit Kap114 zeigt sowie einen Komplex mit Kap114 und Nap1 bildet, die partielle Kernlokalisierung des Zwei-Hybrid Fragments von Hsl1 und die nach Sequenzanalyse entdeckten NES-ähnlichen Sequenzen im C-Terminus von Hsl1 führten zu der Annahme, dass Hsl1 möglicherweise zellzyklusabhängig in den Zellkern importiert und wieder exportiert wird und somit ähnlich wie Nap1 pendeln kann. Der Nachweis einer kurzzeitigen Kernlokalisierung von Hsl1 ist dadurch erschwert, dass Hsl1 nur sehr gering exprimiert wird und das Hsl1-Kontingent zudem zellzyklusabhängig schwankt. Der Versuch, Hsl1 durch eine Überexpression im Zellkern zu detektieren, schlug fehl (Abbildung 37). Hsl1 konnte weder im Wildtyp noch in den untersuchten Mutanten $\Delta kap114$ und $pse1-1 / \Delta kap114$ eindeutig im Kern identifiziert werden. Auch durch eine Blockade des Exports von NES-Substraten in der $xpo1-1$ -Mutante war Hsl1 nicht verstärkt im Kern nachweisbar (Abbildung 38). Die Deletion des alternativen Exportins Msn5 bewirkte ebenfalls keine Kernakkumulation von Hsl1, woraus zu schließen ist, dass ein möglicher Export von Hsl1 nicht ausschließlich über Msn5 und Xpo1 erfolgt. Auch für Nap1, das nachweislich eine NES

besitzt und über Xpo1 exportiert wird, existieren noch andere Exportwege (Zlatanova *et al.*, 2007).

Erst die Lokalisierung verschiedener Deletionsfragmente von Hsl1 zeigte, dass Hsl1 möglicherweise in den Kern importiert wird. Beide N-terminalen Fragmente von Hsl1 ohne Septinbindungsdomäne (Hsl1-N und Hsl1-N+2H) lokalisieren im Zellkern und diese Lokalisierung zeigte sich abhängig vom Gsp1-GTP Gradienten (Abbildung 40 und 41). In der Doppelmutante *pse1-1/Δkap114* war bei beiden Hsl1-Fragmenten nur eine leichte cytoplasmatische Misslokalisierung zu verzeichnen, während bei der Doppelmutante *pse1-1/Δkap123* eine klare Misslokalisierung nachzuweisen war. Insgesamt zeigten sich die Ergebnisse bei dem Hsl1-N+2H Fragment in einem stärkeren Ausmaß, allerdings verblieb ein Teil des Fragments weiterhin im Kern (Abbildung 41). Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass Hsl1 ohne die Septinbindungsdomäne in der Lage ist in den Kern zu gelangen, folglich in der N-terminalen Domäne eine NLS besitzt und dass die Kerntransportfaktoren Pse1 und Kap123 in diesen Import involviert sind. Ebenfalls lässt sich daraus ableiten, dass für den Import und somit die Bindung an die Kerntransportfaktoren entweder das kurze Fragment zwischen der Kinasedomäne und dem Zwei-Hybrid Fragment (Aminosäurereste 372-499) ausreichend ist oder dass die Kinasedomäne von Hsl1 hierbei auch eine Rolle spielt. Das Hsl1-C+2H Fragment, das einerseits das Zwei-Hybrid Fragment besitzt, das die Interaktionen zu den Transportfaktoren vermittelt und andererseits die Septinbindungsdomäne, lokalisiert wie Hsl1vL am "bud neck", so dass vermutet werden kann, dass die N-terminalen Fragmente von Hsl1 aufgrund einer fehlenden NES im Kern lokalisieren.

Eine Deletion der Cdc12 Bindungsdomäne II, die hauptsächlich für die korrekte Lokalisierung von Hsl1 verantwortlich ist, führt dazu, dass Hsl1 Δ 1282-1400 größtenteils in einem punktförmigen Muster über die ganze Zelle und den "bud" verteilt vorliegt (Hanrahan & Snyder, 2003), wobei kein Kernausschluss zu verzeichnen ist. Weder die Deletion der inhibitorischen Domäne von Hsl1 noch die der diese teilweise überlappenden Cdc11-Bindungsregion hat einen nennenswerten Einfluss auf die Lokalisierung von Hsl1 (Hanrahan & Snyder, 2003). Das weist darauf hin, dass Hsl1, das nicht autoinhibitorisch inaktiv gehalten wird, in der Lage ist, an die Septine zu binden. Möglicherweise ist das auch der Grund, warum die N-terminalen Fragmente von Hsl1 im Wildtyp vollständig im Nukleus lokalisieren. Aufgrund der fehlenden inhibitorischen Domäne sind diese Fragmente für die Kerntransportfaktoren durchgängig zugänglich und können importiert werden. Hsl1 Δ Cdc12II, das die inhibitorische Domäne noch besitzt, ist möglicherweise deshalb über die ganze Zelle

verteilt, weil Hsl1 entweder autoinaktiviert oder importiert wird. Deshalb ist Hsl1 Δ Cdc12II teilweise im Kern vorhanden und der andere Teil liegt inaktiv im Cytoplasma vor, da die noch vorhandenen Septinbindungsstellen nicht ausreichen, um Hsl1 an den Septin-Cortex zu rekrutieren und damit zu aktivieren. Mittels weiterer Lokalisierungsstudien mit C-terminalen Deletionsfragmenten von Hsl1 könnte eventuell eine NES identifiziert und die Rolle eines Hsl1-Imports enthüllt werden.

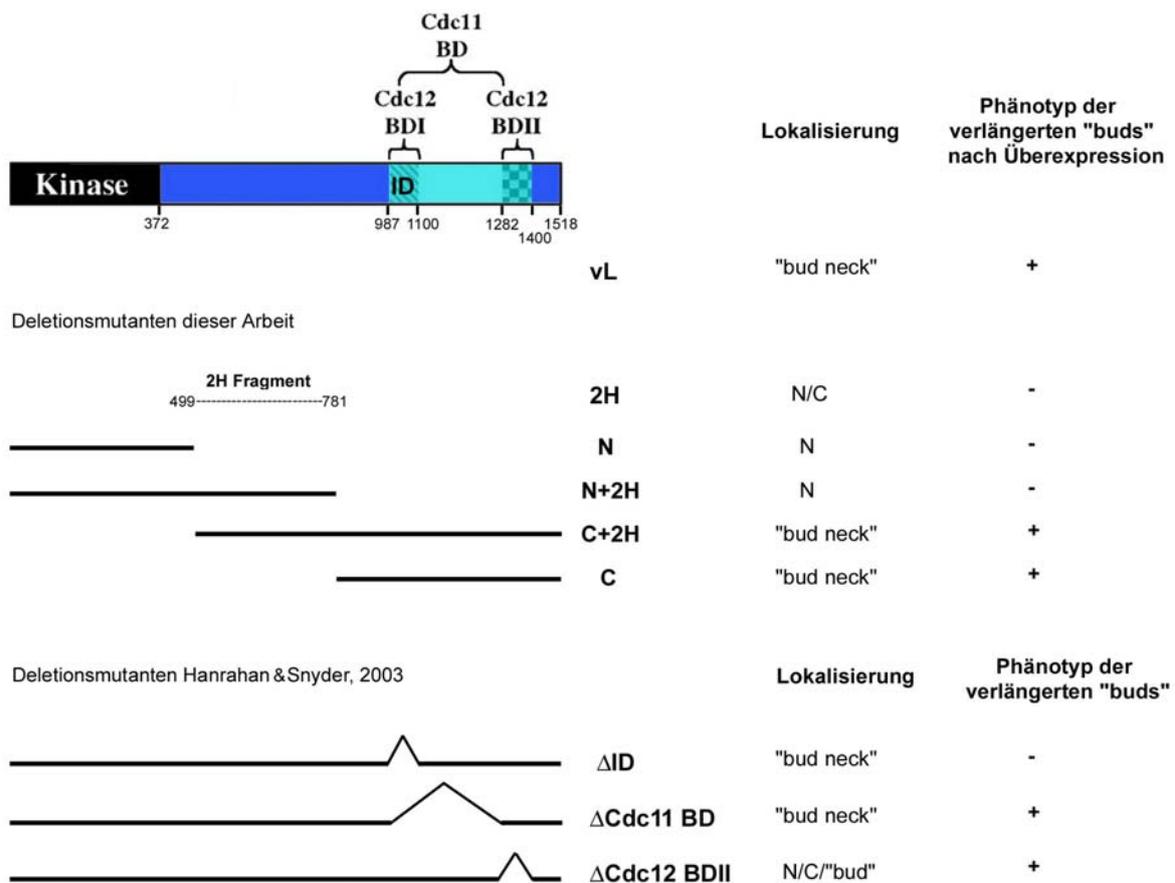


Abbildung 47: Zusammenfassung des Phänotyps von Deletionsfragmenten von Hsl1

Dargestellt sind die in dieser Arbeit und die von Hanrahan & Snyder (2003) untersuchten Deletionsfragmente von Hsl1, ihre Lokalisierung und der resultierende morphologische Phänotyp.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der experimentellen Ergebnisse folgern, dass Hsl1 in den Kern transportiert werden kann und dass die Importfaktoren Pse1, Kap123 und

vermutlich auch Kap114 bei diesem Import eine Rolle spielen. Wie bei Set2, Sda1 und Yra1 hätte hier die Dreifachmutante *pse1-1/Δkap123/Δkap114*, die nicht kreierte werden konnte, die Rolle von Kap114 beim Import von Hsl1 klären können.

2.8.4 Die Überexpression von Hsl1 und dessen C-terminaler Fragmente führt zu einer abnormalen Zellmorphologie mit verlängerten "buds"

Bei dem Versuch, *GFP-HSL1* durch Expression unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors im Kern zu detektieren, wurde eine veränderte Morphologie der Zellen festgestellt. Es zeigte sich sowohl im Wildtyp als auch in der *Δkap114*-Mutante Zellen mit verlängerten "buds", der beobachtete Phänotyp ähnelte dem der *Δhsl1*-Mutante. Dieser Phänotyp wurde in der Doppelmutante *pse1-1/Δkap114* in verstärkter Ausprägung nachgewiesen, während er sich in der Importmutante *pse1-1/Δkap123* wiederum in milderer Form zeigte (Abbildung 36). Durch eine fünfstündige Überexpression von *HSL1* war es möglich, den Phänotyp in allen untersuchten Mutanten zu verstärken, wobei auch hier *pse1-1/Δkap114*-Zellen den auffälligsten Phänotyp zeigten (Abbildung 37). Eine Überexpression des Zwei-Hybrid Fragments von *HSL1* führte hingegen zu keiner phänotypischen Veränderung der Hefezellen (Abbildung 37). Ebenso wenig wurde bei den untersuchten N-terminalen Fragmenten von Hsl1 (Hsl1-N und Hsl1-N+2H) eine morphologische Veränderung der Zellen festgestellt (Abbildung 40 und 41). Hanrahan & Snyder (2003), die ebenfalls Überexpressionsexperimente mit Hsl1-GST durchführten, zeigten auch, dass eine Überexpression des Kinasefragments und eines Fragments von Hsl1 ähnlich dem Zwei-Hybrid Fragment (Hsl1-734-980) keine verlängerten "buds" hervorrief. Diese Fragmente sind nicht in der Lage, korrekt am "bud neck" zu lokalisieren, und scheinen die Funktion des endogenen Hsl1 nicht zu beeinträchtigen. Ein milder Phänotyp bezüglich der verlängerten "buds" zeigte sich bei den Fragmenten Hsl1-C und Hsl1-C+2H, wobei sich bei Hsl1-C+2H in der *pse1-1/Δkap114*-Mutante wiederum eine Verstärkung des Phänotyps nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt). Auch Hanrahan & Snyder (2003) wiesen nach, dass eine Überexpression des C-Terminus (987-1518) und ebenso der inhibitorischen Domäne von Hsl1 (987-1100) einen mit *Δhsl1* vergleichbaren Phänotyp zeigte, der auch Swe1-abhängig war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die inhibitorische Domäne von Hsl1 einen dominant negativen Effekt auf die Hsl1-Funktion besitzt. Einen solchen Effekt scheinen katalytisch inaktive Formen von Hsl1 ebenfalls zu haben. Burton & Solomon (2000) zeigten, dass eine

Überexpression von Hsl1^{ΔKinase} (372-1518) und Hsl1^{K110A} verlängerte "buds" verursachen. Der beobachtete Phänotyp war wesentlich ausgeprägter als bei dem in etwa vergleichbaren Fragment Hsl1C+2H in dieser Arbeit. Außerdem stellten sie keine verlängerten "buds" nach einer Überexpression von Hsl1-HA fest. Es kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die in dieser Arbeit verwendete N-terminale GFP-Fusion die Kinaseaktivität von Hsl1 stört und deshalb eine Überexpression von GFP-Hsl1 zu dem Phänotyp der verlängerten "buds" führt. Allerdings zeigten die Hefezellen mit integriertem GFP-Hsl1 keine morphologischen Veränderungen (Abbildung 24). Eine Überexpression von Kcc4 oder Gin4, die beide in die Septinassemblierung involviert sind, führt ebenfalls zu der verlängerten "bud"-Morphologie (Okuzaki *et al.*, 1997; 2003). Dieser Phänotyp ähnelt dem, der für *Δclb1/Δclb3/Δclb4/GAL:CLB2* beschrieben wurde, und bei dem der verlängerte "bud" als Folge eines unkontrollierten Wechsels von apikalem zu isotrophen Wachstum auftritt (Okuzaki *et al.*, 2003). Die induzierte Überexpression von *HSL1* könnte dazu führen, dass der Mitoseeintritt und damit der Wechsel zum isotrophen "bud"-Wachstum nicht mehr koordiniert und zeitgerecht, sondern frühzeitig erfolgen und damit die veränderte Morphologie verursachen. Dafür spricht, dass es möglich ist, durch eine Überexpression von *HSL1* oder *HSL7* den Morphogenese-,Checkpoint“ zu überwinden (McMillan *et al.*, 1999). Neuere Studien, die die Phänotypen von Überexpressionen systematisch untersuchten und Überexpressionsexperimente mit ca. 80% der Gene in *S. cerevisiae* durchführten, bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit. Eine Überexpression von *HSL1* führte zu abnormaler Zellmorphologie und Zellzyklusprogression (Sopko *et al.*, 2006).

Der Unterschied zwischen Hsl1^{ΔKinase} und Hsl1C+2H liegt in einem kleinen Fragment zwischen der Kinasedomäne und dem 2H-Fragment (372-499). Möglicherweise stellt dieses Fragment eine Interaktionsdomäne von bisher noch nicht identifizierten Proteinen dar oder es besitzt Phosphorylierungsstellen und deshalb ist Hsl1^{ΔKinase} in der Lage, die Funktion des endogenen Hsl1 in stärkerer Weise zu beeinträchtigen als Hsl1C+2H.

Hsl1C+2H lokalisiert korrekt am "bud neck" (diese Arbeit), Hsl1^{ΔKinase} wurde in den durchgeführten Experimenten nicht lokalisiert und von Hsl1^{K110A} liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Mizunuma *et al.* (2001) zeigten, dass Hsl1^{K110A} in der *Δhsl1*-Mutante nicht am "bud neck" lokalisiert ist, hingegen im Wildtyp in ca. 30% der Zellen ein "bud neck" Signal nachgewiesen wurde. Da katalytisch inaktives Hsl1 von Wildtyp-Hsl1 *in vivo* phosphoryliert werden kann (Barral *et al.*, 1999), führten die Autoren das unterschiedliche Verhalten von Hsl1^{K110A} auf den unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus zurück und folgerten daraus, dass die Hsl1-Phosphorylierung und nicht die Kinaseaktivität selbst für die

Hsl1- Lokalisierung erforderlich ist. Andere Studien wiesen nach, dass katalytisch inaktives Hsl1 wie Wildtyp-Hsl1 am "bud neck" lokalisierte und auch in der Lage war, Hsl7 an den "bud neck" zu rekrutieren, allerdings war die Menge an rekrutiertem Hsl7 reduziert und in noch stärkerem Maße die Menge an Swe1 (Theesfeld *et al.*, 2003). Dieser Studie zufolge ist die Kinaseaktivität von Hsl1 nicht erforderlich für die korrekte Lokalisierung, aber das Unvermögen Swe1 an den "bud neck" zu rekrutieren, liegt der fehlenden Swe1-Regulation zu Grunde. Da Hsl7 mit der nicht-katalytischen Domäne von Hsl1 (987-1332), überlappend mit der Septinbindungsdomäne, interagiert (Shulewitz *et al.*, 1999), scheint die Rekrutierung von Hsl7 an den Septin-Cortex unter stringenter Regulation zu stehen (Theesfeld *et al.*, 2003).

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Überexpression von *HSL1* ähnlich wie eine *HSL1*-Deletion zu einem Defekt im Mitoseeintritt führt. Da die zusätzliche Deletion der Transportfaktoren *KAP114* und *PSE1* zu einer Verstärkung des Phänotyps führte, spielen sie möglicherweise auch eine Rolle bei der Mitoseregulation. Es sei angemerkt, dass vor allem Kap114 eine Funktion bei der mitotischen Signalkaskade innehaben könnte und zwar unabhängig von einem möglichen Import von Hsl1, da eine Deletion von *PSE1* und *KAP123* wiederum einen milderen Phänotyp zeigt.

Die Septinbindungsdomäne von Hsl1 scheint für den beobachteten Phänotyp der verlängerten "buds" verantwortlich zu sein. Die Überexpression der inhibitorischen Domäne von *HSL1* führt zu einer Mitoseverzögerung (Hanrahan & Snyder, 2003), die auf die Inaktivierung des endogenen Hsl1 zurückzuführen ist. Die anderen C-terminalen Fragmente (Hsl1-C, Hsl1-C+2H und wahrscheinlich auch Hsl1^{ΔKinase} und Hsl1^{K110A}) sind in der Lage, an den Septin-Cortex zu binden und können vermutlich Hsl7 in gewissem Umfang rekrutieren. Da aber eine Aktivierung von Hsl1 und Hsl7 aufgrund der fehlenden Kinaseaktivität nicht stattfindet, wird die Signalkaskade an dieser Stelle unterbrochen und die Funktion des endogenen Hsl1 wird gestört. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Septinbindungsdomänen für Cdc11 und Cdc12II, nicht aber die inhibitorische Domäne, *in vivo* essentiell für die Funktion von Hsl1 sind (Hanrahan & Snyder, 2003). Es wäre interessant zu erfahren, welche Auswirkungen die alleinige Expression der N-terminalen Fragmente von Hsl1 und deren Kernlokalisierung auf den Phänotyp hätten.

2.9 Kap114 spielt wie Hsl1 und Nap1 eine Rolle in der Regulation des Morphogenese-„Checkpoints“

Störungen der mitotischen Signalkaskade des Morphogenese-„Checkpoints“, die in einer verminderten Aktivität der Clb/Cdc28 Kinase münden, zeigen sich phänotypisch umso ausgeprägter, je mehr beteiligte Proteine deletiert werden. Einzelne Deletionen von *GIN4*, *CLAA4*, *NAP1* oder *HSL1* sind für die Zelle noch kompensierbar und führen zu einem vergleichsweise milden Phänotyp während die vollständige Inaktivierung des Clb/Cdc28-Komplexes durch Deletionen von *HSL1* (oder *HSL7*) und dem Antagonisten von Swe1, Mih1, letal ist (Barral *et al.*, 1999; McMillan *et al.*, 1999; Longtine *et al.*, 2000).

Sollte der Kerntransportfaktor Kap114 eine wie auch immer geartete Rolle bei der Regulation des Morphogenese-„Checkpoints“ innehaben, wäre zu postulieren, dass eine zusätzliche Deletion von *KAP114* in einer Δ *hsl1*-Mutante zu einer Verstärkung des Phänotyps der verlängerten "buds" führt, die zudem abhängig von Swe1 ist. Der Nachweis wurde in dieser Arbeit sowohl qualitativ als auch quantitativ erbracht. Während die Δ *kap114*-Mutante den Phänotyp des Wildtyps zeigt und die Einzeldelationen von *HSL1* und *NAP1* zu einem milden Phänotyp der verlängerten "buds" führen, kam es in der Δ *hsl1*/ Δ *kap114*-Doppelmutante zu einer eindeutigen Verstärkung des veränderten Phänotyps. Die Anzahl der Zellen mit großen "buds" war verdoppelt und die mit verlängerten "buds" um ein dreifaches erhöht gegenüber der Einzelmutante *hsl1*. Eine zusätzliche Deletion von *SWE1* führte zu einer vollständigen Unterbindung des Phänotyps (Abbildung 42 und 43). Dies kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass Kap114 in der Signalkaskade fungiert, die in der Hemmung von Swe1 mündet. Auch Pse1 scheint in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen, eventuell durch einen Import von Hsl1 in den Zellkern. In der Dreifachmutante *pse1-1*/ Δ *hsl1*/ Δ *kap114* kam es bei permissiver Temperatur zu einem weiteren Anstieg der Zellen mit großen "buds" um das zweieinhalbfache gegenüber der Einzelmutante *hsl1*. Bei restriktiver Temperatur traten zusätzlich viermal mehr Zellen mit verlängerten "buds" auf (Abbildung 42 und 43). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese Verstärkung des Phänotyps der Zellen mit verlängerten "buds" nach zusätzlicher Deletion von *PSE1* und restriktiver Temperatur auf den Hitzestress der Hefezellen zurückzuführen ist. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass GFP-Hsl1 unter Hitzeeinwirkung relativ schnell abgebaut wird und so besteht die Möglichkeit, dass der Morphogenese- „Checkpoint“ von der Zelle auch benutzt wird, um auf diese Umweltveränderung zu reagieren. In ähnlicher Weise

wurde dies bereits für eine erhöhte Osmolarität und einen erhöhten Ca^{2+} -Spiegel nachgewiesen (Clotet *et al.*, 2006; Mizunuma *et al.*, 2001).

Den auffälligsten Phänotyp mit stark verlängerten "buds" und zum Teil verzweigten Zellen mit spröder Oberfläche zeigte die Dreifachmutante $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$. Es wurden verglichen mit $\Delta hsl1$ achtmal so viele morphologisch veränderte Zellen nachgewiesen (Abbildung 42 und 43). Der Phänotyp ähnelt dem, der für $NAP1$ oder $GIN4$ Deletionen in einem $Clb2$ -abhängigen Stamm ($\Delta clb^{1,3,4}$) beschrieben wurde, bei dem ebenfalls eine raue, spröde Oberfläche der Hefezellen beobachtet wurde (Altmann & Kellogg, 1997). Nap1, das sowohl mit $Clb2$ (Kellogg *et al.*, 1995a/b; Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 2003) als auch mit $Gin4$ (Altmann & Kellogg, 1997; Gavin *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2007) interagiert, zeigt diesen markanten Phänotyp nur in Zellen, die $Clb2$ -abhängig sind. In der Doppelmutante $\Delta nap1/\Delta gin4$ wurde ebenfalls eine phänotypische Verstärkung gegenüber den beiden Einzelmutanten nachgewiesen (Longtine *et al.*, 2000). Von Nap1 wurde einerseits dargelegt, dass es in der Septinorganisation eine Rolle spielt, möglicherweise indirekt über die Phosphorylierung von $Gin4$ (Longtine *et al.*, 2000), und zum anderen wurde demonstriert, dass das nukleocytoplasmatische Pendeln von Nap1 erforderlich für das Fortschreiten des Zellzyklus ist (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 2003). Inwiefern der Nap1-abhängige Import oder Export von Proteinen, die in die Mitoseregulation involviert sind, hier eine Rolle spielt bleibt noch ungeklärt. Von einem möglichen Kandidaten, dem Zyklin $Clb2$ wurde gezeigt, dass die Interaktion mit Nap1 weder von der NES-Sequenz noch von der subzellulären Lokalisation abhängt und dass das Pendeln von $Clb2$ nicht abhängig von Nap1 ist (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 2003). Desweiteren wurde nachgewiesen, dass der C-Terminus von Nap1 essentiell für die Histonbindung und den Import ist, aber es konnte keine strikte Korrelation zwischen der Nukleosomenassemblierungs-Aktivität und der mitotischen Komplementationsfähigkeit festgestellt werden (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 2003).

Nach den experimentellen Daten dieser Arbeit scheinen Nap1 und Kap114 innerhalb der mitotischen Signalkaskade auf einer Ebene zu fungieren. Die Doppelmutante $\Delta nap1/\Delta kap114$ zeigte nahezu den gleichen Phänotyp wie die Einzelmutante $\Delta nap1$, lediglich die Anzahl der Zellfraktion mit großen "buds" war verdoppelt. Auch wurde der dramatische Phänotyp der Dreifachmutante $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$ durch das zusätzliche Einbringen eines $KAP114$ -Plasmids zwar etwas abgemildert, aber Kap114 war nicht in der Lage, die Nap1-Funktion zu komplementieren (Abbildung 43). Da eine der Hauptaufgaben von Kap114 der Import von Nap1 ist, könnte argumentiert werden, dass der Phänotyp der $\Delta hsl1/\Delta kap114$ -Mutante ursächlich von einem verminderten Import von Nap1 herrührt. Dagegen spricht die direkte,

klare Interaktion von Kap114 und Hsl1 und dass das *KAP114*-Plasmid in der Lage ist, den Dreifachknockout $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$ zu modifizieren. Auch zeigten kürzliche Studien einen synthetischen Wachstumsdefekt in der Doppelmutante $\Delta kap114/\Delta nap1$, während keine der beiden Einzelmutanten einen Wachstumsdefekt aufweist (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 2003). Es bieten sich zwei Szenarien an, die sich nicht gegenseitig ausschließen, um die experimentellen Ergebnisse zu interpretieren (Abbildung 48). Zum einen kann vermutet werden, dass Hsl1 im Verlaufe des Zellzyklus in den Kern importiert wird, wie Nap1 zwischen Kern und Cytoplasma pendeln kann und dass dieses Pendeln eine mitotische Funktion hat. Der Import von Hsl1 könnte alleine oder im Komplex mit Nap1 über Kap114 und Pse1 stattfinden, während Kap123 einen Ersatzimportweg darstellen könnte. Da sowohl Nap1 als auch die Importine an das Zwei-Hybrid Fragment von Hsl1 binden, ist es wahrscheinlich, dass Hsl1 in diesem Komplex nicht autoinhibitorisch inaktiv vorliegt. Vermutlich besitzt die Kinaseaktivität von Hsl1 auch eine Funktion im Zellkern, beispielsweise die bevorstehende Mitose einzuleiten. Eine Interaktion über biochemische Aktivität zwischen Nap1 und Hsl1 wurde bereits nachgewiesen, allerdings ist die Funktion noch völlig unklar (Ptacek *et al.*, 2005). Unklar bleibt ebenfalls, über welche Wege Hsl1 wieder exportiert wird, auch dies könnte im Komplex mit Nap1 geschehen und Xpo1, aber auch andere Exportfaktoren involvieren. Eine Aufgabe von Kap114 innerhalb der Mitoseregulation wäre somit der Import von Nap1 und Hsl1, allerdings scheint bei einem etwaigen Import von Hsl1 das Importin Pse1 die Hauptrolle zu spielen und Kap123 und Kap114 stellen lediglich Nebenwege dar. Somit wäre die nukleäre Funktion von Hsl1 in der $\Delta kap114/\Delta nap1$ -Mutante nicht beeinträchtigt, was eventuell den milden Phänotyp erklären könnte. In der $\Delta hsl1/\Delta kap114/\Delta nap1$ -Mutante ist durch die *NAP1*-Deletion die Septinorganisation und die bisher noch nicht näher charakterisierte Funktion seines nukleocytoplasmatischen Pendelns gestört und durch die Deletion von Hsl1 die Degradation von Swe1 und eine mögliche nukleäre Funktion. Die Importfunktion von Kap114 spielt in dieser Mutante keine Rolle mehr und die Tatsache, dass die An- oder Abwesenheit eines *KAP114*-Plasmids einen Unterschied im Phänotyp macht, deutet darauf hin, dass Kap114 noch eine andere Funktion innerhalb der mitotischen Signalkaskade innehat.

Diese Funktion könnte ein Import von weiteren, pendelnden Proteinen sein, die in die Mitoseregulation involviert sind. Möglicherweise besitzt Kap114 aber auch eine direkte Funktion innerhalb der Mitosekaskade, eventuell fungiert es mit Nap1 in der Septinorganisation oder ist bei der Rekrutierung von Hsl1 an die Septine beteiligt. Zunächst müsste die Swe1-Abhängigkeit des sehr markanten Phänotyps der Dreifachmutante

Δhsl1/Δkap114/Δnap1 nachgewiesen werden, da sonst nicht ausgeschlossen werden kann, dass hier auch andere Funktionen der beteiligten Proteine, wie beispielsweise die Swe1-unabhängige Funktion von Hsl1 in der Spindelorientierung (Grava *et al.*, 2006), eine Rolle spielen.

Weitere Studien müssten folgen, um die genauen Rollen von Hsl1 und Kap114 innerhalb der Mitose zu klären. Um einen Import von Hsl1 zu verifizieren, könnten verschiedene, die Septinbindungsdomäne betreffende, C-terminale Deletionsmutanten von Hsl1 lokalisiert und so eine mögliche NES identifiziert werden. Zudem könnte eine Überexpression und deren Auswirkung auf den Phänotyp überprüft werden. Um eine Rolle von Kap114 in der Septinassemblierung zu untersuchen, könnte die Septinorganisation in den einzelnen Mutanten überprüft werden. Neuere Studien haben einen Zusammenhang zwischen Septinorganisation, Zellzyklus und der Zellgestalt nachgewiesen. Gladfelter *et al.* (2005) fanden in der "bud"-Kettenmorphologie eine schnelle Diagnostik für Septindefekte. Sie wiesen nach, dass sich durch das Auferlegen einer G2-Verzögerung durch Überexpression von *SWE1* ansonsten geringfügige Defekte in der Septinorganisation in einem verstärkten Ausmaß zeigen. Die Zellen bildeten verlagerte Septinringe innerhalb der "buds", die sich ebenfalls ausdehnten, was zu dem Erscheinungsbild der "bud"-Ketten führt. Mittels dieser Methodik sollte sich eine etwaige Rolle von Kap114 in der Organisation und Assemblierung der Septine nachweisen lassen.

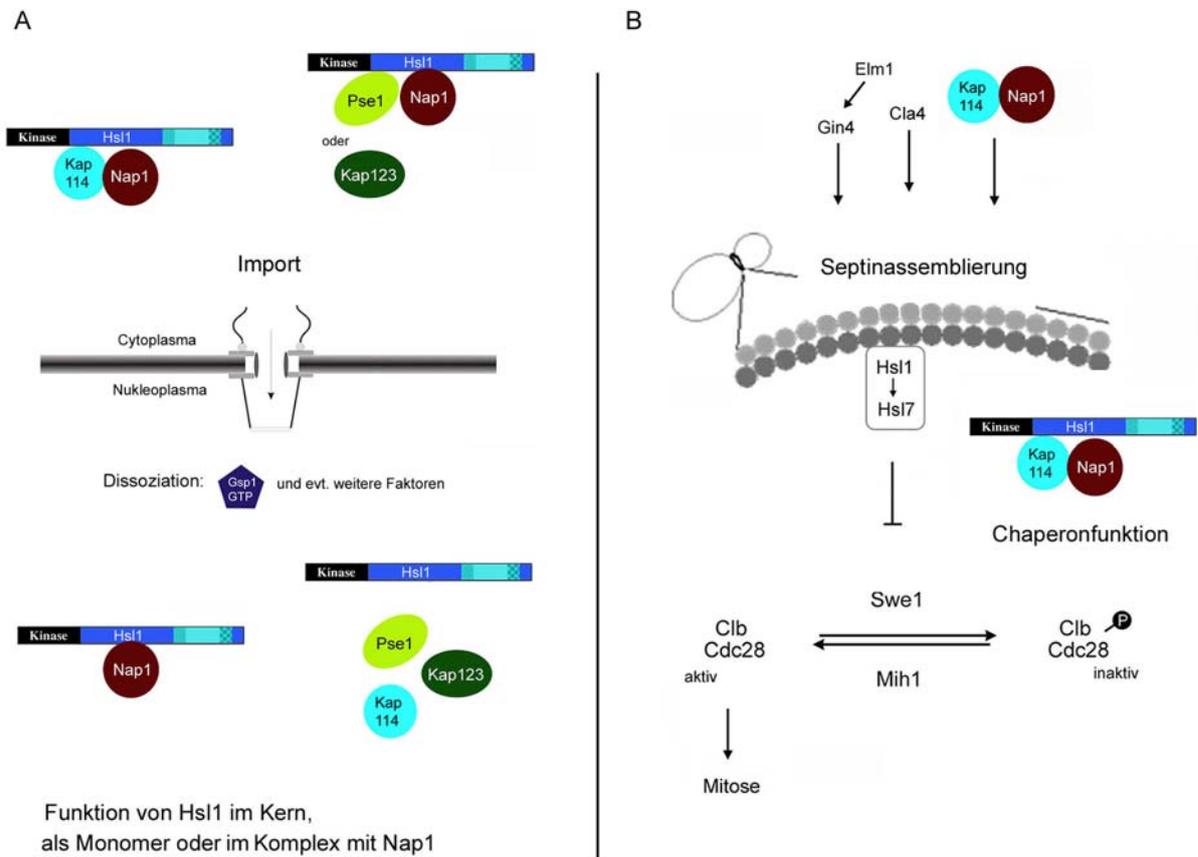


Abbildung 48: Mögliche Rollen von Nap1, Hsl1 und Kap114 in der Mitoseregulation

A. Kap114 ist neben Pse1 und Kap123 in den Import von Hsl1 involviert.

Hsl1 wird möglicherweise während des Zellzyklus in den Kern importiert. Der Import von Hsl1 könnte alleine, oder im Komplex mit Nap1 über Kap114 und Pse1 stattfinden, während Kap123 einen Ersatzimportweg darstellen könnte. Die Dissoziation des Komplexes im Kern erfordert Gsp1-GTP aber wahrscheinlich auch noch weitere Faktoren. Aufgrund der Bindungsmuster der Importine und des Histonchaperons Nap1 ist anzunehmen, dass Hsl1 katalytisch aktiv vorliegt und eine Kinasefunktion im Kern ausüben könnte, die im Zusammenhang mit der Mitoseregulation steht.

B. Kap114 und Nap1 agieren zusammen direkt am Morphogenese-, „Checkpoint“

Der Morphogenese-, „Checkpoint“ (siehe Abbildung 9) beinhaltet eine Signalkaskade, die mit mehreren Proteinen beginnt, die in die Assemblierung des Septingerüsts involviert sind, und mit der über Hsl1 gesteuerten, Swe1 abhängigen Aktivierung von Clb/Cdc28 und dem Eintritt in die Mitose endet.

Nap1 und Kap114 könnten als Chaperone dienen, die Hsl1 vor der autokatalytischen Inaktivierung schützen und somit auch in die Aktivierung von Hsl1 bzw. Rekrutierung von Hsl1 an die Septine involviert sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Nap1 und Kap114 auf einer Ebene, möglicherweise im Komplex, bei der Septinassemblierung agieren.

V Zusammenfassung

Mit dem Zwei-Hybrid System wurden neue Interaktionspartner für das Importin Kap114 identifiziert. Darunter waren die Histon-Methyltransferase Set2, Sda1, das mRNA-Export-Adapterprotein Yra1 sowie Nis1 und die Proteinkinase Hsl1, die beide in die Regulation der Mitose involviert sind.

Die nähere Charakterisierung von Yra1 identifizierte ein zweites, C-terminales Kernimportsignal, an das Kap114 und Nmd5 bevorzugt binden, während Pse1 das N-terminale NLS präferiert. Mittels Lokalisierungsstudien wurde nachgewiesen, dass Yra1 Gsp1-abhängig über die Importine Pse1 und Kap123 in den Kern transportiert wird. Nmd5 und Kap114 scheinen Nebenwege zu vermitteln. Der detektierte trimere Komplex von Yra1 und Nap1 mit Kap114 bzw. Pse1 weist auf einen möglichen Coimport von Nap1 und Yra1 hin.

Hsl1 wurde, abhängig von seiner Septinbindungsdomäne, an der Sprossungszone einer sich teilenden Hefezelle ("bud neck") lokalisiert. Es wurde nachgewiesen, dass der N-Terminus von Hsl1, der die Kinasefunktion trägt, eine NLS besitzt, Gsp1-abhängig in den Nukleus importiert wird und Pse1 und Kap123 in diesen Import involviert sind. Auch Hsl1 bildet trimere Komplexe mit Kap114 bzw. Pse1 und Nap1, was auf einen Coimport, aber auch auf eine mögliche Chaperonfunktion der Kerntransportfaktoren und Nap1 hinweist. Über Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass Kap114 in der mitotischen Signalkaskade des Morphogenese-Kontrollpunktes agiert, die in der Hemmung von Swe1 mündet, und zwar auf der gleichen Ebene wie Nap1.

Summary

Several new interaction partners for the nuclear import receptor Kap114 were identified by two-hybrid screening. Among these were the histone methyltransferase Set2, Sda1, the mRNA export adapter protein Yra1 as well as Nis1 and Hsl1, both involved in the regulation of mitosis.

The characterization of Yra1 showed the presence of a second C-terminal NLS, which is the primary binding site for the importins Kap114 and Nmd5, whereas Pse1 prefers the N-terminal NLS. Using localization studies, it was demonstrated that the nuclear import of Yra1 is Gsp1-dependent and occurs via Pse1 and Kap123. Nmd5 and Kap114 seem to mediate backup pathways. The detected trimeric complex of Yra1 with Nap1 and Kap114 or Pse1 suggests a possible coimport of Yra1 and Nap1.

The localization of Hsl1 at the bud neck of a dividing yeast cell depends on its septin binding domain. It was shown that the N-terminus of Hsl1 containing the kinase function exhibits a NLS, is transported into the nucleus in a Gsp1-dependent fashion, and Kap114 and Pse1 are involved in this import. Like Yra1, Hsl1 is able to form trimeric complexes with Nap1 and Kap114 or Pse1, which hints to a coimport or a potential chaperone activity of the nuclear transport factors and Nap1. A deletion mutant analysis shows a function of Kap114 in the mitotic signaling cascade of the morphogenetic checkpoint, which leads to the inactivation of Swe1. Furthermore, Kap114 and Nap1 act on the same level of regulation in this pathway.

VI Literaturverzeichnis

- Abruzzi K.C., Lacadie S. & Rosbash M.** (2004) Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes *EMBO J* 23, 2620-2631
- Adachi Y. & Yanagida M.** (1989) Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crml+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery *Journ Cell Biol* 108, 1195-1207
- Aitchison J. D., Blobel G. & Rout M. P.** (1996) Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins *Science* 274, 624-627
- Akhtar N., Hagan H., Lopilato J.E. & Corbett A.H.** (2001) Functional analysis of the yeast Ran exchange factor Prp20p: in vivo evidence for the RanGTP gradient model *Mol Genet Genomics* 265, 851-864
- Albertini M., Pemberton L. F., Rosenblum J.S. & Blobel G.** (1998) A novel nuclear import pathway for the transcription factor TFIIS *J Cell Biol* 143, 1447-1455
- Allen N.P.C., Huang L., Burlingame A., & Rexach M.** (2001) Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins *J Biol Chem* 276, 29268-29274
- Allen T.D., Cronshaw J.M., Bagley S., Kiseleva E., & Goldberg M.W.** (2000) The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm *J Cell Sci* 113, 1651-1659
- Altman R. & Kellogg D.** (1997) Control of Mitotic Events by Nap1 and the Gin4 Kinase *J Cell Biol* 138, 119-130
- Amon A., Surana U., Muroff I. & Nasmyth K.** (1992) Regulation of p34 CDC28 tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae* *Nature* 355, 368-371
- Arts G.-J., Fornerod M. & Mattaj I. W.** (1998a): Identification of a nuclear export receptor for tRNA *Curr Biol* 8, 305-314
- Arts G.-J., Kuersten S., Romby P., Ehresmann B. & Mattaj, I. W.** (1998b): The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs *EMBO J* 17, 7430-7441
- Asano S., Park J.E., Yu LR, Zhou M., Sakchaisri K., Park C.J., Kang Y.H., Thorner J., Veenstra T.D. & Lee K.S.** (2006) Direct phosphorylation and activation of a Nim1-related kinase Gin4 by Elm1 in budding yeast *J Biol Chem* 281, 27090-27098
- Askjaer P., Jensen T. H., Nilsson J., Englmeier L. & Kjems, J.** (1998) The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP *J Biol Chem* 273, 33414-33422
- Bachi A., Braun I.C., Rodrigues J.P., Pante N., Ribbeck K., von Kobbe C., Kutay U., Wilm M., Gorlich D., Carmo-Fonseca M. & Izaurralde, E.** (2000) The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates *RNA* 6, 136-158
- Barral Y., Parra M., Bidlingmaier S. & Snyder M.** (1999) Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast *Genes Dev* 13, 176-187
- Belanger K.D., Kenna M.A., Wei S. & Davis L.I.** (1994) Genetic and physical interactions between Srp1p and nuclear pore complex proteins Nup1p and Nup2p *J Cell Biol* 126, 619-630

- Ben-Efraim I. & Gerace L.** (2001) Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import *J Cell Biol* 152, 411-417
- Birnboim H.C. & Doly J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523
- Bischoff F.R. & 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. & Ponstingl H.** (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1 *Nature* 354, 80-82.
- Blackwell J.S. Jr., Wilkinson S.T., Mosammaparast N. & Pemberton L.F.** (2007) Mutational Analysis of H3 and H4 N Termini Reveals Distinct Roles in Nuclear Import *J Biol Chem* 282, 20142 - 20150
- Bogerd H.P., Benson R. E., Truant R., Herold A., Phingbodhipakkiya M. & Cullen B.R.** (1999) Definition of a Consensus Transportin-specific Nucleocytoplasmic Transport Signal *J Biol Chem* 274, 9771-9777
- Bohnsack M. T., Regener K., Schwappach B., Saffrich R., Paraskeva E., Hartmann E. & Görlich D.** (2002) Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm *EMBO J* 21, 6205-6215.
- Bohnsack M.T., Czaplinski K. & Görlich D.** (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191
- Booth J.W., Belanger K.D., Sanella M.I. & Davis L.I.** (1999) The yeast nucleoporin Nup2 is involved in nuclear export of importin alpha/Srp1 *J Biol Chem*, 274, 32360-32367
- Boustany L.M. & Cyert M.S.** (2002) Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site *Genes Dev.* 16(5), 608-619
- Breeuwer M. & Goldfarb D.S.** (1990) Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins *Cell* 60, 999-1008
- Brent R. & Finley R.L., Jr.** (1997) Understanding gene and allele function with two-hybrid methods *Annu Rev Genet* 31, 663-704.
- Brodsky A.S. & Silver P.A.** (2000) Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export *RNA* 6, 1737-1749
- Brune C., Munchel S.E., Fischer N., Podtelejnikov A.V. & Weis K.** (2005) Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export *RNA* 11, 517-531
- Burton J.L. & Solomon M.J.** (2000) Hsl1p, a Swel1p inhibitor, is degraded via the anaphase-promoting complex *Mol Cell Biol* 20, 4614-25
- Burton J.L. & Solomon M.J.** (2001) D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p *Genes Dev.* 15, 2381-2395
- Buscemi G., Saracino F., Masnada D. & Agostini Carbone M.** (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* SDA1 gene is required for actin cytoskeleton organization and cell cycle progression *J Cell Sci* 11,1199-1211
- Caesar S., Greiner M. & Schlenstedt G.** (2006) Kap120 Functions as a nuclear import receptor for ribosome assembly factor Rpf1 in yeast *Mol Cell Biol* 26, 3170-3180
- Calado A., Treichel N., Muller E. C., Otto A. & Kutay, U.** (2002). Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA *EMBO J* 21, 6216-6224

- Calvert, M.E.K., Keck K.M., Ptak C., Shabanowitz J., Hunt D.F. & Pemberton L. F.** (2008) Phosphorylation by Casein Kinase 2 Regulates Nap1 Localization and Function *Mol Cell Biol* 28,1313-1325
- Casolari J.M., Brown C.R., Komili S., West J., Hieronymus H. & Silver P.A.** (2004) Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization *Cell* 117,427–439
- Chaves S. R. & Blobel G.** (2001) Nuclear import of Spo12p, a protein essential for meiosis *J Biol Chem* 276, 17712-17717
- Cingolani G., Bednenko J., Gillespie M. & Gerace L.** (2002) Molecular basis for the recognition of a non-classical nuclear localization signal (NLS) by importin β *Molecular Cell* 10, 1345-1353
- Cingolani G., Petosa C., Weis K. & Müller C. W.** (1999): Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α *Nature* 399, 221-229
- Clotet J., Escoté X., Adrover M.A., Yaakov G., Garí E., Aldea M., de Nadal E. & Posas F.** (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G₂ arrest essential for cell survival at high osmolarity *EMBO J* 25, 2338–2346
- Clouse K.N., Luo M.-J., Zhou Z. & Reed R.** (2001) A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA *Nat Cell Biol* 3, 97-99
- Cole N.C. & Scarcelli J.J.** (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm *Curr Opin Cell Biol* 18, 299-306
- Collins S.R., Kemmeren P., Zhao X.C., Greenblatt J.F., Spencer F., Holstege F..C, Weissman J.S. & Krogan N.J.** (2007) Toward a Comprehensive Atlas of the Physical Interactome of *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Proteomics* 6, 439-450
- Conti E. & Izaurralde E.** (2001) Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age *Curr Opin Cell Biol* 13, 310-319
- Corbett A.H. & Silver P.A.** (1997) Nucleocytoplasmic transport of macromolecules *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 193-211
- Corbett A.H., Koepf D.M., Schlenstedt G., Lee M.S., Hopper A.K. & Silver P.A.** (1995) Rna1p, a Ran/TC4 GTPase activating protein, is required for nuclear import *J Cell Biol* 130, 1017-1026
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. & Matunis, M. J.** (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex *J Cell Biol* 158, 915-927.
- Cross F. & Blake C.** (1993) The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28 *Mol Cell Biol* 13, 3266-3271
- Dahlberg J.E. & Lund E.** (1998) Functions of the GTPase Ran in RNA export from the nucleus *Curr Opin Cell Biol* 10, 400-408
- De Vit M. J. & Johnston M.** (1999) The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae* *Curr Biol* 9, 1231-1241
- Del Rosario B. & Pemberton L.F.** (2008) Nap1 Links Transcription Elongation, Chromatin Assembly, and Messenger RNP Complex Biogenesis *Mol Cell Biol* 28, 2113–2124
- Delahodde A., Pandjaitan R., Corral-Debrinski M. & Jacq C.** (2001) Pse1/ Kap121-dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1 *Mol Microbiol* 39, 304-312
- Dez C., Houseley J. & Tollervey D.** (2006) Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae* *EMBO J* 25, 1534-1546

- Dilworth D.J., Suprapto A., Padovan J.C., Chait B.T., Wozniak R.W., Rout M.P. & Aitchison J.D.** (2001) Nup2p Dynamically Associates with the Distal Regions of the Yeast Nuclear Pore Complex *J Cell Biol* 153, 1465-1478
- Dilworth D.J., Tackett A.J., Rogers R.S., Yi E.C., Christmas R.H., Smith J.J., Siegel A.F., Chait B.T., Wozniak R.W. & Aitchison J.D.** (2005) The mobile nucleoporin Nup2p and chromatin-bound Prp20p function in endogenous NPC-mediated transcriptional control *J Cell Biol* 171, 955-965
- Dingwall C., Kandels-Lewis S. & Seraphin B.** (1995) A family of Ran binding proteins that includes nucleoporins *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7525-7529
- Dlakić M. & Tollervey D.** (2004) The Noc proteins involved in ribosome synthesis and export contain divergent HEAT repeats *RNA* 10, 1355-8382
- Dong S., Li C., Zenklusen D., Singer R. H., Jacobson A. & He F.** (2007) *YRA1* Autoregulation Requires Nuclear Export and Cytoplasmic Edc3p-Mediated Degradation of Its Pre-mRNA *Mol Cell* 25, 559-573
- Doye V. & Hurt E.** (1997) From nucleoporins to nuclear pore complexes *Curr Opin Cell Biol* 9, 401-411.
- Dragon F., Gallagher J. E. G., Compagnone-Post P. A., Mitchell B. M., Porwancher K. A., Wehner K. A., Wormsley S., Settlege R. E., Shabanowitz J., Osheim Y., et al.** (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis *Nature* 417, 967-970
- Dünnwald M., Varshavsky A. & Johnsson N.** (1999) Detection of Transient *In vivo* Interactions between Substrate and Transporter during Protein Translocation into the Endoplasmic Reticulum *Mol Biol Cell* 10, 329-344
- Edskes H.K., Ohtake Y. & Wickner R.B.** (1998) Mak21p of *Saccharomyces cerevisiae*, a homolog of human CAATT-binding protein, is essential for 60S ribosomal subunit biogenesis *J Biol Chem* 273, 28912-28920
- Enenkel C., Blobel G. & Rexach M.** (1995) Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes *J Biol Chem* 270, 16499-16502
- Englmeier L., Fornerod M., Bischoff F.R., Petosa C., Mattaj I.W. & Kutay U.** (2001) RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrats *EMBO Rep* 2, 926-932
- Fahrenkrog B., Köser J. & Aebi U.** (2004) The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem Sci* 29, 175-182
- Fahrenkrog B., Maco B., Fager A.M., Köser J., Sauder U., Ullman K.S. & Aebi U.** (2002) Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex *J Struct Biol* 140, 254-267.
- Farago M., Nahari T., Hammel C., Cole C.N. & Choder M.** (2003) Rpb4p, a subunit of RNA polymerase II, mediates mRNA export during stress *Mol Biol Cell* 14, 2744-2755
- Feng W. & Hopper A.K.** (2002) A Los1p-independent pathway for nuclear Export of intronless tRNAs in *S. cerevisiae* *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5412-5417
- Ferrezuelo F., Steiner B., Aldea M. & Futch B.** (2002) Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin Mtr10 *Mol Cell Biol* 22, 6046-6055
- Ferrigno P., Posas F., Koepf D., Saito H. & Silver P.A.** (1998) Regulated nucleocytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin β homologs Nmd5 and Xpo1 *EMBO J* 17, 5606-5614
- Fischer T., Strässer K., Rácz A., Rodriguez-Navarro S., Oppizzi M., Ihrig P., Lechner J. & Hurt E.** (2002) The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores *EMBO J* 21, 5843-52

- Fischer U., Huber J., Boelens W. C., Mattaj I. W. & 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.** (1996) The nuclear transport factor karyopherin β binds stoichiometrically to Ran-GTP and inhibits the Ran GTPase activating protein *J Biol Chem*, 271, 5313-5316
- Frey S., Richter R.P. & Görlich D.** (2006) FG-Rich Repeats of Nuclear Pore Proteins Form a Three-Dimensional Meshwork with Hydrogel-Like Properties *Science* 314, 815-817
- Fridell R. A., Truant R., Thorne L., Benson R. E. & Cullen B. R.** (1997) Nuclear import of hnRNP A1 is mediated by a novel cellular cofactor related to karyopherin-beta *Cell Sci* 110, 1325-1331.
- Fried H. & Kutay U.** (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory *Cell Mol Life Sci* 60, 1659-1688
- Fries T., Betz C., Sohn K., Caesar S., Schlenstedt G. & Bailer S.M.** (2007) A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins *J Biol Chem* 282, 19292-301
- Fromont-Racine M., Mayes A.E., Brunet-Simon A., Rain J.C., Colley A., Dix I., Decourty L., Joly N., Ricard F., Beggs J.D. & Legrain P.** (2000) Genome-wide protein interaction screens reveal functional networks involving Sm-like proteins *Yeast* 17,95-110
- Fukuda M., Asano S., Nakamura T., Adachi M., Yoshida M., Yanagida M. & Nishida E.** (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390, 308-11.
- Gadal O., Labarre S., Boschiero C. & Thuriaux P.** (2002) Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system *EMBO J* 21, 5498-507
- Gadal O., Strauß D., Kessl J., Trumpower B., Tollervey D. & 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
- Galy V., Gadal O., Fromont-Racine M., Romano A., Jacquier A. & Nehrbass U.** (2004) Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* 116, 63-73
- Gavin A.C., Aloy P., Grandi P., Krause R., Boesche M., Marzioch M., Rau C., Jensen L.J., Bastuck S., Dumpelfeld B., Edlmann A. et al.** (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery *Nature* 440, 631-636
- Gavin A.C., Bosche 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
- Gilbert W. & Guthrie C.** (2004) The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA *Mol Cell* 13, 201-212
- Gladfelter A. S., Kozubowski L., Zyla T. R. & Lew D. J.** (2005). Interplay between septin organization, cell cycle and cell shape in yeast *J Cell Sci* 118, 1617-1628
- Goffeau, A., Barrell B.G., Bussey H. et al.** (1996) Life with 6000 genes *Science* 274, 563-567
- Görlich D., Dabrowski M., Bischoff F.R., Kutay U., Bork P., Hartmann E., Prehn S. & Izaurralde E.** (1997) A novel class of RanGTP binding proteins *J Cell Biol* 138, 65-80
- Görlich D., Prehn S., Laskey R.A. & Hartmann E.** (1994) Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import *Cell* 79,767-778

- Görlich D., Kostka S., Kraft R., Dingwall C., Laskey R. A., Hartmann E. & 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
- Grandi P., Rybin V., Bassler J., Petfalski E., Strauss D., Marzioch M., Schäfer T., Kuster B., Tschochner H., Tollervey D., et al.** (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors *Mol Cell* 10, 105-115
- Grava S., Schaerer F., Faty M., Philippsen P. & Barral Y.** (2006) Asymmetric recruitment of dynein to spindle poles and microtubules promotes proper spindle orientation in yeast *Dev Cell* 10, 425-439.
- Greiner M., Caesar S. & 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
- Großhans H., Deinert K., Hurt E. & Simos G.** (2001). Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export *J Cell Biol* 153, 745-762
- Großhans H., Hurt E. & Simos G.** (2000) An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast *Genes Dev* 14, 830-840
- Hanrahan J. & Snyder M.** (2003) Cytoskeletal activation of a checkpoint kinase *Mol Cell* 12, 663-673
- Hartwell L., Culotti J., Pringle J. & Reid B.** (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast *Science* 183, 46-51
- Hector R.E., Nykamp K.R., Dheur S., Anderson J.T., Non P.J., Urbinati C.R., Wilson S.M., Minvielle-Sebastia L. & Swanson M.S.** (2002) Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export *EMBO J* 21, 1800-1810
- Hellmuth K., Lau D. M., Bischoff F. R., Künzler M., Hurt E. & Simos G.** (1998) Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA *Mol Cell Biol* 18, 6374-6386
- Hieter P., Bassett D.E. & Valle D.** (1996) The yeast genome - a common currency *Nat Genet* 13, 253-255
- Hinshaw J.E., Carragher B.O. & Miligan R.A.** (1992) Architecture and design of the nuclear pore complex *Cell* 69, 1133-1141.
- Ho Y., Gruhler A., Heilbut A., Bader G.D., Moore L., Adams S.L., Miller A., Taylor P., Bennett K., et al.** (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry *Nature* 415, 180-183
- Hodge C.A., Colot H.V., Stafford P. & Cole C.N.** (1999) Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of *xpo1-1* cells *EMBO J* 18, 5778-5788
- Hodges J.L., Leslie J.H., Mosammaparast N., Guo Y., Shabanowitz J., Hunt D.F. & Pemberton L.F.** (2005) Nuclear import of TFIIB is mediated by Kap114p, a karyopherin with multiple cargo-binding domains *Mol Biol Cell* 16, 3200-3210
- Hood J.K., Casolari J.M. & Silver P.A.** (2000) Nup2p is located on the nuclear side of the nuclear pore complex and coordinates Srp1p/importin-alpha export *J Cell Sci* 113, 1471-1480
- Huang Y., Gattoni R., Stévenin J. & Steitz J.A.** (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP dependent mRNA export *Mol Cell* 11, 837-843

- Huber J., Cronshagen U., Kadokura M., Marshallsay C., Wada T., Sekine M. & Lührmann R.** (1998) Snurportin, an m₃G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure *EMBO J* 17, 4114-4126
- Hutten S. & Kehlenbach R. H.** (2007) CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond *Trends in Cell Biology* 17,193-201
- Ishii, K., Arib G., Lin C., Van Houwe G. & Laemmli U.K.** (2002) Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection *Cell* 109, 551-562
- Isoyama T., Murayama A., Nomoto A. & Kuge S.** (2001) Nuclear Import of the Yeast AP-1-like Transcription Factor Yap1p Is Mediated by Transport Receptor Pse1p, and This Import Step Is Not Affected by Oxidative Stress *J Biol Chem* 276, 21863-21869
- Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M. & Sakaki Y.** (2001) A comprehensive Two-Hybrid analysis to explore the yeast protein interactome *PNAS* 98, 4569-4574
- Iwase M. & Toh-e A.** (2001) Nis1 encoded by YNL078W: a new neck protein of *Saccharomyces cerevisiae* *Genes Genet Syst* 76, 335-343
- Izaurralde E. & Adam S.** (1998) Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm *RNA* 4, 351-364
- Izaurralde E.** (2002) A novel family of nuclear transport receptors mediates the export of messenger RNA to the cytoplasm *Eur J Cell Biol* 81, 577-584.
- Jäkel S. & Görlich D.** (1998) Importin β , Transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells *EMBO J* 17, 4491-4502
- Jäkel S., Albig W., Kutay U., Bischoff F.R., Schwamborn K., Doenecke D. & Görlich D.** (1999) The importin β /Importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1 *EMBO J* 3, 2411-2423
- Jaquenoud M., van Drogen F. & Peter M.** (2002) Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C (Cdh1) *EMBO J* 21, 6515-26
- Jarmolowski A., Boelens W. C., Izaurralde E. & Mattaj I.W.** (1994) Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors *J Cell Biol* 124, 627-35.
- Jensen T.H., Dower K., Libri D. & Rosbash M.** (2003) Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Mol Cell* 11, 1129-1138
- Jensen T. H., Neville M., Rain J. C., McCarthy T., Legrain P. & Rosbash M.** (2000) Identification of novel *Saccharomyces cerevisiae* proteins with nuclear export activity: cell cycle-regulated transcription factor Ace2p shows cell cycle-independent nucleocytoplasmic shuttling *Mol Cell Biol* 20, 8047-8058
- Johnsson N. & Varshavsky A.** (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interaction *in vivo Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10340-10344
- Kaffman A., Rank N.M. & O'Shea E.K.** (1998) Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121 *Genes Dev* 12, 2673-2683
- Kaffmann, A. & 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. & 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. & Smith A.E.** (1984a) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large T-antigen *Nature* 311, 33-38
- Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W.D. & Smith, A.E.** (1984b) A short amino acid sequence able to specify nuclear location *Cell* 39, 499-509

- Kashyap A.K., Schieltz D., Yates J. 3rd & Kellogg D.R. (2005)** Biochemical and genetic characterization of Yra1p in budding yeast *Yeast* 22, 43-56
- Katahira J., Strasser K., Podtelejnikov A., Mann M., Jung J.U. & Hurt E. (1999)** The Mex67-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human *EMBO J* 18, 2593-2609
- Kellogg D.R. & Murray A.W. (1995a)** NAP1 acts with Clb2 to perform mitotic functions and suppress polar bud growth in budding yeast *J Cell Biol* 130, 675-685.
- Kellogg D.R. (2003)** Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division *J Cell Sci* 116, 4883-4890
- Kellogg D.R., Kikuchi A., Fujii-Nakata T., Turck C.W. & Murray A. (1995b)** Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins *J Cell Biol* 130, 661-673
- Kessler M.M., Henry M.F., Shen E., Zhao J., Gross S., Silver P.A. & Moore C.L. (1997)** Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast *Genes Dev* 11, 2545-2556
- Koepp D.M., Wong D.H., Corbett A.H. & Silver P.A. (1996)** Dynamic localization of the nuclear import receptor and its interactions with transport factors *J Cell Biol* 133, 1163-1176
- Kotera I., Sekimoto T., Miyamoto Y., Saiwaki T., Nagoshi E., Sakagami H., Kondo H. & Yoneda Y. (2005)** Importin alpha transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin beta *EMBO J* 24, 942-951
- Krebber H., Taura T., Lee M.S. & Silver P.A. (1999)** Uncoupling of the hnRNP Npl3p from mRNAs during the stress-induced block in mRNA export *Genes Dev* 13, 1994-2004
- Krogan N.J., Peng W.T., Cagney G., Robinson M.D., Haw R., Zhong G., Guo X., Zhang X., Canadien V., Richards D.P. et al., (2004)** High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes *Mol Cell* 13, 225-239
- Krogan N.J., Cagney G., Yu H., Zhong G., Guo X., Ignatchenko A., Li J., Pu S., Datta N., Tikuisis A.P. et al., (2006)** Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Nature* 440, 637-643
- Künzler M. & Hurt E.C. (1998)** Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin α in yeast *FEBS Lett* 433, 185-190
- Künzler M., Trueheart J., Sette C., Hurt E. & Thorner, J. (2001)** Mutations in the YRB1 gene encoding yeast ran-binding-protein-1 that impair nucleocytoplasmic transport and suppress yeast mating defects *Genetics* 157, 1089-105.
- Kutay U., Bischoff F.R., Kostka S., Kraft R. & Görlich D. (1997)** Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor *Cell* 90, 1061-1071
- Kutay U., Lipowsky G., Izaurralde E., Bischoff F.R., Schwarzmaier P., Hartmann E. & Görlich D. (1998)** Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor *Mol Cell* 1, 359-369
- la Cour T., Gupta R., Rapacki K., Skriver K., Poulsen F.M. & Brunak S. (2003)** NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res* 31, 393-396
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-685

- Langan T. A., Gautier J., Lohka M., Hollingsworth R., Moreno S., Nurse P., Maller J. & Sclafani R.A.** (1989) Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells *Mol Cell Biol* 9, 3860-3868
- Laser H., Bongards C., Schüller J., Heck S., Johnsson N. & Lehming N.** (2000) A new screen for protein interactions reveals that the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins Nhp6A/B are involved in the regulation of the GAL1 promoter *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13732-13737
- Le Hir H., Gatfield D., Izaurralde E. & Moore M.J.** (2001) The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay *EMBO J* 20, 4987-4997
- Lee D.C. & Aitchison J.D.** (1999) Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and RNA *J Biol Chem* 274, 29031-29037.
- Lee M.S., Henry M. & Silver P.A.** (1996) A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export *Genes Dev* 10, 1233-1246
- Lee S.J., Sekimoto T., Yamashita E., Nagoshi E., Nakagawa A., Imamoto N., Yoshimura M., Sakai H. et al.,** (2003) The structure of importin- β bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor *Science* 302, 1571-1575
- Lehming N.** (2002) Analysis of protein-protein proximities using the split-ubiquitin system *Briefings in functional genomics & proteomics* 1, 230-238
- Lei, E.P. & Silver, P.A.** (2002a) Protein and RNA export from the nucleus *Dev Cell* 2, 261-272
- Lei, E.P. & Silver P.A.** (2002b) Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA *Genes Dev* 16, 2761-2766
- Lew D.J.** (2003) The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures *Curr Opin Cell Biol* 15, 648-653
- Lew D.J., Weinert T. et al.** (1997) Cell Cycle control in *Saccharomyces cerevisiae* Cold Spring Harbor Laboratory Press *Yeast III*, 607-695
- Li B., Howe L., Anderson S., Yates III J.R. & Workman J.L.** (2003) The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II *J Biol Chem* 278, 8897-8903
- Liker E., Fernandez E., Izaurralde E. & Conti E.** (2000) The structure of the mRNA export factor TAP reveals a cis arrangement of a non-canonical RNP domain and an LRR domain *EMBO J* 19, 5587-5598
- Lindsay M., Holaska J.M., Welch K., Paschal B.M. & Macara I.G.** (2001) Ran-binding Protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export *J Cell Biol* 153, 1391-1402
- Lindsay M.E., Plafker K., Smith A.E., Clurman B.E. & Macara I.G.** (2002) Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin-alpha:beta-mediated nuclear protein import *Cell* 110, 349-360
- Lipowsky G., Bischoff F.R., Izaurralde E., Kutay U., Schäfer S., Gross H.J., Beier H. & Görlich, D.** (1999) Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA *RNA* 5, 539-549
- Lobert I.** (2000) *In vivo* Interaktionen von nukleocytoplasmatischen Transportfaktoren in Hefe *Diplomarbeit*, Med. Biochemie der Universität des Saarlandes
- Longtine M.S., Fares H. & Pringle J.R.** (1998b) Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function *J Cell Biol* 143,719-736

- Longtine M.S., McKenzie A. 3rd, Demarini D.J., Shah N.G., Wach A., Brachat A., Philippsen P. & Pringle J.R.** (1998a) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* 14, 953-961
- Longtine M.S., Theesfeld C.L., McMillan J.N., Weaver E., Pringle J.R. & Lew D.** (2000) Septin Dependent Assembly of a Cell Cycle-Regulatory Module in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol* 20, 4049-4061
- Luo M.-J., Zhou Z., Magni K., Christoforides C., Rappsilber J., Mann M. & Reed R.** (2001) Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly *Nature* 413: 644-647
- Lusk C.P., Makhnevych T. & Wozniak R.W.** (2004) New ways to skin a kap: mechanisms for controlling nuclear transport *Biochem Cell Biol* 82, 618-25
- Ma X.J., Lu Q. & Grunstein M.** (1996) A search for proteins that interact genetically with histone H3 and H4 amino termini uncovers novel regulators of the Swe1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* *Genes Dev* 10, 1327-1340
- Macara I.G.** (2001) Transport in and out of the nucleus *Micr Mol Biol Rev* 65, 570-594
- Madeo F., Engelhardt S., Herker E., Lehmann N., Maldener C., Proksch A., Wissing S. & Fröhlich K.U.** (2002) Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine *Curr Genet* 41, 208-216
- Mahajan R., Delphin C., Guan T., Gerace L. & Melchior F.** (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2 *Cell* 88, 97-107.
- Mahanty S.K., Wang Y., Farley F. W. & Elion E.A.** (1999) Nuclear shuttling of yeast scaffold Ste5 is required for its recruitment to the plasma membrane and activation of the mating MAPK cascade *Cell* 98, 501-512
- Makhnevych T., Lusk C.P., Anderson A.M., Aitchison J.D. & Wozniak R.W.** (2003) Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex *Cell* 115, 813-23
- Mattaj I.W. & Englmeier L.** (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase *Annu Rev Biochem* 67, 265-306
- Maul G., Maul H., Scogna J., Lieberman M., Stein G., Hsu B. & Borun T.** (1972) Time sequence of nuclear pore formation in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and in HeLa cells during the cell cycle *J Cell Biol* 55, 433-447
- Maurer P., Redd M., Solsbacher J., Bischoff F. R., Greiner M., Podtelejnikov A. V., Mann M., Stade K., Weis K. & 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
- McMillan J.N., Longtine M.S., Sia R.A.L., Theesfeld C.L., Bardes E.S.G., Pringle J.R. & Lew D.J.** (1999) The Morphogenesis Checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*: Cell Cycle Control of Swe1p Degradation by Hsl1p and Hsl7p *Mol Cell Biol* 19, 6929-6939
- Mendenhall, M.D. & Hodge A.E.** (1998) Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1191-243
- Milkereit P., Strauss D., Bassler J., Gadai O., Kühn H., Schütz S., Gas N., Lechner J., Hurt E. & Tschochner H.** (2003) A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40S subunits *J Biol Chem* 278, 4072-4081

- Minvielle-Sebastia L., Preker P.J., Wiederkehr T., Strahm Y. & Keller W.** (1997) The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 7897-7902
- Miyaji-Yamaguchi M., Kato K., Nakano R., Akashi T., Kikuchi A. & Nagata K.** (2003) Involvement of nucleocytoplasmic shuttling of yeast Nap1 in mitotic progression *Mol Cell Biol* 23, 6672-6684
- Mizunuma M., Hirata D., Miyaoka R. & Miyakawa T.** (2001) GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down-regulation by Ca²⁺ in budding yeast *EMBO J* 20, 1074-1085
- Möckli N., Deplazes A., Hassa P.O., Zhang Z., Peter M., Hottiger M.O., Stagljar I. & Auerbach D.** (2007) A yeast split-ubiquitin based cytosolic screening system (cytoY2H) to detect interactions between transcriptionally active proteins *BioTechniques* 42, 725-730
- Moore M.S.** (1998) Ran and nuclear transport *J Biol Chem* 273, 22857-22860
- Morgan B.A., Mittman B.A. & Smith M.M.** (1991) The highly conserved N-terminal domains of histones H3 and H4 are required for normal cell cycle progression *Mol Cell Biol* 11, 4111-4120.
- Mortensen E.M., McDonald H., Yates J.3rd & Kellogg D.R.** (2002) Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-Septin complex *Mol Biol Cell* 3, 2091-2105
- Mosammaparast N. & Pemberton L.F.** (2004) Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators *Trends Cell Biol* 14, 547-556
- Mosammaparast N., Del Rosario B.C. & Pemberton L.F.** (2005) Modulation of Histone deposition by the Karyopherin Kap114 *Mol Cell Biol* 25, 1764-1778
- Mosammaparast N., Ewart C.S. & 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. & 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. & Pemberton L.F.** (2001b) Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins *J Cell Biol* 153, 251-262
- Nachury M.V., Maresca T.J., Salmon W.C., Waterman-Storer C.M., Heald R. & Weis K.** (2001) Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly *Cell* 104, 95-106
- Nachury, M.V. & Weis, K.** (1999) The direction of transport through the nuclear pore can be inverted *Proc Natl Acad Sci* 96, 9622-9627
- Naim B., Brumfeld V., Kapon R., Kiss V., Nevo R. & Reich R.** (2007) Passive and Facilitated Transport in Nuclear Pore Complexes Is Largely Uncoupled *J Biol Chem* 282, 3881-3888
- Nakielny S. & Dreyfuss G.** (1999) Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus *Cell* 99, 677-690
- Neville M. & Rosbash M.** (1999) The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae* *EMBO J* 18, 3746-3756
- Neville M., Stutz F., Lee L., Davis L.I. & Rosbash M.** (1997) The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export *Curr Biol* 7, 767-75
- Ohno M., Segref A., Bachi A., Wilm M. & Mattaj I.W.** (2000) PHAX, a mediator of UsnRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation *Cell* 101, 187-198

- Ohno M., Segref A., Kuersten S. & Mattaj I.W.** (2002) Identity elements used in export of mRNAs *Mol Cell* 9, 659-671
- Ohtsubo M., Okazaki H. & Nishimoto T.** (1989) The RCC1 Protein, a Regulator for the Onset of Chromosome Condensation Locates in the Nucleus and Binds to DNA *J Cell Biol* 109, 1389-1397
- Okuzaki D., Tanaka S., Kanazawa H. & Nojima H.** (1997) Gin4 of *S. cerevisiae* is a bud neck protein that interacts with the Cdc28 complex *Genes Cells* 2, 753-70.
- Okuzaki D., Watanabe T., Tanaka S. & Nojima H.** (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* bud-neck proteins Kcc4 and Gin4 have distinct but partially-overlapping cellular functions *Genes Genet Syst* 78, 113-126
- Palacios I., Hetzer M., Adam S.A. & Mattaj I.W.** (1997) Nuclear import of UsnRNPs requires Importin β *EMBO J* 16, 6783-6792
- Paraskeva E., Izaurrealde E., Bischoff F.R., Huber J., Kutay U., Hartmann E., Lührmann R. & Görlich D.** (1999) CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm *J Cell Biol* 145, 255-264
- Patel S. S.** (2005) <http://sspatel.googlepages.com/nuclearporecomplex2>
- Pemberton L.F., Rosenblum J.S. & Blobel G.** (1999) Nuclear import of the TATA-binding protein: Mediation by the karyopherin Kap114 and the possible mechanism for intranuclear targeting *J Cell Biol* 145, 1407-1417
- Petrascheck M., Castagna F. & Barberis A.** (2001) Two-hybrid selection assay to identify proteins interacting with polymerase II transcription factors and regulators *Biotechniques* 30, 296-8, 300, 302
- Pohl B.** (1999) Interaktion von nucleocytoplasmatischen Transportkomponenten im Hefe Two-Hybrid System *Diplomarbeit*, Med. Biochemie der Universität des Saarlandes
- Polizotto R.S. & Cyert M.S.** (2001) Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5 *J Cell Biol* 154, 951-960
- Popa I., Harris M.E., Donello J.E. & Hope T.J.** (2002) CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element *Mol Cell Biol* 22, 2057-2067
- Portman D.S., O'Connor P. & Dreyfuss G.** (1997) YRA1, an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene, encodes a novel nuclear protein with RNA annealing activity *RNA* 3, 527-537
- Pruyne D. & Bretscher A.** (2000) Polarization of cell growth in yeast II. The role of the cortical actin cytoskeleton *J Cell Sci* 113, 571-85
- Rao B., Shibata Y., Strahl B.D. & Lieb J.D.** (2005) Dimethylation of Histone H3 at Lysine 36 Demarcates Regulatory and Nonregulatory Chromatin Genome-Wide *Mol Cell Biol* 25, 9447-9459
- Raquet X., Eckert J.H., Müller S. & Johnsson N.** (2001) Detection of altered protein conformations in living cells *J Mol Biol* 305, 927-938.
- Reed R. & Hurt E.** (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing *Cell* 108, 523-531
- Rexach M. & Blobel G.** (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors and nucleoporins *Cell* 83, 683-692
- Ribbeck K. & Görlich D.** (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes *EMBO J* 20, 1320-1330
- Ribbeck K. & Görlich D.** (2002) The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion *EMBO J* 21, 2664-2671
- Ribbeck K., Lipowsky G., Kent H.M., Stewart M. & Görlich D.** (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran *EMBO J* 17, 6587-6598

- Robbins J., Dilworth S.M., Laskey R.A. & Dingwall C.** (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence *Cell* 64, 615-623
- Rodrigues J.P., Rode M., Gatfield D., Blencowe B.J., Carmo-Fonseca M. & Izaurralde E.** (2001) REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1030-1035
- Rodriguez M.S., Dargemont C. & Stutz F.** (2004) Nuclear export of RNA *Biol of Cell* 96, 639-655
- Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.-J., Antúnez O., Brettschneider S., Lechner J., Pérez-Ortín J.E., Reed R. & Hurt E.** (2004) Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery *Cell* 116, 75-86
- Rodríguez-Navarro S., Sträßer K. & Hurt E.** (2002) An intron in the *YRA1* gene is required to control Yra1 protein expression and mRNA export in yeast *EMBO Rep* 3, 438-444
- Rojo-Niersbach E., Morley D., Heck S. & Lehming N.** (2000) A new method for the selection of protein interactions in mammalian cells *Biochem J*, 348, 585-590
- Rondón A.G., Jimeno S., García-Rubio M. & Aguilera A.** (2003) Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation *J Biol Chem* 278, 39037-39043
- Rosenblum J.S., Pemberton L.F. & Blobel G.** (1997) A nuclear import pathway for a protein involved in tRNA maturation *J Cell Biol* 139, 1655-1661
- Rosenblum J.S., Pemberton L.F., Bonifaci N. & Blobel G.** (1998) Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein *J Cell Biol* 143, 887-899
- Rouquette J., Choismel V. & Gleizes P.E.** (2005). Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells *EMBO J* 24, 2862-2872
- Rout M.P. & Aitchison J.D.** (2001) The nuclear pore complex as a transport machine *J Biol Chem* 276, 16593-16596
- Rout M.P., Aitchison J.D., Suprapto A., Hjertaas K., Zhao Y. & Chait B.T.** (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism *J Cell Biol* 148, 635-652
- Rout M.P., Blobel G. & Aitchison J.D.,** (1997) A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins *Cell* 89, 715-725
- Rout M.P. & Blobel G.** (1993) Isolation of the yeast nuclear pore complex *J Cell Biol* 123, 771-783
- Ruault M. & Pillus L.** (2006) Chromatin-modifying enzymes are essential when the *Saccharomyces cerevisiae* morphogenesis checkpoint is constitutively activated *Genetics* 174, 1135-49
- Russell P., Moreno S. & Reed S.** (1989) Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts *Cell* 57, 295-303
- Ryan K.J., McCaffery J.M. & Wentz S.R.** (2003) The Ran GTPase cycle is required for yeast nuclear pore complex assembly *J Cell Biol*, 160, 1041-1053
- Sakchaisri K., Asano S., Yu L.R., Shulewitz M.J., Park C.J., Park J.E., Cho Y.W., Veenstra T.D., Thorner J. & Lee K.S.** (2004) Coupling morphogenesis to mitotic entry *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 4124-4129
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition edn (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sancar A., Sancar G.B., Rupp W.D., Little J.W. & Mount D.W.** (1982) LexA protein inhibits transcription of the *E. coli uvrA* gene *in vitro* *Nature* 298, 96 - 98

- Santos-Rosa H., Moreno H., Simos G., Segref A., Fahrenkrog B., Panté N. & Hurt E.** (1998) Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores *Mol Cell Biol* 18, 6826-6838
- Schaap P.J., van't Ried J., Woldringh C.L. & Raué H.A.** (1991) Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae* *J Mol Biol* 221, 225-237
- Schaft D., Roguev A., Kotovic K.M., Shevchenko A., Sarov M., Shevchenko A., Neugebauer K.M. & Stewart A.F.** (2003) The histone 3 lysine 36 methyltransferase, SET2, is involved in transcriptional elongation *Nucleic Acids Res* 31, 2475-82
- Schlenstedt G., Smirnova E., Deane R., Solsbacher J., Kutay U., Görlich D, Ponstingl H. & Bischoff F.R.** (1997) Yrb4p, a yeast Ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus *EMBO J* 20, 6237-6249
- Schlenstedt G., Wong D.H., Koepp D.M. & Silver P.A.** (1995) Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport *EMBO J* 14, 5367-5378
- Scholey J., Brust-Maschner I. & Mogilner A.** (2003) Cell division *Nature* 422, 746-752
- Seedorf M. & Silver P.A.** (1997) Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8590-8595
- Senger B., Simos G., Bischoff F.R., Podtelejnikov A., Mann M. & Hurt E.** (1998) Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p *EMBO J* 17, 2196-2207
- Shen E.C., Henry M.F., Weiss V.H., Valentini S.R., Silver P.A. & Lee MS** (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins *Genes Dev* 12, 679-691
- Shulewitz M.J., Inouye C.J. & Thorner J.** (1999) Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol* 19, 7123-7137
- Shulga N., James P., Craig E.A. & Goldfarb D.S.** (1999) A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport *J Biol Chem* 274, 16501-16507
- Siomi H. & Dreyfuss G.** (1995) A nuclear localisation domain in the hnRNP A1 protein *J Cell Biol* 129, 551-556
- Siomi M.C., Eder P.S., Kataoka N., Wan L., Liu Q. & Dreyfuss, G.** (1997) Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins *J Cell Biol* 138, 1181-1192
- Smith W.A., Schurter B.T., Wong-Staal F. & David M.** (2004) Arginine Methylation of RNA Helicase A Determines Its Subcellular Localization *J Biol Chem* 279,22795-22798
- Snay-Hodge C.A., Colot H.V., Goldstein A.L. & Cole C.N.** (1998) Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export *EMBO J* 17, 2663-2676
- Solsbacher J., Maurer P., Bischoff F.R. & Schlenstedt G.** (1998) Cse1 is involved in export of yeast importin α from the nucleus *Mol Cell Biol* 18, 6805-6815
- Solsbacher J., Maurer P., Vogel F. & Schlenstedt G.** (2000) Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha *Mol Cell Biol* 20, 8468-8479
- Sopko R., Huang D., Preston N., Chua G., Papp B., Kafadar K., Snyder M., Oliver S.G., Cyert M., Hughes T.R., Boone C. & Andrews B.** (2006) Mapping Pathways and Phenotypes by Systematic Gene Overexpression *Mol Cell* 21,319 - 330
- Stade K., Ford C.S., Guthrie C. & Weis K.** (1997) Exportin1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor *Cell* 90, 1041-1050

- Stagljar I., Korostensky C., Johnsson N. & Te Heesen S.** (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5187-5192
- Stoffler D., Fahrenkrog B., & Aebi U.** (1999) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics *Curr Opin Cell Biol* 11, 391-401
- Stommel J.M., Marchenko N.D., Jimenez, G.S., Moll U.M., Hope T.J. & Wahl G.M.** (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking *EMBO J* 18, 1660–1672
- Strahl B.D, Grant P.A., Briggs S.D., Sun Z.W., Bone J.R., Caldwell J.A., Mollah S., Cook R.G., Shabanowitz J., Hunt D.F., et al.** (2002) Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression *Mol Cell Biol* 22, 1298–1306
- Strahm Y., Fahrenkrog B., Zenklusen D., Rychner E., Kantor J., Rosbash M. & Stutz F.** (1999) The RNA export factor Gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the NPC and physically interacts with the FG-nucleoporin Rip1p, the DEAD-box protein Rat8p/Dbp5p and a new protein Ymr255p *EMBO J* 18, 5761- 5777
- Sträßer K. & Hurt E.** (2000) Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export *EMBO J* 19, 410-420
- Sträßer K. & 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., Rondón A., Aguilera A., Struhl K., Reed R. & Hurt E.** (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export *Nature* 417, 304-308
- Strawn L.A., Shen T., Shulga N., Goldfarb D.S. & Wentz S.R.** (2004) Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport *Nature Cell Biol* 6, 197 - 206
- Stutz F. & Izaurralde E.** (2003) The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export *Trends Cell Biol* 13, 319-327
- Swaminathan S., Kile A.C., MacDonald E.M. & Koepf D.M.** (2007) Yra1 is required for S-Phase entry and affects Dia2 binding to replication origins *Mol Cell Biol* 27, 4674-4684
- Sydorsky Y., Dilworth D.J, Yi E.C, Goodlett D.R., Wozniak R.W., & Aitchison J.D.** (2003) Intersection of the Kap123p-Mediated Nuclear Import and Ribosome Export Pathways *Mol Cell Biol* 23, 2042-2054
- Tanaka S. & Nojima H.** (1996) Nik1: a Nim1-like protein kinase of *S. cerevisiae* interacts with the Cdc28 complex and regulates cell cycle progression *Genes Cells* 1, 905-921
- Theesfeld C.L., Zyla T.R., Bardes E.S. & Lew D.J.** (2003) A monitor for bud emergence in the yeast morphogenesis checkpoint *Mol Biol Cell*, 14, 3280-3291
- Thuret J.-Y., Vally J.-G., Faye G. & Mann C.** (1996) Civ1 (CAK *in vivo*), a novel Cdk-activating kinase *Cell* 86, 565-576
- Timmers A.C.J., Stuger R., Schaap P.J., van't Riet J. & Raué H.A.** (1999) Nuclear and nucleolar localization of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins S22 and S25 *FEBS Letters* 452, 335-340.
- Titov A.A. & Blobel G.** (1999) The karyopherin Kap122p/Pdr6p imports both subunits of the transcription factor IIA into the nucleus *J Cell Biol* 147, 235-246

- Truant R. & Cullen B.R.** (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin β -dependent nuclear localization signals *Mol Cell Biol* 19, 1210-1217
- Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T.A. et al.** (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* *Nature* 403, 601-603
- Venema J. & Tollervey D.** (1995) Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* 11,1629-1650
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O. et al.** (2001) The sequence of the human genome *Science* 291, 1304-1351
- Versele M. & Thorner J.** (2004) Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4 *J Cell Biol* 164, 701-15
- Vinciguerra P. & Stutz F.** (2004) mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores *Curr Opin Cell Biol* 16,285–292
- Wen W., Meinkoth J.L., Tsien R.Y. & Taylor S.S.** (1995): Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus *Cell* 82, 463-473
- Wiese C., Wilde A., Moore M.S., Adam S.A., Merdes A. & Zheng Y.** (2001) Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly *Science* 291, 653-656
- Wittke S., Lewke N., Müller S. & Johnsson N.** (1999) Probing the molecular environment of membrane proteins *in vivo* *Mol Biol Cell* 10, 2519–2530
- Wysocki R., Fortier P.K., Maciaszczyk E., Thorsen M., Leduc A., Odhagen A., Owsianik G., Ulaszewski S., Ramotar D. & Tamás M.J.** (2004) Transcriptional activation of metalloloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p *Mol Biol Cell*, 15, 2049-2060
- Xiao T., Hall H., Kizer K.O., Shibata Y., Hall M.C., Borchers C.H. & Strahl B.D.** (2003) Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast *Genes Dev* 17, 654-63
- Xiao Z., McGrew J.T., Schroeder A.J. & 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
- Yamaguchi R. & Newport J.** (2003) A Role for Ran-GTP and Crm1 in Blocking Re-Replication *Cell* 113, 115-125
- Yan C., Lee L.H. & Davis L.I.** (1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor *EMBO J* 17, 7416-7429
- Yang Q., Rout M.P. & Akey C.W.** (1998) Three-Dimensional Architecture of the isolated Yeast Nuclear Pore Complex: Functional and Evolutionary Implications *Mol. Cell* 1, 223-234.
- Yoshida K. & Blobel G.** (2001) The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins *J Cell Biol* 152, 729-740
- Zeitler B. & Weis K.** (2004) The FG-repeat asymmetry of the nuclear pore complex is dispensable for bulk nucleocytoplasmic transport *in vivo* *J Cell Biol* 167, 583-590
- Zenklusen D., Vinciguerra P., Strahm Y. & Stutz F.** (2001) The Yeast hnRNP-Like Proteins Yra1p and Yra2p Participate in mRNA Export through Interaction with Mex67p *Mol Cell Biol* 21, 4219-4232
- Zenklusen D., Vinciguerra P., Wyss J.-C. & Stutz F.** (2002) Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p *Mol Cell Biol* 22, 8241-8253
- Zhang M. & Green M.R.** (2001) Identification and characterization of yUAP/Sub2p, a yeast homolog of the essential human pre-mRNA splicing factor hUAP56 *Genes Dev* 15, 30-35

- Zimmerman Z.A. & Kellogg D.R.** (2001) The Sda1 Protein Is Required for Passage through Start *Mol Biol Cell* 12, 201–219
- Zlatanova J., Seebart C. & Tomschik M.** (2007) Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills *FASEB J.* 21, 1294–1310
- Zolotukhin A.S., Tan W., Bear J., Smulevitch S. & Felber B.K.** (2002) U2AF participates in the binding of TAP (NXF1) to mRNA *J Biol Chem* 277, 3935–3942

VII Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nukleocytoplasmatischer Transport	2
Abbildung 2: Struktureller Aufbau des Kernporenkomplexes.....	4
Abbildung 3: Schematische Struktur und Interaktionsdomänen von Importin β	9
Abbildung 4: Der Gsp1-GTPase Zyklus und der resultierende Gsp1-GTP Gradient	13
Abbildung 5: Importwege in den Zellkern	16
Abbildung 6: Exportwege aus dem Zellkern.....	21
Abbildung 7: mRNA-Export.....	27
Abbildung 8: Der Zellzyklus in <i>S. cerevisiae</i>	32
Abbildung 9: Der Morphogenese „Checkpoint“ bei <i>S. cerevisiae</i>	34
Abbildung 10: PCR-Programm zur Amplifikation von DNA	60
Abbildung 11: PCR-basierte Methode zur Gen-Deletion und Modifikation	74
Abbildung 12 : Das Zwei-Hybrid System.....	75
Abbildung 13: Das Funktionsprinzips des DupLEX-A-Systems.....	77
Abbildung 14: Flussdiagramm des Zwei-Hybrid Screenverlaufs	79
Abbildung 15: Das Split-Ubiquitin System	83
Abbildung 16: Synthese von GST-Fusionsproteinen mit Yjl103c, Yra1, Nis1 und Hsl1	97
Abbildung 17: Interaktionstest von Nup2 mit Nui- bzw. CubRUra3-Fusionen	104
Abbildung 18: Xpo1 und Nup2 bilden einen Komplex mit Gsp1-GTP.....	106
Abbildung 19: Immunologischer Nachweis der LexA-Fusionsproteine.....	108
Abbildung 20: Test der Genbankklone auf Interaktion mit Kap114, Sxm1 und Nmd5	112
Abbildung 21: Hsl1, Nis1, Yra1, Yjl103c, Set2 und Arr1 binden <i>in vitro</i> an Kap114, Nup1 bindet an Nmd5 und Mak21 an Sxm1	114
Abbildung 22: Die Bindungen von Hsl1, Nis1, Yra1, Yjl103c und Arr1 an Kap114 sind....	116
Abbildung 23: Immunologischer Nachweis von chromosomal kodierten GFP- Fusionsproteinen	118
Abbildung 24: Die Lokalisierung von Hsl1, Set2, Sda1 und Yra1 im Wildtyp und in verschiedenen Transportmutanten.....	120
Abbildung 25: Lokalisierung von Mak21-GFP	123
Abbildung 26: Zwei-Hybrid Assays von B42-Yra1, -Mak21 , -Sda1, -Set2 und -Hsl1 gegen LexA-Fusionen mit Transportfaktoren.....	127

Abbildung 27: Bindungsversuche von GST-Yra1, -Set2, -Mak21 und -Sda1 mit verschiedenen Transportfaktoren	129
Abbildung 28: Hsl1 bindet an verschiedene Transportfaktoren.....	130
Abbildung 29: Lokalisierung von GFP-Mak21 in <i>srp1</i> -Mutanten.....	132
Abbildung 30: Domänenstruktur von Yra1	134
Abbildung 31: Bindungsversuch von GST-YralvL mit verschiedenen Transportfaktoren und Gsp1-Abhängigkeit der Kap114-Bindung	135
Abbildung 32: Bindungsassay von GST-Yra1 mit Hefelysaten	138
Abbildung 33: Der Import von Yra1 in den Zellkern ist abhängig von Gsp1	142
Abbildung 34: Der Import von Yra1 in den Zellkern erfordert Pse1 und Kap123	144
Abbildung 35: Domänenstruktur von Hsl1	146
Abbildung 36: Hsl1 und das Hsl1-Zwei-Hybrid Fragment sind unterschiedlich lokalisiert..	148
Abbildung 37: Überexpression von Hsl1vL führt phänotypisch zu verlängerten "buds"	150
Abbildung 38: Lokalisierung von GFP-Hsl1 in der exportdefizienten Mutante <i>xpo1-1</i>	151
Abbildung 39: Deletionsfragmente von Hsl1.....	152
Abbildung 40: Hsl1 besitzt eine NLS in der N-terminalen Kinaseregion und der Import von Hsl1-N ist Gsp1-abhängig.....	154
Abbildung 41: Hsl1-N+2H wird Gsp1-abhängig importiert und Pse1 und Kap123 sind in diesen Import involviert	155
Abbildung 42: Effekte der <i>pse1-1</i> , Δ <i>hsl1</i> , Δ <i>nap1</i> und Δ <i>kap114</i> Mutationen auf die "bud"-Morphologie der Hefezellen.....	157
Abbildung 43: Quantifizierung der "bud"-Morphologie in Deletionsmutanten	160
Abbildung 44: Yra1 und Hsl1 bilden einen Komplex mit Kap114 bzw. Pse1 und Nap1.....	162
Abbildung 45: Bindungsdomänen von Yra1	181
Abbildung 46: Modell: Verschiedene Möglichkeiten des Yra1 Imports und der intranukleären Zielfindung	187
Abbildung 47: Zusammenfassung des Phänotyps von Deletionsfragmenten von Hsl1.....	194
Abbildung 48: Mögliche Rollen von Nap1, Hsl1 und Kap114 in der Mitoseregulation	202

VIII Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Transportrezeptoren in <i>S. cerevisiae</i> und ihre Substrate	10
Tabelle 2: Signalsequenzen für den Import.....	15
Tabelle 3: Signalsequenzen für den Export.....	19
Tabelle 4: mRNA-Exportfaktoren und ihre Funktion	24
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide	40
Tabelle 6: Verwendete und hergestellte Plasmide	42
Tabelle 7: Verwendete Antikörper	47
Tabelle 8: Aus der Laborkollektion verwendete Hefestämme	48
Tabelle 9: In dieser Arbeit hergestellte Hefestämme	49
Tabelle 10: Eingesetzte Aminosäurelösungen	55
Tabelle 11: Pipettierschema für SDS-Gele	88
Tabelle 12: Vergleich der Interaktionstests von Nui-Nup2 und Nup2-CubRUra3	105
Tabelle 13: Screenzusammenfassung.....	109
Tabelle 14: Ergebnisse der Sequenzierung und Literaturrecherche.....	110
Tabelle 15: Zusammenfassung der <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Interaktionen	116
Tabelle 16: Bindungsversuche der GST-Fusionen mit verschiedenen Transportfaktoren	131
Tabelle 17: Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	133
Tabelle 18: Bindungspartner von Yra1 nach massenspektrometrischer Analyse	139
Tabelle 19: Lokalisierung von Yra1 in verschiedenen Transportmutanten:	145

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. Dr. Gabriel Schlenstedt angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Gabriel Schlenstedt für die interessante Themenstellung, seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die flexiblen Rahmenbedingungen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Richard Zimmermann und Prof. Manfred Schmitt danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Prof. Nils Johnsson (Universität Ulm) möchte ich für das zur Verfügung gestellte Split-Ubiquitin System danken.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Richard Zimmermann und allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zimmermann, für zahlreiche Diskussionen und Anregungen während der Arbeitsgruppenseminare sowie das sehr angenehme Arbeitsklima.

Und ein Dank an die Fa. e.Consult für etliche Ausdrucke diverser Paper sowie an Sabine für die zeitweilige Überlassung ihres Zimmers.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Stefanie Caesar bedanken für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während der Arbeit und fürs Korrekturlesen. Ebenfalls ein besonderer Dank an Karsten Mayr, der mich hilfsbereit und kompetent bei den experimentellen Arbeiten unterstützt und somit einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Schlenstedt, die da wären Dr. Stefanie Caesar, Dr. Markus Greiner, Silke Guthörl, Dr. Silvia Hahn, Sandra Helfen, Dr. Patrick Maurer, Dipl. Biologe Karten Mayr, Dr. Andres Soto und Dr. Iris Zengerly sowie Dr. Johanna Dudek möchte ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung, Diskussionsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit sowie die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre bedanken.

Und vielen herzlichen Dank an Bernd, Tamino und Gian-Luca.

