

Dissertation
zur Erlangung eines Doktorgrades
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Funktionelle Analyse
des Hypusin enthaltenden Proteins
in *Saccharomyces cerevisiae*

vorgelegt
von

Rainer Schrader

aus Hildesheim

2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. phil. Dr. med. habil. Friedrich Lottspeich durchgeführt und von Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 12.07.2004



Unterschrift

Dissertation eingereicht am: 12.07.2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Angelika Vollmar

Mündliche Prüfung am: 14.10.2004

Zur Veröffentlichung eines Teiles dieser Arbeit ist ein Manuskript unter dem Titel in Vorbereitung:

Schrader, R., Young, C., Kozian, D., Lottspeich, F.:
Further evidence for the involvement of the hypusine containing protein (eIF-5A) in the 5'-3'-mRNA degradation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	vi
1.1	Spezies	vii
1.2	Nomenklatur von Genen, Proteinen und Punktmutanten	vii
1.3	Häufig verwendete Genbezeichnungen	vii
1.4	Synonyme	viii
2	Zusammenfassung	1
3	Einleitung	3
3.1	Hypusin – eine modifizierte Form von Lysin	3
3.2	Das Hypusin enthaltende Protein und die Biosynthese seiner posttranslationalen Modifikation	4
3.2.1	Aminosäuresequenz und Struktur	5
3.2.1.1	Ein Zweidomänen-Protein	8
3.2.2	Die Beteiligung von zwei Enzymen an der Hypusinrest-Biosynthese	9
3.2.2.1	Schritt 1: Deoxyhypusinsynthase	9
3.2.2.2	Schritt 2: Deoxyhypusin-Hydroxylase	11
3.3	Kenntnisstand zur Funktion des Hypusin enthaltenden Proteins	11
3.3.1	Hypp – ein essentieller Faktor für das Zellwachstum	12
3.3.2	Hinweise auf Zellzyklus-Arretierung zwischen G ₁ - und S-Phase	13
3.3.3	Beteiligung Hypps an apoptotischen Vorgängen – mögliche Rollen bei Krebsentstehung und Zellalterung	14
3.3.4	Subzelluläre Lokalisation	16
3.3.5	Die Bedeutung Hypps bei RNA-Kernexportvorgängen und der Replikation von Retroviren	17
3.3.6	Mögliche Funktion bei der Ribosomensynthese und beim Abbau von mRNAs	19
3.4	Aufgabenstellung	21
4	Materialien und Methoden	22
4.1	Materialien	22
4.1.1	Chemikalien, Enzyme, Kits	22
4.1.1.1	Chemikalien	22
4.1.1.2	Restriktionsenzyme, Polymerasen, Modifizierungsenzyme	23
4.1.1.3	Kommerzielle Kits	23
4.1.2	Verwendete Mikroorganismen und Plasmide	24
4.1.2.1	<i>Escherichia coli</i>	24

4.1.2.2	Saccharomyces cerevisiae	24
4.1.3	Verwendete Plasmide	25
4.1.4	Konstruierte Plasmide	25
4.1.5	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	26
4.1.6	Geräte	26
4.1.7	<i>S. cerevisiae</i> -Kultivierung	27
4.1.7.1	Vollmedium	27
4.1.7.2	Semisynthetisches Selektivmedium (SSM)	27
4.1.7.3	FOA-Medium (FM)	28
4.1.7.4	Minimal-Sporulationsmedium (MSM)	28
4.1.7.5	Kulturbedingungen für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
4.1.8	<i>E. coli</i> -Kultivierung	28
4.1.8.1	Bakterielles Medium (LB)	28
4.1.8.2	Bakterien-Kulturbedingungen	28
4.2	Methoden der Molekularbiologie	29
4.2.1	Präparation von Nukleinsäuren	29
4.2.1.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	29
4.2.1.2	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	29
4.2.1.3	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
4.2.2	DNA-Leiter-Analyse (DNA laddering)	29
4.2.3	Polymerasen	30
4.2.3.1	Erzeugung glatter Enden aus 3'- oder 5'-Überhängen	30
4.2.3.2	Reverse Transkription	30
4.2.4	Polymerase-Kettenreaktion	30
4.2.4.1	Standardbedingungen	30
4.2.4.2	Direkte Kolonie-PCR	31
4.2.4.3	<i>In vitro</i> -Mutagenese	31
4.2.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	31
4.2.6	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
4.2.7	Reinigung der PCR-Produkte	32
4.2.8	Entsalzung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren	32
4.2.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	32
4.2.9.1	Ligation	32
4.2.9.2	Direktes Klonieren von PCR-Produkten	32
4.2.9.3	Transformation von <i>E. coli</i>	32
4.2.10	DNA-Sequenzierung	32
4.2.11	Einbringung von DNA in Hefezellen	33
4.2.12	Einzelsträngige Träger-DNA mit hohem Molekulargewicht	33
4.2.13	Fluoreszenzlabeling von DNA-Fragmenten	33
4.2.14	Herstellung von 3'-CY5-gelabelten DNA-Oligonukleotiden als Sonden für Northern- Blotting	33
4.2.15	Southern Blotting	34
4.2.16	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefezellen und Zellfraktionen	35
4.2.17	RNA-Gel-Elektrophorese	35

4.2.18	Differentielle Analyse der mRNA-Affinitätsbindung an immobilisierte GST-Proteine – SNAAP-Technik	35
4.2.19	RNA-Blotting	36
4.2.20	Hybridisierung	36
4.2.21	„in gel“-Hybridisierung	36
4.2.22	Plasmid-Isolierung aus Hefezellen	36
4.2.23	Komplementationsanalyse	37
4.2.24	Untersuchung der Plasmidretention - spontaner Plasmidverlust	37
4.2.25	FOA-Screening	37
4.2.26	Quantitative Sybr-Green-Real-Time-PCR	37
4.2.26.1	Relative Quantifizierung durch das Standard-Kurvenverfahren	39
4.2.27	Experimente mit Hochdichte-Oligonukleotid-Genchips	40
4.2.27.1	RNA-Extraktion, cRNA-Präparation und Microarray-Hybridisierung	40
4.2.27.2	Übersicht der Lösungen für Affymetrix Chipexperimente	41
4.2.27.3	Generierung und statistische Auswertung der Expressionsdaten durch vergleichende HDOA-Experimente	42
4.2.28	DNA- und Protein-Sequenzanalysen	46
4.3	Proteinchemische Methoden	47
4.3.1	Proteinbestimmung	47
4.3.2	Aceton-TCA-Proteinfällung	47
4.3.3	Präparation von Hefeproteinen	47
4.3.3.1	Aufschluss für SDS-PAGE-Minigele	47
4.3.3.2	Aufschluß für die isoelektrische Fokussierung	48
4.3.4	IEF, SDS-PAGE und Proteinnachweis in Gelen	48
4.3.4.1	2D-Gelelektrophorese	48
4.3.4.2	Isoelektrische Fokussierung	48
4.3.4.3	SDS-PAGE	49
4.3.4.4	Coomassie Blue Färbung	49
4.3.4.5	Silberfärbung	50
4.3.4.6	Computerunterstützte Auswertung von 2D-Gelen	50
4.3.4.7	Spaltung der Proteine in der Gelmatrix	50
4.3.4.8	Elution der Spaltpeptide	51
4.3.4.9	MALDI-Massenspektrometrie	52
4.3.4.10	Elektrospraymassenspektrometrie (ESI-MS)	52
4.3.4.11	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	53
4.3.5	Aminosäuresequenzanalyse	53
4.3.6	Datenbankrecherche	53
4.3.7	Protein-Blotting	54
4.3.8	Proteinfärbung auf Blots	54
4.3.9	Immunologischer Nachweis von Proteinen	54
4.3.10	Heterologe Expression des GST-getaggten Hyp2p in <i>E.coli</i>	55
4.3.11	Expression von GST-getaggten Hyp2p-Formen in <i>S. cerevisiae</i>	55
4.3.12	Affinitätsreinigung zur Suche nach von Proteininteraktionspartnern (Pull-Down-Experiment)	56
4.4	Zellfraktionierung von Hefezellen	58

4.4.1	Isolierung von Hefe-Zellkernen für die RNA-Extraktion	58
4.4.2	Isolierung von Mitochondrien	58
4.5	Überprüfung der Existenz eines mitochondrialen Membranpotentials	58
4.6	Zell-Proliferationsassay	59
4.7	Zelluläre Fluoreszenzfärbungen, Mikroskopie	59
4.7.1	Anfärbung der Zellkerne in Hefezellen durch DAPI-Färbung	59
4.7.2	End-Labeling von DNA-3'-Termini entstanden durch DNA-Strangbrüche: TUNEL	60
4.7.3	Mikroskopische Untersuchungen	60
4.7.4	Elektronenmikroskopie	60
5	Ergebnisse	61
5.1	Funktionsstudie am Hypusin enthaltenden Protein durch Punktmutanten-Charakterisierung	61
5.1.1	Genetische Überprüfung der Doppeldisruption beider <i>HYP</i> -Gene	61
5.1.2	Überprüfung von Art und Eigenschaften der Plasmidausstattung	64
5.1.3	Eine Punktmutagenese-Studie führt zur temperatursensitiven Mutante G₈₁V	67
5.1.3.1	Regenerierung der Punktmutante G₈₁V durch FOA-Screening	69
5.1.4	Wachstumsverhalten des Hefestammes WDHG₈₁Gal im Vergleich zum Wildtyp	73
5.1.5	Genetische Stabilität des Mutantenstammes WDHG₈₁Gal	75
5.1.6	Proteinchemische phänotypische Charakterisierung durch 2D-Gel-Analyse	75
5.1.6.1	Analyse von Gesamtextrakten	75
5.1.7	Proteomanalytischer Vergleich mitochondrialer Proteine	91
5.1.7.1	Mitochondrien-Analysen durch 2D-Gel-Elektrophorese aus Kulturen bei permissiver Temperatur	92
5.1.7.2	2D-Gel-Analyse von isolierten Mitochondrien nach Inkuba- tion bei 37°C	100
5.1.8	Überprüfung der mitochondrialen Aktivität und Funktionalität des mitochondrialen Genoms	105
5.1.8.1	Messung des Atmungsketten-Membranpotentials an isolier- ten Mitochondrien	105
5.1.8.2	Wachstumsverhalten auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen	107
5.1.9	Differentielle Gen-Transkriptionsprofil-Analyse der <i>HYP(hum)</i> - Punktmutante G₈₁V	110
5.1.9.1	Experimenteller Ansatz und Probenvorbereitung	111
5.1.9.2	Allgemeine Eigenschaften der Auswertungsergebnisse	112
5.1.9.3	Ist Hypp ein RNA-Kernexportfaktor in Hefe?	118
5.1.9.4	Beteiligung Hypps an einem speziellen mRNA-Abbauweg .	125
5.1.9.5	Anreicherung von Pseudogenen – ein direkter Hinweis auf NMD-Defizienz	128
5.1.9.6	Beeinträchtigung des telomeren Positions-Effektes in G₈₁ . .	128
5.1.9.7	Anreicherung retrotransposabler Elemente, ihrer LTR-Sequenzen und ihnen benachbarter ORFs	132

5.1.9.8	Die Serin(AGA)-tRNAs	133
5.1.9.9	Abreicherung mitochondrialer Transkripte	134
5.1.9.10	Übereinstimmungen aus proteomischer und transkriptomi- scher Analyse	134
5.1.9.11	Überlappung von Transkriptgruppen	137
5.1.9.12	Hinweise auf weitere Hypp-Funktionen aus den Genchip-Daten	138
5.1.10	Überprüfung der Überlebensfähigkeit von humanen und hefeeigenen <i>HYP</i> -Mutanten	139
5.1.11	Wachstumsverhalten auf sorbitolhaltigem Medium	141
5.1.12	Elektronenmikroskopische Untersuchung von G₈₁	141
5.1.13	Prüfung auf apoptotisches Verhalten	143
5.1.13.1	DAPI-Fluoreszenzfärbung und TUNEL-Assay	143
5.2	Direkte Bestimmung von Protein- und RNA-Bindungspartner des Hypusin ent- haltenden Proteins	146
5.2.1	Identifizierung eines Proteinbindungspartners durch Affinitätschroma- tographie	149
5.2.2	Suche nach RNA-Bindungspartnern des Hypusin enthaltenden Proteins	152
5.2.2.1	Findung von bindenden mRNA-Spezies durch die SNAAP- Methode	152
5.2.2.2	Herstellung der RRE-DNA-Sequenz aus dem HIV-1-Virus . .	158
6	Diskussion	160
6.1	Die Wahl einer humanen Punktmutante zur heterologen Expression in Bäckerhefe	160
6.2	Entdeckung der mitochondrialen Atmungsdefizienz durch 2D-Gel-Analyse . .	161
6.3	Genchip-Analyse zur Klärung der RNA-Kernexporthypothese	164
6.4	Beeinträchtigung des 5'-3'-mRNA-Abbauweges in G₈₁	166
6.5	Betrachtung der durch NMD bzw. 5'-3'-RNA-Abbau regulierten Gen- und Funktionsgruppen im Hinblick auf die Funktion Hypps	172
6.5.1	Beeinträchtigung des telomeren Positionseffektes	173
6.5.2	Hypp und die Zellalterung	175
6.5.3	Retrotransposable Elemente	176
6.5.4	Verknüpfung der NMD- mit der Atmungs-Defizienz	178
6.6	Weitere Funktionen Hypps neben NMD	181
6.7	Keine Wachstumsverbesserung bei G₈₁ durch Sorbitol	183
6.8	Apoptotisches Verhalten bei arretierten G₈₁ -Zellen	183
6.9	Die Proteininteraktion mit dem Hüllenprotein des L-A-Virus	184
6.10	Direkte Suche nach mit Hypp interagierenden mRNA-Molekülen	187
6.11	Das gewonnene Bild der funktionellen Zusammenhänge Hypps	189
6.12	Ausblick	191
6.13	Fazit	192
7	Tabellen-Anhang zu Datenmaterial der G₈₁-HDOA-Analyse	193
7.1	In G₈₁ akkumulierende Transkripte der HDOA-Analyse mit Zugehörigkeit zu NMD- Substratgruppen	193
7.2	Anreicherungsverhalten der erweiterten Seripauperinfamilie	197
7.3	Angereicherte ORFs unabhängig von der RNA-Abbau-Defizienz	198

1. Abkürzungen

α -	anti-	min	Minute
AK	Antikörper	mitoch.	mitochondrial
AP	alkaline Phosphatase	MM	„mismatch“
APS	Ammoniumpersulfat	MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
ARS	autonome Replikations-Sequenz	M_r	relatives Molekulargewicht
AS	Aminosäure	MS	Massenspektrometrie
ASA	Aminosäureanalyse	mtDNA	mitochondriale DNA
bp	Basenpaare	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
BSA	Rinderserumalbumin	MW	Molekulargewicht
BCIP	Bromochloroindolylphosphat	NDS	2,7-Naphthalen-disulfonsäure, Natriumsalz
BIS	<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid	NES	nukleäre Export-Sequenz
BSA	Rinderserumalbumin	NLS	nukleäre Lokalisations-Sequenz
CIP	calf intestine phosphatase	NMD	„Nonsense Mediated Decay“
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfat	NP-40	Nonidet-P-40-Detergens
CY5	Fluoreszenzfarbstoff mit Cyanin-5-Molekülgerüst	OD	optische Dichte
2D-d	zweidimensionale (Gelelektrophorese) Tage	ORF	„open reading frame“
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DD	Differential Display	PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
DHH	Deoxyhypusinhydroxylase	PCR	Polamerasekettenreaktion
DHS	Deoxyhypusinsynthase	pI	isoelektrischer Punkt
DMSO	Dimethylsulfoxid	PM	„perfect match“
DFMO	α -Difluoromethylornithin	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTP	Deoxynukleotid-Triphosphat	Prec.	Precursor
dpi	dots per inch	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DTT	Dithiothreitol	RRE	„Rev responsive element“ der HIV-1-Virus-RNA
ds	doppelsträngig	RP	reversed phase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	rpm	Rotationen pro Minute
EM	Elektronenmikroskopie	RT	Raumtemperatur
ER	endoplasmatisches Retikulum	SDS	Natriumdodecylsulfat
ESI	Elektrosprayionisation	sec	Sekunden
EST	expressed sequence tag	SELEX	systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
FC	„Fold Change Factor“	SNAAP	„specific nucleic acids associated with proteins“
FITC	Fluorescein	ss	„einzelsträngig“
FOA	5-Fluororotsäure	SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
Gal	D-Galaktose	SSM	semisynthetisches Medium
GC-7	<i>N</i> ¹ -Guanidyl-1,7-diaminoheptan	<i>T</i>	Totalacrylamidkonzentration
GFP	green fluorescent protein	TAE	Tris-Acetat-Puffer
Gluc	D-Glukose	TBE	Tris-Borat-Puffer
GST	Gluthathion-S-Transferase	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
h	Stunden	TCA	Trichloressigsäure
H ₂ O _{bi}	doppelt destilliertes Wasser	TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
HDOA	Hoch-Dichte-Oligonukleotid-Array	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethylendiamin
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)	TFA	Trifluoressigsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie	TOF	time of flight
IEF	isoelektrische Fokussierung	TPE	telomerer Positions-Effekt
IPG	immobilisierter pH-Gradient	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Ig	Immunglobulin	Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactosid	ts	temperatur-sensitiv
kb	Kilobasenpaare	TUNEL	TdT-vermitteltes dUTP-Kettenbruch-Endlabeling
kDa	kilo-Dalton	Ty	Retrotransposon-yeast
LB	Luria-Bertani-Medium	U	„unit“ als Einheit enzymatischer Aktivität
LC	Flüssigkeitschromatographie	UV	ultraviolett
LMW	low molecular weight	WT	Wildtyp
LTR	„long terminal repeat“, lange endständige Wiederholungssequenz	Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation	YPD	„yeast/peptone/dextrose“
MCS	multipler Klonierungsbereich	YPEG	„yeast/peptone/ethanol/glycerol“
		z	Zahl der Ladungen

1.1 Spezies

<i>A. thaliana</i>	Arabidopsis thaliana	<i>M. sativa</i>	Medicago sativa
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans	<i>M. jannaschii</i>	Methanococcus jannaschii
<i>D. discoideum</i>	Dictostelium discoideum	<i>N. crassa</i>	Neurospora crassa
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	<i>N. tabacum</i>	Nicotiana tabacum
<i>H. sapiens</i>	Homo sapiens	<i>S. cerevisiae</i>	Saccharomyces cerevisiae
		<i>S. acidocaldarius</i>	Sulfolobus acidocaldarius

1.2 Nomenklatur von Genen, Proteinen und Punktmutanten

Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden abgekürzt durch drei kursiv-gedruckte Buchstaben. Großschreibung erfolgte, wenn das Gen aktiv (dominant) war, Kleinschreibung wenn es sich um ein inaktiviertes (rezessives) Gen handelte. Allele des gleichen Gens wurden durch Anfügen einer Zahl kenntlich gemacht. Gen-Insertionen wurden durch zweifachen Doppelpunkt gekennzeichnet. Tiefstellungen verdeutlichten partielle oder komplette Gen-Deletionen. Phänotypen wurden durch beschreibende Abkürzungssymbole und durch die Hochstellungen „+“ oder „-“ dargestellt. Proteine wurden in Anlehnung an den Gennamen in normaler Schrift mit großem Anfangsbuchstaben geschrieben und mit einem endständigen „p“ versehen (z.B. Hyp2p). Die Position eines speziellen Aminosäurerestes in der Proteinsequenz wurde beschrieben durch Angabe seiner Dreibuchstaben- oder Einzelbuchstaben-Abkürzung zusammen mit einer Zahl, die die Distanz des Restes vom hypothetischen Start-Methioninrest angibt (z.B. Hyp2p Lys (K) 51). Aminosäure-Punktmutationen in Wildtypsequenzen wurden durch den Einzelbuchstaben-code des neuen Aminosäurerestes gefolgt von einer tiefgestellten Zahl, die wiederum den Abstand des Restes vom Startmethionin angibt, und dem Einbuchstaben-code des Wildtyprestes beschrieben. (Z.B. zeigt G₈₁V an, dass der Wildtyprest Valin durch Glycin ersetzt wurde.) Die Abkürzungen „HYP“ und „Hypp“ werden als Sammelbezeichnungen gebraucht oder beschreiben generelle Bezeichnungen für zuvor genannte oder nicht näher spezifizierte Hypusin enthaltende Proteine oder die für sie codierenden Gene.

1.3 Häufig verwendete Genbezeichnungen

Gen	Genprodukt	Herkunft
<i>DCPI</i>	mRNA-5'-Cap-Abspaltungsenzym I	<i>S. cerevisiae</i>
<i>DYS1</i>	Deoxyhypusinsynthase (DHS)	<i>S. cerevisiae</i>
<i>HIS3 (H)</i>	Imidazolglycerolphosphatdehydratase	<i>S. cerevisiae</i>
<i>HYP1</i>	Hypusin enthaltendes Protein Nr.1 (Hyp1p oder Anb1p)	<i>S. cerevisiae</i>
<i>HYP2</i>	Hypusin enthaltendes Protein Nr.2 (Hyp2p)	<i>S. cerevisiae</i>
<i>HYP(hum)</i>	humanes Hypusin enthaltendes Protein Nr.1 (Hyp(hum)p)	<i>H. sapiens</i>
<i>LEU2 (L)</i>	β-Isopropylmalat-Dehydrogenase	<i>S. cerevisiae</i>
<i>n-HYP1</i>	Hypusin enthaltendes Protein Nr.1 aus Tabak	<i>N. tabacum</i>
<i>n-Hyp2</i>	Hypusin enthaltendes Protein Nr.2 aus Tabak	<i>N. tabacum</i>
<i>TRP1 (W)</i>	N-(5'-Phosphoribosyl)-Anthranilat-Isomerase	<i>S. cerevisiae</i>
<i>URA3 (U)</i>	Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase	<i>S. cerevisiae</i>
<i>XRNI</i>	Exoribonuklease I	<i>S. cerevisiae</i>

1.4 Synonyme

S. cerevisiae: Hypusin enthaltendes Protein Nr.1: Hyp1p = TIF51B = Anb1p = GTD157 = YJR047C

S. cerevisiae: Hypusin enthaltendes Protein Nr. 2: Hyp2p = TIF51A = SYGP-ORF21 = YEL034W

S. cerevisiae: Deoxyhypusin-Synthase: Dys1p = DHS = YHR068W

H. sapiens: humanes Hypusin enthaltendes Protein Nr.1: Hyp(hum)p = IF-M2B α = eIF-4D = eIF-5A1

2. Zusammenfassung

Die durch eine zweistufige posttranslationale Modifikationsreaktion gebildete ungewöhnliche Aminosäure Hypusin kommt in der Zelle proteingebunden nur in einer speziellen Protein-Gruppe vor, die mit einer unterschiedlichen Anzahl von Mitgliedern in allen eukaryontischen und archaebakteriellen Zellen mit einem hohen Identitätsgrad der Aminosäuresequenz gefunden wurde. Die Modifikation stellt als N^ε-(4-amino-2-hydroxybutyl)-Lysin die Veränderung eines einzigen Lysin-Restes innerhalb eines sehr konservierten basischen Sequenzabschnittes dar. Bekannt ist, dass das Hypusin enthaltende Protein (Hypp) essentiell für den Ablauf des Zellzyklus und für die Zellproliferation ist und dass dabei seine Hypusinmodifikation notwendig ist. Ferner ist eine Interaktion mit RNA gezeigt worden, und es gibt Hinweise auf eine Rolle im RNA-Metabolismus. Obwohl das Protein auf proteinchemischer Ebene gut charakterisiert ist, sind Funktionen, die für alle das Protein besitzenden Organismen gültig sind, bislang nicht definiert worden. Diese Arbeit hatte zum Ziel, im System *Saccharomyces cerevisiae* in der Literatur existierende Hypothesen zur Funktion Hypps zu überprüfen und neue zelluläre Funktionszusammenhänge des Proteins aufzudecken.

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Studie stellte die phänotypische Charakterisierung einer ausgeprägt temperatursensitiven Hypp-Punktmutante dar. Es handelte sich um eine punktmutierte Form des heterolog in Hefe exprimierten humanen Proteins Hyp1p, in welcher der Valin-Aminosäurerest an der Position 81 durch Glycin ersetzt vorlag (G₈₁V). Nach einer genetischen Überprüfung der eingesetzten Wildtyp- und Mutantenhefestämmen und ihrer temperaturabhängigen Wachstumseigenschaften erfolgte eine Charakterisierung des Expressionsverhaltens auf Proteinebene durch 2D-Gel-Elektrophorese. Dabei wurden Expressionsunterschiede bestimmter einzelner Proteine gefunden, was gegen eine Rolle des Proteins bei der globalen RNA-Prozessierung spricht. Gezeigt wurden herabgesetzte Proteinmengen für Untereinheiten aus den mitochondrialen Atmungskettenkomplexen I bis V sowie für andere mitochondriale Proteine und für das Hitzeschockprotein Hsp26p. Dies wies auf eine Verknüpfung der Hyppfunktion mit mitochondrialen Funktionen und Vorgängen des Energiestoffwechsels hin. Eine Überprüfung des mitochondrialen Atmungsvermögens durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ sowie des Wachstumsvermögens der G₈₁V-Stämme auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen bei permissiver und restriktiver Temperatur bestätigte diese Ergebnisse und bewies, dass die Punktmutanten-Stämme bei 25°C zur mitochondrialen Atmung eingeschränkt fähig waren, nicht aber bei 37°C.

Die Expressionsanalyse auf die mRNA-Ebene durch Hochdichte-Oligonukleotid-Arrays erbrachte übereinstimmende Ergebnisse auf Protein- und mRNA-Ebene und bestätigte die ausgeprägte mitochondriale Atmungseinschränkung der Mutante. Die Hypothese, dass es sich um ein mRNA-Kernexportprotein handelt, konnte im System Bäckerhefe durch die differentielle Analyse der mRNA-Profile aus G₈₁V-Zellkernen nicht bestätigt werden, da bei beiden Temperaturstufen keine signifikante Anreicherung einer mRNA-Transkriptgruppe im Zellkern gemessen wurde. Unabhängig von der subzellulären Herkunft der untersuchten RNA und der Temperaturstufe wies das Profil der reproduzierbar angereicherten Transkripte hohe Ähnlichkeit zu akkumulierenden mRNA-Spezies auf, die bei genomweiten Studien anderer Arbeitsgruppen von Hefestämmen mit disruptierten Genen codierend für Komponenten der 5'-3'-mRNA-Abbauwege

(*upf123Δ*-, *dcp1Δ*- und *xrn1Δ*-Stämme) gefunden wurden. Zum 5'-3'-mRNA-Abbauweg gehört auch der Nonsense-Codon-vermittelte mRNA-Abbauweg (NMD). Gezeigt wurde eine teilweise Aufhebung des telomeren Positionseffektes, wie er auch bei Ausfall des NMD-Abbauweges nachgewiesen ist. Dies deutete auf eine Funktion Hypps im bei Hefe überwiegend cytosolisch ablaufenden mRNA-Abbau, speziell im Xrn1p-abhängigen 5'-3'-mRNA-Abbauweg. Diese Funktionsverknüpfung steht unmittelbar im Zusammenhang mit der Steuerung mitochondrialer Gene, Telomer-Funktionen, Zellzyklus steuernder Gene und anderer zellwachstumskritischer Gene. Für den korrekten Ablauf dieser Vorgänge hat sich die Hypp-Funktion in früheren Studien als essentiell erwiesen. Die Genchip-Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen kürzlich veröffentlichte Hinweise, dass die Gruppe der von NMD-beeinflussten natürlichen Genprodukte um einige Klassen, zu denen in Hefe Ty-LTR-Retrotransposons und Pseudogene gehören, erweitert werden kann. Zusätzlich definierten die Transkriptomanalysen eine die Funktionsgruppenverteilung des Hefegenoms widerspiegelnde Gengruppe, deren Regulation in weiteren Zusammenhängen mit der Hypp-Funktion steht.

Es wurde gezeigt, dass bei 37°C wachstumsarretierte G₈₁V-Zellen eine verminderte Viabilität und apoptotische Verhalten sowie eine erhebliche Störung der Wildtyp-Morphologie aufweisen. Hinweise darauf erbrachte auch eine elektronenmikroskopische Studie, die zeigte, dass die Anzahl der Mitochondrien in Mutantenzellen keinesfalls vermindert war. Die Ergebnisse zeigten zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Hypp-Funktion und der Auslösung von Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae* und deuten auf eine konservierte antiapoptotische Wirkung des Proteins.

Durch eine affinitätschromatographische Studie mit N-terminalen GST-Hypp-Fusionsproteinen wurde eine von der Hypusin-Modifikation unabhängige Proteininteraktion Hypps mit dem majoren Hüllenprotein des Hefe-spezifischen doppelstängigen RNA-Virus L-A nachgewiesen, einem Protein, das enzymatische Aktivität für die Abspaltung der mRNA-5'-Cap-Struktur besitzt und so in unmittelbarem Zusammenhang mit der Funktion der Exoribonuklease Xrn1p und dem mRNA-Abbau steht. Dies bewies, dass das Hypusin enthaltende Protein zusätzliche Funktionen im Cytoplasma unabhängig vom Zellkern besitzt. Zuvor wurde gezeigt, dass N-terminal GST-getaggtetes Hypp die Funktion des Wildtypproteins uneingeschränkt übernehmen konnte.

Eine Technik zum direkten Nachweis von Protein-mRNA-Interaktionen Hypps wurde evaluiert, die auf der Affinitätsreinigung von bindenden mRNAs basierte. Im Rahmen eines Differential-Display-Ansatzes wurden dabei drei ORF-Transkripte mit unbekannter Funktion identifiziert, die Zusammenhänge mit den Genchip-Studien-Ergebnissen aufzeigten. Ferner wurde die komplementäre DNA-Sequenz zu der mit Hypp interagierenden RNA-Sequenz des Rev-Responsive-Element (RRE) aus dem RNA-Genom des HIV-1-Virus als Werkzeug für nachfolgende Hypp-RNA-Interaktionsnachweise kloniert.

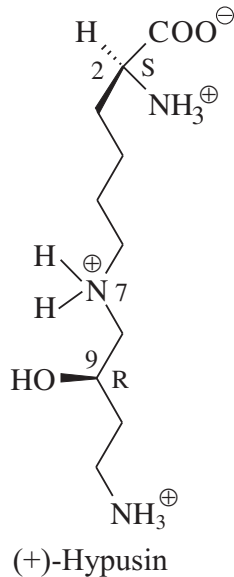
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Hypusin enthaltende Protein zelluläre cytosolische Funktionen in der posttranskriptionalen Kontrolle der Genaktivität viraler und zelleigener Gene in *Saccharomyces cerevisiae* besitzt. Eine Verknüpfung zum 5'-3'-mRNA- und NMD-Abbauweg bzw. der durch ihn kontrollierten Genfunktionen ist evident und sollte weiter erforscht werden.

3. Einleitung

3.1 Hypusin – eine modifizierte Form von Lysin

Der Großteil der Proteine, die in der Zelle gebildet werden, enthalten posttranslational modifizierte Aminosäurereste, die entweder permanent über die gesamte Lebensdauer des Proteins erhalten bleiben oder nur vorübergehend *in vivo* synthetisiert und wieder abgebaut werden. Sie tragen so zur dreidimensionalen Struktur, zur Zielsteuerung des Proteins oder zur katalytischen Enzym-Aktivität bei und verleihen im Falle der Reversibilität dem Protein verschiedene aktive Zustände oder Funktionen. Eine der häufigsten und physiologisch wichtigsten Modifikationen stellen sicher Phosphorylierung und Glykosylierungen dar. Andere Modifikationsarten kommen in der Zelle nur selten vor und wirken bei sehr spezialisierten Proteinfunktionen mit. Die vorliegende Studie sollte neue Funktionsaspekte der ungewöhnlichen Aminosäure Hypusin als spezieller posttranslationaler Modifikation und des sie enthaltenden Proteins aufdecken.

Erstmals 1971 wurde eine seltene, freie, sehr basische Aminosäure aus säurelöslichen Rinderhirnextrakten isoliert und in ihrer Struktur als N^ε-(4-Amino-2-hydroxybutyl)-lysin [SHIBA et al. 1971] identifiziert. Man gab ihr in Analogie zur modifizierten Aminosäure Putrescin den Namen „Hypusin“, da sie formal aus Hydroxyputrescin (2-Hydroxy-1,4-diaminobutan) und Lysin gebildet zu sein schien. Ihre Stereochemie wurde erst 11 Jahre später durch einen direkten Vergleich der gereinigten mit der synthetisch hergestellten Aminosäure aufgeklärt und als (+)-(2S,9R)-2,11-Diamino-9-hydroxy-7-azaundekansäure bestimmt [SHIBA et al. 1982]; [TICE und GANEM 1983]. Als Abkömmling von Spermidin bzw. Putrescin sind beide Aminogruppen des Hypusinrestes unter physiologischen Bedingungen protoniert und daher erscheint das Molekül zweifach positiv geladen. Dies deutete auf eine potentielle Interaktion mit negativ geladenen Partnern hin. Von anderen biogenen Polyaminen weiß man, dass sie an das negativ geladene Phosphatgruppengerüst von Nukleinsäuren [TABOR und TABOR 1984] binden.



Bei Polyaminen wie Spermidin und Spermin ist eine Beteiligung an der Chromatinkondensation nachgewiesen; auch die Konformation von DNA- und RNA-Molekülen (z.B. t-RNAs) kann durch sie weiter beeinflusst werden. Sie üben ebenfalls Einfluss auf die Transkriptionselongation aus [HEBY und PERSSON 1990].

Die Beeinflussung von Translationsvorgängen aller drei Stadien (Initiation, Elongation und Termination) durch Polyamine ist bekannt. Erwähnt sei hier nur ihre Beteiligung an der Steuerung der +1-ribosomalen Leserahmenverschiebung [BALASUNDARAM et al. 1994a]. Mittlerweile weiß man, dass dieses Phänomen, bei dem der translatierte Leserahmen am Ribosom um ein Nukleotid RNA-stromaufwärts verschoben wird, für die Translation einiger natürlich vorkommender Gene, darunter z.B. *EST3*, notwendig ist. Ferner zeichnet sich eine Funktion solcher Transkripte als Substrate eines speziellen mRNA-Abbauweges ab, der als Nonsense-Codon-mRNA-Abbauweg bekannt wurde [HE et al. 2003]. Auf eine Verknüpfung von protein-

gebundenem Hypusin mit diesem speziellen Abbauweg wird in dieser Arbeit eingegangen.

Aufgrund ihrer Einflüsse bei Replikations-, Transkriptions- und Proteinsyntheseabläufen verwundert es kaum, dass die speziellen Funktionen der Polyamine starke Auswirkungen auf Proliferations- bzw. Cytokinese-Prozesse haben und die Zelldifferenzierung sowie die Carzinogenese mitbeeinflussen. So findet man in Tumoren oft ebenfalls erhöhte Polyaminspiegel [HOUGAARD 1992]. Auch über die Rolle der Polyamine in verschiedensten apoptotischen Vorgängen werden zunehmend mehr Erkenntnisse gewonnen (z.B.: [WALLACE et al. 2003]; [BABBAR et al. 2003]). Die biologische Funktion des freien Hypusins als Polyaminderivat in der Zelle ist jedoch bis heute nicht geklärt.

Ungebundenes Hypusin ist in allen Säugetierorganen mit besonders hoher Anreicherung in proliferierendem Gewebe nachgewiesen worden ([IMAOKA und NAKAJIMA 1973]; [NAKAJIMA et al. 1971]; [SANO et al. 1986] und [SANO et al. 1987]). Hohe Hypusin-Konzentrationen fanden sich auch im Gehirn. Dort liegt es zusätzlich in Form von zwei Dipeptiden vor. Es handelt sich um α -(γ -Aminobutyryl)-Hypusin (GABA-Hypusin, [SANO et al. 1986]) und um α -(β -Alanyl)-Hypusin [UENO et al. 1991], die beide im Rinderhirn vorkommen und von denen Aktivität als Neurotransmitter angenommen wird.

Freies Hypusin wurde auch im Urin von gesunden Säugern [NAKAJIMA et al. 1971] und humanen Patienten, die an familiärer Hyperlysinämie litten (dort in größeren Mengen), gefunden [WOODY und PUPENE 1973]. Seitdem konnten jedoch keine weiteren Fakten vorgelegt werden, die eine Hypothese über eine generelle Ausscheidung Hypusins über die Niere als Endmetaboliten stützten.

3.2 Das Hypusin enthaltende Protein und die Biosynthese seiner posttranslationalen Modifikation

Schon früh interessierte man sich für die Frage, ob es Proteine gab, die *in vivo* kovalent mit biogenen Polyaminen posttranslational modifiziert werden. Die Existenz von proteingebundenem Hypusin wurde erstmals 1973 beschrieben [IMAOKA und NAKAJIMA 1973]. Später fand man in Versuchsreihen mit peripheren humanen Blutlymphozyten, bei denen die im Wachstum befindlichen Zellen mit [3 H]-Spermidin oder [3 H]-Putrescin behandelt wurden, nur *ein einziges* Protein ($M_w=18$ kDa, pI 3,5), welches radioaktiv markiert wurde [FOLK et al. 1980]. Nach saurer Hydrolyse dieses markierten Proteins wurde nur eine einzige radioaktive Aminosäure (AS) gefunden, die als Hypusin identifiziert wurde [PARK et al. 1981]. Alle bislang durchgeführten Studien bestätigen diese Beobachtung. Daher wird heute davon ausgegangen, dass es in der Tat nur ein Protein (und von ihm ableitbare eng verwandte Isoformen) in der Zelle gibt, das die posttranslationale Modifikation besitzt. Im folgenden wird der Ausdruck „Hypusin enthaltendes Protein“ (kurz Hypp) benutzt. Das mit Spermidin markierbare Protein wurde in beträchtlichen Mengen ubiquitär in allen eukaryontischen und archaebakteriellen Zellen gefunden.

3.2.1 Aminosäuresequenz und Struktur

Das in bisher allen eukaryontischen Zellen, einschließlich Erythrozyten, gefundene Hypp enthält die Aminosäure Hypusin als Modifikation nur eines einzigen spezifischen Lysinrestes in der Sequenz. Auch Archaea besitzen ein Hypp, welches deutliche Ähnlichkeit zu den eukaryontischen Proteinen aufweist. Dabei fand man es in allen bislang untersuchten Cren-Archaea (zu denen der chemolithotroph aerobe Vertreter *Sulfolobus acidocaldarius* gehört) Hypusin-modifiziert vor; in Eury-Archaea erscheint es hingegen als Deoxyhypusin (Fehlen der Hydroxylierung als letzte Stufe der Hypusinsynthese, s.u.) [BARTIG et al. 1990]. Eine Ausnahme machen Eubakterien, da in ihnen bis heute weder ein Hypusin-enthaltendes Protein noch freies Hypusin oder Deoxyhypusin gefunden wurde ([GORDON et al. 1987]; [SCHÜMANN und KLINK 1989]).

Erste Informationen über den hohen phylogenetischen Konservierungsgrad Hypps erbrachte der Vergleich von Spaltpeptiden der Proteine aus *Drosophila melanogaster* und *S. cerevisiae* [GORDON et al. 1987]. Mit dem Abschluss zahlreicher Genom-Sequenzierungsprojekte von Archaea bis zum Menschen liegen nun über 45 auf den Genstrukturen und proteinchemischer Charakterisierung beruhende Aminosäuresequenzen Hypps aus den unterschiedlichsten Taxa zur Analyse und Vergleich vor. Die hohe Aminosäuresequenz-Konserviertheit wurde dadurch bewiesen.

Die Sequenzlänge liegt bei durchschnittlich 134 (Archaea), 153 (Säugetiere), 160 (Pflanzen) Aminosäureresten. Mit 169 Resten ist das Protein aus *Dictostelium discoideum* überdurchschnittlich lang. Das Molekulargewicht bei höheren Eukaryonten liegt bei durchschnittlich 17,6 kDa (einschließlich des modifizierten Lysins). Der modifizierte Lysinrest befindet sich in einem Cluster basischer Aminosäuren, dessen Basizität durch den Hypusinrest noch einmal erhöht wird. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass diese Region des Proteins extrem hoch konserviert ist. So ist die Sequenz aus den 12 Aminosäuren **STSKTGKHGHAK**, in der der fettgedruckte Lysinrest die Hypusinbildungsstelle kennzeichnet, von Hefe bis zum Menschen absolut identisch (vgl. Abb. 3.1). Sogar bei *Sulfolobus acidocaldarius* weist der zu den 12 Aminosäuren

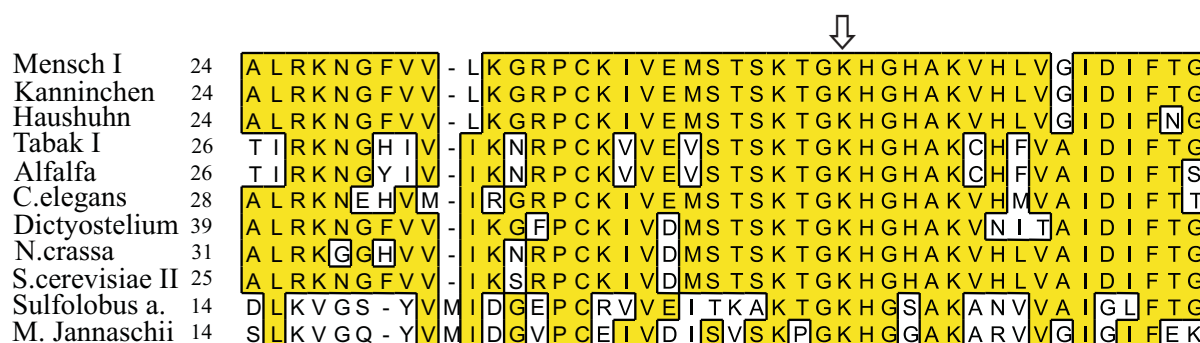


Abbildung 3.1: Ein Ausschnitt aus einem Aminosäure-Alignment des Hypusin enthaltenden Proteins (N-terminale Domäne) aus Taxa unterschiedlichster Familien zeigt die sehr hohe Sequenzhomologie um den modifizierten Lysinrest, der mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. Identische Reste sind grau unterlegt. Waren in einem Organismus mehrere Hypp-Formen bekannt, wurden nur die Sequenzen mit höchster Homologie zu Hyp2p aus Hefe einbezogen.

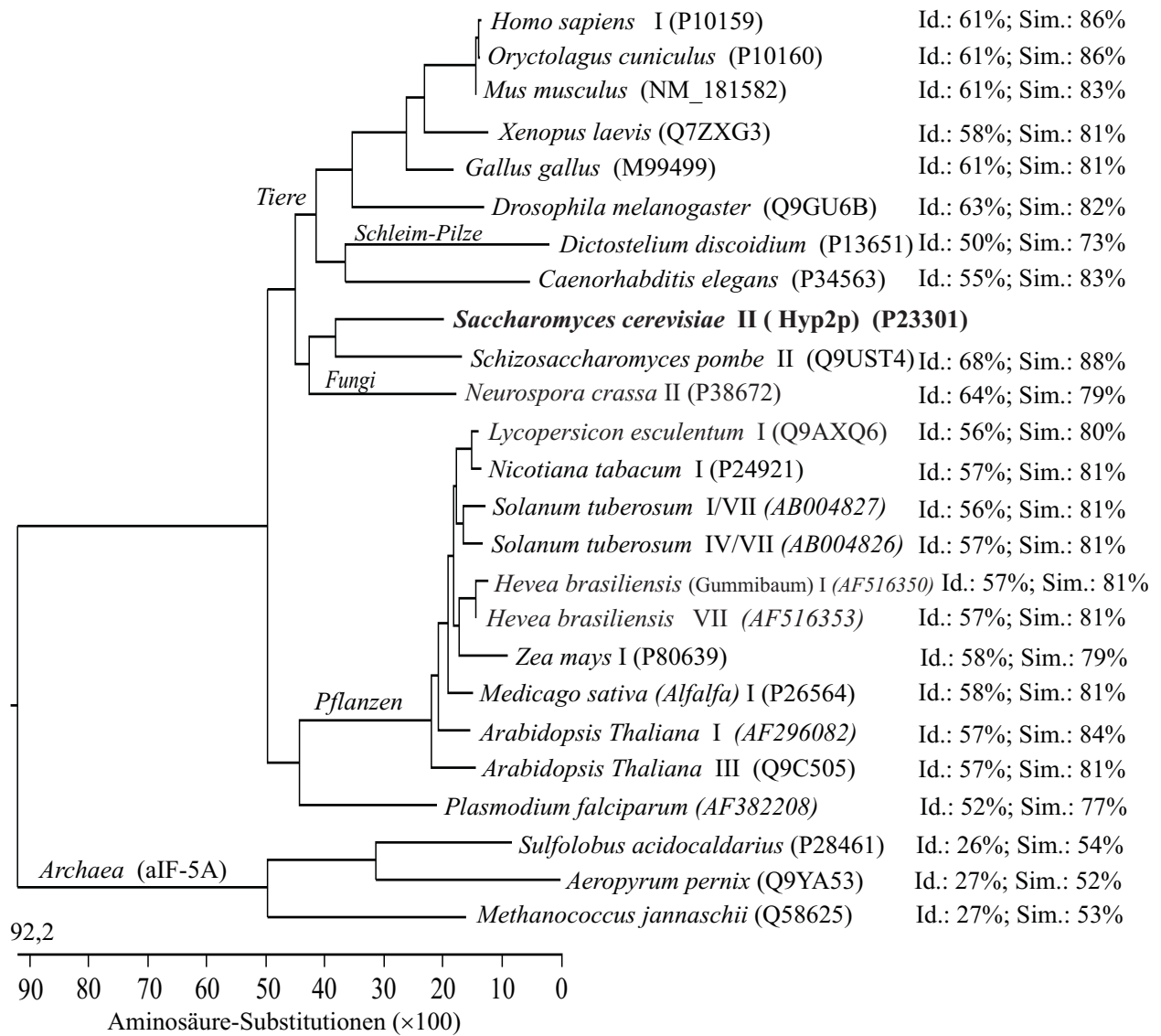


Abbildung 3.2: Phylogramm des Hypusin enthaltenden Proteins (in *Archaea*: aIF-5A) aus unterschiedlichen Organismen basierend auf Vergleich der Aminosäuresequenzen. Die Sequenzen der einzelnen Taxa stammen aus der Swissprot-datenbank (wenn verfügbar), bzw. aus sequenzierten cDNAs bzw. ESTs (Gene-Bank bei NCBI, kursiver Code). Der Balken unten links gibt die Kalibration für horizontale Linienabschnitte, deren Länge den Aminosäure-Austauschwerten an jeder Position des Gesamt-Alignments entspricht. Abgesehen von einigen Pflanzen-Hypp-Formen wurden nur Sequenzen der Familie hinzugerechnet, die höchste Homologie zum Hyp2p aus *Saccharomyces cerevisiae* aufwiesen. Die Prozentanteile identischer Aminosäurereste (Id.) und chemisch ähnlicher Reste (Sim.) aus den Sequenzvergleichen gegen Hyp2p sind angegeben.

homologe Sequenzbereich eine 67%ige Identität und 83%ige Ähnlichkeit bei chemisch verwandten Aminosäureresten zum entsprechenden Protein aus *S. cerevisiae* auf. Die C-terminale Hälfte ist weniger konserviert (ein Vergleich der vollständigen Sequenzen aus Bäckerhefe und Mensch kann Abbildung 5.9 auf Seite 70 entnommen werden). Jedoch liegen die Gesamt-Aminosäureidentitäten z.B. des Bäckerhefe-Proteins bei 64-68% (Ähnlichkeit: 79-88%) gegenüber anderen Pilzarten, bei durchschnittlich 61% (Ähnlichkeit: 82%) gegenüber den zweikeimblättrigen Pflanzen und bei durchschnittlich 57% (Ähnlichkeit: 81%) zu den Tieren. Im Vergleich mit dem Hypp aus *Sulfolobus acidocaldarius* liegt immerhin noch eine Gesamtidentität von 26% bei 54% ähnlicher Aminosäuren vor.

Der Abschluss der Genomsequenzierungen von Maus [KAWAI und HAYASHIZAKI 2001], Ratte und Mensch hat sogar die absolute Identität Hypps in diesen drei Organismen offengelegt. Abbildung 3.2 zeigt ein Phylogramm Hypps und verdeutlicht seinen hohen Konservierungsgrad, der darauf hindeutet, dass das Protein eine grundlegende Funktion in der Zelle besitzt.

In den Transkriptomen und Genomen vieler Eukaryonten hat man mehrere Formen des Hypusin enthaltenden Proteins gefunden, die zu unterschiedlichen Genprodukten prozessiert werden. Vor allem in Pflanzen scheint es größere Hypp-Genfamilien zu geben. In Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurden wenigstens zwei Gene gefunden [CHAMOT und KUHLMEIER 1992], die unterschiedlich exprimiert zu sein scheinen. NeIF-5A1 (n-HYP1) wird bevorzugt in photosynthetisch aktiven Geweben gebildet, während NeIF-5A2 (n-HYP2) in allen Pflanzengeweben detektiert wurde. Fünf Gene wurden in der tetraploiden Kartoffel (*Solanum tuberosum*) gefunden, in der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) sind vier Isoformen bekannt. Aus cDNA-Banken des Gummibaumes (*Hevea brasiliensis*) konnte die bislang größte Genfamilie mit sieben Hypp-Isoformen isoliert werden [CHOW et al. 2003], deren Genprodukte (13kDa), dort als „rubber biosynthesis stimulator proteins (RBSP)“ bezeichnet, die Latex-Produktion der Pflanze steigern.

Zwei separate Hypp-Gene wurden im Genom der Bäckerhefe gefunden, deren Proteine Hyp1p und Hyp2p unterschiedlich exprimiert werden. WÖHL et al. haben gezeigt, dass Hyp1p ausschließlich bei Anaerobiose exprimiert wird, während Hyp2p sowohl bei Anwesenheit und Abwesenheit von Sauerstoff exprimiert ist [WÖHL et al. 1993]; [WÖHL 1994].

In tierischen Organismen hat man bei einigen Spezies bisher zwei Isoformen gefunden, so beim Haushuhn [WOLFF et al. 1992], Maus, Ratte und beim Menschen [JENKINS et al. 2001]. Die beiden humanen Hypp-Formen scheinen unterschiedlich exprimiert zu sein. Während die Form I und seine mRNA in allen Geweben in hohen Mengen vorkommt, wurde für die zweite Gen-Form eine hohe Aktivität in bestimmten humanen Krebszellen gefunden. In gesunden humanen Geweben ist es nur schwach in den Hoden und im Gehirn exprimiert. Daher wird es als potentiell Onkogen diskutiert [CLEMENT et al. 2003]. Form II besitzt eine zu 84% identische Proteinsequenz zur Form I bei 94% Aminosäureähnlichkeit. Wie bei Form I sind die homologen Proteine von Maus und Ratte mit der humanen Form II identisch.

Für das Multi-Alignment (Abb. 3.1) und das von ihm abgeleitete Phylogramm (Abb. 3.2) wurden mit Ausnahme von drei Pflanzenspezies nur Genproduktsequenzen einbezogen, die die

höchste Homologie zu Hyp2p aus *S. cerevisiae* aufweisen; in dieser Arbeit wurden stellvertretend für diese *HYP*-Gengruppe, zu denen die Formen I aus Tabak und Mensch gehören, die Funktionen des *HYP2* und des humanen *HYP(hum)* (Form I) untersucht.

3.2.1.1 Ein Zweidomänen-Protein

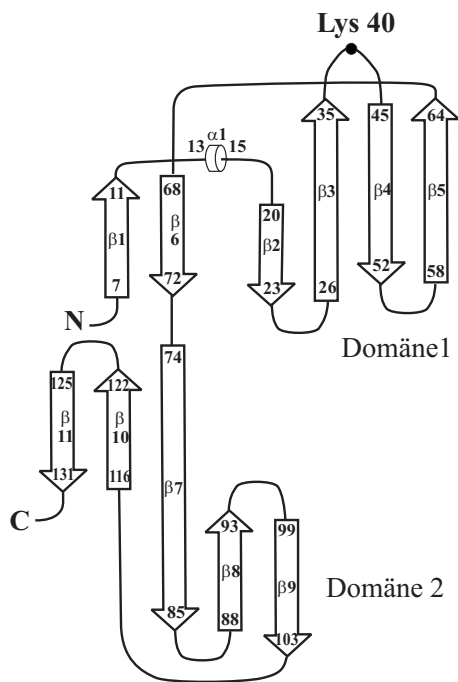


Abbildung 3.3: Bänderdiagramm der Struktur von Hypp aus dem Archaeon *Methanococcus jannaschii*. Die Struktur wurde im Zuge einer Röntgenstrukturanalyse (Auflösung: 1,8 Å) des Deoxyhypusins-Vorläuferproteins gewonnen [KIM et al. 1998]. Die Zeichnung zeigt elf β -Faltblattbereiche, die in zwei Domänen des Moleküls liegen. Die Falblätter sind durch flexible Übergangsbereiche verbunden.

Die Röntgenstrukturen der nicht hypusinylierten Hypp-Vorläuferproteine, welche rekombinant in *E. coli* exprimiert wurden, sind aus drei verschiedenen Archaea bekannt (*Methanococcus jannaschii* [KIM et al. 1998]; *Pyrobaculum aerophilum* [PEAT et al. 1998]; *Pyrococcus horikoshii* [YAO et al. 2003]). Die Tertiärstrukturen ähneln sich sehr stark und weisen zwei Domänen auf. Als Sekundärstrukturelemente treten neben flexiblen Turns und einer sehr kurzen α -Windung elf β -Faltblätter auf, von denen sechs in der N-terminalen und fünf in der C-terminalen Domäne liegen (siehe Bänderdiagramm in Abb. 3.3). Beide Domänen sind über einen kurzen flexiblen Brückenbereich verbunden. Eine Tertiärstruktur des Hypps aus *Methanococcus jannaschii* ist in Abbildung 5.9 auf Seite 70 enthalten.

Die N-terminale Domäne des Archaea-Hypps enthält ein SH3-artiges Fass-Motiv, das als Nukleinsäure-bindende Struktureinheit in Proteinen wie HIV-Integrase (DNA-bindende Domäne) [LODI et al. 1995], in einem *E. coli*-Repressor des Biotin-Operons [WILSON et al. 1992] oder im ribosomalen Protein L2-RBD [NAKAGAWA et al. 1999] gefunden wurde. Der hypusinylierte Lysinrest befindet sich ebenfalls in dieser Domäne in einem für koagierende Enzyme gut zugänglichen nach außen exponierten Turn. Die C-terminale Domäne besitzt die Faltung eines der häufigsten

RNA-Bindungsmotive („oligonucleotide/oligosaccharide binding fold“ = OB-Faltung). Dieses wurde in zahlreichen RNA-Bindungsproteinen gefunden, die an Translationsvorgängen beteiligt sind; darunter die Translations-Initiations-Faktoren eIF-2 α [NONATO et al. 2002] und IF-1 [SETTE et al. 1997] sowie das *E. coli*-Kälteschockprotein CspA [JIANG et al. 1997]. Dies weist stark darauf hin, dass Hypp ein RNA-Bindungsprotein darstellt, was auch durch weitere auf den nächsten Seiten vorgestellte Befunde gestützt wird. Dass es neben RNA auch andere Proteine bindet, ist belegt und weist Hypp als potentielles multimodulares Protein aus.

Obwohl die Proteinsequenz aus Archaea nur zu durchschnittlich 30% mit der Hypps aus anderen Eukaryonten identisch ist, haben Homologie-Modellierungs-Verfahren aus der Bioinformatik für die Hypp anderer eukaryontischen Spezies eine dem Archaea-Hypp analoge dreidimensionale Struktur vorausgesagt [FACCHIANO et al. 2001].

3.2.2 Die Beteiligung von zwei Enzymen an der Hypusinrest-Biosynthese

Bereits 1980 zeigte FOLK, dass mehrere Polyamine *in vitro* als Substrate für Transglutaminasen fungieren konnten [FOLK et al. 1980]. Daher wurde schon früh die Hypothese aufgestellt, dass proteingebundenes Hypusin durch Modifikation eines Lysinrestes durch ein Polyamin entsteht. Durch die Markierungsexperimente von [PARK et al. 1981] konnte schließlich Spermidin als Substrat für die Modifikation gefunden werden. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte auch, dass es sich um eine Reaktionsfolge aus zwei Schritten handelte, bei denen ein Lysin-Rest zunächst zu Deoxyhypusin modifiziert und im zweiten Schritt zu Hypusin hydroxyliert wird [PARK et al. 1982]. Einen schematischen Überblick über die Modifikationsreaktionen gibt Abbildung 3.4.

3.2.2.1 Schritt 1: Deoxyhypusinsynthese

Deoxyhypusinsynthese (DHS) stellt das Schlüsselenzym der Hypusin-Bildung dar und wird, da es im Reaktionsmechanismus zur Übertragung von 4-Aminobutyl-Resten kommt, auch als Aminobutyl-Transferase bezeichnet. Es wirkt als Homotetramer [TAO und CHEN 1995] und seine Aminosäuresequenz ist ebenfalls hoch konserviert, vor allem in seiner C-terminalen Hälfte. Die Kristallstruktur von humaner Deoxyhypusinsynthese wurde bestimmt [LIAO et al. 1998]. Die enzymatische Reaktion kann in vier getrennte Schritte eingeteilt werden (vgl. Abb. 3.4):

- 1.) NAD-abhängige Dehydrogenierung von Spermidin;
- 2.) Transfer des 4-Aminobutyl-Anteiles von Dehydrospermidin auf die ϵ -Aminogruppe eines aktiven Lysinrestes (Lys-329 in der humanen Form [JOE et al. 1997]) unter Bildung eines kovalenten Enzym-Imin-Intermediates (DHS-Imin) und Freisetzung von 1,3-Diaminopropan;
- 3.) Transfer des 4-Aminobutyl-Anteils vom DHS-Imin-Intermediat auf die N^ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes im Hypusin-Protein-Vorläufer (K_{50} in der humanen, K_{51} in der Hyp2p-Form aus Hefe), was zur Bildung eines Hypp-Imin-Intermediates führt;
- 4.) Reduktion des Intermediates durch Enzym-gebundenes NADH bildet den Deoxyhypusinrest. Gezeigt wurde auch, dass als 4-Aminobutyl-Gruppenakzeptor auch Putrescin fungieren kann, was zur Bildung von Homospermidin führt.

Vor kurzem wurde *in vitro* gezeigt, dass die von Deoxyhypusinsynthese katalysierten Schritte einer vollen Reversibilität unterliegen [PARK et al. 2003]. Die Reversibilität wurde nicht beobachtet, wenn [^3H]-Hypusin-Protein als Substrat für Deoxyhypusinsynthese eingesetzt wurde, was zeigt, dass die Hydroxylierung der 4-Aminobutylseitenkette die reversible Deoxyhypusinsynthese-Reaktion verhindert. Die mögliche Umkehrbarkeit der ersten Reaktion der Hypusinsynthese mag eine Erklärung für die Notwendigkeit einer zweistufigen Reaktion in Eukaryonten sein.

Die Deletion des Deoxyhypusinsynthese-Gens führt zu einem lethalen Phenotyp in *Saccharomyces cerevisiae*, was wiederum die Hypusinbildung als essentiell für die Lebensfähigkeit der Zelle kennzeichnet ([PARK et al. 1998]; [YOUNG 1998]).

Zahlreiche inhibitorische Substanzen für DHS sind beschrieben, die sich zumeist von Dia-

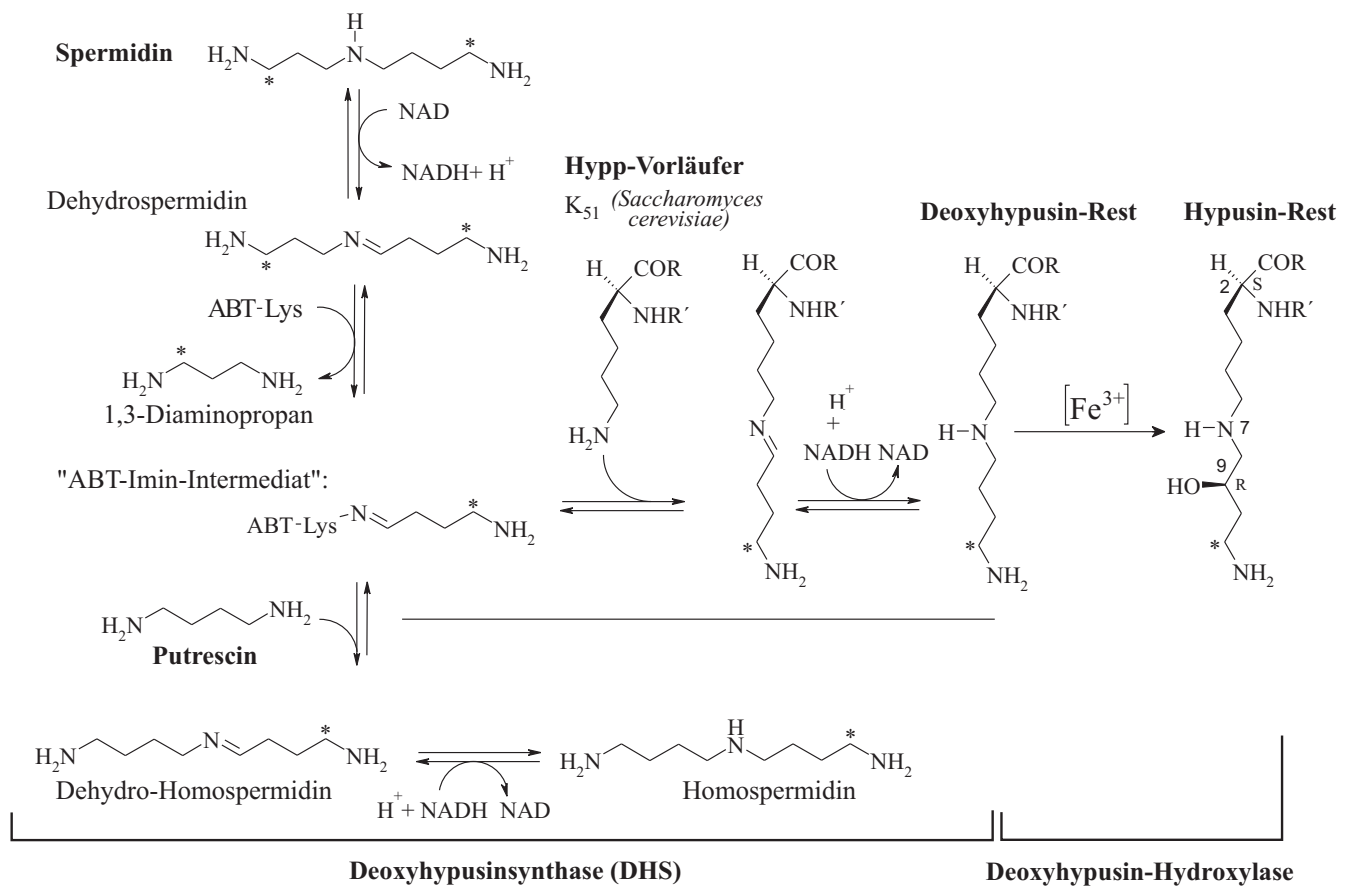


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Wirkung von Deoxyhypusinsynthese (DHS) und der Biosynthese des proteingebundenen Hypusins. DHS katalysiert die Bildung von Deoxyhypusin mit unmodifiziertem Hypp als Akzeptor eines DHS-Imin-Intermediates. Als zweiter Akzeptor kann Putrescin fungieren, wobei es zur Bildung von Homospermidin kommt. Alle Reaktionsschritte der Deoxyhypusinsynthese weisen Reversibilität auf [PARK et al. 2003]. Irreversibel verläuft die zweite Stufe der Hypusinsynthese, katalysiert durch Deoxyhypusinhydroxylase. Eine potentielle radioaktive [^3H]-Markierung mit [1,8- ^3H]-Spermidin des Deoxyhypusins ist durch einen Stern gekennzeichnet, der ebenfalls den Verbleib der Reste verdeutlicht.

minoverbindungen ableiten ([JAKUS et al. 1993]; [PARK et al. 1994]; [LEE und FOLK 1998]). Am empfindlichsten in der Inhibierung des Zellwachstums stellte sich N^1 -Guanyl-1,7-Diaminoheptan (GC7) mit einem K_i -Wert von $1 \mu\text{M}$ (Säugetierzellkultur) heraus. Er wirkt wie auch andere Hemmstoffe als Spermidin homolog und hemmt so kompetitiv DHS. In Nebenstudien zu dieser Arbeit wurde die GC7-Halbwerts-Konzentration in Bäckerhefe-Kulturen (Konzentration, bei der sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur im Vergleich zur unbehandelten gerade halbierte) wesentlich höher gemessen bei $800 \mu\text{M}$ [SCHRADER, unveröffentlichte Daten]. Der Grad der Spezifität aller DHS-Inhibitoren ist bis heute kaum überprüft, aber es ist anzunehmen, dass sie neben der Hemmung von DHS Nebenauswirkungen auf weitere vom Polyaminpool der Zelle ausgehenden Funktionen haben.

Bei CHO-Zellen wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass DHS posttranslational durch Protein Kinase C (Pkc1p) phosphoryliert wird [KANG et al. 2002a]. Die Auswirkungen dieser Reaktion auf die Regulation der Hypusinsynthese am Hypp sind gegenwärtig Gegenstand der Forschung.

3.2.2.2 Schritt 2: Deoxyhypusin-Hydroxylase

Der zweite Schritt der Hypusin-Synthese wird durch Deoxyhypusin-Hydroxylase (DHH) katalysiert. Die Umsetzung dieser Reaktion kann als quantitativ bezeichnet werden, da Deoxyhypusin weniger als 1% des gesamten zellulären Hypusins ausmacht [BENINATI et al. 1990].

DHH wurde bisher noch nicht gereinigt. Auch das für sie codierende Gen konnte bisher in keinem Organismus gefunden werden, obwohl mittlerweile die komplett sequenzierten Genome vieler Eukaryonten vorliegen. Dennoch wurde versucht, DHH durch Inhibitions-Experimente in ihren grundlegenden katalytischen Eigenschaften zu charakterisieren. Dies führte zu einem Vergleich mit post-translational modifizierenden Dioxygenasen (α -Ketosäuredioxygenasen), die an der Hydroxylierung von Prolin- und Lysin-Resten bei der Kollagensynthese mitwirken [KIVIRIKKO und MYLLYLÄ 1982]. Dabei stellte sich heraus, dass diese Hydroxylasen im Gegensatz zu DHH entweder α -Ketoglutarat oder Ascorbinsäure benötigen und nur durch sehr hohe Konzentrationen von 2,4-Dicarboxy-Pyridin (ebenfalls im Gegensatz zu DHH) inhibierbar sind [ABBRUZZESE et al. 1989]. Weitere Untersuchungen führten zur Entdeckung anderer wirkungsvoller Inhibitoren. In Folge konnten für DHH Sulfhydrylgruppen und ein Metall als Kofaktoren bestimmt werden. Darauf wies die DHH-Hemmbarkeit durch Hydralazin [PAZ et al. 1984], α - α -Dipyridyl [PARK et al. 1982] und andere Metall-Chelatsierer [ABBRUZZESE et al. 1986] hin. Eisen-(III) wurde als möglicher essentieller Kofaktor gefunden, nachdem ein schneller Screening-Test, der auf der oxidativen Abspaltung der Hydroxyl-Gruppe beruhte, etabliert war [CSONGA et al. 1996].

Einige DHH-Hemmer wurden zur Grundlage von zellbiologischen Studien. So wurde als Wirkung von α -Hydroxypyridonen, speziell von Mimosin, welches als nichtproteingebundene Aminosäure in Samen und Blättern der Hülsenfrucht-Gattungen *Mimosa* und *Leucaena* vorkommt, ein Zellzyklus-Arrest zwischen G₁- und S-Phase [WATSON et al. 1991] beschrieben. Die gleiche Substanz schränkte die Replikation von HIV-1 in T-Lymphocyten in konzentrationsabhängiger Weise ein [ANDRUS et al. 1998] und löste neben einer Zellwachstumshemmung Apoptose im gleichen Zelltyp aus (weitere Informationen s.S. 13). Die apoptotische Wirkung ist auch bei der humanen Tumorzell-Linie HL60 belegt [RENÓ et al. 2000]. In einer weiteren Überprüfung der Auswirkungen von Mimosin und vier weiteren Hemmern auf humane venöse Endothelzellen (HUVEC) wurde Ciclopirox als effektivster Proliferationshemmer und Angiogenesehemmer gefunden, was für die Weiterentwicklung von bestimmten Krebstherapien von Interesse ist [CLEMENT et al. 2002].

3.3 Kenntnisstand zur Funktion des Hypusin enthaltenden Proteins

Die erste Isolation eines Hypusin enthaltenden Proteins gelang 1976 aus Kaninchen-Reticuloocyten [KEMPER et al. 1976]. Man erkannte eine Identität mit dem postulierten Translations-Initiationsfaktor eIF-4D [COOPER et al. 1983]. Später wurde der Faktor in eIF-5A umbenannt [SMIT-MCBRIDE et al. 1989]. Es wurde als Translations-Initiationsfaktor klassifiziert, weil man zeigen konnte, dass es die Bildung der ersten Peptidbindung in einem *in vitro* Translationsassay erleichterte [KEMPER et al. 1976]. Bei diesem Assay wird der stimulierende Effekt

bestimmter Faktoren, von denen Funktion bei der Translationsinitiation angenommen wurde, auf die Bindungsbildung zwischen Methionin und Puromycin untersucht.

Es wurde eine Mengensteigerung von Methionyl-Puromycin um den Faktor drei gemessen ([MERRICK et al. 1975]; [KEMPER et al. 1976]; [BENNE und HERSHEY 1978]). Die Bindungsbildung wurde angeregt, wenn das Protein gegenüber Substrat in einem hohen Überschuss (1000/1) vorlag [BENNE und HERSHEY 1978]. Die Beteiligung an der Translationsinitiation wurde jedoch bisher in keinem anderen Modellsystem, dessen Bedingungen näher an der physiologischen Situation liegen, bewiesen. So konnte z.B. keine gesteigerte Globin-Proteinsynthese durch Translation einer nativen Globin-mRNA beobachtet werden [KEMPER et al. 1976]; [BENNE und HERSHEY 1978]. Nur wenn Spermidin fehlte und der Translationsprozess durch einen Zusatz geringer Magnesium-Konzentrationen gestört wurde, konnte Hypp die Translationsrate steigern [SCHREIER et al. 1977].

Im Gegensatz zu anderen Translationsinitiationsfaktoren unterliegt Hypp einer sehr starken Expression in der Zelle, wobei nur eine kleine Fraktion des Proteins mit Ribosomen assoziiert ist [THOMAS et al. 1979]. Auch die Zugabe von gereinigtem Hypp hatte keinen Einfluss auf die Bildung des 80S-ribosomalen Komplexes [[BENNE und HERSHEY 1978]; [THOMAS et al. 1981]]. Unmittelbar nach Ausschaltung Hypps in *S. cerevisiae* kam es nur zu einer Teilreduktion (ca. 30%) der Proteinsyntheserate [KANG und HERSHEY 1994]. Für eine Beteiligung Hypps an der Initiation der Translation spricht die Tatsache, dass das durch Anoxie kontrollierte *HYP1*-Gen von *S. cerevisiae* in seinem Promotor ein HOMOL-Motiv besitzt, welches oft bei Translations-Faktoren gefunden wurde [METHA und SMITH 1989].

Eine Mitwirkung Hypps an der generellen Translationsinitiation konnte bisher nicht schlüssig nachgewiesen werden. Daher wird in dieser Arbeit das Protein nicht als eIF-5A bezeichnet, sondern der neutralere Begriff „Hypusin enthaltendes Protein“ bzw. „Hypp“ verwendet.

3.3.1 Hypp – ein essentieller Faktor für das Zellwachstum

Die genauen funktionellen Wirkungsweisen Hypps in der Zelle sind immer noch weitgehend ungeklärt. Sicher ist, dass Hypp essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Lebensfähigkeit ist. So bewirkte die Disruption beider *HYP*-Gene, *HYP1* und *HYP2*, in Bäckerhefe einen lethalen Phänotyp [MAGDOLEN et al. 1994].

Die Hefe-Stämme ohne *HYP1* und *HYP2* wurden zur Grundlage einer Komplementationsanalyse, in der zahlreiche *HYP*-Allele verschiedenster Taxa auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, die Hypp-Funktion von *Saccharomyces cerevisiae* zu übernehmen [MAGDOLEN et al. 1994]. Dabei konnten alle getesteten homologen Proteine bis auf das Archaea-Hypp aus *Sulfolobus acidocaldarius* das Zellwachstum gewährleisten. Dies zeigt, dass die hohe Sequenzhomologie über die Artengrenzen hinweg sich auch in einer funktionellen Äquivalenz der Hypps aus verschiedenen Arten widerspiegelt und eine fundamentale Rolle Hypps bei der zellulären Proliferation nahelegt.

Die Verknüpfung von Vorgängen des Polyamin-Metabolismus mit der Zellproliferation ist in zahlreichen Studien der letzten Jahrzehnte gezeigt worden. Die Polyaminsynthese geht bei

den meisten Eukaryonten ausschließlich von der Aminosäure Ornithin aus, welche durch Ornithindecaboxylase zu Putrescin umgesetzt wird, aus welchem dann durch Anlagerung einer Aminopropylgruppe Spermidin gebildet wird. Ornithindecaboxylase stellt demnach das Schlüsselenzym zur Spermidinsynthese dar. Seine Hemmung durch α -Difluormethylornithin (DFMO) führt zu einer Arretierung des Zellzyklus bei Anhäufung von Putrescin und zum Verschwinden von Spermidin. Da Spermidin das Vorläufermolekül für Hypusin ist, wird angenommen, dass die Hypusin-Modifikation direkt an der Steuerung des Zellwachstums beteiligt ist. Bei Ausschaltung des Spermidin-Pools sollte demnach die Hypusinsynthese verhindert werden. Dafür sprach, dass bei Einsatz von DFMO eine Akkumulation des nicht hypusinylierten Hypp-Vorläuferproteins beobachtet wurde.

Ob das Zellwachstum direkt durch die Hypusin-Biosynthese gesteuert wird, ist fraglich. Dagegen spricht, dass die Hypusin-Syntheserate nicht durch die Menge des intrazellulären Spermidins begrenzt wird [GERNER et al. 1986]. Der Anteil des zur vollständigen Hypusinsynthese notwendigen Spermidins an dessen zellulären Gesamtmenge liegt nur bei etwa 10% [PARK 1987]. Für das Protein wurde eine lange biologische Halbwertszeit in der Zelle von bis zu 120 Stunden postuliert [GORDON et al. 1987]; [TORRELIO et al. 1987]. Desweiteren haben Experimente zur Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid gezeigt, dass das Hypp-Vorläuferprotein sofort nach der Translation modifiziert wird und dass die zweite enzymatische Modifikationsstufe der Hydroxylierung als irreversibel erachtet wird [PARK 1987]; [PARK et al. 2003]. Demnach sollte nicht der Polyaminpool die Hypusinbildungsrate regulieren sondern die Translationsrate des Proteins.

Bei der Expression von verschiedenen Hypp-Formen, die protein-destabilisierende Sequenzelemente tragen, in Hefestämmen mit disruptierten chromosomalen *HYP*-Loci konnte ein rascher Abbau des Proteins ausgelöst werden. Dies führte weder zu detektierbaren Veränderungen des Polysomenprofils noch zu einer Hemmung der globalen Proteinbiosyntheserate (70% der Wildtyp-Translationsrate blieb erhalten) [KANG und HERSHEY 1994]. Diese Beobachtungen deuten nicht auf eine essentielle generelle translatorische Funktion hin.

3.3.2 Hinweise auf Zellzyklus-Arretierung zwischen G₁- und S-Phase

Einige Studien mit verschiedenen Inhibitoren, die eine der beiden Enzyme der Hypusinsynthese hemmen sollen, verhinderten das Wachstum von Säugetierzellen [PARK et al. 1993] und induzierten einen reversiblen Zellzyklus-Arrest am G₁-S-Übergang [PARK 1987]; [LALANDE und HANAUSKE-ABEL 1990]. Ein solcher Zellzyklus-Halt am gleichen Phasenübergang war auch an 9L-Gehirn-Tumorzellen nach Behandlung mit DFMO beobachtet worden [PARK 1987].

Säugetierzellen, die mit Mimosin behandelt wurden, zeigten eine Zellzyklusarretierung zwischen G₁- und S-Phase. Eine Differential-Display-Analyse von polysomaler RNA dieser Zellen legte eine geringere Expression von speziellen mRNAs offen, darunter die mRNA codierend für Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1, ein mitochondrial codiertes Protein, von dem eine translationale Kontrolle angenommen wird und das kritisch für die Zellproliferation ist

[HANAUSKE-ABEL et al. 1995]. Die Autoren sprechen von möglichen Hypusin-abhängig kontrollierten Nukleinsäuren, welche die erste molekulare Basis für die Rolle Hypps bei der Kontrolle des Wachstums darstellen würden. Allerdings hemmen Eisen-Chelatisierer wie Mimosin neben DHH wahrscheinlich auch andere Eisen-abhängige Enzyme, darunter z.B. auch DNA-Polymerasen. Daher ist die Spezifität der DHH-Hemmung fraglich und sind die Ergebnisse der gemessenen RNA-Expressionsunterschiede nicht zwingend mit der Inhibierung der Hypusin-Synthese verknüpft.

Durch Anwendung von Spermidin-Analoga, welche als spezifische DHS-Inhibitoren diskutiert werden, konnte der Zellzyklus-Stop vor Erreichen des G₁-Restriktionspunktes in humanen leukämischen Lymphocyten erneut gezeigt werden [JIN et al. 2003a]. GC7, das als DHS-Hemmer mit der wirksamsten Hemmwirkung bei Säugetierzellen beschrieben wurde, erzeugte ebenfalls einen reversiblen Zellzyklus-Stop im Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* [JANSSON et al. 2000] vor Beginn der Mitose am Ende der D-Phase, welche bei Eukaryonten der G₂-Phase entspricht.

Die Hinweise verdichten sich, dass Zellen, deren Hypusinsynthese nicht durch Inhibitoren gestört ist, die *HYP*-mRNA während der G₁-Phase exprimieren. In somatischen Mais-Zellen wurde eine starke Induktion des Gens während G₁ festgestellt, welches während S-, G₂- und M-Phase bis zur erneuten Induktion in der nächsten G₁-Phase fast völlig abgebaut wurde [DRESSELHAUS et al. 1999]. Auch in der G₀-Phase von nicht befruchteten Mais-Eizellen konnten hohe *HYP*-Transkript-Raten gemessen werden. Die Autoren nehmen eine unterschiedliche Regulation Hypps in Embryo-Zellen und somatischen Zellen an. Eine Analyse des somatischen Zellzyklus im Dinoflagellaten *Cryptothecodinium cohnii* zeigte die gleiche starke Expression in der frühen G₁-Phase und eine sehr starke Abnahme beim Einstieg in die S-Phase [CHAN et al. 2002]. Die gezeigten Beispiele verdeutlichen eine Verknüpfung der Hypp-Transkription mit der G₁-Phase. Ob Hypp selbst an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt ist, z.B. durch Steuerung der Translation einer Proteinuntergruppe, welche für den G₁-S-Übergang erforderlich ist, bedarf weiterer klärender Untersuchungen.

3.3.3 Beteiligung Hypps an apoptotischen Vorgängen – mögliche Rollen bei Krebsentstehung und Zellalterung

Einige experimentelle Arbeiten deuten darauf hin, dass Hypp eine Rolle bei apoptotischen Vorgängen spielt. Vor einiger Zeit wurde eine Korrelation zwischen der Spermidin-abhängigen Modifikation Hypps und der Steuerung apoptotischer Vorgänge in Hepatom-Tumorzellen gefunden [TOME et al. 1997]. Die Ornithin-Decarboxylase überexprimierenden Zellen zeigten angehobene Putrescin-Werte und eine erhöhte Rate an unmodifiziertem Hypp-Vorläuferprotein sowie Anzeichen für programmierten Zelltod. Einige Autoren, die bei der Behandlung von Tumor-Säugetierzelllinien mit Diaminoalkan-Derivaten zur Hemmung von DHS oder Anwendung von Mimosin einen reversiblen Wachstumsstopp beobachtet hatten, berichten über gleichzeitiges apoptotisches Sterben eines Teils der Zellen [JIN et al. 2003a]; [RENÓ et al. 2000]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde diskutiert, ob Hypp Apoptose verhindern kann. Die Tatsache, dass eine andere Arbeitsgruppe bei mit GC7 behandelten humanen Venen-Endothelzellen einen pro-

tektiven Effekt *gegen* einen apoptotischen Zelltod ausgelöst durch Serum-Hungerung beschreibt [LEE et al. 2002], zeigt, dass die apoptotischen Zusammenhänge Hypps derzeit kontrovers diskutiert werden. Studien auf Basis von genetisch veränderten Systemen im Gegensatz zur Anwendung von Hemmsubstanzen der Hypusinsynthese würden hier in Zukunft mehr Klarheit schaffen.

Auch bei der Hemmung des Ubiquitin-Proteasoms durch Inhibitoren in leukämischen Zellen konnte eine Anhäufung von nicht hypusinyliertem Hypp oder einem entsprechenden proteolytischen Hypp-Fragment bei gleichzeitiger Auslösung von Apoptose beobachtet werden [JIN et al. 2003b]. Dabei nahm mit zunehmender Hemmzeit des Proteasoms die hypusinylierte Wildtypform stark ab. Diaminoheptan hatte einen ähnlichen Effekt, jedoch war er viel weniger ausgeprägt als bei Anwendung der Proteasom-Inhibitoren. Die Autoren beobachteten auch eine Veränderung der subzellulären Lokalisation Hypps (siehe unten) zwischen inhibierten und nicht inhibierten Zellen. Bei Wildtypzellen nahm die Menge des GFP-gelabelten Hypps im Zellkern nach 24 h Kultivierungsdauer sehr stark ab, während dieser Effekt bei Hemmung des Proteasoms oder bei Wachstumsarrest durch Diaminooctan nicht zu beobachten war.

Indizien für eine spezielle Hypp-Aktivität gibt es auch in aktiven onkogenen Zellen und Geweben. Bei mit dem Ras-Onkogen transfizierten NIH3T3-Zellen wurde eine stark erhöhte Aktivität der Hypusinsynthese festgestellt und demnach eine erhöhte Deoxyhypusin-Synthase-Aktivität. Die *HYP*-mRNA-Level waren im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht. Die Autoren vermuteten daher eine Regulation Hypps auf der posttranskriptionalen und/oder posttranslationalen Stufe [CHEN und CHEN 1997b]. Diese Hypothese wird gestützt durch eine proteomische Analyse von Lungen-Adenocarcinomen, bei der bei bestimmten Tumorsorten eine deutliche Erhöhung der Hypp-Protein-Expression gemessen werden. Auch die Hypp-mRNA-Level in diesen Tumorzellen waren erhöht, korrelierten jedoch nicht mit den Proteinmengen [CHEN et al. 2003].

Die zweite im menschlichen Genom gefundene Hyppgenform zeigt eine Überexpression in bestimmten humanen Krebszellen [JENKINS et al. 2001]; [GUAN et al. 2001] und wurde daher als Onkogen postuliert [CLEMENT et al. 2003]. Dies deutet auf spezielle Funktionen von Hyp(hum)1p und Hyp(hum)2p bei der Proliferation von gesunden Zellen und Krebszellen hin.

Die Arbeitsgruppe um ABBRUZZESE versucht Zusammenhänge zwischen der apoptotischen Wirkung einer fehlenden Hypp-Funktion und der positiven Korrelation Hypps mit der Zell-Proliferation aufzuzeigen. Das Cytokin Interferon- α (IFN α) induziert Apoptose in humanen epidermoiden KB-Zellen. Dabei wurde eine Hyperaktivierung der MEK1- und ERK-Signalwege und eine Abnahme der Hypusin enthaltenden Form Hypps festgestellt. Die Gabe von epidermalem Wachstumsfaktor EGF stellte sowohl die Hypusin-Synthese als auch eine normale Zellwachstumsrate wieder her. Ferner wurde ein synergistischer Effekt von IFN α und GC7 auf die Apoptoseinduktion festgestellt. Die Autoren schlugen daher eine Regulation der durch IFN α induzierbaren Apoptose durch Hypp vor und diskutierten die Hypp-Aktivität als Ansatzpunkt für neue Anti-Krebs-Therapien [CARAGLIA et al. 2003].

Hypp wurde auch in einen Zusammenhang mit der Zellalterung gebracht. Verschiedene Hypusinsyntheseraten wurden in jungen und alten Zellen gefunden [CHEN und CHEN 1997].

Hinweise in diese Richtung stammen vor allem aus Studien an Pflanzen. Bei Tomatenpflanzen stiegen die mRNA-Mengen von DHS und Hypp in alternden Blättern, Früchten sowie in durch Umwelteinflüsse gestressten Blättern, die Anzeichen von Apoptose aufwiesen, an [WANG et al. 2001]. Dies bringt Hypp erneut mit der Regulation von Genen in Verbindung, welche für die Auslösung des programmierten Zelltods benötigt werden. Eine Studie an *Arabidopsis* bestätigte diese Ergebnisse und zeigte weiterhin, dass Hypp auch für die Entwicklung von Pflanzen essentiell ist. So wurde bewiesen, dass im Verlauf der Pflanzenentwicklung die Expression von DHS und von Hypp 1 zu bestimmten Zeitpunkten Maxima aufwiesen [WANG et al. 2003].

Es gibt Hinweise auf die Funktion des Proteins bei der Stress-induzierten Signaltransduktion. Pankreas-Zellen, bei denen der Zelltod durch Hitzeschock induziert wurde, wiesen einen Verlust des modifizierten Hypp-Proteins auf [TAKEUCHI et al. 2002]. Vor kurzem wurde berichtet, dass Deoxyhypusin-Synthase in höheren Eukaryontenzellen (CHO) *in vitro* und *in vivo* durch Protein-Kinase C (PKC) phosphoryliert wird [KANG et al. 2002b]. Als Suppressor des temperatursensitiven Phänotyps einiger Hefe-*HYP2*-Punktmutanten wurde ebenfalls *PKC1* gefunden [VALENTINI et al. 2002]. Bei Hefe ist *PKC1* insbesondere an der hypertonen Stressantwort beteiligt. Die Auswirkungen dieser Tatsachen auf die Funktionen Hypps liegen noch im dunkeln.

3.3.4 Subzelluläre Lokalisation

Die subzelluläre Lokalisation Hypps in Säugetierzellen und in *Xenopus*-Oocyten ist übereinstimmend beschrieben; Hypp befindet sich sowohl in cytoplasmatischen wie Kern-Kompartimenten und tritt konzentriert an der nukleoplasmatischen Oberfläche der Kernporen-Komplexe (nuclear pore complexes = NPC) [ROSORIOUS et al. 1999] auf. Das Vorkommen im Cytosol ist dabei nicht homogen, sondern erscheint punktförmig konzentriert. Von diesen punktförmigen Ansammlungen nimmt man an, dass sie in höheren Eukaryonten ringförmige Lamellen (Annulate Lamellae = AL) darstellen. Dabei handelt es sich um cytoplasmatische Organellen (mit Konzentration im perinukleären Bereich), die aus gepackten Lagen von Membranen bestehen und Poren besitzen, die von Kernporen nicht zu unterscheiden sind [STAFSTROM und STAEHLEN 1984]. Die Funktion dieser Kompartimente in der Zelle ist unbekannt; man hat sie mit dem Turnover von Kernporenkomplexen in Verbindung gebracht [SUTOVSKY et al. 1998]. In ihnen ist das Vorhandensein von Poly-A-mRNA nachgewiesen [KESSEL 1992], ebenfalls eine Assoziation mit dem rauhen endoplasmatischen Reticulum. Ein Zusammenhang zwischen der AL-Entwicklung und Polyaminen besteht ebenfalls. Bei der Behandlung von Burkitt-Lymphoma-Zellen mit DFMO und damit Hemmung der Spermidinsynthese wurde ein Ansteigen der AL-Zahl festgestellt [ALLEN 1988]. Bei zusätzlicher Zugabe von Putrescin und damit Aufhebung des DFMO-Effekts reduzierte sich die Zahl der Membran-Organellen drastisch. Da DFMO als Stromaufwärtshemmer der Hypusinsynthese angenommen wird und Hypp mit AL kolokalisiert, ist die Hypusinfunktion mit einiger Wahrscheinlichkeit mit der der AL verknüpft.

Auch in *S. cerevisiae* [JAO und CHEN 2002] und *Dictostelium discoideum* [YOUNG 1998]

humanes Hypp I

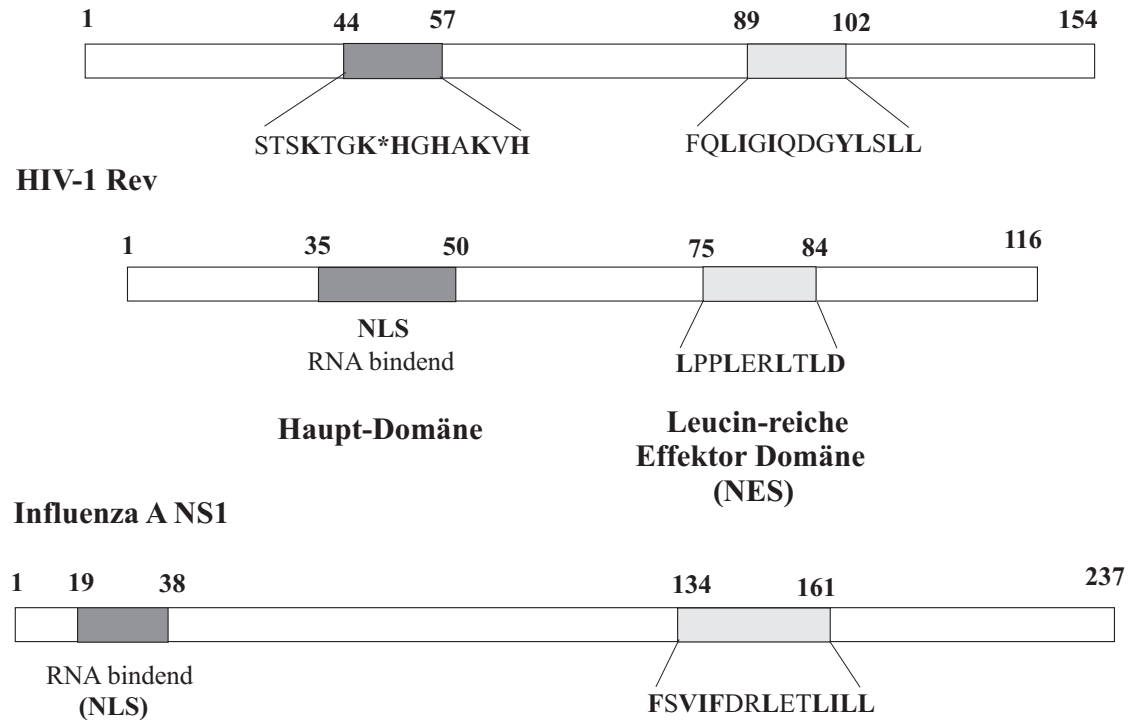


Abbildung 3.5: Motiv-Ähnlichkeit zwischen dem HIV-1-Transaktivator Rev und humanem Hyp(hum)Ip. Die konservierte basische Aminosäuresequenz um den Hypusinrest (Sternkennzeichnung) Hypps besitzt Ähnlichkeit mit einem NLS-Signal aus Rev oder Influenza-A-NS1. Die korrelierende Leucin-reiche Effektordomäne, die den Kernexport vermittelt, ist ableitbar.

wurde Hypp sowohl im Zellkern als auch in cytosolischen Kompartimenten nachgewiesen. Im Schleimpilz konnte auch ein punktförmiges Anreicherungsmuster im Cytosol ähnlich den AL in *Xenopus* Oocyten beobachtet werden.

3.3.5 Die Bedeutung Hypps bei RNA-Kernexportvorgängen und der Replikation von Retroviren

Ein unerwartetes Forschungsergebnis war die mögliche Verknüpfung des Proteins mit der Funktion des HIV-1-Rev-Proteins, die neben der Lokalisation Hypps in Cytosol und Zellkern erstmals die Beteiligung des Proteins an Zellkern-Exportprozessen hypothesisierte. Cross-linking-Versuche hatten gezeigt, dass Hypp als ein Proteinbindungspartner für das HIV-1-Transaktivatorprotein Rev fungiert [RUHL et al. 1993]. Dabei führte die Expression von *HYP*-Anti-Sense-RNA in *Xenopus*-Oocyten zu einem Ausbleiben der durch Rev vermittelten Transaktivierung. In aktivierten Lymphocyten konnte eine Hochregulation der Expression Hypps gemessen werden, ein Effekt, der sich in HIV-1-infizierten T-Zellen verstärkte [BEVEC et al. 1994]. Später wurde gezeigt, dass zwei Doppelpunktmutanten M13 und M14 im C-terminalen Bereich des humanen Proteins die HIV-1-Reifung verhinderten [BEVEC et al. 1996]. Beide mutierten Proteinformen kolokalisierten mit Rev im Zellkern und wiesen darauf hin, dass Hypp ein Kernexportsignal besitzt.

Ein Sequenzvergleich des humanen Hypp I mit Rev und dem Influenza-A-NS1-Protein

machte deutlich, dass die Region um die Hypusinmodifikation als RNA-Bindungsmotiv und gleichzeitig als Kernlokalisierungssignal aufgefasst werden kann, die leucinreiche Sequenz zwischen den Resten 89 und 84 als Effektor-Domäne eines Kernexportsignals (NES) (Abbildung 3.5 [LIU et al. 1997]). YOUNG zeigte hingegen, dass die Hypusinsynthese nicht in einem vermeintlichen Kernimport Hypps mitwirkt, sondern wahrscheinlich andere Funktionen in der Zelle übernimmt [YOUNG 1998]. Bei Mikroinjektionsexperimenten von nicht hypusinyliertem Hypp in Zellkerne von *Xenopus* Oocyten fand ein Export des Proteins statt [ROSORIUS et al. 1999], was auch auf die Entbehrlichkeit des Hypusin-Restes beim Zellkernexport hinwies [ROSORIUS et al. 1999]. Ob jedoch der Hypp-Vorläufer im Zellkern eine Hypusinmodifikation erfuhr, bevor ein Export erfolgte, wurde nicht überprüft. In einer anderen Studie wurde bewiesen, dass auch das Rex-Protein des humanen T-Zell-Leukemia Virus Typ 1 (Retrovirus HTLV-1) für seine Transaktivierungsfunktion Hypp benötigt [KATAHIRA et al. 1995]. Wenn ein Rex-Protein, das mit einer SV40-NLS fusioniert war, in T-Lymphocyten exprimiert wurde, führte dies zu einer Verhinderung der Virusreifung. Wurde Hypp in diesem System überexprimiert, konnte dies die dominante Wirkung des Kernlokalisierungssignals in Rex supprimieren. Dies deutete darauf hin, dass Hypp auch für die Replikation von HTLV-1 benötigt wurde und die durch das mutierte Rex vermittelte Festsetzung Hypps im Zellkern zur Verhinderung eines viralen RNA-Exports ausreichte. Demnach war die Lokalisation Hypps für die Rex-Funktion von Bedeutung.

ROSORIUS et al. entdeckten durch GST-Fusionsprotein-Affinitätschromatographie, dass Hypp mit dem generellen Ran-GTP abhängigen Export-Rezeptor CRM1 interagiert. Mikroinjektionsexperimente an somatischen Zellen zeigten, dass der Kernexport von Hypp durch Einbringung von Leptomycin B, einem spezifischen Hemmer des Kernexports über CRM1, verhindert werden kann. Es existieren auch Hinweise darauf, dass für NES-enthaltende Proteine mehrere spezifische Export-Wege in höheren Eukaryonten vorhanden sind. Durch Einsatz von Hypp-Antikörpern und der Mutante Hypp-M14 konnte spezifisch der Kernexport des NES-CRM1-Exportin1-Komplexes inhibiert werden, nicht aber der Export von PKI, welches ein RNA-unabhängiges NES enthält [ELFANG et al. 1999]. Neben CRM1 wurde von einer unabhängigen Gruppe ein weiteres Exportin, Exportin 4, gefunden, das den Export von Hypp aus dem Zellkern vermittelt. Es kommt in höheren Eukaryonten, jedoch nicht in Hefe vor. Die Autoren zeigten *in vitro* und *in vivo*, dass zum Aufbau des für den Transport notwendigen Komplexes neben Ran-GTP und Exportin 4 voll hypusinyliertes Hypp vorliegen muss. Eine Interaktion mit CRM1 wurde hier nicht gezeigt.

Die essentielle *in vivo*-Funktion Hypps beim Kernexport von Ref und dem Ref-vermittelten Export viraler RNA wurde nochmals von [HOFMANN et al. 2001] in Zellkern-Mikroinjektionsexperimenten gezeigt. Sie zeigten auch durch Affinitäts-Chromatographie auf Proteinebene die Interaktion Hypps mit den Nukleoporinen Can/nup214, nup153, nup98 und nup62. Auch im Zellkern befindliches Actin, das mit den nukleoplasmatischen Filamenten assoziiert vorliegt, wurde als Hyp-Interaktionspartner gefunden und spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Transportfunktion Hypps.

Die Wirkung eines Deoxyhypusinsynthese-Hemmers auf ein virales Regulationssystem

wurde auch für das feline Immunodefizienzvirus (FIV) untersucht. Dabei kam es zu einer dosisabhängigen Reduktion der Virusreplikation bei Anwendung von 1,8-Diaminooctan [HART et al. 2002]. Gemessen wurde eine Anhäufung von mehrfach gespleißten Transkripten im Cytoplasma und eine Abnahme der ungespleißten und einfach gespleißten viralen mRNAs. Dieser Effekt von 1,8-Diaminooctan konnte in einer zuvor durchgeführten Studie mit dem postulierten DHH-Hemmer Mimosin an humanen T-Lymphozyten nicht beobachtet werden, wohl aber eine Suppression der HIV-1-Replikation [HOFMANN et al. 2001].

Ob es sich bei Hypp in seiner Hauptfunktion um ein kern-cytoplasmatische Shuttle-Protein bei allen Eukaryonten handelt, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Im System Bäckerhefe konnte bei einer für den Kernexport temperatursensitiven *XPO1*-Mutante (*XPO1* = *CRM1*) keine Kernanreicherung eines GFP-Hyp2p im Gegensatz zur Anreicherung von GFP-Rev beobachtet werden. Bei Einschränkung der *HYP*-Funktion akkumulierte auch kein GFP-Rev-Fusionsprotein im Zellkern [VALENTINI et al. 2002]. Auch in Wildtypzellen konnten die Autoren keine Lokalisation Hypps im Zellkern nachweisen, sondern in der perinukleären Region.

Die Interaktion von humanem Hypp mit Rev und RRE-RNA wurde *in vitro* durch elektrophoretische Banden-Verschiebungsassays gezeigt. Dabei war der Banden-Shift abhängig von der Hypusin- oder Deoxyhypusin-Modifikation. Das Hypp-Vorläufermolekül ließ die elektrophoretischen Laufeigenschaften der RNA unverändert [LIU et al. 1997]. Ein ähnlicher Banden-Shift wurde nicht nur durch die RRE-RNA ausgelöst sondern auch durch die U6-snRNA. Im Rahmen einer SELEX-Studie konnte eine *in vitro*-Interaktion des humanen Hypp mit einer speziellen RNA-Sequenz nachgewiesen werden [XU und CHEN 2001]. Für diese Interaktion war die Hypusin-Modifikation erforderlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Anzeichen dafür sprechen, dass Hypp eine Funktion beim Kernexport von retroviraler RNA in das Cytoplasma hat. Rex und Rev wiederum üben ihre transaktivierende Funktion durch Inhibierung des Spleißens viraler RNA aus. Diese Vorgänge scheinen bei eingeschränkter oder gestörter Hypp-Funktion ebenfalls behindert. Hypp besäße demnach neben der Erleichterung des Kernexport auch andere zelluläre Funktionen bei der Reifung von Retroviren und Vorgängen des zellulären RNA-Metabolismus.

3.3.6 Mögliche Funktion bei der Ribosomensynthese und beim Abbau von mRNAs

Einige Ergebnisse deuten auf eine Funktion Hypps bei Ribosomen-Synthese bzw. beim Kernexport ribosomaler Untereinheiten hin. In einem Assay mit permeabilisierten Humanzellen wurde eine Akkumulation Hypps in den Nukleoli gezeigt [LIPOWSKI et al. 2000], dem Ort der Ribosomensynthese. Ferner wurde in Hefe im Zuge eines Rpl11b-GFP-Kernexport-Assays eine Kernanhäufung des mit GFP fusionierten ribosomalen Proteins Rpl11b in temperatursensitiven Prolin-83-Punktmutanten (*npl2-1* und *npl2-2*) von Hyp2p beobachtet. Dies deutete auf eine Akkumulation der 60S ribosomalen Untereinheit im Zellkern bei gestörter *HYP*-Funktion hin [STAGE-ZIMMERMANN et al. 2000]. Das Vorkommen Hypps als Ribosomen-assoziiertes Faktor [BENNE und HERSHEY 1978] untermauert diese Beobachtungen, ebenso wie die zu 30% verringerte Translationsrate in Hefe-Zellen ohne Hyp-Protein [KANG und HERSHEY 1994].

Auch die Identifikation der Proteininteraktion Hypps in *Saccharomyces cerevisiae* mit dem ribosomalen Protein L5 [YOUNG 1998]; [SCHATZ et al. 1998], welches als ein wichtiger Faktor des Zellkernexportsystems für die 5S-rRNA gilt, durch zwei unabhängig durchgeführte Two-Hybrid-Screens deutet zum einen auf die Beteiligung beim Export von RNA aus dem Kern in das Cytosol zum anderen auf die mögliche Funktion bei der Ribosomensynthese.

In einer temperatursensitiven Hefe-Mutante, welche im C-terminalen Bereich eine punktmutierte Form des *HYP2*-Gens exprimiert, kam es zu einem Defekt im mRNA-Abbau [ZUK und JACOBSON 1998]. Die Mutante wies eine zu 30% erniedrigte Proteinsyntheserate und eine Akkumulation von mRNAs ohne 5'-Cap-Struktur auf. Dieses Ergebnis konnte durch die Charakterisierung weiterer temperatursensitiver *HYP2*-Allele (darunter *npl2-1* und *npl2-2*) bestätigt werden [VALENTINI et al. 2002] und deutet auf eine Funktion Hypps als mRNA-Abbaufaktor. Bei der weiteren Charakterisierung dieser Mutanten wurde Pab1p als ein High-Copy-Suppressor des dort vorliegenden temperatursensitiven Phänotyps gefunden. Pab1p bindet an die Poly-A-Enden von mRNAs und ist bei vielen Aspekten des mRNA-Metabolismus involviert, wie Prozessierung von RNA-3'-Enden, Translation und mRNA-Abbau.

Die aufgezeigten Funktionsaspekte ließen sich mit den Beobachtungen zur subzellulären Lokalisation (Cytosol + Zellkern) und mit der Hypothese eines mRNA-Zellkern-Cytosol-Shuttleproteins, das zusammen mit anderen proteinergergen Faktoren wirkt, kombinieren, vorausgesetzt Hypp ist am Kernexport bzw. an der Prozessierung einer speziellen Untergruppe von mRNA-Molekülen beteiligt, die für Proteine der G₁-S-Zellzyklus und Aufrechterhaltung der Zellproliferation codieren.

Einige Beobachtungen sprechen dafür, dass eine spezifische Gruppe von Genen einer möglichen posttranskriptionalen Kontrolle durch Hypp unterliegt und nicht der globale mRNA-Transport betroffen ist. So führt die Überexpression einer punktmutierten Form von *HYP2*, I₅₁K, die anstelle des hypusinylierten Lysinrestes einen Isoleucinrest trägt, zu einem dosisabhängigen Wachstumsstopp, der reversibel ist [YOUNG 1998]. Eine Regulation des globalen RNA-Pools würde nicht eine entsprechende spezifische Wirkung haben. Hefezellen, die destabilisierte Hypp-Formen exprimierten, zeigten bei deren Ausfall keine globale Einschränkung der Proteinsynthese [KANG und HERSHEY 1994]. Ferner konnten *in situ*-Hybridisierungen von Hefestämmen, die temperatursensitive Hypp-Allele trugen, keine Akkumulation von Poly-A-mRNA im Zellkern bei restriktiver Temperatur zeigen [TARTAKOFF, persönliche Korrespondenz].

Neben dem gerade dargestellten heterogenen Bild der bekannten Hypp-Forschungsergebnisse bleibt die Frage nach der Urfunktion des Proteins, die außerhalb des Zellkernexports liegen muss, da man das Protein in zellkernlosen Archaeen findet. Festzustellen ist, dass außer der klaren Evidenz für das Hypusin enthaltende Protein als Marker der Zellproliferation es bisher nicht gelungen ist, eine für alle Eukaryonten gültige definierte Funktion oder auch mehrere Funktionen zu finden, die alle vorliegenden Beobachtungen erklären können.

3.4 Aufgabenstellung

Die überwiegend an Säugetierzellen beobachtete Lokalisation des Proteins im Zellkern und Cytoplasma und Charakterisierung Hypps als essentieller Faktor für den Kernexport des HIV-1-Transaktivatorproteins Rev sowie sein Ran-GTP-abhängiger Kernexport durch die Exportine CRM1 bzw. Exportin 4 wiesen auf eine Funktion des Proteins beim Kernexport von Proteinen bzw. mRNAs. In *S. cerevisiae* ist eine Kernlokalisierung des Proteins bislang nicht gezeigt worden, und das Vorkommen eines Hypusin bzw. Deoxyhypusin enthaltenden Proteins in Archaea deutete auf zellkernunabhängige Funktionen.

Im Rahmen einer möglichst umfassenden phänotypischen Charakterisierung eines ausgeprägt temperatursensitiven punktmutierten *HYP*-Allels sollte die Hypothese, die Hypp im Zusammenhang mit dem Zellkernexport eines speziellen Subsets von mRNA-Molekülen sieht, überprüft werden. Zunächst sollte eine 2D-Gel-Analyse auf Proteinebene erfolgen, um aus der Charakterisierung von unterexprimierten Proteinen bei einer gestörten Hypp-Funktion indirekte Hinweise auf die von Hypp beeinflussten Genfunktionen zu erhalten. Die Ergebnisse sollten dann durch gezielte zellbiologische Überprüfungen der von den Genen betroffenen Zellfunktionen bestätigt werden.

Die Phänotypisierung war auf die Messung von genomweiten Transkriptomanalysen von Wildtyp- und Mutantenstämmen auszudehnen, um die Proteinergebnisse zu reproduzieren und mögliche mRNA-Interaktionspartner Hypps aufzufinden. Speziell der Vergleich von Gesamt-RNA-Transkriptionsprofilen aus Zellkern im Vergleich zum Cytosol bei permissiver und restriktiver Temperatur sollte Aussagen über eine gestörte Zellkernexportfunktion der Mutante liefern. Einige Ergebnisse der Transkriptomanalyse waren durch unabhängige Methoden zu überprüfen und zu verifizieren.

Im zweiten Teil einer Hypp-Funktionsstudie sollten Protein- und RNA-Bindungspartner des Hypusin enthaltenden Proteins durch Affinitätschromatographische Verfahren direkt gefunden werden, um in unabhängigen experimentellen Ansätzen die gefundenen funktionellen Aspekte Hypps zu bestätigen und neue funktionale Hinweise zu erhalten. Dazu war eine Expression und Reinigung N-terminaler GST-Hypp-Fusionsproteine durchzuführen. Durch die Expression der Hyp2p-Punktmutante I₅₁K in *S. cerevisiae* und die heterologe Expression von Wildtyp-Hyp2p in *E. coli* sollten GST-Hypp-Formen erzeugt werden, die keine Hypusinmodifikation aufwiesen. Dies sollte Aussagen über die Abhängigkeit der gefundenen Interaktionen von der Hypusin-Modifikation ermöglichen.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits

4.1.1.1 Chemikalien

α - ^{32}P]dCTP, γ - ^{32}P]ATP	Amersham- Buchler, Braunschweig, BRD
Acetonitril	Merck, Darmstadt, BRD
Acrylamid	Serva, Heidelberg, BRD
Agarose	Sigma, Deisenhofen, BRD
Agarose, niedrig schmelzend	Ambion(Europe), GB
Ameisensäure	Merck, Darmstadt, BRD
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, BRD
Ammoniumhydroxid	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ammoniumpersulfat(APS)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ampicillin	Roche, Basel, Schweiz
Bakto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bakto-Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bakto-Peptone	Difco Laboratories, Detroit, USA
BCIP	Roth, Karlsruhe, BRD
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, BRD
BSA (versch. Reinigungsstufen)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva, Heidelberg, BRD
Coomassie Brilliant Blue G	Serva, Heidelberg, BRD
Citronensäure	Merck, Darmstadt, BRD
CHAPS	Sigma, Deisenhofen, BRD
CY5-ddUTP	Mirus, Madison, USA
DAPI	Sigma, Deisenhofen, BRD
DNA-Größenstandard	Gibco, Eggenstein, BRD
DTT	Sigma, Deisenhofen, BRD
EDTA-Titriplex III	Sigma, Deisenhofen, BRD
Essigsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Ethidium Bromid	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ficoll	Sigma, Deisenhofen, BRD
5-FOA	ABCR, Karlsruhe, BRD
Formaldehyd (25% in Wasser)	Merck, Darmstadt, BRD
Formamid	Flucka AG, Neu-Ulm, BRD
Glutaraldehyd (25% in Wasser)	Merck, Darmstadt, BRD
Glycerin	Merck, Darmstadt, BRD
Glycin	Merck, Darmstadt, BRD
Harnstoff	Biorad, Hercules, USA
Hybond-N (Nylonmembran)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD
IPTG	Roche, Basel, Schweiz
Immobiline [®] II: pK 3.6, 4.6, 6.2, 7.0, 8.5, 9.3	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD
Kanamycin	Roche, Basel, Schweiz
Methanol	Merck, Darmstadt, BRD
MOPS (3-N-(Morpholino)-Propasulfonsäure	Merck, Darmstadt, BRD
MTT	Sigma, Deisenhofen, BRD
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Deisenhofen, BRD
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, BRD
di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Natronlauge (1N)	Merck, Darmstadt, BRD
NDS	Acros Organics
Nucleotide	New England Biolabs, Schwabach, BRD

Pharmalyte	Merck, Darmstadt, BRD
2-Propanol	Merck, Darmstadt, BRD
Rnase-Zap	Ambion(Europe), GB
RNA Millennium Markers™	Ambion(Europe), GB
SDS	Sigma, Deisenhofen, BRD
Silbernitrat	Riedel-de Haen, Seelze, BRD
Siliconöl DC 200	Serva, Heidelberg, BRD
TEMED	Serva, Heidelberg, BRD
Trypsin	Roche, Basel, Schweiz
Trifluoressigsäure	PE Biosystems, USA
Tris	Sigma, Deisenhofen, BRD
X-Gal	Roche, Basel, Schweiz
Yeast Nitrogen Base	Difco Laboratories Detroit, USA
Zymolyase (syn. Zymolase, versch. Reinigungsstufen)	Sigma, Deisenhofen

Alle verwendeten nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Biomol (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), NEB (England), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Oligonukleotide wurden von der Firma metabion (Martinsried, BRD) synthetisiert und HPLC-gereinigt.

4.1.1.2 Restriktionsenzyme, Polymerasen, Modifizierungsenzyme

Intestinale Kälber-Phosphatase	Roche, Basel, Schweiz
T4-DNA-Polymerase	Roche, Basel, Schweiz
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach, BRD
Terminale Transferase	Roche, Basel, Schweiz
DNase I	Roche, Basel, Schweiz
Rnase A	Roche, Basel, Schweiz
Vent _R -DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach, BRD
Taq-DNA-Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD
AmpliTag Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt, BRD
Turbo-Pfu-Polymerase	Stratagene, Heidelberg, BRD
DNA-Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach, BRD
Endoproteinase Trypsin	Roche, Basel, Schweiz
Endoproteinase LysC	Roche, Basel, Schweiz
Proteinase K	Roche, Basel, Schweiz
Thrombin-Protease	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD

4.1.1.3 Kommerzielle Kits

QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden, BRD
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, BRD
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Access RT-PCR System	Promega, Madison, USA
TaqMan Gold RT-PCR Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, BRD
Sybr [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt, BRD
NorthernMax [®] Complete	Ambion(Europe), GB
KinaseMax [™] 5'End-Labeling Kit	Ambion,(Europe), GB
Gene Images CDP-Star detection module	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD
Gene Images random prime labelling module	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD

Random Prime labelling kit	Roche, Basel, Schweiz
RNAspectra TM Green Fluorescent mRNA	GenHunter Corporation, Nashville, USA
Differential Display System	
Message Clean Kit (DNase-Verdau-Kit)	GenHunter Corporation, Nashville, USA
Yeastmaker Yeast Transformation System 2	BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche, Basel, Schweiz
Colloidal Blue Stain	Novec Electrophoresis GmbH, Frankfurt a.M., BRD

4.1.2 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

4.1.2.1 *Escherichia coli*

Stamm	Genotyp	Vertreiber
XLI-Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, lac[F' proAB⁺, lacI^q lacZΔM15, Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene, Heidelberg, BRD
M15	<i>nals, str^s, rifs, lac, ara, gal, mtl, F⁻</i> [ZAMENHOF und VILLAREJO 1972]	Quiagen, Hilden, BRD
BL21	<i>E. coli B, F⁻, dcm, ompT, hsdS (r_B- m_B-), gal</i> [GRODBERG et al. 1988]	
JM105	<i>thi-1, rpsL, endA1, sbcBC, hsdR4, (lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacI^q lacZΔM15]</i> [YANISCH-PERRON et al. 1985]	
JM109	<i>thi-1, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-mk+), mcrB+, recA1, relA1, supE44, fΦ (lac-proAB), F' [traD36, proAB, lacI^q lacZΔM15]</i>	
TOP10	<i>F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str^R) endA1, nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA

4.1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Herkunft
W303-D	<i>MATa/α, leu2-3, 112, ura3-1, 112, his3-11, 15, trp1-1, 15, ade2-1, can1-100</i>	Rothstein [1983]
W303-1MATα	<i>MATα, leu2-3, 112, ura3-1, 112, his3-11, 15, trp1-1, 15, ade2-1, can1-100</i>	Rothstein [1983]
W303 # 6-9	<i>MATa, hyp1::TRPI, hyp2::LEU2, HYP 1, YEp d-HYP (URA3)</i> Sonst isogenetisch mit W303-D	Otasek, vorl. Dissertation
WDHyp2-16Gal	<i>MATa, hyp1::TRPI, hyp2::LEU2, HYP 1, pRS HYP2 (URA3)</i> Sonst isogenetisch mit W303-D	[YOUNG 1998]
BJ5464	<i>MATα, ura3-52, trp1, leu2Δ1, his3Δ200, pep4::HIS3, prb1Δ1.6R can1 GAL</i>	[JONES 1991]

4.1.3 Verwendete Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Beschreibung	Referenz
pCR2.1	<i>amp^r</i> , <i>kan^r</i> , <i>F1 ori</i> , <i>ColE1 ori</i> , <i>lacZα</i>	<i>E. coli</i> -„Rescueplasmid“ für PCR-produkte mit Topoisomeraseaktivität	Invitrogen, Carlsbad, USA
pCR4-TOPO	<i>amp^r</i> , <i>kan^r</i> , pUC ori, <i>lacZα</i>	<i>E. coli</i> -„Rescueplasmid“ für PCR-produkte mit Topoisomeraseaktivität	Invitrogen, Carlsbad, USA
pGEX-4T2	<i>amp^r</i> , pBR322 ori, <i>lac I^q</i> , <i>GST</i>	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor zur Generierung von GST-Fusionsproteinen mit Thrombin-Schnittstelle	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD
pRS313	<i>HIS3</i> , <i>lacZ</i> , <i>amp</i> , <i>MSC</i> , <i>CEN6</i>	Hefe/ <i>E. coli</i> -Shuttle-Vektor mit <i>HIS3</i> -Marker (Single-Copy)	[SIKORSKI und HIETER 1989]
pRSG313	wie pRS313 aber mit Gal-1/10-Promotor	Hefe/ <i>E. coli</i> -Shuttle-Vektor mit <i>URA3</i> -Marker (Single-Copy) und Gal-Promotor	[WÖHL 1994]
pRSG316	<i>URA3</i> , <i>lacZ</i> , <i>amp</i> , <i>MSC</i> , <i>CEN6</i> , <i>GAL-1/10-Pr.</i>	Hefe/ <i>E. coli</i> -Shuttle-Vektor mit <i>HIS3</i> -Marker (Single-Copy) und Gal-Promotor	[YOUNG 1998]
pCM189	<i>URA3</i> , <i>amp^r</i> , <i>lacZ</i> , <i>CEN6</i> , <i>TetO-Pr.</i>	Hefe/ <i>E. coli</i> -Shuttle-Vektor (<i>URA3</i> -Marker, Single-Copy) zur Expression von Proteinen in Hefe unter dem Tetracyclin-Off-Promotor	[GARÍ et al. 1997]
pYES2	<i>URA3</i> , <i>amp^r</i> , <i>2μ ori</i> , <i>F1 ori</i> , <i>GAL-1/10-Pr.</i>	Hefe/ <i>E. coli</i> -Shuttle-Vektor mit <i>URA3</i> -Marker und Gal-Promotor (Multi-Copy) zur Proteinexpression in Hefe	Invitrogen, Carlsbad, USA
pRSG316- <i>HYP2</i>	abgel. von pRSG316	Exprimiert hefeeigenes Hyp2p von einem Single-Copy- <i>URA3</i> -Plasmid	[YOUNG 1998]
pRSG313- <i>HYP(hum)G₈₁</i>	abgeleitet von pRSG313	Exprimiert die Punktmutante G ₈₁ V des humanen Hyp1p („eIF-5A1“)	[YOUNG 1998]

4.1.4 Konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pCR2- <i>ACT1</i>	enthält die für Actin (Act1p) codierende DNA-Sequenz
pCR4-RRE	enthält eine zur RRE-RNA-Sequenz des HIV-1 komplementäre DNA-Sequenz
pGEX4- <i>HYP2</i>	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor, abgeleitet von pGEX-4T2, exprimiert N-terminal GST-getagtes Hyp2p
pRSG316- <i>YHM2</i>	Single-Copy- <i>E. coli</i> / <i>Hefe</i> -Shuttle-Vektor zur Expression von Yhm2p in <i>S. cerevisiae</i>
pRSG313- <i>HYP(hum)</i>	exprimiert humanes Hyp1p („eIF-5A1“) unter der Kontrolle des <i>GALI-10</i> -Promotors
pRSG313- <i>HYP2(G₈₂)</i>	exprimiert die Punktmutante G ₈₂ V des hefeeigenen Hyp2p (<i>GALI-10</i> -Promotor)
pCMV189- <i>HYP2</i>	exprimiert das hefeeigene Hyp2p unter dem regulierbaren Tetracyclin-Off-Promotor
pCMV189- <i>HYP(hum)</i>	exprimiert humanes Hyp1p („eIF-5A1“) unter dem regulierbaren Tetracyclin-Off-Promotor
pCMV189- <i>HYP2(G₈₂)</i>	exprimiert die Punktmutante G ₈₂ V des hefeeigenen Hyp2p (Tetracyclin-Off-Promotor)
pCMV189- <i>HYP(hum)(G₈₁)</i>	exprimiert die Punktmutante G ₈₁ V des humanen Hyp1p („eIF-5A1“)(Tetracyclin-Off-Promotor)
pYES2GST	Poly-Copy- <i>E. coli</i> / <i>Hefe</i> -Shuttle-Vektor enthält die GST-Sequenz mit C-terminaler Thrombinspaltstelle
pYESGST- <i>HYP2</i>	Expression (<i>GALI-10</i> -Promotor) liefert ein GST-Hyp2p-Fusionsprotein
pYESGST- <i>HYP2(I₅₁)</i>	Expression (<i>GALI-10</i> -Promotor) liefert die Punktmutierte GST-Hyp2p-Form I ₅₁ K

4.1.5 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

SSC:

150 mM NaCl
15 mM NaCitrat pH 7,0

TAE:

40 mM Tris-HAc pH 8,0
10 mM EDTA
20 mM Eisessig

TBS:

25 mM Tris-HCl pH 7,4
137 mM NaCl
5 mM KCl
0,6 mM Na₂HPO₄
0,7 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂

TE:

10 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM EDTA

TBE:

90 mM Tris
90 mM Borsäure
2,5 mM EDTA

10 x PBS:

160 mM Na₂HPO₄
40 mM NaH₂PO₄
1,5 M NaCl, pH 7,5

4.1.6 Geräte

Gießkassette für Gele:

für 10 Gele, Glasplatten 16 cm (Breite) x 17 cm (Höhe)
Kammern für Minigele und Kleine Gele (12 cm x 12,5 cm)
Kämme und Spacer

IPG-Gelplatten

IEF-Kammern:

Multiphor II electrophoresis unit 2117 und Ultrophor

Electrofocussing Unit 2217:

SDS-PAGE-Kammer: PROTEAN II xi Multi-Cell

Reswelling Tray

Spannungsquellen für IEF: 2297 Macrodrive 5 (bis max. 3000 V); Economy line LNC 10000-5pos (bis max. 5000V)

Spannungsquellen für SDS-PAGE:

Semi-Dry-Blot-Apparatur

Gel-Scanner: SHARP JX-Serie u. Labscan 2.0-Software

HPLC:

System HP1100

Vorsäule : OPTI-Guard, C8, 1mm

Trennsäule: MicroCART[®] 150-1, RP-18, Purospher 5 µm, endcapped, 1mm

Micro-Entsalzung: Poros 50RL C18-RP-Material

Protein-Sequenzierung:

PROCISE[™] Proteinsequenzer-System 492 A

Agarose-Gel-Kammern:

Vakuum-Blot-Apparatur :

DNA-Gel-Dokumentation: Polaroid-Kamera mit

UV_{302nm}-Leuchtbank

Photometer: Spektralphotometer UVikon 922

Bio-Rad

Werkstätten MPI für Biochemie

Bio-Rad; Werkst. MPI f. Biochem.

Amersham Pharmacia

Amersham Pharmacia

Amersham Pharmacia

Werkstätten MPI f. Biochemie

Amersham Pharmacia; Heinzinger

BioRad; Biometra; Heinzinger

Werkstätten MPI für Biochemie

Amersham Pharmacia

Agilent Technologies

Wicom

Merck

Poros

PE Biosystems

Werkstätten MPI f. Biochemie

Werkstätten MPI f. Biochemie

Cybertech

Kontron

Waagen:

Sartorius Research

Mettler PE 3600 Delta Range

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge L8 versch. Rotoren

Ultrazentrifuge TLA

Sorvall Zentrifuge RC-5B, Rotor SS34

Kühlzentrifuge SIGMA 4K10

Tischzentrifuge Sigma 201M

Tischzentrifuge Hettich Universal

Wasserbad(thermostatisierbar, Pumpe)

Kältetechnik (-20°C; -80°C)

Gefriertrocknung Lyovac GT 2E

Magnetrührer IKAMAG RET

Mixer:

pH-Meter wtw pH 521

Hand-Pipetten:

Speed-Vac Concentrator

Zentrifugationskonzentration: Amicon Microcon 30

Thermoschüttler 5437

Ultraschallgerät Sonifier 450

dest-Wasser-Anlage: Milli-Q-Plus

Sartorius

Mettler

Beckman Coulter

Beckman Coulter

Kendro Laboratory Product

B.Braun

Sigma

Hettich

Haake

AEG, Liebherr Heraeus

Finn-Aqua

Bachofer

Bender&Hobein AG

wtw

AbiMed; Eppendorf

Bachofer

Millipore

Eppendorf

Branson

Millipore

4.1.7 *S. cerevisiae*-Kultivierung

4.1.7.1 Vollmedium

Das Vollmedium gemäß [SHERMAN 1991] wurde für Kultivierungen benutzt, bei denen keine Selektionsbedingungen benötigt oder erwünscht waren. Es bestand aus 2% Bacto-Pepton, 1% Hefeextrakt und 2% Glukose (YPD) oder 3% Galaktose (YPGal). Bei Herstellung von Mediumplatten wurde 2% Bacto-Agar zugesetzt. Um Karamellisierung zu verhindern, wurden 20%ige (10x) Stocklösungen der verschiedenen Zucker Glukose, Galaktose, Raffinose und Sorbitol separat autoklaviert und zugegeben.

4.1.7.2 Semisynthetisches Selektivmedium (SSM)

Selektivmedium nach [SHERMAN 1991] wurde zur Selektion gegen Genfunktionen benutzt und enthielt 0,67% Yeast Nitrogen Base, 2% Glukose (SSM) oder 3% Galaktose (SSMGal) (dann in Kombination mit 2% Raffinose) sowie Aminosäuren mit Ausnahme von L-Tryptophan (W), L-Histidin (H), L-Leucin (L) und den organischen Basen Uracil (U) und Adenin (A). Die letzteren Komponenten wurden je nach den Selektionserfordernissen in einer Endkonzentration von 20 mg/L [SHERMAN 1991] in Form steriler Stamm-Lösungen nach dem Autoklavieren zugesetzt. Bei Herstellung von Mediumplatten wurde 2% Bacto-Agar (10%ige sterile Stocklösung) nach dem Autoklavieren zugesetzt.

4.1.7.3 FOA-Medium (FM)

Für die Selektion gegen den Ura⁺-Phänotyp nach [BOEKE et al. 1987] wurde SSM mit einer Konzentration von 50 mg/L Uracil und 0,1% 5-FOA pro L verwendet.

4.1.7.4 Minimal-Sporulationsmedium (MSM)

Als Sporulationsmedium (MSM), modifiziert nach [SHERMAN 1991], diente 1% Kaliumacetat pH 6,7. Zusätzlich wurden für die jeweilige Selektion die benötigten Aminosäuren aus Stock-Lösungen beigemischt, die Lösung anschließend steril filtriert.

4.1.7.5 Kulturbedingungen für *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae wurde bei 30°C in Flüssigkulturen gezüchtet. Das Medium füllte dabei nur max. 1/5 des jeweiligen Erlenmeyerkolbenvolumens aus. Benutzt wurden Kolben bis maximal 10L Gesamtvolumen. Die Zellen wurden in einem Schüttelinkubator bei einer Drehschüttelfrequenz von max. 250 rpm gezüchtet. Für Hefe-Kleinkulturen (>5mL) wurden schräg gestellte Plastik-Falcon-Röhrchen oder sterile Reagenzgläser verwendet. Für Wachstum auf festem Medium wurden die Zellen auf Agar-Platten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Temperatur-sensitive Mutanten wurden bei einer permissiven Temperatur von 25°C und restriktiven Temperaturen von 37°C und 39°C kultiviert.

4.1.8 *E. coli*-Kultivierung

4.1.8.1 Bakteriellies Medium (LB)

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Bakterienkulturen in LB-Medium gezüchtet, welches aus 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% NaCl [SAMBROOK et al. 1989] bei pH 7,0 bestand. Ampicillin bei einer Konzentration von 50µg/mL wurde zur Selektion zugesetzt. Einige *E. coli*-Stämme benötigten zur Selektion Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 µg/mL im Medium. Zur Herstellung von Kulturplatten wurden alle benutzten LB-Medium-Varianten mit 1,5% Bacto-Agar versetzt.

4.1.8.2 Bakterien-Kulturbedingungen

Alle *E. coli*-Stämme wurden bei 37°C entweder auf Selektivplatten oder in Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben (maximale Füllung: 1/10 Gesamtvolumen) bzw. bis 5 mL in Reagenzgläsern oder Falcon-Röhrchen angezüchtet.

4.2 Methoden der Molekularbiologie

4.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

4.2.1.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mittels alkalischer Lyse gewonnen, wie bei [BIRNBOIM und DOILY 1979] beschrieben.

4.2.1.2 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Präparation genomischer DNA aus Hefe wurden jeweils 50 mL einer logarithmischen Schüttelkultur nach der bei [SHERMAN et al. 1986] beschriebenen Methode verwendet.

4.2.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Menge von Enzymen, DNA, Salzkonzentration, Temperatur und Dauer der Spaltungs-Reaktionen variierten abhängig von der speziellen Anwendung. Bei bekannter Anzahl der Schnittstellen wurden die einzusetzende Enzymmenge sowie die Spaltzeit aus dem Vergleich mit den für den Phagen λ bekannten Daten errechnet. In einem typischen analytischen Verdau wurden 250 ng der Plasmid-DNA mit 0,5 U des jeweiligen Enzyms für 60 min bei 37°C gespalten. Wenn notwendig, wurde die Endonuklease durch den Zusatz von BSA (100 μ g/ml) stabilisiert. Für den Verdau genomischer DNA wurde mit 5-10 U/ μ g DNA für 16-24 h gespalten. Bei mehrfachen Restriktionsspaltungen, die nicht gleichzeitig in demselben Puffer durchgeführt werden konnten, wurde die DNA nach der ersten Restriktionsspaltung quantitativ mit Ethanol gefällt und danach im passenden zweiten Puffer gespalten.

4.2.2 DNA-Leiter-Analyse (DNA laddering)

5 mL einer logarithmischen Hefekultur wurden bei 1000 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden durch Zymolyase-Verdau sphäroplastiert. Die pelletierten Sphäroplasten wurden in 1 mL DNA-Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl) resuspendiert. 100 μ g/mL Proteinase K (20 μ L einer 1 mg/mL-Stammlsg.) wurden zugegeben, die Suspension für 3 h bei 37°C inkubiert. Darauf wurden 200 μ L Isopropanol (RT) zugesetzt und die Mischung über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Es wurde 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Das Pellet wurde 1 x in 200 μ L 70% Ethanol gewaschen und 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet ließ man kurz an der Luft trocknen. Danach wurde es in 10 μ L TE-Puffer resuspendiert. 4 μ L einer 1mg/mL Rnase A-Lösung wurden zugegeben und die Mischung 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Mischung mit 10 μ L eines DNA-Probenpuffers wurde die DNA gelelektrophoretisch in einem 1,5%igen Agarose/TAE-Gel bei 80 V während einer Stunde aufgetrennt und durch EtBr-Färbung sichtbar gemacht.

4.2.3 Polymerasen

4.2.3.1 Erzeugung glatter Enden aus 3'- oder 5'-Überhängen

Für einige Klonierungsstrategien war es häufig notwendig, 3'- oder 5'-Überhänge zu glätten. Dies wurde durch die Anwendung von T4-DNA-Polymerase erreicht. Kohesive Enden tragende DNA wurde zu einer Lösung mit 100 μM dNTP, 1-2 U Polymerase/ μg DNA gegeben und bei 12°C für 20 min inkubiert. Es folgte eine Hitzedenaturierung bei 75°C für 10 min.

4.2.3.2 Reverse Transkription

Die Synthese von beiden cDNA-Strängen bei der Produktion von cDNA-Bibliotheken geschah durch Anwendung von Moloney-Maus-Leukämie-Virus-reverse-Transkriptase (MMLV-RTase). 10 μg Templat wurde zu einem Reaktionspuffer aus 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 8 mM MgCl_2 , 10 mM DTT und 10 mM dNTPs (versetzt mit 800 U MMLV-RTase) gegeben. Die Dauer der Reaktion betrug 1h bei 37°C.

4.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

4.2.4.1 Standardbedingungen

Eine normale Reaktion beinhaltete 25 Zyklen, von denen jeder aus einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 1 Minute, einem Annealing-Schritt für 1 Minute bei einer für jedes Amplifikat individuell gewählten Temperatur und einem Elongations-Schritt für eine Minute bei 72°C bestand. Das Programm wurde durch eine 10-minütige Extensionsinkubation bei 72°C terminiert. Um die Spezifität der PCR-Reaktion zu maximieren, wurde die Annealing-Temperatur der Oligonukleotid-Primer nach folgender Gleichung bestimmt:

$$T_m = 2(N_T + (G + C))$$

mit N_T = Oligomer-Länge in Nukleotiden.

Die Gleichung berücksichtigt nicht den Salz-Effekt, wurde jedoch als eine nützliche Näherung einer optimalen T_m verwendet.

Aufgrund ihrer hohen Genauigkeit wurde Vent[®]-DNA-Polymerase (New England Biolabs) für alle Standard-PCR-Reaktionen eingesetzt. Eine Ausnahme stellte die Kolonie-PCR-Methode dar, bei der Taq-Polymerase sich als geeigneter herausstellte. Vor der Zugabe der Polymerase wurde das PCR-Gemisch auf 94°C erhitzt, was eine spezifische Primerbindung in der ersten Amplifikationsrunde sicherstellte. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 50 μL ausgeführt mit der Zusammensetzung: 40 ng/ μL linearisiertes Templat, 0,2 mM dNTPs, 1mM MgCl_2 , 20 pmol 5'-Primer, 20 pmol 3'-Primer, 1x Polymerase-Puffer und 0,5 U Polymerase [ERLICH et al. 1991]. Der Reaktionsansatz wurde mit 50 μL Mineralöl überschichtet. Nach erfolgter Amplifikation wurde 1/10 für die Erfolgskontrolle mit Hilfe eines Agarosegels eingesetzt. Vor einer Weiterverwendung wurde der verbliebene Ansatz nach [CROWE et al. 1990] mit Proteinase K verdaut, mit Hilfe einer Phenolextraktion gereinigt und ethanolisch gefällt.

4.2.4.2 Direkte Kolonie-PCR

Direkte Kolonie-PCR wurde für der Routine-Kontrolle von Hefe-Genotypen benutzt, wie z.B. für die Bestimmung des Genotyps vor und nach dem 5-FOA-Screening. Eine Fraktion von Hefezellen einer Kolonie wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß transferiert, in 50 μ L Zymolyase-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 M Sorbitol, 30 mM DTT) resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (1500 x g), der Überstand abgenommen und das Pellet in 50 μ L Zymolyase-Puffer resuspendiert, der 20 U/ml Zymolyase enthielt. Die Probe wurde in einem Thermo-Mixer mit moderatem Schütteln für 40 min bei 30°C inkubiert. Danach wurde 1/5 der Suspension mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen verdaut (vgl. 4.2.1.3. Die Reihenfolge, in der die Reaktionsbestandteile pipetiert wurden, war entscheidend. Optimale Ergebnisse wurden erhalten, wenn Wasser vorgelegt wurde, was den osmotischen Schock maximierte. Die nachfolgende PCR wurde erneut mit 1/5 des Verdau-Volumens durchgeführt. Dabei wurde Taq-DNA-Polymerase (Fa. Peqlab) und eine verlängerte Anfangsdenaturierung von 10 min bei 94°C benutzt.

4.2.4.3 *In vitro*-Mutagenese

Für die Punktmutantengenerierung fand die Megaprimer-Methode beschrieben von [SARKAR und SOMMER 1990] Anwendung. Die Methode nutzt die Beobachtung aus, dass ein PCR-Produkt selbst auch als Primer in der Polymerase-Kettenreaktion fungieren kann. Ein auf diese Weise genutztes Amplikon wird als Megaprimer bezeichnet. Ein Anfangsdurchlauf der PCR wurde mit zwei Oligonukleotiden durchgeführt, welche die gewünschte Punktmutierung einführen. Das mutierte Produkt wurde isoliert und in Kombination mit einem dritten Primer in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt, bei der das Produkt in seiner Gesamtlänge erzeugt wurde. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch DNA-Sequenzierung oder wenn möglich durch Restriktionsanalyse überprüft.

4.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten wurde durch Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt [SAMBROOK et al. 1989]. Wenn nicht anders erforderlich, wurde eine Agarosekonzentration von 1,2% für alle präparativen und analytischen Gele verwendet. Die DNA wurde durch Ethidiumbromid-Färbung mit Hilfe einer UV_{365nm}-Lichtbank sichtbar gemacht.

4.2.6 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit EtBr angefärbte DNA wurde während UV-Bestrahlung bei 365 nm mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit einem Reinigungskit nach Angaben des Herstellers (QIAquick Gel Extraktion Kit, Qiagen, Hilden, BRD).

4.2.7 Reinigung der PCR-Produkte

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden vor der weiteren Verwendung mittels eines PCR-Reinigungskits nach Herstellervorgaben gereinigt (Quiagen, Hilden, BRD). Wenn Klonierungsprobleme auftraten, wurde eine Proteinase-K-Behandlung für notwendig befunden. Diese wurde in Anlehnung an das Protokoll von [CROWE et al. 1990] durchgeführt. Bei jeder Einbeziehung von PCR in Klonierungsstrategien wurden erhaltene individuelle Klone zur Sicherstellung einer Fehlerfreiheit sequenziert.

4.2.8 Entsalzung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren

Bei Empfindlichkeit nachfolgender enzymatischer Schritte mit Nukleinsäuremolekülen gegenüber der Restsalzkonzentration war eine Veränderung der Pufferkonditionen erforderlich. Dazu wurde eine Alkoholpräzipitation mit 100%igem Ethanol und einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol sowie Lufttrocknung durchgeführt. Die gleiche Methode wurde zur Aufkonzentrierung von DNA-Proben angewendet.

4.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.2.9.1 Ligation

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben verwendet; die Reaktion wurde für 16 Stunden bei 16°C durchgeführt, anschließend wurde die Probe für 20 min auf 65°C erhitzt und anschließend direkt für die Transformation eingesetzt [KING und BLAKESELEY 1986].

4.2.9.2 Direktes Klonieren von PCR-Produkten

Mit Taq-Polymerase amplifizierte Fragmente wurden direkt in die TOPO TA-Cloning-Systeme der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben kloniert.

4.2.9.3 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Plasmiden, bzw. Ligationsansätzen wurden je nach Klonierungszweck verschiedene kommerzielle und nichtkommerzielle superkompetente *E. coli*-K12-Stämme eingesetzt und entweder nach den Vorgaben der Hersteller behandelt oder nach dem Standard-Protokollen von [HANAHAN 1983] transformiert.

4.2.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierung wurde von der Sequenzierabteilung des Max-Planck-Instituts für Neurobiologie und der Firma Medigenomix, Martinsried, durchgeführt. Dazu wurde Plasmid-DNA, aufgenommen in H₂O_{bi}, in einer Konzentration von 100 bis 500 ng/μL abgegeben.

4.2.11 Einbringung von DNA in Hefezellen

Hefezellen wurden durch Anwendung der Lithium-Ionen-Methode beschrieben bei [SCHIESTL und GIETZ 1989] transformiert. Die Technik erreichte routinemäßig Transformationseffizienzen von 10^5 bis 10^6 Klone pro μg DNA. Diese Effizienzen waren ausreichend, um komplexe cDNA-Bibliotheken in Hefe repräsentieren zu können, wie sie in Two-Hybrid-Screens oder Klonierungen durch Komplementation vorkommen.

4.2.12 Einzelsträngige Träger-DNA mit hohem Molekulargewicht

Einzelsträngige Träger-DNA ist kritisch für hohe Transformationseffizienzen. DNA aus Lachs-Testikeln wurde von der Firma Sigma, Deisenhofen, bezogen und in 1 x TE, pH 8,0 in einer Konzentration von 10 mg/mL gelöst. Die resultierende viskose Lösung wurde für 45 bis 60 Sekunden sonifiziert (Branson Sonifier 450 bei 50% Leistung mit einer Pulsierung von 1 Puls pro Sekunde). Die DNA wurde Phenol/Chloroform-extrahiert. Etwa 1 mg der DNA wurde in einem 0,8%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Größenverteilung der sonifizierten Fragmente zu bestimmen. [SCHIESTL und GIETZ 1989] zeigten empirisch, dass eine vorteilhafte Verteilung der Fragmentgrößen im Bereich von 2 kb bis 15 kb lag (mittlere Größe ca. 7 kb). Nach der Auswahl geeigneter DNA-Fractionen wurde die DNA mit 0,1 Volumen einer 3M Na-Acetat-Lösung, pH 5,2 und 2,5 Volumen EtOH (100%) präzipitiert. Die DNA wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und mit 70% EtOH gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation und Trocknung wurde sie in 1 x TE-Puffer in einer Endkonzentration von 10 mg/mL resolvasiert. Die Träger-DNA wurde vor Einfrierung und Lagerung bei -20°C für 5 min aufgekocht.

4.2.13 Fluoreszenzlabeling von DNA-Fragmenten

Die zur Southern- und Northern-Hybridisierung verwendeten DNA-Fragmente wurden nach dem Standardprotokoll des Random-Prime-Labeling-Verfahrens der Firma Roche, Basel nach [FEINBERG und VOGELSTEIN 1983] hergestellt. Dabei wurde ein die Zielsequenz enthaltendes denaturiertes Templat-DNA-Fragment zusammen mit einem Gemisch aus markiertem dCTP (Fluorescein tragendes dCTP im Falle der Southern-Proben, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP im Falle der Northern-Proben) und unmarkierten Desoxynukleosidtriphosphaten, dem Klenow-Fragment der *E.-coli*-DNA-Polymerase I und einem Gemisch von Nonanukleotiden mit breiter Sequenzverteilung inkubiert.

4.2.14 Herstellung von 3'-CY5-gelabelten DNA-Oligonukleotiden als Sonden für Northern-Blotting

Die 3'-Endmarkierung von DNA-Oligonukleotiden erfolgte enzymatisch durch Anbindung eines einzelnen CY5-gelabelten Didesoxyuridin-Triphosphates (CY5-ddUTP) mit Hilfe von terminaler Transferase in Anlehnung an das Protokoll von [SCHMITZ et al. 1991]. 100 pmol Oligonukleotid wurden mit H_2O_{bi} auf ein Volumen von 10 μL in einem Reaktionsgefäß aufgefüllt. Jeweils 4 μL eines 5x Kalium-Cacodylatpuffers (1 M K-Cacodylat; 0,125 M Tris-HCl;

1,25 mg/mL BSA, pH 6,6) und einer CoCl_2 -Lösung (25 mM) sowie je 1 μL einer 1mM CY5-ddUTP-Lösung und einer 400 U/ μL Lösung von terminaler Transferase (Roche, Basel) wurden gemischt und bei 37°C für 15 min inkubiert, danach auf Eis gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μL 0,2 M EDTA (pH 8,0) terminiert. Die Lösung wurde vor der Hybridisierung nicht aufgereinigt.

4.2.15 Southern Blotting

DNA wurde gemäß den generellen Vorgaben nach [SOUTHERN 1975] mit einigen Modifikationen des Protokolls hybridisiert. 10 μg genomischer Hefe-DNA wurde jeweils bei 37°C für 16 h mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten. Die generierten Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Denaturierung und Depurination wurde durch Inkubation des Gels in 1,5 M NaCl; 0,4 N NaOH für eine Stunde durchgeführt. Das Gel wurde mit H_2O_{bi} gewaschen und für 30 Minuten in einer Neutralisationslösung inkubiert (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5). Der Tank-Blot-Stapel wurde aufgebaut und in 2x SSC äquilibriert. Die DNA wurde mittels Kapillarfluss auf eine Nylon-Membran (Hybond-N) mit 10 x SSC als Flussmittel übertragen. Nach 16 h wurde der Transfer unterbrochen, die Membran mit 2x SSC gewaschen und im feuchten Zustand kurzzeitigem UV-Licht zur Quervernetzung der DNA auf der Nylon-Membran ausgesetzt. Danach wurde die Membran in einer Hybridisierungslösung (50% Formamid; 0,12 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6,8; 4 mM EDTA, pH 7,2; 2x SSC; 1% Sarcosyl; 4x DENHARDTS Reagens) bei RT für 2 h inkubiert. Die Hybridisierungskubation mit einer Fluorescein-gelabelten DNA-Probe (s.o.) wurde in einem Volumen von ca. 20 mL der Hybridisierungslösung über Nacht bei 60°C durchgeführt. Zwei Waschschrte für 5 min in einer Lösung von 2x SSC/0,1% SDS wurden gefolgt von zwei längeren Waschungen für 15 min bei 46°C in einer Waschlösung (50% Formamid; 0,12 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6,8; 2 mM EDTA, pH 7,2; 2x SSC; 1% Sarcosyl; 0,2% SDS).

Für die Detektion wurde das käufliche System „CDP-Star“ (Fa. Amersham, Uppsala) verwendet, welches an das Western-Blot-Verfahren angelehnt war. Der gewaschene Blot wurde für 1h bei RT in 1 mL/cm² in Blockierungslösung (100 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl (pH 9,5)) inkubiert. Der Anti-Fluorescein-Antikörper (alkaline Phosphataseaktivität) wurde in einer Verdünnung 1/5000 in Blockierungslösung (0,5% BSA) gelöst und der Blot bei leichtem Schwenken darin für 1 h inkubiert. Ungebundenes Antikörper-Konjugat wurde durch drei Waschschrte für 10 min in Überschußvolumina von 0,3% (v/v) Tween-20 in Blockierungslösung entfernt. Nach Entfernung überschüssiger Waschlösung wurde der Blot auf Saran-Folie blasenfrei ausgebreitet und mit Detektionsreagens benetzt. Durch die Alkaline-Phosphatase-Aktivität des Antikörpers wurde dabei die Umlagerung eines Dioxetan-Substrates zur Lichterzeugung katalysiert. Eine Hyperfilm-MP-Film-Folie (Amersham, Uppsala), auf den der in Folie eingeschlagene Blot plaziert wurde, wurde je nach erzeugter Lichtmenge für 10 min bis 60 min belichtet.

4.2.16 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefezellen und Zellfraktionen

Für die Präparation von RNA aus Hefezellen, Zellkernen, Cytosol und Mitochondrien wurde die SDS/Hot-Phenol- Methode beschrieben bei [LIN et al. 1996] benutzt. Anstelle der Anwendung von Chloroform und Phenol als Einzelkomponenten wurde auf das Mischreagens Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol (25:24:1, v/v/v), Fa. Ambion, zurückgegriffen.

4.2.17 RNA-Gel-Elektrophorese

Die denaturierende elektrophoretische Trennung von RNA durch Anwendung von Formaldehyd erfolgte nach dem Protokoll von [LIN et al. 1996]. RNA wurde visualisiert durch UV_{254nm} nach Färbung mit Ethidiumbromid. Ribosomale RNA fungierte als Größenmarker.

4.2.18 Differentielle Analyse der mRNA-Affinitätsbindung an immobilisierte GST-Proteine – SNAAP-Technik

Reinigung von GST-Fusionsproteinen und Affinitätsbindung mit mRNA-Extrakten geschah entsprechend der SNAAP-Methode, beschrieben bei [TRIFILLIS et al. 1999], mit Protokollerweiterungen, die die Expression von Fusionsproteinen in *S. cerevisiae* betreffen. Die N-terminalen GST-Fusionsproteine wurden im *S. cerevisiae*-Stamm BJ5464 bzw. in *E. coli*-JM105-Zellen exprimiert. Fusionsprotein exprimierende Zellen wurden in Lysis-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,6, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, Proteinaseinhibitormix Complete (Fa. Boehringer, Mannheim; 1 Tablette auf 25 mL) resuspendiert und nach den Protokollen für den Aufschluss von Hefe- (siehe Abschnitt Proteinexpression in *S. cerevisiae*) bzw. *E. coli*-Zellen (siehe Abschnitt Proteinexpression in *E. coli*) disruptiert und unlösliches Material durch Zentrifugation bei 31000 x g für 20 min entfernt. Der *E. coli*-Extrakt wurde mit 200 U/mL Micrococcus-Nuklease (Pharmacia) behandelt, um bakterielle RNAs in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ bei 30°C für 20 min zu entfernen. Die nachfolgende Inkubation der Fusionsproteine mit RNA-Gesamtextrakten aus *S. cerevisiae* sowie Wasch- und Reextraktionsschritte der bindenden mRNAs geschah entsprechend dem Protokoll von [TRIFILLIS et al. 1999].

Die kogereinigten RNAs wurden einer Differential-Display-Technik folgend weiteranalytisiert. Das Protokoll beinhaltete die Schritte: reverse Transkription, PCR-Amplifikation, Polyacrylamidgelelektrophorese, Ausschneiden und DNA-Extraktion von DNA-Banden, Reamplifikation, Klonierung und Sequenzierung derselben. Für die Detektion differentiell angereicherter mRNAs wurde eine auf Fluoreszenz basierende Methode verwendet, welche einen 3'-Fluorescein-gelabelten 3'-Primer in der ersten PCR-Reaktion nutzt (Kit der Fa. GenHunter). Die einzelnen Schritte wurden gemäß den Protokollvorgaben der Hersteller und der bei [TRIFILLIS et al. 1999] gemachten Angaben durchgeführt. Zur Fluoreszenz-Detektion wurde ein FLA3000-Laser-Scanner der Firma Raytest verwendet. Das Gerät enthielt einen Filtersatz, der auf die Emissionswellenlängen von Fluorescein optimiert war. Die Klonierung der reamplifizierten DNA-Banden nach der zweiten PCR-Reaktion geschah mit Hilfe eines Topoisomerase-Vektorsystems in den pCR4-Vektor der Fa. Invitrogen (TOPO-TA-Cloning-Kit).

4.2.19 RNA-Blotting

Das Northern-Blot-Protokoll nach [THOMAS et al. 1979] wurde durch die Anwendung einer Vakuumblotapparatur (Werkstätten MPI für Biochemie, Martinsried) modifiziert. Dazu wurde das Formaldehydgel 3x 15 Minuten in 10x SSC gewaschen. Die Teflon-Siebplatte der Apparatur wurde ausgiebig in DEPC-H₂O_{bi} gewaschen, in das Blotgestell eingesetzt und eine trockene Nylon-Membran (Hybond-N, Amersham) aufgelegt. Die Membran war dabei größer als das Gel. Eine Passende PVC-Maske wurde zur Abdichtung überschüssiger Siebplattenflächen eingesetzt und die Ränder zur Membran mit Parafilm abgedeckt. Die Membran wurde mit 10x SSC befeuchtet und das Gel blasenfrei aufgelegt. Das Gel wurde mit 10x SSC bedeckt. Bei 50 mbar Unterdruck wurde 2h geblotet. Ca. jede halbe Stunde wurde 10x SSC auf das Gel nachgegossen. Nach Abnahme des Gels von der Membran wurde die Position der Geltaschen mit Bleistift (Bleistift=RNA-Seite) markiert. Vor der Quervernetzung durch UV-Licht-Behandlung wurde der Blot einige Minuten getrocknet.

4.2.20 Hybridisierung

Vor Zugabe der markierten Probe wurden die Membranen bei Raumtemperatur vollständig mit Hybridisierungslösung (50% Formamid, 0,12 mM KPO₄ pH 6,8, 4 mM EDTA pH 7,2, 2xSSC, 1% Sarcosyl, 4xDenhardts Reagenz (je 0,4% Ficoll, Polyvinylpyrrolidin, BSA)) benetzt. Die Inkubation mit der Sonde in 10-15 ml Hybridisierungslösung erfolgte über Nacht in einem Rollerofen entweder bei 37°C (für Oligonukleotidsonden) oder bei 46°C (für DNA-Fragment-Sonden). Anschließend wurde bei Raumtemperatur für 2x 5 min mit 2xSSC/0,1% SDS gespült und bei der jeweiligen Hybridisiertemperatur für 2x 15 min mit Waschlösung (50% Formamid, 0,12 mM KPO₄ pH 6,8, 2 mM EDTA pH 7,2, 2xSSC, 1% Sarcosyl, 0,2% SDS) gewaschen. Für die folgende Autoradiographie(X-OrnatTM-Film) bzw. Fluoreszenz-Emissions-Analyse wurde die noch feuchte Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen.

4.2.21 „in gel“-Hybridisierung

Alternativ zu der Hybridisierung von DNA, die auf eine Membran transferiert wurde, fand die In-Gel Hybridisierung Verwendung, wie bei [AMMER et al. 1991] beschrieben. Diese Methode wurde aus Gründen der Zeitersparnis eingesetzt und wenn nur besonders kleine Probenmengen vorhanden waren.

4.2.22 Plasmid-Isolierung aus Hefezellen

Plasmide wurden aus Hefezellen nach dem Protokoll von [HOFFMAN und WINSTON 1987] isoliert.

4.2.23 Komplementationsanalyse

Als *in vivo*-Ansatz zu einer Funktionsanalyse modifizierter *HYP*-Allele wurde die Fähigkeit der veränderten *HYP*-Formen, das Zellwachstum der Hefe zu fördern, untersucht. Dafür wurden diverse Wildtyp-*HYP* Gene mit Hilfe der „plasmid shuffle“-Methode, modifiziert nach [BOEKE et al. 1987], und mehrere *HYP*-Mutanten, gemäß [SIKORSKI und BOEKE 1991] auf die Fähigkeit zur Komplementation einer [*hyp1;hyp2*]-Doppeldisruption hin analysiert. Als Ausgangsstamm diente dabei die haploide [*hyp1;hyp2*]-Doppeldisruptante WDHyp2-16Gal, die ein pRS-Plasmid (*URA3*-Marker) mit einem intakten *HYP2* unter Kontrolle des Gal-Promotors enthielt. Diese Hefe wurde dann mit verschiedenen pRSG-Plasmiden (*HIS3*-Marker) transformiert, die eine der *HYP*-Varianten unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors trugen. Neben dem Stammsystem, in dem alle Plasmide den Gal-Promotor enthielten, wurde durch die gleichen Methoden ein System basierend auf Single-Copy-Plasmiden unter der Kontrolle des steuerbaren Tetracyclin-Off-Promotors geschaffen (führte z.B. zum Wildtypkontrollstamm WD-Hyp2TO).

4.2.24 Untersuchung der Plasmidretention - spontaner Plasmidverlust

Für die Klärung der Frage, ob eine plasmidcodierte *HYP*-Variante statt des ebenfalls plasmidcodierten Wildtypgens *HYP2* das Wachstum der Hefe gewährleisten kann, wurde die entsprechende Doppeltransformante, mit Mediumwechsel alle 36 h, für 5 Tage auf U^+/HWL^- -SMGal bzw. auf YPGal-Vollmedium kultiviert. Dabei wurde auf ein ständig logarithmisches Wachstum geachtet. Nach dieser Zucht erfolgte eine Selektion auf UWL^-/H^+ -Klone, die ohne das, pRS316-*HYP2*-Plasmid weiterwachsen. Gescreent wurde mit Hilfe von Stempelübertragung.

4.2.25 FOA-Screening

In dem Fall, da obige Methode zu keinen selektierbaren U^-/His^+ -Klonen führte, wurde die 5-Tage-Kultur über Nacht, gemäß [BOEKE et al. 1987] mit 5-FOA kultiviert. Diese Selektion gegen *URA3*-exprimierende pRSG316-Plasmide sollte die Identifikation von Hefen mit einer funktionell niedereffizienten *HYP*-Form wie dem humanen, G₈₁V-punktmutierten Allel sicherstellen. Auf solche Klone wurde nach der FOA-Kultur mittels Stempelübertragung gescreent.

4.2.26 Quantitative Sybr-Green-Real-Time-PCR

Real-Time-RT-PCR wurde als quantitatives Verfahren angewendet, um die mRNA-Mengen einzelner Transkripte aus den Genchipversuchen zu überprüfen. Im ersten Schritt wurden aus den Zielensequenzen Amplikons mit einer Länge von 50 bis 80 Basenpaare ausgewählt, für welche jeweils Vorwärts- und Revers-Primer sowie eine zwischen den Primersequenzen angeordnete TaqMan-Probensequenz nach bestimmten Regeln gestaltet wurden. Hierbei wurde die Primer-Express-Software von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet. Obwohl die SybrGreen-Methode Anwendung fand, wurden die TaqMan-Proben-Oligos mitgestaltet, um bei Problemen bei der Messung eines bestimmten Transkripts die Analyse durch den spezifischeren 5'-Exonuklease-Assay wiederholen zu können. Für die ausgesuchten Oligonukleotide galt:

- Schmelztemperatur: 60°C (Primer); 70°C (TaqMan-Probe)
- GC-Gehalt: 38 - 70% (Primer und Taq-Man-Probe)
- Sequenzlänge: 18 - 26 bp (Primer); 20 -32 bp (TaqMan-Probe)

Das 5'-Ende der TaqMan-Sonde durfte kein G tragen, da es sonst zu einem Quenchen des gebundenen Reporterfarbstoffs kam. Die Sonde sollte relativ nahe am 3'-Ende des PCR-Primers liegen. Aus Kostengründen wurde nicht der 5'-Exonuklease-Assay (TaqMan-Analyse) mit der höchsten Spezifität angewendet, sondern eine Methode, die auf der Messung der Sybr-Green-Fluoreszenz beruhte. Das Fluoreszenzsignal resultierte dabei aus der Interaktion der gesamten amplifizierten DNA mit dem sich in die kleine DNA-Furche einlagernden Farbstoffes. Daher mussten, um eine unspezifische Amplifikation auszuschließen, vor dem Beginn der eigentlichen Messung für jedes Amplikon die Kombinationen der Primer-Konzentrationen in separaten Primer-Matrizes ausgetestet werden. Die Primer wurden in Konzentrationen von 100 bis 900 nM überprüft. Es wurde die Primer-Kombination gewählt, die einen möglichst frühen Fluoreszenzanstieg und ein hohes Endniveau ermöglichte (vgl. Tab. 4.4).

Die Synthese des cDNA-Erststranges erfolgte durch reverse Transkription mittels MMLV-Reverse-Transkriptase (MultiScribe, Kit Fa. Applied Biosystems) nach einem DNase-Verdau (Fa. Quiagen, Hilden) der Ausgangs-RNA. Für den Real-Time-PCR-Ansatz wurde der vorgefertigte „2x SYBR-PCR-Mastermix“ von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet, zu dem nur noch die cDNA und Primer hinzugegeben wurden und mit DEPC-Wasser auf 25 µL aufgefüllt wurde. Der Mastermix enthielt die AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs mit dUTP, eine passive Referenz und einen angepassten Puffer mit MgCl₂. Die AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase stellt eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq-DNA-Polymerase dar, die bei Raumtemperatur keine Aktivität zeigt und zu ihrer Aktivierung anfänglich für 10 Min. auf 95°C erhitzt werden muss und so die Bildung von Primer-Dimer verhindert. Zum Schutz vor Carryover-Kontamination bei der Pipettierung der Ansätze ist dem Mastermix AmpErase UNG (Uracil N-Glykosylase) hinzugefügt worden. Bei Verwendung von dUTPs in den PCR-Reaktionen wird durch die Glykosylase eingebautes UTP von Carryover-Kontaminationen in einem vorgeschalteten 50°C-Schritt gespalten. Die anschließenden 10 Min. bei 95°C inaktivieren das Enzym, um in der folgenden PCR-Amplifikation nicht zu stören. Als passive Referenz wurde der Farbstoff Rox hinzugegeben, der keinen Einfluss auf die PCR hat und Fluoreszenzfluktuationen in der Normalisierung der Fluoreszenzsignale ausglich.

Die PCR-Reaktion und die parallel verlaufende Detektion wurden mit dem „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die speziellen „ABI PRISM Optical Tubes and Caps“ ermöglichten einer im Deckel des PCR-Blocks installierten Optik, während der PCR-Zyklen den Sybr-Green-Farbstoff im Komplex mit dsDNA anzuregen und die resultierende Fluoreszenz zu messen. Das PCR-Programm bestand aus folgendem Zweischnitt-PCR-Mechanismus:

- 2 min 50°C
- 10 min 95°C
- 15 sec 95°C
- 1 min 60°C (40 Zyklen)

Gen/ORF c(VPr.)/c(RPr.)	Vorwärts-Primer / TaqMan-Probe	Rückwärts-Primer / PCR-Produktgröße in bp
ACT1 300 nM/ 300 nM	5'-GTCGCCTTCCACTTCGAACA-3' 5'-AAATGCAAACCGCTGCTCAATCTTCTCA-3'	5'-GGCTCTGAATCTTTCGTTACCAAT-3' 117 bp
18S-rRNA (RDNI8) 300 nM/ 300 nM	5'-GAGTTTCCCCGTGTTGAGTCAA-3' 5'-TTAAGCCGCAGGCTCCACTCCTGG-3'	5'-GAGTATGGTCGCAAGGCTGAA-3' 96 bp
YNL335W 300 nM/ 300 nM	5'-GCCATTCCAGTGGTGAATGC-3' 5'-ACCACGGGCCGTTGTTCCGC-3'	5'-AGCCTAGCAGTTTACTGTTTGG-3' 71 bp
ARN2 300 nM/ 600 nM	5'-TGTTGGTTGTATTCTGTACCACTCA-3' 5'-CTTGCTGGTGGCGTCTCTACAAATTGGAG-3'	5'-AGGGCCCCGATAATCTTTGAATT-3' 80 bp
NMD2 300 nM/ 300 nM	5'-GAGCTTGAAGGTGCCTCTAATGA-3' 5'-ATCTGAAAGAAACAGCTTCTCCAATGATCAG-3'	5'-TGGTTGGGTGGCAATATCTGA-3' 80 bp
EST1 600 nM/ 300 nM	5'-ACCTATGCGCAAAGTACGATATGA-3' 5'-TCCGTTATTTCAAATGCTCTCTTCGCGA-3'	5'-CCATCTGTGTATTGCATTAATCAA-3' 82 bp
HXT3 300 nM/ 900 nM	5'-TTGCCTGGGCTTTGTTATGA-3' 5'-CGGTGGTATGACTTTCGTTCCAGAATCCC-3'	5'-GACCAGCTTCAACCAATAACGT-3' 75 bp
RPL7B 300 nM/ 300 nM	5'-CATCGAAGCCAAGTGGGTAA-3' 5'-TGGTATCTGTCCATTGACGATTTGATCAG-3'	5'-AAGTGTGGACCAACAGTGATGATT-3' 81 bp

Tabelle 4.4: DNA-Sequenzen der benutzten Primer und potentiellen TaqMan-Proben für die mRNAs, deren Anreicherungen in G_{81} im Vergleich zum Wildtyp durch Real-Time-PCR überprüft wurden. Für die PCR verwendet Primerkonzentrationen (VPr. = Vorwärts-Primer; RPr.= Rückwärts-Primer) und die Länge der Amplikons sind angegeben. Die Primer wurden synthetisiert von der Firma metabion (Planegg-Martinsried).

4.2.26.1 Relative Quantifizierung durch das Standard-Kurvenverfahren

Gemessen wurde der Zyklus der Reaktion, in dem die Amplifikation des PCR-Produkts zuerst detektiert wurde. Der Parameter C_T (Threshold Cycle) ist als die Zyklusnummer definiert, ab der die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellwert oberhalb der Basislinie überschreitet. Wird ein Gen in einem Gewebe stark exprimiert, liegen zu Beginn der PCR-Reaktion schon eine große Anzahl von cDNA-Kopien vor und der festgelegte Schwellwert wird nach weniger Zyklen erreicht als in einem Gewebe mit niedrigerer Expression. Durch Vergleich der C_T -Werte war eine relative Quantifizierung von Transkripten verschiedener Hefestämme möglich.

Für die Quantifizierung wurde eine relative Methode angewendet (vgl. Protokolle der Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt), die auf der Generierung von Standardgeraden basiert. Die Menge eines bestimmten Transkriptes in der Probe (entspricht dem gemessenen C_T -Wert) wird dabei als relativer Wert zu einem in allen Proben nicht regulierten Gen (House-Keeping-Gen oder auch Kalibratorgen) ausgedrückt. Für alle Proben des Experimentes wird die Zieltranskriptmenge aus einer Standardkurve bestimmt und durch die Menge des Kalibratortranskriptes dividiert. Dementsprechend wird das Kalibrator-Transkript zu einer 1x-Probe, während alle anderen Mengen als n-fache Differenzen zum Kalibratorgen ausgedrückt werden. Da die Mengen in den experimentellen Proben dividiert werden, entstehen dimensionslose Werte. Deshalb ist für die Methode lediglich die Kenntnis der relativen Verdünnungen, die bei den Einzelproben und bei dem Kalibratortranskript genau gleich gewählt wurden, erforderlich. Wichtig ist eine akkurate Anfertigung der cDNA-Verdünnungsreihen, dabei sind die gewählten Verdünnungsschritte beliebig.

Standardkurven der PCR-Amplifikate wurden sowohl für das zu messende Transkript als

auch für das endogene Kalibratortranskript jeweils für Mutante und Wildtyp erstellt. Nach Vergleich der Genchip-Ergebnisse wurde die Actin(*ACT1*)-mRNA als Kalibratorgen ausgewählt. Für jedes zu messende Transkript wurde aus der zugehörigen Standardkurve der C_T -Wert des Zieltranskriptes aus der Mutanten- und Wildtyp-cDNA bestimmt. Es folgte die Division der Zieltranskript-Werte durch die Kalibratorgen-Werte. Das Ergebnis stellt einen normalisierten Zieltranskript-Wert dar. Anschließend wurde der Quotient der normalisierten Zieltranskriptwerte für Mutante und Wildtyp gebildet (Mutantenwert:Wildtypwert) und so die relative Expressionshöhe des Zieltranskriptes bestimmt. Sowohl die Messung der Standardkurven-Werte, als auch der Zieltranskript- und Kalibratortranskript-Werte erfolgten in Quadruplikaten.

4.2.27 Experimente mit Hochdichte-Oligonukleotid-Genchips

4.2.27.1 RNA-Extraktion, cRNA-Präparation und Microarray-Hybridisierung

Für die RNA-Isolierung wurden Kulturen der verschiedenen Hefestämme, gezüchtet bei 25°C bzw. 37°C, mit einer OD_{600nm} von 1,0 verwendet. Die Zellen wurden in AE-Puffer (50 mM NaOAc, pH 5,2; 10 mM EDTA) gewaschen. Gesamt-RNA aus den ganzen Zellen oder subzellulären Fraktionen wurde nach der SDS/Hot-Phenol-Methode (s.o.) isoliert [LIN et al. 1996] und für die Synthese doppelsträngiger cRNA nach den Vorgaben der Firma Affymetrix eingesetzt. Die RNA wurde mit Hilfe von RNeasy-Säulen (Fa. Quiagen) weiter aufgereinigt. 30 μ g Gesamt-RNA des jeweiligen zellulären Ausgangsmaterials wurde für eine Erststrang-cDNA-Synthese durch Benutzung eines Oligo(dT)-Primers mit einer T7-Promotor-Sequenz am 5'-Ende eingesetzt. Nach der Synthese des zweiten Stranges wurde die doppelsträngige cDNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, präzipitiert und in Nuklease-freiem H_2O_{bi} aufgenommen. Biotin-gelabelte cRNA wurde durch *in-vitro*-Transkription mit Hilfe des High-Yield-Transkription-Kits der Firma ENZO-Diagnostics, USA, hergestellt. Die gebildete cRNA wurde bei 94°C für 35 min in einer Lösung mit 40 mM Tris-Acetat, 100 mM KOAc und 30 mM MgOAc fragmentiert.

Die Hybridisierung des S98-Genchips der Firma Affymetrix wurde gemäß den Protokollen des Herstellers durchgeführt: Der Chip wurde mit 200 μ L Hybridisierungspuffer, welcher 12 μ g fragmentierte cRNA, 0,1 mg/mL Hering-Spermien-DNA und 0,5 mg/mL acetyliertes BSA in Mes-Puffer enthält, für 18 h bei 45°C hybridisiert. Waschungen und Färbung wurden in der Affymetrix-Genchip-Fluidics-Station 400 durchgeführt. Nach der Waschung in dem nicht stringenten Waschpuffer (6x SSPE; 0,01% Tween 20; 0,005% Antifoam) bei 25°C und einem stringenten Waschschrift (100 mM Mes; 0,1 M NaCl; 0,01% Tween 20; 0,005% Antifoam) bei 50°C wurden zum Chip 2 mg/mL R-Phycoerythrin-Sterptavidin (MoBiTec, Deutschland) in Färbepuffer (100 mM Mes; 0,1 M NaCl; 0,01% Tween 20; 0,005% Antifoam) zur Anfärbung der hybridisierten und biotinylierten cRNA-Fragmente zugesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift in nicht-stringenten Puffer wurde der Chip mit einem GeneChip-Scanner (Hewlett-Packard, USA) gescannt. Die Hybridisierungsintensitäten wurden durch Anwendung der Methode des mittleren Unterschieds zwischen genau übereinstimmenden (PM) und nicht übereinstimmenden (MM) Probenpaaren bestimmt (s.u.).

4.2.27.2 Übersicht der Lösungen für Affymetrix Chipexperimente

5x RNA Fragmentierungspuffer:

200 mM Trisacetat pH 8.1
150 mM MgOAc
500 mM KOAc
ad 20ml DEPC-H₂O

Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2x MES-Hybridsations-Puffer:

200 mM MES
2 M NaCl
40 mM EDTA
0,02 % Tween 20

12x MES-Färbelösung:

0,33 M MES saures Monohydrat
0,89 M MES Natriumsalz

Die Puffer wurden mit DEPC-H₂O aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Der pH-Wert sollte zwischen 6,5 und 6,7 liegen. Die Lösungen wurde durch einen 0,2 µm Sterilfilter filtriert (nicht autoklaviert!) und bei 2-8°C im Dunkeln gelagert. Bei gelber Verfärbung wurden sie verworfen.

Nicht-Stringenter Waschpuffer (Wash A):

6x SSPE
0,01 % 10% Tween 20
0,005% Antifoam

Stringenter Waschpuffer (Wash B):

100 mM MES
0,1 M NaCl
0,5 mL 10% Tween 20 (entspr. 0,01%)

Die Puffer wurden mit DEPC-H₂O aufgefüllt und bei 2-8°C gelagert.

2x Färbepuffer:

100 mM MES
1 M NaCl
0,05 % Tween 20
0,005 % Antifoam

Dehybridisierungslösung:

100 mM MES
0,1 M NaCl
0,01 % 10% Tween 20
2 % SDS

Die Puffer wurden mit DEPC-H₂O aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

SAPE Färbelösung:

300 µL 2x Färbepuffer
24 µL BSA (50 mg/ml)
6 µL Streptavidin, R-phycoerythrin
(1 mg/ml, Molecular Probes(Leiden, Niederlande))

Antikörper Lösung (Anti-Biotin):

300 µL 2x Färbepuffer
24 µL BSA (50 mg/ml)
6 µL Ziege IgG (10 mg/ml)
3,6 µL bioAnti (0,5 mg/ml)

Die Lösungen wurden mit DEPC -Wasser auf 600 µL aufgefüllt.

4.2.27.3 Generierung und statistische Auswertung der Expressionsdaten durch vergleichende HDOA-Experimente

Der von der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) hergestellte Hochdichte-Oligonukleotidchip S98 trägt Sequenzinformation für 9336 Sequenzabschnitte in Form von Probensätze. Davon codieren 6430 Sätze für alle bekannten ORFs von *Saccharomyces cerevisiae*. 6373 Ursprungssequenzen stammen aus der SGD-Datenbank mit dem Stand von Dezember 1998. Zusätzlich enthält der Chip 127 Probensätze für Sequenzen, die vom Münchener Informationszentrum für Proteinsequenzen (MIPS) als ORFs identifiziert wurden, aber nicht von den Wissenschaftlern der SGD (Saccharomyces Genomic Database, Stanford University, CA) als solche anerkannt wurden. Neben den Datenbanken von MIPS und SGD enthält der Chip Proben für verschiedene Sequenzen von speziellem Interesse. Dabei handelt es sich um mitochondrial-codierte Gene, Ty-Proteine, ribosomale RNAs, snRNAs, ORFs aus 2μ -Plasmiden und mögliche ORFs aus Serien-Analysen der Genexpression [VELCULESCU et al. 1997]. Die restlichen ca. 2200 Probensätze entstammen Sequenzen, die Ende 1998 als Kandidaten für ORFs angesehen wurden und vorläufig durch serielle Analysen der Gen-Expression (SAGE) identifiziert wurden. Diese Sequenzen könnten mit geringen Raten oder unter spezifischen Bedingungen exprimiert werden. So kann die Verlässlichkeit multipler Genchip-Ansätze auch zur Funktionsaufklärung dieser schwach charakterisierten Sequenzen beitragen.

Für jeden Probensatz, der einen identifizierten oder potentiellen ORF repräsentierte, befanden sich 16 verschiedene Oligonukleotide von 25 Basenpaaren Länge auf dem Chip (mit Glasoberfläche). Diese Nukleotide waren genau komplementär („Perfect-Match-“, PM-Proben) zur jeweiligen Sequenz in der RNA. Unter diesen Proben waren weitere 16 Oligonukleotide angeordnet, die in der Mitte an der 13. Position identisch zur Zielsequenz waren („Mismatch“, MM-Proben, siehe Abb. 4.1A.). Die MM-Felder dienten so als Kontrolle für Kreuz-Hybridisierung und Spezifität der Hybridisierung. Die Anordnung ergab pro Ziel-ORF 16 Wertepaarungen (MM gegen PM); jede Einzelzelle im Probensatz enthielt etwa einige Millionen Moleküle.

Die Proben-Zellen auf dem Chip maßen $24\mu\text{m} \times 24\mu\text{m}$. Der Fluoreszenz-Scanvorgang erfolgte bei 570 nm Excitations-Wellenlänge mit einer Auflösung von $3\mu\text{m}$ pro erzeugtem Bildpunkt, was zu einer $8\text{Pixel} \times 8\text{Pixel} = 64\text{Pixel}$ -Matrix für jede Probenzelle führte. Aus den 64 Einzelintensitätswerten wurde dann ein einziger Durchschnitts-Intensitätswert für jede Probenzelle berechnet, indem aus den 64 Einzelintensitäten eine Verteilung berechnet und der Wert des 75. Quantils dieser Verteilung als Intensitätswert der gesamten Zelle übernommen wurde (Abb. 4.1B. und C.).

Die primäre Auswertung der Chips erfolgte mit dem Algorithmensatz der *GeneChip3.1-5.0*-Software (Firma Affymetrix). Die statistische Analyse auf signifikante An- bzw. Abreicherung eines Transkripts und Quantifizierung der Expressionsunterschiede geschah in zwei Algorithmenblöcken. Der Wechselalgorithmus erzeugte für jeden Probensatz einen Unterscheidungs-*p*-Wert und damit verbunden die Entscheidung, dass es sich um unterschiedliche Expressionswerte handelte. In einem zweiten Schritt wurde die quantitative An- oder Abreicherung durch Berechnung eines Signal-Log-Verhältnisses angegeben. Vor dem Vergleich der beiden Arrays wurde zum Ausgleich der technischen und biologischen Variation zwischen den Arrays

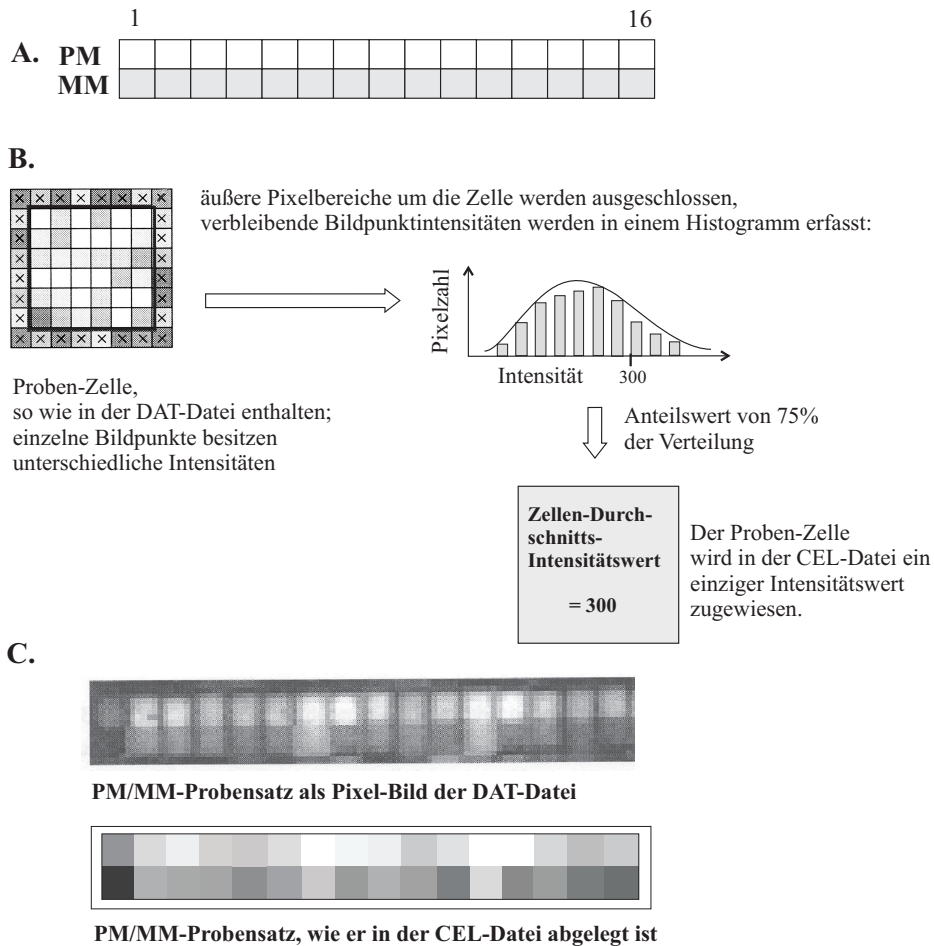


Abbildung 4.1: Zum Aufbau und Primärauswertung eines Oligonukleotid-Probensatzes, welcher ein Gen auf dem Chip repräsentiert. **A:** Probensatz aus 2×16 Oligonukleotid(25-mer)-enthaltenden Probenzellen. Die obere Reihe enthielt 16 perfekt komplementär zum Zielgen gewählte Oligonukleotid-Sequenzen, PM-Zellen („Perfect Match“). Die Reihe darunter enthielt die gleichen Nukleotide, die jedoch an Position 13 der Nukleinsäurekette einen Basenaustausch (identische Base zum Zielgen) besaßen (MM-Zellen, „Mismatch“), die zur Messung von Fehlbindung dienen. **B:** Skizzierung der Fluoreszenzsignal-Auswertung einer einzelnen Zelle in einem Probensatz. Das Pixelmuster aus 64 Punkten mit unterschiedlichen Intensitätswerten wird in ein Histogramm übersetzt. Der Intensitätswert, der dem 75. Quantil der Verteilung entsprach, wurde der Gesamtzelle als Durchschnittswert zugewiesen. Die für jede Zelle erhaltenen Intensitätswerte wurden in einer CEL-Datei abgespeichert (**C.**).

eine globale Daten-Skalierung bzw. eine globale Normierung durchgeführt. Bei der Computerunterstützten globalen Normierung wurde die Durchschnittsintensität aller Proben-Sätze auf dem Experiment-Chip durch Multiplikation mit einem Normierungsfaktor NF äquivalent zur Durchschnittsintensität auf dem Baseline-Chip ausgedrückt. Die globale Daten-Skalierung beinhaltete die Multiplikation der Intensitäts-Durchschnittswerte beider Chips oder auch der Chippaare aus mehreren Experimenten mit Skalierungsfaktoren SF_1 bzw. SF_2, \dots, SF_n , um alle Werte auf einen Ziel-Durchschnittsintensitätswert einzustellen und so verschiedene differentielle Experimente untereinander besser vergleichbar zu machen.

Die Durchschnittsintensität eines Chips wurde berechnet, indem der Mittelwert der Durchschnittsintensitäten aller Probensätze auf dem Chip bestimmt wurde, nachdem die höchsten 2% und die niedrigsten 2% der Werte ausgeschlossen wurden.

Ein weiterer robuster, nicht veränderbarer Normalisierungsfaktor, genannt „Perturbationsfaktor“, wurde jeweils spezifisch auf jeden Probensatz angewendet. Er berücksichtigte die cha-

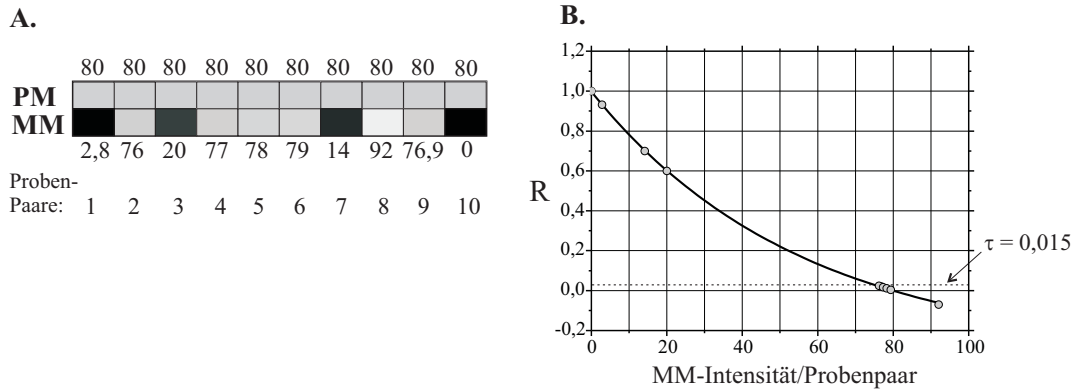


Abbildung 4.3: Auswertung eines hypothetischen Probensatzes für den Vorzeichen-Rangtest nach Wilcoxon zur Generierung des p -Wertes. **A.** zeigt den Probensatz nach Bestimmung der Fluoreszenz-Intensitäten. Die PM-Wert-Intensität liegt hier bei konstant 80, die MM-Intensitäten schwanken von 0 bis 92. Die Probenpaare sind von 1 bis 10 nummeriert. Wenn die MM-Zellen-Intensität, aufgetragen als Abszisse in **B.**, steigt und größer/gleich der PM-Intensität wird, wird der Unterscheidungswert R kleiner. Wird also die Intensität der MM-Zellen höher, sinkt die Möglichkeit, zwischen PM und MM zu unterscheiden. Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Benutzer-einstellbaren Parameter τ (in unseren Experimenten bei 0,015) dar.

rakteristischen sequenzabhängigen Eigenschaften der einzelnen Probensätze (darunter die die Affinität der Zielsequenzen zur Probe und die Hybridisierungs-Linearität jedes Probenpaares im Probensatz). Desweiteren wurde eine Hintergrundkorrektur und die Bestimmung eines Rauschfaktors durchgeführt (für Einzelheiten siehe Affymetrix-GeneChip-Dokumentation).

4.2.27.3.1 Der Weg zur zur quantitativen Bestimmung der Ab-/Anreicherung von Transkripten, Signifikanzbestimmung

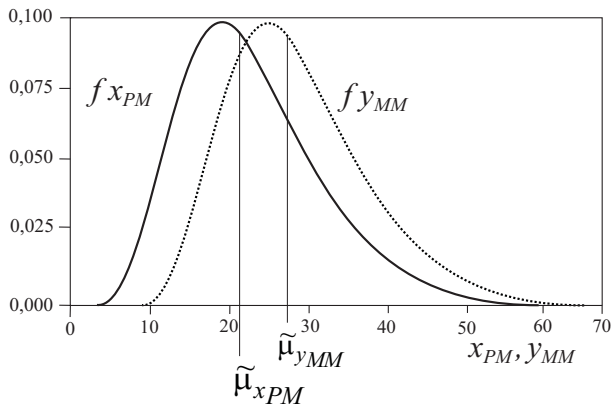


Abbildung 4.2: Für den Rangsummentest von Wilcoxon wird angenommen, dass die Intensitätswerte der PM- und MM-Zellen gleich verteilt sind. Sie unterscheiden sich nur in den Medianen $\tilde{\mu}$.

Der Wechselalgorithmus generierte für jeden Probensatz einen p -Wert als Maß für die Zufallswahrscheinlichkeit der gemessenen Unterschiede. Er gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass es sich bei der Verteilung der Differenzen aller Probenpaare eines Probensatzes um eine zufällige handelt, unter der Annahme, dass der Verteilungsmedian $\tilde{\mu}_{PSatz}$ gleich Null ist. So entscheidet der p -Wert, ob die Nullhypothese H_0 angenommen oder zurückgewiesen werden muss. Die beobachtete Verteilung war nicht zufällig, wenn der p -Wert klein ist. Je kleiner der p -Wert, desto größer also die Wahrscheinlichkeit, dass das betreffende Gen in den beiden Proben unterschiedlich exprimiert ist.

Die Bestimmung des Probensatz- p -Wertes erfolgte real durch zweiseitige Wilcoxon-Rangsummen-Tests für gepaarte Stichproben. Es handelt sich

um einen nichtparametrischen Test, der sehr allgemein anwendbar ist, da keine bestimmte Verteilungsannahme erforderlich ist und keine großen Stichproben vorausgesetzt werden. Er geht

von zwei gleichen Verteilungen der PM- und MM-Probenzellen eines Satzes aus. Die Verteilungen von unterschiedlich exprimierten Proben dürfen sich dabei nur in den Medianen unterscheiden (vgl. Abb. 4.2). Es wird geprüft:

$$H_0: \tilde{\mu}_{PM} = \tilde{\mu}_{MM} \quad \text{gegen} \quad H_1: \tilde{\mu}_{PM} \neq \tilde{\mu}_{MM}$$

Der Test beurteilt anhand einer Rang-Statistik, ob die Signalintensität resultierend aus der Hybridisierung der Perfect-Match-Proben höher war als die der Mismatch-Proben-Intensitäten. Aus den Intensitäten von PM und MM jedes Zellen-Paares wurde ein R -Wert berechnet nach

$$R = \frac{PM - MM}{PM + MM}. \quad (4.1)$$

Die R -Werte wurden der Größe nach in einer Rangliste sortiert und mit dem Signifikanz-Schwellenwert τ verglichen. Das Vorgehen beim Wilcoxon-Test soll anhand eines Beispiel-Probensatzes (siehe Abb. 4.3) verdeutlicht werden:

- 10 R -Werte eines Beispiel-Probensatzes:

$$\{3,2; 0,024; 0,6; 0,017; 0,011; 0,004; 2,04, -0,07; 0,02; 1,0\}$$

- Werte vergleichen zum gewählten Schwellenwert $\tau = 0,015$:

$$\text{z.B.: \#1} = (3,2 - 0,015 = 3,185, \dots, \text{\#5} = (0,011 - 0,015) = -0,004$$

- So eingestellte Probenwerte werden nach ihren Beträgen sortiert:

	8	6	5	4	9	2	3	10	7	1
R	$ -0,085 $	$ -0,011 $	$ -0,004 $	0,002	0,005	0,009	0,585	0,985	2,025	3,185

- Die Vorzeichen tragenden Rangzahlen r der Zellen ergeben sich zu:

$$r: \{10, 4, 7, 1, -2, -5, 9, -6, 3, 8\}$$

- Als Summe der positiven Rangzahlen und somit als Teststatistik T ergibt sich:

$$T = \sum(+r) = 10 + 4 + 7 + 1 + 9 + 3 + 8 = 42$$

- Für $n = 10$ findet man p -Werte tabelliert als:

T	41	44	47	50	52
p	0,097	0,053	0,024	0,010	0,005

Es konnten auf diese Weise computergestützt p -Werte generiert werden, die durch Vergleich mit Grenzwerten, genannt γ_1 bzw. γ_2 , zu Gruppierungen der Probensätze in Kategorien von angereicherten bis abgereicherten Transkripten oder nicht vorhandener Regulation führten. Hierbei werden Paarwerte der beiden Arrays gebildet und mit zwei weiteren Grenzwerten verglichen. Aus den Einzel- p -Werten wurde ein Vergleichs- p -Wert für die Probensätze in beiden Chips berechnet. Zur Einschätzung der Expressionsstärke eines Transkripts wurden auch Tukey-Zweifachgewichtungen angewendet. Dabei werden Probenpaare, deren Signalstärke enger am Median-Wert des gesamten Probensatzes liegen, stärker gewichtet.

Zur quantitativen Bestimmung des Signals eines Probensatzes wurde die mittlere Differenz benutzt (Average Difference, AD). Für die 16 Probenpaare wurden die Differenzen von PM–MM gebildet und daraus der Mittelwert berechnet. Ob das Expressions-Niveau eines Transkripts im Baseline- gegenüber dem Experiment-Chip verändert war, wurde anhand von vier Vergleichswerten ermittelt (siehe Affymetrix-Dokumentation):

- Die Max-Werte (Zahl der erhöhten bzw. erniedrigten Probenpaare/Zahl der benutzten Probenpaare)
- Anreicherungs-/Abreicherungs-Verhältnis
- Log Average Ratio Change = $\text{Log Avg}_{exp} - \text{Log Avg}_{base}$
- Differenzpositiv-Differenznegativ-Verhältnis

Ein Ab- bzw. Anreicherungsfaktor eines Gens in beiden HDOAs, FC (FoldChange) wurde folgendermaßen bestimmt: Der AD-Wert eines Transkripts steht in direkter Beziehung zu dessen Expressionshöhe. Es wurden skalierte AD-Werte im Baseline- und Experiment-Datensatz neu berechnet, wobei nur relevante Probenpaare berücksichtigt wurden. Als nächstes wurde ein AD-Wechselwert (AD_W) bestimmt:

$$AD_W = AD_{exp} - AD_{base}$$

Der FC-Faktor berechnete sich nach:

$$FC = \frac{AD_W}{\max[\min(AD_{exp}, AD_{base}), Q_M \cdot Q_C]} + \begin{cases} +1 & \text{falls } AD_{exp} \geq AD_{base} \\ -1 & \text{falls } AD_{exp} < AD_{base} \end{cases} \quad (4.2)$$

mit $Q_C = \max(Q_{exp}, Q_{base})$
 und $Q_M = 2,8$ bei $24\mu\text{m}$ -Auflösung des Arrays

Die Gleichung berechnet den FC-Wert als positive Zahl, wenn das Transkript der Mutante gegenüber dem Wildtyp(Baseline)-Zustand angereichert war (Quotient: Mutantenwerte/Wildtypwerte), und als negative Zahl, wenn das Niveau abnahm. Q ist der zuvor berechnete Faktor für das Hintergrundrauschen des Gen-Chips.

4.2.28 DNA- und Protein-Sequenzanalysen

DNA- Aminosäuresequenz-Daten wurden computertechnisch bearbeitet unter Nutzung des GCG-Wisconsin-Package(Accelrys, USA), der Sequenzanalyse-Software DNASTar (DNASTar Company) und dem Shareware-Programm BioEdit (5.0.7). Dequenz-Daten wurde erhalten und online verglichen mit Hilfe der Datenbanken EMBL, GenBank, DDBJ, SwissProt, PIR und PRF. Dabei kamen die FASTA- und BLAST-Algorithmen zum Einsatz [PEARSON 1990]. Multi-Protein-Alignments wurden mit Hilfe des Clustal-W-Algorithmus und Phylogramme mit TREEVIEW [PAGE 1996] berechnet. Einige der Aminosäuresequenzen, die zur Generierung des Phylogrammes von Abbildung 3.2 benutzt wurden, sind bisher unpubliziert und nur in Datenbanken erhältlich. In diesen Fällen wurden die Zugangsnummern angegeben.

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Gesamt-Protein-Konzentrationen in Zellysaten ohne hohe Harnstoff- und Detergenskonzentrationen wurde nach der Methode von [BRADFORD 1976] mit Hilfe von Reagenzien der Firma Biorad durchgeführt. Wurde die Proteinbestimmung von Zellysaten für die isoelektrische Fokussierung notwendig, fand eine modifizierte Bradford-Bestimmung, veröffentlicht von [RAMAGLI 1999a], Anwendung.

4.3.2 Aceton-TCA-Proteinfällung

Benötigte Lösungen:

Aceton-TCA-Fällungslösung: 20% (v/v) TCA (Trichloressigsäure); 0,07% (v/v) β -Mercaptoethanol in Aceton, -20°C

Aceton-Waschlösung: 0,07% (v/v) β -Mercaptoethanol in Aceton, -20°C

Die proteinhaltigen Extrakte wurden mit der Aceton-TCA-Fällungslösung versetzt, so dass in dem Gemisch TCA von ca. 10% (v/v) vorlag. Diese Ansätze wurden 2 h bei -20°C stehen gelassen. Das dabei präzipitierte Protein wurde abzentrifugiert und das erhaltene Pellet mit der Aceton-Waschlösung gewaschen, bis alle TCA-Rückstände entfernt waren.

4.3.3 Präparation von Hefeproteinen

Für alle Präparationen wurden im logarithmischen Wachstum befindliche Hefekulturen verwendet. Für die Bestimmung des Wachstumszustandes wurde die optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt und die Kulturen bei $\text{OD}_{600} = 0,5$ bis 1,0 verwendet. In dieser Phase besitzen die Hefezellen Zellwände normaler Dicke und der Proteasegehalt ist nicht erhöht, was das Aufschlussverfahren erleichtert und den proteolytischen Abbau gering hält.

4.3.3.1 Aufschluss für SDS-PAGE-Minigele

Die Proben wurden aus je 5 mL einer Zellkultur hergestellt. Nach dem Pelletieren (bei 2500 rpm/ 4°C / 5 min) wurden die Zellen zweimal mit 5 mL H_2O_{bi} gewaschen. Die Zellen wurden in 30 μL 3-fachem Auftragspuffer nach [LAEMMLI 1970] resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei 95°C wurden die Zellen abzentrifugiert, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Volumen mit 1 x Auftragspuffer auf 100 μL aufgefüllt; dieses Lysat wurde für die SDS-PAGE benutzt.

Auftragspuffer 3 x:

SDS	10%
Tris/HCl pH 6,8	150 mM
Glycerin	45%
Bromphenolblau	0,01%
β -Mercaptoethanol	6%

4.3.3.2 Aufschluß für die isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist empfindlich gegenüber Salzen. Daher bedarf es bei der Präparation der Proteine spezieller Puffer und Bedingungen. Es wurde durchgehend bei 4°C bzw. auf Eis gearbeitet. Zunächst wurden 50 mL einer Hefekultur in 50 mL Falcongefäßen abzentrifugiert und zweimal mit je 50 mL H₂O_{bi} gewaschen; das Pellet wurde in 1,5 mL Lysispuffer aufgenommen und in 15 ml Falcongefäße überführt. Der Lysispuffer enthielt 1 mM Tributylphosphin neben DTT als Reduktionsagens. Der primäre Aufschluss erfolgte mechanisch mit Glasperlen von 0,4 mm Durchmesser, wobei 8 x 30 sec rigide gevortext wurde, unterbrochen von je 30 sec Kühlung auf Eis. Danach erfolgte eine gepulste Ultraschallbehandlung für sechs Minuten (3 x 1 min gepulster Ultraschall, dazwischen je 1 min Stehen des Reaktionsgefäßes auf Eis). Anschließend wurden Zellfragmente vor der weiteren Verwendung für 45 min bei 4°C und 100000 x g abzentrifugiert.

Lysispuffer:

Harnstoff	8 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	4%
Tris/HCl	20 mM
(Tributylphosphin	1 mM)
DTT	40 mM
PMSF	0,05%

„Proteaseinhibitor-Cocktail“ (Roche, Basel, Schweiz) doppelte Konzentration

4.3.4 IEF, SDS-PAGE und Proteinnachweis in Gelen

4.3.4.1 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Auftrennung von Proteinen in einer Polyacrylamidmatrix, mit einer isoelektrischen Fokussierung in der ersten Dimension und einer SDS-PAGE in der zweiten Dimension, erfolgte nach der bei [GÖRG et al. 1988] und [WERNER et al. 1990] beschriebenen Methode.

4.3.4.2 Isoelektrische Fokussierung

Die angewandten Methoden lehnten sich an die Protokolle von [[GÖRG et al. 1988]; [GÖRG et al. 2000]] an. Für die isoelektrische Fokussierung wurden käufliche (ImmobilineTM) und selbst hergestellte Fokussierstreifen (Methode beschrieben bei [WESTERMEIER 1990]) verwendet. Benutzt wurde eine per Kryostat (Paratherm FT 20B Electronic) auf konstante 15°C gekühlte Fokussiereinheit (2117 MultiphorTM). Dabei wurden je nach Fokussierstreifenlänge (11 bzw. 18 cm; Breite jeweils 3 mm; Geldicke im gequollenen Zustand: 0,5 mm) und Färbemethode des 2D-Gels unterschiedliche Gesamtproteinmengen pro Fokussierstreifen aufgetragen. Die Auftragung erfolgte durch Inkubation des nichthydratisierten Gelstreifens mit dem geklärten Lysat („in gel sample reswelling“, [GÖRG et al. 1988]) in einem speziellen Trogtabrett aus Plexiglas (Werkstätten MPI für Biochemie) über Nacht. Die Streifen wurden dabei

mit Paraffinöl überschichtet und so vor Austrocknung geschützt. Handelte es sich um „analytische“ Gele, die für die Silberfärbung vorgesehen waren, wurde eine maximale Proteinmenge von 100 μg (11 cm Streifen) bzw. 200 μg (18 cm Streifen) verwendet. „Präparative“ Gele wurden durch auf Coomassie-Farbstoffen basierenden Techniken gefärbt. Für sie wurden maximal 500 μg (11 cm Streifen) bzw. 1000 μg (18 cm Streifen) fokussiert. Nach einer Einwanderungszeit von 3 h bei 300 V, 0,1-0,4 mA und 0,1-0,2 W wurde das Spannungsgerät (2297 Macrodrive 5TM) ca. alle 2 h um 300 V höher eingestellt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass ein konstanter Stromfluss von >0,1 mA erhalten blieb. Insgesamt wurden 65 kWh im Fokussierbereich von pH 4,5-5,4, 40 kWh im Bereich von pH 4-7 und 30 kWh im Bereich von pH 4-9 verwendet. Für die letzte Stunde einer Fokussierung wurde die Spannung auf ca. 1/10 des numerischen Wertes erhöht, der jeweils in kWh zu erreichen war, also auf 3000V, 4000V oder 5000V.

4.3.4.3 SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden Polyacrylamidgele modifiziert nach [LAEMMLI 1970] benutzt. Diese bestanden aus Sammel- und Trenngel bei einer Schichtdicke von 1 bis 1,5 mm und einer Trennstrecke von wahlweise entweder 20 cm, 12 cm oder 7 cm. Vor einer SDS-PAGE als zweiter Dimension wurden die IEF-Streifen nach der isoelektrischen Fokussierung gemäß [WERNER et al. 1990] für 2x 10 min umäquibriert. Für die SDS-PAGE als zweite Dimension fanden große Gele der Dimensionen 12x12 cm (Dicke 1mm) und 20X20 cm (Dicke 1,5 mm) Verwendung. Nach erfolgter Trennung der Proteine bei 100 V im Sammelgel und 200 V im Trenngel wurden die Gele je nach Fragestellung weiter verwendet. Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts erfolgte mit Hilfe eines käuflichen Proteinstandards (SDS-BMW, Biorad).

4.3.4.4 Coomassie Blue Färbung

Gele wurden gemäß [FAZEKAS DE ST GROTH et al. 1963] für 60 min in der Fixier-/Färbelösung inkubiert und anschließend durch in Entfärbelösung inkubiert, die mehrmals gewechselt wurde; vor der weiteren Verwendung wurden die Gele gründlich mit bidest H₂O gewässert.

Fixier-/Färbelösung:

Essigsäure	10%
Methanol	50%
Coomassie Brilliant Blue R250	0,1%

Entfärber:

Essigsäure	10%
------------	-----

Auch modifizierte Coomassie-Färbemethoden wurden eingesetzt, welche auf einer kolloidalen Verteilung des Farbstoffes Coomassie-Blue-G beruhen (Protokolle RotiBlue-Stain, Fa. Roth und beschrieben bei [RABILLOU 2000]). Diese Färbungen besitzen im Vergleich zur herkömmlichen Methode eine bis zum Faktor 3 höhere Sensitivität.

4.3.4.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung der 2D- Gele erfolgte nach den Methoden von [HEUKESHOVEN und DERNICK 1985] bzw. [HOCHSTRASSER et al. 1988]. Auf die zweite Methode sei hier genauer eingegangen.

ZEIT	LÖSUNG	ZU BEACHTEN
5 min	H ₂ O	
1 h - über Nacht	40% Essigsäure, 10% Ethanol	
5 min	H ₂ O	
30 min	1% Glutaraldehyd, 0,5 M Natriumacetat	
3x 10 min	H ₂ O	
2x 30 min	0,05% NDS	
4x 15 min	H ₂ O	
30 min	0,8% Silbernitrat, 1,32% (v/v) Ammoniumhydroxid, 2% (v/v) 1N Natronlauge	Silbernitrat in 30 mL H ₂ O lösen, NH ₄ OH und NaOH in 200 mL lösen, Ag NO ₃ -Lösung langsam dazugeben
4x 4 min	H ₂ O	
5 - 10 min	0,005% Citronensäure, 0,1% (v/v) Formaldehyd	Zuerst 250 mL Entwickler auf die Gele geben, abgießen und mit restlicher Lösung zu Ende färben
Mindestens 20 min	5 mM Tris/HCl, 2% Essigsäure	

Bei dieser Färbemethode war es möglich 6 Gele gemeinsam in einem Färbebehälter parallel zu verarbeiten. Das benötigte Volumen für jede Lösung betrug in diesem Fall 1500 mL.

4.3.4.6 Computerunterstützte Auswertung von 2D-Gelen

Die Gele wurden mit dem Scanner SHARP JX-330 und der entsprechenden Software Lab Scan Version, 2.01 (Amersham Pharmacia Biotech) mit einer Auflösung von 150 dpi bzw. 300 dpi digitalisiert. Für quantitative Analysen wurde der Scanner mittels eines Graukeils (KODAK; Kalibriertablett mit 21 Absorptionseinheiten von 0,05-3,05) kalibriert. Die Gele wurden mit Hilfe des Programms ProteomeWeaver[®] (Version 2.0, Fa. Definiens, München) gemäß den Anleitungen des Software-Herstellers ausgewertet.

4.3.4.7 Spaltung der Proteine in der Gelmatrix

Die Proteinspots von Coomassie Blue gefärbten 2D- Gelen wurden exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Vergrößerung der Oberfläche wurden die Gelbereiche in Würfel mit ca. 1mm Kantenlänge zerlegt. Die Gelstückchen wurden 5 x 15 min im Schüttler mit H₂O_{bi} gewaschen, bis ein pH-Wert von ca. 6 erreicht war; anschließend wurde mit dem Protokoll für den Verdau mit Trypsin bzw. Endoproteinase LysC begonnen. Die Protokolle des Herstellers (Roche, Mannheim) wurden befolgt und unterschieden sich für beide Enzyme kaum.

Lösungen:

Einfach konzentrierter Spaltpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,5
Doppelt konzentrierter Spaltpuffer:	100 mM Tris/HCl pH 8,5
DTT-Lösung:	10 mM DTT in doppelt konz. Spaltpuffer
Jodacetamid-Lösung:	50 mM Jodacetamid in doppelt konz. Spaltpuffer
10% Ameisensäure	
100% Acetonitril	

Es wurden bei jedem Schritt ca. 20 μL Lösung verwendet, gerade soviel, dass die Gelstückchen bedeckt waren. Die Überstände der nachfolgenden Schritte wurden jeweils abpipettiert und verworfen; zwischen den einzelnen Schritten wurde gevortext.

Protokoll für die tryptische Spaltung:

ZEIT	LÖSUNG	ZU BEACHTEN
Kurz	Mit Acetonitril waschen	
1 min	In Acetonitril inkubieren	
5 min	In doppeltem Spaltpuffer inkubieren	
1 min	In Acetonitril inkubieren	
5 min	In doppeltem Spaltpuffer inkubieren	
1 min	In Acetonitril inkubieren	
Kurz	Mit Acetonitril waschen	
30 min bei 60°C	In DTT-Lösung inkubieren	10 μL Lösung mehr verwenden
1 min	In Acetonitril inkubieren	
1 min	In Acetonitril inkubieren	
15 min	In Jodacetamid-Lösung inkubieren	
Kurz	Mit Acetonitril waschen	
5 min	In doppeltem Spaltpuffer inkubieren	
1 min	In Acetonitril inkubieren	
5 min	In doppeltem Spaltpuffer inkubieren	
1 min	In Acetonitril inkubieren	
1 min	In Acetonitril inkubieren	
10 min bei 37°C	Ohne Lösung inkubieren	bis keine Lösung mehr sichtbar ist
4 h - über Nacht bei 37°C:	In einfachem Spaltpuffer mit Trypsin inkubieren	Verhältnis 1:10 (Enzym: Proteinmenge)

Trypsin (25 μg) wurde gelöst in 100 μL 1 mM HCl.

4.3.4.8 Elution der Spaltpeptide

Nach der Spaltung wurde mit der Elution begonnen. Es wurden wiederum 20 μL Lösung für die einzelnen Schritte verwendet. Zwischen jedem Schritt wurde gevortext, alle weiteren Überstände wurden gesammelt und zu einem Peptidgemisch („Spaltnix“) vereinigt.

ZEIT	LÖSUNG
5 min	In Acetonitril inkubieren
10 min	In Acetonitril inkubieren
10 min	In 10%-iger Ameisensäure inkubieren
5 min	In Acetonitril inkubieren
10 min	In 10%-iger Ameisensäure inkubieren
5 min	In Acetonitril inkubieren

4.3.4.9 MALDI-Massenspektrometrie

Die durch den Verdau mit Endoproteinasen generierten Peptide wurden in einem ersten Analyseansatz mit verschiedenen MALDI-Massenspektrometern gemäß der Methode des MALDI-MS-Fingerprintings gemessen. Anwendung fand ein Bruker Reflex III MALDI-TOF-Massenspektrometer, das mit einem 337 nm Stickstofflaser ausgerüstet war sowie das MALDI-TOF-TOF-System Proteomics Analyser 4700 (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt). Mit letzterem wurden auch Tochterionen-MS-Spektren zur Erhaltung von Peptidsequenzinformation angefertigt.

Die Standardprozedur am Bruker Reflex III:

1 μ L der eluierten Peptidmischung wurde auf das Probenziel aufgetragen; nach Trocknen bei Raumtemperatur wurde die Probe mit 1 μ L der Matrixlösung (5 mg α -Cyano-4-hydroxymethylsäure) gelöst in 1 ml Acetonitril/Wasser/TFA; 50:50:0,1; v/v/v) überschichtet und nochmals bei Raumtemperatur getrocknet. Die Ausführung der Massen-Analyse erfolgte im positiven Reflektormodus bei eingeschalteter „Delayed-Extraktion“ mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, einer Reflektorspannung von 22,8 kV und der Deflektion von Massen kleiner als 500 Da. Für die Aufnahme der Spektren wurden die Signale aus 100-150 Laserimpulsen aufsummiert. Zur Datenbanksuche nach dem Fingerprint-Verfahren wurde das Programm „Profound“ von Prowl und der Algorithmus „PepIdent“ (bei <http://www.expasy.ch>) verwendet.

4.3.4.10 Elektrospraymassenspektrometrie (ESI-MS)

Ungespaltene Proteineinheiten wie z.B. die affinitätschromatographisch gereinigten N-terminalen Hyp2p-Fusionsproteine (ca. 43 kDa) sowie das aus ihnen durch Thrombin-Spaltung gewonnene Hyp2p und von ihm abgeleitete Proteinformen (ca. 18 kDa) wurden für eine Massenbestimmung mit einem Quadropol-Instrument (API 3000TM, Sciex-AppliedBiosystems) untersucht. Dazu wurde eine normale ESI-Quelle bei Anlegen der üblichen Flussraten benutzt. Nach Eichung der m/z-Skala über Ammonium-Adduktionen von Polyethylenglykol erfolgte die computergestützte Berechnung des Molekulargewichts aus den m/z-Maxima der Ladungsverteilungsprofile mehrfach geladener Ionen nach [COVEY et al. 1988] und [MANN et al. 1989].

Das Gerät konnte optional mit einer Nano-ESI-Quelle ausgestattet werden, was die Untersuchung von Peptiden und Proteinen auch im Nano-Mol-Bereich (bis oberer Femto-Mol-Bereich) ermöglichte. Gleichzeitig konnte durch die mit Stickstoff beschickbare Kollisionszelle Peptidsequenzinformation durch Aufnahme von Tochterionenspektren gewonnen werden.

4.3.4.11 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die Auftrennung des Peptidgemisches wurde eine Mikro-HPLC eingesetzt. Die eluierenden Peptide wurden manuell gesammelt.

- Vorsäule:** OPTI-GUARD, C8, 1 mm (Wicom)
Trennsäule: MicroCART[®] 150-I, RP 18, Purospher 5 μ m endcapped, 1mm (Merck)
Mobile Phase: Solvent A: 0,1% v/v TFA in H₂O_{dd} Solvent B: 0,0,8 % v/v TFA in Acetonitril
Gradient: Säule war mindestens 30 min mit 5% B äquilibriert

Zeit	Solvent A	Solvent B
[min]	[%]	[%]
0	95	5
60	60	40
85	40	60
90	30	70
95	95	5

- Flußrate:** 60 μ L/min
Detektion: 206 nm und 280 nm an Monitor und Schreiber (KIPP und ZONEN BD40)
Injektion: 95 μ L (Probe wurde in H₂O_{dd} mit 5 % v/v Ameisensäure gelöst)

4.3.5 Aminosäuresequenzanalyse

Zur Aminosäuresequenzanalyse wurden die aus der enzymatischen Fragmentierung resultierenden und durch HPLC aufgetrennten Peptide eingesetzt. Die Aminosäuresequenzanalyse nach dem Prinzip des Edman-Abbaus [LOTTSPREICH und ZORBAS 1998] wurde an einem PROCISE[™]-492A-Gasphasensequenzersystem (PE Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die dafür benötigten Reagenzien und Lösungen wurden von der Firma bezogen. Die nach Durchlaufen des Reaktions- und Konvertierungskompartiment des Sequenzers entstandenen Phenylthiohydantoin (PHT)-Aminosäuren wurden online an einem angeschlossenen HPLC-System (ebenfalls PE Biosystems) bei 269 nm detektiert.

4.3.6 Datenbankrecherche

Die aus der Edman-Sequenzierung erhaltenen Aminosäuresequenzdaten wurden mit den Eintragungen von nicht-redundanten Datenbanken verglichen. Mit Hilfe der Datenbankrecherche konnten die isolierten Proteine über die Homologie zu bereits bekannten und eingetragenen Proteinen identifiziert werden. Dazu wurden die Suchprogramme BLAST and FASTA, beide über die Internetadressen

„<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>“ bzw.

„<http://www2.igh.cnrs.fr/bin/fasta-guess.cgi>“

zugänglich, benutzt. Ebenso wurden Sequenzvergleiche mit dem Modul MS-Edman des Programms ProteinProspector, unter „<http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/ncsfhtml3.2/msedman.htm>“, durchgeführt. Die theoretischen Massen (Mr) und isoelektrischen Punkte (pI) der Proteine wurden mit dem unter dem ExPASy-Server (<http://www.expasy.org>) angebotenen Werkzeug „MW, pI, Titration curves“ ermittelt.

4.3.7 Protein-Blotting

Der Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte in Anlehnung an [ECKERSKORN 1990] in einer „semi dry“-Blotkammer (Semi Dry Electrobloetter™). Für das Normalexperiment und für den Fall einer weiteren proteinchemischen Analyse der transferierten Proteine wurde eine PVDF-Membran (Fluorotrans™) verwendet. Dieser Membrantyp wurde auch für eine Weiterverarbeitung des Blots nach der Western-Technik benutzt. Direkt nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Blotsandwich zusammengesetzt und die Proteine bei Raumtemperatur bei einem konstanten Stromfluss von 1mA/cm² für 3-5 Stunden auf die Membran übertragen.

4.3.8 Proteinfärbung auf Blots

Für eine weitere proteinchemische Analyse wurden die Proteinblots, gemäß [FAZEKAS DE ST GROTH et al. 1963] mit Coomassie Blau gefärbt. Sollte die 2D-Position bestimmter Referenz-Proteine vor dem immunologischen Nachweis bestimmt werden, erfolgte zunächst eine Ponceau S-Färbung. Anschließend wurde das entsprechende Spot-Muster auf der Membran nachgezeichnet und der Blot wieder entfärbt, wie bei [KLIER und LOTTSPEICH 1992] beschrieben.

4.3.9 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis verschiedener Proteine wurde ein Western-Blot, modifiziert nach [HARLOW und LANE 1988] benutzt. Primäre und sekundäre Antikörper (AB) wurden in Verdünnungen eingesetzt, die zuvor optimiert wurden. In einem Standard-Protokoll fanden Verdünnungen des primären AB von 1:5000, 1:10000 und 1:20000 Anwendung. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10000 mit NCP-Puffer verdünnt.

Behandlung des Blots in der Schrittfolge:

	Inkubation in
6 x 5 min	NCP-Puffer
30 min	4% BSA/NCP-Puffer (Absättigung freier Bindungsstellen)
1,5 h - 3 h	Lösung aus 1. AB in 4% BSA/NCP-Puffer
6 x 5 min	NCP-Puffer
2 h	Lösung aus 2. AB in 4% BSA/NCP-Puffer
6 x 5 min	NCP-Puffer
5 min	Für alkalische Phosphatase-Bcjp-Detektion: 0,1 M Na ₂ CO ₃ , pH 10,2
	Färben mit BCIP (0,2 mg/mL) in 0,1 M Na ₂ CO ₃ (Bromochloroindolyl-Phosphat, Fa. Roth)

10 x NCP (2 L)	
Tris	24,23g
NaCl	180,0 g
Tween 20	10,0 mL
NaN ₃	0,4g
pH 7,4 (einstellen mit HCl (verdünnt))	
ad 2000 mL mit H ₂ O _{bi}	

Als an alkalische Phosphatase gekoppelte Zweitantikörper dienen gemäß den Angaben der Hersteller, ein α -Kaninchen-IgG-AK und ein α -Maus-IgG-Ak aus der Ziege sowie ein α -Huhn-IgY-AK aus Kaninchen. Mit dem sekundären AK wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Farbreaktion mit Hilfe von BCIP und NBT entwickelt.

Als zweite Detektionsmethode kam das ECL-Chemolumineszenz-Verfahren (Fa. Amersham, Uppsala) zum Einsatz, bei dem als zweiter Antikörper ein Meerrettich-Peroxidase-AP-Konjugat eingesetzt wurde, welches ein Luminol-Derivat unter Lichtaussendung oxidiert.

4.3.10 Heterologe Expression des GST-getaggten Hyp2p in *E.coli*

Für die Synthese des N-terminal mit GST fusionierten Hyp2p in *E. coli* wurde der Expressionsvektor pGEX-4T2 (Fa. Amersham, Uppsala) verwendet, der die Sequenz für GST und für eine daran fusionierte C-terminale-Thrombin-Spaltstelle besitzt. Mittels PCR wurde die codierende Sequenz des *HYP2* als BamHI-SalI-Fragment synthetisiert, durch DNA-Sequenzanalyse überprüft und in das Plasmid pGEX-4T2 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde danach in den *E. coli*-Stamm JM-105 transformiert. Die Transformanten wurden per Kolonie-Lift und Hybridisierung mit einer *HYP2*-Probe identifiziert. Der Klon JM-105-5, der das GST-Hyp2p-Fusionsprotein exprimiert, wurde in Ampicillin-haltigem LB-Medium kultiviert, mit IPTG induziert und nach 2 h für die Proteinpräparation lysiert. Das lösliche Protein wurde unter Verwendung einer Gluthathion-S-Transferase-Säule affinitätschromatographisch gereinigt. Vom isolierten Protein konnte das N-terminale GST-Protein durch Thrombinspaltung (Protokoll von Amersham, Uppsala) abgespalten werden. Das entstandene Hyp2p wurde per Aminosäuresequenzanalyse überprüft.

4.3.11 Expression von GST-getaggten Hyp2p-Formen in *S. cerevisiae*

Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pYES2 (Fa. Invitrogen) ausgewählt, welches den Gal1-10-Promotor, den μ 2-Replikationsursprung und das auxotrophe Markergen *URA3* trägt. Im ersten Schritt wurde durch Nutzung des linearisierten Vektors pGEX-4T2 als Templat durch PCR die für GST (einschließlich der C-terminalen Thrombin-Sequenz) codierende DNA-Sequenz als HindIII-BamHI-Fragment synthetisiert, durch DNA-Sequenzanalyse überprüft und in das Plasmid pYES2 kloniert. Es resultierte das Plasmid pYES2GST. Für den zweiten Klonierungsschritt wurden die *HYP2*-Gen-Varianten als BamHI-XbaI-Fragmente durch PCR an geeigneten Templaten hergestellt und in den Vektor pYES2GST kloniert. Die Plasmide einiger erhaltener Klone wurden sequenziert und fehlerfreie Plasmide ausgewählt.

Für die Expression der GST-Fusionsproteine wurde der proteasedefiziente Hefestamm

BJ5464 mit den korrekten Plasmiden transformiert. Auf U⁻-Selektivmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle wachsende Kolonien wurden in Kleinkulturen in Raffinose-U⁻-Selektivmedium angezüchtet. Vor Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Fusionsprotein-Expression durch Zugabe von Galaktose-Lösung (Endkonzentration 2%) eingeschaltet. GST-Hyp2p-Proteinformen exprimierende Einzelkulturen wurden durch Proteinextraktion, SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western-Blotting mit einem anti-GST monoklonalem Antikörper (Quiagen, Hilden) identifiziert. Für eine Großkultivierung und Herstellung der Fusionsproteine wurde das Induktionsverfahren der Kleinkulturen auf 500mL-Ansätze übertragen. Die Proteinexpression erfolgte durch Schütteln der Kulturen bei 120 rpm und bei einer Temperatur von 25°C. Nach Überschreiten der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ 2,5 - 3,0) wurde die Kultivierung beendet. Die Zellen wurden in einer CO₂-gekühlten Glasmühle nach ZILLIG (MSK-Zellhomogenisator, Fa. Braun, Melsungen) mit Glasperlen vom Durchmesser 0,4 mm aufgeschlossen. Danach klärten zwei Zentrifugationsschritte (20 min bei 14500 rpm = 25000 x g, SS34-Rotor; 45 min bei 100000 x g = 33170 rpm, Kontron-Rotor 50.2 TL, Ultrazentrifugation) die Lysate. Je nach Einsatzzweck der N-terminalen Fusionsproteine (entweder Reinigung der Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie oder Einsatz des Lysates zur affinitätschromatographischen Findung von Protein-Bindungspartnern (Pull-Down-Experiment)) wurden die Lysate unterschiedlich weiterbehandelt.

Die klassische Affinitätsreinigung erfolgte analog zu den Arbeitsprotokollen der Fa. Amersham (Freiburg, Br.). Puffermischung, Äquilibrierung, Dimensionierung, Anwendung der GST-Sepharose-Beads und Elution erfolgten wie dort beschrieben.

4.3.12 Affinitätsreinigung zur Suche nach von Proteininteraktionspartnern (Pull-Down-Experiment)

Die Expression und Affinitätsreinigung der potentiellen Protein-Komplexe erfolgte aus derselben Hefekultur. Der Zellaufschluß und die Komplexereinigung erfolgten in Anlehnung an die Tandemaffinitäts-Reinigungsmethode für Protein-Komplexe, die auf dem TAP-Tag beruht [RIGAUT et al. 1999]. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer orientierte sich an den Protokollen der Autoren.

Zellaufschlusspuffer nach TAP-Bedingungen (Puffer A):

10 mM HEPES-KOH pH 7,6
10 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
0,5 mM DTT
0,5 mM PMSF
2 mM Benzamidin
Proteinase-Inhibitorcocktail Complete(EDTA-frei)(Roche), 1 Tab. auf 25 mL

Nach Abzentrifugieren der Ausgangskulturen wurde ein Hefe-Zell-Pellet von ca. 13 mL Naßvolumen im gleichen Volumen Zellaufschlusspuffer (4°C) resuspendiert und in eine Homogenisierungsflasche (50 mL) für die Glasmühle umgefüllt. 26 g säuregewaschene Glasperlen wurden zugegeben. Der Aufschluß erfolgte im MSK-Zellhomogenisator in 30 sec-Abschnitten bei Kühlung im CO₂-Strom. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich im Homogenat kein Eis bildete. Der liquide Teil wurde vom Kugelbett abpipettiert. Dem Homogenat wurde 1/9 Volumen einer 2-molaren KCl-Lösung zugesetzt und es wurde wie im Protokoll des vorigen Abschnitts in zwei Schritten zentrifugiert. Der nach den Zentrifugationen erhaltene Überstand wurde 3 h gegen Puffer B dialysiert.

Dialysepuffer (Puffer B):

20 mM	HEPES-KOH pH 7,9
50 mM	KCl
0,2 mM	EDTA pH 8,0
0,5 mM	DTT
20%	Glycerin
0,5 mM	PMSF
2 mM	Benzamidin

2,5 mL suspendierte Glutathion-Sepharose-4B-Beads wurden abzentrifugiert und dreimal mit dem gleichen Volumen Puffer C (Wasch- und Bindungspuffer, s.u.) gewaschen. 8 mL eines Wildtyp-Hefeextraktes wurden 30 min mit den Beads bei 4°C durch langsames Rotieren über Kopf inkubiert. Diese Vorbehandlung des Säulenbettes sollte den Anteil von fehlgebundenen Proteinen in der nachfolgenden Affinitätsreinigung minimieren. Darauf wurden die Beads dreimal mit 10 mL kaltem Puffer C gewaschen und im letzten Waschschrift das Material als Säulenbett in eine Chromatographie-Säule gegeben und sedimentiert. Das Säulenbett wurde mit 16 mL des dialysierten GST-Hyp2p-Hefeextraktes für 2 h bei 4°C zur Affinitätsbindung der GST-Proteinkomplexe inkubiert. Nach Sedimentation des Bettes wurde der Extrakt abgetrennt und das Säulenbett sukzessive 6 mal mit 6 mL Waschpuffer C (4°C) gewaschen. Nachdem die OD_{280nm} der Waschlösung unter 0,005 gefallen war, wurde das Säulenbett dreimal mit 1 mL Elutions-Puffer (10 mM reduziertes Gluthathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) für 10 min bei Raumtemperatur eluiert. Die in den Wasch- und Eluatfraktionen vorhandenen Proteine wurden mittels TCA-Aceton-Behandlung (s.o.) ausgefällt und in 1x Laemmli-SDS-PAGE-Auftragspuffer resolubilisiert. Aliquote wurden durch SDS-PAGE (T=14%) analysiert. Die Proteinbanden wurden durch die Standard-Coomassie-Blue-Färbung sichtbar gemacht. Einzelne Banden wurden aus präparativen Gelen ausgeschnitten und Peptidgemische durch In-Gel-Restriktionsverdau mittels LysC erzeugt. Die Peptidgemische wurden durch MALDI-MS bzw. Mikro-RP-HPLC und EDMAN-Sequenzierung einzelner Spaltpeptide weiter analysiert. Mittels Datenbanksuche mit den gefundenen monoisotopischen Peptidmassen und den kurzen Aminosäuresequenzabschnitten konnte eine Protein-Identifikation einiger Banden erreicht werden.

Bindungs- und Waschpuffer (Puffer C):

20 mM	HEPES-KOH pH 7,6
50 mM	KCl
1 mM	EDTA
0,5 mM	DTT
10%	Glycerin
0,5 mM	PMSF
2 mM	Benzamidin
Proteinase-Inhibitorcocktail Complete(EDTA-frei)(Roche), 1 Tab. auf 100 mL	

4.4 Zellfraktionierung von Hefezellen

4.4.1 Isolierung von Hefe-Zellkernen für die RNA-Extraktion

Die Isolierung von Hefe-Zellkernen geschah an sphäroplastierte Zellen nach der Methode von [WISE 1991b]. Dabei handelt es sich um ein verkürztes Protokoll, das speziell für die Isolation von RNA aus Zellkernen optimiert wurde. Das Protokoll verzichtet dabei auf eine zeitaufwendige und daher die RNA-Degradation fördernde Dichtegradientenzentrifugation.

4.4.2 Isolierung von Mitochondrien

Die Zellfraktionierung zur Gewinnung einer Hefe-Mitochondrienfraktion erfolgte durch Anwendung der Arbeitsvorschrift beschrieben bei [WISE 1991a]. Das Verfahren basiert auf differentieller Zentrifugation und wurde optimiert, um Organellen zu erhalten, mit denen Atmungs-funktionen überprüft werden konnten.

4.5 Überprüfung der Existenz eines mitochondrialen Membranpotentials

Eine Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ erfolgte an isolierten Mitochondrienfraktionen durch Untersuchung der Aufnahme des CY5-Fluoreszenzfarbstoffs 3,3'-Dipropylthiocarbocyanin-Iodid [diS-C₃-(5), Molecular Probes, Eugene, OR] beschrieben bei [WISE 1991a]. Der Farbstoff wird von Mitochondrien in einer Potential-abhängigen Weise aufgenommen. Diese Resorption wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Spectrophotometers der Fa. Perkin-Elmer gemessen. In eine Lösung, die 0,6 M Mannitol, 20 mM Kaliumphosphat (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 0,5M EDTA, 1 mg/L BSA (Fettsäure-frei) und 5 mM Tris-Succinat (und/oder 5 mM Tris-Malat) enthielt, wurden 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mitochondrien eingerührt. Der Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 2 μM . diS-C₃-(5) aus einer 2 mM Stammlösung in DMSO zugesetzt. Alle Komponenten bis auf die mitochondrialen Substrate wurden in einer rührbaren Quarzküvette gemischt und die Emission bei 670 nm (Excitation bei 620 nm) aufgezeichnet. Nachdem sich die Emission der Probe nach Zusatz der Mitochondrien stabilisiert hatte, wurden die Substrate zugesetzt und die Veränderung der Fluoreszenz aufgezeichnet. Der Zusatz von

1mM KCN als mitochondrialer Inhibitor verdeutlichte, dass die Änderungen in der Fluoreszenz ursächlich mit der Generierung eines Membranpotentials zusammenhängen.

4.6 Zell-Proliferationsassay

Der phalgelbe Redoxindikator 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird in lebenden Zellen zu einem dunkelblauen MTT-Formazan reduziert. Die Durchführung der Messung geschah in Anlehnung an das Protokoll bei [HODGSON et al. 1994]. Eine Übernachtskultur wurde mit frischem Medium verdünnt und bis zum Erreichen der frühlogarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Aliquote, die 1×10^8 Zellen/mL enthielten, wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und auf 500 μ L Volumen eingestellt. 50 μ L einer 5 mg/mL MTT-Lösung (Sigma, Deisenhofen) wurden zugegeben und für 2 h bei der entsprechenden Temperatur (25°C oder 37°C) inkubiert. Die Kulturen wurden erneut auf dieselbe Zellzahl (kontrolliert durch OD-Messung bei 600 nm und Zelldichtebestimmung durch Auszählung in einer Neubauer-Kammer) eingestellt und auf das gleiche Volumen eingestellt. Zu jeder Probe wurden 500 μ L 2-Propanol gegeben, welches 0,04 M HCl enthielt. Die Mischung wurde stark geschüttelt, um MTT-Formazan aus den Zellen zu extrahieren. Darauf wurde bei 12000 x g für 2 min zentrifugiert und die Absorption des Überstandes bei 570 nm gegen zellfreie Kontroll-Lösungen gemessen, die in gleicher Weise behandelt worden waren.

4.7 Zelluläre Fluoreszenzfärbungen, Mikroskopie

4.7.1 Anfärbung der Zellkerne in Hefezellen durch DAPI-Färbung

2,5 mL einer Hefekultur am Anfang des logarithmischen Wachstums (OD_{600nm} lag bei ca. 0,6) wurden bei $1500 \times g$ abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden durch Resuspendieren in 10%iger Formaldehydlösung (1 mL) für 5 min fixiert und bei $1500 \times g$ für 1 min abzentrifugiert. Ein Waschschritt der Zellen in 5 mL PBS folgte. Nach Zentrifugation (wie im vorhergehenden Arbeitsschritt) wurden die Zellen in 100 μ L PBS resuspendiert und auf einen Polylysin-behandelten Objektträger auspipettiert. Nach 10 min wurde die überschüssige Flüssigkeit mit ungebundenen Zellen abgesaugt. Die Objektträger mit den befeuchteten Zellen wurden in -20°C kaltes Methanol für 6 min ohne Konvektion getaucht, anschließend für 30 sec in -20°C kaltes Aceton (100%). Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und einmal mit 1 mL PBS an den mit Zellen bedeckten Bereichen gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 500 μ L einer Lösung von 1 μ g/mL DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) in PBS für 5 min bei -70°C im Dunkeln, danach zwei Waschschritte mit jeweils 1 mL PBS für 30 bis 60 sec. Vor der Fluoreszenzmikroskopie (Emission bei 450 bis 488 nm) wurden die Zellen mit einem Tropfen einer Anti-Ausblendungslösung (5%ige Lösung von n-Propylgallat, Sigma Deisenhofen), in Glycerin (100%)) überschichtet.

4.7.2 End-Labeling von DNA-3'-Termini entstanden durch DNA-Strangbrüche: TUNEL

DNA-Strangbrüche in chromosomaler DNA wurde nachgewiesen durch Labeling freier 3'-OH-Termini mit FITC-gelabeltem Deoxyuridin, welches mit Hilfe eines alkaline Phosphatasegekoppelten Anti-Fluorescein-Antikörpers und die Bildung eines Farbstoffpräzipitates mit einem Phosphatase-Substrates detektiert wurde („In Situ Cell Death Detection Kit“; Fa. Roche, Mannheim). Hefezellen wurden mit einer 3,7%igen Formaldehydlösung fixiert und die Zellwände mit Zymolyase verdaut. Die Zellen wurden auf einem Polylysin-beschichteten Objektträger immobilisiert. Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen und in Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X-100; 0,1% Natrium-Citrat) für 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 10 μ L TUNEL-Reaktionsgemisch (200 u/mL terminale Deoxynukleotidyl-Transferase; 10 mM FITC-gelabeltes dUTP; 25 mM Tris-HCl; 200 mM Natrium-Cacodylat; 5 mM CoCl₂; Fa. Roche, Mannheim) für 30 min bei 37°C. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit 50 μ L-Konverter-AP-Lösung (alkaline Phosphatasegelabelter Anti-FITC-Antikörper; Roche, Mannheim) für 30 min bei 37°C inkubiert. Es wurde nochmals dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit einem Anti-Ausblendungs-Reagens (5%ige Lösung von n-Propylgallat, Sigma Deisenhofen, in Glycerin (100%), 1 Tropfen pro Objektträger) behandelt. Die Zellen wurden mit einem Deckglas bedeckt und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

4.7.3 Mikroskopische Untersuchungen

Phasenkontrast- und Hellfeld-Mikroskopie wurde an einem Ortholux-Mikroskop (Leitz) durchgeführt. Konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte an einem Zeiss-IM 35 invertierten Mikroskop, ausgestattet mit einem x100/1,3 Plan-Apochromat-Objektiv, einer Contax 167 MT-Kamera und Fuji-RSP 400 ASA-Farbdiafilmen.

4.7.4 Elektronenmikroskopie

Hefezellen wurden mit phosphat-gepuffertem Glutaraldehyd fixiert. Die Zellwände wurden durch Zymolyase-Verdau entfernt und die Zellen mit Osmium-Tetroxid und Uranylacetat nachfixiert. Danach folgte die Dehydratisierung wie bei [BYERS und GOETSCH 1991] für Zellen der stationären Phase beschrieben. Nach Waschungen mit 100%igem Ethanol wurden die Zellen in Aceton (100%) gewaschen und mit einer 1:1-Mischung aus Aceton und Epon für 30 min, danach mit 100%igem Epon für 20 h infiltriert. Die Zellen wurden in frisches 100%iges Epon überführt und bei 56°C für 48 h inkubiert. Danach erfolgte der Mikrotom-Schnitt und die Anfärbung mit Bleiacetat.

5. Ergebnisse

5.1 Funktionsstudie am Hypusin enthaltenden Protein durch Punktmutanten-Charakterisierung

Im ersten Teil dieser Arbeit war eine phänotypische Charakterisierung eines punktmutierten temperatursensitiven *HYP*-Allels bei heterologer Expression in *Saccharomyces cerevisiae* auf Protein-, RNA- und zellbiologischer Ebene durchzuführen. Voraussetzung dazu war, dass im benutzten Ausgangsstamm beide natürlichen *HYP*-Gene, *HYP1* und *HYP2*, deaktiviert vorliegen, so dass die zu untersuchende punktmutierte Form die einzige Hypp-Quelle in der Zelle darstellt.

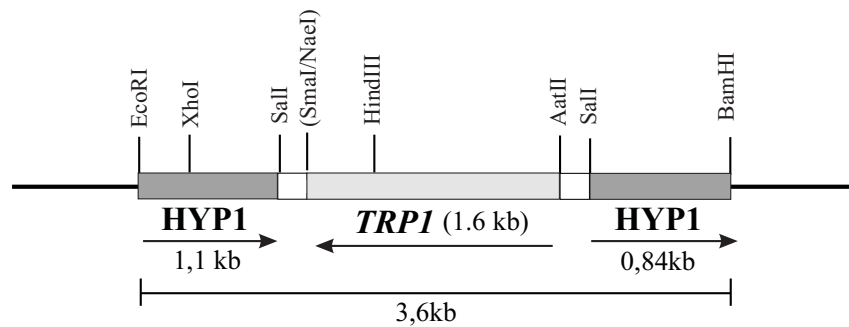
In einer Studie vor dieser Arbeit wurde ein haploider Hefestamm W303-h1h2 (WDH) erzeugt, in dem beide *HYP*-Gene durch Einschub von *in vivo* funktionellen auxotrophen Markern inaktiviert wurden [WÖHL 1994], [OTASEK 1997]. Für die Lebensfähigkeit von Hefezellen muss wenigstens ein funktionelles *HYP*-Gen in der Zelle vorhanden sein. Daher wurde vor dem Knock-Out der genomischen *HYP*-Loci im Stamm W303 deren Funktion durch ein plasmidständiges *HYP2*-Wildtyp-Gen, befindlich auf dem Single-Copy-Plasmid pRSG316-*HYP2* (*cen6*-Ori), komplementiert. Als Abkömmling von pRS316 enthielt dieses Plasmid den Gal1-10-Promotor und einen *URA3*-auxotrophen Marker [SIKORSKI und HIETER 1989]; [MAGDOLEN et al. 1994]. Dieser komplementierte Doppel-Knock-Out-Stamm als Ausgangsmaterial für eine Mutagenesestudie wird im folgenden als WDHyp2-16Gal bezeichnet.

Vor Beginn der Experimente zur Punktmutantencharakterisierung musste die genetische Integrität dieses Ausgangsstammes zunächst überprüft werden. Die Überprüfung umfasste den Beweis der korrekten Doppeldisruption beider *HYP*-Gene im langzeitgelagerten Stamm WDHyp2-16Gal durch Southern-Blot-Analyse und anschließend die Betrachtung der Plasmid-Ausstattung des Stammes.

5.1.1 Genetische Überprüfung der Doppeldisruption beider *HYP*-Gene

Die für die Erzeugung der Doppeldisruption eingesetzten Knock-Out-Kassetten sind in ihrer genetischen Struktur in Abbildung 5.1 dargestellt. Im ersten Schritt wurde das genomische *HYP2*-Gen, befindlich im Plasmid p21LEU2, durch Einklonieren eines 2,22 kb-*LEU2*-Fragments in seine genuine *SalI*-Schnittstelle disruptiert. Das nach *PstI*-Verdau aus diesem Plasmid erhaltene 3,65 kb Fragment diente zur Transformation des diploiden Hefe-Stammes W303-D, was zu einem homologen Rekombinationsereignis führte. Nach Tetradenanalyse des nun auf *LEU*⁻-Medium wachsenden Klons W303-D#6-9 wurde eine Ascospore isoliert, die einer haploiden *hyp2*-Disruptante entsprach [WÖHL 1994]. Das nur unter anaeroben Bedingungen aktive *HYP1*-Gen wurde dann in diesem Stamm durch homologe Rekombination mit dem aus dem Vektor p14RB-TRP isolierten 3,6 kb-*EcoRI*/*BamHI*-Fragment, welches eine Insertion mit einem *TRP1*-Marker besitzt, deaktiviert. Die erfolgreich disruptierten Klone besaßen einen UWL⁺-Phänotyp. Nach diesem Vorgehen liegt entsprechend der Länge der auxotrophen Marker im Doppel-Knock-Out-Stamm für den Genlocus des *HYP2* eine Verlängerung um 2,2 kbp (+*LEU2*)-Marker), für den des *HYP1* eine Verlängerung um ca. 1,6 kbp (+*TRP1*-Marker)

**A. Kasette für Knock-Out von HYP1:
in Vektor p14EB-TRP**



**B. Kasette für Knock-Out von HYP2:
in Vektor p21LEU2**

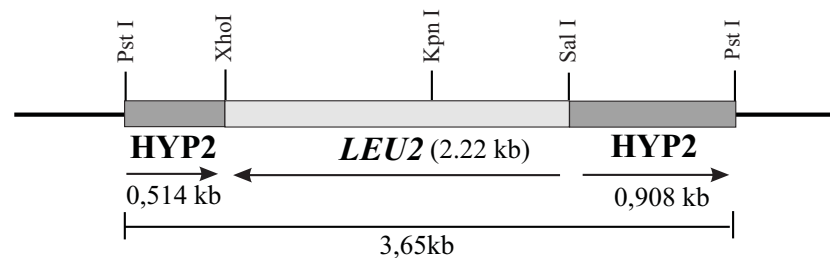


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Knock-Out-Kassetten, die für die Disruption beider in *Saccharomyces cerevisiae* vorkommenden *HYP*-Gene, *HYP1* und *HYP2*, eingesetzt wurden.

A.: In das *HYP1*-Gen wurde durch die im Gen nur einmal vorkommende *Sal I*-Schnittstelle zunächst ein Oligo-Linker ligiert, in dessen *SmaI*- und *AatII*-Schnittstellen das 1,6 kbp große *TRP1*-Marker-Gen eingebracht wurde. Daraus resultierte ein 3,6 kbp *EcoRI*/*BamHI*-Fragment im Knock-Out-Vektor p14RB-TRP, das für die homologe Rekombination des Stammes W303# 6-9D, der bereits ein mit *LEU2* disruptiertes *HYP2*-Gen enthielt, eingesetzt wurde.

B.: Das *HYP2*-Gen wurde durch Einklonieren eines 2,22 kb-Fragments, welches den funktionellen *LEU2*-Marker enthielt, deaktiviert.

vor. Zur Kontrolle wurden Southern-Blots des Stammes WDHyp2-16Gal und des haploiden Kontrollstammes W303-1MATa angefertigt.

Genomische DNA wurde isoliert und jeweils mit drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen, *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, gespalten. Jeweils gleiche Mengen der verdauten DNA wurden auf ein Agarosegel geladen und die Nukleinsäurefragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ethidiumbromid gefärbte Gel (Abbildung 5.2A) belegt, dass jeweils gleiche Mengen gespaltener genomischer DNA der beiden Hefestämme für die Analyse eingesetzt wurden. Die unterschiedlichen Fragmentmuster der drei verwendeten Endonukleasen zeigen eine zunehmende Fragmentierung des Hefegenoms von *BamHI* über *HindIII* nach *EcoRI*. Die Nukleinsäure-Banden wurden darauf durch Tank-Blotting auf eine positiv geladenen Nylon-Membran übertragen.

Zur Sichtbarmachung der Hybridisierungsbanden im Southern-Verfahren wurde eine nicht-radioaktive Detektionsmethode auf Chemolumineszenzbasis gewählt (siehe Materialien und Methoden, Abschnitt 4.2.13, Seite 33).

Der durch UV-Bestrahlung vernetzte Blot wurde im ersten Schritt mit einer Probe gegen die

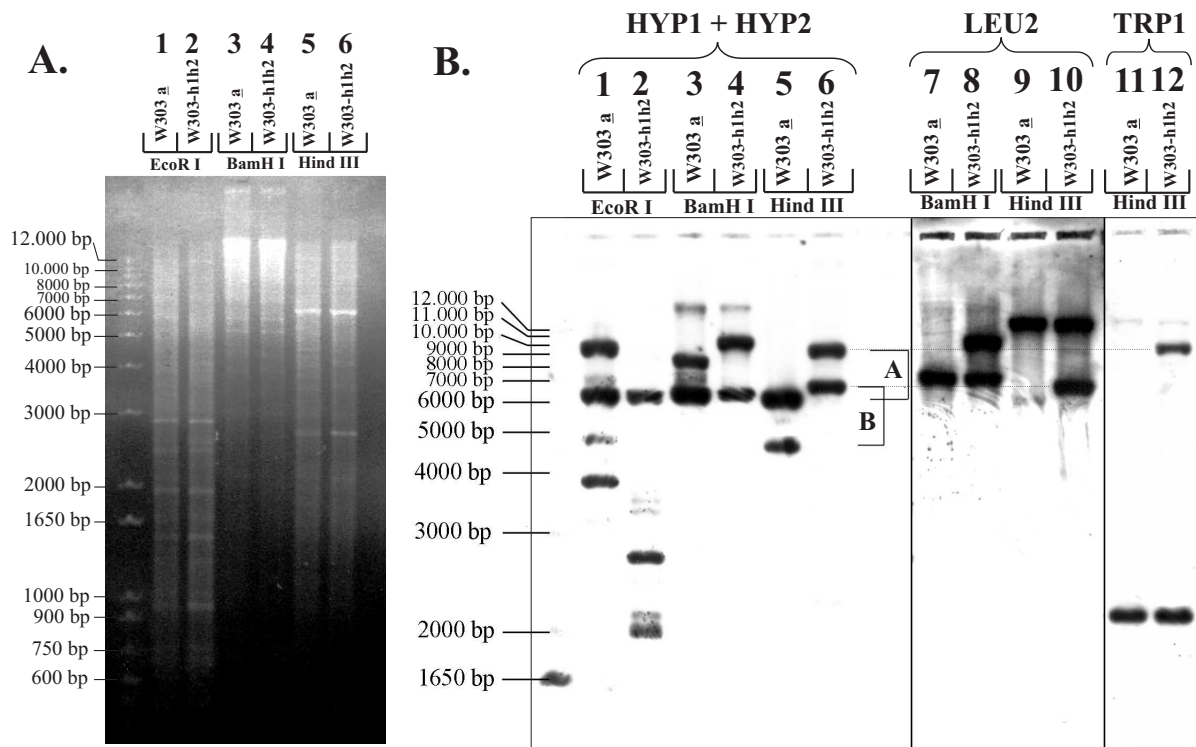


Abbildung 5.2: Southern-Blot-Analyse des Ausgangsstammes WDHyp2-16Gal (hier als WDH-h1h2 bezeichnet) als haploide *hyp2::LEU2*- und *hyp1::TRP1*-Transformante.

A.: Darstellung des Agarosegels für den Tank-Blot. Aufgetragen ist die Doppeldisruptante (Spuren 2, 4, 6) im Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm W303-1MATa (Spuren 1, 3, 5). Die genomische DNA wurde zuvor mit EcoRI (Spuren 1 u. 2), BamHI (Spuren 3 u. 4) und HindIII (Spuren 5 u. 6) enzymat. gespalten. 10 µg DNA wurden pro Spur auf ein 0,8%iges Agarosegel geladen, die Elektrophorese bei 20V über Nacht durchgeführt. Banden wurden mit Ethidiumbromid im Gel sichtbar gemacht. Die Fragmentgrößen sind in bp angegeben.

B.: Hybridisierung desselben Blots mit drei verschiedenen Proben nacheinander: links *HYP*-spezifische Probe (erkennt *HYP1* und *HYP2* aufgrund hoher Homologie), daneben: Probe gegen *LEU2* (Mitte) und gegen *TRP1* (rechts). Durch Klammern an den nach Hybridisierung mit der *HYP*-Probe erhaltenen Banden ist die erwartete Massenerhöhung der zum *HYP1*-Gen-(Klammer A, ca. 1700 bp) und zum *HYP2*-Gen (Klammer B, ca. 2300 bp) gehörenden Fragmente im HindIII-Verdau angedeutet.

codierende Sequenz des *HYP2*-Gens hybridisiert. Aufgrund des hohen Identitätsgrades beider codierender *HYP*-Gen-Bereiche von 91% hybridisierte diese Sonde mit beiden *HYP*-Genen im Blot, was das Auftreten einer Doppelbande impliziert. Die *HYP2*-Sonden-Hybridisierung ist im linken Teil von Abbildung 5.2B dargestellt. Spur 5 zeigt die Hybridisierungssignale der *HYP*-Gene in der Wildtyp-Kontrolle, Spur 6 die der Doppeldisruptante. Es wurde deutlich, dass ein Verdau der genomischen DNA mit HindIII das günstigste Fragmentmuster für die Detektion der Veränderungen in den *HYP*-Loci aufweist. Im Gegensatz zum EcoRI-Muster wurden diese unfragmentiert erhalten, was die Planung des Fragmentierungsmusters und somit die Wahl von Hind III als Endonuklease voll bestätigte. In Spur 6 ist ein Massenshift beider Banden in der Doppeldisruptante erkennbar, wobei im gesamten Blot keine neuen mit der *HYP2*-Probe hybridisierenden Banden zu detektieren waren.

In den Spuren 9 und 10 ist nach Entfernung der *HYP2*-Signale die Hybridisierung desselben Blots mit einer *LEU2*-spezifischen Sonde und in den Spuren 11 und 12 die entsprechenden Signale nach einer dritten Hybridisierung mit einer *TRP1*-Sonde im Hind III-Fragmentspektrum dargestellt. Beide Hybridisierungen zeigen jeweils zwei Banden, die in der Kontrolle und im

Doppel-Knock-Out völlig identisch auftreten (*LEU2*-Signale bei 12.500 bp, *TRP1*-Signale bei 2150 bp). Es sind die nativen Loci der *LEU2*- und *TRP1*-Gene, die im Stamm W303-1MATA bereits inaktiviert sind. Zusätzlich tritt in Spur 10 ein *LEU2*-Fragment bei 7600 bp auf, welches dasselbe Molekulargewicht wie das untere Fragment in Spur 6 aufweist. Analog zeigte das in Spur 12 detektierte zusätzliche *TRP1*-Fragment dieselbe Wanderungsdistanz wie das obere *HYP*-Fragment in Spur 6 auf. Dies deutet darauf hin, dass in Spur 6 das schwerere *HYP*-Signal bei 9500 bp die *TRP1*-Sequenz und das leichtere Fragment bei 6600 bp die *LEU2*-Sequenz enthält, was das in Abbildung 5.1 gezeichnete Bild der gestalteten Knock-Out-Kassetten voll bestätigt. Ebenso entsprechen die Größendifferenzen zwischen dem leichteren Fragment in Spur 5 und dem *LEU2*-Fragment in Spur 6 von ca. 2300 bp sowie die Differenz zwischen dem schwereren *HYP2*-Fragment des Wildtyps und dem oberen *TRP1*-Fragment in der Disruptanten von ca. 1700 bp den nach den Marker-Einfügungen zu erwartenden Größenzuwächsen beider *HYP*-Gene (vgl. Abbildung 5.1). In beiden Hybridisierungen gegen Marker-Gene blieben weitere deutliche Signale aus, welche die gleiche Intensität wie die beschriebenen aufwiesen.

Dies zeigte, dass im doppelt disruptierten Ausgangsstamm der *HYP2*-Genlocus ein *LEU2*-Gen und der *HYP1*-Genlocus ein *TRP1*-Gen enthielt und beide *HYP*-Gene so erfolgreich ausgeschaltet vorliegen. Ferner waren beide Rekombinationsereignisse homolog, da das Auftreten der Markerbanden und die in ihrer Basenlänge erweiterten *HYP*-Fragmente bei gleichen Fragmentgrößen erfolgte. Da keine zusätzlichen *TRP1*- und *LEU2*-Signale als die zu erwartenden im Fragmentspektrum des Ausgangsstamms detektiert wurden, konnte man ausschließen, dass andere Genloci als die beabsichtigten von den Eingriffen in das Genom betroffen waren. Das Funktionieren der eingebrachten auxotrophen Marker wurde durch den [Leu/Trp]⁺-Phänotyp des Ausgangsstammes, ausgedrückt durch seine Fähigkeit zum Wachstum in einem Selektivmedium ohne Leu und Trp, dokumentiert.

5.1.2 Überprüfung von Art und Eigenschaften der Plasmidausstattung

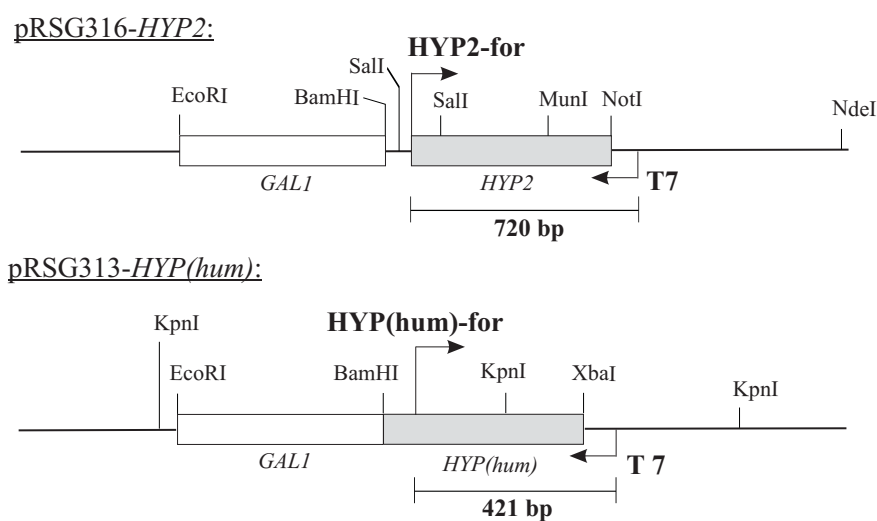


Abbildung 5.3: Schema der Orientierung von zwei spezifischen Primerpaaren mit jeweils demselben Reversed-Primer T7 und den beiden Forward-Primern *HYP2*-for und *HYP(hum)*-for, zum gleichzeitigen Einsatz im Hefekolonie-PCR-Experiment zur Unterscheidung der Plasmide pRSG316-*HYP2* und pRSG313-*HYP(hum)*.

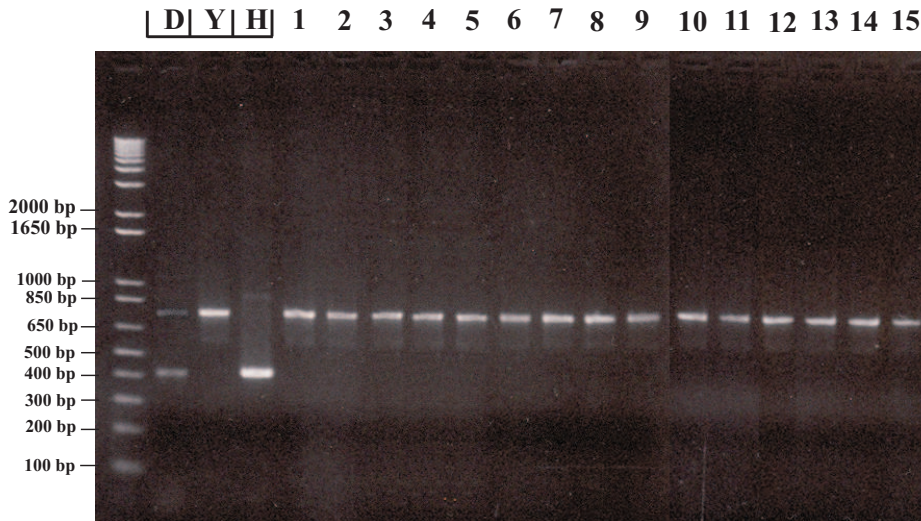


Abbildung 5.4: Kolonie-PCR-Experiment zur Plasmid-Überprüfung im Stamm WDHyp2-16Gal. Eine PCR-Reaktion enthielt 10 μ L der entsprechenden Hefe-Suspension, 20 pmol von jedem der vier Primer sowie die restlichen benötigten PCR-Komponenten. Die PCR beinhaltete 24 Zyklen. Nach Beendigung der Reaktion wurden 3 μ L des gebildeten Produktes auf ein 2%iges Agarosegel gegeben. Als Positivkontrollen wurden als Template in der PCR die linearisierten Plasmide pRSG316-*HYP2* (Spur Y), pRSG313-*HYP(hum)* (Spur H), bzw. eine Mischung aus beiden (Spur D) eingesetzt. Es wurden ein Signal bei 421 bp (pRSG313-*HYP(hum)*) oder 720 bp (pRSG316-*HYP2*) bzw. zwei Signale bei beiden Größen erwartet.

Auch das im Stamm enthaltene pRSG316-*HYP2*-Plasmid wurde zunächst durch ein Kolonie-PCR-Experiment überprüft, um dessen Existenz sicherzustellen, eine mutationsbedingte Veränderung des *HYP2*-Gen oder des auxotrophen Markergens auszuschließen und seine Eigenschaft als einzige funktionelle *HYP*-Gen-Quelle in diesem Hefesystem zu beweisen.

Der experimentelle Ansatz hierzu enthielt im ersten Schritt eine Analyse durch direkte Kolonie-PCR mit vier verschiedenen Primern (siehe Schema in Abbildung 5.3). Die beiden Primerpaare amplifizierten hierbei spezifisch zwei DNA-Sequenzen aus den zwei potentiell im Stamm vorhandenen Single-Copy-Plasmiden mit unterschiedlichen auxotrophen Markern, pRSG316 (*URA3*, Primerpaar *HYP2*-for/T7) und pRSG313 (*HIS3*, Primerpaar *HYP(hum)*-for/T7). Die Plasmid-spezifischen Fragmente wiesen eine Massendifferenz von ca. 300 bp auf. Dies ermöglichte die Unterscheidung der beiden Plasmide und gleichzeitig deren Nachweis. Dazu wurde der Ausgangsstamm auf einem UWL⁻-Selektivmedium mit einer Mischung aus Galaktose und Raffinose als Kohlenstoffquellen ausplattiert, da der Gal-Promotor die Expression der *HYP*-Genformen, welche das Überleben der Zellen sicherten, sowohl im Plasmid pRSG316GAL-*HYP2* als auch im potentiell vorhandenen pRSG313GAL-*HYP(hum)*-Plasmid kontrollierte.

Abbildung 5.4 zeigt das Ergebnis des Kolonie-PCR-Experimentes mit 15 überprüften Einzelkolonien. Dabei wurde nach der PCR mit beiden Primerpaaren (Spuren 1-15) immer nur ein DNA-Fragment der Länge von 720 bp amplifiziert. Dies entspricht dem aus Abbildung 5.3 im oberen Teil skizzierten zu erwartenden DNA-Fragment, welches das *HYP2*-Gen enthielt und nur mit pRSG316-*HYP2* als Templat-Strang entstanden sein konnte. Eine Bande bei 421 bp wurde im Vergleich zur Positivkontrolle in Spur D nicht amplifiziert, in der eine Mischung des pRSG316-*HYP2*- und des pRSG313-*HYP(hum)*-Plasmids, bzw. zur Kontrolle in Spur H das

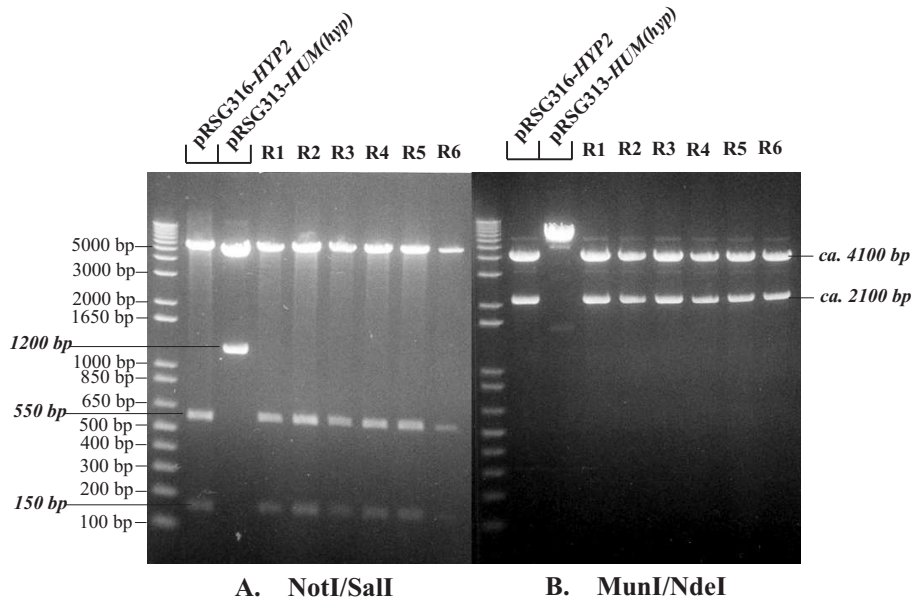


Abbildung 5.6: Restriktionsendonuklease-Verdaue von aus WDHyp2-16Gal reisolierten Plasmiden.

reine Plasmid pRSG313-*HYP(hum)* als Templat eingesetzt wurde.

Dieses 421 bp-Fragment enthält, wie in Abbildung 5.3 dargestellt, die um ca. 100 bp vom N-Terminus her verkürzte Sequenz des humanen *HYP*-Gens und wurde durch Bindung der beiden spezifischen Primer *HYP(hum)*-for und T7 an die entsprechende Sequenz im pRSG313-Plasmid amplifiziert. Dieses war in den 15 überprüften Kolonien jedoch nicht vorhanden.

Aus drei Einzelkolonien wurden Plasmid-Rescue-Experimente durchgeführt und je Kolonie zwei Plasmid-Mini-Präps angefertigt. Diese sechs Plasmid-Präparationen wurden jeweils zwei unterschiedlichen Restriktionsendonuklease-Verdauen unterzogen: a) mit den Endonukleasen Not I/Sal I; b) mit Mun I/Nde I.

Die Wahl der Enzyme ergab sich aus der Restriktionschnittstellen-Karte des pRSG316-Plasmids (siehe Abbildung 5.5). Die aufgetrennten Verdauemuster sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Hierbei wurden aus allen getesteten Plasmiden mit den Enzymen Not I/Sal I (Abb. 5.6A.) zwei charakteristische Fragmente von 150 bp und 550 bp gebildet, die aus dem *HYP2*-Insert stammten. (Dieses beinhaltete eine endogene Sal I-Schnittstelle an Position 2561.) Mit den endonukleasen Mun I/Nde I erfolgte die Restriktion des pRSG316-Plasmids in Fragmente der Längen 1922 bp und 4125 bp. Diese Fragmentgrößen sind aus der Plasmidkarte von pRSG316-*HYP2* ableitbar. Bei drei der aus dem Rescue erhaltenen Plasmidfraktionen

wurde die DNA-Sequenz, welche das GAL-Promotor-*Hyp2*-Fragment enthielt, durch Plasmidsequenzierung überprüft und die Sequenzen nach Vergleich mit der zu erwartenden pRSG316-

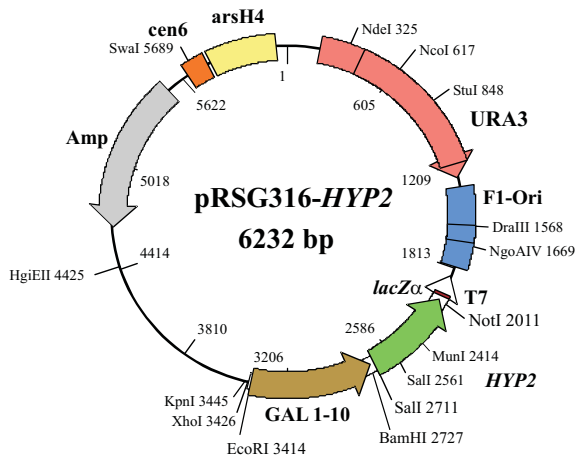


Abbildung 5.5: Übersichtsschema des Plasmids pRSG316-*HYP2(URA3)*, welches das Wildtypgen *HYP2* trägt. Mit den Primern *HYP2*-for und T7(rev) kann ein DNA-Fragment der Länge 720 bp amplifiziert werden. Die Ergebnisse der Verdaue mit den Enzymen NotI/SalI, bzw. NdeI/MunI können anhand der einmal vorkommenden Schnittstellen vorhergesagt werden.

HYP2-Sequenz für korrekt befunden.

Desweiteren zeigten 200 Einzelkolonien des Ausgangsstammes nach Replica-Plattierung auf ein UHWL⁻-Medium und viertägiger Inkubation bei 30°C kein Wachstum und somit keinen UHWL⁺-Phänotyp. Dies wies auf das Fehlen einer weiteren funktionellen *HYP*-Gen-Quelle, die unabhängig vom GAL-Promotor exprimiert wurde, im Ausgangsstamm hin.

Alle Beobachtungen gaben berechtigten Anlass zur Annahme, dass zu diesem Zeitpunkt der Stammgenerierung der Ausgangsstamm das pRSG316-*HYP2*-Plasmid enthielt, und dass von diesem Plasmid funktionsfähiges Hyp2p exprimiert werden konnte, abgeleitet aus der Tatsache, dass die Sequenz des *GAL1-10-HYP2* im Plasmid korrekt war und es überhaupt zum Koloniewachstum kam. Desweiteren funktionierte die Selektion gegen den *URA3*-Marker im Plasmid (Wachstum auf UWL⁻-Medium). Im Stamm war noch kein pRSG313-*HIS3*-Plasmid enthalten, was das Fehlen der 421 bp-Bande und der fehlende UHWL⁻-Phänotyp zeigten. Auch im Plasmidrescue wurde kein pRS313-Plasmid isoliert. Daraus folgte, dass pRSG316-*HYP2* die einzige funktionsfähige *HYP*-Gen-Quelle der Zelle darstellte. Der Ausgangsstamm konnte demnach für die folgende Charakterisierung von *HYP*-Punkt-Mutanten eingesetzt werden.

5.1.3 Eine Punktmutagenese-Studie führt zur temperatursensitiven Mutante G₈₁V

Die humane Hypp1-Proteinsequenz wurde für eine Punktmutagenesestudie ausgewählt, in der einzelne phylogenetisch konservierte Aminosäurereste an unterschiedlichen Stellen der Proteinsequenz ausgetauscht wurden [OTASEK 1997]. Um die funktionellen Auswirkungen der Punktmutationen im *HYP* zu testen, wurden die mutierten Allele *X* in das *HIS3*-enthaltende Single-Copy-Plasmid pRSG313 kloniert [SIKORSKI und HIETER 1989].

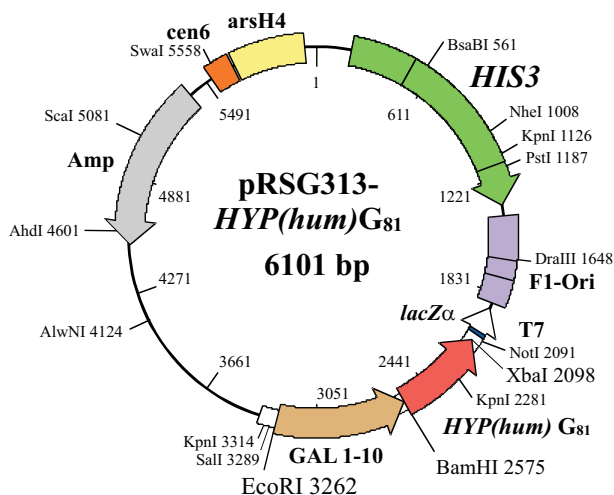


Abbildung 5.7: Übersichtsschema des E.Coli-Hefe-Shuttle-Plasmids pRSG313-*X*, wobei *X* hier durch die Punktmutante G₈₁V des humanen *HYP*s(eIF5A1) repräsentiert ist. Das mutierte Gen *HYP(hum)* besitzt GAL-1-10 als Promotor. Überprüfung des Vektors kann durch Restriktion mit KpnI erfolgen, wobei drei Fragmente charakteristischer Länge gebildet werden sollten.

Wie aus Abbildung 5.7 ersichtlich, standen die so entstehenden pRSG313-*X*-Plasmide unter der Kontrolle des induzierbaren GAL-1-10-Promotors. Aufgrund ihres Replikations-Ursprunges cen6, an dem das Centromer der Zelle angreift, war sichergestellt, dass nur eine Kopie des Plasmids pro Filial-Zelle weitergegeben wurde. So sollte eine moderate Hypp-

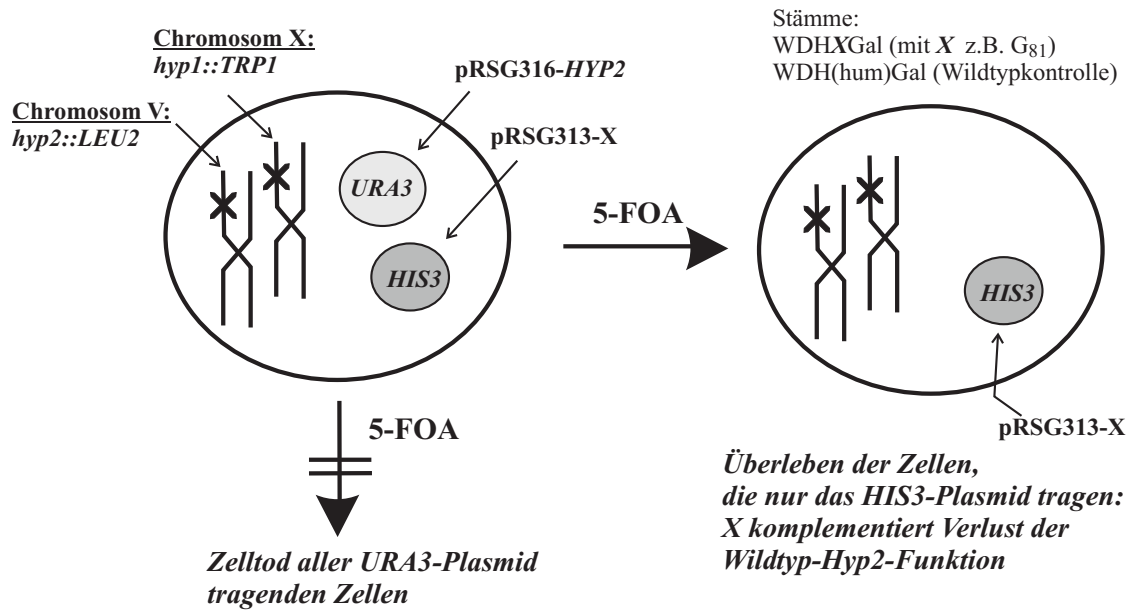


Abbildung 5.8: Schematische Darstellung der 5-FOA-Screen-Technik. Beide genomischen Gene *HYP1* und *HYP2* im haploiden Chromosomensatz sind disruptiert durch den Einschub von *LEU2* bzw. *TRP1*. Der Ausgangs-Hefe-Stamm besitzt ein Wildtyp-*Hyp2*-Gen auf dem Plasmid pRS316-*Hyp2* (*URA3*-Marker) und ein pRS313-Plasmid (*HIS3*-Marker), welches das mutierte *HYP*-Allel trägt, dessen Eigenschaften untersucht werden sollen. Ausplattierung auf 5-FOA-Platten leitet die negative Selektion gegen *URA3* ein, wobei nur das mutierte *HYP*-Gen *X* das Überleben von Zellen sicherstellt, die dann Kolonien bilden können.

Kopienzahl nahe der Wildtypexpressionsrate in der Zelle garantiert sein und eine Übertitrierung der Enzyme zur Hypusinsynthese vermieden werden. Die pRS313-Plasmide wurden im nächsten Schritt für die Transformation des Stammes WDHyp2-16Gal eingesetzt. Die Zellen wurden auf Medium ausplattiert, das Glukose als Kohlenstoffquelle enthielt und sowohl defizient an Leucin, Tryptophan als auch an Uracil und Histidin war, um gegen beide nun in der Zelle vorhandenen pRS-Plasmide, pRS316-*Hyp2* und pRS313-*X* zu selektieren. Das darauffolgende 5-FOA-Screening gewährleistete, dass nur Zellen überlebten, die das *URA3*-Plasmid verloren hatten (siehe Abbildung 5.8).

Mit 5-FOA wurde gegen den Ura⁺-Phänotyp des pRS316-Plasmids selektiert. Ura⁺-Zellen metabolisieren durch das Enzym Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, codiert durch das Gen *URA3* als auxotrophischer Marker, die 5-Fluororotsäure (5-FOA) zum hochmutagenen und damit für die Zelle toxischen 5-Fluorouracil (F-UMP), welches Auswirkungen auf den Nukleinsäuremetabolismus hat. 5-FOA selbst wirkt nicht toxisch. Zellen, die das Plasmid pRS316-*Hyp2* verlieren, metabolisierten FOA nicht länger. Die essentielle *HYP*-Funktion wurde von der in der Zelle verbliebenen pRS313GAL-Version (mutierte Form *X* des humanen oder hefeeigenen *HYP*-Gens) übernommen. Zur Koloniebildung kam es nur dann, wenn dabei das Allel *X* eine funktionsfähige Variante darstellte.

Ob wirklich die *GALI*-kontrollierte Expression der *HYP*-Variante die *HYP*-Doppeldisruption komplementiert hatte, wurde durch Replika-Plattierung von Klonen auf Glukose-haltigem Medium getestet. Da Glukose den GAL-Promotors reprimiert, blieb bei positiver Komplementierung das Wachstum aus.

Die Neigung zur Retention des pRS313-Plasmids nach Kultivierung des noch beide Plas-

miden Stammes W303-h1h2-*HYP2/URA3-X/HIS3* konnte durch Plattierungsexperimente und Auszählung der Kolonien bestimmt werden. So ergaben sich bereits hier Hinweise darauf, wie gut ein mutiertes Allel *X* die *HYP*-Funktion übernehmen konnte. Beobachtet wurde, dass die Hefezellen das Wildtyp-*URA3*-Plasmid weniger häufig verloren. Wenn das pRS-Plasmid nicht mehr detektiert werden konnte, war ersichtlich, dass das in ihm vorhandene *HYP*-Allel *X* nicht funktionell war.

Im Rahmen der Mutagenesestudie durch FOA-Screen wurden unter anderem die konservierten Aminosäurereste V₈₁ und P₈₂ im *HYP(hum)* punktmutiert [YOUNG 1998]. Eine Übersicht über konservierte Aminosäurereste im Vergleich der Proteinsequenz des hefeeigenen Hyp2p mit humanem Hypp zeigt Abbildung 5.9 A. Die Abbildung enthält auch Information über die Zweidomänenstruktur des Proteins, die aus der Röntgenstruktur des eIF-5A aus *Methanococcus jannashii* [KIM et al. 1998] abgeleitet wurde (vgl. Abbildung 5.9B).

Die Domänenstruktur wurde auf die Hefe-Hyp2p- und die humane Hypp-Sequenz übertragen. Dabei befindet sich der hypusinylierte Lysinrest an der äußersten Stelle eines langgestreckten Turns in gut zugänglicher, exponierter Lage. Die C-terminale Domäne hat starke Ähnlichkeit mit dem RNA-Bindungsmotiv einer SH3-Domäne, wie sie z.B. im Kälteschockprotein CspA aus *E. coli* vorkommt. Die punktmutierte Region um den Rest V₈₁ liegt am Anfang der flexiblen Übergangsregion zwischen den beiden Domänen.

Durch einen systematischen Ansatz waren alle in Hyp(hum)p vorkommenden Prolinreste durch Glycin ersetzt worden [OTASEK, vorl. Doktorarbeit 1997]. Dabei erwies sich nach drei unabhängig durchgeführten FOA-Screens für jede einzelne Prolin-Mutante nur G₈₂P als lethal in *Saccharomyces cerevisiae*. Die Mutagenese des N-terminal benachbarten Valins zu Leucin (L₈₁) führte zu lebensfähigen Klonen, die eine mäßige Temperatursensitivität bei Temperaturerhöhung von 25°C auf 39°C zeigten. Punktmutierung des Restes V₈₁ ergab zwei weitere stärker temperatursensitive Mutanten M₈₁ und G₈₁, wobei der Effekt bei G₈₁ am ausgeprägtesten war [YOUNG 1998]. Das Wachstum bei 25°C war dabei abgeschwächt, aber deutlich vorhanden. Die Punktmutante G₈₁V wurde für eine genauere Charakterisierung ausgewählt, die zum Gegenstand eines Teils dieser Arbeit wurde.

5.1.3.1 Regenerierung der Punktmutante G₈₁V durch FOA-Screening

Die Punktmutante G₈₁V wurde für diese Arbeit neu generiert. Dazu wurde zunächst das Plasmid pRSG313-[G₈₁] amplifiziert und sein GAL1-10-[G₈₁]-Insert sequenziert, um die Punktmutation zu beweisen. Nachdem es für korrekt befunden war, wurde es in den Stamm WDHyp2-16Gal transformiert und auf HWL⁻-Glukose-Medium plattiert, was den neuen Hefestamm W303-h1h2-[*HYP2/URA3*][G₈₁-*HYP(hum)/HIS3*] erzeugte. Da das *URA3*-Plasmid pRSG316 seltener verloren ging, konnte auf eine Selektion gegen den U⁺-Phänotyp verzichtet werden. Gleichzeitig wurde das Wildtyp-*HYP(hum)* durch Gebrauch der Restriktionsenzyme BamHI/XbaI in den pRSG313-Vektor kloniert und das korrekt sequenzierte Plasmid ebenfalls für Transformation des Ausgangsstammes eingesetzt (führte zu W303-h1h2-[*HYP2/URA3*][WT-*HYP(hum)/HIS3*]). Vor dem folgenden FOA-Screen wurden die hierfür eingesetzten Kolonien durch die in Abschnitt 5.1.2 beschriebene Kolonie-PCR-Methode überprüft. Wie Abbil-

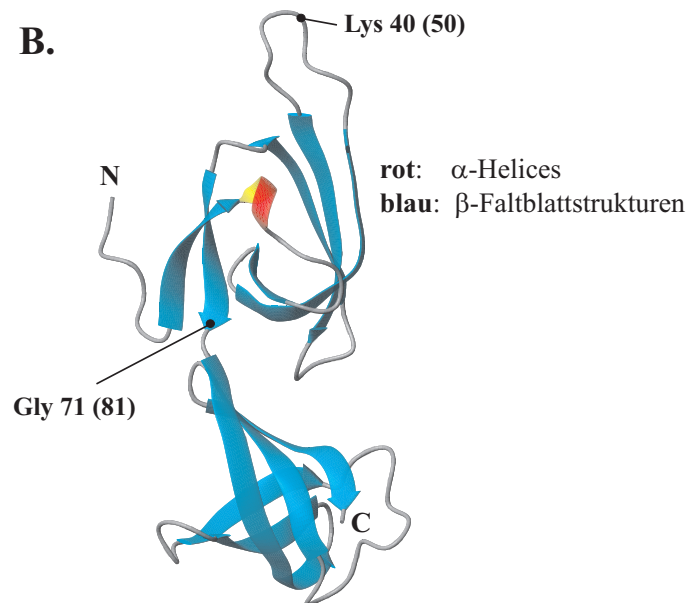
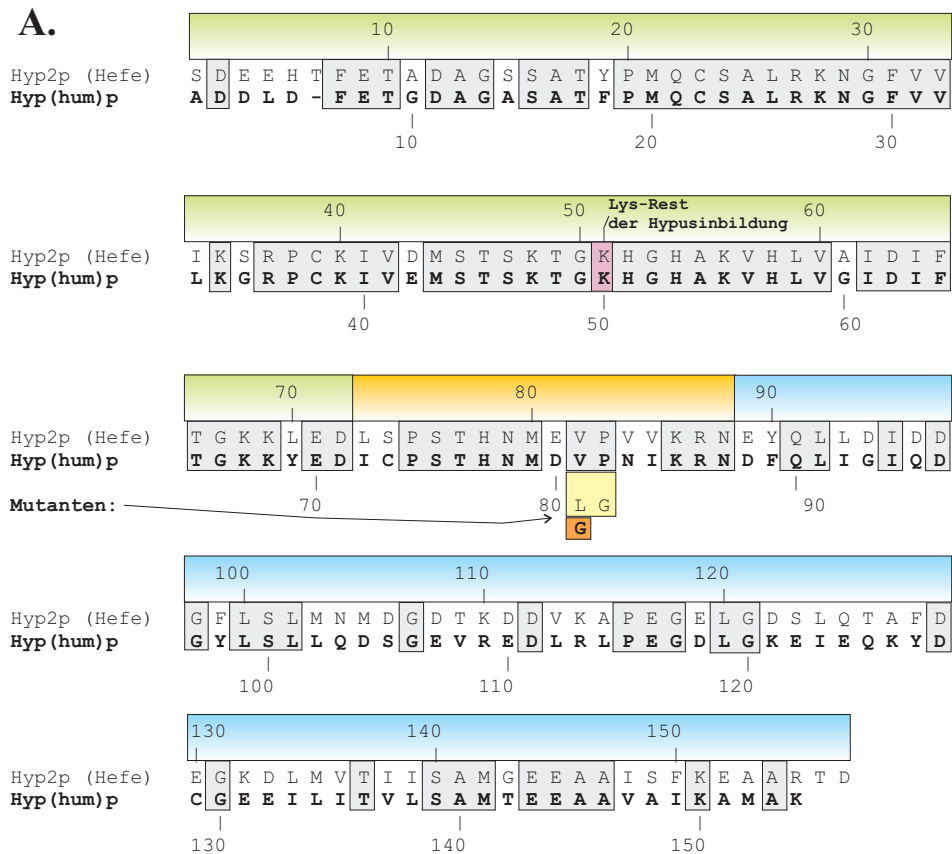


Abbildung 5.9: Struktur des Hypps als Ausgangspunkt der Mutagenese. **A.:** Vergleich der Proteinsequenzen von Hyp2p versus humanem Hyp und Lage der Mutationsstellen an den Resten 81, bzw. 82. Schattierte Kästen um Originalsequenzbereiche kennzeichnen identische Bereiche zwischen beiden Proteinen und stellen evolutiv konservierte Reste dar. Der posttranslational zu Hypusin modifizierte Lysin-Rest K₅₁ (bzw K₅₀ im humanen Protein) ist violett unterlegt. In der Proteinsequenz aus *Methanococcus Jannashii* liegt der Hypusinrest an Position 40. Durch die über den Sequenzen angeordneten farbigen Balken ist die Domänenstruktur des Hypps nach der Röntgen-Kristallstruktur-Analyse in *Methanococcus jannashii* angedeutet. Es handelt sich um ein Zweidomänen-Protein, beide Domänen sind durch eine flexible Übergangssequenz verbunden. Die untersuchte Mutante G₈₁V (human), bzw. G₈₂V (Hefe) liegt in diesem Übergangsbereich.

B.: Darstellung der Röntgenstruktur des Hypps aus *Methanococcus jannashii*. Das Protein besitzt eine Zweidomänenstruktur. Die N-terminale Domäne enthält den Hypusinrest, der exponiert am Extrempunkt eines Turns liegt. Die C-terminale Domäne besitzt Motivähnlichkeit zu einer SH3-Domäne, bestehend aus einer fünfsträngigen β -Fass-Struktur. Die Mutationsstelle G₈₁ liegt am Anfang der flexiblen Übergangsregion.

dung 5.11 B. darstellt, zeigten die meisten Doppeltransformanten-Klone wie erwartet beide Fragment-Signale bei 421 bp und 720 bp. Drei der Einzelkolonien, die das Doppelbandenmuster deutlich aufwiesen, wurden in drei unabhängigen FOA-Selektionen eingesetzt.

Kleinkulturen der drei Einzelklone wurden in $UHWL^-$ -Medium angezüchtet. Bei Erreichen einer OD_{600} von ca. 0,8 wurde die Inkubation gestoppt und die optische Dichte aller drei Kulturen exakt auf den gleichen Wert eingestellt und verdünnt. Ca. 1000 Zellen in 80 μ L Medium wurden auf 5-FOA-HWL⁻-SSM-Nährplatten ausgebracht und 6 Tage bei 25°C inkubiert. Auf identische Weise wurde mit drei Kolonien verfahren, die nach Transformation des Wildtyp-*HYP(hum)*-Vektors entstanden. Abbildung 5.11A zeigt eine Übersicht der erhaltenen Koloniezahlen der Mutante G_{81} nach der 5-FOA-Selektion im Vergleich zum Wildtyp. Dabei ergaben sich in drei unabhängig durchgeführten Ansätzen jeweils ähnliche Koloniezahl-Verhältnisse (Wildtyp:Mutante = 3:1). Schon dieses Ergebnis zeigte, dass die Punktmutation einen klaren Abschwächungseffekt auf die *HYP*-Funktion hatte.

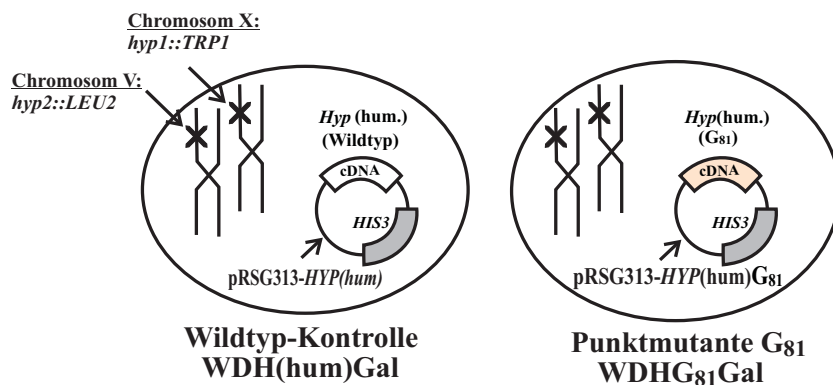


Abbildung 5.10: Schema des durch FOA-Selektion erhaltenen differentiellen Hefe-Stammsystems zur Analyse der Mutante G_{81} im Vergleich zum Wildtyp-Protein *Hyp(hum)p*. Beide Stämme tragen nur das Single-Copy-Plasmid *pRSG313-[G_{81}]*, bzw. *pRSG313-HYP(hum)* als einzige funktionelle *HYP*-Gen-Quelle.

Die FOA-Selektion generierte den Stamm $WDHG_{81}Gal$, der nun die punktmutierte *Hypp*-Form $G_{81}V$ als einzige *Hypp*-Quelle exprimiert sowie die zugehörige Wildtyp-Kontrolle *WDH(hum)Gal*. In dieser war die hefeeigene Wildtypform *Hyp2p* durch die humane Form *Hypp(hum)* ersetzt. Das erhaltene differentielle Stammsystem als Ausgangssystem der phänotypischen Charakterisierung ist im Schema von Abbildung 5.10 abgebildet.

Nach den unabhängig durchgeführten 5-FOA-Selektionen wurden wiederum Kolonie-PCR-Experimente (siehe Abbildung 5.11C) mit jeweils 20 erhaltenen Kolonien von $WDHG_{81}Gal$ und der Wildtyp-Kontrolle *WDH(hum)Gal* als Templat durchgeführt. Dargestellt sind jeweils 6-7 Einzelüberprüfungen pro FOA-Screen der Mutante. Die PCR-Ergebnisse des Wildtyps zeigten dabei ein ähnliches Bild (nicht gezeigt). In allen Fällen wurde lediglich das Fragment der Größe 421 bp im Gegensatz zur Positivkontrolle amplifiziert, die beide Plasmidsorten *pRSG316(URA3)* und *pRSG313(HIS3)*, als Ausgangs-DNA enthielt. Dies zeigte den sicheren Verlust des *URA*-Plasmids in allen überprüften koloniebildenden Hefezellen an und wies das *pRSG313-X*-Plasmid als einzige *HYP*-Gen-Quelle im differentiellen Stammsystem aus. Die aus den drei unabhängigen FOA-Screens erhaltenen Mutanten werden im Folgenden mit $G_{81}(1-3)$ bezeichnet.

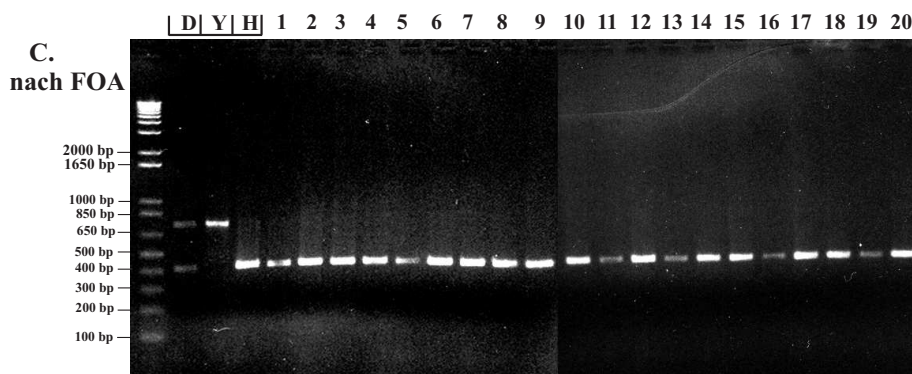
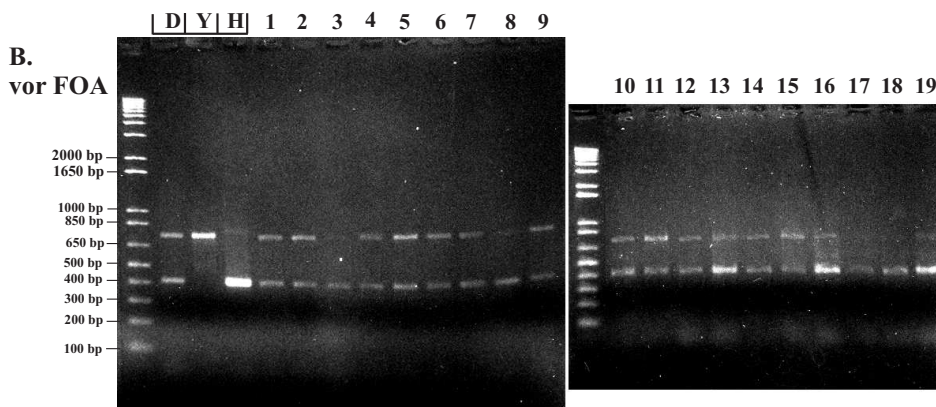
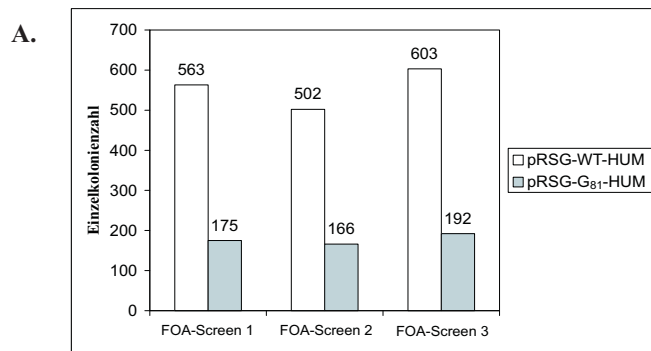
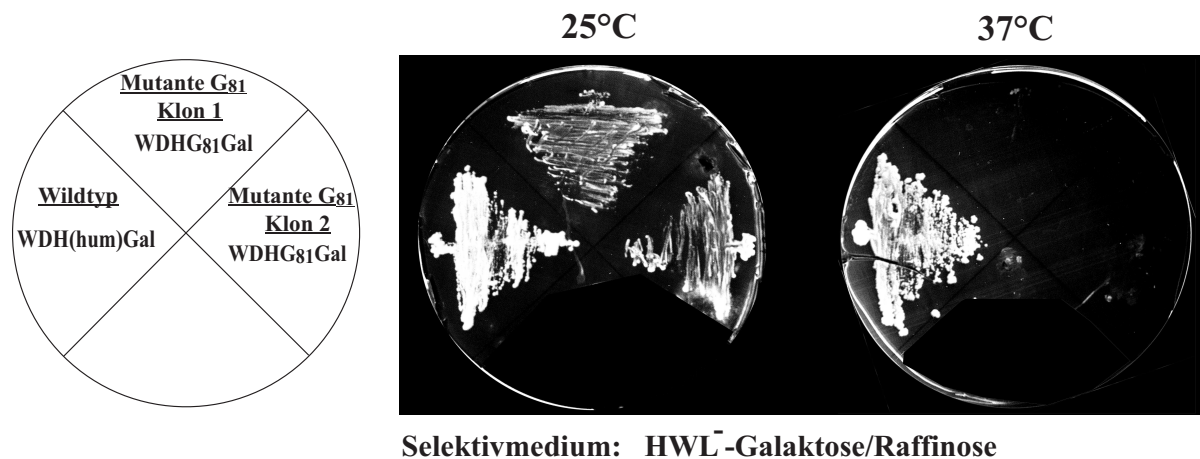


Abbildung 5.11: Verlauf der 5-FOA-Selektionen zur Regenerierung des Mutanten-Stammes WDHG₈₁Gal und der zugehörigen Wildtyp-Kontrolle.

A.: Anzahl erhaltener Kolonien aus drei unabhängigen FOA-Screens nach Ausplattierung gleicher Zellzahlen von Wildtyp- und Mutanten-Vorläuferkulturen auf 5-FOA-haltigem HWL⁻-SSM.

B.: Kolonie-PCR-Experiment von Klonen nach der Transformation des *HIS3*-Plasmids in den Ausgangsstamm. Es wurden in jeder PCR-Reaktion beide in Abbildung 5.3 beschriebene Primerpaare simultan eingesetzt. Die meisten Klone zeigen ein Amplifizierungsmuster aus zwei Banden. Drei der so positiv getesteten Kolonien wurden in drei unabhängigen 5-FOA-Screenings eingesetzt.

C.: Kolonie-PCR-Reaktionen mit Kolonien, die nach den drei FOA-Screenings erhalten wurden. Die Spuren 1-7 sind zugehörig zu FOA-Screen 1, Spuren 8-14 zu FOA-Screen 2, Spuren 15-20 zu FOA-Screen 3. Der selektive Druck des 5-FOA führte sicher zu Hefekolonien, deren Zellen das *URA3*-Plasmid verloren hatten. Nur das pRS-313-spezifische Fragment der Länge 421 bp wurde jeweils amplifiziert. Spuren D, H und Y sind das PCR-Ergebnis der drei Positivkontrollen: D:*HIS3*- und *URA3*-Plasmid; H: nur *HIS3*-Plasmid; Y: nur *URA3*-Plasmid als Templat eingesetzt.



Selektivmedium: HWL^- -Galaktose/Raffinose

Abbildung 5.12: Wachstum der Mutante G_{81} im Vergleich zum Wildtyp $\text{WDH}(\text{hum})\text{Gal}$ bei 25°C und 37°C . Ein Wildtyp-Klon und zwei aus unabhängigen FOA-Selektionen erhaltene Mutantenstämme wurden auf Galaktose haltigem HWL^- -Medium ausgebracht und 7 Tage bei den unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Beide Mutantenstämme zeigten langsames Wachstum als der Wildtyp und ausgeprägte Temperatursensitivität. Bei 37°C zeigte G_{81} kein Wachstum.

5.1.4 Wachstumsverhalten des Hefestammes $\text{WDHG}_{81}\text{Gal}$ im Vergleich zum Wildtyp

Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm $\text{WDH}(\text{hum})\text{Gal}$ zeigte die Mutante $\text{WDHG}_{81}\text{Gal}$ schon nach Ausplattierung auf 5-FOA-HWL^- -Selektivmedium ein deutlich langsames Wachstum. Die erhaltenen Kolonien hatten eine hellere, weniger bräunliche Färbung als der Wildtyp. Im ersten Schritt der phänotypischen Charakterisierung galt es, die Temperatursensitivität des Mutantenstammes gegenüber dem Wildtyp zu überprüfen. Beide Stämme wurden dazu auf HWL^- -Mediumplatten mit einer Mischung aus Galaktose und Raffinose als Kohlenstoffquellen ausgestrichen und bei 25°C und 37°C inkubiert. Abbildung 5.12 zeigt das langsamere Wachstum der Mutante bei 25°C und ihre ausgeprägte Temperatursensitivität bei 37°C . Bei dieser restriktiven Temperatur war kein weiteres Wachstum zu beobachten. Die Aufzeichnung von Wachstumskinetiken ermöglichte den Blick auf das genaue Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp bei permissiver (25°C) und restriktiver (37°C) Temperatur (Abbildungen 5.13 und 5.14). Aus den unterschiedlichen FOA-Isolierungen gewonnene Wildtyp- und Mutantenstämme wurden in Flüssig-Selektivmedium angezchtet. In den Über-Nacht-Kulturen befanden sich alle Stämme am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und wurden auf die gleiche Zelldichte eingestellt. Dies geschah durch photometrische Messung der optischen Dichten bei 600 nm und anschließender Verdünnung, bzw. Aufkonzentrierung. Der kinetische Zuwachs der Zelldichte der Kulturen bei 25°C ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Die Mutante zeigte dabei eine reproduzierbare Verdopplungsperiode in der logarithmischen Phase von ca. 6 h , während die des Wildtyps bei 3 h lag.

Nach Anlegen der restriktiven Temperatur von 37°C zeigte sich, wie erwartet, ein beschleunigtes Wachstum des Wildtyps. G_{81} -Zellen verdoppelten sich innerhalb der ersten zwei Stunden nach Anlegen der hohen Temperatur genau einmal. Danach trat ein vollständiger Wachstumsstopp ein.

Um eine Reversibilität der Wachstumsarretierung zu prüfen, wurden zwei Kolonien der Mutanten $G_{81}(1)$ und (2) auf HWL^- -Gal-SSM ausplattiert und bei 25°C für 6 Tage inkubiert. Pro

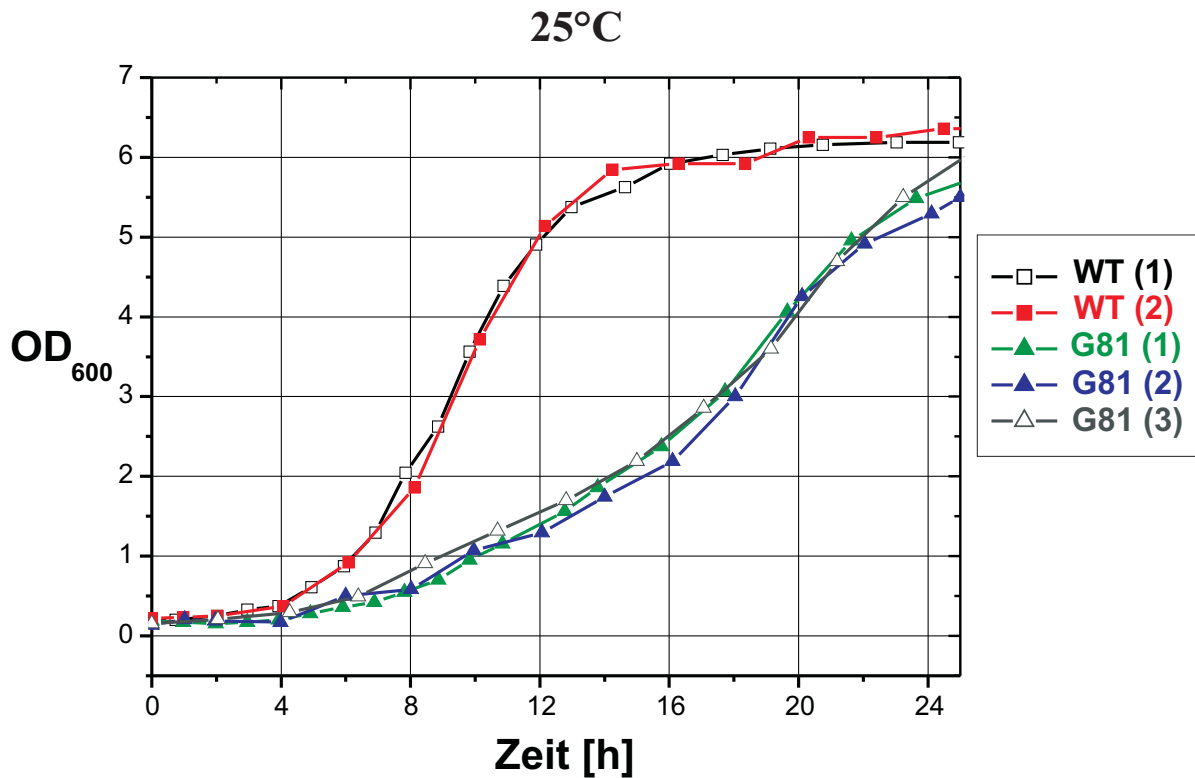


Abbildung 5.13: Wachstumverhalten von drei G_{81} -Mutantenstämmen im Vergleich zum Wildtyp $HYP(hum)$ bei 25°C (permissive Temperatur). Alle Stämme wurden aus jeweils unterschiedlichen 5-FOA-Selektionen erhalten.

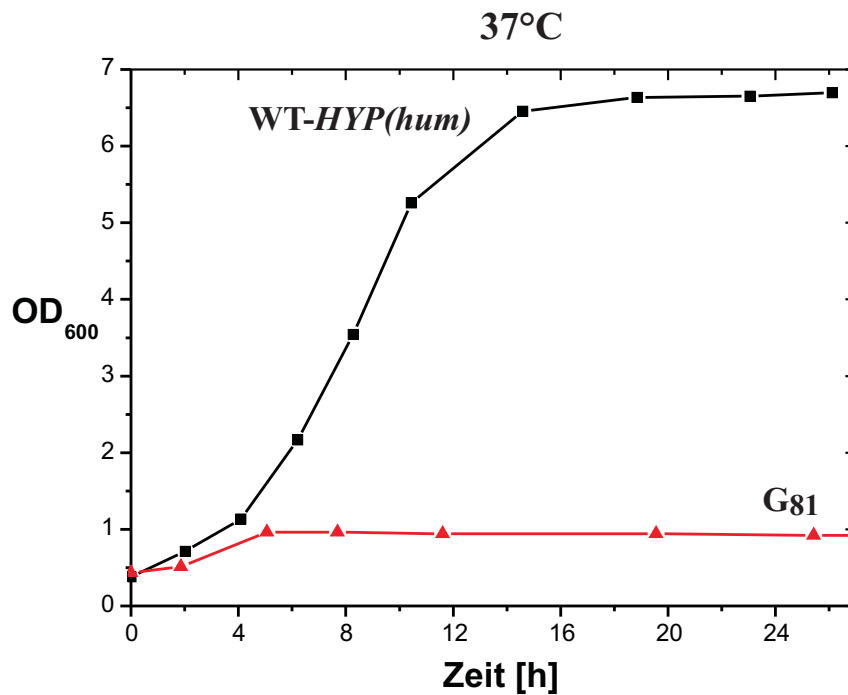


Abbildung 5.14: Wachstumskinetik des Hefestammes $WDHG_{81}Gal$ im Vergleich zum Wildtyp (Expression von $HYP(hum)$) bei 37°C (restriktive Temperatur).

Platte ergaben sich etwa 400 Einzelkolonien, die darauf für weitere 48 h bei 37°C gelagert wurden. Von den Petrischalen wurden Replika-Plattierungen auf frische SSM-Platten angefertigt und diese erneut bei permissiver Temperatur für eine Dauer von 6 Tagen inkubiert. Dabei zeigte ein kleiner Anteil der pro Einzelkolonie vorhandenen Zellen eine Wiederaufnahme des Wachstums, was auf eine Arretierung mit Teilreversibilität der Hefezellen hinwies.

Daher wurde eine Viabilitätsstudie von arretierten und nicht arretierten Zellen durchgeführt (siehe unten Kapitel 5.1.10, Seite 139).

5.1.5 Genetische Stabilität des Mutantenstammes WDHG₈₁Gal

Die Neigung der mutierten Hefestämme, dem selektiven Druck auszuweichen und die Auswirkungen der Punktmutation zu umgehen (z.B. durch zur Rückbildung einer unmutierten Form des *HYP*-Gens), wurde in einem Plattierungsversuch nochmals geprüft. Die Mutantenkulturen befanden sich dazu im logarithmischen Wachstum. Verdünnte Aliquote wurden auf SSM-Medium ausplattiert und 6 Tage bei 37°C und 25°C inkubiert. Die Platte bei 37°C enthielt dabei 1×10^6 Zellen, während bei 25°C 1×10^3 Zellen ausgestrichen wurden. Bei 37°C wurde danach eine Kolonie erhalten, während bei 25°C 1000 Kolonien wuchsen. Dies spiegelte eine Ausweich-Frequenz von 1×10^{-6} wider. Die genetische Stabilität des Stammsystem war demnach gegeben und die Mutante eignete sich daher gut für eine phänotypische Charakterisierung.

5.1.6 Proteinchemische phänotypische Charakterisierung durch 2D-Gel-Analyse

Die ausgeprägte Temperatursensitivität der Mutante legte die Frage nach deren molekularen Ursache nahe. Mit Hilfe der 2D-Geltechnik wurde im ersten Teil einer phänotypischen Charakterisierung nach Unterschieden der quantitativen Expression regulierter Proteine der Mutante im Vergleich zur Wildtypkontrolle bei restriktiver Temperatur gesucht. Gefundene Proteinspots wurden darauf proteinanalytisch charakterisiert. Eine bei 37°C verminderte oder ausfallende Funktion der mutierten Hypp-Form in G₈₁ sollte direkt oder indirekt für die gefundenen Expressionsunterschiede verantwortlich sein. Der proteomanalytische Ansatz wurde parallel zu transkriptomanalytischen Experimenten basierend auf einem mRNA-Genchip des Hefegenoms durchgeführt (siehe Abschnitt 5.1.9). Die Ergebnisse der beiden Verfahren konnten so kombiniert und zur Grundlage weiterführender Experimente verwendet werden.

5.1.6.1 Analyse von Gesamtextrakten

Für diese erste Analyse wurde auf eine Vorfraktionierung der Hefeextrakte nach Organellen oder löslicher und membrangebundener Proteinfraction verzichtet, um die Analyse zunächst breit anzulegen. Dies sollte den Proteinverlust bei der Probenvorbereitung verringern und eine relativ schnelle Analyse nach dem Erntezeitpunkt ermöglichen.

5.1.6.1.1 Optimierung des Hefe-Aufschlusses für die IEF

Der Zellaufschluss für die isoelektrische Fokussierung muss bei *Saccharomyces cerevisiae* aufgrund ihrer starken Zellwand unter intensiven mechanischen Bedingungen erfolgen, welche starkes Schütteln mit Glasperlen beinhalten.

Das in Literatur angegebene Standardprotokoll enthält für die speziellen Bedingungen der Bäckerhefe folgende Limitierungen:

1. Um eine Schaumbildung zu vermeiden, die eine ausreichende Bewegung des Glasperlenbettes und so einen effektiven mechanischen Aufschluss verhindert, sieht das Standardprotokoll den Aufschluss in einem Tris-haltigen Puffer ohne Detergens vor, suboptimale Bedingungen für die Solubilisierung von Membranen und schwerer löslichen Proteinen.
2. Es werden keine Chaotrope zur Verbesserung der Proteinkomplex-Solubilisierung eingesetzt.
3. Tris im Aufschlusspuffer erhöht die Gesamtsalzkonzentration der Probe, ein kritischer Parameter für die isoelektrische Fokussierung.
4. Die Aktivität der in Hefen überdurchschnittlich aktiven Proteasen (vor allem vakuoläre Proteasen) wird nur durch Proteinaseinhibitoren nicht aber durch hemmende hohe Harnstoff- und Detergenskonzentrationen eingeschränkt. Die Protease-Aktivität wird in der Lösung durch ein unvermeidbares Ansteigen der Temperatur durch Reibung des Glasperlenbettes während des Aufschlusses und Ultraschalleinsatz auch bei Verwendung von Eiskühlung erhöht.
5. Auf die Verwendung von Ultraschall zur Verbesserung der Solubilisierung wird völlig verzichtet.

Für die 2D-Gel-Analysen dieser Arbeit wurde daher folgendes optimiertes Aufschlussverfahren genutzt:

- Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte in einem kompletten Lysispuffer, der 8 M Harnstoff und 2M Thioharnstoff als Chaotrope, das zwitterionische Detergens CHAPS in einer Konzentration von 4% (w/v) sowie einen Proteinaseinhibitor-Cocktail enthielt (vgl. Materialien und Methoden).
- Neben DTT als Reduktionsagens wurde Tributylphosphin parallel verwendet. Dadurch wurde eine starke Schaumbildung während des Vortexens verhindert.
- Nach dem mechanischen Aufschluss erfolgte eine zweiminütige Ultraschallbehandlung.
- Auf den Einsatz Tris-gepufferter Lösungen oder anderer Ionen-haltiger Puffer wurde verzichtet.

5.1.6.1.2 Überprüfung des Hefeaufschlusses und der Auftrennungsqualität

Da mit einem modifizierten Zellaufschlussverfahren gearbeitet wurde, war die Qualität des Hefeaufschlusses und der zweidimensionalen Auftrennung am Wildtyp zu überprüfen. Um gute Vergleichbarkeit mit Spotmustern aus der Literatur zu erreichen, wurde ein häufig eingesetztes Gelsystem gewählt. In der ersten Dimension wurden IPG-Fokussiergelstreifen der Länge 18 cm mit einem pH-Bereich von 3-10 eingesetzt, wobei im Bereich mit hoher zu erwartender Proteindichte zwischen pH 5 und 7 eine Dehnung des Gradienten vorlag. In der zweiten Dimension wurde ein Gradientengel mit *T*-Werten von 9 bis 16% gewählt. So entstand ein großer Trennraum, um einen Hauptteil der im betrachteten pH-Bereich fokussierenden sowohl nieder- als auch hochmolekularen Proteine im gleichen Gel zu erfassen. Abbildung 5.15 zeigt ein Beispielgel aus einer Gruppe von 6 hoch reproduzierbaren Gelen des Wildtyps WDH(hum)Gal (1. Isolation). Die eingezeichneten Gen-Produktzuordnungen wurden aus einem Vergleich mit verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae*-2D-Proteomkarten aus der Literatur erstellt („The yeast SWISS-2DPAGE database“ [SANCHEZ et al. 1996]; Proteomkarte von Bordeaux [BOUCHERIE et al. 1995]; *S. cerevisiae*-Proteomprojekt des Zentrums für Proteom-Analyse in Odense, Dänemark [FEY et al. 1997]). Aus den veröffentlichten Ergebnissen bei [FEY et al. 1997] ist Abbildung 5.16 entnommen. Das abgebildete Gel wurde mit dem gleichen gerade beschriebenen Immobilin-Gelsystem erstellt. Daneben nutzten andere Autoren für ihre Kartierungen eine hochauflösende Ampholin-2D-PAGE-Technik. Die generierten Wildtyp-Proteinmuster waren gut mit den veröffentlichten vergleichbar, was die Identifikation majorer Proteinspots ermöglichte. Anhand der reproduzierbar aufzufindenden und in der Literatur bereits charakterisierten Untereinheiten bestimmter Proteine (wie z.B. Ssa1p, Eno2p, Fba1p, Tdh2p, Gmp1p, auch Hyp2p, usw.) ließen sich alle angefertigten 2D-Gele von Hefe-Gesamtextrakten eindeutig in beiden Dimensionen kalibrieren. Eine Beschreibung aller zugeordneten Protein-Untereinheiten ist aus Tabelle 5.1 zu entnehmen.

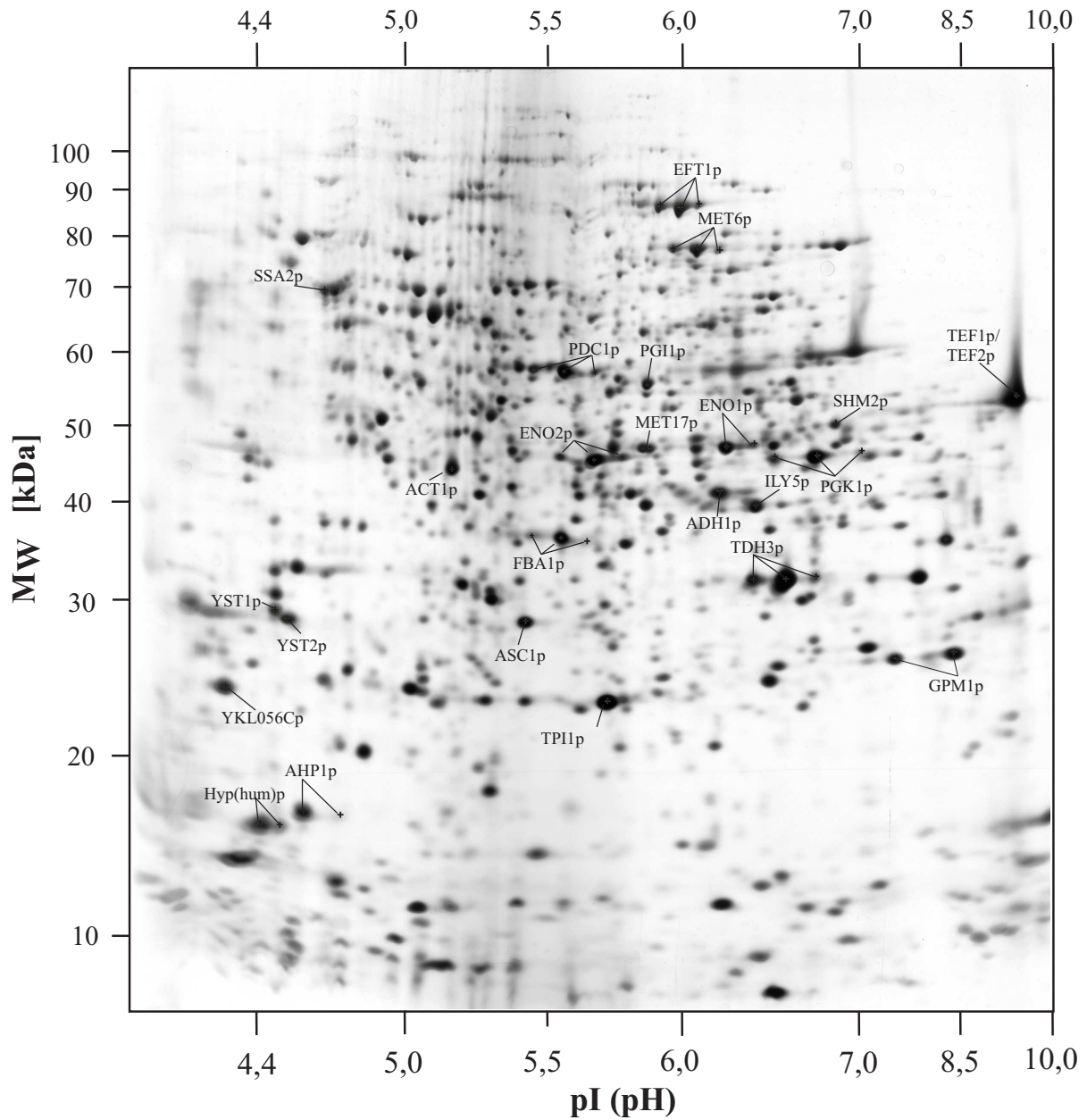


Abbildung 5.15: Übersichtsgel des Wildtypstammes WDH(hum)Gal. 500 μg Gesamtprotein wurden für die isoelektrische Fokussierung eingesetzt. Hierzu wurde ein IPG-Streifen mit einem oft eingesetzten Standard pH-Gradient von pH 3 bis 10 mit einer Dehnung des pH-Bereiches von 5 bis 7 eingesetzt. In der zweiten Dimension wurde ein SDS-Polyacrylamidgel mit eingegossenem Gradienten mit T-Werten von 9 bis 16 % verwendet. Dies führte vor allem bei Proteinen im unteren Massenbereich zu einer besseren Auflösung. Aus sechs parallel angefertigten Gelen stellte sich das Spotmuster als hochreproduzierbar heraus.

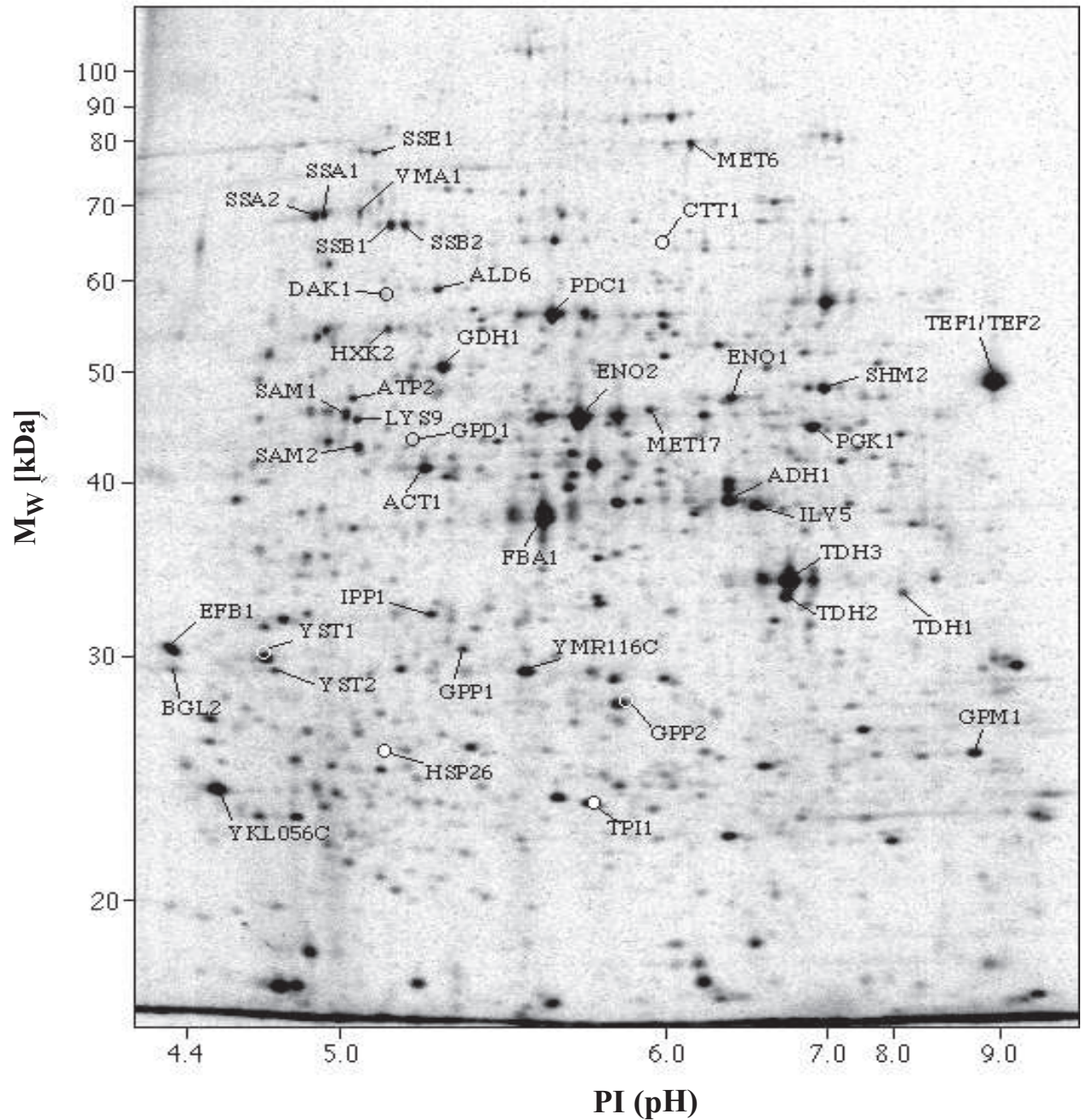


Abbildung 5.16: 2D-Gel mit Spotzuordnungen des „Centre for Proteome Analysis in Life Sciences“, Odense, Dänemark [FEY et al. 1997]. Die experimentellen Bedingungen des 2D-Gelsystems lagen nah an denen, die zur Überprüfung des Hefeaufschlusses am Stamm WDH(hum)Gal verwendet wurden (vgl. Abbildung 5.15).

Zuordnungen nach Hefe-2D-Datenbanken						
	Protein	Beschreibung	M _w [Da] (SwissP.)	M _w [Da] (mod. Cys)	pI (theoret.)	pI (Gel)
1.	Eft1p	Transl.-Elongationsfaktor 2	93289	93745	5,8	5,8 - 6,1
2.	Met6p	Homocystein-Methyltransferase, <u>EC 2.1.1.14</u>	85728	85900,0	5,9	5,9 - 6,1
3.	Ssa2p	Heat-Shock-Protein Ssa2p	69338	69468	4,6	4,6
4.	Tef1/2p	Elongationsfaktor 1-alpha	50032	50400	9,6	9,6
5.	Pdc1p	Pyruvatdecarboxylase Isozym 1, <u>EC 4.1.1.1</u>	61468	61753	5,9	5,5 - 5,7
6.	Pgi1p	Glukose-6-Phosphat-Isomerase, <u>EC 5.3.1.9</u> , GPI	61168	61168	5,9	5,8
7.	ENO2p	Enolase 2, <u>EC 4.2.1.11</u> , 2-Phosphoglycerat-Dehydratase	46783	46811	5,6	5,5 - 5,7
8.	Met17p	O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, (<u>EC 4.2.99.10</u>)	48540	48568	5,9	5,9
9.	Eno1p	Enolase 1, <u>EC 4.2.1.11</u> , 2-Phosphoglycerat-Dehydratase	46671	46728	6,0	6,0 - 6,2
10.	Shm2p	Serine-Hydroxymethyltransferase, <u>EC 2.1.2.1</u> , SHMT	52218	52504	6,9	6,9
11.	Act1p	Actin	41689	41918	5,2	5,2
12.	Adh1p	Alkohol-Dehydrogenase I, <u>EC 1.1.1.1</u>	36692	37148	6,1	6,2
13.	Ilv5p	Ketolsäure-Reductoisomerase, mitochon. Prec., <u>EC 1.1.1.86</u>	44368	44539	9,5	6,4
14.	Pgk1p	Phosphoglyceratkinase, <u>EC 2.7.2.3</u>	44607	44664	7,5	6,7 - 7,1
15.	Fba1p	Fructose-Bisphosphat-Aldolase <u>EC 4.1.2.13</u>	39489	39775	5,4	5,4 - 5,6
16.	Tdh3p	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 3, <u>EC 1.2.1.12</u> , GAPDH 3	35615	35729	6,3	6,3 - 6,7
17.	Yst1p	40S-ribosomales Protein S0-A, homolog zu NAB1A	27893	27950	4,3	4,4
18.	Yst2p	40S-ribosomales Protein S0-B, homolog zu NAB1B	27831	27888	4,4	4,5
19.	Asc1p	ähnl. Guanin-Nucleotid bind. Protein β-Untereinheit	34805	34919	5,7	5,4
20.	Gpm1p	Phosphoglycerat-Mutase 1, <u>EC 5.4.2.1</u>	27477	27477	9,1	7,6 u. 8,6
21.	YKL056Cp	homolog zum translational kontr. Tumor-Protein, TCTP	18741	18798	4,2	4,2
22.	Tpi1p	Triosephosphat-Isomerase, <u>EC 5.3.1.1</u> , TIM	26664	26778	4,4	4,4 - 4,5
23.	Ahp1p	peroxisom. Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase, <u>EC 1.6.4.</u> , TPx Typ II	19115	19286	4,4	4,6
24.	Hyp(hum)p	humanes Hypusin enth. Protein 1, „eIF-5A 1“	16701		4,4	4,4 - 4,5

Tabelle 5.1: Aus Hefe-2D-Datenbanken abgeleitete Spotzuordnungen im Gel von Abbildung 5.15. In der Spalte „M_w (SwissP.)“ sind die Molekulargewichte, wie in der Swiss-Prot-Datenbank angegeben, notiert. Die Molekulargewichtsangaben unter der Abkürzung „(mod. Cys)“ sind aus den Sequenzangaben der Swiss-Prot-Datenbank nach simulierter Carbamidomethylierung aller Cystein-Reste mit Iodacetamid abgeleitet, wobei zur Berechnung das Atomgewicht der vorkommenden Elemente benutzt wurde. Für jedes vorkommende Element ergibt es sich als Durchschnittswert aller in ihm vorkommenden Isotope nach relativer Häufigkeit. Weitere mögliche Modifikationen der Proteine wurden nicht berücksichtigt.

5.1.6.1.3 Computerauswertung gleicher Wildtyp-Gele

Drei von sechs mit jeweils 500 µg Gesamtprotein (Kultur 6h bei 37°C) parallel hergestellten Gelen wurden in einer Computer gestützten Analyse genauer ausgewertet, die wie alle weiteren 2D-Gel-Auswertungen in dieser Arbeit mit der Software Proteomweaver 2.0 (Definiens AG, München) durchgeführt wurde.

Die Menge eines Proteins in einem Gelspot wurde durch seine Intensität I ausgedrückt. Die Software bestimmte sie aus der Spotausdehnung und der an jeder Stelle des Spots vorliegenden optischen Dichte der Spotfärbung, die beim Scan-Vorgang des Geles in ein Pixelmuster mit einer Graustufenwert-Verteilung umgerechnet wurde. Die Durchführung der Silberfärbung musste daher für alle zu vergleichenden Gele exakt unter gleichen Bedingungen und mit gleichen Parametern erfolgen, wie auch die Computerdigitalisierung der Gel-Bilder. Dabei lag der dynamische lineare Messbereich für einen silbergefärbten Spot je nach Proteinart zwischen 10 bis 200 ng [RABILLOUD 2000], die Sensitivität der Methode demnach im unteren Nanogramm-Bereich. Die von der Software auf Basis des digitalisierten Bildmaterials berechneten Spot-Intensitäten lagen zwischen den Werten 0,023 bis 12,41.

Gele besitzen oft Bereiche, die sich aufgrund von Mängeln oder zu hohen Spotdichten, wie sie an den Rändern des pH-Bereiches vorkommen, nicht für eine semiautomatische Computerauswertung eignen. Diese Bereiche wurden reproduzierbar für alle in die Auswertung einbezogenen Gele durch Einstellung des in Abb. 5.17A angedeuteten Polygons von einer Spotdetektion ausgeschlossen.

Nach der Spotdetektion der drei zu einer Gruppe zusammengefassten Gele erfolgte die Zuordnung von einander entsprechenden Spots in einer Matchmatrix. (Die Spotpaare wurden „gematcht“.) Abbildung 5.17 zeigt 1562 Spots eines aus den Spotdetektionen und der Matchmatrix der Wildtyp-Gele 1-3 errechneten Durchschnittgels. Die Anzahl gematchter Spots der Einzelgele mit Spots des Durchschnittgels ist in Tab. 5.2 angegeben und lag bei Werten von 87 bis 95%. Die Zahlen aus dem Vergleich der Einzelgele lagen etwas niedriger.

Ein Möglichkeit, die Ähnlichkeit der Spotmuster von zwei „gematchten“ Gelen quantitativ anzugeben, besteht im Vergleich der Intensitäten aller zugeordneten Spotpaare.

	aktive Spots	Anzahl „gematchter“ Spots		
		zum Durchschnittsgel (ϕ-Gel)	Gel3	Gel2
Gel1	1541	1371 (88%)	1340	1253
Gel2	1583	1369 (87,6%)	1352	
Gel3	1521	1480 (95%)		
ϕ-Gel^a	1562			
Spots detektiert für: $0,023 \leq \text{Int.} \leq 12,41$				

Tabelle 5.2: Auswertergebnisse zeigen Reproduzierbarkeit der Spotmuster von Wildtyp-Übersichtsgelen: Dargestellt ist die Anzahl der durch Proteomweaver erkannten Spots im Spotintensitäts-Intervall von 0,023 bis 12,41 (aktive Spots). Aus allen aktiven Spots in drei Gelen wird die Spotzahl eines „Durchschnittgels“ berechnet. Der Vergleich dieses Gels mit jedem der drei Gele, als auch der Gele 1-3 untereinander, ergibt eine „Matchmatrix“ von einander zugeordneten Spots. Die Prozentzahl gibt den Grad der zugeordneten Spots der Gele 1-3 mit dem Durchschnittsgel an.

^a„Durchschnittsgel“ aus den Gelen 1-3

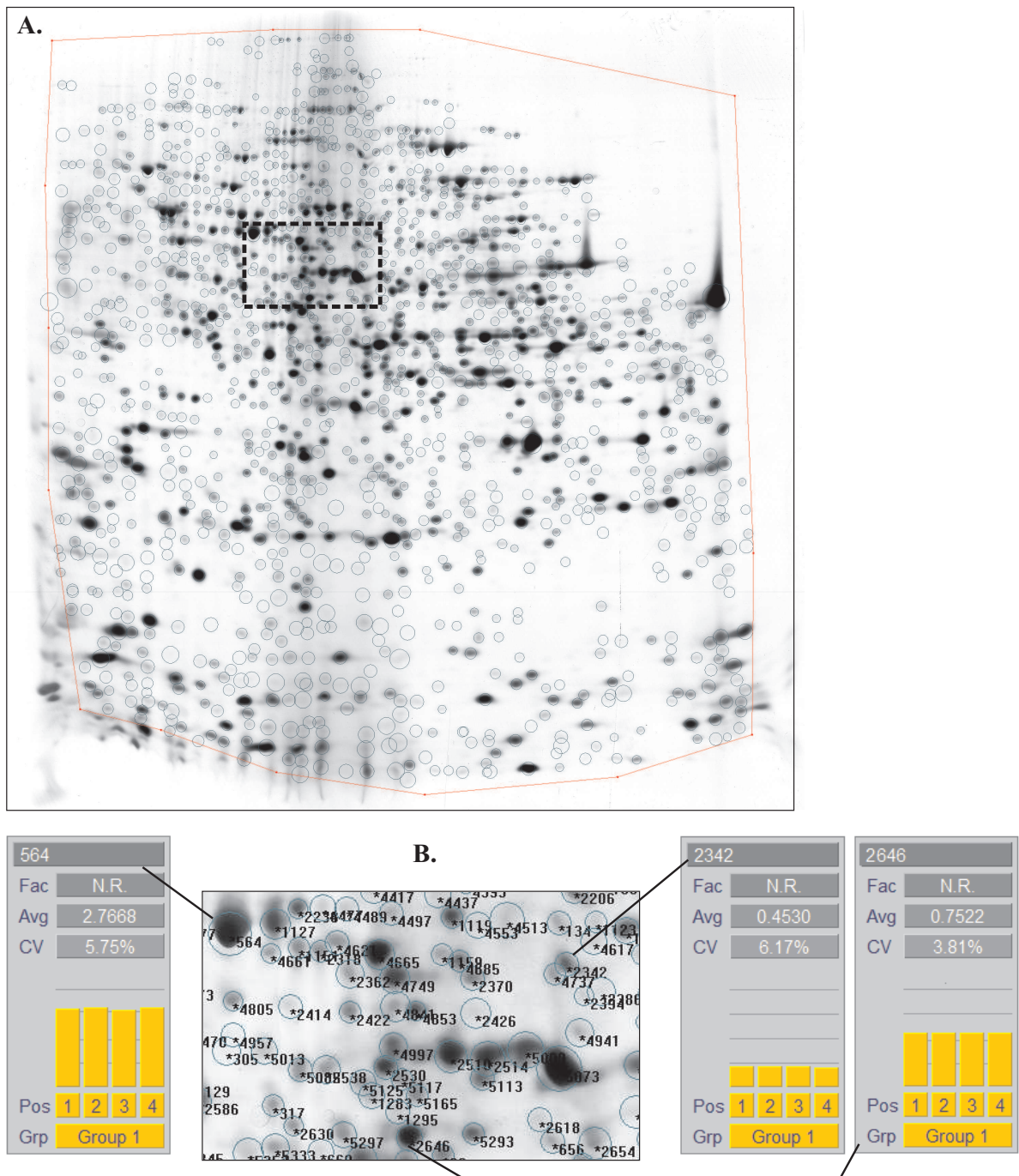


Abbildung 5.17: Computer gestützte Auswertung von drei 20×20 cm-2D-Gelen des Wildtyps.
A.: Ergebnis der automatischen Spotdetektion aus drei Gelen, zusammengefasst im dargestellten Durchschnittsgel. Der Rahmen, innerhalb dessen sich die detektierten Spots befinden, wird als Croppolygon bezeichnet. Seine Größe und Form wurde auf alle in der Auswertung einbezogenen Gele übertragen und schließt für die Detektion wenig sinnvolle Gelbereiche aus.
B.: Der gezeigte Ausschnitt stellt eine Vergrößerung des gestrichelten Auswahlkastens von Teil A. dar. Programminterne Laufnummern der Spots sind angegeben. Reproduzierbarkeit der Gelauswertungen kann aus den für drei Spots hoher bis niedriger Intensität angegebenen Übersichtsdiagrammen abgeleitet werden.

Dabei wird die Variation in den Spotintensitäten V_I als Prozentwert angegeben und wird berechnet nach:

$$V_I = 1 - \frac{I_{min}}{I_{max}} \cdot 100\% \quad (5.1)$$

Beim Vergleich von Gelen der gleichen Probe, wie hier der Fall, sollte V_I für jedes zugeordnete Spotpaar so klein wie möglich bleiben. Abbildung 5.18 zeigt den Vergleich der Intensitäten aller zugeordneten aktiven Spots in den Gelen 1 und 3 in einem Streudiagramm. Gegeneinander aufgetragen sind die Intensitäten aller zugeordneten Spots von Gel 1 (Ordinate) und Gel 3 (Abszisse). Spotpaare, die auf der Diagonalen liegen, besitzen eine V_I -Wert von 0%. Im Idealfall sollten beim Vergleich zweier Gele derselben Probe alle Spotpaare auf dieser Diagonalen liegen.

	Spots
zugeord.	1340 (100%)
$V_I \leq 10\%$	562 (42%)
$V_I \leq 20\%$	901 (67%)
$V_I \leq 25\%$	1045 (78%)
$V_I \leq 30\%$	1152 (86%)

Tabelle 5.3: Vergleich der Gele 1+3: Spotzahlen, die untersch. hohen V_I -Wertebereichen zuzuordnen waren.

Die Parallelen ober- und unterhalb der Diagonalen grenzen V_I -Wertebereiche ein, innerhalb derer gematchte Paare mit abweichenden Intensitäten zu finden sind. In der Darstellung sind diese Grenzen frei wählbar. So zeigen z.B. Spots oberhalb der V_I -Wert-Grenze von 70% eine Abweichung von $> 70\%$ in Gel1 gegenüber Gel3 an. Eine gestufte V_I -Wert-Verteilung ist aus Tab. 5.3 zu entnehmen. Dabei zeigten 78% der Spotpaare eine Variation der Intensitäten von unter 25%, was auch in der Anhäufung der Spots entlang der Diagonalen deutlich wird. Diese Werte und das Streudiagramm in Abbildung 5.18 verdeutlichen gleichzeitig die Varianzen, die bei den Gelvergleichen methodenbedingt auftreten. In den Gelvergleichen zwischen Wildtyp und Mutante konnte diese Varianz nur durch die Anfertigung von mehr Gelreplikaten ausgeglichen werden.

Die Streudiagramme, die aus den paarweisen Zuordnungen von Gel 1 mit Gel 2, bzw. von Gel 2 mit Gel 3 erhalten wurden (nicht dargestellt), lagen in ihren Verteilungsmustern sehr nah bei dem in Abbildung 5.18 gezeigten Bild.

Auf eine akzeptable Reproduzierbarkeit des Spotmusters konnte demnach aus folgenden Auswertedaten geschlossen werden:

- Der Spotanteil, der in den drei Einzelgelen den Spots des Durchschnittsgels zuzuordnen war, lag im Bereich von 87 - 95% (vergl. Tabelle 5.2).
- Die Variation der Intensitäten zugeordneter Spotpaare lag in 75% der Fälle unter 25%.

Aus der Qualität der erzeugten 2D-Gele, die eine problemlose Computerauswertung zuließ, und den oben gezeigten Auswertergebnissen ließ sich schließen, dass die benutzte modifizierte Zellaufschlussmethode, bei der die Reduktionsagenzien DTT und Tributylphosphin parallel eingesetzt wurden, effektiv war und für die nachfolgenden Probenvorbereitungen verwendet werden konnte.

Das in diesem Unterabschnitt beschriebene 2D-Gel-Auswerteverfahren wurde auch für die nachfolgenden Vergleiche des Wildtyps mit der Mutante angewendet.

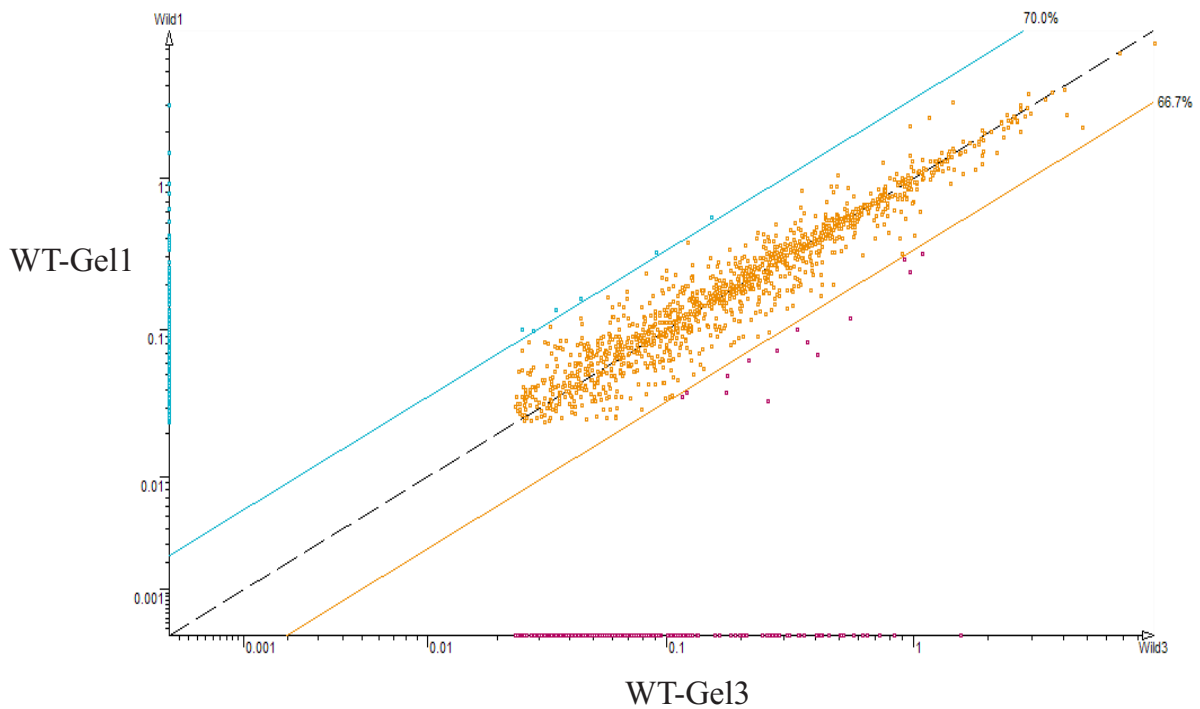


Abbildung 5.18: Ein Streudiagramm zeigt die Intensitätsverteilung der Spots im Vergleich der Wildtyp-Gele 1 (Ordinate) und 3 (Abszisse).

5.1.6.1.4 Vergleich nach Inkubation bei 37°C

Es wurden zunächst Gesamtproteinextrakte der Mutantenstämme $G_{81}(1-3)$ und der entsprechenden Wildtypstämme nach Inkubation bei 25°C und 37°C hergestellt. Alle zu vergleichenden Hefestämme wurden dafür bei 25°C über Nacht kultiviert (Wildtyp-Stämme aufgrund des deutlich schnelleren Wachstums entsprechend später angesetzt). Die so erhaltenen spätlogarithmischen Kulturen der Mutantenstämme wurden auf denselben OD-Wert von 0,5 verdünnt und für eine Dauer von 5 bis 24h bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubation lagen die optischen Dichten bei ca. 1,0. Der Ausgangs-OD-Wert vor restriktiver Temperatur der Wildtyp-Kulturen wurde aufgrund ihres schnelleren Wachstums auf 1/3 des Mutantenwertes gewählt. Wie aus der Wachstumskinetik ersichtlich, teilten sich Hefezellen, die aus einer 25°C-Kultur in der spätlogarithmischen Phase stammten, innerhalb sechs Stunden bei 37°C gerade einmal. Die Proliferation stagnierte danach. Daher wurde für die Analyse der erste Erntezeitpunkt auf 5 Stunden nach Inkubationsbeginn bei restriktiver Temperatur gelegt. Weitere Zeitpunkte lagen bei 6, 8, 12 und 24h.

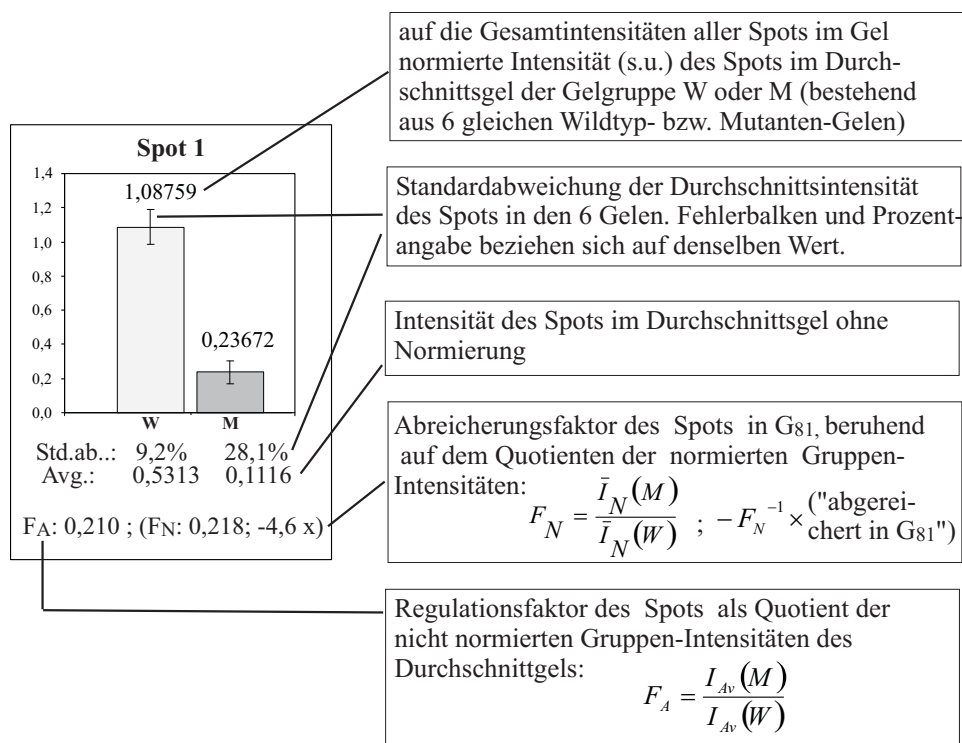
Für die differentielle 2D-Gel-Analyse wurde ein anderes Gelsystem gewählt. Für die erste Dimension wurde ein linearer pH-Gradient von pH 4 bis 10 auf zwei überlappende Einzelgradienten von pH 4-7 und 6-10 in jeweils 11 cm langen Fokussiergelstreifen aufgeteilt. Dies schien sinnvoll, da zum damaligen Zeitpunkt SDS-Elektrophoresen mit Gelen der Dimension 14×14 cm in der zweiten Dimension in einer höheren Anzahl gleichzeitig parallel angefertigt werden konnten, als dies mit 20×20 cm Gelen möglich war.

Die Abbildungen 5.19 und 5.20 zeigen einen Ausschnitt der Analyse. Pro Gel wurde eine Gesamtproteinmenge von 250 μg (gemessen nach [RAMAGLI 1999b]) für die mit Silber zu

färbenden Gele verwendet. Im pH-Bereich von 4-7 sind vier in G₈₁ schwächer, bzw. im Wildtyp stärker exprimierte Proteinuntereinheiten zu erkennen (bezeichnet als Spots 1 bis 4), im basischen Bereich von pH 6-10 zwei Untereinheiten mit der Bezifferung 10 und 11. Das ungefähre Molekulargewicht und die pI-Werte dieser Spots sind aus den Abbildungen 5.19B und 5.20E abzuleiten. Dargestellt ist auch das Verhalten der regulierten Spots in Extrakten, die nach unterschiedlich langen Inkubationen bei 37°C gewonnen wurden. Aus den gewonnenen Übersichtsbildern war ein kinetischer Zusammenhang zwischen der Anreicherungsstärke im Wildtyp und der Inkubationsdauer bei restriktiver Temperatur erkennbar. Besonders deutlich wird dies beim Betrachten der Spots 3 und 4. Während bei der Mutante im Vergleich der Bilder bei 5 und 24 h die Spotintensitäten im Vergleich zu den nichtregulierten umgebenden Spots gleichblieben bzw. leicht abnahmen, ist beim Wildtyp ein Ansteigen festzustellen (Abb. 5.19B, Bild 24h bei 37°C).

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war sowohl aus den drei dargestellten Versuchen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer ablesbar als auch aus einer nachfolgenden quantitativen Auswertung von je 6 Gelen des Wildtyps und der Mutante G₈₁ von Proben, die nach einer sechsständigen 37°C-Inkubation gewonnen wurden.

Je zwei der sechs Gele wurden von aus unterschiedlichen FOA-Selektionen stammenden Hefestämmen hergestellt. Demnach wurden drei überprüfte Wildtypstämme aus den FOA-Selektionen 1-3 und drei unabhängige überprüfte G₈₁-Stämme eingesetzt und für die Auswertung völlig gleich behandelt. In Abbildung 5.19C sind die Ergebnisse der Computerauswertung für die Protein-Spots 1 bis 4 in Diagrammform dargestellt. Die in den Diagrammen angegebenen Werte ergeben sich aus der folgenden Erklärung, exemplarisch für Spot 1:



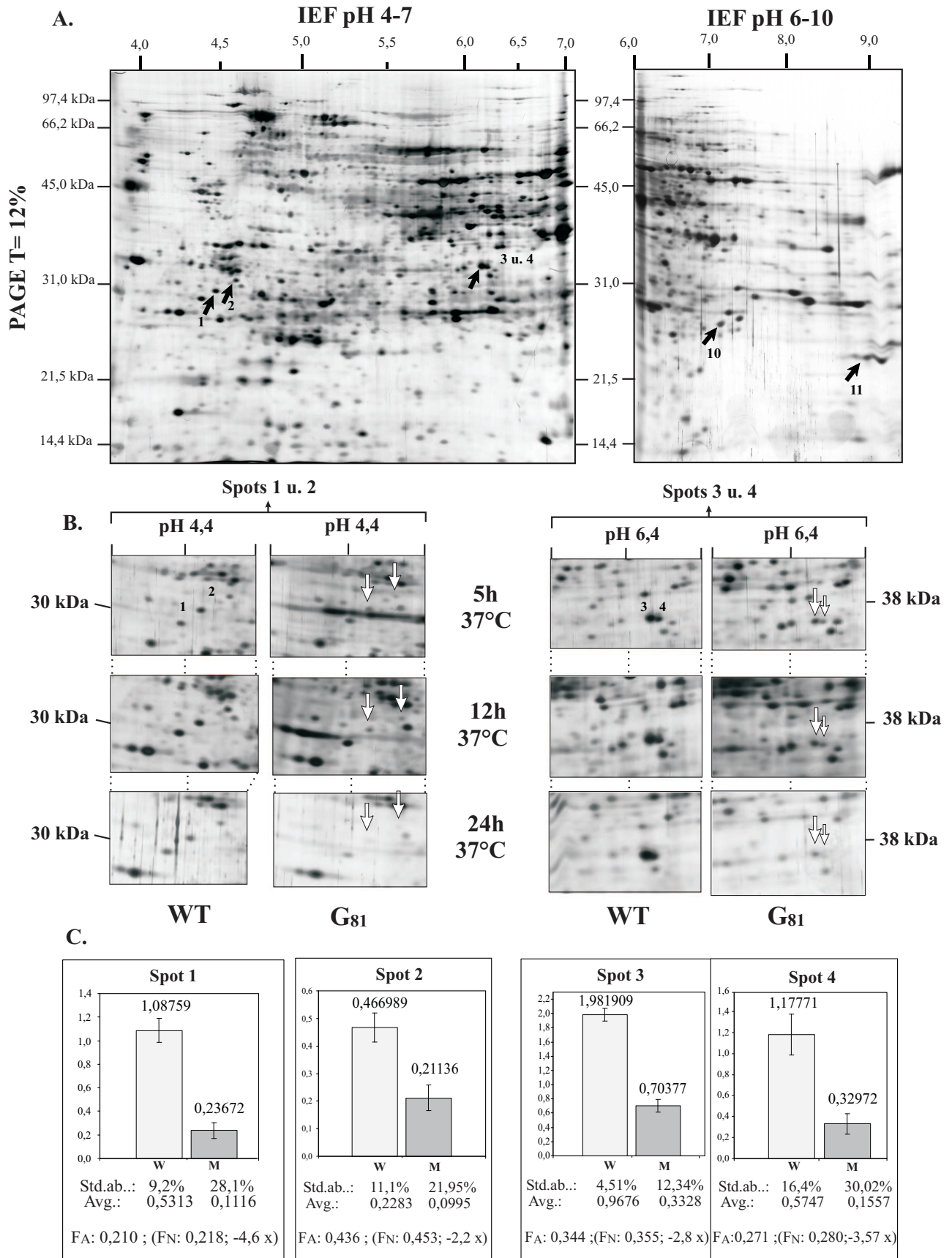


Abbildung 5.19: Auszug aus der differentiellen 2D-Gel-Analyse von Gesamtextrakten bei 37°C. **A** zeigt anhand zweier 14×14 cm-Gele des Wildtyps die Aufspaltung des pH-Gradienten. Sechs regulierte Spots sind markiert. **B**: Zeigt die unterschiedliche Expression der Spots 1-4 in G₈₁ nach Inkubation bei 37°C. **C**: Quantitative Bestimmung der Expression und Regulationsfaktoren der Spots 1-4 nach Computerauswertung von jeweils 6 Gelen von Wildtyp und G₈₁. Je zwei der sechs Gele stammten aus drei unabhängigen differentiellen Experimenten, in denen jeweils Stämme vom Wildtyp und G₈₁ eingesetzt wurden, welche aus den unterschiedlichen FOA-Selektionen 1-3 isoliert worden waren.

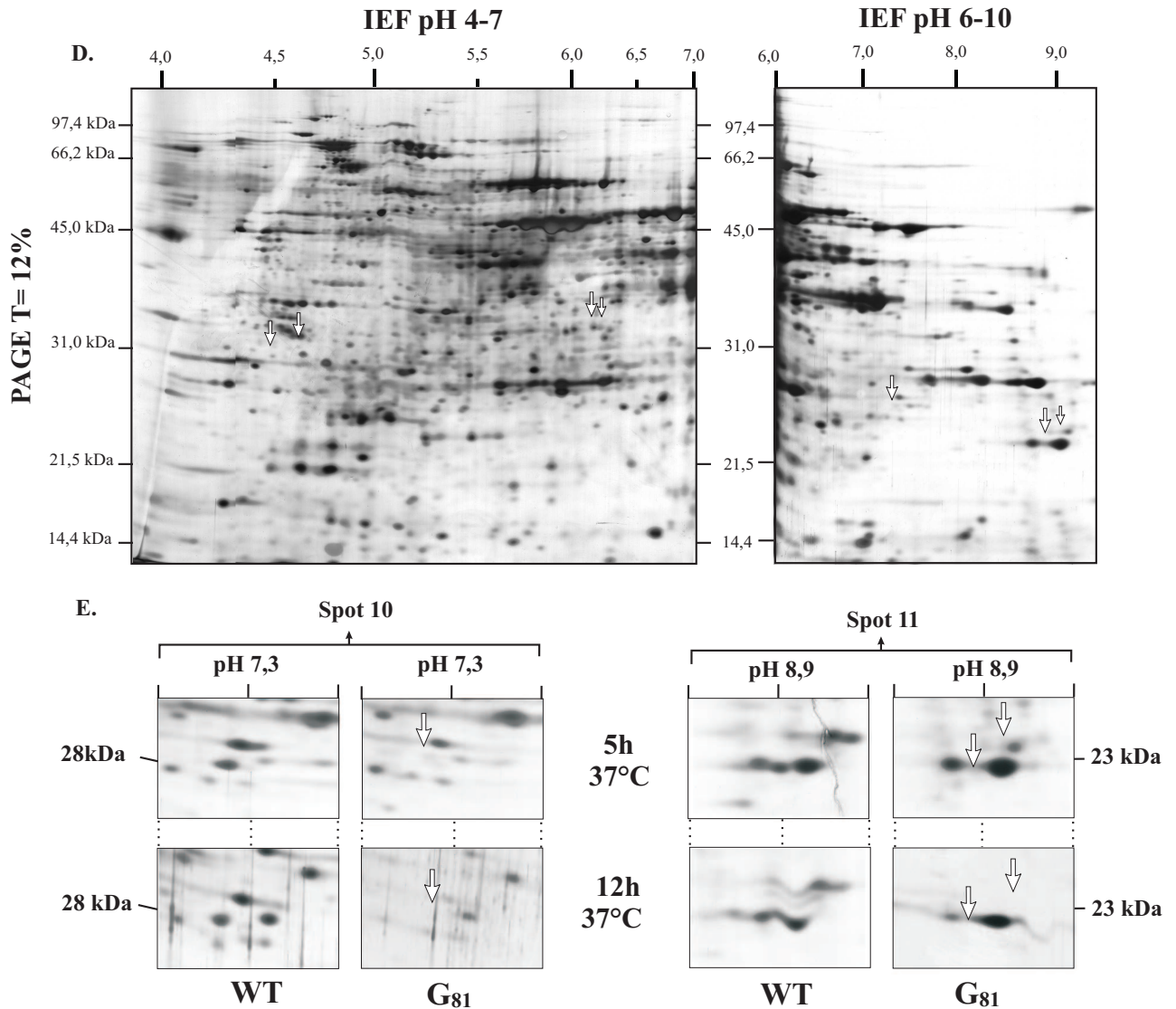


Abbildung 5.20: Fortsetzung von Abb. 5.19. **D** zeigt das zu Abb. 5.19A korrespondierende Übersichtsgel mit einem G_{81} -Gesamt-Proteinextrakt nach 6 stündiger Inkubation bei 37°C . **E**: Gezeigt ist die Abreicherung der basischen Spots 10 und 11 in G_{81} .

Die Normierung der Intensität auf die Gesamtintensität aller Spots im Gruppen-Durchschnittsgel berechnete sich dabei nach:

$$I_N = \frac{I_{Sp}}{\sum_{j=1}^n I_j} \cdot 1000 \quad (5.2)$$

Der Faktor 1000 war sinnvoll, da bei einer Anzahl von durchschnittlich 1210 detektierter Spots pro Gel und einer Summe aller Intensitäten dieser Spots von $\sum I_j \approx 480$ nach (5.2) die meisten normierten Intensitäten I_N Werte von 0,5 bis 2 annahmen. Wie aus den Werten für F_A und F_N zu erkennen, unterschieden sich die Regulationsfaktoren mit und ohne Normierung nur wenig. Sie zeigten in den Mutanten-Kulturen eine 2,2- bis 4,6-fache Abreicherung der Spots 1-4, die weit unter der jeweiligen Standardabweichung liegt. Die Abreicherung der vier Spots über 100% konnte durch die Computerauswertung der 12 Gele aus sechs unabhängigen Hefekultur-Aufarbeitungen als reproduzierbar und signifikant eingestuft werden. In den

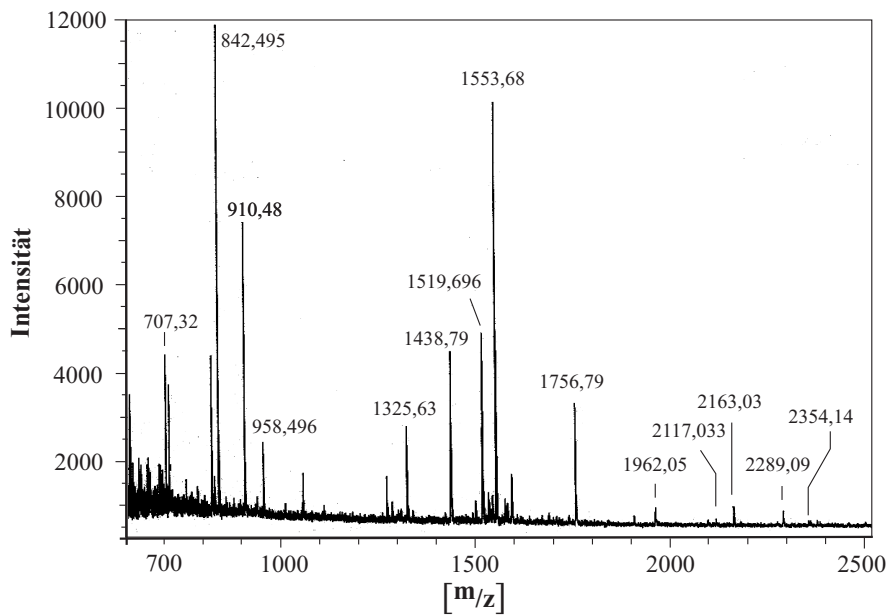


Abbildung 5.21: Reflektor-MALDI-MS-Spektrum des Peptidgemisches aus Spot 3 als Beispiel eines MALDI-MS-Fingerprints

der Auswertung zugrunde liegenden Gelen zeigte sich im basischen pH-Bereich auch die Anreicherung der Spots 10 und 11 als reproduzierbar.

Im Vergleich der Gesamtpotmuster gleichbehandelter Kulturen von Wildtyp und Mutante bei 37°C wiesen die Expressionsmuster einen hohen Anteil gleich exprimierter Proteine auf. Dies ist ein Hinweis, dass die gefundenen Unterschiede spezifische Expressionsereignisse betrafen und die Mutation nicht in die Regulation der gesamten Translation eingriff.

5.1.6.1.5 Proteinchemische Charakterisierung der Spots 1 bis 4, 10 und 11

Für die proteinchemische Charakterisierung unterschiedlich angereicherter Spots durch In-Gel-Verdau und anschließende Analyse der Spaltpeptide musste bedacht werden, dass dies zum damaligen Zeitpunkt experimentell nur mit Coomassie gefärbten Spots möglich war, die gut sichtbar waren. Der minimal notwendige Coomassie-Spot-Proteininhalt lag bei etwa 70 ng. Daher mussten vor der Spotanalyse präparative Gele der Proben angefertigt werden. Eine Analyse von sehr schwach exprimierten Spots war auch bei maximaler Beladung dieser Gele oft schwierig, da die klassische Coomassiefärbung eine bis zu einem Faktor von 100 schwächere Sensitivität als die verwendete Silberfärbung besitzt. Im Vergleich zu den besten kolloidalen Coomassiefärbungen (von denen sich nicht alle für eine massenspektrometrische Analyse eignen) weist die Silberfärbung eine 10 mal höhere Sensitivität auf [RABILLOUD 2000]. Diese Limitierungen reduzierten die Zahl der Spotunterschiede, die weiter charakterisierbar waren. Für die in den Übersichtsgelen markierten regulierten Spots war eine Charakterisierung möglich.

Die Analyse der Spots 1-4 sowie der Spots 10 und 11 begann mit dem In-Gel-Endopeptidaseverdau mit Trypsin der aus präparativen Coomassie-Gelen isolierten Protein-Gelspots. Dabei war im Spaltprotokoll ein Reduktionsschritt der Disulfidbrücken und eine anschließende Modifikation der Cystein-Reste mit Iodacetamid oder Vinylpyridin enthalten, um die Auffind-

Score: 0,34; 11/16 gematchte Peptide; Datenbank-Nr.: O13449; pI: 7,00; Mw: 55529,33 Da F ₁ F ₀ -ATPASE (ALPHA-Untereinheit) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
Masse [M ⁺] (gemessen)	Masse [M ⁺] (theoret.)	ΔM [ppm.]	Fehlsp.	Modifi- kation	Position	Peptid
582,341	582,347	10,44	0	0	324-328	RPPGR
958,496	958,543	48,95	1	0	453-460	QTLVRGER
1325,63	1325,681	38,33	0	0	511-521	SNHNELLTEIR
1438,785	1438,849	44,42	0	0	397-410	GIRPAINVGLSVSR
1519,696	1519,768	47,32	0	0	498-510	IGEFESSFLSYLK
1553,679	1553,738	38,17	0	0	329-341	EAYPGDVFYLSHR
1593,873	1593,911	23,9	1	0	422-435	QVAGSLKLFLAQYR
1756,785	1756,839	30,62	0	0	436-452	EVAFAQFGSDLDASTK
1962,045	1962,044	-0,36	1	0	300-316	HALIVYDDLKQAVAYR
2117,033	2117,068	16,29	1	0	324-341	RPPGREAYPGDVFYLSHR
2354,143	2354,199	23,62	1	0	436-457	EVAFAQFGSDLDASTKQTLVR

Tabelle 5.4: Homologe Peptidmassen aus dem MALDI-MS-Fingerprint von Spot 3, identifiziert als Bruchstück der Alpha-Untereinheit aus dem mitochondrialen F₁F₀-ATPase-Komplex. Die angegebenen Massen sind monoisotopisch und entsprechen den einfach positiv geladenen Peptiden.

barkeit der Cystein-haltigen Peptide im MS-Spektrum zu erhöhen.

Da das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* vollständig sequenziert ist, wurde in einem ersten Ansatz einer Charakterisierung an Gel-eluierten Spaltpeptiden das MALDI-MS-Fingerprinting-Verfahren angewendet. Die erhaltenen Peptidgemische wurden zunächst über C18-Reversed-Phase-Material entsalzt und zusammen mit einer Matrixsubstanz auf MALDI-Target-Platten kokristallisiert. Aus dem MS-Spektrum erhielt man eine Liste monoisotopischer Peptidmassen, die im Computer mit einer Liste der Spaltpeptide aller Proteine der Hefe-Datenbank nach einem theoretischen Verdau mit derselben Endopeptidase verglichen wurde, mit der die reale Spaltung durchgeführt wurde.

Ein Ausschnitt des MALDI-MS-Spektrums vom Peptidgemisch, das sich nach Spaltung des in Spot 3 enthaltenen Proteins mit der Endopeptidase Trypsin ergab, ist in Abbildung 5.21 als Beispiel des Fingerprints dargestellt, wie er für alle sechs Spots erfolgreich durchgeführt wurde. Das Spektrum lieferte mehr als 36 Peaks, die den Masse-zu-Ladungsverhältnissen der entsprechenden monoisotopischen Peptide im Bereich von $[m/z]$ 500 – 3500 entsprachen. Die Messgenauigkeit des MALDI-TOF-Gerätes lag in diesem Massenbereich bei 50 ppm.

Mit 16 der im Spektrum erhaltenen Massen von einfach positiv geladenen Spaltpeptiden wurde mit Hilfe des Programmes „PeptIdent“ (<http://us.expasy.org/cgi-bin/peptident.pl>) der Datenbankvergleich durchgeführt. In Tabelle 5.4 ist das Ergebnis des Vergleichs mit der höchsten Zuordnungswertigkeit, „Score: 0,34“, dargestellt. Dabei konnten 11 der 17 Peptidmassen in der Datenbank (hier SwissProt-Datenbank) aufgefunden werden. Fünf der Peptide enthielten eine von der Peptidase nicht erkannte Spaltstelle. Da das Massenspektrometer für die Messung extern kalibriert wurde, liegen die Abweichungen im Rahmen der Messgenauigkeit.

Spot 3 konnte mit einer Sequenzabdeckung von 22% als Proteinprodukt des Gens *ATP1* (α -Untereinheit des mitochondrialen F₁F₀-ATP-Synthase-Komplexes) identifiziert werden. Genauer handelte es sich dabei um die erste von fünf Untereinheiten, die gemeinsam den kata-

lytischen, nicht Membran-gebundenen F₁-Teil des Komplexes bilden, der die Stöchiometrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ besitzt. Dabei ragt der F₁-Teil aus der Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran in die Matrix hinein [PENEFSKY und CROSS 1991]. Das Molekulargewicht des Atp1p ist in der SwissProt-Datenbank mit 55.529,3 Da bei einem theoretischen pI-Wert (nach [BJELLQVIST et al. 1993]) der unmodifizierten Polypeptidkette von 7,0 angegeben. Wie aus Abb. 5.19B ersichtlich, lag das gemessene Molekulargewicht von Spot 3 bei ca. 37 kDa bei einem pI-Wert von ca. 6,2. Das folgende Schema zeigt die Lage der gefundenen Spaltpeptide in der Sequenz.

Δ pI: 1,50; Δ Mw: 17529,3 Da (46.1%); 21,8% Sequenzabdeckung:

	1	11	21	31	41	51	
1					trrlastka	qptevssile	erikgvsdea 60
61	nlnetgrvla	vgdgiarvfg	lnniqaeeLv	efssgvkqma	lnlepgqvgi	vlfgsdrlvk	120
121	egelvkrtn	idvvpvgpl	lgrvvdalgn	pidgkqpid	agrsraqvka	pgilprsvh	180
181	epvqtglkav	dalvpigrqg	reliigdrqt	gktavaldti	lnqkrwnngs	deskklycvy	240
241	vavqqkrstv	aqlvqtleg	damkysiiva	ataseaaplq	ylapftaasi	dewfrdngkH	300
301	ALIVYDDLK	QAVAYR qlsl	llr RPPGREAYPGDV FYLHS	Rlleraakls	ekegsgslta		360
361	lpvietqggd	vsayiptnvi	sitdgqifle	aelfyk GIRP	AINVGLSVSR	vgsaaqvkal	420
421	kQVAGSLKLF	LAQYREVAAF	AQFGSDLASTKQTL VRGER	ltqllkqny	splateeqvp		480
481	liyagvnghl	dgielsr IGE	FESSFLSYLK	SNHNELLTEI	Rekgelskel		
laslksates	540						
541	fvatf						

Alle aufgefundenen Spaltpeptide lagen in der C-terminalen Hälfte der Primärstruktur. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei Spot 3 um ein Bruchstück des Atp1p von 37 kDa handelte, welches den C-Terminus enthielt. Betrachtete man die C-terminalen 313 Aminosäurereste der Sequenz aus der Datenbank als separates Polypeptid, errechnete sich ein theoretisches M_w von 34.303 Da und ein pI von 6,4. Diese Werte stimmten im Rahmen der Messgenauigkeit eines 2D-Gels gut mit den gemessenen überein. Der um weniger als 0,1 pI-Einheiten neben Spot 3 liegende basischere Spot 4 mit etwas kleinerem Molekulargewicht (nur schwach aufgelöst) wurde als ein Bruchstück der gleichen Region des Atp1p charakterisiert, da ein Großteil der zugeordneten Peptide mit denen von Spot 3 übereinstimmten. Die genaue Ursache des etwas höherliegenden, modifizierten pI-Wertes des Fragmentes 4 wurde nicht genauer untersucht.

Die Spots 1 und 2 wurden anhand ihrer Spaltpeptide als unterschiedlich große Teilstücke der β -Untereinheit identifiziert, der zweiten dreifach vorkommenden Polypeptidkette des gleichen F₁-ATP-Synthase-Komplexes. Dabei handelte es sich bei diesen Bruchstücken wiederum um den C-terminalen mehr sauren Anteil der Gesamtuntereinheit. Das theoretische Molekulargewicht der β -Untereinheit betrug laut SwissProt-Datenbank 51.256,5 Da mit einem pI von 5,2. Das 2D-Gel nach Abb. 5.19B erbrachte Daten von ca. 30.000 Da und einen pI um 4,4.

Was den Bruch der Peptidketten für beide Untereinheiten Alpha und Beta verursacht hatte, oder ob es sich um natürlich auftretende Abbauvorgänge handelte, wurde nicht weiter untersucht. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die besondere Kombination von Aufschlussverfahren, die eine Behandlung mit Detergens, Chaotropen, mechanischem Aufschluss sowie Ultraschall einschloss, für das spezielle Spaltmuster verantwortlich waren. Eine geringfügige Degradation der Probe durch zelleigene Proteasen kann trotz konsequenter Anwendung

Spot Nr.	S.-Pep. ¹ (zugeo.)	M _w (2D-Gel)	M _w (theoret.) [Da]	pI (2D-Gel)	pI (theoret.)	Zuordnung	Hefe-Gen
1	10/19	ca. 32 kDa	51256,48	4,5	5,22	ATP-Synthase β-Unter. (F ₁)	<i>ATP2</i>
2	8/14	ca. 34 kDa	51256,48	4,65	5,22	ATP-Synthase β-Unter. (F ₁)	<i>ATP2</i>
3	11/16	ca. 36 kDa	54920	6,5	6,5	ATP-Synthase α-Unter. (F ₁)	<i>ATP1</i>
4	6/12	ca. 36 kDa	54920	6,58	6,5	ATP-Synthase α-Unter. (F ₁)	<i>ATP1</i>
10	9/14	ca. 24 kDa	23250,64	7,2	7,83	ATP-Synthase Unter. 4 (F ₀)	<i>ATP4</i>
11	12/20	ca. 20 kDa	19678,41	8,9	8,92	ATP-Synthase d-Kette (F ₀)	<i>ATP7</i>

Tabelle 5.5: Übersicht der charakterisierten Proteinspots aus dem Vergleich bei restriktiver Temperatur. Die Ergebnisse wurden durch MALDI-MS-Fingerprinting nach Proteinspaltung mit Trypsin erhalten. 1: Zahl der vom Programm „PeptIdent“ zugeordneten Spaltpeptide aus den MALDI-MS-Spektren zu berechneten Peptiden aus den theoretischen enzymatischen Spaltungen. (Unter. = Untereinheit)

von Kälte und Proteaseinhibitoren in Kombination mit hohen Chaotrop-Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden. Das Muster der Teilsequenzen war jedoch in allen angefertigten 2D-Gelen reproduzierbar. Aufgrund der exakten Gleichbehandlung von Proben des Wildtyps und der Mutante waren die gemessenen Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die veränderte Hypp-Funktion und deren Auswirkungen in der Punktmutante und nicht auf zufällige Heterogenitäten durch unterschiedliche Probenbehandlungen zurückzuführen.

Zu erwähnen ist auch, dass die Untereinheiten des F₁F₀-ATP-Synthasekomplexes nach Recherche in den veröffentlichten 2D-Gel-Datenbanken von Gesamtextrakten der Bäcker-Hefe nicht als einfach aufzufindende gut exprimierte Spots zu bezeichnen sind, während sie als Bruchstücke in den für diese Arbeit angefertigten Gelen im gewählten pH-Bereich gut separiert und schnell auffindbar waren. Somit stellte die Fragmentierung der beiden Ketten für diese Analyse eher einen Vorteil dar.

Die Charakterisierung der basischen Spots 10 und 11 ergab, dass es sich um Untereinheiten des membranständigen F₀-Teils aus dem ATP-Synthase-Komplex handelte. Beide Untereinheiten wurden dabei als intakt ohne Fragmentierung der Aminosäureketten gefunden. Spot 10 wurde als Genprodukt von *ATP4* identifiziert (auch als „Untereinheit b“ bezeichnet). Spot 11 wurde der d-Kette aus dem F₀-Teil als Genprodukt *Atp7p* [NORAIS et al. 1991] zugeordnet. Demnach stammten alle 6 analysierten Polypeptidketten – zugehörig zu vier unterschiedlichen Untereinheiten – aus demselben Enzymkomplex der mitochondrialen F₁F₀-ATP-Synthase. Eine Übersicht der Spotcharakterisierung der sechs Protein-Spots gibt Tabelle 5.5.

5.1.7 Proteomanalytischer Vergleich mitochondrialer Proteine

Sowohl die Abreicherung des mitochondrialen F₁F₀-ATPase-Komplexes als auch das Ergebnis einer Single-Copy-Suppressoranalyse von G₈₁ mit Hilfe einer cDNA-Bibliothek im Plasmid pRS316Gal [YOUNG 1998] deuteten auf eine Beteiligung des hypusinhaltigen Proteins bei der Biogenese oder Bereitstellung voll funktionsfähiger Mitochondrien hin. Daher wurde die phänotypische Analyse durch 2D-Gel-Analyse mit dem direkten Vergleich der Proteinmuster von isolierten Mitochondrien aus dem differentiellen Stammsystem nach 25°C- und 37°C-Inkubation fortgesetzt.

5.1.7.1 Mitochondrien-Analysen durch 2D-Gel-Elektrophorese aus Kulturen bei permissiver Temperatur

Die Stämme der Mutante G₈₁ zeigten schon bei der permissiven Temperatur von 25°C ein zum Vergleich mit dem Wildtyp deutlich langsames Wachstum, welches die Auswirkungen der Punktmutation auch schon bei dieser Temperatur verdeutlicht. Daher wurden Mitochondrien aus bei 25°C inkubierten Hefe-Kulturen isoliert. Verwendet wurde eine Standard-Zellfraktionierungsmethode für Hefezellen (siehe Methoden). Der große Trennraum der 2D-Gelelektrophorese gestattete eine Aufreinigung, bei der nach differentieller Zentrifugation und intensiven Waschungen der erhaltenen mitochondrialen Membranfraktion auf eine weitere Reinigung der Mitochondrien durch Dichtegradientenzentrifugation verzichtet werden konnte. Ein Vergleich der Protein-Spotmuster der Gele von Gesamtzelllysaten (Abb. 5.19) und der gewonnenen angereicherten Mitochondrienfraktion (Abb. 5.22) ergab völlig unterschiedliche Muster. Wie Spotcharakterisierungen durch Restriktionsverdau und Analyse durch massenspektrometrische Methoden zeigten, war der überwiegende Anteil der Spots mitochondrialer Herkunft. Dies zeigte eine ausreichende Reinigung und Anreicherung der Mitochondrienfraktion an. Der Vergleich der Proteinspot-Muster hinsichtlich unterschiedlich exprimierter mitochondrialer Proteine war problemlos möglich.

Schon die Färbung der erhaltenen Mitochondrien-Pellets zeigte die Auswirkungen der Punktmutation. Während die aus dem Wildtyp erhaltene Pelletfraktion eine dunkelbraune Färbung besaß, die auf das Vorhandensein einer normalen Verteilung der Cytochrome und eisenhaltigen Enzymkomplexe hinwies, wiesen die Präparationen aus G₈₁-Kulturen eine viel schwächere Braunfärbung auf.

Lichtmikroskopische Untersuchungen der Mitochondrienfraktionen sowie in späteren Unterabschnitten beschriebene DAPI-Fluoreszenzfärbungen und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellen des differentiellen Stammsystems zeigten, dass die geringere cytochrome Braunfärbung nicht auf eine geringere Mitochondriendichte pro Zelle zurückzuführen war.

Es wurden drei Mitochondrienisolationen mit aus unterschiedlichen FOA-Selektionen isolierten Stämmen von Wildtyp und Mutante durchgeführt. Die unterschiedliche Färbung der Pellets wurde dabei jeweils reproduziert. Für die 2D-Gel-Analyse der mitochondrialen Proteininhalte wurde das gleiche Gelsystem verwendet wie für die differentielle Gesamtextrakt-Auswertung (vgl. Abschnitt 5.1.6.1.4). Abbildung 5.22 zeigt den Vergleich von zwei Gelen in den pH-Bereichen 4-7 und 6-10 von Wildtyp- und G₈₁-Mitochondrien-Proben. Es wurden auch Vergleiche im pH-Bereich von 5,5 bis 7,5 angefertigt. So konnte in diesem pI-Bereich eine verbesserte Auflösung erreicht werden, da die Trennstrecke für die isoelektrische Fokussierung verbreitert wurde. Dies war vor allem aufgrund der zu erwartenden hohen Spotdichte um den neutralen pI-Bereich sinnvoll. Abbildung 5.23 zeigt eine Gegenüberstellung zweier Gele aus diesem gespreizten pH-Bereich. Die verbesserte Auflösung wird im Vergleich des zoomten Ausschnitts aus Abb. 5.22B mit dem entsprechenden pH-Bereich von 6,0 bis 7,0 aus Abb. 5.23 besonders deutlich. Das mitochondriale Spotmuster des Wildtyps als solches wies in Spotdichte und Spotverteilung deutliche Parallelen mit einer 2D-Gel-Analyse von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* auf [KRUFTE et al. 2001].

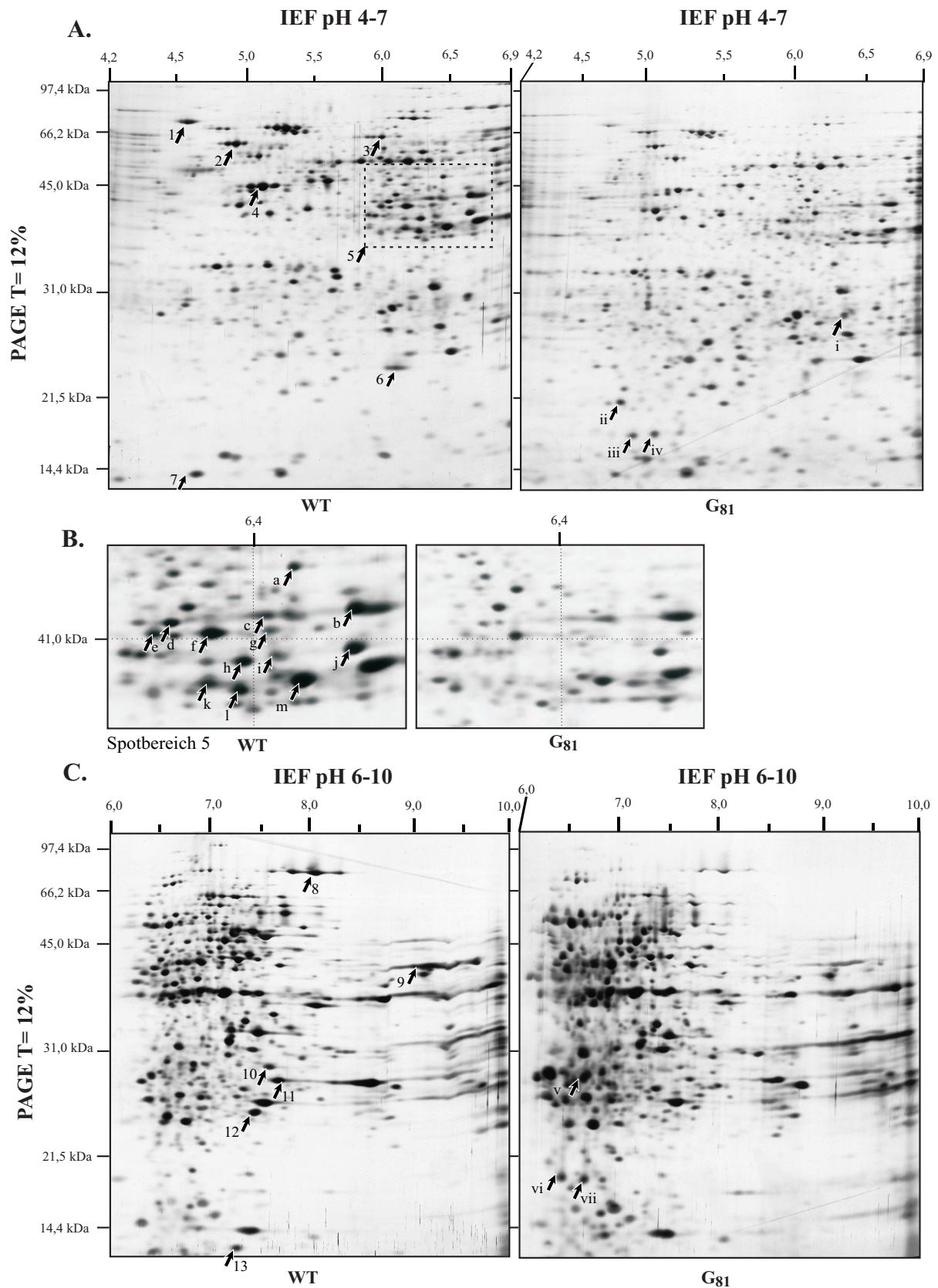


Abbildung 5.22: 2D-Gel-Analyse von Mitochondrienextrakten, die aus Hefekulturen nach Inkubation bei 25°C hergestellt wurden. Es wurde das gleiche Gelsystem wie bei der differentiellen Analyse von Gesamtextrakten mit pH-Gradienten von 4 bis 7 und von 6 bis 10 gewählt. Die zweite Dimension entspricht der SDS-PAGE mit 12×12 cm-Gelen vom T-Wert 12%. **A.**: 250 µg mitochondrialer Proteine eingesetzt im pH-Bereich von 4-7. Im Wildtyp angereicherte Spots sind gekennzeichnet. Gravierende Unterschiede von Spots im pH-Bereich von 5,6 bis 6,8 sind im gestrichelten Rechteck dargestellt, das in Teil **B** größer aufgelöst ist. **C** zeigt den Vergleich im pH-Gradienten 6-10. Insgesamt sind 24 im Wildtyp und 7 in der Mutante deutlich angereicherte Spots gekennzeichnet.

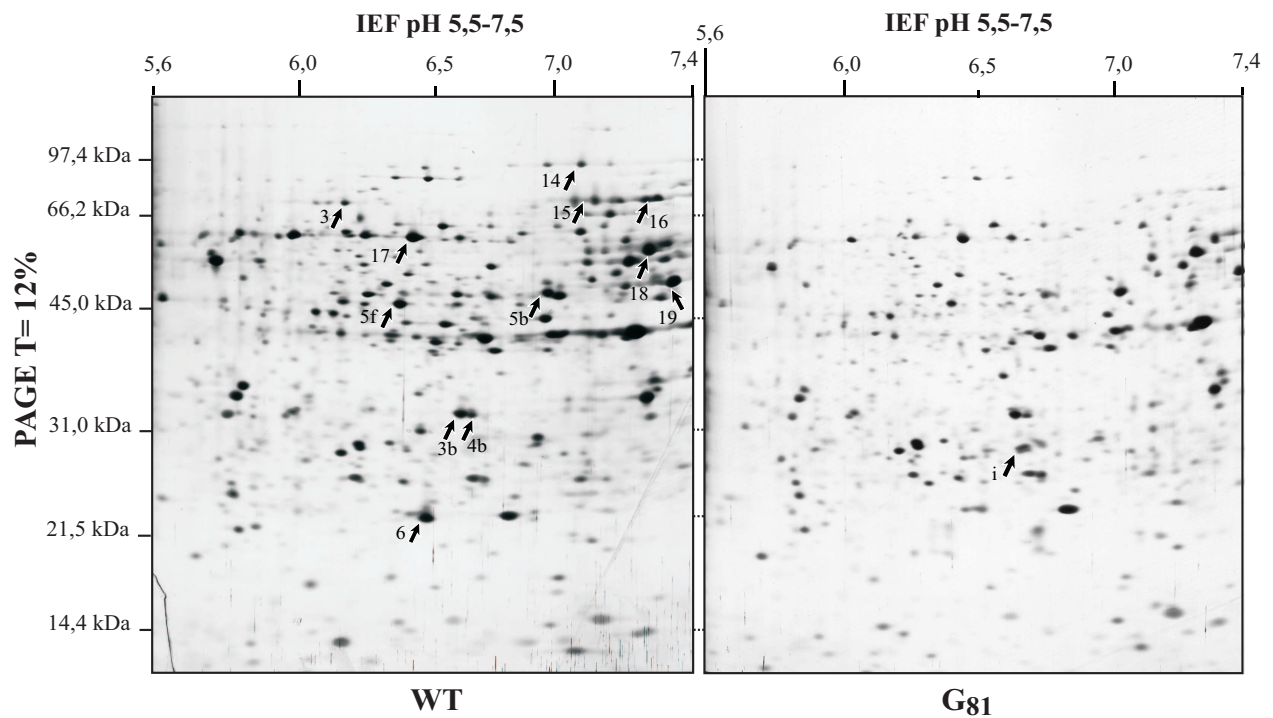


Abbildung 5.23: Auftrennung mitochondrialer Proteine nach Inkubation bei 25°C im pH-Bereich 5,5 bis 7,5 gezeigt an zwei Beispielgelen.

Wie Abbildung 5.22C zeigt, ist eine scharfe isoelektrische Fokussierung von Proteinspots im höher basischen pI-Bereich nicht einfach durch eine normale IPG-Technik zu erreichen [GÖRG 1999]. Es ist bekannt, dass etwa 73 % der Gen-Produkte, die Funktionen im Mitochondrium übernehmen, einen theoretischen pI-Wert über 7,6 besitzen. 150 von 399 Proteinen liegen sogar im berechneten pI-Wert über 10,0. Verantwortlich dafür ist eine relativ große Zahl ribosomaler mitochondrialer Proteine. Für eine Computer-gestützte Auswertung und reproduzierbare Spotdetektion sollte eine möglichst gute Fokussierung vorliegen. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Auftrennung der stärker basischen Spezies im normalen IPG-2D-Gelelektrophoresesystem und mit dem Anspruch, im Rahmen der hier durchgeführten ersten Screenings mitochondrialer Proteinkandidaten Hinweise auf die Ursachen des Phänotyps zu erlangen, wurde daher für die quantitative Gelauswertung mit Gelen in den pH-Bereichen 4 bis 7 und 5,5 bis 7,5 gearbeitet. Es wurde dabei in Kauf genommen, dass ein Anteil mitochondrialer Proteine so der Auftrennung nicht zugänglich sein würde. Aus den drei separaten Mitochondrienisolationen wurden drei unabhängige differentielle 2D-Gel-Analysen mit anschließender Computer-Auswertung durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 5 Gele des Wildtyps mit 5 Gelen der Mutante G₈₁ miteinander verglichen.

In Tabelle 5.6 sind die Ergebnisse der Spotdetektion und Spotzuordnung der drei Auswertungen zusammengefasst. Erfasst sind die Spotzahlen aus Durchschnittsgelen (Spalte GZ), die aus den 5 Gelen einer Gelgruppe gemittelt wurden. So konnten bei den gewählten experimentellen Bedingungen, wie gewählte Ausgangsproteinmenge pro Gel und Färbungsgrad der Silberfärbung, im pH-Bereich von 4-7 im Durchschnitt 853 und im höher aufgelösten gespreizten Bereich von 5,5 bis 7,5 730 Spots detektiert werden.

Aus beiden Gelgruppen (Wildtyp und Mutante) in beiden pH-Bereichen wurde jeweils ein

	Gruppe 1: Wildtyp				Gruppe 2: Mutanten G ₈₁				
	V.-Nr. ^{a)}	GZ ^{b)}	z.S. ^{c)}	Av. G1 ^{e)}	GZ	z.S.	Av. G1 ^{e)}	Av. G2 ^{e)}	Av. G1+G2 ^{f)}
pH 4 - 7	1	789	789	707	802	556	612	744	
	2	736	580	667	980	561	616	800	
	3	899	635	743	913	500	563	746	
Übereinstimmung ^{d)}		804 = 100%		706 = 88%	868	539 = 67%	597 = 74%	769 = 86%	621 = 77%
pH 5.5 – 7.5	1	688	688	672	766	515	516	732	
	2	703	668	684	717	496	500	699	
	3	670	508	527	894	490	505	625	
Übereinstimmung ^{d)}		690 = 100%		627 = 91%	758	500 = 73%	507 = 74%	685 = 90%	512 = 74%

Tabelle 5.6: Computer-gestützte Detektion mitochondrialer Proteinspots (25°C) in den Gelen von Wildtyp und Mutante für eine an einer Proteomanalyse orientierten Auswertung.

a) V.-Nr.: Versuchsansatz

b) GZ: Gesamtzahl aller deklierten Spots im Durchschnittsgel der Gelgruppe im Versuchsansatz

c) z.S.: Anzahl an Spots, die dem Durchschnittsgel des 1. Versuchsansatzes als Referenzgel (jeweils Wildtyp) zugeordnet werden konnten.

d) durchschnittliche Menge der übereinstimmenden Spots, ausgedrückt in %, bezieht sich auf die durchschnittliche Deckungsgleichheit der Proteinspotmuster des Wildtyps im Vergleich zur Mutante.

e) Av.Gx: Anzahl an Spots, die einem Durchschnittsgel aller Versuchsansätze der Gelgruppe des Wildtyps (G1), bzw. der Mutante (G2) zugeordnet werden konnten.

f) Menge der einander zugeordneten Spots in den Gesamtdurchschnittsgelen beider Gelgruppen.

Gesamtdurchschnittsgel errechnet, in dem die Spots der drei Durchschnittsgel aus den drei Versuchsansätzen einander zugeordnet wurden. Die Zuordnung beinhaltete ebenfalls die Errechnung durchschnittlicher Spotintensitäten. So konnten z.B. für die Gelgruppe des Wildtyps (im pH-Bereich von 4-7) 804 Spots in das Gesamtdurchschnittsgel aufgenommen werden (siehe Tab. 5.6, Zeile „Übereinstimmung“). Die Zuordnung von Spots der gleichen Gelgruppe erfolgte entweder zum Durchschnittsgel des ersten Versuchsansatzes (Spalte z.S.) oder zum Gesamtdurchschnittsgel der Gelgruppe (Spalte Av.Gx.). Die Zuordnung von Mutanten- zu Wildtypspots geschah durch Vergleich der Mutantenspots der Einzeldurchschnittsgel mit dem Gesamtdurchschnittsgel des Wildtyps (Spalte Av.G1 in der Mutantengruppe) oder durch Vergleich der beiden Gesamtdurchschnittsgel beider Gruppen (Spalte Av. G1+G2). Dabei lag der Anteil von einander zugeordneten Spots im pH-Bereich von 4 bis 7 zwischen 74 und 77%. Im Bereich von pH 5,5 bis 7,5 konnte diese Deckungsgleichheit reproduziert werden.

Die quantitative Analyse der Proteinmuster beinhaltete den Vergleich aller Spot-Intensitäten in den beiden Gesamtdurchschnittsgelen von Wildtyp und Mutante. Dazu wurde jeweils der Quotient der Intensitäten des Wildtypgelspots und des zugeordneten Spots in der Mutante als Faktor F_N gebildet. Die Spotintensitäten waren dabei normiert auf die Summe aller Spotintensitäten des Durchschnittsgels (vgl. Abschnitt 5.1.6.1.3, Computer-gestützte Auswertung von Gesamtextrakt-Gelen). Tabelle 5.7 zeigt die Spotzahlen, die in den Wildtypgelen um einen Faktor > 3 angereichert, bzw. um $F_N < 0,3$ reproduzierbar abgereichert gefunden wurden.

Im Wildtyp zeigte ein Spotanteil von 4,5% im Bereich von pH 4-7 und 9,6% im Bereich

von pH 5,5-7,5 eine Expressionszunahme von über 150%. 22 von diesen 28 Spots sind in den Abbildungen 5.22A und B als Spots 1 bis 7 und 5a bis 5m gekennzeichnet. In Abbildung 5.23 sind es die Spots 14 bis 19. Der Anteil der in der Mutante auf über 150% angereicherten Spots lag bei durchschnittlich 4,5%. Von diesen Spots sind 4 majore in Abbildung 5.22A auf der rechten Seite mit römischen Ziffern angezeigt. Über 90% der Spots zeigten demnach nur eine schwache Regulation, die in der Größenordnung der Standardabweichung lag, bzw. waren in beiden Gruppen gleich exprimiert. Die meisten der majoren Spotunterschiede bestanden jedoch, wie aus Abb. 5.22 ableitbar, in einer Abreicherung in der Mutanten.

Veränderung der Spotintensitäten im Vergleich WT vs. G ₈₁		
	pH 4-7 621 Spots ¹⁾	pH 5,5-7,5 511 Spots ¹⁾
relative Expression	Spotzahl (ausgedrückt in %)	Spotzahl (ausgedrückt in %)
Faktor >3	28 (4,5%)	49 (9,6%)
Faktor <0,3	32 (5,2 %)	18 (3,5%)
Faktor 0,3-3,0	561 (90,3%)	444 (86,9%)
ohne Zuordnung	12 (1,9%)	7 (1,4%)

Tabelle 5.7: Quantitative Einordnung der Unterschiede von mitochondrialen Spotintensitäten (25°C). 1): Zuerst liegen die relativen Intensitäten aller Spots aus den Gesamtdurchschnittsgelen von Wildtyp und G₈₁. Der Faktor ergibt sich aus dem Quotienten $I_{WT}/I_{G_{81}}$. Angegeben sind die Mengen von im Wildtyp stark an- bzw. abgereicherter Spots. Nicht- bzw. schwächer regulierte Spots liegen im Bereich des Faktors von 0,3 bis 3,0. Die Anzahl der Spots, die keinem entsprechenden Spot im Vergleichsdurchschnittsgel zuzuordnen waren, ist in der letzten Zeile angegeben.

5.1.7.1.1 Proteinchemische Charakterisierung mitochondrialer Spots

Einige der major-abgereicherten Spots in G₈₁ wurden durch MALDI-Fingerprint-Analyse proteinchemisch charakterisiert. Die Ergebnisse sind Tabelle 5.8 zu entnehmen. Dabei konnten Untereinheiten von 4 unterschiedlichen Atmungsketten-Proteinkomplexen gefunden werden, aus dem Succinat-Dehydrogenase-Komplex (Komplex II), dem Cytochrom-b/c-1-Komplex (Komplex III), dem Cytochrom-c-Oxidase-Komplex (Komplex IV) und dem ATP-Synthase-Komplex (Komplex V). Auch wichtige Enzyme aus dem Zitronensäurezyklus, wie Aconitase und Succinat-Dehydrogenase lagen herunterreguliert vor. Zugeordnet werden konnte auch Spot 1 zum Na⁺/H⁺-Antiporter Nhx1p, der eine Rolle im intrazellulären Na⁺-Haushalt spielt [NASS et al. 1997]. Bei dessen systematischem Knock-Out kommt es, wie beim Knock-Out der meisten an der Atmungskette beteiligten Proteinuntereinheiten, zur Ausbildung von Wachstumsdefekten bei Kultivierung auf einer nicht durch Gärung metabolisierbaren Kohlenstoffquelle wie Glycerin oder Ethanol.

Als in der Mutante stark abgereichertes und dort praktisch nicht detektierbares Protein wurde Spot 3 gefunden, charakterisiert als Isopropylmalat-Synthase (siehe Abbildung 5.24).

Spot-Nr.	zug. Pep.	M _w [Da] (Gel)	M _w [Da] (theoret.)	pI (Gel)	pI (o.M.) ¹	Protein	Gen	Bezeichnung
1	8/14	70000	70100	4,6	4,5	Nhx1p	YDR456W	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter
2	10/16	65000	58889	5,0	5,5	Atp2p	YJR121W	F ₁ F ₀ -ATP-Synthase-Komplex, β-Kette
3	14/21	68000	68409	5,9	5,7	Leu4p	YNL104C	2-Isopropylmalat-Synthase
4	11/19	45000	45361	5,1	5,5	Pdx1p	YGR193c	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Protein X
3b/4b	13/22	36000	55529	6,5	7,0	Atp1p	YBL099w	F ₁ F ₀ -ATP-Synthase-Komplex, α-Untereinheit (Fragment)
5b	9/9	47000	47379	6,9	7,3	Qcr1p	YBL045C	Ubichinol-Cytochrom-c-Reductase-Komplex, 44kDa-Hauptprotein
5c	12/13	41500	40478	6,4	7,2	Qcr2p	YPR191W	Ubichinol-Cytochrom-c-Reductase-Komplex, 40kDa-Kette II
5h	15/20	38000	40478	6,4	7,2	Qcr2p	YPR191W	Ubichinol-Cytochrom-c-Reductase-Komplex, 40kDa-Kette II
6	8/11	23000	17000	6,2	6,5	Atp16p	YDL004W	ATP-Synthase-Komplex, δ-Untereinheit
8	10/13	85000	85400	8,1	8,2	Aco1p	YLR304C	Aconitat-Hydratase (Aconitase)
12	10/15	25000	23250	7,4	7,8	Atp4p	YPL078C	F ₁ F ₀ -ATP-Synthase-Komplex, Untereinheit 4 (Untereinheit b)
14	9/14	97000	97800	6,9	7,0	Fzo1p	YBR179C	benötigt für Biogenese von Mitochondrien
16	14/21	70000	70200	7,3	7,5	Sdh1p	YKL148C	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein-Vorläufer
17	10/20	53000	54920	6,4	6,5	Atp1p	YBL099W	F ₁ F ₀ -ATP-Synthase-Komplex, α-Untereinheit
18	9/15	55000	58800	7,2	7,1	Cox1p	Q0045	Cytochrome-c-Oxidase, Untereinheit I (mitoch. Genom)

Tabelle 5.8: Ergebnisse der proteinchemischen Charakterisierung von in G₈₁-Mitochondrien abgereicherten Proteinuntereinheiten. Die Nummerierung der Spots entspricht den in den Abbildungen 5.22 und 5.23 vorgenommenen Beschriftungen.

1) pI (o.M.): pI-Wert bei Fehlen der natürlich vorkommenden posttranslationalen Modifikationen

Das Enzym katalysiert die erste Reaktion in der Leucin-Biosynthese und kommt sowohl im Cytosol als auch in der Mitochondrien-Matrix vor. Es steht nicht mit unmittelbaren Funktionen des Mitochondriums im Zusammenhang und hebt sich so von den anderen charakterisierten Untereinheiten ab. Ferner besitzt die *LEU4*-mRNA, wie ca. 200 andere mRNAs der Bäckerhefe, in ihrer 5'-untranslatierten Region einige kleinere offene Leserahmen (sogenannte „upstream open reading frames“, abgekürzt uORFs), die in einem posttranskriptionalen Regulationsmechanismus auch Einfluss auf die Stabilität der mRNA und so auf die Menge des translatierten Proteins

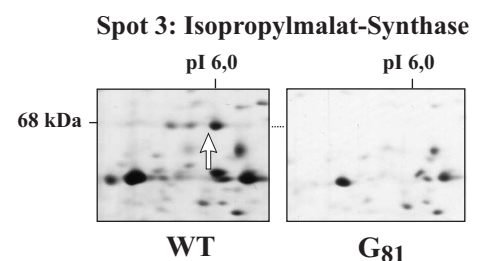


Abbildung 5.24: Abreicherung von Leu4p (Isopropylmalat-Synthase) in Mitochondrien von G₈₁ bei 25°C. Die in der Mutante vorhandene Menge des Proteins lag unter der Nachweisgrenze der verwendeten Silberfärbung.

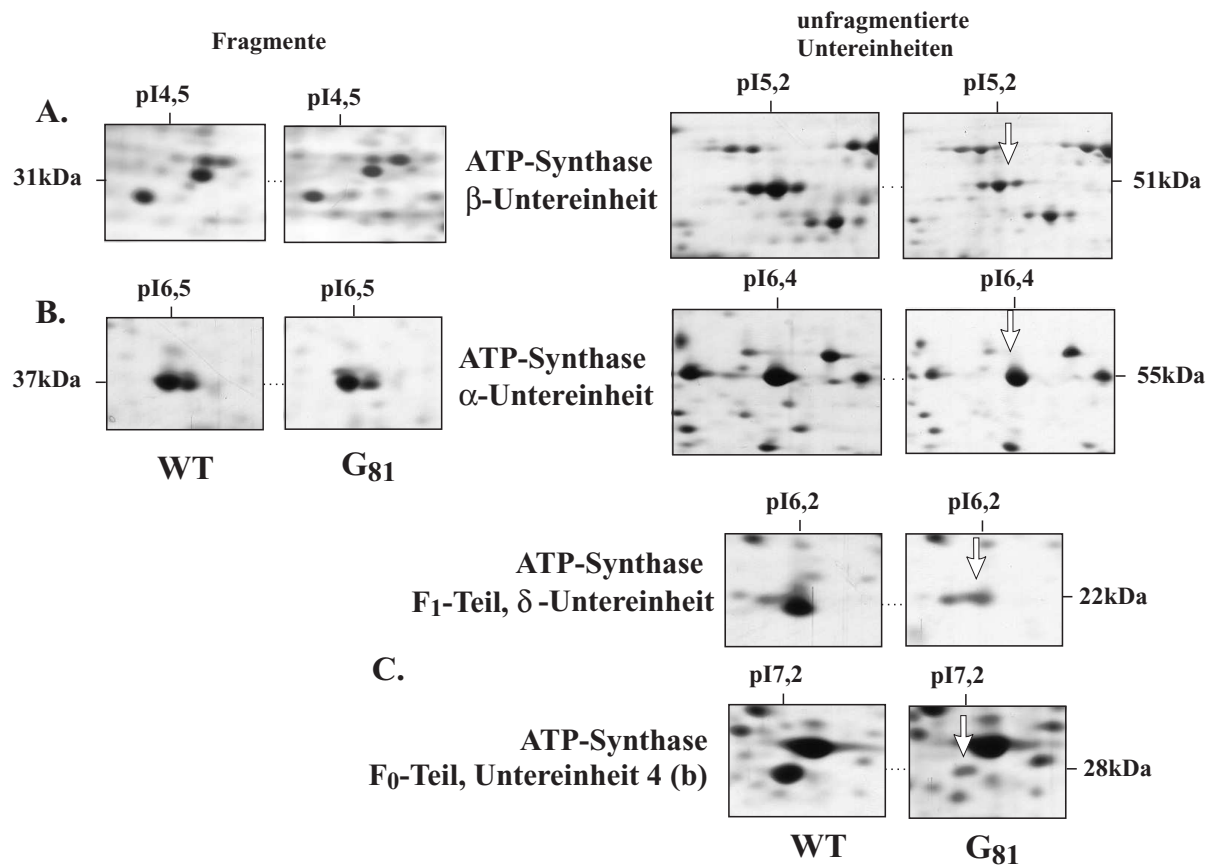


Abbildung 5.25: Verhalten der mitochondrialen ATP-Synthase-Untereinheiten nach Inkubation bei 25°C

zu haben scheinen [VILELA et al. 1998]. Von diesen 200 mRNAs codieren auch einige für regulatorische Proteine, die für die Biogenese und Funktion von intakten Mitochondrien nötig sind. Eine mögliche interessante Verbindung dieser Tatsache zur Funktion des Hypp wird in der Diskussion auf Seite 173 aufgezeigt.

5.1.7.1.2 Verhalten des ATPase-Komplexes bei 25°C

Die Veränderung im Expressionsverhalten des F_1F_0 -ATP-Synthase-Komplexes und seinen Untereinheiten nach Inkubation bei permissiver Temperatur wird hier im Überblick dargestellt. Gefunden wurden die α - und β -Untereinheit (Spots 2 und 17 als Atp1p und Atp2p) und deren in Abschnitt 5.1.6.1.5 beschriebenen Fragmente. Eine weitere Untereinheit des F_1 -Teils, die δ -Untereinheit (ATP16p), wurde Spot 6 zugeordnet. Als Untereinheit aus dem nicht enzymatisch aktiven membranständigen F_0 -Komplex wurde erneut die Untereinheit 4 (Atp4p) (Spot 12; Spot 10 in der Gesamtlysate-Analyse, Abschnitt 5.1.6.1.5) charakterisiert. In der Computerunterstützten Gelauswertung erwiesen sich alle gefundenen Unterschiede als signifikant und reproduzierbar. Der Grad der Abreicherung in der Mutante zeigte sich jedoch bei den einzelnen Spots sehr unterschiedlich. Abbildung 5.25 zeigt eine Übersicht aller ATP-Synthase-Spots anhand von Ausschnitten aus Beispielgelen.

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit zeigten dabei eine schwache Abreicherung in G81 um einen Faktor von maximal 2. Dieses Bild spiegelte sich sowohl im Vergleich der unfrag-

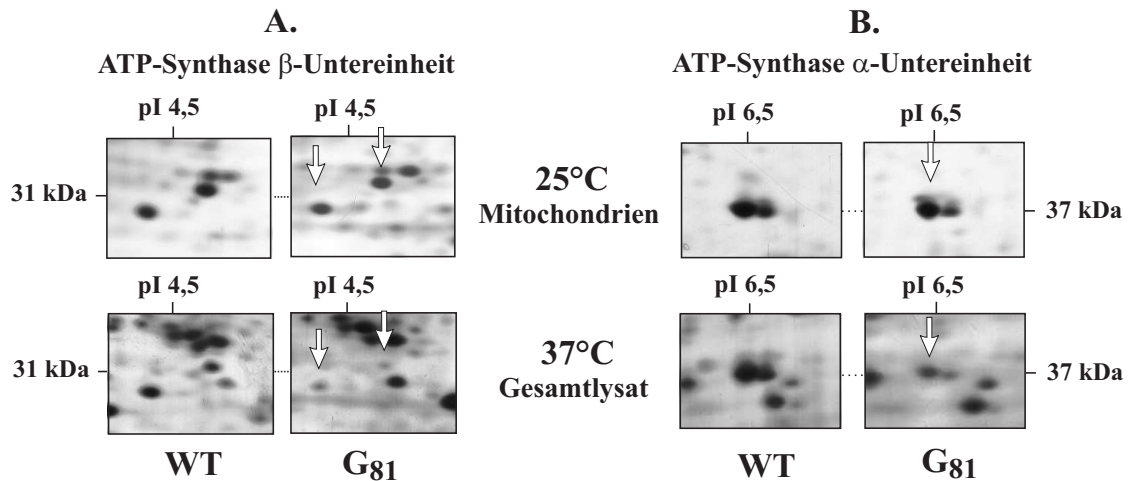


Abbildung 5.26: Vergleich der Spotintensitäten von Fragmenten der ATP-Synthase-Untereinheiten α und β nach Inkubation bei 25°C und 37°C.

mentierten Untereinheiten als auch im Intensitätsmuster der Fragmente beider Untereinheiten wider (Abb. 5.25A und B). Eine erheblich stärkere Regulation zeigten die δ -Untereinheit des F_1 - und die Untereinheit 4 des F_0 -Komplexes. Die Expression in der Mutante lag in beiden Fällen um einen Faktor von über 4 unter der des Wildtyps (Abb. 5.25C). Die Betrachtung der Untereinheiten-Stöchiometrie von $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ im F_1 -Teil des ATP-Synthase-Komplexes der Hefe zeigt, dass die α - und β -Untereinheiten pro F_1 -Komplex dreimal häufiger vorkommen als die δ -Untereinheit. Man kann demnach folgern, dass die stärkere gemessene Abreicherung der δ -Untereinheit auch in der Stöchiometrie des Komplexes mitbegründet liegt.

Die Stöchiometrie des F_0 -Komplexes, der integral-membranständig ist und den enzymatisch nicht aktiven Teil des Protonenkanals trägt, ist nicht sicher geklärt. Vieles deutet jedoch darauf hin, dass die Untereinheit 4 (auch b-Untereinheit genannt) zweifach in jedem Gesamtkomplex vorliegt. Dies wurde aus dem Vergleich mit dem Aufbau des besser charakterisierten ATP-Synthase-Komplexes aus *E. coli* deutlich. Dort besitzen die Untereinheiten a bis c des F_0 -Teils die Stöchiometrie $a_1b_2c_{10}$. Zwischen den Spezies variiert hierbei die Zahl der c-Untereinheiten [SAWADA et al. 1997]. Bei Annahme einer zweifachen b-Untereinheit liesse sich der Grad der beobachteten Abreicherung in G_{81} im Vergleich mit der δ -Untereinheit nicht voll mit dem Komplexaufbau erklären.

In Abbildung 5.26 ist ein Vergleich der charakterisierten Fragmente aus den α - und β -Untereinheiten des ATP-Synthase-Komplexes nach Inkubation bei 25°C und 37°C dargestellt. Das Spotmuster dieser Fragmente, wie es in den 2D-Gelen aus Gesamtproteinextrakten nach Inkubation bei 37°C vorlag, konnte in den Gelen von Mitochondrienisolationen bei 25°C exakt reproduziert werden. Aus dem Vergleich dieser Gelausschnitte wird deutlich, dass beide Untereinheiten in der Mutante bei permissiver Temperatur bereits schwach abgereichert vorlagen; nach der Temperaturanhebung auf 37°C verringerte sich die Proteinmenge beider Untereinheiten jedoch um ein mehrfaches, wie aus den Spotintensitäten aus Abbildung 5.26 ersichtlich ist.

Die Beobachtungen aus 2D-Gel-Analysen von isolierten Mitochondrien nach Inkubation bei 25°C deuteten darauf hin, dass die Gesamtfunktionalität der Mitochondrien in G₈₁ bereits bei dieser Temperatur stark beeinträchtigt vorlag. Das Verhalten des ATP-Synthase-Komplexes ließ darauf schließen, dass es erst bei restriktiver Temperatur zum weitgehenden Ausfall der ATP-Synthase-Aktivität kam, die bei 25°C zum Teil noch vorhanden war. Dieser Hypothese wurde in weiteren Studien dieser Arbeit genauer nachgegangen (Abschnitt 5.1.8f.).

5.1.7.2 2D-Gel-Analyse von isolierten Mitochondrien nach Inkubation bei 37°C

Fortgesetzt wurde die G₈₁-Charakterisierung mit der Betrachtung mitochondrialer Protein-expressionsmuster nach Inkubation bei restriktiver Temperatur. Dazu wurden in einem gleichen Ansatz, wie in Abschnitt 5.1.7.1 beschrieben, Kulturen aus unabhängigen Mutanten- und Wildtyp-Isolierungen bei 25°C über Nacht angezchtet und in die spätlogarithmische Wachstumsphase gebracht. Nach Einstellung der optischen Dichten wurden sie für 12 h bei 37°C inkubiert. Vor Anlegen der höheren Temperatur lag die optische Dichte OD₆₀₀ der Mutanten-Kulturen bei 0,6. Dieser Wert wurde gewählt, da ihr Wachstumsverhalten vor Eintreten der Wachstumsarretierung zu einer weiteren Verdopplung der Zellzahl führte. Mit einer Erntedichte von ca. 1,2 lagen die Kulturen so im frühlogarithmischen Bereich und eigneten sich so am besten für die Zellfraktionierung. In diesem OD-Bereich erhöhten die Zellen noch nicht die Stärke ihrer Zellwände, so dass ein Verdau der äußeren Zellwand durch Zymolyase am effektivsten war. Die Wildtyp-Kulturen wurden auf eine sehr niedrige optische Dichte eingestellt, so dass ihre Erntedichte nach 12 h bei 37°C ebenfalls etwa 1,2 betrug.

Die Mitochondrienisolation führte zu Pellet-Fraktionen von Wildtyp und Mutante, die in ihrem Aussehen den Fraktionen nach 25°C-Inkubation ähnelten. Die Braunfärbung der Wildtyp-Mitochondrien war intensiver als die entsprechende 25°C-Fraktion, während die Pellets der Mutante eine noch schwächere Braunfärbung aufwiesen.

Die 2D-Gel-Elektrophorese wurde mit Gelen der Größe 20 × 20 cm im pI-Bereich von 4 bis 7 durchgeführt. So konnte im Vergleich zur Analyse bei 25°C für diesen pI-Bereich die Spot-Auflösung der 12 angefertigten Gele in beiden Dimensionen verbessert werden.

Abbildung 5.27 zeigt jeweils ein Gel aus einer Gruppe von 6 Gelen von Wildtyp und G₈₁. Erkennbar ist, dass im Vergleich mit den Mitochondrien-Gelen bei 25°C weniger Spots im Wildtyp eine Anreicherung über 150% aufwiesen. Diese Spots sind in der Abbildung durch Pfeile markiert. Beide Spotmuster zeigten viele Spots, die entweder gleich exprimiert oder schwächer reguliert erschienen. Dabei konnten die Ergebnisse aus den 25°C-Experimenten tendenziell bestätigt werden. Der ATP-Synthase-Komplex und auch die anderen Atmungskettenkomplexe wurden in der Mutante abgereichert gefunden.

Die proteinchemische Charakterisierung von unterschiedlich exprimierten Spots geschah auch hier durch massenspektrometrische Analyse der aus der Gelmatrix isolierten Peptid-Gemische. Verwendet wurde Endoproteinase Lys-C, die gegenüber Trypsin zwar im Durchschnitt längere Peptide erzeugt, da sie C-terminal nach Lysinresten, nicht aber nach Argininresten spaltet, das entstehende Peptidgemisch jedoch kaum durch Eigenverdaupeptide aus Lys-C

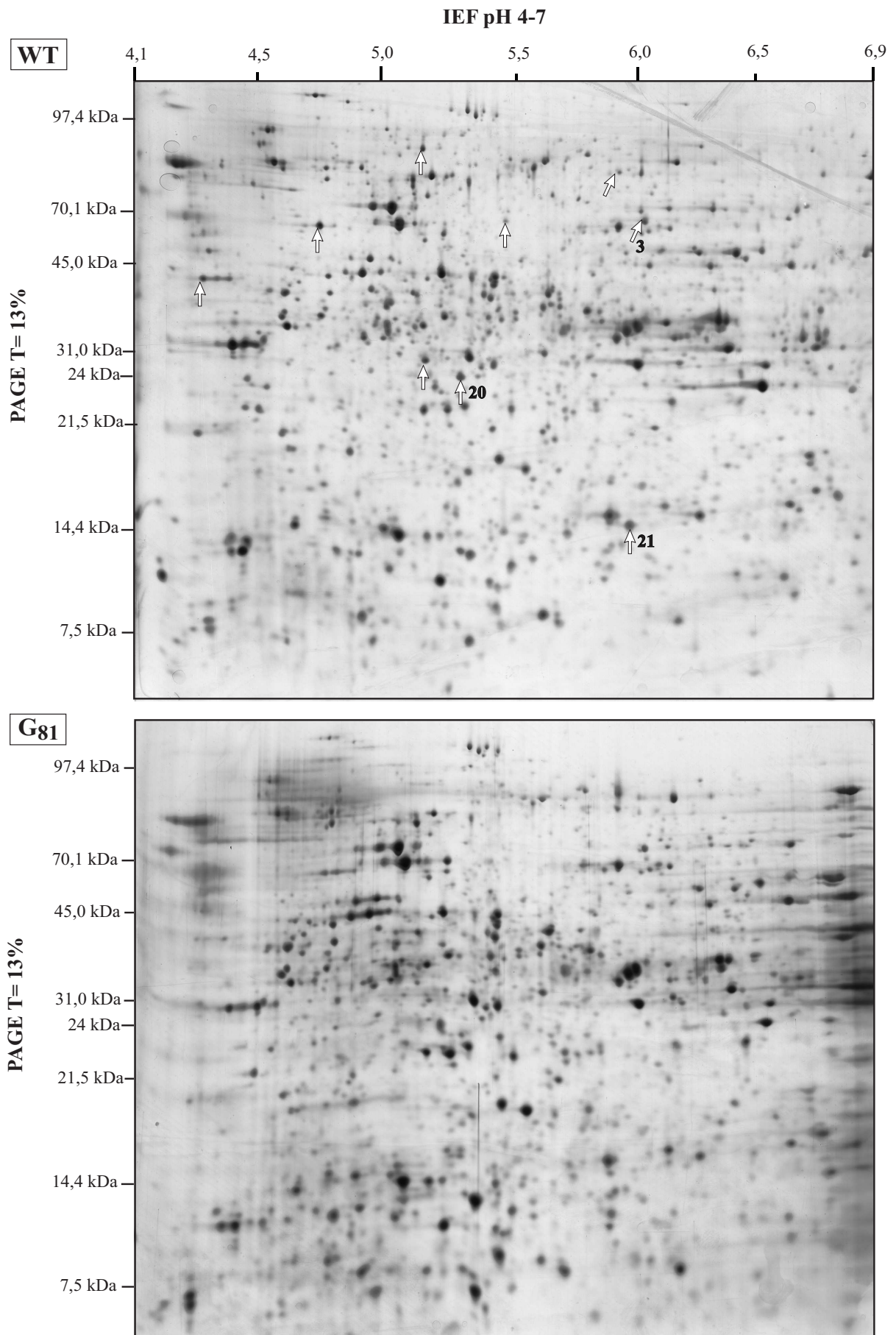


Abbildung 5.27: Zwei Beispielgele von Wildtyp und Mutante im pI-Bereich von 4 bis 7. Als Probe dienten Mitochondrienisolationen aus Kulturen nach Inkubation bei 37°C für 12 h. Eingesetzt wurden jeweils 750 µg Protein, die Sichtbarmachung der Spots erfolgte durch Silberfärbung nach MANN.

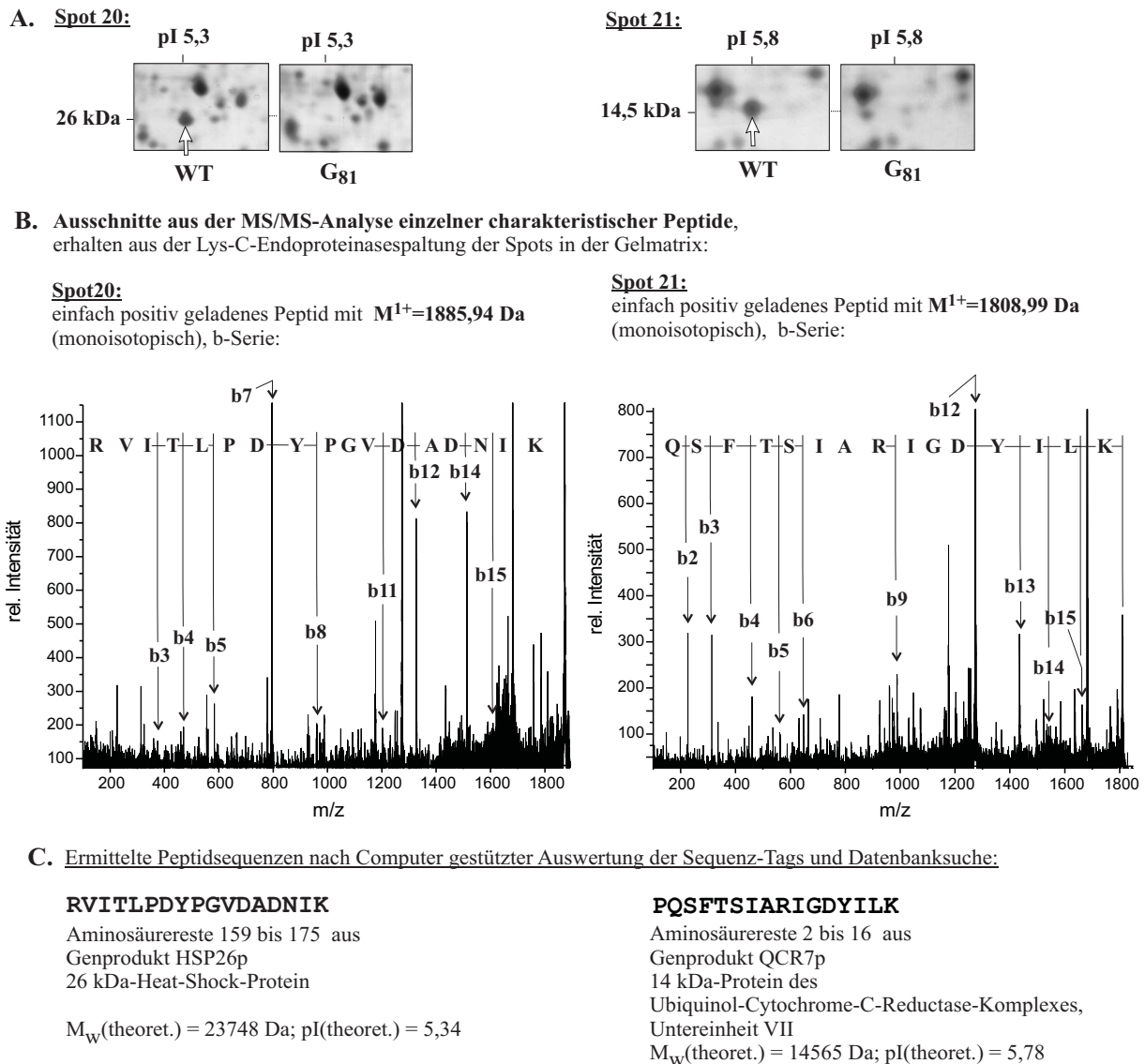


Abbildung 5.28: Stark verminderte Expressionsraten in Mitochondrien aus bei 37°C inkubierten G₈₁-Zellen der in Spot 20 und 21 enthaltenen Proteine, bzw Proteinuntereinheiten sowie Auszüge aus deren massenspektrometrischen Charakterisierung.

kontaminiert wird. Die Selbstverdaupeptide dieses Spaltenzyms liegen bis auf ein Peptid der Masse 2928 Da in einem Massenbereich von 8200 bis 16940 Da. Diese Fragmente liegen weit über dem m/z-Bereich von 800 bis 5000, in dem die meisten Spaltpeptide mit Reflektor-TOF-MALDI-Massenspektrometern bei hoher Präzision (50 ppm Massenabweichung) vermessen werden und erhöhen so nicht die Komplexität des Peptid-Massenspektrums. Ferner eluieren sie in der C18-Reversed-Phase-HPLC bei sehr hohen %B-Werten und stören eine chromatographische Auftrennung der Spaltpeptidmischungen nicht. Abbildung 5.28 zeigt die starke Expressionsanreicherung der Spots 20 und 21 in G₈₁-Mitochondrien bei restriktiver Temperatur sowie zwei Tochterionen-Massenspektren von zugehörigen Peptiden.

Die Ermittlung von Sequenzinformation geschah mittels massenspektrometrischer Peptidsequenzierung durch Fragmentierung in der Kollisionszelle eines MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometers. Für mehrere Lys-C-spezifische Spaltpeptide aus jedem Peptidgemisch konnte

R.Nr.	a	a*	b	b*	Seq.	y	y*	R.Nr.
1	70,07		98,06		P			16
2	198,12	181,10	226,12	209,09	Q	1711,94	1694,91	15
3	285,16	268,13	313,15	269,12	S	1538,88	1566,85	14
4	432,22	415,20	460,22	443,19	F	1496,85	1479,82	13
5	533,27	516,25	561,27	544,24	T	1349,78	1332,75	12
6	620,30	603,28	648,30	631,27	S	1248,73	1231,71	11
7	733,39	716,36	761,38	744,36	I	1161,70	1144,67	10
8	804,43	787,40	832,42	815,39	A	1048,62	1031,59	9
9	960,53	943,50	988,52	971,50	R	977,58	960,55	8
10	1073,61	1056,58	1101,61	1084,58	I	821,48	804,45	7
11	1130,63	1113,61	1158,63	1141,60	G	708,39	691,37	6
12	1245,66	1228,63	1273,65	1256,63	D	651,37	634,35	5
13	1408,72	1391,70	1436,72	1419,69	Y	536,34	519,32	4
14	1561,81	1504,78	1549,80	1532,77	I	373,28	356,25	3
15	1634,89	1617,86	1662,89	1645,86	L	260,20	234,17	2
16					K	147,11	130,09	1

Tabelle 5.9: Massenspektrometrische Charakterisierung von Spot 21 mit dem MALDI-TOF-TOF. MS/MS-Fragmentierungstabelle des einfach positiv geladenen Peptids PQSFTSIARIGDYILK mit dem monoisotopischen m/z-Massenwert 1809,06. Es enthält die Aminosäurereste 2 bis 16 der Mitochondriensignalsequenz vom 14 kDa-Protein aus dem Ubiquinol-Cytochrome-C-Reduktase-Komplex (EC 1.10.2.2, Komplex III, Untereinheit VII, Genprodukt Qcr7p). 34 von 88 theoretischen Fragmentionen konnten gefunden werden und sind durch Fettdruck hervorgehoben. Bei den mit * gekennzeichneten Serien ist an den Fragmentionen formal eine NH₃-Gruppe von 17 Da verloren gegangen.

so Computer-unterstützt Sequenzinformation gewonnen werden. Die Datenbankrecherche ergab die Zuordnung zu den Stammproteinen („Proteomics Analyzer 4700“-Software der Fa. „Applied Biosystems“ für die Serienzuordnung der erhaltenen Fragmentionen sowie „Mascot“-Suchalgorithmus der Fa. „Matrix Science“ für die Datenbankrecherche). In Tabelle 5.9 ist die MS/MS-Fragmentierungstabelle exemplarisch für ein Lys-C-Peptid der Masse 1808,99 Da aus Spot 21 dargestellt.

Bevorzugt werden in der MS/MS-Analyse Fragmentionen der b- und y-Serien gebildet, bei denen der Bindungsbruch genau in der Peptidbindung erfolgt [BIEMANN 1988]. Bei Fragmentionen der y-Serie wird die Bindung vor dem neu entstehenden N-Terminus gespalten; der genuine C-Terminus des Peptids ist in allen Ionen der Serie erhalten. Bei a- und b-Serien bleibt der genuine N-Terminus erhalten. Keine C-terminale Carbonylgruppe besitzen a-Fragmente; der Bruch des „Rückgrats“ erfolgt an der C-C-Bindung zwischen dem α -C-Atom der Aminosäure und der Carbonylgruppe. Bei b-Fragmentionen ist die C-terminale Carbonylgruppe erhalten. Tabelle 5.9 enthält fast die gesamte y-Serie des 16 Aminosäurereste enthaltenden Peptids, wobei b- und y-Serie überlappen. So kann auch bei unvollständigen Serien aus den für jede Aminosäure charakteristischen Massendifferenzen die Sequenz des gesamten Peptids mit Ausnahme einer Unterscheidung von Leucin und Isoleucin abgeleitet werden.

	Spot 20	Spot 21
Zahl gefundener Peptide (Sequenz-Abdeckung)	6/12 (33%)	5/8 (43%)
Peptid für MS/MS [M ¹⁺] [Skalenwert S]	1275,36 Da [65] 1887,14 Da [51] 2057,44 Da [59]	1418,70 Da [70] 1806,96 Da [66] 1808,99 Da [69] 2204,15 Da [57]

Tabelle 5.10: Übersicht über die massenspektrometrische Charakterisierung von Spot 20 und 21. Angegeben ist die Zahl der zur theoretischen Proteinsequenz zugeordneten Peptide sowie die erreichte Sequenzabdeckung. Darunter sind die monoisotopischen Massen einzelner einfach positiv geladener Peptide, die in der Sequenz enthalten waren, aufgeführt. Mit diesen wurden MS/MS-Fragmentierungen durchgeführt. Die jeweils gefundenen Skalenwerte sind angegeben.

Tabelle 5.9 zeigt auch, dass von 88 möglichen Fragmentionen der a-, b- und y-Serien 34 zuzuordnen waren, was für die Zuordnung mehrerer Sequenzausschnitte des Peptids ausreichend war. Die Datenbanksuche ergab, dass es sich um ein Peptid am N-terminalen Ende von Qcr7p, einem 14 kDa-Protein aus dem Ubiquinol-Cytochrome-C-Reduktase-Komplex, handelte. Die Wahrscheinlichkeit P , dass es sich bei der aus der Peptid-Fragmenttabelle erhaltenen Zuordnung um ein Zufallsereignis handelte, wird durch einen nach oben offenen Skalenwert S angegeben, mit

$$S = -10 \cdot \log(P).$$

Ein Skalenwert > 16 zeigt Peptide mit signifikanter Homologie ($P < 0,05$), ein Skalenwert > 22 repräsentiert Peptide mit Identität oder sehr großer Homologie ($P \ll 0,05$). Der erreichte Skalenwert für das Peptid aus Tabelle 5.9 lag bei 69. Drei weitere Fragmentierungen anderer Peptide ergaben die gleiche Proteinzuzuordnung bei ähnlichen Skalenwerten (Tabelle 5.10, unter Spot 21).

Im Fall von Spot 20 wurde nach Identifizierung eines Peptids der Masse 1885,94 Da mit 20 von 96 Fragmentionen (Fragmentierungstabelle nicht gezeigt) eine Zuordnung zum Protein HSP26p, einem Hitzeschockprotein der Masse 26 kDa, mit einem Skalenwert von 51 getroffen. Dieses Ergebnis wurde sowohl durch Vergleich mit dem MALDI-MS-Fingerprint-Ergebnis des Spots aus dem Überblickspektrum, in dem 6 von 12 möglichen Peptiden wiedergefunden wurden, als auch in zwei weiteren MS/MS-Fragmentierungen von weiteren zwei der 6 Peptide mit hohen Skalenwerten bestätigt (siehe Tabelle 5.10).

Das Ergebnis aus Spot 21 bestätigte die Abreicherung des Komplexes III der Atmungskette, die auch bei permissiver Temperatur beobachtet wurde. Desweiteren wurde durch die Abreicherung des HSP26p deutlich, dass G₈₁-Zellen nur eingeschränkt oder nicht in der Lage sind, auf den angelegten Stress (Temperaturerhöhung von 12 Grad auf 37°C) durch die Ausbildung eines typischen Hitzeschock-Phänotyps – u.a. mit der Expression wichtiger Hitzeschockproteine – zu reagieren.

Die Abreicherung der Isopropylmalatsynthase in der Mutante konnte auch bei 37°C in Mitochondrienpräparationen bestätigt werden, wie aus Abbildung 5.29 abgeleitet werden kann. Die massenspektrometrische Spot-Charakterisierung von Spot 3 erfolgte wie bei der zuvor gezeigten Charakterisierung aus 25°C-Proben durch MALDI-MS-Fingerprinting.

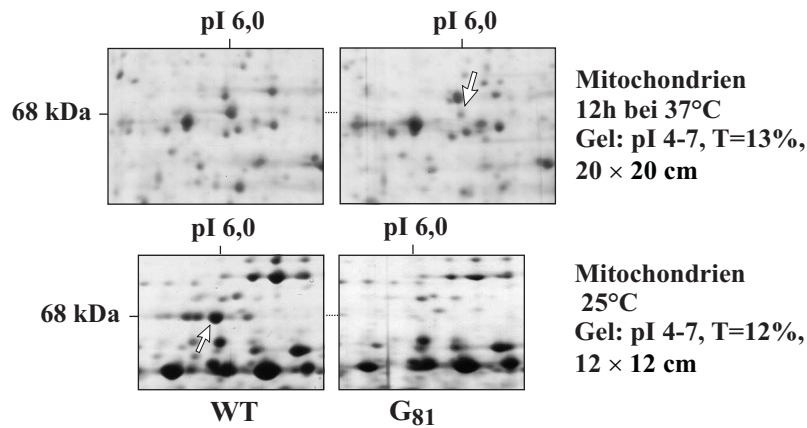


Abbildung 5.29: Bestätigung der Abreicherung von Spot 3, Isopropylmalatsynthase, in Mitochondrien von G₈₁ im Vergleich zum Wildtyp auch bei restriktiver Temperatur. Gegenüberstellung der Ergebnisse bei 37 und 25°C.

5.1.8 Überprüfung der mitochondrialen Aktivität und Funktionalität des mitochondrialen Genoms

Die Expressionsprofilanalysen auf Proteinebene durch 2D-Gel-Analysen hatten eine Beeinträchtigung der Atmungsaktivität von G₈₁-Zellen sowohl bei 25°C als auch bei 37°C gezeigt.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die mitochondriale Funktion von G₈₁-mutierten und Wildtyp-Zellen an isolierten mitochondrialen Fraktionen aus beiden Stammsorten überprüft. Es war zu klären, ob das mitochondriale Genom in G₈₁-Zellen funktionsfähig vorlag.

5.1.8.1 Messung des Atmungsketten-Membranpotentials an isolierten Mitochondrien

Eine wichtige Voraussetzung für die mitochondriale Funktion ist das Vorhandensein eines mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$. Da Untereinheiten des F₀- und des F₁-Teils des mitochondrialen ATPase-Komplexes sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene (siehe Abschnitt 5.1.9) als sehr schwach exprimiert in der Mutante G₈₁ bei beiden Temperaturstufen gefunden wurden, stellte sich die Frage, inwieweit aerob gezüchtete Zellen mit der mutierten *HYP*-Funktion überhaupt in der Lage waren, bei restriktiver und permissiver Temperatur ein $\Delta\psi_m$ -Potential aufzubauen.

Die Fluoreszenz und Absorption bestimmter Farbstoffe wie des hier verwendeten Cyanin-Farbstoffs 3,3'-Dipropylthiocarbocyaniniodid DiSC₃(5) (Formel siehe Abbildung 5.30) reagieren hoch sensitiv auf das mitochondriale innere Membranpotential. Mit Hilfe des Farbstoffes konnte das Vorhandensein und die Stärke eines $\Delta\psi_m$ an isolierten Mitochondrien bestimmt werden. Die Methode basiert auf der Potential-abhängigen Verteilung des Farbstoffs zwischen Mitochondrien und Medium. Der kationische Farbstoff diffundiert bei vorhandenem Potential bevorzugt an die partiell negativ-geladene Seite der inneren Mitochondrienmembran, was zu abnehmender Fluoreszenz im Medium oder veränderter Emission („quenching“) des in den Mitochondrien akkumulierten Farbstoffs führt. Die gemessene

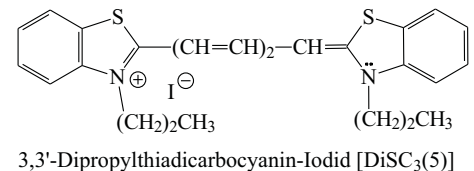


Abbildung 5.30: Struktur des kationischen Cyanin-5-Farbstoffs DiSC₃(5), dessen Aufnahme in Mitochondrien abhängig von $\Delta\psi_m$ ist.

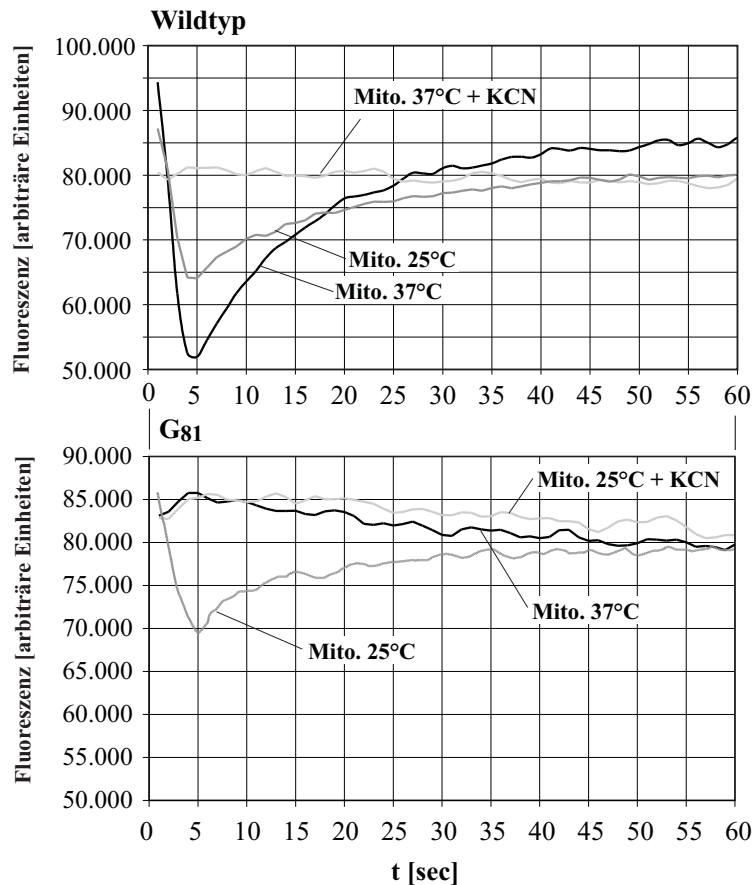


Abbildung 5.31: Test auf Vorhandensein eines $\Delta\psi_m$ in Mitochondrien aus Wildtyp- und Mutanten-Kolonien nach Inkubation bei 25°C und 37°C. Die deutliche Abnahme der Emission im Fluoreszenz-Zeit-Diagramm direkt nach Zugabe gleicher Mengen der mitochondrialen Präparate zeigt eine Farbstoffkonzentrationsabnahme im Medium bzw. einen Quenching-Effekt an. Dieser wird durch Akkumulation des kationischen Cyaninfarbstoffs an der inneren Mitochondrienmembran hervorgerufen. Diese Vorgänge können nur bei Mitochondrien mit intaktem $\Delta\psi_m$ auftreten. Blockierung der Cytochrom-Oxidase durch Hemmung der Ferriform des Häm a_3 mit CN^- -Ionen führt zu einem Abbruch des Elektronentransfers und zur Aufhebung des $\Delta\psi_m$. KCN-vergiftete Mitochondrien dienen daher als Negativkontrollen.

Emission wird daher mit steigendem $\Delta\psi_m$ geringer ([WAGGONER 1979], [SIMS et al. 1974]).

Für die Messung wurden Mitochondrienfraktionen aus Mutanten- und Wildtyp-Kulturen nach Inkubation bei permissiver und restriktiver Temperatur nach einem Standard-Protokoll gewonnen. Ein Aliquot an Mitochondrien (abgeschätzt durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm) wurde in eine vorbereitete rührbare Quarzküvette gegeben, die im Puffergemisch jeweils gleiche Mengen $\text{DiSC}_3(5)$ sowie Tris-Succinat und Tris-Malat als Template des mitochondrialen Metabolismus enthielt. Die Küvette wurde auf konstant 25°C temperiert und der Emissionsverlauf pro Zeiteinheit bei 670 nm nach Excitation des Farbstoffs bei 620 nm aufgezeichnet. Als Negativkontrollen dienten Mitochondrienfraktionen des Wildtyps bei 37°C und der Mutante bei 25°C, die mit dem Potential-zerstörenden mitochondrialen Inhibitor Kalium-Cyanid (KCN) behandelt wurden. Abbildung 5.31 zeigt die zeitliche Veränderung der gemessenen Fluoreszenz nach Zugabe der mitochondrialen Fraktionen.

Beim Wildtyp verursachten die bei 37°C und 25°C gewonnen Mitochondrien einen schnellen Abfall der Emission, wobei der Effekt bei den 37°C-Mitochondrien am ausgeprägtesten war. Beide Fraktionen zeigten demnach wie erwartet das Vorhandensein eines $\Delta\psi_m$, welches bei der

mit KCN behandelten Wildtyp-Fraktion nicht messbar war. Die Fluoreszenz dieser Reaktionsmischung wurde durch Zugabe der inhibierten Mitochondrien nicht beeinflusst, was durch das Fehlen des Emissionsabfalls erkennbar war.

Bei den aus der ts-Mutante G₈₁ gewonnen Mitochondrien zeigten nur die aus Kulturen nach Inkubation bei permissiver Temperatur gewonnen Mitochondrien einen Fluoreszenzabfall, der jedoch deutlich schwächer ausfiel als bei der entsprechenden Wildtyp-Mitochondrienfraktion. Bei den Mitochondrien aus 37°C-Kulturen konnte wie bei den mit KCN vergifteten 25°C-Mutanten-Mitochondrien kein Abfall der Emission beobachtet werden.

Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass in Mitochondrien aus G₈₁ bei 25°C ein Membran-Potential in abgeschwächter Form im Vergleich zum Wildtyp aufgebaut werden kann. Nach dem Temperaturschift auf 37°C kommt es jedoch zu dessen vollständigem Verlust.

5.1.8.2 Wachstumsverhalten auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen

Alle Experimente mit der Mutante G₈₁ haben eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung, die mit verminderten Expressionsraten von Untereinheiten von Atmungsketten-Komplexen einher geht, gezeigt. Die 2D-Gel-Analyse erbrachte die Unterexpression von zum Teil mitochondrial codierten Untereinheiten von Cytochrom-c-Oxidase, Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase und ATP-Synthase. Ferner verdeutlichte die Isolierung von *YHM2* als Suppressor des Hochtemperaturphänotyps von G₈₁ [YOUNG 1998] den Zusammenhang zwischen der Stabilität des mitochondrialen Genoms und den phänotypischen Eigenschaften der Mutante. Daraus stellte sich die Frage, ob in G₈₁-Zellen bei 25°C noch funktionsfähige mt-DNA enthalten war oder Mutationen im mitochondrialen Genom vorlagen, die zur Ausschaltung der auf ihm codierten Gene führten.

Je nach Ausmaß der Veränderung der mt-DNA teilt man mitochondriale Mutationen unterschiedlich ein:

- Kleinere Läsionen, die einzelne Gen-Funktionen betreffen (bezeichnet als *mit*⁻) bzw. ρ^+ . Die mitochondriale Atmungsfähigkeit in diesen Stämmen ist oftmals erhalten (falls kein atmungsessentielles Gen von der Mutation betroffen ist).
- Große Deletionsmutationen, welche die Synthese aller Mitochondrien-Proteine blockieren (bezeichnet als „cytoplasmatisch petite“ oder ρ^-).
- Kompletter Verlust des mitochondrialen Genoms (ρ^0).

mit⁻-, ρ^- - oder ρ^0 -Mutantenstämme besitzen sogenannte Petite-Phänotypen (langsam wachsende Stämme aufgrund Ausfall oder Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung).

Petite-Hefestämme zeigen kein Wachstum auf nicht durch Gärung verwertbaren Kohlenstoffquellen. Zur Prüfung auf Vorliegen eines Petite-Phänotyps bei G₈₁-Zellen wurde daher die Wachstumsfähigkeit der Mutanten-Stämmen in Medien, die ausschließlich Ethanol und Glycerin als C-Quellen enthielten, parallel zum entsprechenden Wildtyp-Stamm getestet. Gleichzeitig diente dieses Experiment zur Verifizierung der Ergebnisse, die aus der Messung des mitochondrialen Membranpotentials an isolierten Mitochondrien (Abschnitt 5.1.8.1) gewonnen

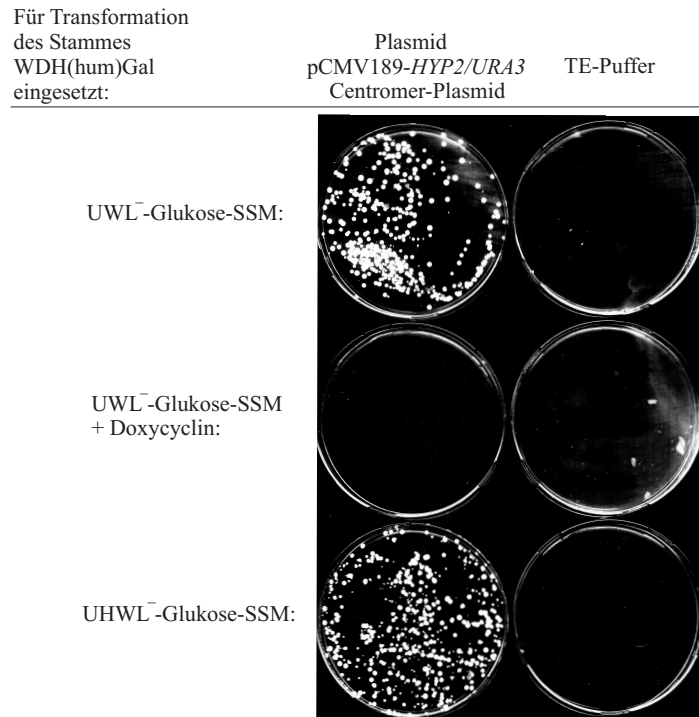


Abbildung 5.32: Überprüfung der Funktionalität des Tetracyclin-Off-Promotors im Single-Copy-Plasmid pCMV189-*HYP2*/*URA3*. Das neu generierte Hefe-Wildtyp-Plasmid pCMV189-*HYP2*/*URA3* wurde in den Stamm WDH(hum)Gal, der in den proteomischen und transkriptomischen Analysen als Wildtyp fungierte, transformiert. Auf UWL⁻-Selektivmedium ohne Zusatz des Antibiotikums Doxycyclin ist der Promotor des Tet.-Off-Plasmids aktiv, und es kommt zur Koloniebildung. Bei Doxycyclin-Gabe kommt es zur Repression. Das im Hefestamm noch vorhandene *HYP*(hum)-Gen auf dem *HIS3*-Plasmid ist durch den *GAL*-Promotor kontrolliert, der hier durch Glukose im Medium reprimiert ist.

wurden und die zunehmende Atmungsdefizienz bei Temperaturerhöhung auf 37°C gezeigt hatten.

In den bislang verwendeten Doppelknockout-Stämmen befanden sich alle *HYP*-Funktion komplementierenden Gene plasmidständig unter der Kontrolle des *GAL1-10*-Promotors. Damit war Galaktose im Medium obligat. Für den Versuch musste daher eine Umklonierung aller *HYP*-Genformen in Plasmide mit einer Zucker-unabhängigen Expressionsinduzierbarkeit erfolgen. Als Wirtsplasmid wurde pCMV189 ausgewählt, ein Plasmid, welches den stufenlos kontrollierbaren Tetracyclin-OFF-Promotor enthält. Es handelte sich um ein Single-Copy-Centromer-Plasmid mit einem *URA3*-auxotrophen Marker, bei dem die Expression im Fall der Abwesenheit eines Tetracyclin-Antibiotikums induziert ist. Mit steigender Antibiotikum-Konzentration nimmt die Repression des Promotors zu. Dementsprechend wurden die humane und die hefeeigene Wildtyp-Form (*HYP2*) sowie die punktmutierte Form G₈₁ in das Plasmid pCMV189 kloniert.

Als weitere Kontrolle wurde die zu G₈₁ analoge mutierte Form des hefeeigenen *HYP2*-Gens, G_{82V}, in den Test einbezogen. Die codierende DNA-Sequenz wurde zuvor durch die „Megaprimer-Methode“ [SARKAR und SOMMER 1990] hergestellt, mit der auf einfache Weise bereits zuvor die Punkt-Mutagenese der humanen *HYP*-Form durchgeführt worden war. [WÖHL 1994].

Mit den neugenerierten Plasmiden wurde der Hefestamm WDH(hum)Gal (humanes Wildtyp-

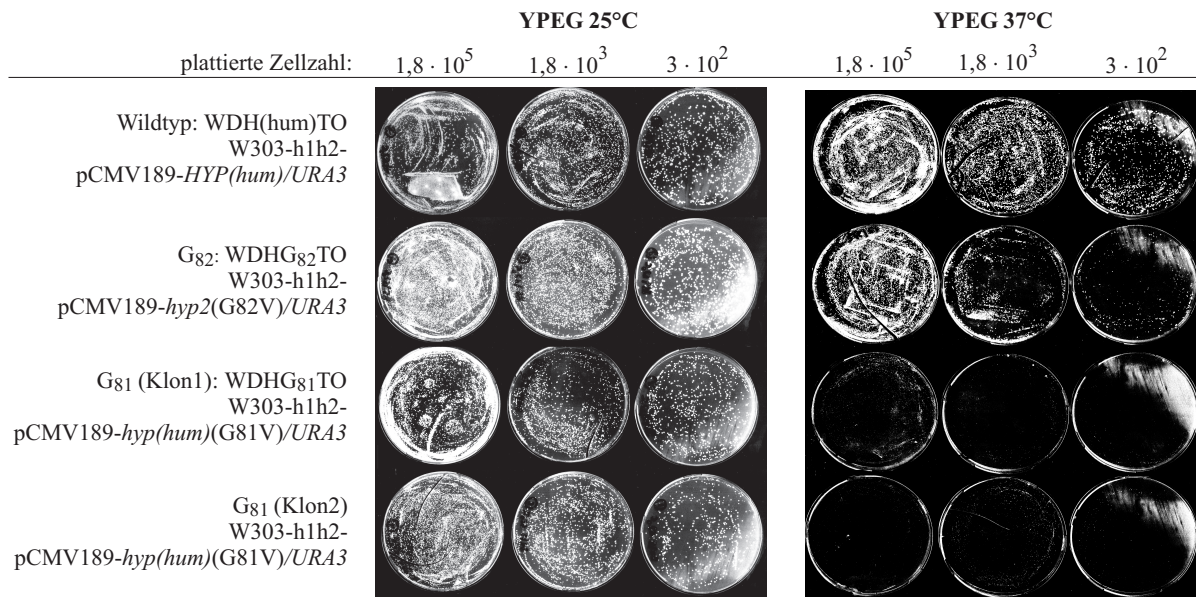


Abbildung 5.33: Wachstum der *HYP(hum)*-Mutante G₈₁ und der *HYP2*-Mutante G₈₂ auf YPEG-Medium (nur Glycerin und Ethanol als C-Quellen enthaltend) bei permissiver und restriktiver Temperatur. Als Wildtyp-Kontrolle diente der Stamm WDH(hum)TO. Alle *HYP*-Allele standen unter der Kontrolle des Tetracyclin-Off-Promotors des Plasmides pCMV189.

Gen auf Single-Copy-*HIS3*-Plasmid) transformiert. Nach spontanem Plasmidverlust durch Kultivierung der Stämme auf Vollmedium für mehrere Generationen konnte durch Plattierung auf UWL⁻-SSM und anschließende Replika-Plattierung auf UHWL⁻-SSM gegen den Verlust des *HIS3*-Plasmids selektiert werden, so dass die pCMV189-Plasmide die einzigen funktionierenden *HYP*-Gene der Stämme stellten. Die so isolierten Hefestämme erhielten die Bezeichnungen WDH(hum)TO („TO“ für Tetracyclin-OFF), WDHyp2TO, WDHG₈₁TO und WDHG₈₂TO.

Die Funktionsfähigkeit der vier neuen pCMV-Plasmide und des Tetracyclin-Off-Promotors wurde bereits vor dem spontanen *HIS3*-Plasmid-Verlust überprüft. In Abbildung 5.32 ist exemplarisch für das *HYP2*-tragende Plasmid dessen korrekte Funktion belegt, da es nach Plattierung des Stammes auf UWL⁻-Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle zur Koloniebildung kam. Diese wurde durch Anwesenheit von Doxycyclin in einer Konzentration, die den Promotor vollständig reprimierte, verhindert. Der *GALI-10*-Promotor des *HIS3*-Plasmides war dabei durch den Repressor Glukose vollständig ausgeschaltet, was ebenfalls aus dem Fehlen einer Koloniebildung auf den Antibiotikum-haltigen UWL⁻-Agarplatten geschlossen werden konnte. Die reale Anwesenheit des *HIS*-Plasmides war jedoch an der Koloniebildung auf UHWL⁻-SSM ohne Doxycyclin-Zugabe erkennbar. Alle vier pCMV189-Plasmid-Stämme erwiesen sich als funktionell.

Abnehmende Zellzahlen der *HYP(hum)*/*HIS3*-Plasmid freien Stämme wurden auf YPEG-Medienplatten ausgestrichen und bei permissiver und restriktiver Temperatur inkubiert. Abbildung 5.33 zeigt das Ergebnis der Inkubation für die Mutanten-Stämme sowie den Wildtyp-Stamm WDH(hum)TO *HYP(hum)*/URA3. Bei 25°C wuchsen alle Stämme deutlich auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen.

Bei 37°C besaß der Wildtyp ein praktisch unverändert starkes Wachstum. G₈₂ zeigte eine moderate Wachstumsabnahme, was für das Vorhandensein einer schwachen Temperatursen-

sitivität sprach. Bei beiden G₈₁-Kulturen stagnierte, wie zu erwarten, die Proliferation nach Anlegen der höheren Temperatur völlig. Die Wachstumsfähigkeit bei permissiver Temperatur beweist, dass G₈₁-Zellen bei niedrigerer Temperatur in abgeschwächter Form in der Lage sind, Stoffwechselenergie durch mitochondriale Atmung zu erzeugen. Dies bestätigte die Beobachtung des reduziert vorhandenen mitochondrialen Membranpotentials bei 25°C (Abschnitt 5.1.8.1) und spricht gegen das Vorliegen von Petite-Phänotypen.

5.1.9 Differentielle Gen-Transkriptionsprofil-Analyse der *HYP(hum)*- Punktmutante G₈₁V

Auf Proteinebene konnten zu diesem Zeitpunkt der Charakterisierung keine weiteren Aussagen über die zellulären Gründe der beobachteten Atmungsdefizienz gemacht werden. Daher wurde die Analyse auf die mRNA-Ebene verlagert, indem Transkriptomprofile der Mutante untersucht wurden. Die genomweite Transkriptomanalyse stellt eine wesentlich empfindlichere Methode zur Bestimmung der Genaktivität aller bekannten ORFs im Genom eines Organismus dar und vermag die Regulation von mRNA-Kandidaten im unteren Kopienbereich pro Zelle zu detektieren. Dies bereitet bei der Proteomanalyse von Low-Abundance-Proteinen noch Probleme. Zusätzlich wurde dadurch ermöglicht, die gewonnenen Ergebnisse auf Proteinebene mit RNA-Transkriptom-Daten zu vergleichen.

Die Forschung der letzten Jahre am Hypusin enthaltenden Protein hat seine Interaktionsmöglichkeit mit RNA offengelegt. Schon die Tatsache, dass Spermidin selbst, das Vorläufermolekül der ersten Stufe der Hypusinsynthesereaktion, tRNA zu binden vermag [POCHON und COHEN 1972], konnte erste Hinweise auf die Bindung Hypps an RNA geben. Proteinsequenzvergleiche zeigten, dass die hochbasische Aminosäuresequenz in der Umgebung des Hypusin-Restes Homologie zum NLS-Motiv des Rev-Proteins und anderer Rev-verwandter Proteine hat. Dort fungiert dieses Motiv sowohl als Kernimportsignal als auch als RNA-Bindungsstelle. Die direkte Interaktion des Proteins mit RNA in-vitro zeigten erstmals BEVEC et al. [BEVEC et al. 1996] durch RNA-Bindungsstudien eines C-terminal GST-getaggten humanen eIF-5A an die RNA-Sequenz des Rev-Responsive-Elements (RRE) aus HIV-1 im Komplex mit Rev-Protein. Desweiteren versuchten CHEN et al. zu beweisen, dass das Hypp für diese Bindung die Deoxyhypusin- oder die Hypusin-Modifikation enthalten muss und dass für die Interaktion Rev nicht essentiell ist [LIU et al. 1997]. Die Röntgenstrukturanalyse der Hyp-Proteine aus den Archae-Bakterien *Methanococcus jannashii* [KIM et al. 1998] und *Pyrococcus horikoshii* [YAO et al. 2003] zeigten die hohe Motivähnlichkeit der C-terminalen Domäne mit einer OB-Fass-Struktur (Oligonukleotid-/Oligosaccharid-bindendes Motiv), eines der häufigsten RNA-Bindungs-Motive [MURZIN 1993]. Hohe Ähnlichkeit weist diese Domäne auch mit dem Kälteschockprotein CspA aus *E. coli* auf, welches auch als RNA-Chaperon klassifiziert wurde [JIANG et al. 1997]. In der N-terminalen Domäne wurde neben einem Nucleinsäurebindungsmotiv um den Hypusin-Rest auch eine SH3-Fass-Struktur als weiteres Nucleinsäurebindungselement identifiziert. SH3-Domänen wurden z.B. in den DNA-bindenden

Sequenzanteilen von HIV-Integrase [LODI et al. 1995] oder der C-terminalen Domäne aus dem ribosomalen Protein L2-RBD [NAKAGAWA et al. 1999] gefunden.

Die Diskussion um die Eigenschaft Hypps, als RNA-Bindungsprotein am Export eines speziellen Subsets von rRNA und/oder mRNA-Spezies aus dem Zellkern an die ribosomalen Zentren im Cytosol beteiligt zu sein, führte zu der Hypothese, dass die RNA-Transporteigenschaften der Punktmutante G₈₁V im Vergleich zum Wildtyp gestört vorliegen könnten, sowohl bei permissiver als auch ausgeprägter bei restriktiver Temperatur. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte das Verhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp auf RNA-Ebene einer Transkriptomanalyse überprüft werden, um so erstmals genauere Information über die RNA-Bindungskandidaten Hypps *in vivo* erhalten zu können.

Zur Realisierung dieser RNA-Profilanalyse wurde die Hefegenom-DNA-Chip-Technologie (Mikro-Array-Technik) eingesetzt. Dies ermöglichte neben der Messung aller bekannten ORF-mRNA-Transkripte auch die Expressionsmessung von ribosomalen Ribonukleinsäuren, tRNAs und anderer kleinerer RNA-Spezies. Eingesetzt wurde ein auf der Oligonukleotid-Technik basierender Hefe-Genom-Chip der Firma Affymetrix. Die Methode wird im folgenden als „high-density oligonukleotid array“ (HDOA) bezeichnet [WODICKA et al. 1997].

5.1.9.1 Experimenteller Ansatz und Probenvorbereitung

Als Ausgangsprobenmaterial für die HDOA-Analysen dienten Gesamt-RNA-Isolierungen aus Wildtyp- und G₈₁-Kulturen bei restriktiver und permissiver Temperatur. Da Hinweise auf die Akkumulation von Hypp in den Nukleoli von HeLa-Zellen bestehen [LIPOWSKI et al. 2000], wird auch seine Beteiligung an Reifung oder Prozessierung ribosomaler RNA diskutiert. Um im Array-Experiment weiterführende Hinweise in diese Zusammenhänge zu bekommen, erschien daher der Einsatz von Gesamt-RNA sinnvoll.

Die Arbeitshypothese besagte, dass die Phänotypen der Mutante G₈₁ bei 25°C und 37°C ein verändertes Bindungsverhalten des mutierten Proteins an RNA im Gegensatz zum Wildtyp aufweisen könnten. In diesem Falle wäre der aktive Export von mit Hypp interagierenden mRNA-Kandidaten aus dem Zellkern in G₈₁ beeinträchtigt. Von den Hinweisen, die auf eine Beteiligung Hypps beim Export von mRNAs aus dem Zellkern in das Cytosol deuten, sei hier lediglich das Vorhandensein eines Hypp-spezifischen RAN-GTP-abhängigen Exportins (Exportin 4) in höheren Eukaryonten erwähnt [LIPOWSKI et al. 2000]. Eine vorliegende Transportdefizienz würde dann zu einer Anhäufung von RNA-Spezies im Zellkern der Mutante führen. Es wäre so möglich, die Überprüfung der Kern-Exporthypothese mit der Auffindung der an Hypp bindenden RNA-Spezies zu verknüpfen.

Daher wurden Gesamt-RNA-Präparationen aus intakten Zellen aus zuvor isolierten Hefe-Zellkernen und aus den cytosolischen Fraktionen gewonnen. Für die Herstellung wurden Kulturen unabhängig isolierter Stämme nach Inkubation bei 25°C und 37°C verwendet. Wildtyp- und Mutanten-Allele wurden im gleichen differentiellen Stammsystem unter der Kontrolle des Gal1-10-Promotors exprimiert wie bei der 2D-Gel-Analyse auf Proteinebene (siehe Seite 71).

Somit ergaben sich pro Array-Analyse-Experiment sechs jeweils miteinander vergleichbare RNA-Proben-Paare:

1.	Gesamt-RNA aus intakten Zellen	Wildtyp u. G ₈₁	25°C
2.	Gesamt-RNA aus intakten Zellen	Wildtyp u. G ₈₁	37°C
3.	RNA isoliert aus cytosolischen Fraktionen	Wildtyp u. G ₈₁	25°C
4.	RNA isoliert aus cytosolischen Fraktionen	Wildtyp u. G ₈₁	37°C
5.	Gesamt-RNA präpariert aus Zellkernen	Wildtyp u. G ₈₁	25°C
6.	Gesamt-RNA präpariert aus Zellkernen	Wildtyp u. G ₈₁	37°C

Bei dem verwendeten Mikro-Array-Ansatz handelte es sich um eine relative Quantifizierung der RNA-Mengen auf Grundlage von Paarvergleichen zwischen Wildtyp und Mutante. Zur Einschätzung des Kerntransportverhaltens einzelner RNA-Kandidaten konnte durch den Vergleich der Paarverhältnisse aus den Kern-RNAs mit denen der Gesamtzell-RNAs eine Regulation der RNA-Niveaus allein durch den Einfluss einer Transkriptionskontrolle eingeschätzt werden. Lag eine Transportdefizienz vor, sollte der Signalverhältniswert von Mutante zu Wildtyp bei kernisolierter RNA größer 1 werden, während das gleiche Verhältnis gemessen aus den Gesamtzell-RNA-Proben einen Wert nahe 1 beibehalten sollte.

Bei Fehlen eines messbaren Einflusses von Hypp auf den RNA-Transport konnten die erhaltenen Daten dennoch neue Hinweise auf regulierte RNA-Spezies als Folge der veränderten HYP-Funktion in der Mutanten liefern.

Die RNA wurde bei allen HDOA-Versuchen aus Kulturen nach zweistündiger Inkubation bei 37°C gewonnen. Alle Hefekulturen besaßen am Erntezeitpunkt vor Zellfraktionierung und/oder RNA-Isolierung etwa eine optische Dichte von 1.

Nach Isolierung der Gesamt-RNA-Fractionen wurden die Probenpaare gegen zwei gleiche Gen-Chip-Arrays hybridisiert. Ein Chip diente hierbei als Grundwertmessung („Baseline“), der zweite als Experiment-Messung („Experiment“). Derzeit werden häufig cDNA-hybridisierte Arrays eingesetzt, auf denen zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gelabelte unabhängige Proben gleichzeitig gemessen werden können (Multiplexing). Bei dem hier verwendeten Affymetrix-Chip-System war diese Multiplexing-Methode nicht möglich.

5.1.9.2 Allgemeine Eigenschaften der Auswertungsergebnisse

In unabhängigen Ansätzen wurden je RNA-Fraktion (Nukleus, Cytosol, Gesamtzellen, jeweils bei 25°C und 37°C) zweimal Biotin-gelabelte cRNA-Proben aus Gesamt-RNA-Präparationen als Ausgangsmaterial gewonnen, das aus separat isolierten Hefestämmen von G₈₁ und dem Wildtyp stammte.

Für die nachfolgende Analyse wurden sechs Genchips aus derselben Charge zur Hybridisierung gegen die drei Probenpaare von Wildtyp und Mutante der gleichen Temperaturstufe parallel eingesetzt. Dieser Ansatz wurde dann noch zweimal mit frisch isoliertem RNA-Material aus unabhängigen Hefekulturen wiederholt. Tab. 5.11 verdeutlicht, dass auf diese Weise der Dreifachbestimmung 4 Blöcke, bestehend aus 6 Genchiphybridisierungen, die zu 2 × 6 Vergleichspaaren von Wildtyp und Mutante führten, resultierten. Aus den digitalisierten Hybridisierungs-

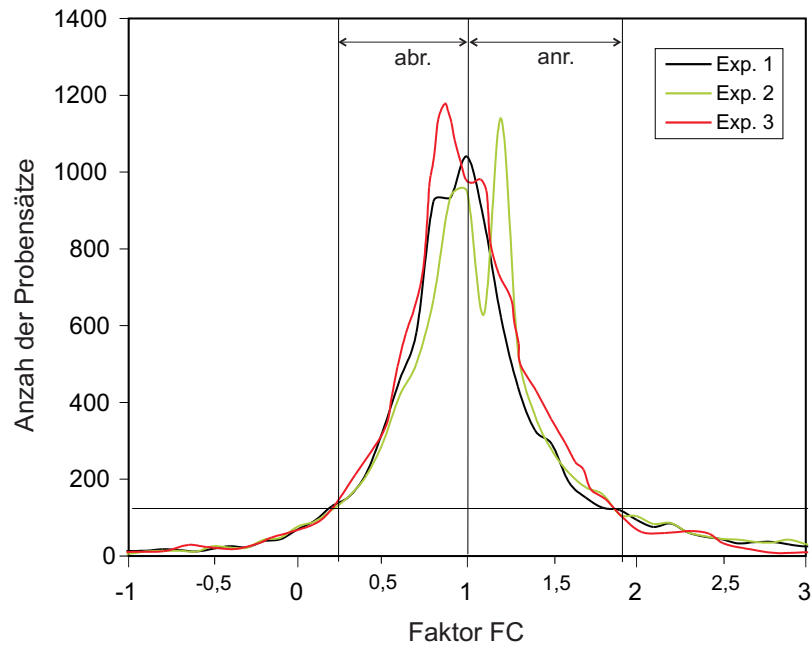


Abbildung 5.34: Verteilungen des Faktors FC in den aus 9336 Probensätzen bestehenden Datensätzen aus drei vergleichenden Einzel-Genchip-Experimenten. Sie wurden jeweils mit Gesamt-RNA (Kulturen bei 37°C inkubiert) der drei Fraktionsgruppen Nucleus (schwarzer Graph), Cytosol (grün) und Gesamtzelle (rot) durchgeführt.

fluoreszenz-Bildern aus jedem der 36 Einzelchips wurden 36 Datensätze erzeugt und mit Hilfe des Vergleichs-Algorithmensatzes der Affymetrix-Software (siehe Materialien und Methoden) 18 Paar-Vergleichsdatsätze mit *FC*- und *p*-Werten berechnet.

	25°C		37°C	
	WT	G ₈₁	WT	G ₈₁
Gesamt-RNA aus:				
Nuclei	3	3	3	3
Cytosol	3	3	3	3
Gesamt-Zellen	3	3	3	3

Tabelle 5.11: Aufteilung der insgesamt 36 durchgeführten Genchip-Hybridisierungen.

Im folgenden wird ein Satz von Oligonukleotiden, deren DNA-Sequenzen aus demselben ORF entnommen wurden, als Probensatz bezeichnet. Demnach repräsentiert ein Probensatz auf dem Genchip einen speziellen ORF des Hefegenoms.

In Abbildung 5.34 sind die FC-Wert-Verteilungen für vergleichende Chipexperimente, die mit drei verschiedenen RNA-Fraktionen (Zellkern, Cytosol, ganze Zellen) von Mutante und Wildtyp bei 37°C durchgeführt wurden, unter Einbeziehung aller Probensätze des Arrays dargestellt. Die Grafik belegt die gute Übereinstimmungen der Verteilungen in den Randbereichen. Schwankungen sind in den Median-Umgebungen zu erkennen. Das Datenmaterial zeigt jedoch für den überwiegenden Teil der Transkripte eine Streuung des Anreicherungsfaktors FC um den Wert 1. Der Hauptteil der ORFs zeigt demnach keine signifikante An- oder Abreicherung. Abzulesen ist eine Asymmetrie der Verteilungen im FC-Wert-Intervall von 1,7 bis 4, in dem mehr Transkripte eine Anreicherung aufwiesen als im entsprechenden Abreicherungsintervall. Die Verteilungen in den übrigen Chip-Experimenten der gleichen RNA-Fraktionen sowie alle Vergleiche nach Inkubation bei 25°C wiesen die in Abb. 5.34 gezeigte Asymmetrie auf. Die Mehrzahl der angereicherten Kandidaten liegen demnach im Bereich einer schwachen Anreicherung mit Faktoren von 2 bis 6. Auf die speziellen Eigenschaften der zugehörigen Gene wird weiter unten eingegangen.

untere p-Wert-Grenze: $\leq 0,065$				
Chip-Experiment-Gruppe	anger. Probensätze (Durchschnitt)	abger. Probensätze (Durchschnitt)	Σ (an+ab)	Verhältnis an/ab
Kernisolation 25°C	380	316	696	1,203
Kernisolation 37°C	413	264	677	1,564
Cytosol-Fraktion 25°C	382	331	713	1,154
Cytosol-Fraktion 37°C	419	255	674	1,653
Gesamt-RNA 25°C	423	273	696	1,549
Gesamt-RNA 37°C	364	261	625	1,395

Tabelle 5.12: Anzahl der an- und abgereicherten Transkripte in allen 12 vergleichenden Genchipauswertungen. Es wurden nur Probensätze einbezogen, deren p -Wert als Signifikanzindikator bei höchstens 0,065 lag. Die Werte sind aus den drei Einzelexperimenten mit den einzelnen mRNA-Isolierungen bei 25 und 37°C arithmetisch gemittelt.

Für die Interpretation des FC-Wertes als Indikator eines an- oder abgereicherten Transkriptes in der Mutante wurde unter Berücksichtigung der FC-Standardabweichungen, die zwischen 5 und 40% lagen, folgende Einteilung gewählt:

$$\begin{array}{ll}
 FC \geq 1,7 & \text{Anreicherung in } G_{81} \text{ gegenüber Wildtyp} \\
 -1,7 < FC < 1,7 & \text{keine signifikanten Unterschiede im Expressionsverhalten} \\
 FC \leq -1,7 & \text{Abreicherung in } G_{81} \text{ gegenüber Wildtyp}
 \end{array}$$

Die Standardabweichung des FC-Faktors im Genchipexperiment, wie hier durchgeführt, ist mit bis zu 40% als hoch anzusehen, liegt aber auch bei Vergleichen mit der Literatur in dieser Größenordnung. Zur Verbesserung der Messgenauigkeit wären weitere Mehrfachbestimmungen erforderlich. Jedoch musste die Zahl der Replikate aus Kostengründen begrenzt bleiben. Aufgrund des Auswerteverfahrens über eine Wilcoxon-Statistik konnte die Signifikanz der Messwerte durch Angabe des Vergleichs- p -Wert für jede mRNA auf dem Chip erhöht werden. So war es möglich, auch bei geringer Replikat-Anzahl verlässliche Aussagen zu treffen.

Der FC-Wert eines Transkriptes wurde als signifikant eingestuft, wenn sein p -Wert unterhalb von 0,065 lag. Dies entspricht einer 6,5%-igen Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Unterschied auch gemessen worden wäre, wenn es sich um zwei identische Wildtyp-RNA-Proben gehandelt hätte. In diesem Fall würde der Messunterschied auf reinem Zufall oder auf Verfahrens-technischen Messfehlern beruhen.

In Tabelle 5.12 spiegelt sich das Ergebnis einer asymmetrischen Verteilung von Abbildung 5.34 wider. Dargestellt sind die durchschnittlichen Zahlen an- und abgereicherter Transkripte aus den Vergleichen der einzelnen RNA-Fraktionsgruppen. Es wurden nur Probensätze berücksichtigt, deren p -Wert unter 0,065 lag. Die Transkriptzahlen aus den beiden Doppelbestimmungen wurden gemittelt. Die Zahl der angereicherten signifikanten Transkripte im FC-Wertbereich von 2 bis 6 lag in allen Fraktionen 16 bis 64% höher als die Zahl der abgereicherten. Eine Temperaturabhängigkeit der Asymmetrie oder Spezifität für den Zellkern oder das Cytosol war aus den Daten nicht zu entnehmen.

Die Höhe des Faktors FC lag bei den am höchsten an- bzw. abgereicherten Transkripten etwa der gleiche Größenordnung. Die größte Abreicherung eines Transkriptes in G_{81} (37°C)

wurde mit einem FC-Wert von durchschnittlich -19,61 gemessen, während der höchste Anreicherungsfaktor bei +25,2 lag.

Aus Tabelle 5.12 ist ersichtlich, dass in allen RNA-Unterfraktionen sowohl bei 25°C als auch bei 37°C durchschnittlich knapp 700 ORFs des Hefegenoms eine unterschiedliche Expressionsrate (Summe aus an- und abgereicherten ORFs) aufwiesen. Dies entspricht ca. 11% von 6430 ORFs, die im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert wurden.

5.1.9.2.1 Funktionelle Verteilung Hypp-abhängiger mRNAs

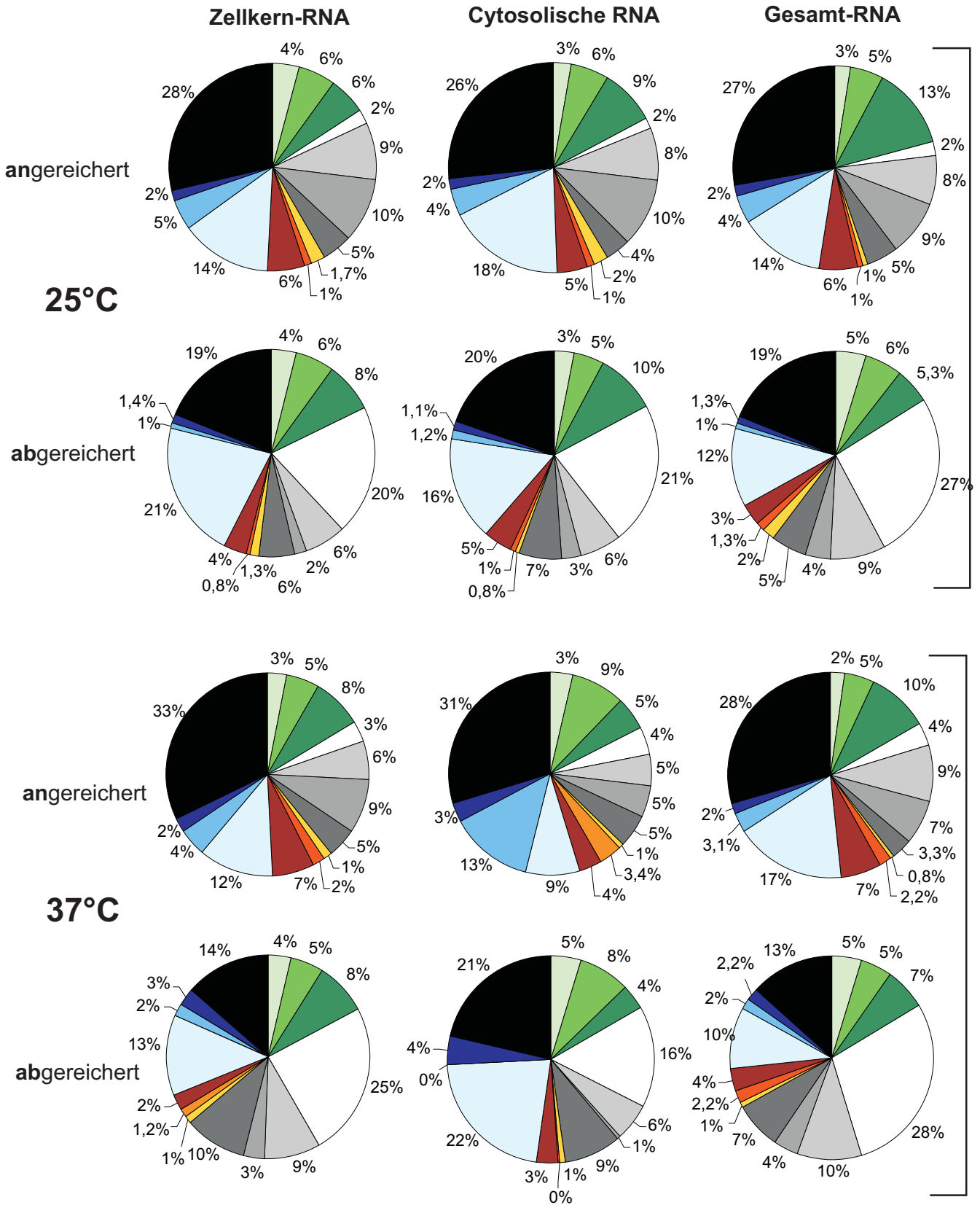
In der Mutante G₈₁ herunter- und heraufregulierte Transkripte aus den drei untersuchten differentiellen RNA-Fraktionen (nukleäre Gesamt-RNA, cytosolische Gesamt-RNA und Gesamt-RNA aus intakten Zellen) wurden auf ihre Zugehörigkeit zu zellbiologischen Funktionsgruppen untersucht. Alle zu ORFs des Hefegenoms gehörenden Probensätze auf dem Chip wurden dabei in 14 Genfunktionsgruppen eingeteilt. Hierbei dienten die Funktionsannotationen aus der „Comprehensive Yeast Genome Database“ (CYGD) des Münchener Informationszentrums für Proteinsequenzen (MIPS) [MEWES et al. 2002], Stand Juni 2003, als Referenz. Die gewählte Einteilung ist ein Kompromiss, die zellbiologische funktionelle Diversität der beteiligten Genprodukte in überschaubarer Form darzustellen und dabei dennoch eine notwendige, ausreichend große Aufsplittung der Funktionsgruppen vorzunehmen.

Eine Übersicht über die Verteilung in allen RNA-Fraktionen sowie die Beschreibung der gewählten Einteilung ist Abbildung 5.35 zu entnehmen. Den Kreisdiagrammen lagen die ab- und angereicherten Transkripte der drei RNA-Fraktionen bei 25°C und 37°C zugrunde, deren *p*-Werte unter 0,065 lagen und deren Mengen in Tabelle 5.12 aufgeführt sind. Die FC-Faktoren aus Replikat-Versuchen wurden auch hier gemittelt.

Der Anteil von ORFs mit unbekannter Funktion lag bei beiden Inkubationstemperaturen etwa gleich hoch. Im Falle der angereicherten Kandidaten lag er zwischen 26 und 33% und damit um durchschnittlich 11% höher als im Falle der abgereicherten Genprodukte (13 bis 21%).

Am auffälligsten bei der Verteilung abgereicherter Probensätze ist die hohe Zahl von Genen mit mitochondrialen Funktionen, vor allem Gene, die sowohl chromosomal als auch mitochondrial für Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe codieren. Dieser Anteil lag in allen Diagrammen zwischen 16 und 28%. Bei den angereicherten Spezies lag diese Gengruppe bei nur etwa 3%. Hier spiegeln sich Ergebnisse der proteomischen Analysen wider, die Abreicherungen von Atmungskettenkomplexen gezeigt haben (vgl. Abschnitt 5.1.6.1.4 ff.), was eine Übereinstimmung proteomischer und transkriptomischer Ergebnisse bedeutet.

Der Temperaturshift von 25°C auf 37°C wirkte sich kaum auf die Genfunktionsverteilung in den drei RNA-Fraktionen aus. Z.B. besitzen die Diagramme der Kern- und Gesamt-RNA-Fraktionen im Fall der angereicherten Gene bei beiden Temperaturen sehr ähnliche Zusammensetzungen. Abweichend von diesem Verhalten fiel in der Überexpressionspopulation der Cytosolfraction der Anteil von Genen, die an Transkription und Translation beteiligt sind, im Vergleich von 25°C und 37°C um die Hälfte, während der Anteil transposaler Elemente um



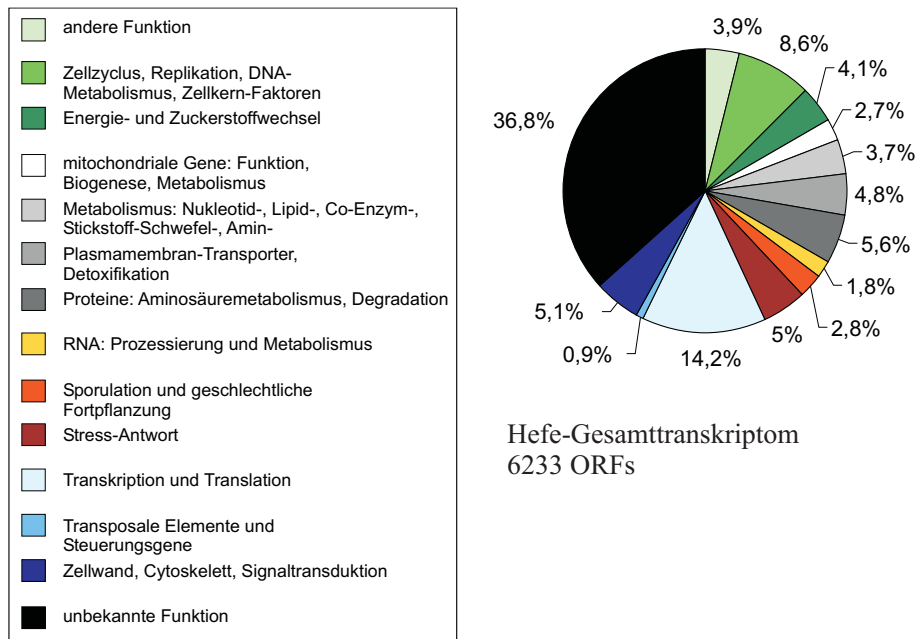


Abbildung 5.35: Funktionelle Einteilung von in G_{81} ab- und angereicherten Transkripten nach Gen-Chip-Versuchen bei permissiver und restriktiver Temperatur. Das Diagramm rechts neben der Legende zeigt die Funktionsgruppeneinteilung für das gesamte Hefe-Transkriptom, dem 6233 ORFs zugrunde liegen. Die Einteilung basiert auf den Funktionsbeschreibungen in der MIPS-CYGD-Datenbank, Stand Juli 2003.

den Faktor drei anstieg. Die spezielle Betrachtung der Expressionsmuster und der sie bildenden Gene im einzelnen unterstrich jedoch das globale Erscheinungsbild der qualitativen Unabhängigkeit vom Temperatureinfluss.

Im Vergleich zur Häufigkeit im gesamten Hefe-Genom sind Transposons und Gene zur Kontrolle dieser Elemente unter den angereicherten mRNAs signifikant angereichert. In den abgereicherten Fraktionen sind diese Gene unter 2% anwesend. Dies deutet auf eine Rolle Hypps in der Kontrolle der Transposon-Aktivität hin.

Die Verteilung der Genfunktionen des gesamten Hefe-Transkriptoms (Abb. 5.35, Diagramm rechts neben der Legende) besitzt, abgesehen vom Anteil der Gene ohne bekannte Funktion, eine viel größere Ähnlichkeit mit den Diagrammen angereicherter mRNAs sowohl bei 25°C als auch 37°C als mit den Verteilungen abgereicherter Kandidaten. Daraus kann abgeleitet werden, dass eine mögliche Wirkung des Hypusin enthaltenden Proteins, deren Störung in der Mutante G_{81} zu einer Anreicherung von mRNA-Spezies führt, sich nicht auf eine spezielle Funktionsgruppe von Genen auswirkt, sondern auf ein Subset von Genen, die verschiedene Funktionen der Zelle gleichermaßen betreffen.

Genaueres Tabellenmaterial der in der Mutante bei 37°C an- und abgereicherten ORFs kann unter „<http://www.biochem.mpg.de/Lottspeich/>“ (Stichwort Hypusin) eingesehen werden.

5.1.9.3 Ist Hypp ein RNA-Kernexportfaktor in Hefe?

Zur Klärung der Frage, ob die gestörte Hypp-Funktion in G_{81} zu einem veränderten mRNA-Kernexportverhalten eines bestimmten mRNA-Subsets in *Saccharomyces cerevisiae* führt, wurde ein Vergleich der Expressionsverteilungen von an- bzw. abgereicherten mRNAs zwischen den drei RNA-Fractionen aus Gesamtzellen, Zellkernen und Cytosol nach Inkubation bei 37°C durchgeführt.

Dazu wurden die gemittelten FC-Werte aller 9335 Probensätze nach dem mittleren p -Wert aufsteigend sortiert und 1400 Probensätze mit den kleinsten p -Werten isoliert. Diese Probensätze wurden zur Datengrundlage für Vergleiche der Expressionslevel zwischen den drei RNA-Fractionen. Probensätze, die in allen drei Fractionen keine Regulation zeigten, wurden aus den Tabellen entfernt, so dass in jedem Datensatz 841 Probensätze verblieben, die eine Verteilung der deutlich ab- und angereicherten RNAs darstellten.

Diese drei Datensätze wurden jeweils nach einem der beiden Fraktions-FC-Werten absteigend sortiert, so dass die erhaltene Tabelle mit den hochregulierten Probensätzen begann. Anschließend wurden die Datensätze in allen drei Kombinationsmöglichkeiten untereinander gemischt. Es resultierten Vergleichsverteilungen, die in Quartil-Bereiche untergliedert wurden. In jedem dieser Bereiche wurden Probenpaare ausgezählt, die einer von vier Gruppen entsprechend ihrem differentiellen Expressionsverhalten zuzuordnen waren (Abbildung 5.36).

Unterschieden wurden Paare, die in beiden Fractionen angereichert („an“) oder abgereichert („ab“) waren. Probensätze, die nur in einer RNA-Unterfraktion angereichert oder abgereichert waren, in der zweiten jedoch zwischen beiden Fractionen gleich verteilt waren, sind in der mit „v“ bezeichneten Diagramm-Säule aufgeführt. Probensätze mit umgekehrter Regulation („inv“) waren selten (0,6 bis 2%).

Bei Betrachtung der Diagramme von Abbildung 5.36 wurde die Ähnlichkeit der Proben-satzzahlen in allen vier Verteilungsbereichen und Regulationsgruppen zwischen den zellulären RNA-Fractionen deutlich. Die ab- und angereicherten Probensätze erwiesen sich bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse sogar zum Großteil als identisch. Eine detailliertere Analyse zeigte, dass ein Großteil der zwischen G_{81} und dem Wildtyp unterschiedlich exprimierten Gene in allen drei RNA-Unterfraktionen enthalten war. Ein deutlicher Anteil von im Zellkern angereicherten Probensätze bei 37°C, der auf eine gestörte Funktion des punktmutierten Hypps beim Export eines bestimmten Satzes von RNAs oder mRNAs vom Zellkern in das Cytosol hindeuten könnte, wurde demnach nicht gefunden.

Hinweise darauf gab auch die oben gezeigte Einteilung der im Expressionsniveau veränderten Gene in Funktionsgruppen (Abb. 5.35). Die Einteilung der Zellkern-Fraktion von G_{81} bei 37°C glich dort im wesentlichen den Cytosol- oder Total-RNA-Fractionen.

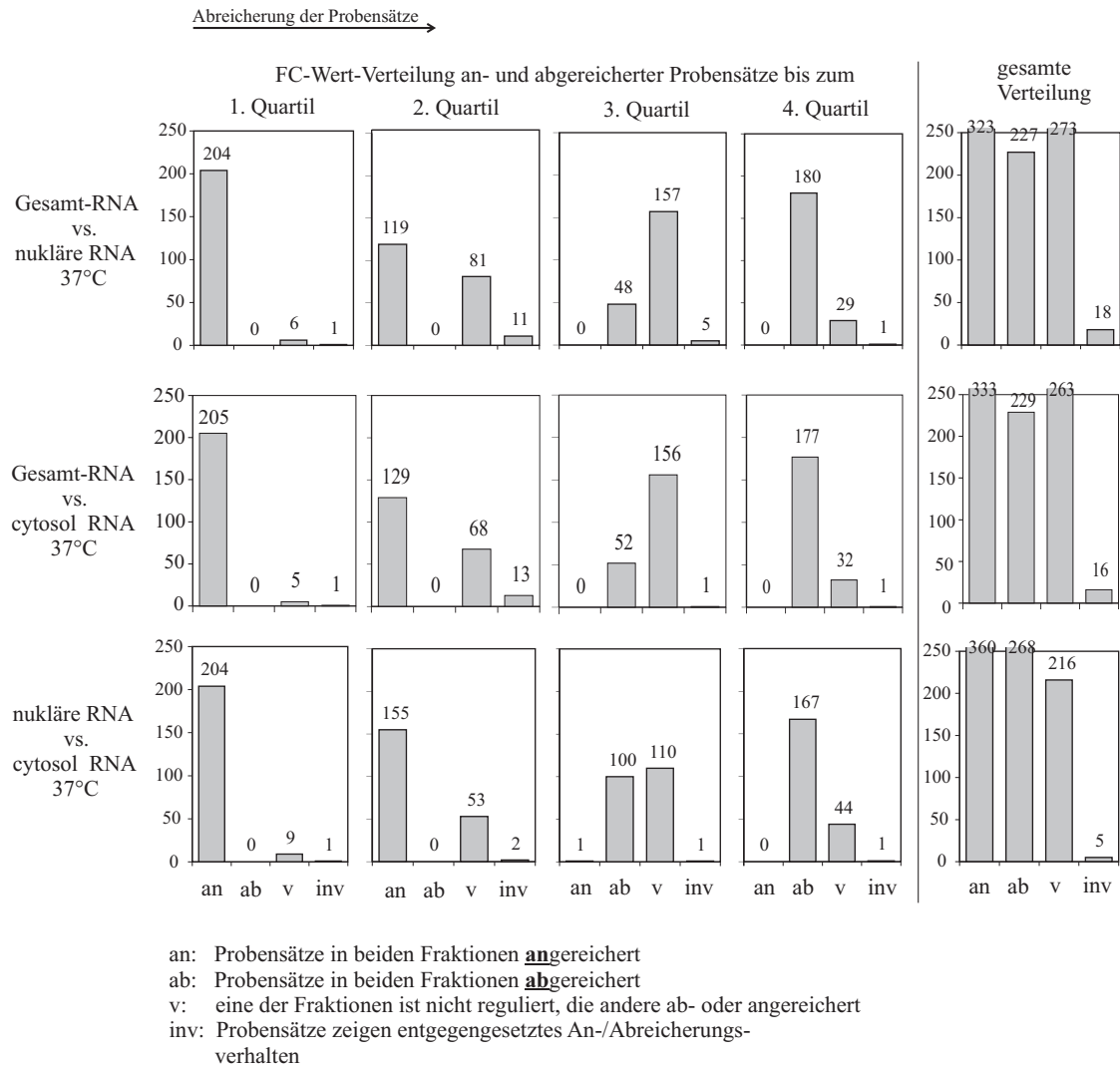


Abbildung 5.36: Vergleich der Verteilung von jeweils 841 angereicherten und abgereicherten Probensätzen mit p -Werten unter 0,065 in Abhängigkeit von der RNA-Fraktion. Die FC-Wert-Verteilung wurde in vier Bereiche (Quartile) aufgeteilt. Angegeben sind die Transkriptzahlen, die im Vergleich von jeweils zwei der gemittelten FC-Wert-Ergebnisse für kernangereicherte, cytosolische und Gesamt-RNA-Fraktionen in beiden Verteilungen angereichert oder abgereichert (unter Erfüllung der oben aufgeführten Bedingungen) gefunden wurden. Die mit „v“ gekennzeichnete Probensatz-Menge enthält ORFs, die in einer der verglichenen RNA-Verteilungen an- oder abgereichert erschienen, in der zweiten als nicht beeinflusst ($FC \approx 1$) gefunden wurden. mRNAs, die genau entgegengesetztes Anreicherungsverhalten zeigten (in der ersten Verteilung an-, in der anderen abgereichert oder umgekehrt), sind in der Diagramm-Säule mit der Bezeichnung „inv“ enthalten. Die Gesamtzahlen aller vier Probensatz-Untergruppen sind in den Diagramm-Säulen ganz rechts angegeben. Die große Ähnlichkeit aller drei Paarvergleiche in allen Quartilbereichen der Verteilung wird deutlich und zeigt eine weitgehende Unabhängigkeit der Menge regulierter mRNAs von der untersuchten subzellulären RNA-Fraktion.

5.1.9.3.1 Prüfung auf Kernexportdefizienz spezieller mRNA-Spezies in G₈₁

In einem zweiten Ansatz der Datenanalyse wurden die einzelnen Transkripte auf eine mögliche Zellkern-Export-Defizienz hin analysiert. Dazu wurden Bedingungen für das Anreicherungsverhalten in den drei RNA-Unterfraktionen gestellt:

1. Transportierte Transkripte sollten bei restriktiver Temperatur im Kern von G₈₁ angereichert erschienen, jedoch nicht oder nur schwach in der Cytosol- oder Gesamt-RNA-Fraktion.
2. Bei 25°C sollten diese Probensätze in der Cytosol- oder Gesamtfraktion nicht reguliert oder schwach angereichert erscheinen, in der Kernfraktion nicht oder schwächer angereichert sein als in der entsprechenden Fraktion bei 37°C.

Es zeigte sich, dass kein Probensatz die Bedingungen reproduzierbar erfüllte. Aus den drei Parallel-Experimenten konnten insgesamt 83 Transkripte isoliert werden, die jeweils nur in einem Datensatz, niemals in allen drei Datensätzen als kernangereichert eingruppiert wurden.

Überprüfung einer 24-fachen Anreicherung von 18S-rRNA im Zellkern von G₈₁ durch quantitative RT-PCR und Northern-Blotting

In einem der drei HDOA-Ansätze mit Kern-RNA für 37°C wurden Probensätze codierend für die ribosomalen RNA-Untereinheiten 18S-rRNA, 35S-rRNA und 5S-rRNA als die am stärksten angereicherten Spezies im Kern von G₈₁ gefunden (FC-Werte: 24,46(18S); 13,15 (35S); 6,08 (5S)).

Zur Klärung der Frage, ob es sich dabei um reale Messwerte oder Artefakte handelte, wurde das Anreicherungsverhalten der 18S-rRNA in nukleären Fraktionen durch Realtime-PCR-Analysen und Northern-Blotting überprüft. Als Normierungsgen wurde *ACT1* codierend für Actin ausgewählt, dessen Expressionslevel in allen HDOA-Analysen als nicht reguliert bestimmt wurde.

Abbildung 5.37 zeigt einen Ausschnitt aus Real-Time-PCR-Messungen der Expressionsniveaus für die 18S-rRNA (Genbezeichnung *RDN18*) und die Actin-mRNA (*ACT1*). Die Quantifizierung gebildeter DNA-Mengen in den PCR-Reaktionen erfolgte durch Messung der Emissions-Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I. Zur Fluoreszenz kommt es nur bei Anlagerung des Farbstoffes in die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Die Menge des emittierten Lichtes ist dabei im relevanten DNA-Mengenbereich proportional zur gebildeten DNA-Menge. Nachteil der Methode ist die fehlende Spezifität des gemessenen Signals zu der zu messenden PCR-Amplifikation, da auch entstehende DNA aus Nebenamplifikationen mitgemessen wird. Aus Kostengründen musste auf die Durchführung des spezifischeren 5'-Exonuklease-Assays mit doppelt fluoreszenzgelabelten „TaqMan“-Proben, die zwischen den beiden Primern binden, verzichtet werden.

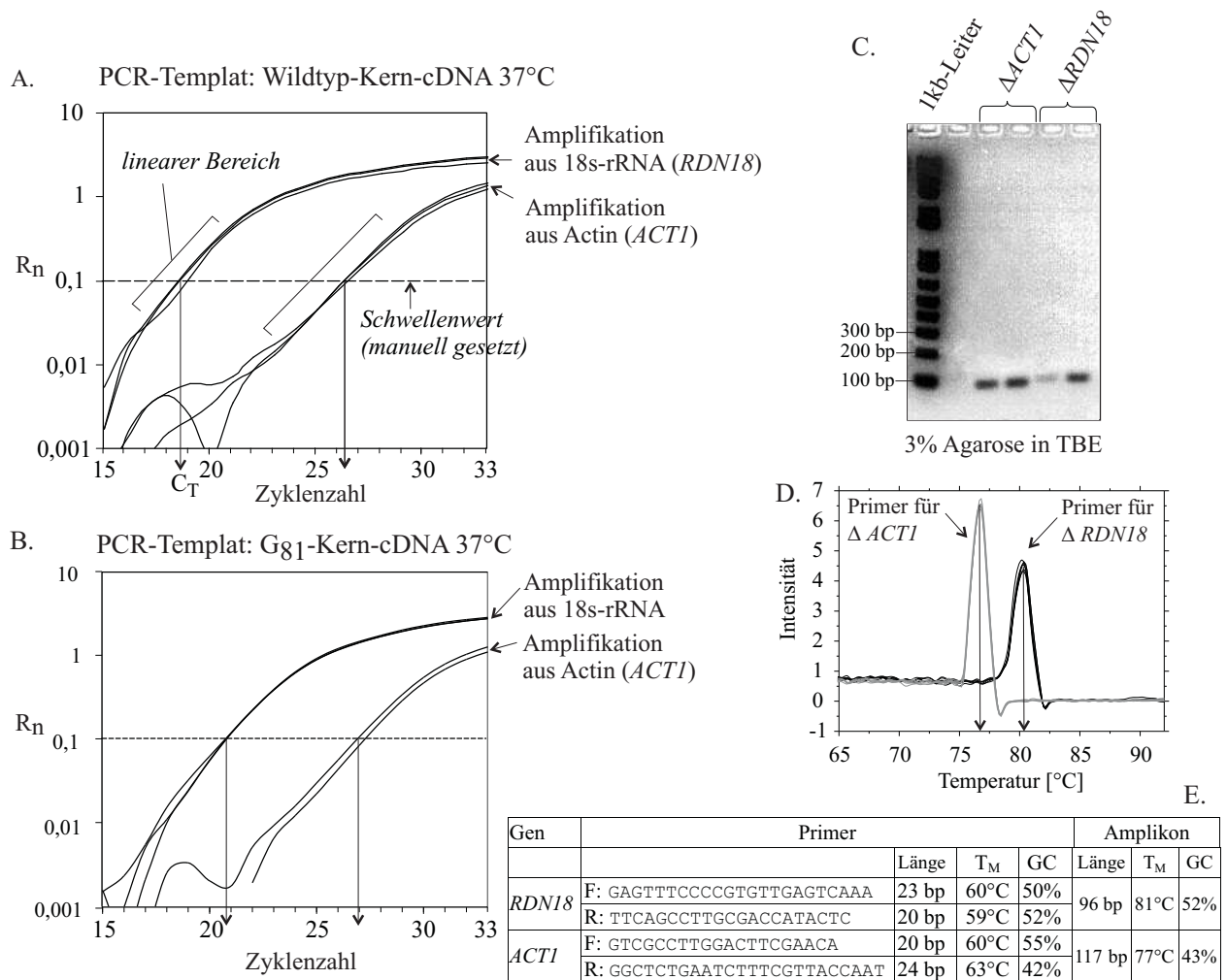


Abbildung 5.37: SYBR-Green-Real-Time-PCR zur Expressions-Niveau-Messung der 18S-rRNA (Gen: *RDNI8*) in G₈₁-Kern-RNA-Fractionen bei 37°C im Vergleich zum Wildtyp. Darstellung einer Einzelmessung in drei Replikaten.

A. und B.: Logarithmische Darstellung des SYBR-Green-Fluoreszenzintensitätsanstiegs über den für alle PCR-Reaktionen gleich festgesetzten Schwellenwert von $R_n = 0,1$, der im linearen Bereich des Zuwachses (logarithmische Skala) aller Reaktionen lag. In einem Diagramm ist jeweils der PCR-Verlauf von *RDNI8* und *ACT1* dargestellt, getrennt für G₈₁ (unten) und den Wildtyp (oben). Die cDNA-Ausgangskonzentrationen in den 18S-rRNA-Messungen wurden aufgrund des natürlichen hohen Überschusses im Vergleich zu den Normalisierungsgenmessungen des *ACT1*-Gens stärker verdünnt. Die C_T -Werte können an den Zyklenzahlen abgelesen werden.

C.: Kontrolle der verwendeten Primer in Vorläufer-RT-PCR-Experimenten mit einem Kontroll-cDNA-Templat. Die Primerpaare für beide Zielgene erwiesen sich nach speziellem Design als sehr spezifisch. Im Ethidiumbromidgefärbten Agarosegel (3%) zeigten sich keine Nebenamplifikationen und keine Primer-Dimere, was für eine korrekte Konzentrationsmessung essentiell ist, die auf der Mengenbestimmung der gesamten mit SYBR-Green interagierenden doppelsträngigen DNA beruht.

D.: Schmelz-Diagramme für jeweils 6 Einzelamplifikationen für *ACT1* und *RDNI8*. Es wurden nur die gewünschten PCR-Produkte mit den vorausberechneten Schmelztemperaturen amplifiziert; Primer-Dimere wurden nicht detektiert.

E.: Eigenschaftsübersicht der verwendeten Primer und der gebildeten PCR-Produkte. Die Bestimmung der Schmelztemperaturen erfolgte durch den „Algorithmus des nächsten Nachbarn“ nach [BRESLAUER et al. 1986].

RT-PCR im Standardkurvenverfahren: 5 ng cDNA eingesetzt; c_0 sei 1000 Kopien/Vol. (rel.Quant.)						
Templat	Primer gegen	Geradengleichungen: $C_T = f(\log C_0)$	C_T	$\bar{c} \pm SD$	Normierung $\frac{c(RDN18)}{c(ACT1)}$	$FC \left(\frac{G_{81}}{WT} \right) \pm SD$
G₈₁ Kern 37°C	<i>RDN18</i>	$C_T = -3,79865 \cdot \log C_0 + 33,0369$	21,50 21,67 21,56	1040,68 ± 53,97	1,03036 ± 0,14955	1,091 ± 0,263 aus 6 Versuchen: 1,046 ± 0,201
G₈₁ Kern 37°C	<i>ACT1</i>	$C_T = -3,42301 \cdot \log C_0 + 37,7924$	26,75 26,55 26,35	1165,30 ± 154,66		
WT Kern 37°C	<i>RDN18</i>	$C_T = -3,32957 \cdot \log C_0 + 28,9645$	19,17 18,75 18,57	1122,45 ± 228,41	0,95726 ± 0,08251	
WT Kern 37°C	<i>ACT1</i>	$C_T = -3,46212 \cdot \log C_0 + 37,1575$	26,75 26,55 26,35	1165,299 ± 154,66		

Tabelle 5.13: Auswertung der RT-PCR-Ansätze, beschrieben in Abb. 5.37. Anwendung eines relativen Quantifizierungsverfahrens durch Standardkurven: Vor DNase-Verdau und reverser Transkription wurden ausgehend von gleichen RNA-Mengen für Wildtyp und Mutante Verdünnungsreihen pipettiert. Die Verdünnungen wurden durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und in RT-PCR-Reaktionen für die Generierung von Standardkurven eingesetzt (jeweils für Normierungsgen und Zielgen auf einer 96-Well-Platte). Ausgleichsgeraden wurden aus der Auftragung C_T -Wert (cycle threshold) $\rightarrow \log c(\text{cDNA})$ erhalten. Aus den gemessenen C_T -Werten in Triplikaten bzw. Quadruplikaten wurden mit Hilfe der Geradengleichungen die zugehörigen Konzentrationswerte für die zu bestimmenden unbekanntenen Proben zurück berechnet. Die Normierung der 18S-rRNA-Werte erfolgte gegen das „House-Keeping-Gene“ *ACT1* durch Bildung von $c(RDN18)/c(ACT1)$. Aus den normierten Werten wurde dann ein Änderungsfaktor ($FC = G_{81}/WT$) gebildet. Das Experiment wurde mehrere Male mit unabhängigen RNA-Isolierungen wiederholt. Das Durchschnittsergebnis aus sechs Einzelansätzen ist in der letzten Spalte (Mitte) angegeben.

Daher wurden die zu quantifizierenden Amplifikationsreaktionen zuvor gründlich getestet. Primer wurden nach optimalen Bedingungen so gestaltet, dass Nebenamplifikationen nicht relevanter Hefegenomabschnitte sowie die Bildung von Primerdimeren oder Hairpin-Schleifen innerhalb der Primer möglichst nicht auftraten. Der Erfolg dieses Primerdesigns zeigte sich bei der Überprüfung pipettierter Primermixtures darin, dass weder in 3%igen Agarose-Gel-Überprüfungen noch in der Schmelzkurvenanalyse der gebildeten PCR-Produkte neben den vorausgesagten PCR-Produkten Banden von Primer-Dimeren oder Nebenamplifikationsprodukten detektiert werden konnten (Abb. 5.37 C. und D.). Beide PCR-Reaktionen, die zur Amplifikation von etwa gleich großen Fragmenten (Länge ca. 100 bp) aus *ACT1* und *RDN18* führten, wurden daher als spezifisch genug für eine Quantifizierung erachtet.

Die RNA-Isolierungen aus den Kernen von Wildtyp und Mutante wurden durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben; die relativen Mengenverhältnisse der zu messenden Ziel-cDNAs blieben dabei im Vergleich mit den RNA-Ausgangs-Verhältnissen konstant, da hoch reproduzierbar gearbeitet wurde. Die Auswertung erfolgte über eine relative Quantifizierungsmethode durch Standardkurven. DNA als Standard für eine absolute Quantifizierung konnte nicht verwendet werden, da es keine Kontrolle für die Effizienz der der PCR vorangehenden reversen Transkription gibt.

Für die Standardgeraden-Generierung wurden daher RNA-Verdünnungen eingesetzt, deren Stabilität vor der RT-Reaktion durch die Behandlung der RNA-Proben nach guter Laborpraxis sichergestellt wurden. Die Ausgangs-RNA-Konzentrationen vor der Verdünnung wurden pho-

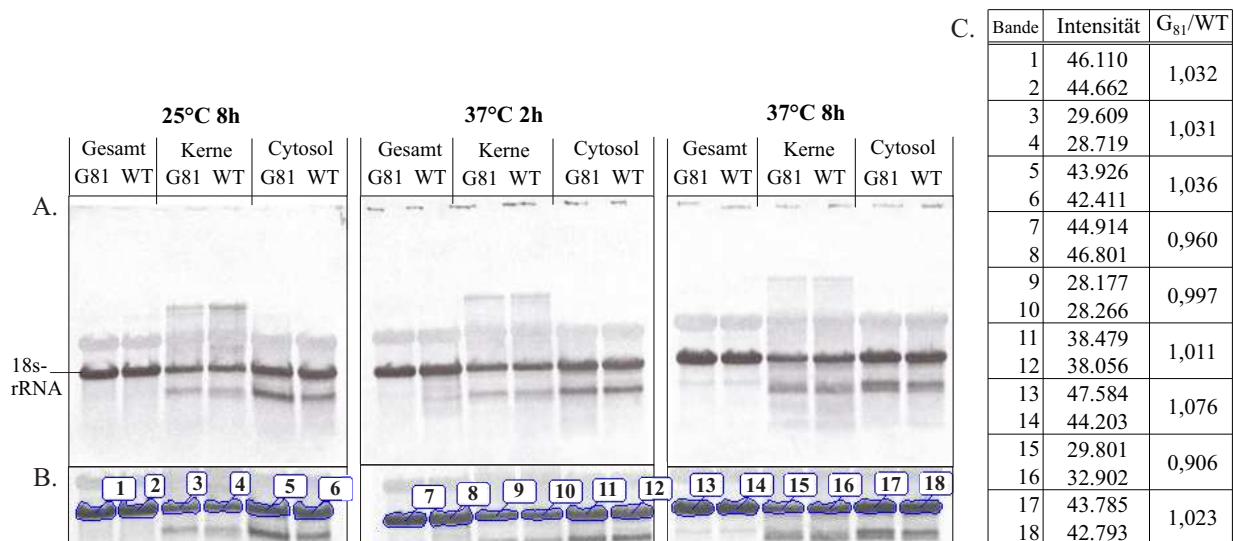


Abbildung 5.38: A.: Fluoreszierende Northern-Blots hybridisiert mit einer 3'-CY5-gelabelten Oligonukleotid-Probe gegen 18S-rRNA. Der Fluoreszenzmarker wurde in Form eines CY5-gelabelten Didesoxyuridin-Triphosphates mit Hilfe von terminaler Transferase kovalent an das 3'-Ende eines 18S-spezifischen Oligonukleotids gebunden. Jeweils gleiche Mengen der parallel angefertigten RNA-Isolierungen aus Wildtyp- und Mutanten-Stämmen sind aufgetragen. Kulturen nach Inkubation bei 25°C sowie bei 37°C nach zwei und sechs Stunden wurden verwendet.

B. und C.: Densitometrische Auswertung der Fluoreszenz-Bilder. Nach Spotdetektion der entsprechenden Banden und Hintergrundkorrektur sowie Normierung gegen zugehörige Signale der *ACT1*-mRNA (nicht gezeigt) wurden die Spotflächen und deren Schwärzungsgrade Computer-gestützt in Intensitäten umgewandelt. Die Quotienten aus G₈₁- durch Wildtyp-Werte sind in C. angegeben.

tometrisch bestimmt. Nach der PCR und Bestimmung der entsprechenden C_T -Werte wurden vier Standard-Geradengleichungen erhalten: für das Normierungsgen *ACT1* und *RDN18* jeweils für Wildtyp und Mutante. Diese wurden zur Berechnung von Zielsequenz-Konzentrationen c_0 beider Gene in den Ausgangs-cDNA-Templaten benutzt. Die Ausgangstemplate entstammten parallel revers-transkribierte RNA-Proben aus den Zellkernen des Wildtyps und der Mutante (37°C), die die gleiche Gesamt-RNA-Konzentration besaßen.

Die Normierung der erhaltenen 18S-rRNA- c_0 -Werte auf das *ACT1*-Gen erfolgte durch die Division der 18S-rRNA-Werte durch die *ACT1*-Werte. Darauf war es möglich, einen FC-Wert (fold change) als Maß der Kernanreicherung in G₈₁ durch Division der normierten G₈₁-Werte durch die entsprechenden Wildtyp-Werte anzugeben. Tabelle 5.13 zeigt die Auswertung für eine vergleichende Quantifizierung des 18S-rRNA-Genproduktes in Triplikaten. Dabei wurde ein FC-Faktor von $1,096 \pm 0,263$ ermittelt. Das Ergebnis wurde in separaten Bestimmungen mit unabhängigen RNA-Ausgangsproben einige Male wiederholt und reproduziert ($\overline{FC} = 1,046 \pm 0,201$). Die 18S-rRNA zeigte demnach keine unterschiedliche Expression in Wildtyp und Mutante. Dieses Ergebnis widerlegte das Anreicherungsresultat für *RDN18* aus der Einzel-HDOA-Analyse.

Zur weiteren Verifizierung dieses Ergebnisses wurde eine Northern-Blot-Analyse der relativen Mengen der 18S-rRNA in den zellulären RNA-Fractionen aus G₈₁ und der Wildtyp-kontrolle durchgeführt. Auch für die Northern-Blot-Analyse wurde eine Normierung auf die *ACT1*-mRNA gewählt.

Abbildung 5.38 zeigt fluoreszierende Bandenmuster, erzeugt durch die Hybridisierung einer

ORF	Gen	\overline{FC} (37°C) ± SD [HDOA]	\overline{FC} ± SD [RT-PCR]
YNL335W		10,87 ± 4,33	11,48 ± 4,61
YHL047C	<i>ARN2</i>	9,36 ± 1,91	8,93 ± 1,98
YNR077C	<i>NMD2</i>	5,93 ± 0,54	6,26 ± 1,49
YLR233C	<i>EST1</i>	5,82 ± 0,53	5,11 ± 0,45
YDR345C	<i>HXT3</i>	5,77 ± 1,19	4,83 ± 0,37
YPL198W	<i>RPL7B</i>	3,73 ± 0,77	3,45 ± 0,55

Tabelle 5.14: Quantitativer Vergleich von Änderungen der mRNA-Akkumulation durch HDOA-Analyse und quantitativer RT-PCR-Überprüfung für sechs Kandidaten-Gene.

mit dem Fluoreszenzmarker CY5 3'-gelabelten Oligonukleotid-DNA-Probe mit den auf positiv geladenen Nylonmembranen Tank-geblotteten RNA-Proben aus den verschiedenen Zell-Fractionen bei beiden Temperaturen. Die Sonde enthielt eine zur 18S-rRNA komplementäre doppelsträngige DNA-Sequenz in der Länge von 60 Basenpaaren.

Die Blots bestätigten das gleich hohe Expressionslevel der 18S-rRNA in den Zellkern-isolierten RNA-Proben der RT-PCR-Analyse. Sowohl bei direkter Betrachtung als auch densitometrisch nach Normierung der 18S-rRNA-Banden gegen die zugehörigen Actin-Banden (nicht dargestellt) wurden jeweils gleiche Expressionswerte zwischen Wildtyp und Mutante in Total-, Cytosol- und Kern-RNA-Isolierungen sowohl nach Inkubation der Kulturen bei 25°C als auch nach zwei- bzw. achtstündiger Inkubation bei 37°C gemessen (Ergebnisse siehe Tabelle im Teil C. aus Abb. 5.38).

Die beschriebenen Überprüfugsexperimente zeigten, dass die Anreicherungsfaktoren der 18S-rRNA aus der Genchip-Analyse nicht reproduziert werden konnten. Um die Effizienz der HDOA-Technik in der Bestimmung von mRNA-Häufigkeitsunterschieden zu überprüfen, wurden RT-PCR-Analysen von weiteren sechs unabhängig vom Zellkern angereicherten Poly-A⁺-mRNAs nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt und die Ergebnisse mit den aus der HDOA-Analyse erhaltenen Daten verglichen. Die Messwerte dieser quantitativen PCR-Analysen bestätigten die HDOA-Ergebnisse und sind in Tabelle 5.14 dargestellt:

Die durchschnittlichen Anreicherungsfaktoren (\overline{FC}) im Vergleich beider Techniken besaßen einen Korrelationskoeffizient von 0,98. Dies belegt, dass sich die \overline{FC} -Werte der HDOA-Analyse und der RT-PCR-Versuche einander ähnelten. Zur Klärung, ob die Mittelwerte beider Techniken sich statistisch unterschieden, wurde ein Student-t-Test mit den Daten durchgeführt, der keine Hinweise auf einen statistischen Unterschied der mittleren Anreicherungsfaktoren ergab. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die durch die HDOA-Analysen erhaltenen Messwerte von Poly-A⁺-mRNAs als signifikant angesehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine globale und spezielle Betrachtung der in den HDOA-Analysen erhaltenen Daten über angereicherte RNA-Spezies keine signifikanten Hinweise auf eine durch die Mutation hervorgerufene gestörte RNA-Zellkern-Exportfunktion bei permissiver oder nach Shift auf restriktive Temperatur ergab.

5.1.9.4 Beteiligung Hypps an einem speziellen mRNA-Abbauweg

Pro Chip-Experiment wurden etwa 400 angereicherte RNAs (Mittelwert aus Tabelle 5.12, p -Werte unter 0,065) gefunden, denen aus der MIPS-CYGD-Datenbank ORFs zuzuordnen waren. Die dabei gemessenen FC-Werte lagen im Bereich von 11 bis 2. Bei der Suche nach Zusammenhängen zwischen diesen angereicherten ORFs fiel die Aufmerksamkeit auf ein Gen des RNA-Metabolismus. Es handelte sich um *UPF2* (*NMD2*), ein Gen, das zusammen mit *UPF1* (*NAM7*) und *UPF3* als trans-agierender Faktor am Nonsense-Codon vermittelten mRNA-Abbauweg (NMD-Pathway), einer speziellen Variante des 5'-3'-mRNA-Abbauweges, in *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt ist. Die drei *UPF*-Gene sind Teil des „mRNA-Überwachungskomplexes“, über den mRNAs mit „Nonsense-Strukturelementen“, wie z.B. vorzeitige Stop-Codons ausgewählt werden. Darauf folgt die Abspaltung der Cap-Struktur am mRNA-5'-Ende durch Dcp1p und der Abbau von 5' - in 3'-Richtung durch die Exoribonuklease Xrn1p.

Tabelle 5.16 enthält das gut reproduzierbare Expressionsverhalten von *UPF2* in allen Genchipversuchen. Es wurde eine durchschnittliche Anreicherung um den Faktor 5,9 gemessen. Da bei permissiver Temperatur der FC-Wert um 2,1 Anreicherungsfaktoren niedriger lag, ist ein Einfluss des temperatursensitiven *HYP*-Gens auf die Funktion bzw. Expression von *UPF2* in G_{81} nicht auszuschließen.

Eine Literaturrecherche in der recht umfangreichen Primärliteratur zum *UPF*-gesteuerten mRNA-Abbauweg in *Saccharomyces cerevisiae* eröffnete die Möglichkeit, die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Genchip-Daten mit zwei Genchipanalysen von Knock-Out-Stämmen verschiedener Komponenten des 5'-3'-mRNA-Abbauweges zu vergleichen. Bereits 1999 wurden Transkriptomprofile von *upf123*-Knock-Out-Hefestämmen veröffentlicht [LELIVELT und CULBERTSON 1999]. Es folgte vor kurzem eine umfassendere Studie [HE et al. 2003], in der Knock-Out-Stämme sowohl der drei *UPF*-Gene als auch der stromabwärts agierenden Faktoren *DCPI* und *XRNI* transkriptionell untersucht wurden.

Beide Autorengruppen beschreiben in Genchip-Studien globale Änderungen im Hefe-Transkriptom, ausgelöst durch den Verlust der Genfunktion der einzelnen Faktoren, bzw. aller Faktoren zusammen in Stämmen mit mehrfachen Disruptionen.

Null-Mutationen in den *UPF*-Genen verursachten in beiden Studien die Akkumulation von 540-680 ORF-mRNAs. Zwischen 6 und 41 Probensätze wurden als herunterreguliert gefunden. Unabhängig davon, welches *UPF*-Gen ausgeschaltet wurde, akkumulierten jeweils die gleichen mRNAs.

Knock-Out-Stämme von *DCPI* und *XRNI* wiesen höhere Zahlen regulierter ORFs auf. Sie lagen bei *xrn1Δ* am höchsten mit ca. 985 angereicherten und 94 abgereicherten ORFs. Ausgeprägter als in den HDOA-Experimenten mit G_{81} zeigte sich demnach in *nmd*-defizienten Stämmen der Überschuss angereicherter gegenüber abgereicherter Probensätze.

Da sich in den G_{81} -Chipdatensätzen die Probensatzverteilungen der verschiedenen RNA-Fractionen der gleichen Temperaturstufe sehr ähnlich waren, wurden sie zusammen ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung resultierten in der Angabe eines mittleren FC-Wertes, der das arithmetische Mittel der Einzel-FC-Werte darstellt unter Angabe zugehöriger SD-Werte. p -Werte wurden ebenfalls arithmetrisch gemittelt (\bar{p}). Tabelle 5.15 zeigt 85 Probensätze, die die

Transkripte mit den höchsten signifikanten Anreicherungen in der <i>HYP</i> -Mutante <i>G</i> ₈₁							
ORF	Gen	Avg FC ± SD	\bar{p}	<i>upf1</i> Δ ¹	<i>dcp1</i> Δ ¹	<i>xrn1</i> Δ ¹	C. ²
YNL335W		10,87 ± 4,33	0,02013	11,72	29,30	12,48	*
YAL064W		10,82 ± 1,25	0,00086	8,36	13,00	9,15	
YJR004C	<i>SAG1</i>	9,69 ± 0,89	0,00000	8,68	11,20	9,20	*
YHL016C	<i>DUR3</i>	9,66 ± 3,21	0,00053	8,66	19,35	15,43	
YHL047C	<i>ARN2</i>	9,36 ± 1,91	0,00000	10,26	7,25	10,50	*
YLL063C	<i>AYT1</i>	7,58 ± 2,49	0,00153	9,86	6,15	14,43	
YOL161C		7,53 ± 0,73	0,00356	16,60	9,10	19,78	
YIR041W		7,38 ± 0,08	0,00098	7,00	13,05	9,30	*
YLL025W		7,12 ± 1,35	0,03040	9,12	17,50	11,80	*
YJL213W		7,07 ± 2,74	0,00368	9,06	9,65	21,98	
YHR210C		6,85 ± 1,08	0,00232	3,40	2,75	3,40	*
YHL035C		6,79 ± 1,88	0,00106	5,08	11,05	5,85	*
YIR028W	<i>DAL4</i>	6,65 ± 0,94	0,00047	1,72	7,55	4,00	
YOL015W		6,60 ± 0,33	0,00685	13,74	7,55	7,18	
YMR118C		6,57 ± 1,24	0,04290	2,36	15,35	3,93	
YHL040C	<i>ARN1</i>	6,40 ± 1,03	0,00141	8,38	7,05	8,15	*
YJL215C		6,29 ± 0,30	0,00816	5,00	6,00	4,63	
YNL269W	<i>BSC4</i>	6,26 ± 1,28	0,02695	1,76	5,00	3,50	
YHR157W	<i>REC104</i>	6,22 ± 2,20	0,03311	6,18	5,25	5,48	*
YHL037C		6,09 ± 1,82	0,01184	7,68	6,40	6,05	
YHR022C		6,00 ± 2,05	0,01600	2,04	5,25	4,70	
YOR381W	<i>FRE3</i>	5,99 ± 1,62	0,01655	13,52	9,50	14,20	*
YHL012W		5,87 ± 1,63	0,06190	2,34	2,25	1,93	
YKL220C	<i>FRE2</i>	5,82 ± 0,42	0,01004	18,30	14,25	13,90	*
YLR233C	<i>EST1</i>	5,82 ± 0,53	0,00294	17,06	13,10	14,70	*
YEL057C		5,72 ± 0,38	0,00162	2,64	8,05	3,15	*
YJR156C	<i>THI1</i>	5,69 ± 0,46	0,00509	5,52	22,30	17,20	*
YFLWDELTA1		5,57 ± 0,56	0,01010	4,14	22,30	5,48	*
YLR122C		5,50 ± 0,34	0,00760	8,52	14,40	11,10	*
YOL159C		5,46 ± 0,68	0,00345	1,90	5,00	3,08	*
YMR085W		5,38 ± 0,45	0,00586	6,88	10,80	7,65	
YMR325W		5,37 ± 0,76	0,00052	2,98	3,50	2,98	*
YJR108W	<i>ABM1</i>	5,36 ± 1,84	0,02387	8,04	8,10	6,20	
YCR099C		5,36 ± 0,12	0,00417	6,20	15,00	8,55	
YOR009W	<i>TIR4</i>	5,25 ± 0,90	0,00051	9,38	6,25	8,68	
YHL042W		5,22 ± 1,65	0,04490	7,82	9,40	4,35	*
YEL049W	<i>PAU2</i>	5,19 ± 1,01	0,01343	10,98	17,95	13,50	*
YFL050C	<i>ALR2</i>	5,19 ± 0,29	0,01342	13,14	17,15	16,58	*
YOL162W		5,18 ± 1,25	0,04155	29,16	22,75	17,38	*
YGR294W		5,15 ± 2,03	0,01400	26,32	4,50	35,88	*
YHR095W		5,04 ± 0,35	0,00664	1,66	3,05	2,45	
YBL109W		5,04 ± 0,83	0,00461	9,42	16,00	9,18	
YGR289C	<i>MAL11</i>	4,94 ± 1,25	0,00673	24,42	16,15	18,58	*
YLL016W	<i>SDC25</i>	4,93 ± 0,25	0,01390	4,72	5,60	3,20	*
YBR299W	<i>MAL32</i>	4,85 ± 0,43	0,00115	2,56	5,85	2,25	*
YOL107W		4,84 ± 0,57	0,00119	4,54	8,20	2,93	*
YLL064C		4,83 ± 0,96	0,03460	13,50	14,35	20,48	*
YHRCDELTA4		4,71 ± 0,57	0,01716	3,28	9,00	3,68	*
YHR204W	<i>MNL1</i>	4,70 ± 0,81	0,00217	2,52	2,55	2,88	*
YGR039W		4,67 ± 1,45	0,05870	2,72	6,55	3,03	*
YKL224C		4,67 ± 0,99	0,00230	2,50	4,10	3,45	*
YJR061W		4,66 ± 1,05	0,01498	3,92	6,60	4,95	*
YKL071W		4,66 ± 1,00	0,02549	3,64	8,50	4,05	*
YHR015W	<i>MIP6</i>	4,66 ± 1,58	0,03447	3,56	1,80	4,03	*
YOR380W	<i>RDR1</i>	4,62 ± 1,19	0,00388	3,20	4,35	3,20	*
YDR542W		4,60 ± 1,18	0,00867	12,20	5,25	6,65	*
YNR068C		4,59 ± 1,42	0,00569	15,38	5,70	5,60	*
YIR039C	<i>YPS6</i>	4,53 ± 0,41	0,00051	4,94	6,70	4,58	*
YBR298C	<i>MAL31</i>	4,52 ± 1,09	0,02163	25,94	28,55	19,80	*
YDL243C	<i>AAD4</i>	4,51 ± 0,56	0,01156	8,44	6,95	4,78	
YPR007C	<i>SPO69</i>	4,48 ± 0,34	0,02240	2,28	4,05	4,55	*
YHR180W		4,48 ± 1,77	0,03794	3,38	3,80	4,53	*
YJR152W	<i>DAL5</i>	4,44 ± 1,17	0,01448	8,82	7,70	8,10	*
YBR156C	<i>SLI15</i>	4,42 ± 0,73	0,02450	2,40	7,35	4,00	*
YCR104W	<i>PAU3</i>	4,40 ± 0,89	0,01460	3,74	4,00	3,00	*
YIR029W	<i>DAL2</i>	4,35 ± 0,02	0,00403	10,30	10,15	8,83	*
YIL028W		4,31 ± 0,37	0,02042	5,54	6,10	4,70	*
YML002W		4,30 ± 0,42	0,00353	7,66	8,85	6,10	*
YKL188C	<i>PXA2</i>	4,29 ± 0,20	0,00219	8,06	11,65	6,53	*
YIR031C	<i>DAL7</i>	4,21 ± 1,16	0,04042	11,10	5,45	5,63	*
YJLW1Y4-1		5,96 ± 0,48	0,00905	1,14	2,95	5,60	
YHR077C	<i>NMD2</i>	5,93 ± 0,54	0,00098	1,44	2,00	2,25	
YDR043C	<i>NRG1</i>	5,76 ± 1,61	0,00111	-0,30	4,55	8,98	
YHR101C	<i>BIG1</i>	5,44 ± 0,34	0,00306	1,26	1,90	1,73	*
YIR001C	<i>SGN1</i>	4,57 ± 0,41	0,00297	1,42	0,50	2,45	
YJL037W		4,35 ± 0,09	0,01350	0,62	15,45	5,45	
YMR323W		4,30 ± 0,56	0,00404	0,32	6,70	2,78	*
YIR019C	<i>MUC1</i>	5,26 ± 1,23	0,00243	2,20	3,45	1,28	
YPR200C	<i>ARR2</i>	4,78 ± 0,02	0,01010	1,82	-1,40	2,43	
YGL259W	<i>YPS5</i>	5,32 ± 2,13	0,06340	2,06	0,05	1,08	*
YERWOMEGA2		4,75 ± 0,59	0,02330	3,54	-2,00	-1,23	
YLR415C		4,30 ± 0,14	0,01550	1,10	2,25	1,55	*
YAR071W	<i>PHO11</i>	5,99 ± 0,80	0,00471	-1,20	-2,90	-1,28	*
YDR345C	<i>HXT3</i>	5,77 ± 1,19	0,00139	1,16	-1,50	0,05	
YIL114C	<i>POR2</i>	4,84 ± 0,48	0,01811	1,52	-1,40	0,58	

Tabelle 5.15: Darstellung der 85 Probensätze mit den höchsten gemittelten FC-Werten aus allen durchgeführten Genchip-Experimenten. Der oberer grau unterlegte Teil enthält 71 ORFs (82% von 85 Probensätzen) mit absteigenden FC Werten von 10,87 bis 4,21, die auch in den veröffentlichten HDOA-Datensätzen [HE et al. 2003] von Knock-Out-Stämmen verschiedener Gene des 5'-3'-mRNA-Abbauweges (*upf1*Δ₃, *dcp1*Δ, *xrn1*Δ; Spalten mit (1) gekennzeichnet) übereinstimmend als deutlich angereichert identifiziert wurden. Die vorderen drei numerischen Spalten enthalten die Datenauswertungen der *G*₈₁-HDOA-Analysen. Angegeben ist der Durchschnitts-FC-Wert aller Experimente (Avg FC) und dessen Standardabweichung, SD, die aus allen Einzel-Chipergebnissen gebildet wurde. Der Durchschnittswert \bar{p} stellt das arithmetische Mittel aller Paarvergleichs-*p*-Werte dar und dient als Signifikanz- und Reproduzierbarkeits-Indikator. Der Stern-Eintrag (2) in der letzten Spalte kennzeichnet Transkripte, die in einer weiteren Genchipstudie von *upf1*Δ₃-Mutanten [LELIVELT und CULBERTSON 1999] deutlich angereichert gemessen wurden. Die folgenden nicht unterlegten 11 Zeilen kennzeichnen ORFs, die nur bei Ausschaltung einzelner Komponenten des Abbauweges akkumulierten. Die drei letzten ORFs zeigten kein Anreicherungsverhalten in 5'-3'-Abbau-defizienten Stämmen.

Probensatz für YHR077C: <i>NMD 2 (UPF 2)</i>						
<i>RNA-Frak.</i>	$\overline{FC}^{(1)}$	$sd(\overline{FC})^{(2)}$	\overline{FC} (Temp.)	\overline{sd} (<i>FC Temp.</i>)	\overline{p}	\overline{p} (Temp.)
37°C total	5,396	± 0,680	5,935	± 1,117	0,0011	0,00098
37°C Kern	5,928	± 1,029			0,0008	
37°C Cytos.	6,480	± 1,642			0,0011	
25°C total	3,188	± 0,642	3,780	± 0,774	0,0271	0,0168
25°C Kern	4,161	± 0,864			0,0048	
25°C Cytos.	3,991	± 0,815			0,0185	

Tabelle 5.16: HDOA-Auswertung für die YHR077C-mRNA, codierend für *NMD2*. Zugrunde liegen die Durchschnitts-FC-Werte (1) (\overline{FC}) aus den Genchip-Versuchen der sechs RNA-Fractionen sowie deren Standardabweichungen (2) $sd = \sqrt{\frac{\sum (FC_i - \overline{FC})^2}{n-1}}$, mit $n = 3$. Aufgrund der Ähnlichkeit der Ergebnisse für die drei zellulären RNA-Fractionen wurde ein Mittelwert mit Standardabweichung für beide Temperaturstufen berechnet (Spalten 4 u. 5). Die zugehörigen p -Werte wurden ebenfalls gemittelt.

höchsten gemittelten FC-Werte aus allen durchgeführten Genchipexperimente aufwiesen. Die Tabelle ist aufgeteilt in die oberen 71 ORFs (82% von 85 Probensätzen), die ebenfalls in den Experimenten mit allen *nmd*-defizienten Hefestämmen akkumulierten.

In einer breiteren Betrachtung von 533 in G_{81} am höchsten angereicherten Probensätzen konnten 416 (78%) auch als akkumuliert in der *nmd* Δ -Studie [HE et al. 2003] wiedergefunden werden. Dabei stellten sowohl die übereinstimmenden als auch die nicht übereinstimmenden akkumulierenden ORFs in beiden HDOA-Studien Repräsentanten vieler Gen-Funktionsgruppen dar. Umgekehrt wurden von den 541 akkumulierten Probensätze in der *nmd* Δ -Studie von LELIVELT 414 auch in den G_{81} -Experimenten unter den angereicherten wiedergefunden (ca. 77%), 108 *UPF*-Kandidaten (20%) zeigten keine Regulation. 19 (3,5%) der 541 ORFs wurden abgereichert in G_{81} gefunden.

Tabelle 5.17 zeigt die Anzahl der am höchsten angereicherten ORFs der G_{81} -Analyse, die auch in den HDOA-Analysen von *xrn1* Δ - bzw. *upf* Δ -Mutanten von HE überlappend als angereichert klassifiziert wurden. Demnach liegt die Zahl der gleichermaßen angereicherten ORFs im Vergleich mit dem *xrn1* Δ -Phänotyp leicht höher als im Vergleich mit einem *upf* Δ -Phänotyp.

Die Höhe der Anreicherungsfaktoren glichen denen der Genchip-Datensätze aus der Literatur, wenngleich die Größenverteilung der in beiden Experimentreihen übereinstimmend angereicherten Probensätze sich deutlich unterschied. Diese Beobachtung verdeutlicht die Auftragung von Abbildung 5.39, in der die mittleren FC-Werte von 375 übereinstimmend angereicherten Transkripten der G_{81} - und der LELIVELT-Genchipstudie verglichen wurden.

Die mittleren G_{81} -FC-Faktoren sind in absteigender Reihenfolge als Säulen dargestellt. Die zugehörigen *UPF*-Werte sind daneben platziert und zeigen keinen äquivalenten Abnahmeverlauf.

	ORF-Zahl
Überlappung zwischen Genchip-Analysen	732(100%)
<i>hyp(ts)</i> G_{81} + <i>xrn1</i> Δ + <i>upf</i> Δ	460 (63%)
<i>hyp(ts)</i> G_{81} + <i>xrn1</i> Δ	540 (74%)
<i>hyp(ts)</i> G_{81} + <i>upf</i> Δ	503(69%)

Tabelle 5.17: Überlappung der 732 höchst angereicherten Transkripte in G_{81} mit den entsprechenden Ergebnissen in *xrn1* Δ - und *upf* Δ -Stämmen [HE et al. 2003].

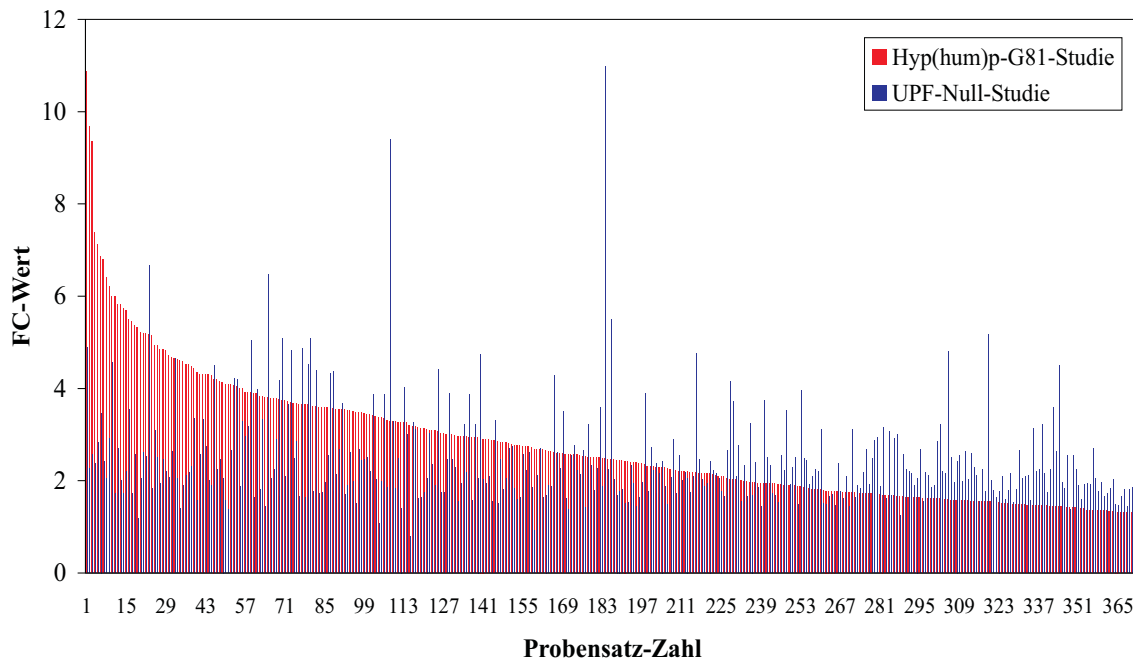


Abbildung 5.39: Vergleich der mittleren FC-Werte von 375 ORFs, die übereinstimmend in den beiden HDOA-Analysen von *upf*⁻-Mutanten von der Hyp(human)-ts-Mutante G₈₁ als angereichert gefunden wurden. Die Datensätze wurden nach den G₈₁-FC-Werten absteigend sortiert.

Die hohe Ähnlichkeit des Anreicherungsmusters zu Hefestämmen mit ausgeschaltetem NMD-mRNA-Abbauweg bleibt aber evident.

5.1.9.5 Anreicherung von Pseudogenen – ein direkter Hinweis auf NMD-Defizienz

Eine Transkript-Gruppe mit Akkumulation bei defizienter HYP-Funktion stellten die mRNAs der Pseudogene dar. Sie können für vollständige Proteine codieren, enthalten aber innerhalb der codierenden Sequenz oft ein oder mehrere deaktivierende Elemente wie vorzeitige Stop-Codons und Leserahmenverschiebungen, die zur Verhinderung einer Translation und zu einem verstärkten Abbau solcher Transkripte durch NMD führen. Die Anreicherung ihrer mRNAs liefert daher einen direkten Hinweis auf einen Ausfall des NMD-Abbauweges. Aufgrund ihrer pseudogenen Eigenschaften werden diese ORFs auch dORFs („disabled open reading frames“) genannt. Es wird angenommen, dass in Bäckerhefe bis zu 221 dORFs vorhanden sind, die häufig chromosomal in telomernahen Bereichen codiert sind [HARRISON et al. 2002].

Die sechs *BSC*-Gene als Vertreter der dORFs wurden früh als „*Bypass of Stop Codon*“-Gene bezeichnet, da man erkannt hatte, dass zu ihrer Translation vorzeitige Stop-Codons in der Sequenz vom Ribosom überlesen werden mussten. Dennoch ist ihre Translation nachgewiesen [NAMY et al. 2003]. Vier mRNAs dieser sechs Gene zeigen Anreicherung in G₈₁.

5.1.9.6 Beeinträchtigung des telomeren Positions-Effektes in G₈₁

Bei genauerer Betrachtung der in G₈₁ angereicherten ORFs war bei einer Teilgruppe ein Zusammenhang zwischen der Anreicherung und der Lage der Gen-Sequenzen im Chromosom zu erkennen. 54,7% (222 von 406) der ORFs, die innerhalb der 27 kb-Regionen an den Telomeren

ORF	Gen	FC (37°C) ± SD	Struktur-Element
YDR275W	<i>BSC2</i>	2,03 ± 0,62	Stop-Codon-Überbrückung
YLR465C	<i>BSC3</i>	<i>tel</i> 3,28 ± 1,52	„
YNL269W	<i>BSC4</i>	6,26 ± 1,28	„
YNR069C	<i>BSC5</i>	<i>tel</i> 2,75 ± 1,16	„
YJR155W	<i>AAD10</i>	<i>tel</i> 3,78 ± 1,15	„
YLR463C		<i>tel</i> 4,24 ± 0,53	„
YIL164C	<i>NIT1</i>	<i>tel</i> 2,78 ± 0,93	Stop-Codon-Überlesung zwischen YIL164C und YIL165C
YGL261C		<i>tel</i> 3,82 ± 0,61	Leserahmenverschiebung

Tabelle 5.18: Anreicherung von Pseudogenen. (*tel* = subtelomer codiert). Weitere Anreicherungsfaktoren von Pseudogenen und dORFs finden sich im Anhang unter Punkt 7.1.

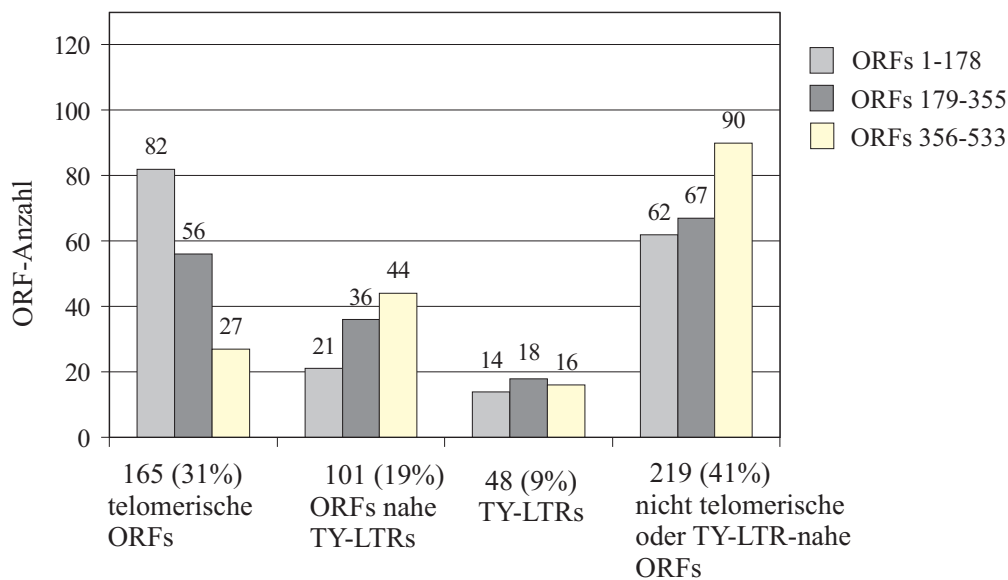


Abbildung 5.40: Positionierung der 533 ORFs mit der stärksten Anreicherung in G_{81} im Hefegenom hinsichtlich ihrer Lage zu Telomeren oder LTR-Elementen von Ty- Retrotransposons. Die Verteilung mit absteigenden \overline{FC} wurde gedreht.

lokalisiert sind, waren in der Mutante angereichert. Demgegenüber akkumulierten nur ca. 7% (408 von 5863) der nichttelomerisch codierten ORFs in den G_{81} -Stämmen. Die Chipergebnisse zeigen eine Anhäufung von Sequenzen aus Multigen-Familien, deren Mitglieder sich nahe an den Telomeren wiederfinden, wie *FLO*- (121 Mitglieder), *MEL*- (123), *SUC*- (11) oder *MAL*-Gene (15).

In *Saccharomyces cerevisiae* sind in gesunden Zellen solche Gene transkriptionell reprimiert, die sich in Telomernähe befinden – einem Genombereich mit von Natur aus geringerer ORF-Dichte als in nicht-telomerischer chromosomaler DNA. Dieses Phänomen wurde telomerer Positionseffekt (TPE) genannt [GOTTSCHLING et al. 1990]. TPE nimmt im Normalfall mit steigender Distanz vom Telomer schnell ab. Die Untersuchung der 533 am höchsten exprimierten ORFs auf ihre chromosomale Lokalisation ergab die Verteilung von Abbildung 5.40. Dabei wiesen 31% (165 ORFs) eine Lage nahe am Telomer auf. 219 ORFs (41%) zeigten keine telomerische Nähe. Innerhalb der 533 ORFs lag der Anteil der meisten subtelomerischen ORFs bei den am höchsten angereicherten Probensätzen, wie die Aufteilung der 533 Transkrip-

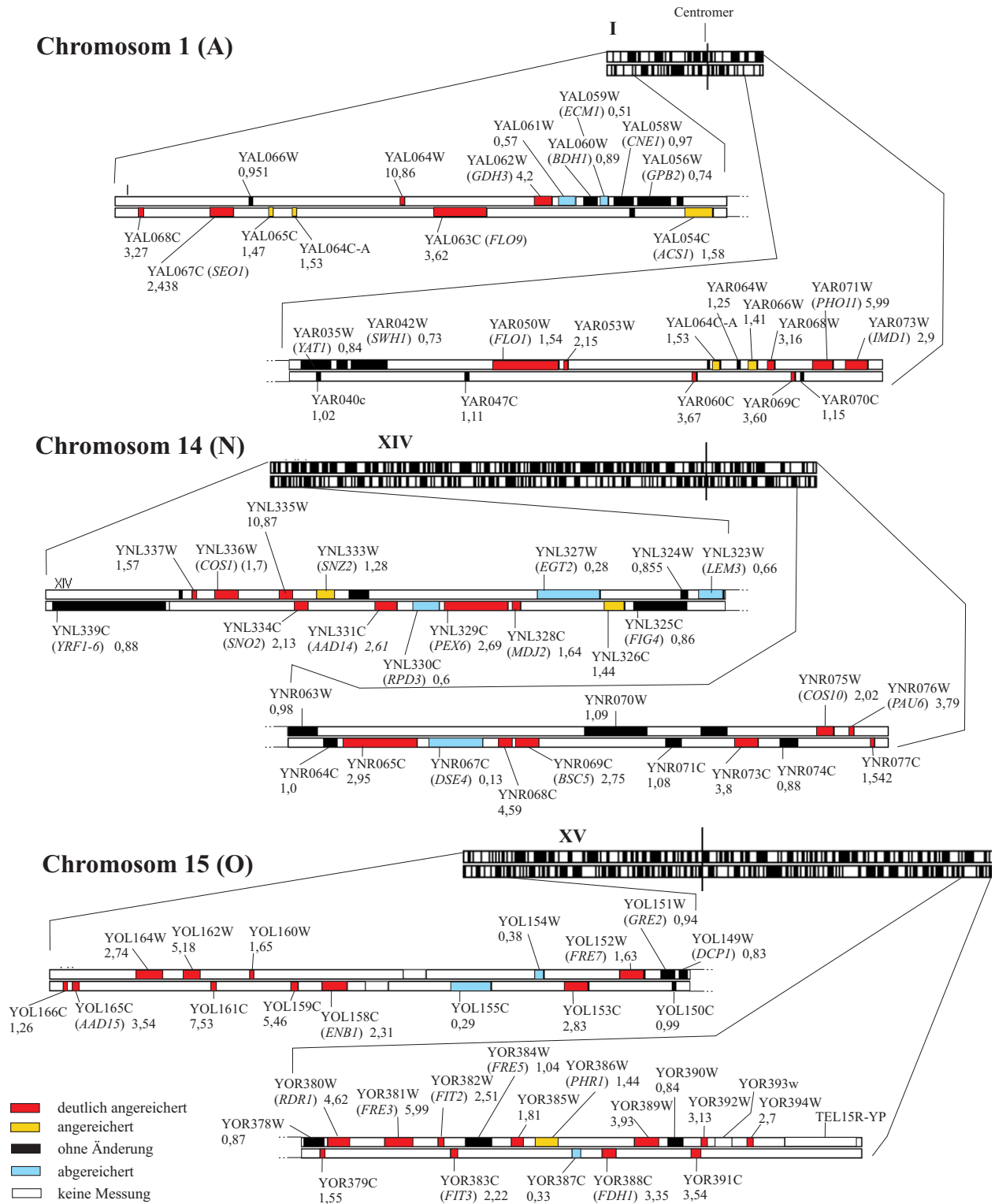


Abbildung 5.41: Darstellung des Expressionsverhaltens von telomerischen Genen in der G₈₁-HDOA-Analyse. Stellvertretend für alle 16 Chromosomen ist die teilweise Aufhebung des telomerischen Positions-Effektes (TPE) an den Telomerbereichen der Chromosomen 1, 14 und 15 gezeigt. Die signifikante Häufung von deutlich angereicherten ORFs im subtelerischen Bereich, die in der Wildtyp-Zelle schwächer exprimiert werden, ist an jeweils beiden Telomerbereichen des Chromosoms erkennbar.

ORF	Gen	Beschreibung	FC (37°C) ± SD	\bar{p}	Avg.FC	Position im Chromosom
YLR233C	<i>EST1</i>	TLC1-RNA-assoziiertes Protein involviert in Telomer-Verlängerung	5,82 ± 0,53	0,00294	2,01	nicht telomerisch
YBL088C	<i>TEL1</i>	Reaktion auf schadhafte DNA; Telomerase-abhängiger Telomer-Erhalt	2,89 ± 0,16	0,01220		subtelomer
YLR010C	<i>TEN1</i>	involviert in Telomer-Längenregulation und Schutz der Telomerenden	2,88 ± 0,05	0,05220	3,3	nicht telomerisch
YDL146W		schwache Ähnlichkeit zu Orc3p	2,36 ± 0,19	0,04850		nicht telomerisch
YKR091W	<i>SRL3</i>	Suppressor der rad53-Lethalität; Nukleinsäuremetabolismus	2,36 ± 0,08	0,02290		subtelomer
YDR082W	<i>STN1</i>	involviert in Telomerlängen-Regulation; könnte funktionell im Telomer-Metabolismus in der späten S-Phase sein	2,15 ± 0,29	0,05980	2,43	nicht telomerisch
YHR119W	<i>SET1</i>	involviert in der Chromatin-vermittelten Gen-Regulation	2,08 ± 0,11	0,05870		neben Ty-LTR
YJR127C	<i>ZMS1</i>	Transkriptionsfaktor mit Ähnlichkeit zum regulat. Protein Ard1p	2,02 ± 0,27	0,05885		nicht telomerisch
YLR453C	<i>RIF2</i>	Kernprotein, das synergistischen Einfluss auf die Telomerlänge und den Verlust von Chromosomen hat; bindet telomerische DNA	1,99 ± 0,37	0,03841		subtelomer
YNL261W	<i>ORC5</i>	Chromatin-Silencing an HMR und HML	1,96 ± 0,13	0,02350	1,69	nicht telomerisch
YIL009C-A	<i>EST3</i>	Komponente des Telomerase-Holoenzym, involviert in Telomer-Replikation	1,92 ± 0,26	0,03210		neben Ty-LTR
YLR318W	<i>EST2</i>	103 kD-Protein (basisch), katalytische Untereinheit der Telomerase, besitzt Aktivität einer reversen Transkriptase	1,89 ± 0,40	0,06027	2,28	nicht telomerisch
YKR101W	<i>SIR1</i>	involviert am Silencing-Effekt an HMR und HML	1,89 ± 0,36	0,05391		subtelomer

Tabelle 5.19: Angereicherte ORFs, deren Gene an Funktionen des Telomer-Metabolismus beteiligt sind. Die vorletzte Spalte enthält den Anreicherungsfaktor „Avg.FC“ der *UPF123*-Knock-Out-Studie.

te in drei Expressionsbereiche in Abbildung 5.40 zeigt: 82 der 165 subtelomerischen ORFs lagen im ersten Drittel der nach absteigendem FC-Wert sortierten Probensätzen. Je niedriger der Anreicherungsfaktor war, umso geringer war auch die Wahrscheinlichkeit, einen betreffenden ORF am Telomer aufzufinden: Nur 27 aus 533 ORFs waren im unteren Drittel der FC-Wert-Verteilung telomer-ständig. Die Beeinträchtigung des subtelomerischen Silencing-Effektes (oder auch TPE) wurde ebenfalls in *nmdΔ*-Hefestämmen beobachtet.

Zur Ausschaltung des TPE passt das Ergebnis, dass unter den Telomer-fernen angereicherten Genen sich sowohl in der G_{81} - als auch in der *UPF*⁻-Analyse einige Gene fanden, die direkt mit der Steuerung telomerischer Funktionen in Zusammenhang stehen; darunter befindet sich das für die katalytische Proteineinheit der Telomerase codierende Gen *EST2* und dessen Aktivator *EST1* sowie *STN1* und *TEN1*. Tabelle 5.19 listet weitere Telomer-steuernde Gene auf, die sowohl im nicht telomerischen als auch im telomerischen Bereich codiert sind und hochreguliert erschienen.

Einen Ausschnitt der Beeinträchtigung des telomeren Positions-Effektes durch die eingeschränkte *HYP*-Funktion zeigt Abbildung 5.41. Die subtelomerischen Bereiche der Chromosomen 1, 14 und 15 sind exemplarisch für alle anderen Chromosomen mit der räumlichen Anordnung und Angabe Anreicherungsfaktoren FC der einzelnen ORFs dargestellt. Erkennbar wird der hohe Anteil von deutlich angereicherten Genen und ORFs (rote Anfärbung) in der Nähe zu den Telomeren.

Die teilweise Aufhebung des telomerischen Silencings betraf grundsätzlich alle Chromosomen von 1-16, da subtelomerisch codierte hochregulierte ORFs von allen Chromosomen in den 165 Probensätzen enthalten waren. Besonders stark zeigte sich der Effekt jedoch an den Telomeren der Chromosomen 8 (H) und 15 (O). Unter den subtelomerisch codierten ORFs konnten auf beiden Chromosomen 21 als angereichert bzw. deutlich angereichert identifiziert werden.

Orf	Gen	Beschreibung	$\overline{FC} (37^\circ\text{C}) \pm \text{SD}$	\bar{p}	Avg.FC	CKI Score
YKL071W		schwache Ähnlichkeit zum nor-1-Protein aus <i>A. parasiticus</i>	4,66 ± 1,00	0,02549	4,65	0,97
YHR180W		hypothet. Protein	4,48 ± 1,77	0,03794	2,3	0,75
YIL028W		mögliches Pseudogen	4,31 ± 0,37	0,02042	2,58	0,47
YGR144W	<i>THI4</i>	involviert in Thiamin-Biosynthese und DNA-Reparatur	4,09 ± 0,81	0,01361	1,38	0,44
YLR036C		Ähnlichkeit zu YIL089w	2,96 ± 0,53	0,03140	1,94	0,81
YEL023C		involv. in Kontrolle der Zellorganisation	2,85 ± 0,22	0,04910	1,5	0,56
YEL005C	<i>VAB2</i>	Vac8p bindendes Protein (31 kDa)	2,60 ± 1,11	0,01240	2,27	0,47
YDR265W	<i>PEX10</i>	peroxisomales Assemblierungsprotein - Peroxin	2,57 ± 0,31	0,04490	2,54	0,75
YFR030W	<i>MET10</i>	Untereinheit der assimilatorischen Sulfit-Reduktase	2,50 ± 0,22	0,01620	2,26	0,88
YOR005C	<i>DNL4</i>	ATP-abhängige DNA-Ligase	2,45 ± 0,07	0,03125	2,03	0,59
YHR001W	<i>OSH7</i>	Ähnlichkeit zu Kes1p; benachbart zu <i>QCR10</i>	2,39 ± 1,45	0,05366	1,44	0,44
YDR242W	<i>AMD2</i>	Amidase	2,21 ± 0,07	0,04695	2,54	0,59
YMR009W		schwache Ähnl. zum regulatorischen Protein <i>mmsR</i> aus <i>P. aeruginosa</i>	2,19 ± 0,73	0,05322	2,17	0,75
YMR114C		Ähnlichkeit zu den konservierten Proteinen <i>yoqW</i> und <i>yoaM</i>	2,19 ± 0,28	0,03919	2,06	0,59
YMR104C	<i>YPK2</i>	Protein-Kinase	2,15 ± 0,61	0,05141	1,94	0,44
YDR236C	<i>FMN1</i>	Riboflavin-Kinase	2,09 ± 0,07	0,04733	1,78	0,66
YGL154C	<i>LYS5</i>	Aminoacidipat-Semialdehyddehydrogenase, kleine Untereinheit (α-Aminoacidipat-Reduktase)	2,00 ± 0,25	0,05560	1,56	0,69

Tabelle 5.20: Angereicherte ORFs, die sich im Genom am nächsten zu LTR-Abschnitten von retrotransposalen Elementen befanden, und die ebenfalls in der HDOA-Studie von *UPF123*⁻-Mutanten [LELIVELT und CULBERTSON 1999] eine reproduzierbare Anreicherung aufwiesen. Die Tabelle stellt einen Ausschnitt von 136 angereicherten ORFs dar, die in Distanzbeziehung zu LTR-Untereinheiten standen.

5.1.9.7 Anreicherung retrotransposabler Elemente, ihrer LTR-Sequenzen und ihnen benachbarter ORFs

In der Mutante zeigten Transkripte signifikante Anreicherungen, die von retrotransposablen Elementen (Ty-Elemente, abgeleitet von „Transposon Yeast“) stammten.

Die zugehörigen chromosomalen Sequenzen der Ty-Elemente sind in unterschiedlichen Hefestämmen an verschiedenen Stellen positioniert, da sie die Fähigkeit zur Transposition besitzen, d.h. sich in unterschiedliche Stellen des Chromosoms einzubauen. Ty-Retrotranspositionen ähneln in ihrem Verlauf dem Einbau retroviraler DNA in das Genom. In beiden Fällen wird die codierende DNA durch reverse Transkription eines RNA-Intermediates erzeugt. Wie bei retroviraler DNA werden bei den Ty-Elementen die *gag*- und *pol*-analogen Sequenzen von terminalen Wiederholungssequenzen („Long Terminal repeats = LTRs“, auch als δ -Sequenzen bezeichnet) flankiert. Im Hefegenom existieren ca. 36 Kopien von Ty-Elementen. Dazu kommen etwa hundert unabhängige LTR-Elemente, die von früheren Retrotranspositionen herrühren.

Die Einteilung angereicherter Transkripte in Genfunktionsgruppen (siehe Abbildung 5.35) enthielt eine Gruppe von Ty-Element-Transkripten und ihrer LTRs (Zusammen im folgenden als Ty-LTRs bezeichnet), die durchschnittlich 4% aller angereicherten Probensätze ausmachten.

Das Diagramm in Abbildung 5.40 zeigt 48 angereicherte Ty-LTRs. Dabei war die Anzahl unabhängig von der Höhe des Anreicherungsfaktors FC in den drei Bereichen einer absteigenden FC-Wert-Verteilung. Von den insgesamt 442 Probensätzen, welche auf dem Hochdichte-Genchip S98 Ty-LTR-Sequenzen repräsentieren, zeigten 139 (31%) einen FC-Wert über 1,7; 229 Probensätze (51%) lagen über 1,3; in einem FC-Wert-Intervall FC[0,8 ... 1,2], welches nicht regulierte Probensätze repräsentierte, lagen 203 Probensätze (46 %); Zehn Ty-LTR-Probensätze (2%) lagen bei FC-Werten unter 0,7. Diese Verteilung verdeutlicht, dass gegenüber dem nicht regulierten Anteil wesentlich mehr der Ty-LTR-Probensätze in G_{81} angereichert erscheinen als abgereichert.

101 (19%) der höchst angereicherten 533 Probensätze zeigten interessanter Weise große Nähe zu den Ty-Elementen oder den von ihnen stammenden LTR-Sequenzen. Besonders eine 5'-Lage des Ty-LTRs strangaufwärts vor dem betrachteten ORF bewirkte dessen Anreicherung. Auch eine 3'-Orientierung oder eine Position auf dem komplementären DNA-Strang bewirkte eine Höherexpression des ORFs. Der größte Teil dieser Ty-LTR-nahen ORFs fand sich an telomerfernen Chromosomenbereichen. An telomernahen Ty-Elementen konnte nicht eindeutig unterschieden werden, ob der beobachtete Anreicherungseffekt durch das Telomer, das nahe Ty-LTR-Element oder synergistisch durch beide Effekte mitbeeinflusst war. Von diesen 101 Ty-LTR-nahen ORFs reicherten sich 40 (40%) auch bei Verlust der *UPF*-Gen-Funktionen an. Einen Ausschnitt aus dieser Gen-Gruppe zeigt Tabelle 5.20 (aufgelistete Gene sind unmittelbar benachbart zu Ty-LTR-Elementen). Diese Tatsache verdeutlicht, dass auch der Ursprung der Anreicherung von Ty-LTR-nahen ORFs mit dem NMD-mRNA-Abbauweg verknüpft ist.

5.1.9.8 Die Serin(AGA)-tRNAs

In der HDOA-Analyse erwiesen sich die Transkripte codierend für verschiedene Varianten der Serin-tRNAs (Basentriplett AGA) unter allen tRNAs als am höchsten angereichert in G_{81} . Dies verdeutlicht das mRNA-Profil aller FC-Werte von tRNA-Probensätzen in Abbildung 5.42. Die Namen anderer tRNAs außer den Ser(AGA)-tRNAs sind aus Platzgründen an der Basis der Balkendiagramme nicht angegeben.

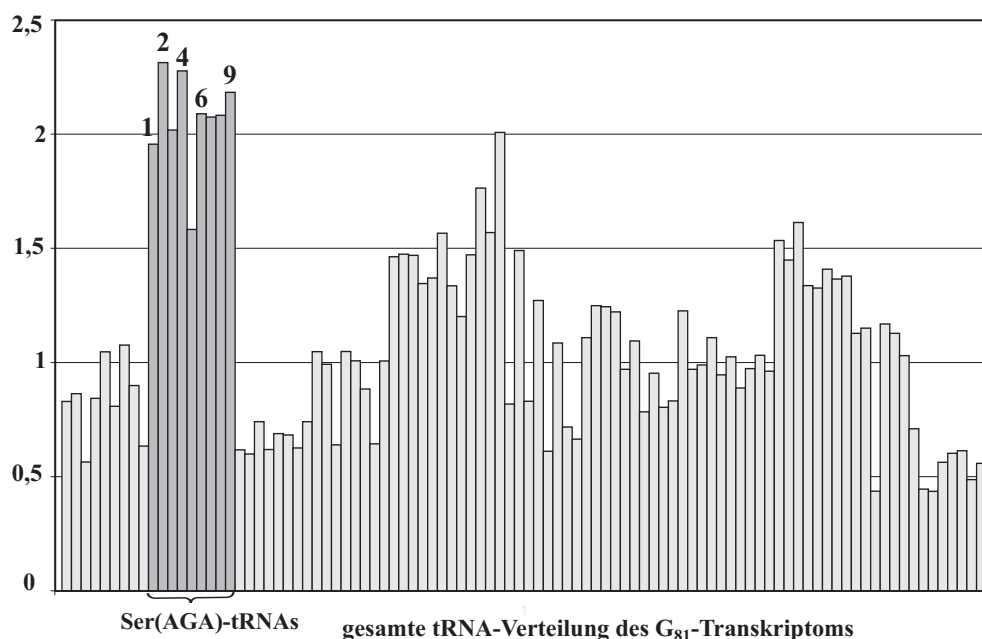


Abbildung 5.42: Serin(AGA)-tRNA-Expressionen im G_{81} -Transkriptom. Angegeben sind die zugehörigen mittleren FC-Faktoren.

1: tS(AGA)M; 2: tS(AGA)L; 3: tS(AGA)J (3' neben *HYP1*); 4: tS(AGA)E (3' neben *HYP2*); 5: tS(AGA)D3; 6: tS(AGA)D2; 7: tS(AGA)D1; 8: tS(AGA)B; 9: tS(AGA)A.

5.1.9.9 Abreicherung mitochondrialer Transkripte

Die Einteilung von abgereicherten ORFs in Funktionsgruppen (siehe Abschnitt 5.1.9.2.1) ergab bei Einbeziehung aller Einzel-Experimente einen Gen-Anteil von 23 %, der in mitochondriale Stoffwechselforgänge involviert ist. Tabelle 5.22 listet 70 ORFs auf, die zu dieser Gruppe mitochondrialer Gene gehören.

Enthalten sind ORFs mit den niedrigsten gemessenen Expressionsraten in G_{81} , von denen neun auf dem mitochondrialen Genom codiert sind, die übrigen chromosomal. Die geringsten Expressionsraten wiesen Cytochrom-c-Oxidase (Untereinheit I) aus dem Atmungskettenkomplex IV sowie die ebenfalls mitochondrial codierte Untereinheit *COB* (*CYTB*) aus dem Cytochrom-bc1-Komplex auf. Auf dem Mikro-Array S98 waren insgesamt sechs verschiedene Probensätze codierend für das *COX1*-Gen vorhanden, die ohne Ausnahme stark abgereichert in allen durchgeführten Experimenten gefunden wurden. Dies deutet auf die hohe Reproduzierbarkeit der Messung für das *COX1*-Gen hin.

In Anbetracht der Abreicherung von sieben mitochondrial-codierten ORFs und dem Fehlen weiterer mt-DNA-ORFs als Probensätze auf dem Genchip S98 (Affymetrix) konnte man vermuten, dass die generelle Expression von Genen des mitochondrialen Genoms in G_{81} bei beiden Temperaturstufen beeinträchtigt war. Dabei bestand die Möglichkeit, dass die Stabilität oder Funktionalität des mitochondrialen Genoms in der Mutante gestört war. Für diese Hypothese sprach die Beobachtung, dass *YHM2* den temperatur-sensitiven Phänotyp der Mutante G_{81} in einer Single-Copy-Suppressor-Analyse teilweise unterdrücken konnte [YOUNG 1998]. Das zugehörige Protein bindet an die innere Mitochondrienmembran und ist an der Stabilisierung des mitochondrialen Genoms beteiligt [CHO et al. 1998]. *YHM2* war in den HDOA-Analysen der Mutantenstämme stets herunterreguliert ($\overline{FC} = -1,69$). Interessant war, dass dieses Gen als einziges mit mitochondrialer Funktion in einer Gruppe von 41 ORFs enthalten war, die sich in der HDOA-*UPF123*⁻-Studie von [LELIVELT und CULBERTSON 1999] als reproduzierbar unterexpressiert herausstellten.

40% (=16 ORFs) dieser 41 Gene waren auch unter den herunterregulierten Genen der G_{81} -Genchipstudie zu finden und sind in Tabelle 5.22 aufgelistet. Zu beachten ist dabei, dass insgesamt durchschnittlich 270 ORFs in den G_{81} Mutanten-Stämmen als unterexpressiert gefunden wurden (vgl. Tabelle 5.12).

5.1.9.10 Übereinstimmungen aus proteomischer und transkriptomischer Analyse

Auf Transkriptom-Ebene konnten die Ergebnisse aus proteomischer Analyse, die die Unterexpression von Untereinheiten mitochondrialer Atmungskettenkomplexe ergeben hatten, zu einem Großteil bestätigt werden. In Tabelle 5.21 sind ORFs hellgrau unterlegt, die ebenfalls auf

Tabelle 5.21: →
Auswahl von mitochondrialen unterexpressierten ORFs in G_{81} . Enthalten sind ORFs codiert auf dem mitochondrialen Genom und den Chromosomen. Hellgrau unterlegte Gene wurden auch in den Protein-2D-Gel-Analysen der Mutante abgereichert gefunden. Die dunkelgraue Unterlegung von *YHM2* kennzeichnet das Gen als Suppressor des $G_{81}^{(ts)}$ -Phänotyps [YOUNG 1998].
(1) Die beiden hinteren Spalten enthalten Vergleichsinformationen einer Hefe-genomweiten Array-Studie über anaerobisch induzierte Gene [KWAST et al. 2002] mit Angabe des Anreicherungsfaktors FC (Quotient anaerobisch/aerobisch). Die letzte Spalte kennzeichnet ORFs, die sowohl in der G_{81} -Studie als auch bei Anaerobie (im Vergleich zu aeroben Bedingungen) herunterreguliert gefunden wurden. Die beiden letzten Einträge der Tabelle wurden miteinbezogen, um einen kompletten Überblick über die Transkriptions-Eigenschaften aller ATP-Synthase-Komplex-Einheiten zu erhalten.

Ausschnitt unterexprimierter mitochondrialer Gene aus dem Transkriptom der <i>HYP</i> -Mutante G ₈₁					
ORF	Gen	Beschreibung	$\overline{FC} \pm SD$	FC (Anox. ¹)	Anox.
Q0045	<i>COX1</i>	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I (mt-DNA, 13848-13988)	-19,61 ± 10,381		
Q0045	<i>COX1</i>	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I (mt-DNA, 20508-20984)	-18,18 ± 3,967		
Q0045	<i>COX1</i>	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I (mt-DNA, 23612-23746)	-8,33 ± 6,111		
Q0045	<i>COX1</i>	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I (mt-DNA, 26627-26701)	-5,88 ± 6,574		
Q0045	<i>COX1</i>	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I (mt-DNA, 26228-26530)	-5,26 ± 4,155		
Q0060	<i>AI3</i>	DNA-Endonuclease ai3 (mt-DNA, 18992-19996)	-5,88 ± 5,190		
Q0085	<i>ATP6</i>	F ₁ F ₀ -ATPase-Komplex, F ₀ -A-Untereinheit (mt-DNA, 28487-29266)	-13,89 ± 0,579		
Q0130	<i>OL11</i>	F ₁ F ₀ -ATPase-Komplex, F ₀ -Untereinheit 9 (mt-DNA, 46723-46953)	-7,69 ± 5,858		
Q0105	<i>COB</i>	Ubiquinol-Cytochr.-c-Red.ase (Cytochr.B) (mt-DNA, 43297-43647)	-10,00 ± 4,700		
Q0105	<i>COB</i>	Ubiquinol-Cytochr.-c-Red.ase (Cytochr.B) (mt-DNA, 40841-41093)	-5,88 ± 3,460		
Q0105	<i>COB</i>	Ubiquinol-Cytochr.-c-Red.ase (Cytochr.B) (mt-DNA, 39141-39217)	-5,26 ± 3,324		
Q0105	<i>COB</i>	Ubiquinol-Cytochr.-c-Red.ase (Cytochr.B) (mt-DNA, 36540-36954)	-5,26 ± 3,490		
Q0105	<i>COB</i>	Ubiquinol-Cytochr.-c-Red.ase (Cytochr.B) (mt-DNA, 42508-42561)	-4,35 ± 3,214		
Q0055	<i>AI2</i>	COX1-Intron-2-Protein (mt-DNA, 16473-18830)	-4,76 ± 4,218		
Q0080	<i>AAP1</i>	F ₁ F ₀ -ATPase-Komplex, F ₀ -Untereinheit 8 (mt-DNA, 27666-27812)	-4,55 ± 1,674		
Q0250	<i>COX2</i>	Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit II (mt-DNA, 74495-75622)	-2,22 ± 0,691		
Q0140	<i>VARI</i>	mitochondriales ribosomales Protein (mt-DNA, 48901-50097)	-2,94 ± 1,990		
YJL133W	<i>MRS3</i>	mitochondriales Carrier-Protein	-4,55 ± 0,207	-1,07	
YKL029C	<i>MAE1</i>	mitochondriales Malat-Enzym	-4,55 ± 0,413	1,34	
YEL033W		schwache Ähnlichkeit zu <i>Sauroleishmania</i> -mitoch. ORF-5-Protein	-4,00 ± 1,920	-2,39	a
YKL016C	<i>ATP7</i>	ATP-Synthase d-Untereinheit	-3,57 ± 0,472	-1,81	a
YDL181W	<i>INH1</i>	ATPase-Inhibitor	-3,45 ± 1,189	-1,72	a
YNL052W	<i>COX5A</i>	Cytochrom-c-Oxidase, Kette Va	-3,45 ± 0,844	-3,15	a
YLL041C	<i>SDH2</i>	Succinatdehydrogenase (Ubiquinon), Eisen-Schwefel-Prot.	-3,33 ± 0,167	-2,15	a
YDL004W	<i>ATP16</i>	ATP-Synthase δ-Untereinheit	-3,13 ± 0,684	-1,92	a
YOR065W	<i>CYT1</i>	Cytochrom c1	-3,03 ± 0,055	-7,04	a
YDR377W	<i>ATP17</i>	ATP synthase f-Untereinheit	-3,03 ± 0,735	-1,64	a
YBR039W	<i>ATP3</i>	γ-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase	-3,03 ± 0,643	-1,72	a
YKL148C	<i>SDH1</i>	Flavoprotein-Untereinheit der Succinatdehydrogenase	-2,94 ± 0,433	-2,20	a
YKL141W	<i>SDH3</i>	Succinatdehydrogenase, Cytochrom b	-2,86 ± 0,327	-1,57	a
YFR049W	<i>YMR31</i>	mitochondriales ribosomales Protein (precursor)	-2,78 ± 0,849	-1,76	a
YJR144W	<i>MGM101</i>	involviert in die Erhaltung des mitochondrialen Genoms	-2,78 ± 0,270	-1,25	
YGL187C	<i>COX4</i>	Untereinheit IV der Cytochrom-c-Oxidase	-2,78 ± 0,309	-4,46	a
YPR020W	<i>ATP20</i>	Untereinheit G der mitoch. F ₁ F ₀ -ATP-Synthase (Dimerform)	-2,78 ± 1,080	-2,60	a
YDL198C	<i>YHM1</i>	benötigt für die Erhaltung des mitochondrialen Genoms	-2,70 ± 0,584	-2,49	a
YEL024W	<i>RIP1</i>	Rieske-Eisen-Schwefel-Prot. des mitoch. Cytochrom-bc1-Komplexes	-2,70 ± 0,095	-4,24	a
YDR298C	<i>ATP5</i>	ATP-Synthase Untereinheit 5; F ₁ -δ; verleiht Oligomycin- Sensitivität	-2,63 ± 0,097	-2,66	a
YML120C	<i>ND11</i>	mitochondriale NADH-Ubiquinon-6-Oxidoreduktase	-2,63 ± 0,277	-2,32	a
YDR178W	<i>SDH4</i>	Succinatdehydrogenase, Membrananker-Untereinheit	-2,63 ± 1,177	-2,22	a
YLR295C	<i>ATP14</i>	ATP-Synthase, Untereinheit h	-2,44 ± 0,595	-1,94	a
YOR176W	<i>HEM15</i>	Ferrochelatase (katalysiert letzten Schritt der Häm-Synthese)	-2,44 ± 0,357	1,3	
YDL066W	<i>IDP1</i>	mitochondriale Form der NADP-spezifischen Isocitratdehydrogenase	-2,44 ± 0,297	-1,36	a
YPL271W	<i>ATP15</i>	nukleäres Gen für die ATP-Synthase-ε-Untereinheit	-2,44 ± 0,476	-1,67	a
YPR191W	<i>QCR2</i>	40 kDa-Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase Hüllen-Protein 2	-2,44 ± 0,714	-2,06	a
YPL078C	<i>ATP4</i>	F ₁ F ₀ -ATPase-Komplex, F ₀ -Untereinheit 4, mitochondrial	-2,38 ± 0,227	-2,02	a
YKL150W	<i>MCR1</i>	NADH-Cytochrom-b5-Reduktase	-2,38 ± 0,340	-2,12	a
YJR048W	<i>CYC1</i>	Iso-1-Cytochrom-c	-2,33 ± 0,487	-22,22	a
YIL070C	<i>MAM33</i>	mitochondriales saures Matrix-Protein	-2,33 ± 1,514	-1,97	a
YJL208C	<i>NUC1</i>	mitochondriale Nuklease	-2,27 ± 0,517	-2,23	a
YJL063C	<i>MRPL8</i>	mitochondriales ribosomales Protein MRPL8 (YmL8)	-2,22 ± 0,840	-1,80	a
YLR395C	<i>COX8</i>	Cytochrom-c-Oxidase, Kette VIII	-2,17 ± 0,236	-3,40	a
YKR066C	<i>CCP1</i>	Cytochrom-c-Peroxidase	-2,17 ± 0,709	1,88	
YGL191W	<i>COX13</i>	Untereinheit VIa der Cytochrom-c-Oxidase, interagiert spezif. mit ATP	-2,08 ± 0,694	-2,69	a
YDL067C	<i>COX9</i>	Untereinheit VIIa der Cytochrom-c-Oxidase	-2,04 ± 0,392	1,24	
YPR058W	<i>YMC1</i>	mitochondriales Transportprotein	-2,00 ± 0,120	-1,04	
YGR183C	<i>QCR9</i>	7,3 kDa-Untereinheit 9 des Ubiquinol-Cyto.-c-Oxidoreduktase-Kompl.	-2,00 ± 0,240	-1,73	a
YKL142W	<i>MRP8</i>	mitochondriales ribosomales Protein	-1,92 ± 0,518	1,1	
YMR081C	<i>ISF1</i>	<i>UPF1</i> -regulierende Funktion auf mRNA-Turnover-Ebene	-1,92 ± 1,036	1,63	
YLR038C	<i>COX12</i>	Untereinheit VIb der Cytochrom-c-Oxidase	-1,92 ± 0,259	-4,85	a
YMR256C	<i>COX7</i>	Untereinheit VII der Cytochrom-c-Oxidase	-1,89 ± 0,214	-3,44	a
YBL045C	<i>COR1</i>	44 kDa-Hauptproteinn der Coenzym-QH2-Cytochrom-c-Reduktase	-1,85 ± 0,446	-3,73	a
YML091C	<i>RPM2</i>	Untereinheit der mitochondrialen RNase P	-1,85 ± 1,029	-1,86	a
YDL078C	<i>MDH3</i>	Malatdehydrogenase	-1,85 ± 0,274	-1,39	a
YER141W	<i>COX15</i>	Cytochrom-Oxidase-Verbindungsfaktor	-1,79 ± 0,274	-1,03	
YDR529C	<i>QCR7</i>	Ubiquinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, Untereinheit 7 (14 kDa)	-1,79 ± 0,415	-2,65	a
YMR056C	<i>AAC1</i>	mitochondrialer ADP/ATP-Translokator	-1,79 ± 0,446	-1,00	
YNL137C	<i>NAM9</i>	mitochondriales ribosomales Protein, kleine Untereinheit	-1,79 ± 0,089	-1,68	a
YMR072W	<i>ABF2</i>	HMG-1-Protein, mitochondrial	-1,79 ± 0,383	1,53	
YBR084W	<i>MIS1</i>	mitochondriale C1-Tetrahydroflav-Synthase	-1,75 ± 0,154	-1,30	a
YBR251W	<i>MRP5</i>	mitochondriales ribosomales Protein, kleine Untereinheit	-1,75 ± 0,523	-1,21	
YOR045W	<i>TOM6</i>	Komponente des mitoch. Protein-Translokations-Komplexes	-1,75 ± 0,708	-1,24	
YML081C	<i>ATP18</i>	Protein assoziiert an ATP-Synthase	-1,75 ± 0,154		
YMR241W	<i>YHM2</i>	mtDNA stabilisierendes Protein, innere Mitochondrienmembran	-1,69 ± 0,115	-1,72	a
YJR121W	<i>ATP2</i>	F ₁ F ₀ -ATPase-Komplex, β-Untereinheit, mitochondrial	-1,37 ± 0,038		
YLR393W	<i>ATP10</i>	essentiell für den Zusammenbau einer funkt. mitoch. ATPase	-1,35 ± 0,073		
YBL099W	<i>ATP1</i>	mitochondriale F ₁ F ₀ -ATPase, α-Untereinheit	-1,16 ± 0,041		
YJL180C	<i>ATP12</i>	essentiell für den Zusammenbau einer funktionellen F ₁ -ATPase	-1,02 ± 0,479		
YNL315C	<i>ATP11</i>	essentiell für den Zusammenbau einer funktionellen F ₁ -ATPase	1,07 ± 0,120		

ORF	Gen	Beschreibung	$\overline{FC} \pm SD$	Avg.FC ¹	CKI score ¹
YOL155C		Ähnlichkeit mit Glucan-1,4- α -glucosidase Sta1p YAR066w	-3,47 \pm 0,866	0,74	-0,44
YOL154W	<i>ZPS1</i>	Zink- und pH-reguliertes Oberflächenprotein, Glykoprotein	-2,65 \pm 0,537	0,56	-0,63
YML123C	<i>PHO84</i>	Transporter für anorganisches Phosphat	-2,39 \pm 1,441	0,27	-1,00
YLR359W	<i>ADE13</i>	Adenylosuccinatylase	-2,36 \pm 1,028	0,72	-0,50
YER072W	<i>VTC1</i>	vakuoläres Transporter-Chaperon, homolog zu <i>S. pombe</i> Nrf1p	-2,03 \pm 0,269	0,55	-1,00
YER003C	<i>PMI40</i>	Mannose-6-phosphatisomerase	-1,84 \pm 0,156	0,68	-0,47
YMR241W	<i>YHM2</i>	mtDNA stabilisierendes Protein, innere Mitochondrienmembran	-1,70 \pm 0,125	0,67	-0,41
YBR072W	<i>HSP26</i>	Hitzeschock-Protein 26	-1,70 \pm 0,391	0,77	-0,44
YJL012C	<i>VTC4</i>	schwache Ähnlichkeit zum regulatorischen Protein Pho81p, vakuoläre Membran	-1,68 \pm 0,074	0,63	-0,53
YDR280W	<i>RRP45</i>	mögliche 3' \rightarrow 5'-Exoribonuklease, Komponente des Exosomen-Komplexes	-1,63 \pm 0,115	0,81	-0,41
YJR118C	<i>ILM1</i>	uncharakterisierter Transporter, Null-Mutante zeigt Wachstumsdefekt auf vergärbaren Kohlenstoffquellen	-1,57 \pm 0,305	0,71	-0,44
YNL110C	<i>NOP15</i>	nukleolares Protein, inv. in Ribosomen-Biosynthese	-1,57 \pm 0,104	0,77	-0,41
YER146W	<i>LSM5</i>	Sm-artiges Protein, inv. in mRNA-Abbauwegen	-1,56 \pm 0,066	0,79	-0,44
YDL084W	<i>SUB2</i>	ATP-abhängige RNA-Helikase, pre-mRNA-Splicing-Faktor, inv. in mRNA-Kern-Export	-1,48 \pm 0,440	0,77	-0,41
YDR492W		unbekannte Funktion, starke Ähnlichkeit zum hypothet. Protein YOL002c	-1,48 \pm 0,043	0,81	-0,44
YJL111W	<i>CCT7</i>	Komponente des cytosol. Chaperonin-Cct-Ringkomplexes (Cytoskelett-Biogenese)	-1,43 \pm 0,150	0,74	-0,41

Tabelle 5.22: 16 abgereicherte RNA-Spezies (40 %) in der Punktmutante G₈₁, die ebenfalls im Datensatz der 41 (100 %) herunterregulierten ORFs einer genomweiten Transkriptionsprofilanalysen von *UPF123*⁻-Mutanten [LELIVELT und CULBERTSON 1999] enthalten waren.

(1): Angabe des Anreicherungsfaktors „Avg.FC“ und des Reproduzierbarkeit-Indikators „CKI score“ aus der *UPF123*⁻-Studie.

Das hellgrau unterlegte Gen *HSP26* wurde in der Proteinexpressionsstudie mitochondrialer Proteine nach Kultur-Inkubation bei 37°C als in den Mutantenstämmen unterexprimiert gefunden.

Die dunkelgraue Unterlegung kennzeichnet erneut das Suppressorgen *YHM2* des G₈₁^(ts)-Phänotyps [YOUNG 1998].

Proteinebene abgereichert gefunden wurden.

Wiedergefunden wurden folgende Untereinheiten aus den Atmungskettenkomplexen:

- ATP-Synthase-Komplex: *ATP4*, *ATP7* und *ATP16*,
- Cytochrom-bc-1-Komplex: *QRC2*, *QCR7*,
- Succinat-Dehydrogenase-Komplex: *SDH1*.

Desweiteren konnte die Abreicherung des 26kDa-Hitzeschockproteins Hsp26p auf Transkriptionsebene ebenfalls bestätigt werden (Tabelle 5.22). Das Gen war auch unter den reproduzierbar abgereicherten 41 Probensätzen im Datensatz von [LELIVELT und CULBERTSON 1999] enthalten.

5.1.9.10.1 Vergleich mit anoxischen Daten

Zellen unter anaeroben Bedingungen besitzen wie bei G₈₁ eine abgeschwächte mitochondriale Atmungsaktivität. Ein Großteil der am stärksten abgereicherten Gene wies analoges Verhalten in einer genomweiten Studie zur Reaktion von *Saccharomyces cerevisiae* auf Sauerstoffausschluss auf. Dieses Ergebnis spiegelt sich repräsentativ in den 70 am stärksten abgereicherten ORFs von Tabelle 5.1.9.9 (Spalten 6 und 7) wider, in der Ergebnisse aus der Anoxie-Studie [KWAIST et al. 2002] (Probensätze von mitochondrial codierten Genen sind dort nicht berücksichtigt) enthalten sind. Dabei waren von den 70 Probensätzen 41(59%) in beiden Datensätzen deutlich abgereichert.

Der umfassendere Vergleich mit den anoxischen Transkriptomdaten verdeutlichte aber, dass ein Großteil der unter Ausschluss von Sauerstoff mittelstark oder schwächer abgereicherten

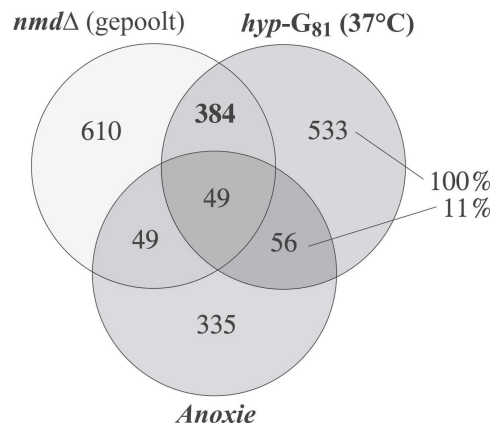


Abbildung 5.43: Überlappung angereicherter Transkripte in der G₈₁-HDOA-Analyse mit denen von *upfΔ*-Stämmen [HE et al. 2003] und Hefestämmen unter anaeroben Bedingungen [KWASt et al. 2002]. In das Venn-Diagramm wurden nur akkumulierende Transkripte aus den drei Studien mit einem FC-Faktor $\geq 1,7$ und einem p-Wert unter 0,065 einbezogen.

ORFs nicht unter den abgereicherten Transkripten bei G₈₁ zu finden war. Von insgesamt 250 signifikant abgereicherten ORFs überlappten 20% mit der Anoxie-Studie.

Es stellte sich auch die Frage, ob das Muster angereicherter Transkripte in der Mutante kausal durch die eingeschränkte mitochondriale Atmung mitverursacht war. Daher wurden die angereicherten Transkripte ebenfalls mit denen des anoxischen Datensatzes verglichen.

Abbildung 5.43 zeigt die Überlappung der 533 signifikant angereicherten Probensätzen mit 335 ORFs, welche bei Sauerstoffausschluss akkumulierten [KWASt et al. 2002]. In den Vergleich wurde die gemittelte Zahl angereicherter ORFs aus *upfΔ*-Stämmen [HE et al. 2003] einbezogen. 384 (72%) dieser Transkripte waren auch in G₈₁-Stämmen angereichert. Dagegen wurden im Vergleich zur Anoxiestudie nur 56 gleiche Transkripte (11%) gefunden. Dies zeigt, dass das Anreicherungstranskriptom von G₈₁ nicht durch eine ausfallende mitochondriale Atmung ausgelöst wird.

5.1.9.11 Überlappung von Transkriptgruppen

In den vorhergehenden Unterabschnitten wurden Zusammenhänge der Anreicherung von mRNA-Molekülen in G₈₁ mit einer Defizienz des NMD-Abbauweges aufgezeigt. Es wur-

Datengrundlage: 533 höchst angereicherte ORFs in G ₈₁						
	533 (100 %)	NMD- ¹ Defizienz	bei An- ² aerobie	subtelo- merisch	nahe Ty-LTR	nicht sub- telomer
NMD-Defizienz ¹	384 (72,1 %)	–	49	182	73	127
bei Anaerobie ²	56 (10,5 %)	49	–	22	10	24
subtelomerisch	165 (31 %)	81	39	–	–	–
nahe Ty-LTR	101 (18,9 %)	33	19	–	–	–
nicht subteler	219 (41,1 %)	55	44	–	–	–

Tabelle 5.23: Anteile der gefundenen Effekte an den am höchsten exprimierten 533 Probensätzen in G₈₁ und deren Effektanteil-Überlappung.

(1) Daten basieren auf Vergleich mit der HDOA-Analyse von *upf*⁻-Mutanten [HE et al. 2003].

(2) Daten aus der genomweiten Analyse von anaerobisch induzierten Genen in Bäckerhefe [KWASt et al. 2002].

de eine Einschränkung des telomeren Positionseffektes festgestellt, die bei Ausfall der *UPF*-Genfunktionen ebenfalls beobachtet wurde. Wie gezeigt, wirkte sich die Lage von ORFs nahe an Ty-LTR-Sequenzen auf die Akkumulation aus. Ty-LTR-Elemente selbst zeigten ebenfalls eine signifikante Anreicherung.

Die beschriebenen Gruppen angereicherter Transkripte zeigten Überlappungen. In diesem Zusammenhang stellt Tabelle 5.23 die Aufteilung der 533 akkumulierenden Transkripte dar. Die jeweiligen Anteile von ORFs aus den einzelnen Gruppen (Spalten 3-7) an der jeweiligen betrachteten Effektgruppe (Spalte 1) sind angegeben. Zu erkennen ist: Etwa 47% (182 von 384) der mit der NMD-Studie überlappenden ORFs waren subtelomerisch lokalisiert gegenüber 33% (127) nicht telomerischen. Ein Anteil von 73 (19%) Ty-LTR-nahen ORFs an dieser Gruppe wurde deutlich.

Ein Beispiel, in der ein Großteil der Mitglieder einer Genfamilie akkumuliert in mehreren Effektgruppen gefunden wurde, stellte das Expressionsverhalten der Seripauperin- und Zellwand-Manno-Genfamilie dar. Zu ihr gehören die *PAU*-, *DAN*-, *TIR*- und *TIP*-Gene. Insgesamt werden 24 ORFs in der Seripauperinfamilie zusammengefasst, von denen ein Großteil chromosomal subtelomerisch codiert ist und ähnliche Aminosäuresequenzen besitzt. Ihre Genfunktionen sind kaum geklärt, werden aber mit der Stressantwort auf verschiedene äußere Reize in Verbindung gebracht. Viele *PAU*- und *DAN*-Transkripte akkumulierten in G_{81} , in *upf*-defizienten Hefestämmen [HE et al. 2003] sowie unter Sauerstoffausschluss (gezeigt von [RACHIDI et al. 2000] und im Genchipdatensatz von [KWAST et al. 2002]). Eine Tabelle, welche die Akkumulation der Seripauperingruppe verdeutlicht, ist im Anhang enthalten (s. Anhang, Abschnitt 7.2, S. 197).

5.1.9.12 Hinweise auf weitere Hypp-Funktionen aus den Genchip-Daten

Die Einteilung angereicherter Transkripte in Untergruppen und die Analyse ihrer Überlappungen identifizierten eine Transkriptgruppe aus 52 Mitgliedern. Diese waren weder in den Genchipdatensätzen von *upf*-defizienten Hefestämmen angereichert noch nahe an den Telomeren oder Ty-LTR-Elementen codiert. Ebenfalls akkumulierten diese mRNAs nicht unter anaeroben Bedingungen [KWAST et al. 2002]. Diese 52 ORFs konnten daher im Zusammenhang mit weiteren Zusammenhängen der Hypp-Funktion gesehen werden. Eine Zusammenstellung der Transkripte mit den relativ höchsten Anreicherungen dieser Gruppe, zu denen einige Vertreter der Hexosetransporter-Familie (*HXT*-Gene) gehörten, listet Tabelle 5.24 auf. Genchipdaten zu allen 52 ORFs finden sich im Anhang auf Seite 198.

ORF	Gen	Beschreibung	FC ± SD	\bar{p}
YDR345C	<i>HXT3</i>	hochaffiner Glukose-Transporter	5,77 ± 1,19	0,00139
YPL198W	<i>RPL7B</i>	ribosomales Protein L7B (L6B) (rp11) (YL8)	3,87 ± 0,77	0,02461
YHR092C	<i>HXT4</i>	hochaffiner Glukose-Transporter	3,79 ± 0,33	0,01276
YHR094C	<i>HXT1</i>	hochaffiner Hexose(Glukose)-Transporter	3,73 ± 1,54	0,06364
YFL026W	<i>STE2</i>	α-Faktor-Pheromon-Rezeptor (sieben Transmembranhelices)	3,38 ± 0,69	0,01190
YDR461W	<i>MFA1</i>	α-Faktor-Paarungs-Pheromon (Precursor)	3,24 ± 0,68	0,0650
YHR160C	<i>PEX18</i>	Protein-Peroxisom-Zielsteuerung	3,20 ± 0,72	0,05100
YJR094C	<i>IME1</i>	Masterregulator der Meiose	3,08 ± 0,16	0,02561
YKL101W	<i>HSL1</i>	Protein-Kinase mit Rolle beim G ₂ -M-Übergang des Zellzyklus	3,07 ± 0,65	0,02473
YDL024C	<i>DIA3</i>	Protein mit unbek. Funktion, involviert beim invasiven und pseudohyphalen Wachstum	2,94 ± 0,35	0,01012
YJR157C	<i>FAR1</i>	Faktor-Arretierungs-Protein	2,90 ± 0,81	0,04951
YHR164C	<i>DNA2</i>	DNA-Replikation-Helikase	2,86 ± 0,18	0,05310
YHR164C	<i>MSR1</i>	Arginyl-tRNA-Synthetase	2,86 ± 0,38	0,05155
YMR011W	<i>HXT2</i>	hochaffiner Hexose-Transporter 2	2,85 ± 0,73	0,03611
YHR082C	<i>KSP1</i>	Ser-Thr-Proteinkinase	2,79 ± 0,59	0,02158
YHR154W	<i>RTT107</i>	Regulator der Ty1-Transposition; etabl. stilles Chromatin	2,77 ± 0,18	0,05500
YHR109W	<i>CTM1</i>	Cytochrom-c-Methyltransferase	2,74 ± 0,83	0,03661
YFL034C-A	<i>RPL22B</i>	ribosomales Protein L22B (L1c) (rp4) (YL31)	2,45 ± 0,84	0,04112
YLR382C	<i>NAM2</i>	mitochondriale Leucyl-tRNA-Synthetase	2,29 ± 0,76	0,02011
YHR024C	<i>MAS2</i>	53 kDa-Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungs-Protease	2,23 ± 0,69	0,05501
YDR060W	<i>MAK21</i>	essentiell für die Biogenese des 60S-Ribosomen-Untereinheit	2,21 ± 0,94	0,04881
YPL012W	<i>RRP12</i>	benötigt für normale pre-rRNA-Prozessierung	2,16 ± 0,98	0,03321
YHR165C	<i>PRP8</i>	RNA-Splicing-Faktor	2,15 ± 0,45	0,05666

Tabelle 5.24: 23 Gene aus der Gruppe von 52 ORFs, die im Zusammenhang mit weiteren Auswirkungen der *HYP2*-Mutation stehen. Die Einträge sind nach ansteigendem mittleren *FC*-Wert sortiert.

5.1.10 Überprüfung der Überlebensfähigkeit von humanen und hefeeigenen *HYP*-Mutanten

Zur Klärung der Frage nach der Überlebensfähigkeit von G₈₁-Zellen bei permissiver und restriktiver Temperatur wurde ein MTT-Tetrazoliumsals-Reduktionstest durchgeführt (MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid). Obwohl weithin angenommen wurde, dass MTT durch Dehydrogenasen von aktiven Mitochondrien in lebenden Zellen reduziert wird, wurde gezeigt, dass diese Reduktionsaktivität auch in anderen zellulären Kompartimenten als Mitochondrien auftritt. Ein großer Anteil des zellulären MTT-Reduktionsvermögens (bis 45%) wird jedoch Succinat-abhängig von mitochondrialen Dehydrogenasen gestellt [BERNAS und DOBRUCKI 2002], so dass der Test auch eine gewisse Aussage über die mitochondriale Atmungsaktivität der Zelle macht.

Gültig bleibt, dass die Tetrazolium-Salz-Messung im MTT-Assay als Quantifizierungsmethode angesehen wird, um Zell-Proliferation, Zell-Überlebens-Vermögen und Cytotoxizität zu messen. So zeigten HODGSON und BUTTON an Hefezellen die Korrelation der Zahl lebensfähiger Zellen mit der Menge des aus dem MTT gebildeten Formazans [HODGSON et al. 1994].

In dem Assay wurden Kulturen aus unabhängig isolierten Stämmen der Mutante G₈₁ und dem entsprechenden Wildtyp verglichen. Es sei daran erinnert, dass dies einer heterologen Expression der humanen Wildtyp-Form des Hypusin enthaltenden Proteins und der von diesem abgeleiteten Punktmutante G_{81V} entsprach. Daher sollte auch Hyp2p-Wildtypstämme in die Überprüfung einbezogen werden, was zum Einsatz der oben beschriebenen Hefestämme WDH(hum)TO, WDHyp2TO, WDHG₈₁TO und WDHG₈₂TO führte (alle Plasmide standen in diesen Stämmen unter der Kontrolle des Tetracyclin-Off-Promotors).

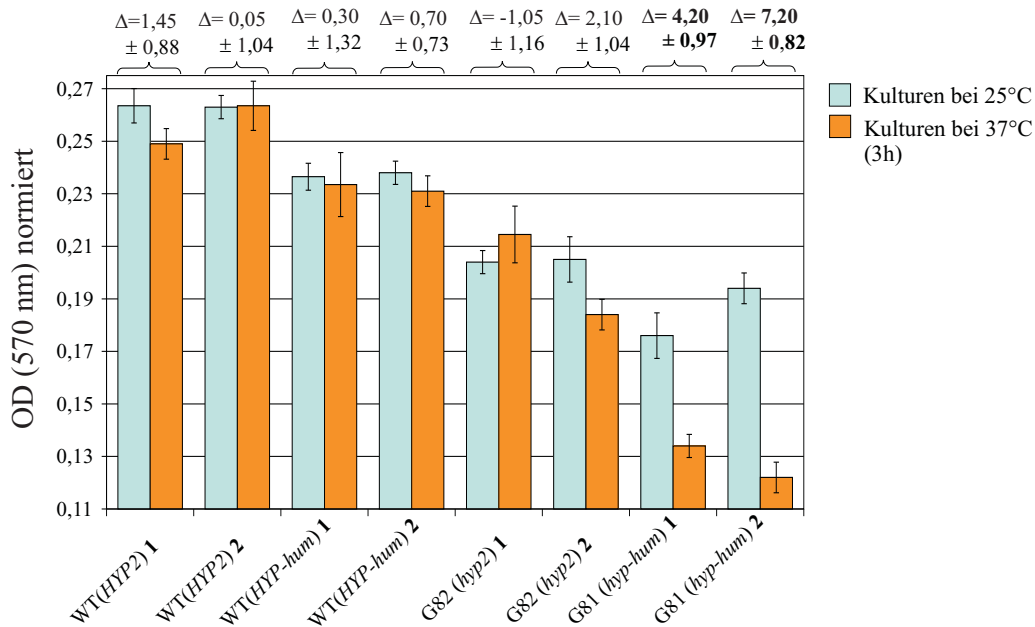


Abbildung 5.44: MTT-Assay von Mutanten- und Wildtyp-Kulturen gezüchtet bei permissiver und restriktiver Temperatur. Von jeder Stammsorte wurden jeweils zwei unabhängige Isolanten in Kultur-Triplikaten eingesetzt. Die Inkubationsdauer mit MTT betrug drei Stunden. Danach wurde erneut auf die gleiche Zellkonzentration von $5 \cdot 10^8$ Zellen/ml normiert und die OD bei 570 nm bestimmt, welche proportional zu der Menge des gebildeten blauen Formazans ist. Über dem Diagramm sind die absoluten OD-Differenzen zwischen Kulturen gleicher genetischer Ausstattung bei 25°C und 37°C nach der Beziehung: $\Delta = |OD_{570nm}(K_{25^\circ C}) - OD_{570nm}(K_{37^\circ C})| \times 100$ angegeben. Die Standard-Abweichung der aus den Triplikatmessungen erhaltenen normierten OD_{570nm} -Werte entspricht den Fehlerbalken.

Um eine signifikante Reduktion von MTT zum MTT-Formazan messen zu können, befanden sich die zu überprüfenden Hefe-Kulturen von Wildtyp und Mutante in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei 25°C. Nach Verdünnung und Normierung aller Kulturen auf die gleiche Zellzahl und Zugabe von MTT ($c=5$ mg/mL) wurden jeweils zwei unabhängig isolierte Hefestämme mit gleichem genetischen Hintergrund sowohl bei 25°C als auch bei 37°C für drei Stunden inkubiert. Danach wurde erneut auf die Zellzahl normiert und die Menge des gebildeten Formazans photometrisch bestimmt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Bei der Zellzahlnormierung war zu beachten, dass G_{81} -Zellen im Gegensatz zu Wildtyp- und G_{82} -Zellen morphologisch ein durchschnittlich größeres Zellvolumen besaßen.

In Abbildung 5.44 sind die gemittelten und normierten Absorptionswerte für beide Stammsysteme dargestellt. Der Temperaturwechsel von 25 auf 37°C wirkte sich nicht auf die Lebensfähigkeit der Wildtypkulturen aus, unabhängig davon, welches Wildtyp-Hyp-Protein sie exprimierten. Die Dehydrogenase-Aktivität der WT-(HYP-hum)-Zellen lag generell leicht unterhalb der in WT-(HYP2)-Zellen gemessenen. Die Werte der Hyp2p-Mutante G_{82} zeigten wiederum eine reduzierte Formazanbildung, wobei kein Einfluss der Temperatur messbar war. Ein deutlicher Abfall der Absorption war zwischen G_{81} -Zellen, die bei 25 und 37°C inkubiert wurden, sichtbar. Dies ist in Abbildung 5.44 an den höheren Δ -Werten zwischen 4,2 und 7,2 für die G_{81} -Säulen gegenüber Δ -Werten um 1 für die übrigen Hefestämme ablesbar. Demnach besaßen G_{81} -Zellen bereits bei 25°C geringere Dehydrogenase-Aktivitäten gegenüber dem entsprechenden Wildtyp. Bei 37°C ist die mitochondriale Atmungsaktivität und die Lebensfähigkeit der

Zellen, wie schon aus den Vorläuferexperimenten ersichtlich, herabgesetzt.

5.1.11 Wachstumsverhalten auf sorbitolhaltigem Medium

Bei einer Charakterisierung von drei punktmutierten *HYP2*-Allelen [VALENTINI et al. 2002] deutete die Auffindung von *PKC1* und von drei *WSC*-Genen als Suppressoren der dort beobachteten Hochtemperatur-Phänotypen auf eine Verbindung zwischen Hyp2p und einem Stressantwortweg hin, der den Erhalt der Zellwand-Integrität mit beeinflusst. Dort erhöhte der Zusatz von Sorbitol als osmotischer Stabilisator signifikant die Fähigkeit der ts-*HYP2*-Mutante zum Wachstum bei 37°C.

Um zu überprüfen, ob die Mutante G₈₁ des humanen *HYP* in dem vorliegenden Stammhintergrund (pRSG313-Plasmid, *GAL*-Promotor) eine entsprechende funktionelle Beeinträchtigung der Zellwandintegrität aufwies, wurde ihr Wachstumsverhalten bei Zusatz des osmotischen Stabilisators Sorbitol getestet.

Eine 2%ige Sorbitolkonzentration im Vollmedium YEP-Galaktose verbesserte wiederholt das Wachstum von G₈₁-Stämmen bei permissiver oder restriktiver Temperatur nicht. Bei 37°C arretierte das Zellwachstum nach wie vor vollständig.

5.1.12 Elektronenmikroskopische Untersuchung von G₈₁

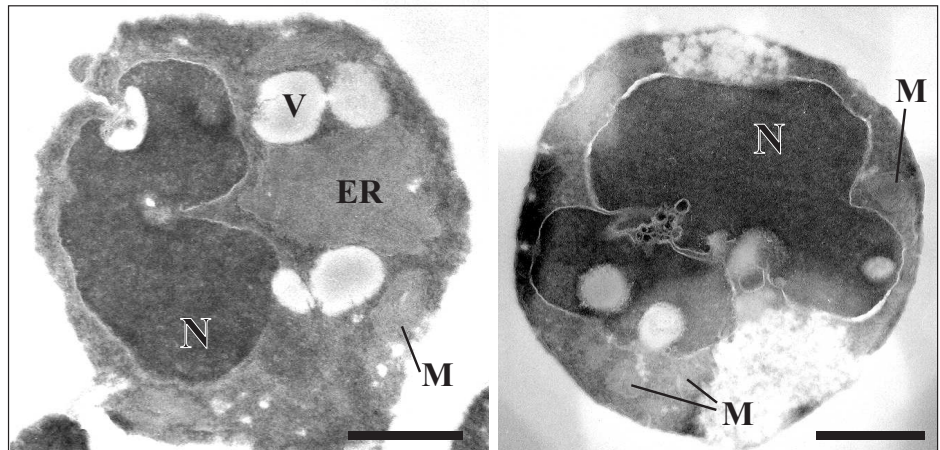
In Ergänzung zur Analyse der Mitochondrienfunktion und Prüfung der Lebensfähigkeit von G₈₁-Zellen wurde durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung Einblick in die Morphologie von Mutanten- und Wildtypzellen bei beiden Temperaturstufen gewonnen.

Untersucht wurden Wildtyp- und G₈₁-Zellen aus den Hefestämmen WDH(hum)Gal und WDHG₈₁Gal gezüchtet in Galaktose-SSM. Die Inkubation bei 25 bzw. 37°C dauerte 6 Stunden vor der direkt anschließenden Ernte der Zellen, die sphäroplastierte und fixiert wurden.

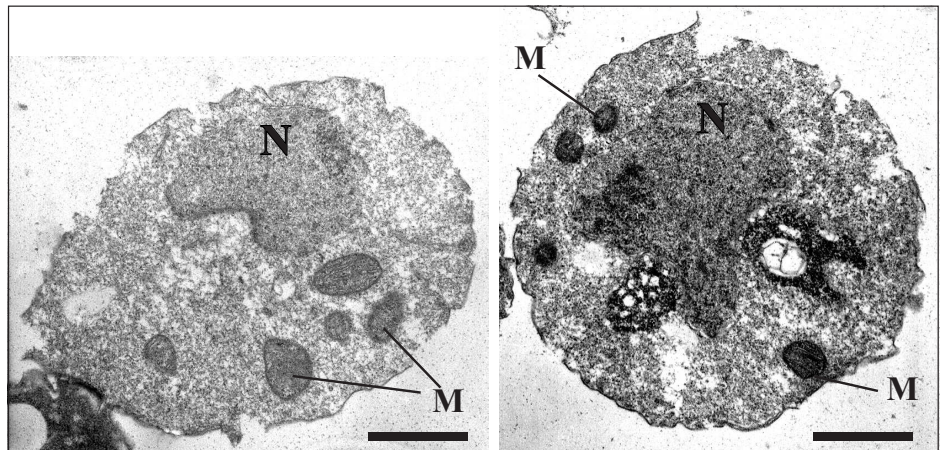
Aus dem Vergleich von Wildtyp- und G₈₁-Sphäroplasten bei permissiver Temperatur (Abbildung 5.45 A.-C.) wird deutlich, dass es in G₈₁ zur Biogenese von Mitochondrien kommt. Anzahl und Form der Mitochondrien waren in den Mutantenzellen ähnlich wie im Wildtyp. Bei Betrachtung des gesamten Erscheinungsbildes der 25°C-Zellen fiel jedoch bei der Mutante neben ihrem leicht höheren Zellvolumen die stets geringere Elektronendichtestruktur vieler Organellen einschließlich des Zellkernes auf. Dadurch waren die Abgrenzungen zwischen Zellkern, Vakuole, ER, Mitochondrien und Cytoplasma häufig weniger ausgeprägt als im Wildtyp. Die Mitochondrien erschienen in sehr vielen überprüften Einzelzellen der Mutante als dunkle Aggregate vor hellem cytoplasmatischem Hintergrund, während der Wildtyp ein gerade umgekehrtes Erscheinungsbild aufwies.

Nach Inkubation bei restriktiver Temperatur änderte sich die Morphologie von G₈₁-Zellen drastisch (Abb.5.45 D.). Im Zellkern wurden klare Veränderungen der Chromatinstruktur sichtbar, die an apoptotische Zellkern-Phänotypen erinnerten. Bei diesen kommt es im Zuge einer Chromatinfragmentierung zu einer morphologischen Unterscheidbarkeit von maginiertem und kondensiertem Chromatin.

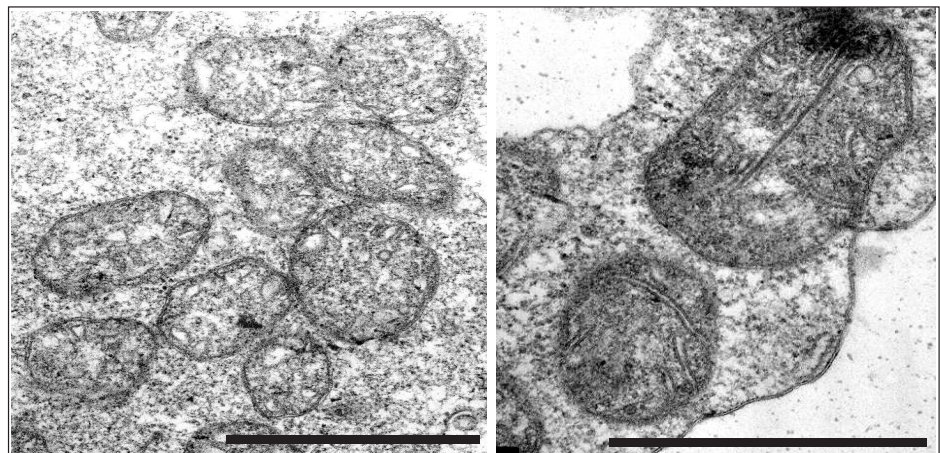
A. Wildtyp-Zellen,
HYP(hum)
exprimierend,
kultiviert bei 25°C



B. G₈₁-Zellen,
kultiviert bei 25°C



C. Vergrößerung
von Mitochondrien
in G₈₁-Zellen,
kultiviert bei 25°C



D. G₈₁-Zelle
nach 6-stündiger
Inkubation bei 37°C

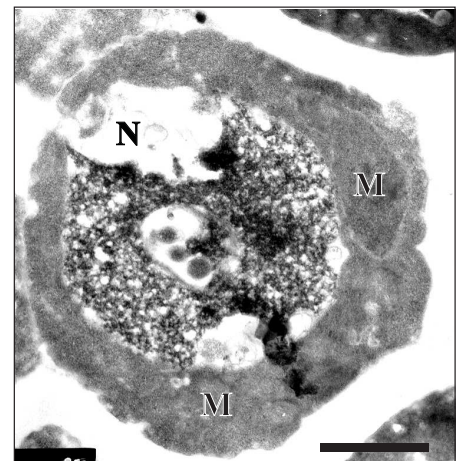


Abbildung 5.45: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von sphäroplastierte G₈₁-Zellen und Wildtyp-Zellen nach Inkubation bei beiden Temperaturstufen in Galaktose-haltigem Selektivmedium. In Bild D. sind Veränderungen an der Zellkern-Chromatinstruktur (Abgrenzung von marginiertem und kondensiertem Chromatin) sichtbar.
N: Zellkern; V: Vakuole; M: Mitochondria; ER: endoplasmatisches Retikulum.

(Balken= 1 µm)

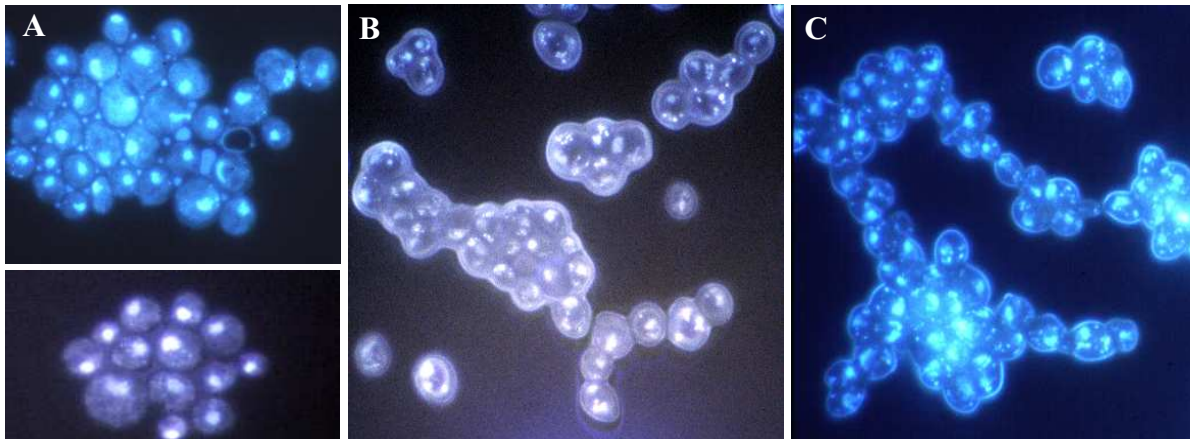


Abbildung 5.46: DAPI-Fluoreszenzfärbung des *S.cerevisiae*-Stammes WDHG₈₁Gal mit dem Plasmid pRSG313-*hyp(hum)*-G₈₁/HIS3 und dem entsprechenden Wildtypstamm WDH(hum)Gal (Plasmid pRSG313Hyp(hum)) A(oben): Wildtyp-Zellen bei 25 °C; A(unten): Wildtyp-Zellen bei 37°C; B: G₈₁-Zellen 25°C; C: G₈₁- Zellen nach 6 stündiger Inkubation bei 37°C.

5.1.13 Prüfung auf apoptotisches Verhalten

In Abschnitt 5.1.10 wurde eine herabgesetzte Lebensfähigkeit von G₈₁-Zellen bei permissiver und vor allem bei restriktiver Temperatur gemessen. Ferner zeigte die EM-Studie Veränderungen der Chromatinstruktur bei 37°C. Ausgehend von diesen Beobachtungen lag der Verdacht nahe, dass es bei G₈₁-Zellen im Zustand einer arretierten Zellproliferation zu Absterbeprozessen kam. Wenn dem so wäre, bliebe zu klären, ob es sich um nekrotische oder apoptotische Vorgänge handelte. Es ist bekannt, dass Hefezellen eine spezielle Art von Todesprogramm besitzen, das z.B durch die heterologe Expression des apoptotischen Induktorgens *BAX*, für das in Hefezellen kein Homologes bekannt ist, aktiviert werden kann. Es kommt dabei zur Ausbildung von typischen Apoptosemarkern wie DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation, Membranbläschenbildung und Externalisierung von Phosphatidylserin [FROEHLICH und MADEO 2000].

5.1.13.1 DAPI-Fluoreszenzfärbung und TUNEL-Assay

Um zu überprüfen, ob es zu apoptotischen Vorgängen kam, wurden die nukleären morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante durch DAPI-Fluoreszenzfärbung der Zellkerne weiter untersucht.

Kulturen in der frühlogarithmischen Wachstumsphase von Wildtyp und Mutante G₈₁ wurden unterschiedlich lange (2,7 und 21 Stunden) bei 37°C inkubiert. Die danach durchgeführte DAPI-Fluoreszenzfärbung zeigte bei Zellen, die die Wildtypform von Hyp(hum)p exprimierten, sowohl bei 25°C als auch bei 37°C eine normale Zellkernmorphologie bei Detektion von scharfrunden Zellkernen in jeder Zelle. Dabei konnte klar zwischen kleineren punktförmigen Fluoreszenzen, stammend von mt-DNA der Mitochondrien, und den eigentlichen kompakten Zellkernen unterschieden werden.

Die Verteilung fluoreszierender DNA-Kompartimente in G₈₁-Zellen zeigte bei beiden Temperaturen deutliche Unterschiede zum Wildtyp. Das Zellvolumen erschien leicht erhöht gegenüber dem Wildtyp, die Fluoreszenz der Zellkerne wirkte deutlich abgeschwächt und weniger

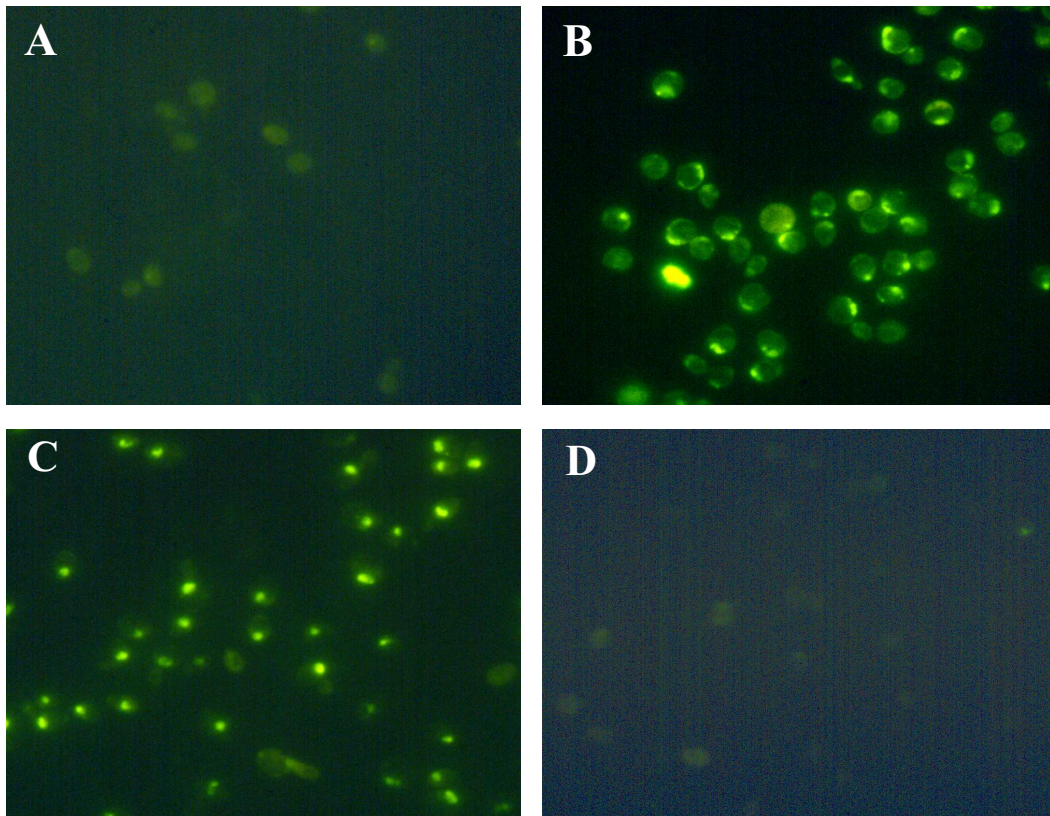


Abbildung 5.47: TUNEL-Test auf freie 3'-OH-Enden erzeugt durch DNA-Strangbrüche. Als Positivkontrolle fungierten mit H_2O_2 behandelte Wildtypzellen, als Negativkontrolle (nicht gezeigt) Wildtypzellen kultiviert bei 25°C und 37°C .

A: G_{81} -Zellen, gezüchtet bei 25°C .

B: G_{81} -Zellen nach Inkubation bei 37°C für 6 h.

C: Wildtyp-Positivkontrolle: Inkubation von Wildtypzellen in Gegenwart von H_2O_2 (3 mM) für 6 h.

D: Wildtyp-Zellen, inkubiert bei 37°C (6 h).

scharf abgegrenzt. Die Lage der Zellkern-Fluoreszenz in der Zelle war im Vergleich zum Wildtyp bei beiden Temperaturstufen weniger zell-zentriert und erschien oft näher an den Zellrändern.

Bei 37°C nahm der Anteil der Zellen zu, bei welchen eine asymmetrische Verteilung des Chromatins mehr zur Kernhülle beobachtbar war (Anzeichen für Chromatinmarginierung). Mit zunehmender Inkubationsdauer bei 37°C stieg dieser Anteil ebenfalls. Bei einem Teil der Zellen schien die Zellkern-DNA-Fluoreszenz nicht vorhanden zu sein. Anzahl und Stärke der Mitochondrien-Fluoreszenzen waren in der Mutante generell erhöht an der Zell-Peripherie, was bei der Mutante zu einem Bild kleinerer punktierter Fluoreszenzen führte. Die Fluoreszenz von Wildtyp-Mitochondrien war ebenfalls periphär punktförmig, jedoch mit geringerer Intensität als in Mutanten-Zellen.

DNA-Fragmentierung ist ein weiteres Kennzeichen für Apoptose, ein Phänomen, das in situ durch TUNEL-Färbung sichtbar gemacht werden kann. In dem Test werden freie 3'-OH-Enden detektiert, die aus dem Bruch der DNA herrühren [GAVRIELI et al. 1992]. Als Positivkontrolle fungierten Wildtypzellen, die durch H_2O_2 -Exposition im Zuge ihrer Antwort auf oxidativen Stress apoptotisches Verhalten entwickelten [MADEO et al. 1999].

Wie in Abbildung 5.47 D. gezeigt, fluoreszierten die Kerne von Wildtypzellen des Stam-

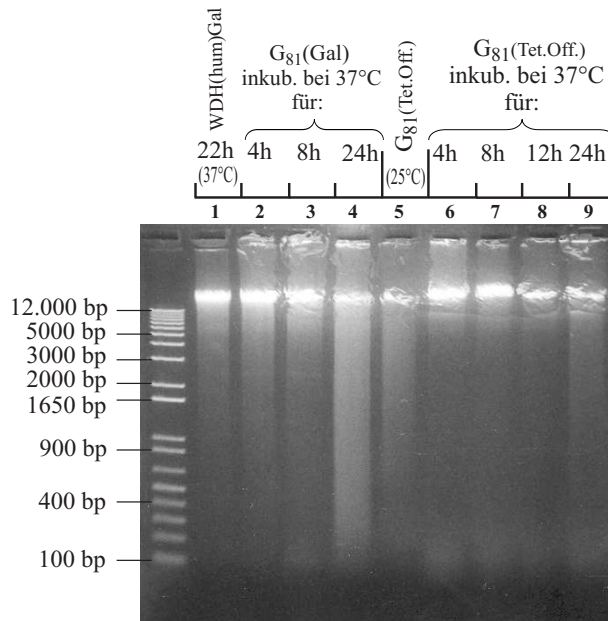


Abbildung 5.48: elektrophoretische Analyse (1,5 % Agarose in TAE) von isolierter chromosomaler DNA aus den G_{81} -Stämmen $WDHG_{81}Gal$ und $WDHG_{81}TO$ nach unterschiedlich langer Kultivierung bei $37^{\circ}C$. Pro Spur wurden jeweils $5 \mu g$ DNA aufgetragen.

mes $WDH(hum)Gal$ bei beiden Temperaturstufen nicht bei Excitation des FITC-Farbstoffes. Ein H_2O_2 -Zusatz in der Endkonzentration von 3 mM und eine Inkubationsdauer von 6 h bei $25^{\circ}C$ reichten aus, um in allen Wildtypzellen deutliche DNA-Brüche zu detektieren (Abb. 5.47 C). Bei $25^{\circ}C$ konnten in Zellen des Stammes $WDHG_{81}Gal$ keine fluoreszierenden Zellkerne erkannt werden. Hingegen traten nach Inkubation bei $37^{\circ}C$ bereits nach 2 h deutlich fluoreszierende Zellkerne auf, deren Anzahl und Stärke sich auch bei längerer Hochtemperaturinkubation (6-21 h) nicht erhöhte (Abb. 5.47 A u. B). Die Form der fluoreszierenden Zellkernbereiche erinnerte dabei häufig an eine Sichelform und war oft an mehreren Stellen der Zelle sichtbar. Dies konnte auf eine Chromatin-Fragmentierung hindeuten und bestätigte die Beobachtungen aus der EM-Studie und der DAPI-Zellkernfärbung.

Eine DNA-Leiter-Bildung beruhend auf einer Chromatinfragmentierung konnte durch Agarose-Gelelektrophorese von chromosomaler DNA gewonnen aus G_{81} -Zellen (Stämme $WDHG_{81}Gal$ und $WDHG_{81}TO$) nach 4, 8, 12 und 24-stündiger Inkubation bei $37^{\circ}C$ wiederholt nicht gezeigt werden. Abbildung 5.48 enthält ein Agarosegel, auf welchem die Auftrennung chromosomaler DNA, die aus G_{81} -Zellen verschiedener Stämme nach Wachstum bei $37^{\circ}C$ in unterschiedlicher Dauer gewonnen wurde.

Diese Beobachtung wurde auch durch andere Autoren, die Hefe-Apoptose studierten, beschrieben [CORNILLON et al. 1994] und könnte damit erklärt werden, dass die Chromatinstruktur von *S. cerevisiae* nur kurze oder keine Linker-DNA zwischen den Nukleosomen besitzt [MADEO et al. 1999].

5.2 Direkte Bestimmung von Protein- und RNA-Bindungspartner des Hypusins enthaltenden Proteins

Um weitere Hinweise auf die spezielle Funktion Hypps vor dem Hintergrund zu erlangen, dass es sich um ein mit RNA und anderen Protein-Faktoren interagierendes Protein handelt, wurde versucht, durch Affinitätschromatographie-Verfahren zelluläre Bindungspartner des Proteins auf Protein- und mRNA-Ebene aufzufinden. Dies sollte neue Aspekte der Proteinfunktion aufdecken und die bis dahin gefundenen Zusammenhänge der Verknüpfung zum 5'-3'-mRNA-Abbauweg und zur mitochondrialen Atmung bestätigen. Ferner sollten diese Bestätigungen in einem von der Punktmutante G₈₁ unabhängigen System erfolgen. Daher wurden unbeeinflusste Hefe-Wildtypstämme für die Analyse herangezogen.

Voraussetzung war die Protein-Expression eines funktionsfähigen Hypp, das möglichst ganz oder teilweise deoxyhypusinyliert und hydroxyliert vorliegen sollte und welches im Komplex mit den Protein- oder RNA-Bindungspartnern leicht zu reinigen war. Anwendung fand das GST-Fusionssystem, da es eine schnelle Aufreinigung ermöglichte, bereits weite Anwendung gefunden und sich schon in der Vergangenheit als effektiv bei der Reinigung von Proteinkomplexen in Hefezellulären extrakten erwiesen hat. Für die Komplexbildung sollten N-terminale GST-Hyp2p-Fusionsproteine eingesetzt werden. Die posttranslationale Prozessierung Hyp2ps sollte durch die moderate Expression in Hefe als Expressions- und Überexpressionssystem sichergestellt werden.

Um die Notwendigkeit der Hypusinmodifikation auf die Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen studieren zu können, wurde neben der Wildtypform Hyp2p auch dessen punktmutierte Form, I₅₁K N-terminal an GST fusioniert. Bei dieser Mutante konnte es zu keiner Modifikation kommen, da der zu Hypusin umgesetzte Lysinrest durch Isoleucin ersetzt war. Die Mutante I₅₁ war auch deshalb von weiterführendem Interesse, da es bei ihrem Funktionstest im doppelt disruptierten Hefestamm nach FOA-Selektion gegen das alleltragende Plasmid wider Erwarten zur Koloniebildung kam. Keine andere Punktmutation am Rest K₅₁ zeigte dieses Verhalten [OTASEK 1997]. Eine Überexpression der Mutante in Wildtyp-Hefestämmen hatte einen dominant negativen Effekt auf das Zellwachstum, welcher nach Stop der I₅₁-Induktion zeitversetzt reversibel und abhängig von der exprimierten Menge des mutierten Proteins war [YOUNG 1998].

Die DNA-Sequenz codierend für Glutathion-S-Transferase (GST) wurde aus dem *E. coli* Expressionsvektor pGEX4T2 PCR-amplifiziert und über die Schnittstellen Hind III/BamH I in den Multicopy-Vektor pYES2 (Invitrogen) kloniert, woraus das Plasmid pYES2GST resultierte. Die Sequenzen für *HYP2* und *HYP2*(I₅₁) wurden mit entsprechend gestalteten Primern aus den linearisierten Plasmiden pRSG313-*HYP2* und pRSG313I₅₁ [OTASEK 1997] gewonnen und gerichtet im korrekten Leserahmen in pYES2GST (BamH I/ Xba I) kloniert, wodurch die Plasmide pYES-GST-*HYP2* und pYES-GST-*HYP2*(I₅₁) generiert wurden. Abbildung 5.49 verdeutlicht die genetische Struktur der GST-*HYP2*-Fusionsproteine, deren 1160 Basenpaare für 383 Aminosäurereste mit einem theoretischen Molekulargewicht des Proteins von 43,3 kDa codieren. Im Fusionierungsbereich wiesen die Konstrukte eine Protease-Spaltstelle für die Serin-Endopeptidase Thrombin auf, die in der natürlichen Hyp2p- bzw. GST-Sequenz nicht vorhanden

war. Zusätzlich wurde eine N-terminal GST-getaggte *HYP2*-Sequenz im reinen *E. coli*-Expressionsplasmid pGEX4T2 (führte zum Vektor pGEX4-*HYP2*) hergestellt, um durch Überexpression in *E. coli* ein unmodifiziertes Wildtyp-Protein für die Bindungsstudien zu erhalten.

Der Hefestamm WDH(hum)Gal wurde mit dem *URA3*-Plasmid pYES-GST-*HYP2* transformiert und über mehrere Generationen in Glukose-haltigem Vollmedium kultiviert. Dabei kam es bei einem Teil der Zellen zu einem Verlust des Single-Copy-Plasmids pRSG313*HYP(hum)*. Durch Plattierung auf UWL⁻-Gal-Medienplatten wurde gegen Hefezellen selektiert, die das *URA3*-Plasmid trugen. Die Kolonien wurden durch Replikaplattierung auf UHWL⁻-Gal-Platten übertragen und einige Tage bei 30°C inkubiert. Die Kolonien die kein Wachstum auf dem zweiten Medium aufwiesen, hatten das *HIS3*-Plasmid verloren. Die Koloniebildung zeigte hier bereits an, dass das N-terminal GST-fusionierte Protein die Hypp-Funktion übernehmen konnte. Abbildung 5.50 zeigt den Wachstumsverlauf des Stammes WDH-GST-Gal im Vergleich zum echten Wildtyp WDHyp2Gal. Die Expression vom $\mu 2$ -Plasmid pYES-GST-Hyp2 im Gegensatz zum Wildtyp (*HYP2* auf Centromerplasmid) hatte keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten. Es wurde deutlich, dass das N-terminale Fusionsprotein die Hypusin-Funktion ebenso gut übernehmen konnte wie das normale Hyp2p.

Nach Aufreinigung von Hyp2p, Hyp2p(I₅₁) aus *S. cerevisiae* und Hyp2p-Fractionen exprimiert in *E. coli* ohne Optimierung auf Erhalt von Proteinkomplexen wurden für eine Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese gleiche Mengen eingesetzt. Abbildung 5.51A zeigt das Ergebnis der Auftrennung. Dabei trennten sich alle drei Fusionsproteine in mindestens 4 Isoformen auf.

Die beiden linken senkrechten Linien verbinden saure Markerproteine, die in sehr geringen Mengen den aufgereinigten Proteinen zugesetzt wurden und so eine Kalibration des isoelektrische Punktes der Hypp-Isoformen relativ zum pI dieser Zusatzproteine ermöglichten, zusätzlich zur Einordnung in den pH-Gradienten von 4,5 bis 6,5. Dabei erschienen die pI-Werte der Hyp2p-Isoformen gewonnen aus *S. cerevisiae* und *E. coli* nahezu bei gleichen pI-Werten, während die mengenmäßig stärkste Isoform des I₅₁-Proteins um ca. 0,14 pI-Einheiten saurer lag als der intensivste Spot des unmutierten Hyp2p exprimiert im gleichen Organismus. Dies bestätigt den theoretisch zu erwartenden pI-Shift des I₅₁-Proteins in den sauren pH-Bereich nach Ersatz

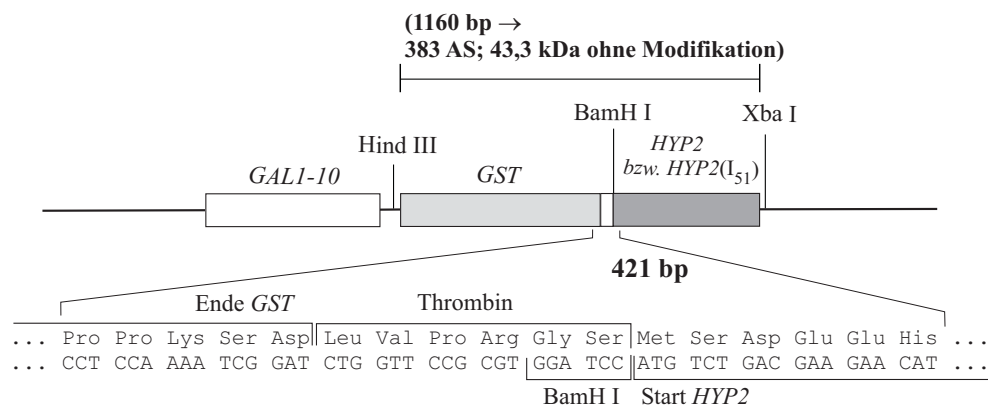


Abbildung 5.49: Struktur und Klonierung des *GST-HYP2*-Inserts im Vektor pYES-GST-*HYP2*. Analoge Struktur besaß die mutierte Form I₅₁ in pYES-GST-*HYP2(I₅₁)*.

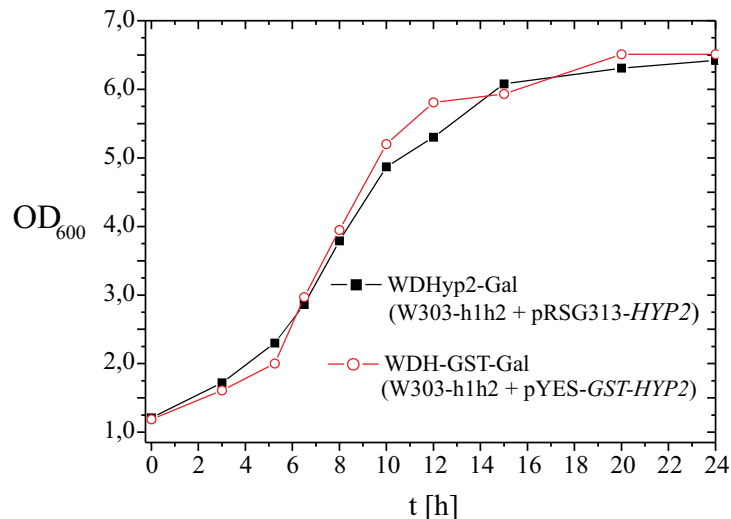


Abbildung 5.50: Wachstumsverhalten der Stämme WDHyp2-Gal und WDH-GST-Gal bei 30°C in UWL⁻- bzw. HWL⁻-Selektivmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle. Das GST-Hyp2p Fusionsprotein kann die Hypp-Funktion übernehmen.

eines basischen Lysin-Restes durch Isoleucin.

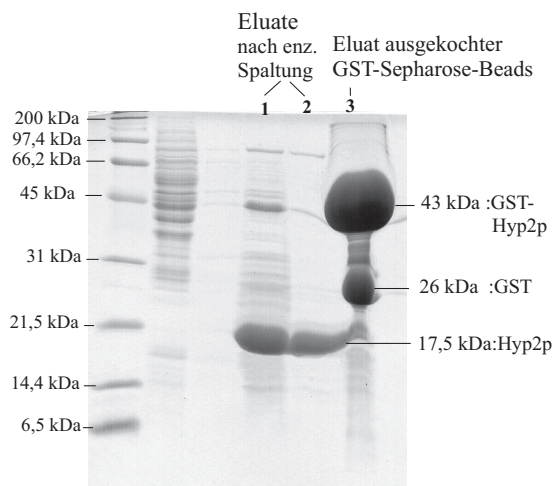


Abbildung 5.52: Enzymatische Spaltung des an Glutathion-Sepharose-4B gebundenen Fusionsproteins GST-Hyp2p durch Thrombin. PAGE (T=14,5%) des in den Spaltpuffer abgegebenen Hyp2p ($M_w = 17,5$ kDa; Spuren 1 und 2) sowie des Eluates, welches nach partiellem Auskochen des Sepharose-Bettes (Spur 3) erhalten wurde.

Da der pI-Wert des freien Hypsusins weit basischer liegt als die von Lysin (pI 9,74¹) und Arginin (pI 10,76¹) [KLIER 1994], war mit einer Verschiebung des Hypsusin enthaltenden Proteins, exprimiert in *S. cerevisiae*, in den basischen pI-Bereich im Vergleich zum *E.coli*-exprimierten (ohne Hypsusin) zu rechnen. Diese pI-Wert Verschiebung wurde nicht beobachtet. Eine vollständig fehlende Modifikation des Hyp2p-Fusionsproteins wurde jedoch als unwahrscheinlich erachtet, da das GST-Hyp2p die Funktion des unveränderten Wildtyp-Proteins *in vivo* gleich gut übernehmen konnte.

Aus einem im *E. Coli*-Stamm M15 heterologen Expressionsexperiment von Hyp2p, welches N-terminal mit einem 6xHis-Tag versehen war [WÖHL 1994] (der Affinitäts-Tag wurde nach der Reinigung durch Verdau mit Proteinase Faktor Xa abgespalten), ging hervor, dass auch das dort aufgereinigte unmodifizierte Protein zwei Isoformen bei ähnlichen pI-Werten aufwies wie das aus Hefe nativ aufgereinigte Hyp2p. Es wurde gezeigt, dass die basische Isoform von einer Phosphorylierung am Serin 1 herrührt, die aber für die Funktion des Proteins nicht essentiell war.

Abbildung 5.51B zeigt die Isoformverteilung des dort angefertigten 2D-Gels. Dies verdeutlicht, dass eine fehlende Hypsusin-Modifikation nicht zwangsläufig zu einer von der modifizierten Form deutlich abweichenden Isoform-Verteilung führen muss.

¹Handbook of Chemistry and Physics, CRC-Press 1999

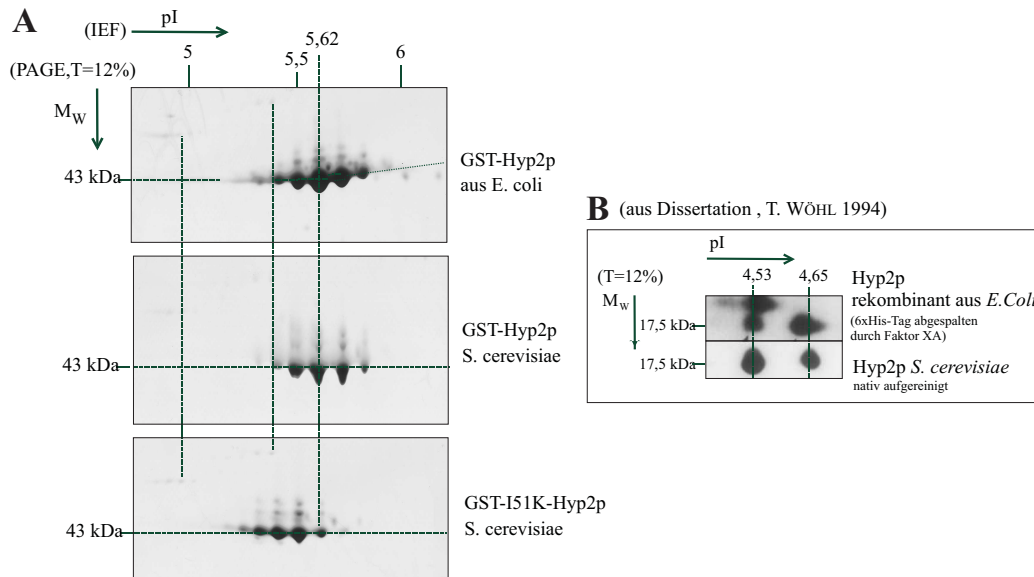


Abbildung 5.51: Die 2D-elektrophoretische Auftrennung von Isoformen der rekombinanten GST-Hypp-Fusionsproteine mit anschließender Silberfärbung deckte deren Isoformenverteilung bei nahezu identischem Molekulargewicht auf. A: Die Isoformenverteilung des Hyp2p(I₅₁) lag dabei um 0,14 pI-Einheiten mehr im basischen Bereich als die der Hyp2p aus Hefe und *E. coli*. B: Isoformenverteilung eines rekombinanten Hyp2p aus *E. coli* im Vergleich mit nativ aufgereinigten Hyp2p aus *S. cerevisiae* [WÖHL 1994].

Die genauen posttranslationalen Ursachen, die zu den Isoformmustern der Fusionsproteine führten, wurden nicht weiter untersucht. Das in *S. cerevisiae* exprimierte GST-Hyp2p wurde qualitativ als verwendbar für die nachfolgenden Experimente befunden.

Überprüft wurde auch die Abspaltbarkeit des GST-Teils durch Thrombin, um ein ungetaggetes Protein zur Verfügung zu haben. Abbildung 5.52 verdeutlicht die erfolgreiche Abspaltbarkeit des GST-Tags von Hyp2p. Da die enzymatische Spaltung mit dem an die Sepharose gebundenen GST-Hyp2p durchgeführt wurde, verblieb Glutathion-S-Transferase am Säulenmaterial, während Hyp2p mit dem richtigen Molekulargewicht in den Spaltpuffer überging. Die vollständige Elution des Sepharose-Bettes nach Abtrennung des Spaltpuffers durch Auskochen zeigt, dass die Spaltung nur partiell war, aber prinzipiell funktionierte und dass keine Nebenspaltprodukte auftraten. Daher eignete sich Thrombin, das eine gewisse Variabilität in der Erkennung positiver Spaltstellen in der Aminosäure-Sequenz aufweist, zur Generierung eines unfusionierten Proteins.

5.2.1 Identifizierung eines Proteinbindungspartners durch Affinitätschromatographie

Die *URA3*-Plasmide pYES-GST-*HYP2*(I₅₁) und pYES-GST-*HYP2* sowie pYES2GST, welches ein exprimierbares unfusioniertes GST-Protein codierte, wurden in den Protease-defizienten haploiden Hefestamm BJ5464 transformiert (ergab die Stämme BJGHyp2, BJGHyp2(I₅₁) und BJGST). Klone, die die Fusionsproteine bzw. das GST-Protein allein exprimierten, wurden isoliert. Das unfusionierte GST-Protein diente als Negativkontrolle zur Erkennung unspezifisch bindender Proteinbindungspartner in der nachfolgenden Affinitätschromatographie. Nach Anzucht der exprimierenden Einzelkolonien in Raffinose-haltigem Medium wurden jeweils vier 500mL-Kulturen vor Eintritt in die früh-logarithmische Wachstumsphase mit Galaktose-Lösung

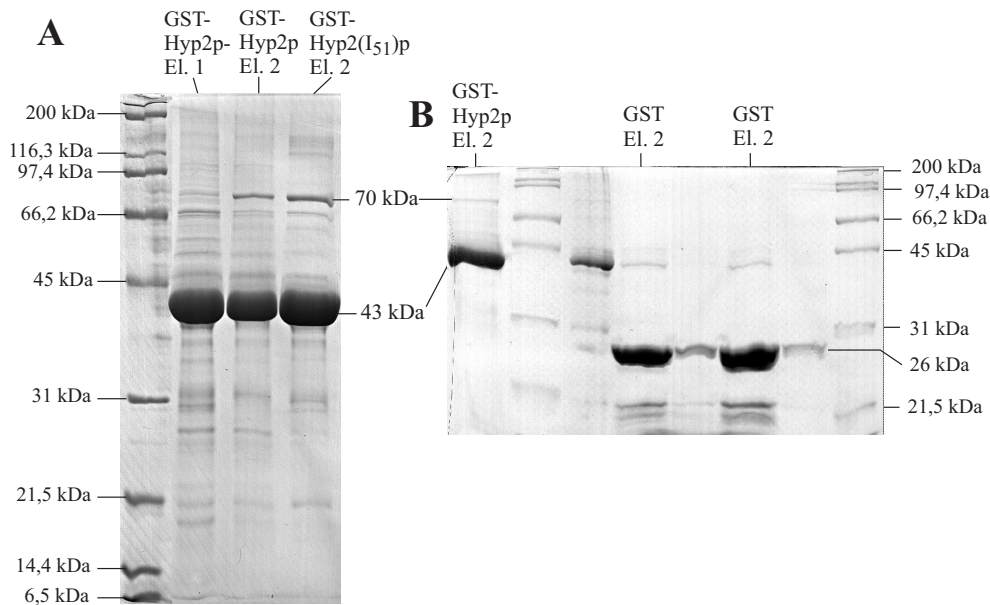


Abbildung 5.53: 1D-Gel-Auftrennung von konzentrierten Eluat-Proteinen als Ergebnis der Protein-Affinitäts-Aufreinigung zur Findung von Protein-Interaktionspartnern der GST-Fusionsproteine GST-Hyp2p, GST-Hyp2(I₅₁)p und unfusionierter Glutathion-S-Transferase als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit Coomassie(R) angefärbt. Eine Proteinbande bei 70 kDa koeluierte mit beiden GST-Fusionsproteinen Hyp2p und Hyp2p(I₅₁), nicht aber mit unfusioniertem GST.

(Endkonzentration 2%) behandelt und so die Proteinexpressionen von den *URA3*-Plasmiden induziert. Die Kulturen wurden bei 26°C für fünf Stunden geschüttelt. Darauf wurden Einzelkulturen desselben Stammes vereinigt, abzentrifugiert und die Zell-Pellets bei -196°C zur Lagerung schockgefroren. Danach folgte der Zellaufschluss in einem für die Protein-Protein-Interaktion optimierten Aufschlusspuffer (mit Proteaseinhibitoren) durch mechanischen Aufschluss in einem Zellhomogenisator nach dem Glasmühlenprinzip von ZILLIG. Das Homogenat wurde dabei durch CO₂-Umströmung (Joule-Thomson-Effekt) gekühlt. Nach Klärung des Zelllysates durch Zentrifugation und Ultrazentrifugation wurde zur Einstellung einer optimalen Salzkonzentration gegen den Bindungs- und Waschpuffer dialysiert. Nach Bindung der Fusionsproteine im vermeintlichen Komplex mit ihren Bindungspartnern an GST-Sepharose-Material wurde das Sepharose-Gelbett ausgiebig mit Waschpuffer bei 2°C gewaschen. Nachdem der OD₂₈₀-Wert unter 0,08 gefallen war, wurde das Gelbett dreimal für 15 Minuten bei 17°C mit einem Bettvolumen Trispuffer (*c* = 50mM; pH 8,0) inkubiert, welcher reduziertes Glutathion (*c*=10 mM) enthält. Nach TCA-Aceton-Fällung der in den jeweils drei Eluatfraktionen enthaltenen Proteine wurden diese in Probenauftragspuffer für die 1D-PAGE resolubilisiert und als Konzentrate durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. In Abbildung 5.53 sind Polyacrylamidgele (*T* = 14%) dargestellt, die den Proteininhalt der Eluatfraktionen 1 und 2 für die Bindung an das GST-Hyp2-Protein zeigen. Aus den Affinitätsbindungen an das unmodifizierte Hyp2(I₅₁) und an unfusionierte Glutathion-S-Transferase wurden jeweils die Konzentrate der Eluate 2 aufgetragen. Die Hauptfraktion der an Glutathion-Sepharose Gesamtproteine befand sich in allen Aufreinigungen jeweils in diesen zweiten Eluat-Fraktionen (Gel nicht gezeigt). Nach der Konzentrierung durch Fällung der Proteine wurden etwa gleiche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen. Die Konzentrierung wird durch den Mengenanteil der GST-Proteine deut-

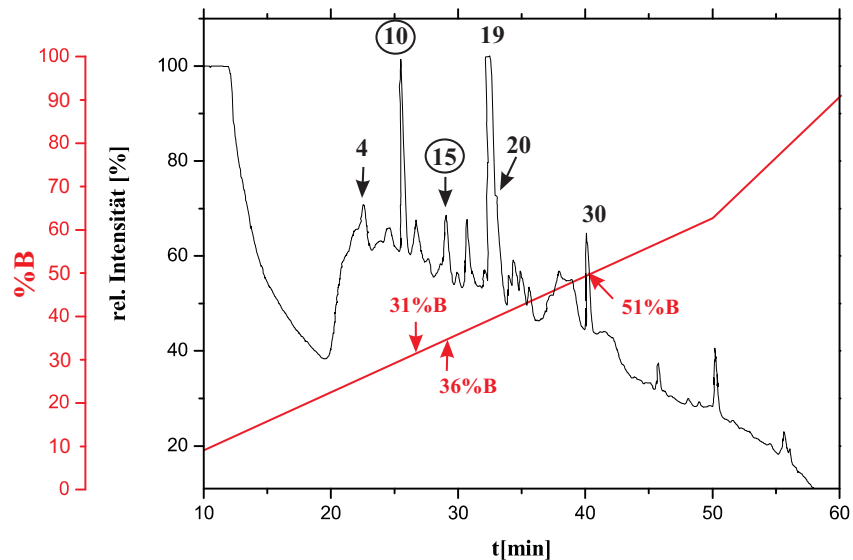


Abbildung 5.54: RP(C18)-HPLC-Chromatogramm, welches die Auftrennung von Spaltpeptiden aufsteigender Hydrophobizität des Proteins p70 nach dessen Restriktionsverdau in der PA-Gelmatrix mit Endoproteinase LysC zeigt. Für die anschließende EDMAN- Sequenzierung wurden die Peaks 10 (31% B) und 15 (36% B) gesammelt und verwendet.

lich.

Sowohl in der zweiten Eluatfraktion bei GST-Hyp2p als auch bei GST-Hyp2(I₅₁)p koeluierte ein deutliche Proteinbande bei ca. 70 kDa, die in der Eluatfraktion 1 bei GST-Hyp2p schwächer vorhanden war (Abb. 5.53A), was zeigt, dass der potentielle Bindungspartner p70 mit der Hauptproteinmenge eluierte. In der Negativkontrolle fehlte eine entsprechende Proteinbande bei Auftragung von in etwa der gleichen Proteinmenge (Abb. 5.53B). Dies zeigt, falls es sich bei den p70-Banden auftretend bei Hyp2p und Hyp2(I₅₁)p um identische Untereinheiten handelte, dass die Affinität von p70 sowohl zu Hyp2p als auch zu der punktmultierten sicher nicht Hypusin-tragenden I₅₁-Form bestand und somit unabhängig vom Hypusinrest war.

Die Coomassie-gefärbten Banden p70(Hyp2p) und p70(I₅₁) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in der Gelmatrix ein Proteinrestriktionsverdau mit Endoproteinase LysC durchgeführt. Eine MALDI-Fingerprint-Analyse zeigte anhand des Peptid-Fragmentmusters, dass es sich um identische Proteine handelte.

Die Auffindung desselben potentiellen Bindungspartners p70 aus der Affinitätsreinigung unabhängiger Kulturen und Hefestämme zeigte bereits zu diesem Zeitpunkt die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses. Der Versuch wurde nochmals unter gleichen Bedingungen mit anderen isolierten und die verschiedenen GST-Proteine exprimierenden Hefestämmen wiederholt und führte zum gleichen Ergebnis.

Zur Identifikation des Proteins p70 reichte die MS-Fingerprintanalyse überraschender Weise zunächst nicht aus. Es konnte keine eindeutige Zuordnung zu Proteineinträgen in gängigen Proteindatenbanken gefunden werden. Daher wurde eine RP(18)-HPLC-Auftrennung des Spaltpeptidgemisches von p70 durchgeführt und einige der isolierten Peptide in einer EDMAN-Sequenzierung analysiert. Abbildung 5.54 zeigt das Peak-Spektrum der RP-HPLC. Für die EDMAN-Sequenzierung wurden die Peptide, welche in den Peaks 10 (eluierte bei 31% B) und 15 (eluierte bei 36% B) isoliert wurden, eingesetzt. Dabei besaß Peptid 10 die Aminosäuresequenz

[M ⁺] (Mess.)	[M ⁺] (theoret.)	Δ M [ppm]	HPLC ¹	Position	Peptid	EDMAN- Seq.
–	646,36	–	15,83	507-511	LEAWK	•
894,28	894,52	-44,72	16,32	1-7	MLRFVTK	
917,25	917,56	-10,90	15,74	271-278	VMLSALRK	•
1090,72	1090,55	-27,51	14,10	527-536	VYGDTHGLTK	
1748,15	1747,93	45,77	23,95	512-526	LAWALRVAGYDTHFK	
1786,16	1785,93	50,39	19,58	38-52	FDNLVFNRYVYGVVSQK	
2297,43	2297,18	39,18	22,71	221-239	WHRRTNLAIDYEAPQLADK	
2503,49	2503,22	43,94	26,22	53-75	FTLVGNPTVCFNEGSSYLEGIAK	
2915,71	2915,42	30,87	25,28	13-37	SSDLFSICSDRGTFFVAHNRVRTDFK	
3651,04	3650,73	43,83	27,48	240-270	FAYRHALTVDQDADEWIEGDRTRDDQFRPPSSK	

Tabelle 5.25: LysC-Spaltpeptide aus GAG-SCLAp im monoisotopischen [M/Z]-Bereich von 800 bis 3700, welche in den MALDI-TOF-Spektren der Proteine p70(Hyp2p) und p70(I₅₁) wiedergefunden wurden. Keines der einfach positiv geladenen Peptide, welche in diesem Messbereich aus dem theoretischen Verdau erwartet wurden, fehlte. Die durch EDMAN-Abbau erhaltenen Peptidsequenzen sind gekennzeichnet.

(1): Aus dem simulierten HPLC-Chromatogramm der theoretischen LysC-Fragmente berechnete Retentionszeiten nach [SAKAMATO et al. 1988].

LEAWK; Peptid 15 wurde sequenziert als VMLSALRK. Eine Proteindatenbanksuche ergab, dass es sich um das majore Hüllenprotein des doppelsträngigen RNA-Virus L-A (GAG-SCLAp) aus *Saccharomyces cerevisiae* handelte. Das theoretische Molekulargewicht des Proteins liegt bei 75994 Da bei einer Länge von 680 Aminosäureresten.

Bei einem erneuten Vergleich der aus p70(Hyp2p) und p70(I₅₁) erhaltenen LysC-Spaltpeptidmassen mit den theoretischen einfach positiv geladenen Peptidmassen aus der veröffentlichten Proteinsequenz (P32503) des GAG-SCLAp konnten alle Peptide ohne Fehlsplaltung im [m/z]-Bereich von 800 bis 3700 den MS-Peaks zugeordnet werden. Tabelle 5.25 gibt einen Überblick über die entsprechenden Peptide.

5.2.2 Suche nach RNA-Bindungspartnern des Hypusin enthaltenden Proteins

Es existieren viele Hinweise auf eine Interaktion Hypps mit RNA, jedoch sind bisher mit wenigen speziellen Ausnahmen (Interaktion mit dem HIV1-Rev-Responsive-Element-Rev-Komplex (RRE-Rev) [BEVEC et al. 1996]; Deoxyhypusin abhängige Interaktion mit RRE ohne Abhängigkeit von Rev und Interaktion mit U6-snRNA [LIU et al. 1997]) keine nativen mRNA-Interaktionspartner des Proteins bekannt. Um neue *in vivo* Bindungspartner für das Hypusin enthaltende Protein zu finden, wurde eine Strategien verfolgt, die auf der Affinitätsbindung der mRNAs mit dem Zielprotein beruhte.

5.2.2.1 Findung von bindenden mRNA-Spezies durch die SNAAP-Methode

Es fand eine Methode Anwendung, die an Hypp bindende RNAs von unspezifischer Bindung durch eine „Differential-Display“-Analyse unterscheidet und mit der Abkürzung „SNAAP“ (specific nucleic acids associated with proteins) bezeichnet wurde [TRIFILLIS et al. 1999]. SNAAP verbindet demnach einen Koreinigungs-Ansatz mit Differential Display. Die Affinitätsreinigung geschah durch Inkubation der an GST-Sepharose gebundenen Fusionsprotei-

ne GST-Hyp2p, GST-Hyp2(I₅₁)p und Glutathion-S-Transferase (exprimiert in *S. cerevisiae*), sowie GST-Hyp2p (exprimiert in *E. coli*) mit Protein-RNA-Gesamtextrakten aus *S. cerevisiae*-Wildtypextrakten und nicht mit isolierten gesamt-RNA- oder Poly-A⁺-RNA-Fractionen. Dies stellte die Erfassung von Hypp-RNA-Interaktionen, die von weiteren Proteinfaktoren bzw. Nukleinsäure-Spezies abhängen, sicher.

Zunächst wurden die GST-Hyp2-Proteine sowie unfusioniertes GST-Protein nach Expression in den Stämmen BJGHyp2, BJGHyp2(I₅₁) und BJGST durch Pelletierung und Waschung des Sepharose-Materials isoliert, eluiert und die gereinigten Fusionsproteine gegen Sepharose-Bindungspuffer, der kein freies reduziertes Glutathion enthielt, dialysiert. Die so für eine erneute Bindung an GST-Material vorbereiteten Extrakte wurden aliquotiert, in Glycerin-haltigen Puffer schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Wiederanbindung an GST-Material wurden gleiche Proteinmengen an gleiche Sepharose-Bettvolumina verwendet. Dazu wurden von allen eingesetzten gereinigten Fusionsproteinen zunächst Proteinbestimmungen nach Bradford durchgeführt sowie Verdünnungsreihen angefertigt und diese anschließend elektrophoretisch im 1D-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die Gele wurden densitometrisch ausgewertet und die relativen gemessenen Proteinkonzentrationsunterschiede mit den Werten der Proteinbestimmung verglichen.

Das aus *E. coli* gereinigte unmodifizierte Hyp2p wurde vor der erneuten Bindung an GST-Sepharose einem RNase-Verdau mit anschließender Reinigung unterzogen, um Interaktionen mit nicht aus *S. cerevisiae* stammenden RNA-Spezies ausschließen zu können. Die Hefe-Gesamtextrakte, aus dem die RNA-Bindung erfolgte, wurde mit RNase-Inhibitoren behandelt und einem DNase-Verdau mit *Micrococcus*-DNase unterzogen.

Nach Inkubation der Hefeextrakte mit gleichen Mengen der gebundenen GST-Proteine wurden die mRNP-Komplexe, die die GST-Hyp2p-Proteine enthielten, durch Pelletierung des Sepharose-Materials isoliert und darauf die spezifisch gebundenen mRNAs extrahiert. Die Identifizierung dieser mRNAs geschah anschließend durch den Differential-Display-Assay [LIANG und PARDEE 1992]. Dazu wurden die mit GST-Hyp2p und den Kontrollfusionsproteinen kogereinigten mRNAs revers transkribiert, was zur Synthese von einzelsträngiger cDNA führte. Als Poly-T-Primer wurde der HT₁₁A-Primer aus einer Gruppe von den drei möglichen 11-T-Oligonukleotiden (HT₁₁A, HT₁₁C oder HT₁₁G) für drei Replikat-Experimente ausgewählt. Die erhaltene Erststrang-cDNA wurde dann in einer PCR-Reaktion mit demselben für die RT-Reaktion benutzten 3'-Primer (nun am 3'-Ende Fluorescein-gelabelt) eingesetzt. Als Vorwärts-Primer wurden vier von 80 möglichen Oligonukleotiden mit zufälligen Sequenzen (H-AP1 bis H-AP80; Spectra-Green-DD-Kit der Fa. GenHunter) verwendet.

Da damit gerechnet wurde, dass eine Untergruppe aller mRNA-Spezies an Hypp bindet, wurden die vier 5'-Primer simultan eingesetzt. Als Kontrollexperiment zur Identifizierung unspezifischer Protein-RNA-Interaktion wurden die mit dem unfusionierten GST-Protein koeluierenden RNA-Spezies in der gleichen RT-PCR-Reaktion verwendet. Als Positivkontrolle der erfolgreichen RT-PCR-Reaktionen diente die Reaktion mit einer eukaryontischen Gesamt-RNA-Probe als Templat. Es folgte die Auftrennung der PCR-Amplifikate durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.

Ein repräsentatives Beispiel eines Gels des Differential-Displays zeigt Abbildung 5.55.

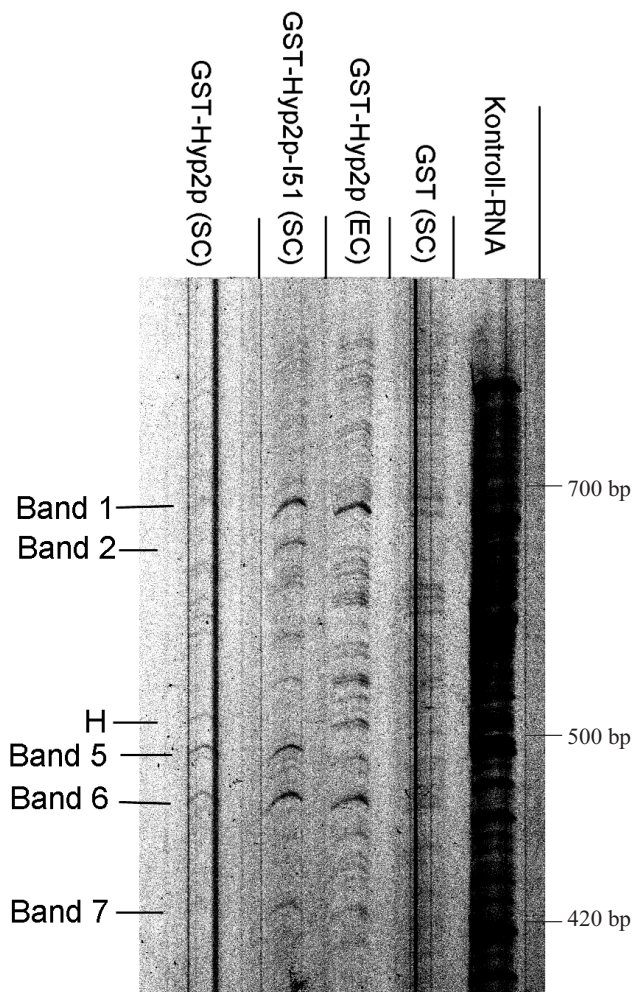


Abbildung 5.55: Polyacrylamidgeltrennung der PCR-Produkte von mRNAs, die mit GST-Hyp2p und Kontrollen kogereinig wurden, als Differential-Display-Ansatz. Alle aufgetragenen PCR-Reaktionen wurden mit dem HT₁₁A-FITC-3'-Primer und den Zufalls-5'-primern H-AP1 bis H-AP4 durchgeführt. Die angezeichneten Banden 1 bis 7 sowie H entsprechen PCR-Produkten von spezifischen mRNAs, die mit hypusinyliertem und/oder nicht hypusinyliertem Hyp2p interagierten, jedoch nicht mit dem unfusionierten GST-Protein. Spur 1 zeigt die Interaktion mit Hyp2p exprimiert in *S. cerevisiae* (SC), Spur 2 mit der mutierten nicht zur Hypusinbildung fähigen Form I₅₁. Spur 3 entspricht der Interaktion mit in *E. coli* (EC) heterolog exprimiertem Hyp2p, Spur 4 der Negativkontrolle (unfusioniertes GST-Protein). Das grundsätzliche Funktionieren der RT- und PCR-Reaktionen ist an den stark fluoreszierenden Banden, die nach RT-PCR einer eukaryontischen Gesamt-RNA-Probe in Spur 5 aufzutrennen waren, ableitbar. Die erhaltenen Ampifikate besaßen Größen zwischen 800 und 100 bp (nur bis ca. 400 bp gezeigt). Bis auf die Bande H erscheinen die DNA-Spezies 1 bis 7 als Repräsentanten von mRNAs, die unabhängig von der Hypusin-Modifikation mit Hyp2p wechselwirkten.

mRNAs, die mit GST, GST-Hyp2p und GST-Hyp2(I₅₁)p aus *S. cerevisiae* sowie Hyp2p exprimiert in *E. coli* interagierten, wurden simultan unter gleichen Bedingungen durch RT-PCR amplifiziert und elektrophoretisch getrennt. Die vier Fluoreszenz-Bandenmuster wurden untereinander verglichen und führten zur Identifikation von 9 deutlich sichtbaren Banden, die aus der Interaktion mit allen drei Hyp2p-Proben stammten (Spuren 1–3), nicht aber aus der Interaktion mit dem unverknüpften GST-Protein (Spur 4). Fünf dieser Amplifikate (Banden 1, 2, 5, 6, 7) sind gekennzeichnet. Wenige Banden, wie Bande H, traten allein bei der hypusinhaltigen Probe GST-Hyp2p (SC; Spur 1) auf. Dies deutete darauf hin, dass die Hypusinmodifikation auf die Protein-RNA-Interaktionen, die unter den gewählten Bedingungen identifiziert wurden, keinen bestimmenden Einfluss hatte. Dennoch konnten ähnlich wie bei der im letzten Abschnitt gezeigten Protein-Protein-Interaktion auch hypusinunabhängige RNA-Bindungsspezies interessante neue Hinweise geben.

Einige der in der Negativkontrolle fehlenden Banden traten sowohl bei I₅₁ als auch bei dem aus *E. coli* vorgereinigten und mit Hefe-Extrakt inkubierten Hyp2p auf (Band 1, 5, 6 und 7). Sowohl hypusinabhängig als auch unabhängig kogereinigte und amplifizierte Banden, die in einem molekularen Größenbereich von 100 bis 800 bp lagen, wurden ausgeschnitten und unter Verwendung desselben Primersatzes wie bei der ersten PCR-Reaktion erneut durch PCR

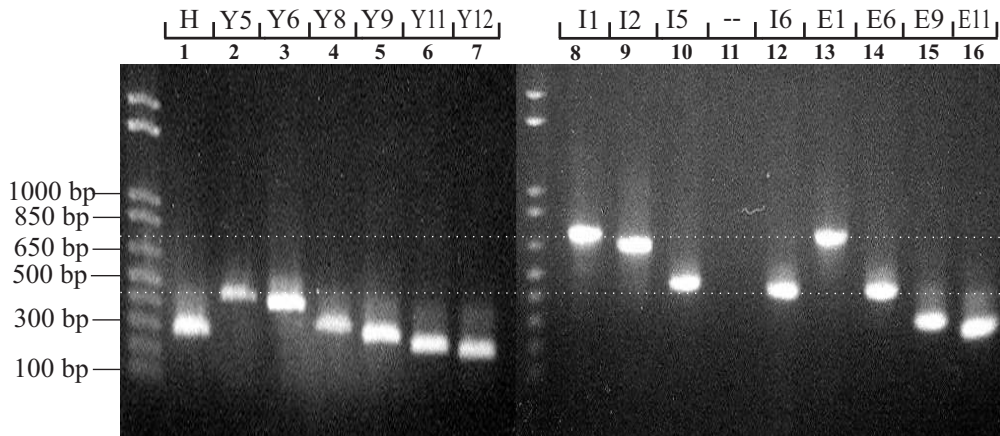


Abbildung 5.56: Reamplifikation von Banden, die aus dem Polyacrylamid-Gel extrahiert wurden (1%-Agarosegeltrennung der PCR-Reaktionsmischungen). Das absteigende Molekulargewicht der PCR-Produkte mit aufsteigender Spurzahl deutet darauf hin, dass DNA-Moleküle aus dem Polyacrylamidgel amplifiziert wurden. Das Molekulargewicht dieser Banden fiel mit steigender Bandennummer ab. Gestrichelte weiße Linien verbinden Amplifikate, die aus Interaktion mit mehreren Hyp2p-Spezies gefunden wurden.

H- und **Y**-Banden: RT-PCR-Amplifikat von mRNAs kogereinigt mit Hyp2p (*S. cerevisiae*);

I-Banden: kogereinigt mit Hyp2(I₅₁)p (*S. cerevisiae*);

E-Banden: kogereinigt mit *E. coli*-Hyp2p

reamplifiziert (Ergebnis siehe Abbildung 5.56). Durch Blunt-End-Ligation wurden die PCR-Produkte in den *E. coli*-Vektor pCR4-Blunt-TOPO (Fa. Invitrogen) kloniert, welcher kovalent gebundene Topoisomerase besitzt. Es folgte die Identifikation der Plasmid-Einschübe durch DNA-Sequenzierung.

Die mit Hyp2p (*S. cerevisiae*), bzw. Hyp2(I₅₁)p spezifisch interagierenden Banden werden im folgenden als Y- bzw. I-Banden bezeichnet. Für Hyp2p-(*E. coli*)-Banden wird der Buchstabe E eingeführt. I1 und E1 erwiesen sich als identische Sequenzen. Das gleiche galt für Y5 und I5 sowie Y6, I6 und E6. Dies deutet auf die Hypusin-Unabhängigkeit dieser Interaktionen hin. Nach Blast-Suche im Hefegenom wurden die drei erhaltenen Sequenzen folgenden ORFs zugeordnet:

- I1 und E1: YPL201C (codierende Sequenz besitzt 1386 bp; Banden bei ca. 700 bp); unbekannte Funktion.
- Y5 und I5: YKL097C (codierende Sequenz 408 bp; Banden bei ca. 410 bp); unbekannte Funktion.
- Y6, I6 und E6: YHR173C (codierende Sequenz 336 bp; Banden bei ca. 390 bp); der komplementäre DNA-Strang enthält die 5'-regulatorische Sequenz von *ENO2*; ORF mit unbekannter Funktion.

Abbildung 5.57 beschreibt die Lage der zugeordneten Sequenzen und ORFs auf den drei betroffenen Chromosomen 8, 11 und 16. Bei I1 und E1 handelt es sich sehr wahrscheinlich um den ORF YPL201C, dessen 3'-UTR und der Anfang der codierenden Sequenz sich im entsprechenden sequenzierten Abschnitt wiederfinden und der in der HDOA-Analyse mit einem durchschnittlichen FC-Wert von 2,15 angereichert gemessen wurde. Der chromosomal 5'-benachbarte ORF *AFT2* zeigt keinen Zusammenhang zur Konsensussequenz.

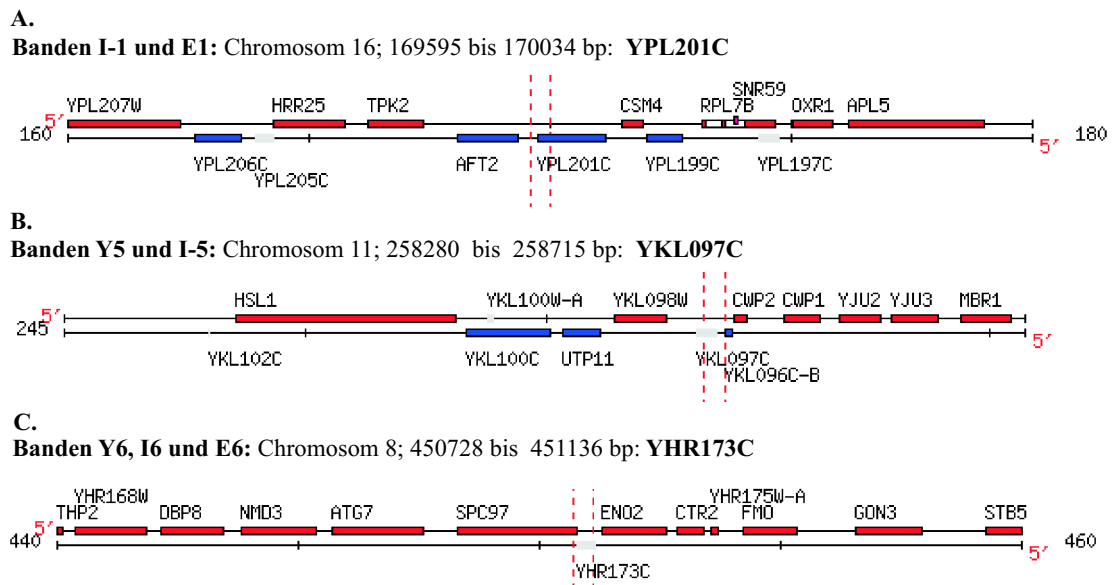


Abbildung 5.57: Lage der drei zugeordneten Sequenzen im Hefegenom. Die vertikalen gestrichelten Linien begrenzen die sequenzierten DNA-Abschnitte.

Klon	ORF	Gen	Kopien pro Zelle ¹	Halbwertszeit [min] ¹	transkr. Frequent. [mRNA/h] ¹	Intensität in G ₈₁ -HDOA ²	Intensität in Anox.-HDOA ³
DD1	YPL201C		n.b.	30	n.b.	22,14	4,16
DD2	YKL097C		n.b.	n.b.	n.b.	2,64	0,25
DD3	YHR173C		0,1	24	0,2	2,45	0,78

Tabelle 5.26: Informationen zu Expressionshöhen der im DD-Ansatz gefundenen mRNA-Spezies im Hefe-Transkriptom.

(1) Die Werte entstammen einer Mikro-Array-Studie zur Aktivitätsbestimmung von RNA-Polymerase II [HOLSTEGE et al. 1998], die Abbauhalbwertszeiten sind Näherungswerte, die Angabe der transkriptionellen Frequentierung der einzelnen Gene wurde aus den Ist-Expressionsleveln und den bestimmten Halbwertszeiten (n.b. = „nicht bestimmbar“ aufgrund zu kleiner Kopiezahl) berechnet.

(2) mittlere Intensitätswerte aus der G₈₁-HDOA-Analyse, die auf den Wildtyp-Probensatz mit der höchsten mittleren Intensität normiert wurden, die dem Wert 1000 entspricht.

(3) Normierte Intensitätswerte der aeroben Kontrolle aus der HDOA-Anaerobie-Studie nach [KWAST et al. 2002]. Die Normierung erfolgte wie unter (2).

Y5 und I5 enthielten den 5'-UTR und weite Teile der codierenden Sequenz von YKL097C, einem kleinen ORF mit unbekannter Funktion, in dessen unmittelbarer Nachbarschaft sich YKL098W und CWP2 befinden. YKL098W fand sich reproduzierbar hochreguliert in den HDOA-Analysen von G₈₁ und von *UPF*⁻-Mutanten. Die CWP-Gene waren unerwartet in der G₈₁-HDOA-Studie im Gegensatz zu vielen anderen Zellwand-Manno-Genen nicht angereichert. Die Sequenzierung von Y6 enthielt fast die gesamte codierende Sequenz von YHR173C (Funktion unbekannt), bei dem auf dem komplementären DNA-Strang die Gene *SPC97* und *ENO2* liegen. *SPC97* codiert für ein Protein des γ -Tubulin-Komplexes, der in der G₁-Phase benötigt wird und eine Komponente des Spindel-Vereinigungs-Kontrollpunktes darstellt [VARDY und TODA 2000]. *ENO2* codiert für das Glykolyse-Enzym Enolase 2.

In einer Wiederholung des beschriebenen Affinitäts-Reinigungsansatzes konnte die gefundenen Zuordnungen reproduziert werden.

Für die drei potentiellen mRNA-Bindungsliganden von Hyp2p wurden Expressionsraten, ausgedrückt als mRNA-Kopienzahl pro Zelle, aus einem Vergleich mit veröffentlichten Daten des Hefe-Transkriptoms recherchiert [HOLSTEGE et al. 1998]. Tabelle 5.26 listet die dort gefundenen Expressionshöhen sowie ungefähre Halbwertszeiten des mRNA-Abbaus auf. Sowohl der Expressionslevel als auch die transkriptionelle Frequentierung² der drei ORFs war gering bzw. aufgrund kaum messbarer Transkription nicht bestimmbar. Mitangegeben sind die mittleren Intensitätswerte der Wildtypkontrolle aus der G₈₁-HDOA-Studie und der aeroben Kontroll-expressionswerte aus einer HDOA-Studie über das anoxische Verhalten der Bäckerhefe. Die Werte wurden auf den Probensatz mit der höchsten mittleren Intensität, welche die Zahl 1000 erhielt, normiert. Auch wenn es sich dabei nicht um eine Bestimmung eines absoluten Expressionslevels handelte, zeigten die Intensitätsangaben für YKL097C und YHR173C aus beiden Studien geringe Werte (< 1) (vgl. Tab. 5.26) und bestätigten so die Expressionslevel-Angaben von [HOLSTEGE et al. 1998].

Bei einer hohen Expressionsrate eines Kandidatengens würde die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Bindung an Hyp2p zunehmen. Die zellulären Kopienzahlen der gefundenen Transkripte kennzeichnen diese aber als schwach exprimierte ORFs.

² Die Autoren beschreiben das Verhalten einer *rpb1-1-ts*-Mutante (RNA-Polymerase II). Bei Temperaturerhöhung auf 37°C kam es zu einer Transkriptionsreduktion jeder Poly-A-mRNA relativ zu einem isogenen Wildtyp-Stamm. Aus mRNA-Zerfalls-Kinetiken wurde eine angenäherte Halbwertszeit für jede mRNA bestimmt. Die transkriptionelle Frequentierung jedes Gens konnte aus den Ist-mRNA-Kopienzahlen und der Halbwert-Zerfallszeit der mRNA berechnet werden.

5.2.2.2 Herstellung der RRE-DNA-Sequenz aus dem HIV-1-Virus

Im nächsten Schritt der Analyse sollten die gefundenen Hyp2p-mRNA-Interaktionen durch Band-Shift-Analysen überprüft werden. Erwartet wurde eine reduzierte Wanderungsgeschwindigkeit in einem Polyacrylamidgel der an Hyp2p gebundenen mRNAs im Vergleich zu den ungebundenen. Diese Analyse konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. In Vorbereitung wurde eine DNA-Sequenz hergestellt, die als Vorlage für eine In-vitro-Transkription zur Herstellung einer mit Hyp2p interagierenden RNA dienen sollte. Es handelte sich um die komplementäre DNA-Sequenz des Rev-responsive-Elements (RRE) aus dem RNA-Genom des humanen HIV-1-Virus (GenBank-Accession: AY426109). Die Interaktion der RNA-Sequenz mit Hypp ist schon länger bekannt und benötigt die Deoxyhypusin- bzw. Hypusinmodifikation [LIU et al. 1997].

Die RRE-Ziel-DNA-Sequenz besaß eine Länge von 351 Basenpaaren und wurde *de novo* aufgebaut. Dabei fand eine modulare Strategie Anwendung, bei der zunächst zwei Einzel-PCR-Reaktionen mit langen Primern den vorderen (Primer A1 und A2) und hinteren Teil (Primer B1 und B2) der Sequenz herstellten. Vorwärts- und Rückwärts-Primer besaßen dabei einen überlappenden Bereich von 20 Basenpaaren, so dass im Anlagerungsschritt der PCR-Reaktion die komplementären Bereiche aneinander binden konnten und es zur gewollten Bildung von „Primer-Dimeren“ kam. Die fehlenden komplementären Sequenzabschnitte konnten dann durch die Polymerase im ersten PCR-Zyklus „aufgefüllt“ werden (Abb. 5.58). Die an Position 180 beginnende Konsensussequenz für Endonuklease Dde 1 wurde für den Restriktionsverdau der 220 bp und 200 bp langen Untereinheiten genutzt, die nach Reinigung aneinander ligiert wurden. Das 351 Basen lange Ligationsprodukt wurde über glatte Enden in den Klonierungsvektor pCR4-Blunt-Topo (Invitrogen) eingebaut. Nach Transformation in einen *E. coli*-K12-Stamm wurden einige erhaltene Kolonien ausgewählt und in Kleinkulturen angezchtet. Nach Isolierung plasmidischer DNA erfolgte der Restriktionsverdau mit EcoR I, der zeigte, dass einige der pCR4-Plasmide das Insert von nun etwas mehr als 351 Basenpaaren enthielten. Abbildung 5.59 zeigt einige Schritte der Klonierung, deren Erfolg durch DNA-Sequenzierung der Plasmide M1 und M2 mit der Bestätigung der korrekten DNA-Sequenz abgeschlossen wurde.

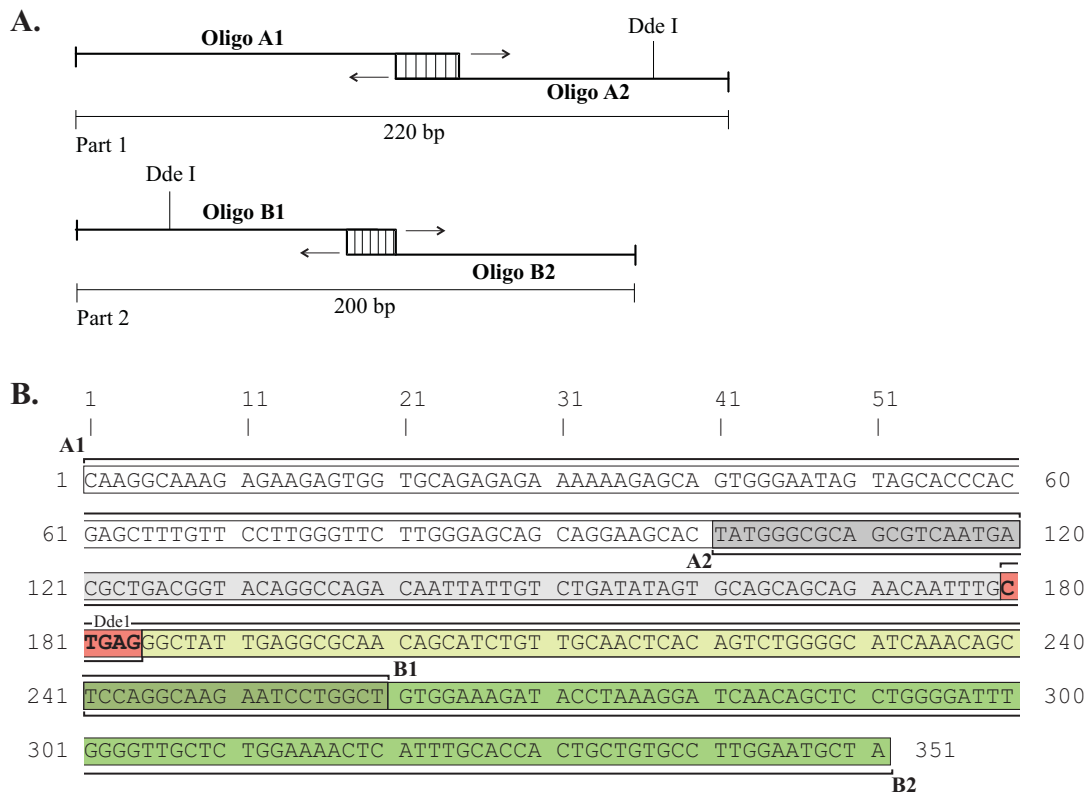


Abbildung 5.58: Modulare PCR-Aufbastrategie der für die RRE-RNA codierenden DNA-Matrizen-Sequenz. A: Zwei PCR-Reaktionen mit den überlangen Primern A1/A2 bzw. B1/B2, die jeweils eine überlappende komplementäre Sequenz von 20 bp besaßen, erzeugten den vorderen und hinteren Teil der Zielsequenz. Nach Restriktionsverdau beider PCR-Produkte mit Dde I (Consensus-Sequenz: CTNAG) erfolgte die Ligation beider Hälften. B: Sequenz nach kompletter Klonierung; die modularen Einheiten A1, A2, B1 und B2 sind angegeben.

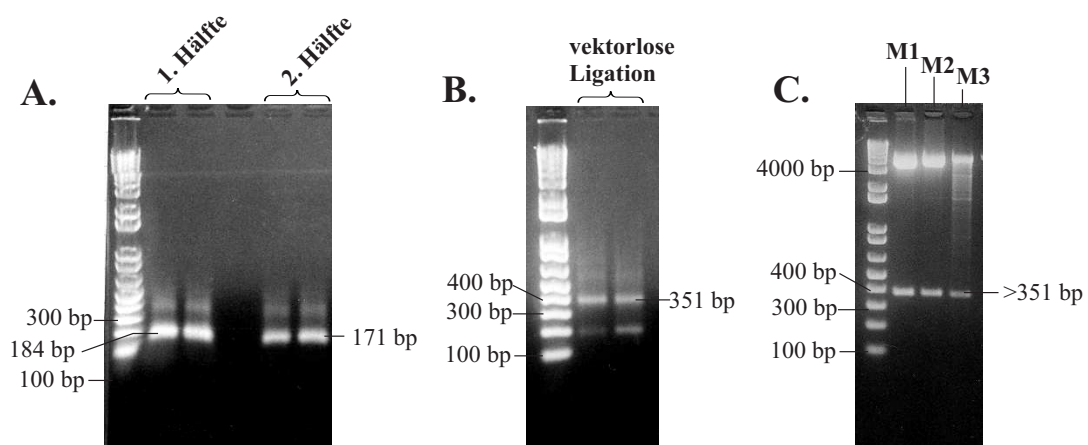


Abbildung 5.59: Agarose-Gele (2%) zur Dokumentation der RRE-Klonierung. A: Auftrennung der PCR-Produkte von Teil A und B nach dem Dde I-Verdau. B: Reinigung des Ligationsproduktes aus Teil A und B nach vektorloser Ligation. C: Nach Blunt-End-Klonierung des 351 bp-Abschnitts in den Vektor pCR4-Blunt-TOPO Transformation und *E. coli*-Anzucht: Verdau der isolierten Plasmide.

6. Diskussion

6.1 Die Wahl einer humanen Punktmutante zur heterologen Expression in Bäckerhefe

Mutagenese und phänotypische differentielle Charakterisierung sind effektive Werkzeuge zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion eines Proteins. Wachstumsvergleiche von verschiedenen eukaryontischen Hypp, die heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert wurden, zeigten, dass das humane *HYP1*-Gen die beiden inaktivierten nativen *HYP*-Gen-Loci in Bäckerhefe am wenigsten komplementieren konnte [WÖHL 1994]. Daher war zu erwarten, dass Punktmutationen im humanen Protein die Wachstumseigenschaften drastischer beeinflussten als Veränderungen am hefeeigenen Protein. Aus diesem Grund wurde für eine Studie zu Struktur-Funktionsbeziehungen das humane Hypp eingesetzt. In die Punktmutagenese konservierter Aminosäurereste wurden auch die Reste V₈₁ und P₈₂ einbezogen, wobei jeder Austausch von P₈₂ immer einen lethalen Phänotyp bewirkte. Für einige Substitutionen des Restes V₈₁ gegen chemisch ähnliche Aminosäuren ergaben sich temperatursensitive Hefestämme. Da die Punktmutante G₈₁ die ausgeprägteste Temperaturempfindlichkeit zeigte [YOUNG 1998], wurde sie für eine Phänotypisierung ausgewählt.

Als Erklärungsansatz für die Temperatursensitivität des mutationstragenden Stammes wurden Veränderungen der Protein-Tertiärstruktur im Vergleich zum Wildtyp angenommen. Weder für die humane Hyp1p-Form noch für das ihr homologe Hyp2p aus Bäckerhefe liegen bisher Tertiärstrukturanalyse-Ergebnisse vor. Eine Homologie-Modellierungsstudie des humanen Hyp1-Proteins zeigte, dass in ihm mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die gleiche Domänenstruktur vorliegt wie in den veröffentlichten Röntgenstrukturen von hyperthermophilen Archaea [FACCHIANO et al. 2001]. Die Position 81 liegt hierbei am Anfang einer flexiblen Übergangsregion, die die beiden Domänen des Proteins miteinander verbindet (siehe Einleitung und Abb. 5.9 auf Seite 70). Diese besondere Position der Punktmutation ist als eine strukturelle Ursache der ausgeprägten Temperatursensitivität von G₈₁ anzusehen. Die Mutation könnte eine veränderte konformative Anordnung der N-terminalen und C-terminalen Domäne bei 25°C und 37°C zur Folge haben, was zu unterschiedlichen RNA- bzw. Proteinbindungseigenschaften bei beiden Temperaturstufen und zur Veränderung der Proteinfunktion führt. Aus der Wachstumskinetik geht hervor, dass der Effekt direkt nach dem Temperaturshift auf restriktive Temperatur einsetzt. Innerhalb der ersten zwei Stunden bei 37°C teilten sich die Zellen nur einmal, danach stoppte die Proliferation vollständig.

Die Hypusinmodifikation hat sich als essentiell für die Funktion Hypps erwiesen. Im Hinblick auf die Struktur der Mutationsstelle und die Kinetik der Wachstumsinhibierung bei G₈₁ ist es unwahrscheinlich, dass der Effekt mit einer gestörten Hypusinsynthese zusammenhängt, da die Halbwertszeit des humanen Hypps bei über 24 h bei einer Irreversibilität der zweiten Stufe der Hypusinsynthesereaktion liegt.

Die Reversionsfrequenz für G₈₁ bei 37°C wurde auf 1×10^{-6} geschätzt. Dieser kleine Wert zeigte die Stabilität des genetischen Systems gegen Rückmutationsereignisse, weshalb der Stamm mit der zugehörigen Wildtypkontrolle als genetisches Ausgangsmaterial für weiterführende phänotypische Charakterisierungen geeignet erschien.

Im Kontrollhefestamm wurde die Wildtypform des humanen Hyp1p von einem Single-Copy-Plasmid exprimiert und nicht die hefeeigene Form Hyp2p. Dies geschah im Hinblick auf die nachfolgenden differentiellen Analysen, weil bekannt war, dass die humane Wildtypgen-Form die *HYP2*-Funktion schlechter übernehmen konnte. Nur dadurch war ein echter Funktionsvergleich der mutierten Hypp-Formen mit dem zugehörigen Wildtyp möglich.

6.2 Entdeckung der mitochondrialen Atmungsdefizienz durch 2D-Gel-Analyse

Um neue funktionale Stoffwechselwege aufzufinden, bei denen Hypp eine Rolle spielt, wurde eine molekulare phänotypische Charakterisierung von G₈₁ durchgeführt.

Nach Betrachtung der vorhandenen Literatur-Daten zum Hypusin enthaltenden Protein wurde eine Involvierung Hypps beim Kernexport bzw. bei der Prozessierung einer bestimmten Gruppe von RNA-Molekülen als Arbeitshypothese postuliert, die u.a. für Zellwachstumsvorgänge und Steuerung des Zellzyklus wichtig sind. Bei Zutreffen der Hypothese läge ein Funktionsschwerpunkt in der postranskriptionellen Kontrolle der betroffenen Gene. Da man nicht davon ausgehen konnte, dass Veränderungen in den mRNA-Transkriptaten gleichgerichtete Veränderungen der translatierten funktionalen Proteinmengen hervorrufen würden, wurde die Untersuchung nicht allein auf Transkriptom-orientierten Techniken aufgebaut, sondern auch auf Proteinebene ausgeweitet.

Die Untersuchung von Gesamt-Proteinextrakten durch zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) erfolgte zunächst mit bei 37°C gezüchteten Wildtypstämmen. Es wurden etwa 1350 Proteinspots gezählt, die reproduzierbar aufgefunden werden konnten. Da für eine Hefezelle eine Protein-Spezies-Zahl von mindestens 10.000 angenommen wird, entsprach die gemessene Spot-Zahl eines Gels streng genommen nicht der Definition eines Proteoms, wie bei [LOTTSPREICH und ZORBAS 1998] formuliert; bildet das Proteom doch die quantitative Darstellung *aller* in der Zelle oder einer Unterfraktion exprimierten Proteinspezies. Die Zelle sollte sich dabei in einem definierbaren Zustand befinden. Als Ursachen für das mangelnde Auflösungsvermögen können die pro isoelektrischer Fokussierung limitierte Proteinmenge, die Sensitivität der verwendeten Silberfärbungsmethode und die Software-unterstützte Gelauswertetechnik, die ebenfalls eine begrenzte Empfindlichkeit bedingt durch Hintergrundrauschen besitzt, angeführt werden. Dem 2D-Gelansatz waren daher zumeist höher exprimierte Proteine zugänglich, unter denen dennoch bei den verwendeten definierten experimentellen Bedingungen quantitative Proteinexpressionsunterschiede zwischen gleich behandelten Wildtyp- und Mutanten-Zellpopulationen aufgedeckt werden konnten.

Der Vergleich der Spotmuster von Gesamtproteinextrakten aus Wildtyp und Mutante zeigte trotz der drastischen Veränderung des Phänotyps von G₈₁ bei restriktiver Temperatur nur die Änderung des Expressionsverhaltens bestimmter, einzelner Spots und nicht eine gravierende Veränderung des Spotmusters. Die spezifischen Proteinexpressionsunterschiede zeigten sich zumeist in einer Unterexpression in der Mutante. Demgegenüber wurden weniger Proteinanreicherungen in G₈₁ bei beiden Temperaturstufen gefunden. Dies macht deutlich, dass keine globale Störung der Proteinbiosynthese durch die mutierte Hypp-Form ausgelöst wurde. Vielmehr kam es zu einer Proteinexpressionsabnahme spezieller Proteine. Dieser Befund bestätigte

die Beobachtungen von [KANG et al. 1994] und [ZUK et al. 1998], die bei ausfallender HYP-Funktion nur eine Abnahme der Gesamttranslation um ca. 30 % beobachtet hatten (vgl. Einleitung) und bestärkt deren Argumentationsrichtung gegen die Funktion Hypps als generellen Translations-Initiationsfaktor.

Es konnten vier Untereinheiten des mitochondrialen F_1F_0 -ATP-Synthase-Komplexes als stark abgereichert in G_{81} gefunden werden (s. Ergebnisse, Abschnitt 5.1.6.1). Dies deutete auf eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung in der Mutante hin.

Um das Teilergebnis zu bestätigen und weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen der Punktmutation auf mitochondriale Funktionen zu gewinnen und gleichzeitig die Temperaturabhängigkeit der Effekte bei G_{81} zu überprüfen, wurde die 2D-Gel-Proteinanalyse an isolierten Mitochondrienfraktionen aus Kulturen, die bei 25°C angezüchtet wurden, fortgesetzt.

Im Gegensatz zum Wildtyp wies das mitochondriale Pellet aus G_{81} -Zellen nach Inkubation bei 25°C und 37°C nur eine schwache Braunfärbung auf, die durch Häm-Moleküle in Cytochrom-c und in anderen mitochondrialen Proteinkomplexen hervorgerufen wird. Dies ließ auf reduzierte Cytochrom-c- bzw. Eisen(III)-Ionen-Mengen in der Mutante schließen. Dementsprechend konnten Abreicherungen von Untereinheiten aus vier mitochondrialen Atmungskettenkomplexen gefunden werden, darunter Succinat-Dehydrogenase (Sdh1p), mehrere Untereinheiten des Ubiquinol-Cytochrom-c-Reductase- und des Cytochrom-c-Oxidasekomplexes.

Der Abreicherungseffekt trat bereits bei 25°C auf, war in seiner Stärke aber temperaturabhängig. Die vier erwähnten Untereinheiten des ATP-Synthase-Komplexes Atp1p, Atp2p, Atp4p und Atp7p besaßen bei 37°C schwächere Protein-Expressionen als bei 25°C. Der Temperaturschock verursachte demnach eine weitere Reduzierung bzw. den Verlust der Atmungsfähigkeit, die schon bei 25°C eingeschränkt war.

Dieses Ergebnis wurde durch die Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$, welches für die Funktion der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe unabdingbar ist, an isolierten Mitochondrien aus Wildtyp- und G_{81} -Zellen bestätigt. Dabei zeigte sich, dass in mitochondrialen Fraktionen, die aus Mutanten-Kulturen bei 37°C stammten, keinerlei Membranpotential messbar war. Bei Mitochondrien aus G_{81} -Zellen bei 25°C war es im Vergleich zum Wildtyp zwar deutlich abgeschwächt, aber messbar.

Im nächsten Schritt wurde auf zellulärer Ebene die mitochondriale Atmungsfähigkeit der Mutante durch Wachstumstests auf einer nur durch mitochondriale Atmung nicht aber durch Gärung verwertbaren Kohlenstoffquelle geprüft. Dies ließ eine Aussage über die Integrität des mitochondrialen Genoms (mtDNA) in der Mutante zu. Deletionen, die entweder einzelne mitochondrial codierte Gene oder größerer Bereiche der mitochondrialen DNA betreffen, bzw. der Verlust der kompletten DNA würden zu sog. Petite-Phänotypen führen (langsam wachsende Stämme aufgrund Ausfall oder starker Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung).

Bei permissiver Temperatur konnten G_{81} -Stämme auf Glycerin- und Ethanol-haltigem Medium deutlich wachsen. Dieses Wachstum blieb bei Temperaturerhöhung auf 37°C gänzlich aus. Demnach war das mitochondriale Genom in G_{81} grundsätzlich funktionsfähig, und es lag kein Petite-Phänotyp vor. Das Ergebnis bestätigt die Messresultate der $\Delta\psi_m$ an isolierten Mitochondrien: abgeschwächte aber vorhandene Fähigkeit zur mitochondrialen Atmung bei 25°C,

nicht aber bei 37°C. Auch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Mutanten-Stämme deutete in diese Richtung, da die Anzahl der Mitochondrien in G₈₁-Zellen nicht verringert war.

Ob der Wachstumsstop bei 37°C durch den Verlust der mitochondrialen Atmungsfähigkeit der Zelle verursacht war oder durch andere Effekte, war unklar.

Einen Hinweis auf die Klärung dieser Frage gibt das Ergebnis einer Suppressor¹-Analyse, die in der Mutante durchgeführt wurde [YOUNG 1998]. Dabei konnte eine zusätzliche Expression des Gens *YHM2* die Temperatursensitivität von G₈₁ zu etwa 50% aufheben. Daten zu *YHM2* zeigen, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein mitochondriales Membranprotein der inneren Mitochondrienmembran handelt [CHO et al. 1998].

Das Protein bindet an mitochondriale DNA und wird als Stabilisator der mitochondrialen DNA diskutiert, da es als Suppressorgen eines nicht funktionalen mutierten Allels des mitochondrialen Histogens *abf2* gefunden wurde. Die Nullmutante von *YHM2* ist lebensfähig, zeigt aber wie G₈₁ ein verlangsamtes Wachstum in Gegenwart von nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen und eine Instabilität des mitochondrialen Genoms. So könnte das Protein als Teil der Proteinmaschinerie fungieren, welche die Anbindung des mitochondrialen Plasmids während Replikations- und Segregationsvorgängen an die innere Mitochondrienmembran sicherstellt. Da eine zusätzliche Expression des mitochondrialen Membranproteins *YHM2* zu einer partiellen Aufhebung der durch G₈₁ bei 37°C verursachten Wachstumsarretierung führt, wird deutlich, dass die stark eingeschränkte Atmungsfähigkeit bei hoher Temperatur eine Ursache für die Arretierung darstellt. Ferner deutete *YHM2* als Suppressor des G₈₁-Phänotyps auf eine Destabilisierung der mtDNA in G₈₁ hin, welche trotz des Wachstumsvermögens auf Glycerin bei 25°C nicht auszuschließen ist.

Genchip-Versuche an G₈₁ bestätigten eindrucksvoll die vorliegende mitochondriale Atmungsdefizienz. Bei beiden Temperaturstufen zeigte sich die Unterexpression einer Vielzahl von Genen mit mitochondrialen Funktionen, was die Atmungsdefizienz der Mutante bereits bei permissiver Temperatur belegt. Unter diesen Transkripten war der Suppressor von G₈₁, *YHM2*, sowie *ABF2*, das von *YHM2* ebenfalls supprimiert wird. Bei den am stärksten abgereicherten mRNAs handelte es sich um die auf dem mitochondrialen Genom codierten Transkripte von Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (*COX1*), *ATP6* aus dem F₁F₀-ATP-Synthase-Komplex und *COB* aus dem Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase-Komplex.

Die mRNA des Gens *COX1* war in einer Differential-Display-RNA-Analyse an Säugetierzellen, die mit Mimosin (Hemmung der Eisen-abhängigen zweiten Stufe der Hypusine-synthese-reaktion) in ihrer Zellproliferation arretiert wurden, als stark abgereichert in der polysomalen Fraktion gefunden worden [HANAU-SKE-ABEL et al. 1995]. Die Zellen zeigten dabei einen Wachstums-Arrest in der späten G₁-Phase des Zellzyklus. Als zweite abgereicherte mRNA fanden die Autoren Methionin-Adenosyltransferase (E.C. 2.5.1.6). In Hefe kommen zwei Homologe dieses Enzyms vor. Das *SAM1*-Transkript wurde in der G₈₁-Genchip-Studie als nicht reguliert (FC = 1,13) gefunden. Dagegen wurde für *SAM2* eine deutliche reproduzierbare Un-

¹Suppressor-Analyse hier im Sinne der molekularen Genetik: Die Wirkung eines mutierten funktionell eingeschränkten Gens wird durch die verstärkte Expression eines anderen Gens (Suppressor) ausgeglichen, mit dem es zellulär zusammenwirkt.

terexpression (FC = -2,81) gemessen. Hierin zeigte sich eine übereinstimmende Auswirkung der beeinträchtigten Hypp-Funktion in zwei unterschiedlich weit entwickelten eukaryontischen Zellsystemen.

In den im Genchip herunterregulierten Genen spiegeln sich übereinstimmende Ergebnisse der 2D-Gel-Analyse auf Proteinebene und auf mRNA-Ebene wider, die vor allem Untereinheiten der fünf Atmungsketten-Proteinkomplexe betreffen sowie die mRNA- und Protein-Produkte des Hitzeschock-Gens *HSP26*. Dieses Transkript fand sich auch in der genomweiten Studie von *upf123⁻*-Mutanten (Hypp-Zusammenhang s. Kapitel 6.4, ab Seite 166) von LELIVELT [1999] unter nur 41 abgereicherten Transkripten zusammen mit *YHM2*. Die Wachstumsarretierung von G_{81} bei 37°C erlaubte es den Zellen offenbar nicht, eine Hitzeschockantwort, in die Hsp26p einbezogen ist, aufzubauen.

6.3 Genchip-Analyse zur Klärung der RNA-Kernexporthypothese

Es stellte sich die Frage, durch welchen Wirkmechanismus die Punktmutierung in G_{81} zu der beobachteten eingeschränkten Zellatmungsfunktion führte. YOUNG postulierte, dass Hypp als möglicher RNA-Export-Faktor den Transport und so die Translation von mRNAs indirekt reguliert, die für die Zellproliferation und die mitochondriale Zellatmung wichtig sind. Dabei wurde nicht ausgeschlossen, dass auch mRNA-Spezies, die für andere Zellfunktionen wichtig sind, durch Hypp posttranskriptional reguliert werden.

Da die Hypothese eine direkte Interaktion des Proteins mit RNA postulierte und es in der Literatur zahlreiche Evidenzen in diese Richtung gibt (vergl. Einleitung), musste eine direkte Methodik zur Analyse des RNA-Profiles der Mutante Anwendung finden und daher die Analyse von der Protein- auf die mRNA-Ebene verlagert werden. Als geeignete Methode zur Überprüfung der mRNA-Kernexporthypothese wurde die genomweite Transkriptomanalyse mittels Hochdichte-Oligonukleotid-Genchip-Technik (HDOA) ausgewählt, indem das mRNA-Profil im Kern der Mutante nach Inkubation bei 37°C mit dem des Wildtyps verglichen wurde. Dabei wurden die erhaltenen Transkriptome denen aus Gesamt-RNA-Isolierungen und cytosolischen RNA-Fractionen gegenüber gestellt, um die Anreicherung von RNA-Spezies im Zellkern der Mutante aufgrund eingeschränkter Exportfähigkeit Hypps messen zu können. Aufgrund der Temperatursensitivität von G_{81} sollte dieser Anreicherungseffekt bei restriktiver Temperatur ausgeprägter erscheinen als bei permissiver.

Es wurde ein Vergleich zwischen nukleärer, cytosolischer und Gesamt-RNA bei beiden Temperaturstufen durchgeführt. Danach wurden die erhaltenen Transkriptomdaten regulierter ORFs getrennt für angereicherte und abgereicherte ORFs in 14 Genfunktionsgruppen eingeordnet. Die die Funktionsverteilung repräsentierenden Tortendiagramme weisen starke Ähnlichkeiten zwischen Zellkern-RNA und cytosolischer RNA der gleichen Temperaturstufe auf. Dies war bei an- und abgereicherten Probensätzen gleichermaßen der Fall. Eine Zellkernanreicherung hätte eine veränderte Funktionsgruppenverteilung der Gene zwischen Zellkern und Cytosol verursacht, die jedoch nicht beobachtet wurde.

Zwei weitere Auswertungen des Datenmaterials sollten die Frage der mRNA-Kernanreicherung beantworten. Im ersten Ansatz wurden 841 an- und abgereicherte Probensätze, die mittlere *p*-Werte unter 0,065 aufwiesen und deren FC-Werte somit als signifikant eingestuft wurden, in ihrer FC-Wertverteilung zwischen den drei RNA-Fractionen Kern, Cytosol und Gesamt-RNA untereinander verglichen (siehe Abb. 5.36, Seite 119). Auch hier zeigte sich keine deutliche Abweichung der Probensatzzahlen in den vier Bereichen der FC-Wert-Verteilung zwischen Zellkern-, Cytosol- und Gesamt-RNA-Fraktion. Im zweiten Ansatz wurden die signifikant angereicherten Probensätze der Zellkernfraktion (37°C) auf die Erfüllung einiger Bedingungen überprüft, die Kernanreicherung anzeigen:

- schwache oder keine Anreicherung in der Cytosol- oder Gesamtfraktion
- bei 25°C keine oder schwächere Anreicherung als in der Kernfraktion bei 37°C.

Dabei wurden keine Gene gefunden, welche die Bedingungen in drei unabhängigen Datensätzen reproduzierbar erfüllten. Aus dem erzeugten Datenmaterial ergab sich demnach, dass die mRNA-Kernexportfunktion in der Mutante nicht beeinträchtigt war, was gegen eine zentrale Funktion Hypps im RNA-Kernexport spricht.

Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe gestützt, die drei temperatursensitive Allele von *HYP2* in Bäckerhefe charakterisierten [VALENTINI et al. 2002]. Die Autoren konnten eine Lokalisation Hypps in Fusion mit GFP² im Zellkern nicht nachweisen, sondern detektierten das Protein vornehmlich im Cytoplasma mit einer Anreicherung in der perinukleären Region. Diese Lokalisation steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei höheren Eukaryonten gefunden wurden und die Hypp zu hohen Anteilen auch im Zellkern nachwiesen ([RUHL et al. 1993]; [BEVEC et al. 1996]; [YOUNG 1998]; [JAO und CHEN 2002]). Die nicht nukleare Lokalisation argumentiert auch gegen eine Funktion Hypps als Shuttle-Protein zwischen dem Zellkern und dem Cytosol, welche bei Säugetierzellen für den Export retroviraler RNAs zusammen mit den Faktoren Rev und Rex bewiesen wurde ([BEVEC et al. 1996]; [KATAHIRA et al. 1995]). Für höhere Eukaryonten ist die Kernexportfunktion auch durch die Interaktion Hypps mit den RAN-GTP-abhängigen Exportinen 1 (Crm1p) und 4 belegt ([LIPOWSKI et al. 2000]; [ROSORIOUS et al. 1999]). In Hefe wurde jedoch eine Akkumulation Hypps im Zellkern einer *crm1*⁻-Mutante nicht beobachtet [VALENTINI et al. 2002]. Für den Kernexport über Exportine müssen in den zu transportierenden Faktoren Leucinreiche Kernexport-Signal-Sequenzen (NES) vorhanden sein. In der humanen Form wurde ein NES-Motiv im Sequenzabschnitt FQLIGIQDGYLSLL (Reste 75 bis 84) postuliert [LIU et al. 1997]. Das Motiv ist jedoch in den Hypp anderer Eukaryonten in der Menge und Anordnung seiner Leucin- und Isoleucin-Reste nicht konserviert und entspricht nicht dem kanonischen NES-Signal, wie es von [STADE et al. 1997] definiert wurde.

Zum jetzigen Zeitpunkt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass in *Saccharomyces cerevisiae* die Hypp-Funktion weniger ausgeprägt an Zellkern-Funktionen gekoppelt ist, als dies bei höher entwickelten Eukaryonten der Fall ist. Dafür mag auch sprechen, dass bisher im Hefegenom kein homologes Gen zu Exportin 4 gefunden wurde.

²GFP = „green fluorescent protein“

Neuere Studien haben gezeigt, dass ein gezielter Abbauweg von mRNA bereits im Zellkern der Bäckerhefe existiert [DAS et al. 2003]. Durch Northern-Blotting, *in situ*-Hybridisierung und Hemmung der Transkription durch Thiolutin wurde dabei in einem *nup116*- Δ -Stamm eine schnelle Degradation der mRNA im Zellkern gezeigt. Dieser Abbau wurde durch *rrp6*- Δ -, *rail*- Δ - und *cbc1*- Δ -Deletionen supprimiert, jedoch nicht durch eine Ausschaltung von *upf1*, welches für die Hauptkomponente des Nonsense-Codon-mRNA-Abbauweges (NMD, Erklärungen s. nächster Abschnitt) codiert. Dies deutet auf die Unabhängigkeit dieses Abbauweges von NMD hin.

Dafür spricht auch, dass die NMD-5'-3'-Exonuklease Xrn1p nicht Teil des Zellkern-mRNA-Abbauweges ist, sondern die zu dieser funktionshomologe nukleäre Nuklease Rat1p.

Aufgrund der Existenz dieses Abbauweges kann nicht notwendigerweise gefolgert werden, dass eine durch G_{81} verursachte RNA-Kernexportdefizienz bei den gewählten experimentellen Bedingungen und Nachweisverfahren zu einer Anreicherung von RNA im Zellkern führen muss.

Das Zwischenergebnis des unbeeinflussten RNA-Kernexports in G_{81} wurde auch durch das Fehlen der in der HDOA-Analyse gemessenen Kernanreicherungen der 18S-rRNA nach Analyse durch quantitative RT-PCR und Northern-Blotting gestützt. Da die 18S-rRNA in einem großen Überschuss in der Zelle vorliegt, konnte auch bei Vorhandensein eines RNA-Abbaumechanismus im Zellkern davon ausgegangen werden, dass eine Anreicherung im Zellkern gegenüber dem Cytosol messbar sein müsste.

Von Interesse war die Zellkernanreicherung der 18S-rRNA, da in der Literatur eine Rolle Hypps bei der Prozessierung und/oder beim Kernexport ribosomaler RNA-Untereinheiten diskutiert wird. So beobachteten [STAGE-ZIMMERMANN et al. 2000] ein Verbleiben des RPL11b-GFP-Proteins, welches am Kernexport der reifen 60S-Untereinheit beteiligt ist, im Zellkern einer Hyp2p-temperatursensitiven Mutante. Auch die Interaktion Hypps mit dem konservierten ribosomalen Protein L5, welches eine zentrale Proteinkomponente des 5S-rRNA-Exportsystems darstellt, deutete auf die Beteiligung Hypps in ein intrazelluläres Transportsystem für Polymerase-III-Transkripte hin [SCHATZ et al. 1998].

Aus den Ergebnissen zu dieser Arbeit ließ sich kein unmittelbarer Hinweis auf eine Beteiligung Hypps beim Export eines speziellen Satzes von mRNA- oder rRNA-Molekülen aus dem Zellkern von *Saccharomyces cerevisiae* finden. Für das System Bäckerhefe ist eine primäre Funktion Hypps als Zellkern-Shuttleprotein aus der Sicht der Ergebnisse dieser Arbeit daher nicht anzunehmen.

6.4 Beeinträchtigung des 5'-3'-mRNA-Abbauweges in G_{81}

Das Muster der reproduzierbar angereicherten Probensätze wies hohe Ähnlichkeit auf mit akkumulierenden Probensätzen in zwei genomweiten Knock-Out-Studien von Faktoren des in *Saccharomyces cerevisiae* als 5'-3'-mRNA-Abbauweg bekannten Stoffwechselweges.

Im folgenden wird ein kurzer Überblick über die bekannten, etablierten mRNA-Abbaumechanismen der Bäckerhefe gegeben. Es existieren zwei generelle prädominante Stoff-

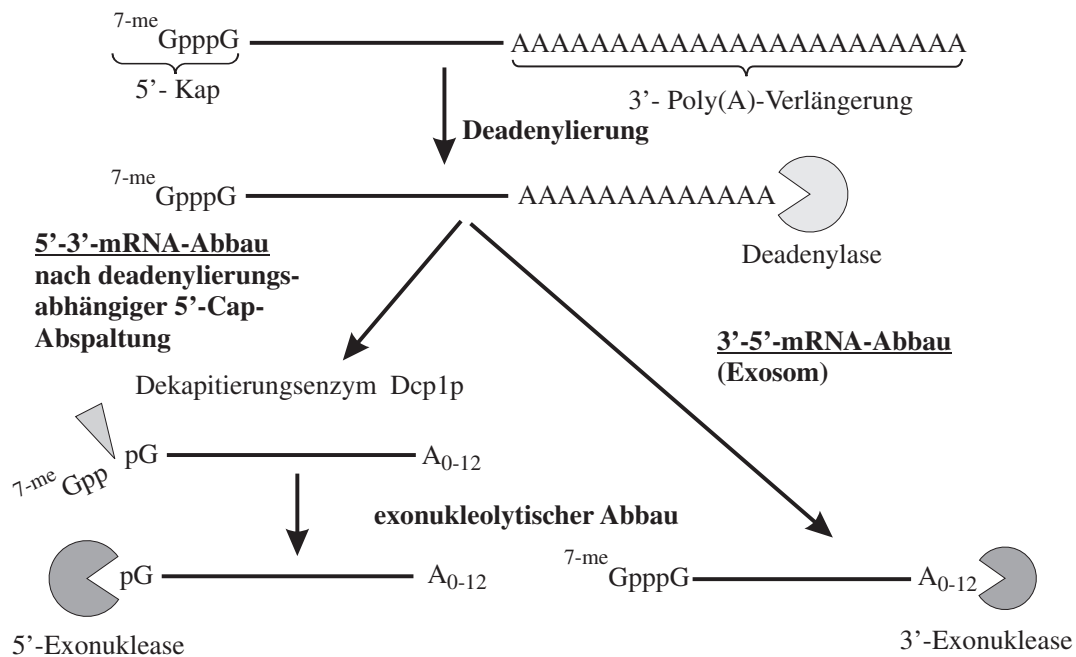


Abbildung 6.1: Der generelle deadenylierungsabhängige mRNA-Abbau beginnt mit der enzymatischen Verkürzung der Poly-A-Verlängerung. Beim Exosom-vermittelten 3'-5'-Abbauweg wird dann die deadenylierte mRNA mit intakter Cap-Struktur von 3'-5'-Exonukleasen abgebaut. Der normale 5'-3'-mRNA-Abbauweg beinhaltet die Abspaltung der 5'-Cap-Struktur mit nachfolgendem Angriff von 5'-3'-Exonukleasen wie Xrn1p.

wechselwege, die anhand der Abbaurichtung der mRNA klassifiziert werden und die abhängig von der Deadenylierung sind (vgl. Abb. 6.1). Der erste beinhaltet den Abbau vom 5'- zum 3'-Ende der mRNA. Der zweite wird als Exosom-abhängiger 3'-5'-Abbauweg bezeichnet. [ANDERSON et al. 1998]; [MANGUS et al. 2003]. In beiden Wegen erfolgt zu Beginn eine Verkürzung der Poly(A)-Kette auf eine Oligo(A)-Länge von 10-12 Nucleotiden [DECKER C. J. 1993]; [MUHLRAD et al. 1995]. Nachfolgend können die Transkripte entweder durch den 5'-3'- oder den 3'-5'-Weg abgebaut werden. Der erstere beinhaltet die Abspaltung der 5'-Cap-Struktur durch den Dcp1p/Dcp2p-Enzymkomplex und den darauf folgenden exonukleolytischen Verdau durch die 5'-3'-Exoribonuklease Xrn1p ([BEELMAN et al. 1996]; [DUNCKLEY und PARKER 1999]; [MUHLRAD et al. 1994]; [MUHLRAD et al. 1995]).

Der Nonsense-Codon vermittelte Abbauweg („Nonsense Mediated Decay“ = NMD) und der sog. „Nonstop-mRNA-Abbauweg“ [VAN HOOFF et al. 2002]; [FRISCHMEYER et al. 2002] stellen zwei spezielle 5'-3'-mRNA-Abbauwege dar, die 5'-Cap-Abspaltung und Abbau durch Xrn1p benötigen [PELTZ und JACOBSON 2000], jedoch keine Deadenylierung der Poly-A-Kette [GONZALES et al. 2001]. In Eukaryonten sind beide Abbauwege konserviert und beide Bestandteil des mRNA-Überwachungssystems, das fehlerhafte mRNAs vor der Translation eliminieren soll. Zur Überwachungsmaschinerie des NMD, die u.a. Nonsense-mRNAs mit vorzeitigen Stop-Codons oder Transkripte mit Frameshift-Mutationen vor der Translation erkennt, gehört ein Komplex aus den drei Upf-Proteinen Upf1p, Upf2p und Upf3p, die den Kern des sog. Überwachungs-Proteinkomplexes („surveillance complex“) bilden [MUHLRAD et al. 1994].

Bei Upf3p handelt es sich um ein Zellkern-Shuttle-Protein, in dessen Sequenz mehrere NES³- und NLS³-Sequenzen vorhanden sind [HO et al. 2000]. Die drei für NMD in *S. cerevisiae* notwendigen *UPF*-Gene zeigen im Sequenzvergleich mit den humanen Homologen von *UPF1* nach *UPF3* abnehmende Prozentsätze der Sequenzidentität. Sie liegt im *UPF1* am höchsten bei 48,5%. Die ATP-Helikase-Domäne des Proteins besitzt dabei eine noch höhere Konserviertheit und hat sich wahrscheinlich in einem frühen Vorfahren von Archaea und Eukaryonten entwickelt [CULBERTSON und LEEDS 2003].

Die genauen Mechanismen der Stop-Codon-Erkennung sind noch nicht bekannt, wengleich der Weg in Hefe am besten charakterisiert ist. Abbildung 6.2 zeigt ein aktuell diskutiertes Modell für NMD in höheren Eukaryonten, das zum Großteil aus Vergleich mit Hefedaten aufgestellt wurde [WILUSZ et al. 2001].

Neben den angesprochenen Haupt-mRNA-Abbauwegen existieren weitere Varianten in Hefe. Zu ihnen gehören der oben angesprochenen zellkernlokalisierte mRNA-Abbau [DAS et al. 2003]. Desweiteren werden einige Messenger-RNAs durch einen seltenen endoribonukleolytischen Weg abgebaut [WILUSZ et al. 2001].

In den letzten Jahren konnte Evidenz dafür gefunden werden, dass NMD in Bäckerhefe neben dem Abbau fehlerhafter RNA eine weitere Funktion in der Zelle bei der posttranskriptionellen Kontrolle von speziellen nicht durch Mutation veränderten mRNA-Transkripten erfüllt. Bei der Identifikation dieser NMD-Substrate sind einige Fortschritte gemacht worden, die zu einer Einteilung nach bestimmten Strukturklassen geführt haben. Zu diesen zählen:

1. mRNAs, die in ihrer codierenden Region früh auftretende Nonsens-Codons tragen („Nonsens-Mutationen“)
[PELTZ et al. 1993b]; [LOSSON und LACROUTE 1979].
2. mRNAs, die in ihrer 5'-UTR (untranslatierte Region am 5'-Ende der mRNA) einen oder mehrere kurze offene Leserahmen („upstream open reading frames“ (uORFs)) tragen
[VILELA et al. 1998]; [RUIZ-ECHEVARRIA und PELTZ 2000].
3. mRNAs mit abnormal verlängerten 3'-UTRs [MUHLRAD und PARKER 1999].
4. mRNAs, bei welchen durch lückenhaftes Scannen des ORFs die Nutzung von außerhalb des Rahmens liegenden AUGs für die Translationsinitiierung begünstigt wird
[WELCH und JACOBSON 1999].
5. Intron enthaltende Pre-mRNAs, die im Zellkern nicht zurückgehalten wurden und das Zytoplasma erreichen [HE et al. 1993].

1999 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um M. R. CULBERTSON eine genomweite Knock-Out-Studie der *UPF*-Gene in *Saccharomyces cerevisiae* [LELIVELT und CULBERTSON 1999]. Die Autoren beschrieben Transkriptomanalysen von Hefestämmen, in denen die Genfunktionen von *UPF1*, *UPF2* und *UPF3* jeweils einzeln und auch zusammen ausgeschaltet worden waren.

³NES = „nuclear export sequence“;

NLS = „nuclear localisation sequence“

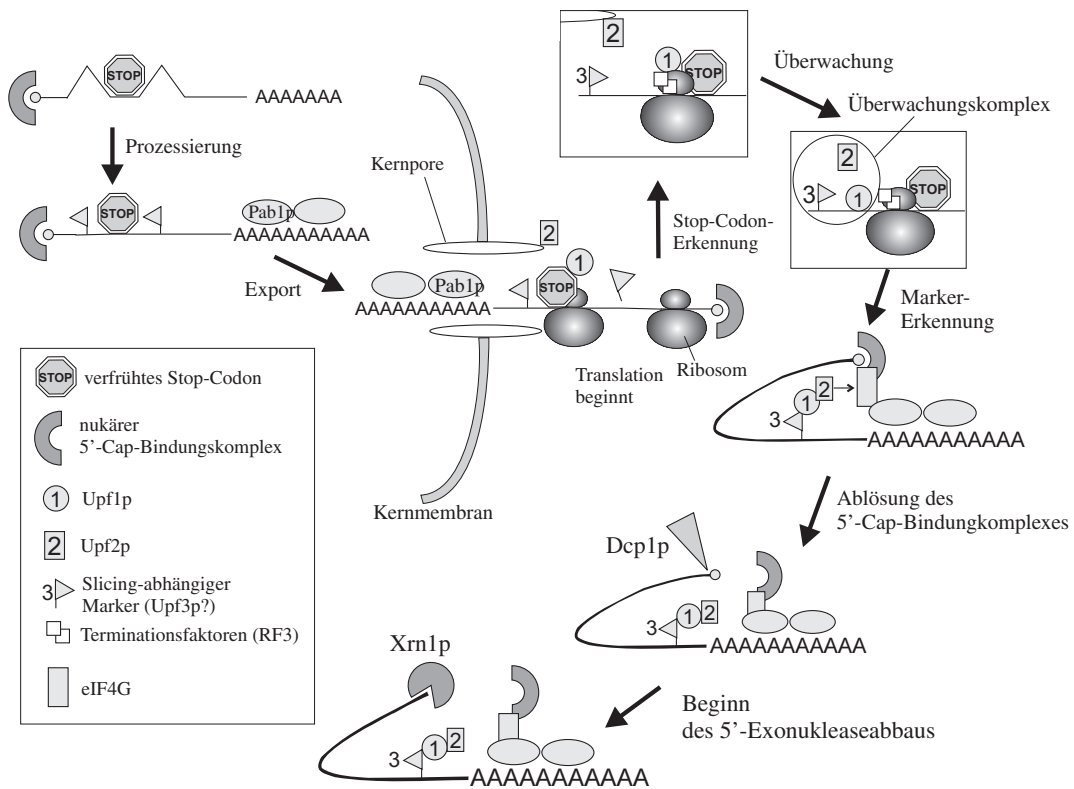


Abbildung 6.2: Nonsense-Codon vermittelter mRNA-Abbauweg (NMD) in höheren Eukaryonten [WILUSZ et al. 2001]. Ein mögliches Modell, wie vorzeitige Stop-Codons in Transkripten erkannt und über einen Poly-A-unabhängigen Weg durch die 5'-3'-Exonuklease abgebaut werden. Noch im Zellkern bindet ein Marker (potentiell Upf3p) spezifisch an Nonsense-RNA. Das Poly-A-bindende Protein Pab1p deckt die Poly-A-Kette ab. Die mRNA wird dann in das Cytoplasma transportiert. Die Translation beginnt, noch bevor die Translokation durch den Kernporenkomplex abgeschlossen ist und die mRNA noch mit dem nukleären 5'-Cap-Bindungskomplex assoziiert ist. Die Passage des Ribosoms kann die Bindung von Marker-Proteinen (Upf3p?) zerstören, so dass eine RNA nach einer Translationsrunde nicht mehr markiert ist. Bei der Translationsterminierung baut sich ein „Überwachungskomplex“ auf, der Upf1p enthält. Dieser Komplex scannt stromabwärts des Stop-Codons nach Markerproteinen. Findet der Überwachungskomplex einen Marker, kommt es zur Umformung der RNA. Dies führt zur Zerstörung des Cap-Bindungskomplexes, zur raschen 5'-Cap-Abspaltung und zum exoribunukleolytischen Abbau.

Vor kurzem erschien eine umfassendere Studie, welche neben der Disruption der drei *UPF*-Gene auch den Ausfall der stromabwärts von ihnen agierenden Faktoren *DCPI* und *XRNI* durch Genchipanalysen untersuchte [HE et al. 2003]. Die Ausschaltung jedes einzelnen oder aller drei *UPF*-Gene zusammen bewirkte dabei die Akkumulierung immer derselben RNA-Transkriptgruppe. Bei Ausschaltung von *DCPI* oder *XRNI* (bzw. beider Gene gemeinsam) reicherten sich diese Transkripte ebenfalls an. Die Gesamtzahl angereicherter Probensätze in diesen Stämmen lag aber um ca. 40% über denen der *upfΔ*-Stämme, da Dcp1p und Xrn1p nicht nur Teil des NMD- sondern auch essentielle Komponenten des generellen 5'-3'-Abbauweges sind (vgl. Abb. 6.1).

Ein Großteil der angereicherten Transkripte in den *nmdΔ*-Stämmen wurde auch im Areicherungstranskriptom von G_{81} gefunden. Die Höhe der Übereinstimmung von > 75% deutet auf eine starke funktionelle Beeinträchtigung des NMD-Abbauweges bzw. des 5'-3'-mRNA-Abbauweges in der Mutante hin. Die Gesamtzahl angereicherter ORFs in G_{81} stimmte dabei

besser mit den ORF-Zahlen der *upf* Δ -Stämme als mit denen der *dcp1*- bzw. *xrn1*- Δ -Stämme überein.

Der NMD-Abbauweg überschneidet sich mit dem normalen 5'-3'-Abbauweg in den beiden letzten Schritten der 5'-Cap-Abspaltung durch Dcp1p/Dcp2p und dem exoribonukleolytischen Abbauschritt durch Xrn1p. Der Einfluss Hypps könnte demnach an den verschiedenen Stufen des Abbauweges ansetzen, nämlich an der Funktion eines einzelnen oder jedes der drei *UPF*-Genprodukte, am 5'-Cap-Abspaltungsschritt der RNA oder an der Xrn1p-Funktion.

Die G₈₁-Ergebnisse sprechen nicht gegen eine Beteiligung, Hypps bei der mRNA-Cap-Abspaltung und/oder beim exonukleolytischen Abbau. Die bessere Übereinstimmung mit *upf* Δ -Stämmen deutet jedoch eher auf eine Funktion Hypps im Zusammenhang mit den *UPF*-Funktionen bzw. mit NMD hin. In diese Richtung deutete auch die spezielle Anreicherung des Transkriptes von *UPF2* im Gegensatz zu den anderen bekannten, essentiellen Faktoren des 5'-3'-Abbauweges, die nicht reguliert erschienen. Dies gibt Anlass zur Spekulation, dass Hypp über *UPF2* mit NMD verknüpft ist.

Eine andere Verbindung Hypps mit NMD könnte über Upf3p bestehen. Es fungiert als klassisches Kern-Shuttle-Protein für den Export der NMD-Substrate und der 60S-ribosomalen Untereinheit [GATFIELD et al. 2003]. Als Ran-GTP-abhängiger Export-Faktor wurde wie für Hypp in höheren Eukaryonten [ROSORIUS et al. 1999] Crm1p gefunden. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Identifizierung von zwei temperatursensitiven Hyp2p-Punktmutanten, die den Export der 60S-Untereinheit behinderten [STAGE-ZIMMERMANN et al. 2000]. Hypp könnte demnach im NMD-Weg auch als Kofaktor für den Kernexport von Upf3p wirken.

ZUK und JACOBSEN haben bereits auf eine mögliche Rolle Hypps in *S. cerevisiae* bei der RNA-Prozessierung, insbesondere im RNA-Abbau hingewiesen [ZUK und JACOBSON 1998]. Sie fanden bei der Suche nach lebenswichtigen Faktoren des mRNA-Turnovers die C-terminale Punktmutante ts1159 von Hyp2p, bei der der nichtkonservierte Serinrest S₁₄₉ durch Prolin ersetzt war. Gescreent wurde nach einer Anreicherung der instabilen *CYH2*-Prä-mRNA, die ein ungespleißtes Intron enthält. Der Phänotyp des temperatursensitiven Allels wies eine zu 30% verringerte Gesamtproteinsynthese bei 37°C auf. Wie die Messung der Aminosäureinkorporation bei zunehmenden Konzentrationen Cycloheximid, einem Translationshemmer, zeigte, konnte die Größenordnung der Translationsabnahme nicht die dort beobachteten mRNA-Abbau-Defekte erklären. Die Autoren schlugen eine Rolle im generellen mRNA-Abbau vor, da es zur Stabilisierung sowohl von Nonsense-Codon-mRNAs als auch von normalen Wildtyp-mRNAs kam, die keiner NMD-Substrat-Klasse zuzuordnen waren. Beobachtet wurde mit Hilfe eines m⁷GMP-Antikörpers auch eine Anhäufung und Stabilisierung von mRNA-Molekülen ohne 5'-Cap-Struktur, was zur Annahme führte, dass Hypp nach der Abspaltung des 5'-Cap wirkt. Da das Transkriptionsprofil von G₈₁ die zuvor beschriebenen Übereinstimmungen aufweist, wird die Hypothese der Beteiligung Hypps bei der 5'-3'-RNA-Prozessierung, insbesondere bei den auf die 5'-Cap-Abspaltung folgenden Schritten, sowohl von ZUK als auch von der Transkriptionsanalyse dieser Arbeit gestützt. Da bei ZUK auch Nicht-NMD-Substrate stabilisiert wurden, ist die Wirkung im normalen 5'-3'-mRNA-Abbauweg wahrscheinlich und deutet hier auf eine Beeinflussung der Xrn1p-Funktion hin.

Aus den Genchipergebnissen ist auch in indirekter, pleiotropischer Effekt Hypps auf den NMD-Weg diskutierbar. Dabei könnte es zu einer Defizienz im Transport oder der Prozessierung einer mRNA kommen, deren Proteinprodukt eine essentielle Komponente des NMD-Weges darstellt. In diesem Zusammenhang ist auch eine Doppelfunktion Hypps denkbar, bei der Hypp am Abbau von RNA-Spezies beteiligt ist und gleichzeitig deren Prozessierung oder Transport selbst kontrolliert.

Einige Fakten sprechen dafür, dass es sich bei der Defizienz im 5'-3'-mRNA-Abbau bei Ausfall der *HYP*-Funktion nicht um Sekundäreffekte handelt. (VALENTINI et al. [2002] hielten die Stabilisierung von mRNAs in den dort analysierten *HYP2*-Mutanten für sekundär.):

- In G_{81} ist der mRNA-Anreicherungseffekt im Gegensatz zu den Beobachtungen an *hyp2-ts*-Mutanten von VALENTINI kaum abhängig von der Temperatur oder der Dauer einer Inkubation bei 37°C. Die RNA-Anreicherung war auch bei permissiver Temperatur sehr ausgeprägt messbar, wie die Expressionsmuster bei 25°C und 37°C im Vergleich zum Wildtyp eindeutig ergaben. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von ZUK et al., die bei ihrer *ts*-Mutanten von *HYP2* ebenfalls bei weniger als 45 min nach Shift auf die hohe Temperatur deutliche mRNA-Anreicherungen messen konnten [ZUK und JACOBSON 1998].
- Die Transkriptionsprofile angereicherter Transkripte zeigen sehr hohe Ähnlichkeiten zu den Datensätzen von *upfΔ*-, *dcp1Δ*- und *xrn1Δ*-Mutanten. Bei Sekundäreffekten wären die Übereinstimmungen weniger ausgeprägt.
- Die Expressionsprofile waren aus unabhängig isolierten Mutantenstämmen und zellulären RNA-Unterfraktionen gut reproduzierbar.
- Die von der Punktmutation $G_{81}V$ ausgelösten phänotypischen Eigenschaften stehen nachweislich im Zusammenhang (s. nächster Abschnitt) mit dem Ausfall von Genen, die bekanntermaßen durch NMD kontrolliert werden [LELIVELT und CULBERTSON 1999]; [HE et al. 2003].

6.5 Betrachtung der durch NMD bzw. 5'-3'-RNA-Abbau regulierten Gen- und Funktionsgruppen im Hinblick auf die Funktion Hypps

Aus den Ergebnissen kann man folgern, dass die Ziel-Molekülgruppen des NMD- bzw. 5'-3'-mRNA-Abbauweges zu einer Gruppe der von der Hypp-Funktion beeinflussten mRNAs gehören. Dies bedeutet, dass die betreffenden Gen-Funktionen durch Hypp mitreguliert würden.

Ca. 33% der durch NMD kontrollierten ORFs konnten von HE et al. [2003] mittels bioinformatischer Methoden in verschiedene strukturelle und funktionelle Kategorien eingeteilt werden. Darunter waren auch Gruppen, die bisher nicht im Zusammenhang mit NMD beobachtet worden sind. Diese Funktionsgruppen ließen sich in den G_{81} angereicherten mRNA-Spezies gut reproduzieren. Demnach können retrotransposable Elemente (Ty-Elemente) und ihre LTR-Sequenzen⁴ (vgl. Abb. 5.40, Seite 129), mRNAs, die einen +1-Frameshift für ihre Translation benötigen, bicistronische mRNAs sowie Transkripte von Pseudogenen (vgl. Ergebnisteil Seite 128 Seite 128) zu den von NMD kontrollierten RNA-Gruppen gerechnet werden. Eine Übersichtstabelle dieser mRNA-Strukturgruppeneinteilung anhand der HDOA-Ergebnisse befindet sich im Anhang zu dieser Arbeit.

uORF⁵-enthaltende mRNAs stellten die größte Gruppe der akkumulierten mRNAs in der Mutante dar, denen in Übereinstimmung mit den Genchip-Daten zum Upf-vermittelten Abbau charakteristische Strukturelemente zugeordnet werden konnten.

(vgl. Tabellenanhang). Viele dieser Transkripte enthielten uORF-Cluster innerhalb 100 bp vor dem Start-Codon des ORFs. Es ist jedoch bekannt, dass uORFs alleine nicht ausreichen, damit eine mRNA über NMD abgebaut wird [PELTZ et al. 1993b]. Als Beispiel sei die *GCN4*-mRNA (Schlüsselgen zur transkriptionellen Kontrolle der Aminosäuresynthese) erwähnt, welche über vier kurze uORFs reguliert wird, aber kein Zielmolekül des NMD vermittelten Abbaus darstellt [HINNEBUSCH 1992]. HE et al. zeigten das Vorhandensein eines speziellen uORF-Motivs der NMD-Substrate (AUGAA oder AAUGA), welches innerhalb der ersten 60 Basenpaare des 5'-UTRs in 86 uORF-enthaltenden Transkripten vorhanden war.

In der 2D-Gel-Studie von Mitochondrien aus G_{81} wurde Isopropylmalatsynthase (Leu4p) als stark angereichertes Protein gefunden. Auch die mRNA dieses Gens enthält einen 13 Codon langen uORF im 5'-UTR, der jedoch nicht die oben beschriebenen Motivelemente enthält. Hingegen zeigt das Gen *LEU3* in *xrn1*- Δ -Mutanten eine reproduzierbare Anreicherung seiner mRNA, welche einen uORF-Cluster mit den genannten Motivelementen aufweist. *LEU3* codiert für einen spezifischen Transkriptionsfaktor, welcher bei der Regulation verzweigter Aminosäuren beteiligt ist und positiv durch α -Isopropylmalat reguliert wird [FRIDEN und SCHIMMEL 1990]. Demnach ist durch den Ausfall der *HYP-Funktion* und somit von NMD eine negative Beeinflussung der *LEU3*-Funktion denkbar. Dadurch würde die Aktivi-

⁴Die retrotransposablen Elemente, genannt Ty-Elemente (von „transposon yeast“) sind DNA-Abschnitte, die in ihrem Aufbau retroviraler DNA ähneln und an verschiedenen Stellen des Genoms eingebaut werden können. Das Retrotransposon besitzt an beiden Enden sog. lange Wiederholsequenzen (LTRs = „long terminal repeats“), von denen Sequenzreste nach einem Transpositionereignis an der ursprünglichen Stelle im Genom zurückbleiben können (vgl. Ergebnisteil, Seite 132).

⁵uORF = „upstream open reading frame“, kurzer ORF in der 5'-untranslatierten mRNA-Region

tät von *LEU4* und so die Menge des von ihm gebildeten Proteins herabgesetzt. Für diese Erklärung des Leu4p-Ergebnisses spricht, dass die *LEU4*-mRNA zusammen mit der *GCN4*-mRNA nicht reguliert bzw. leicht abgereichert gefunden wurde. Da aber das Protein in mitochondrialen Fraktionen gefunden wurde und mitochondriale Funktionen in der Mutante stark beeinträchtigt waren, bedarf es weiterer Studien, um den aufgezeigten Zusammenhang weiter zu untermauern.

Die Hypp-Funktion hat sich als essentiell für die Zellproliferation und die Fortschreitung des Zellzyklus am G₁-Kontrollpunkt beim Übergang zur S-Phase erwiesen (vgl. Einleitung). Bei Ausschaltung Hypps kommt es in G₈₁ bei restriktiver Temperatur zu einem Zellzyklus-Arrest am G₁-Kontrollpunkt [YOUNG 1998]. Wenn eine Hauptfunktion Hypps bei der Regulation oder beim Ablauf des NMD- bzw. 5'-3'-mRNA-Abbauweges läge, sollten unter den NMD-Genen solche Gen-Gruppen zu finden sein, deren Funktionen unabdingbar für das Zellwachstum und den Ablauf des Zellzyklus sind. In den folgenden Unterabschnitten werden solche Zusammenhänge aufgezeigt.

6.5.1 Beeinträchtigung des telomeren Positionseffektes

Bei der Betrachtung der 533 am höchsten angereicherten Probensätze in der G₈₁-HDOA-Studie wurde eine Anhäufung von 165 (31%) ORFs beobachtet, die sich nahe an den Chromosomen-Telomeren befinden. Daraus wurde deutlich, dass eine Ausschaltung des telomeren Positionseffektes (TPE) [GOTTSCHLING et al. 1990] in G₈₁ vorlag, da Gene, welche sich nahe an den Chromosomenenden befinden, im Normalfall transkriptionell kaum aktiv sind.

In Übereinstimmung mit den Gen-Chip-Studien von [LELIVELT und CULBERTSON 1999] und [HE et al. 2003] wurde eine Anreicherung einer Gruppe von Genen gezeigt, welche am Telomer-Metabolismus beteiligt sind, darunter das Gen für die katalytische Untereinheit der Telomerase, *Est2p* (vgl. Tabelle 5.19, Seite 131).

Einige Studien haben eine Steuerung telomerer Funktionen durch NMD gezeigt. Ausgehend von den Daten [LELIVELT und CULBERTSON 1999] wurde gezielt die Steuerung von Telomerase und weiterer Gene, die für wichtige Telomer-Funktionen codieren (darunter das Gen *STN1*, welches an der Telomerlängenregulation beteiligt ist), überprüft [DAHLSEID et al. 2003]. Es zeigte sich, dass die Überexpression von *STN1* zusammen mit *EST2* in Wildtypzellen ausreichte, um ein Ausschalten des telomerischen Silencings in *S. cerevisiae* auszulösen. Es wurde davon ausgegangen, dass ein NMD-kontrollierter Transkriptionsfaktor das *STN1*-Level kontrolliert. Zusätzlich bewiesen HE et al. [2003], dass die *EST1*-mRNA in *upf2Δ*-Stämmen deutlich stabilisiert wurde.

LEW [1998] stellte fest, dass in einer *NMD2*-Mutante TPE abgeschwächt war und bewies die Wichtigkeit von funktionfähigen Upf-Proteinen für die Kontrolle der Telomerlänge und die Erhaltung telomerischen Chromatins. Die Ausschaltung von Faktoren, die für den generellen deadenylierungsabhängigen RNA-Abbau essentiell sind, löste keine Telomer-Defekte aus, was die physiologische Erforderlichkeit NMDs bei der Steuerung telomerer Funktionen zeigte. Dazu besitzen *EST1* und *EST3* uORF-Cluster, wie sie HE et al. beschrieben haben. Auch wurden

uORFs in den *EST2*- und *TEL2*-mRNAs gefunden. Ferner benötigt *EST3* einen Frameshift zur Translation eines vollständigen funktionalen Proteins [LEW et al. 1998]. Die Halbwertszeit der *EST1*-mRNA war in *upf2Δ*-Mutanten ebenfalls deutlich erhöht und so die Steuerung dieses Gens über NMD sehr wahrscheinlich.

Es gibt mannigfaltige Verknüpfungen der Telomerfunktion und der Steuerung des Zellzyklus. So verursacht der Verlust eines einzelnen Telomers einen effizienten Zellzyklus-Arrest, gesteuert über den *RAD9*-Zellzyklus-Kontrollpunkt, der bei Erkennung eines DNA-Schadens aktiviert wird [SANDELL und ZAKIAN 1993]. DE BRUIN et al. fanden heraus, dass bei Arretierung von Hefezellen in der G_1 -Phase TPE verloren ging und daher die Aktivierung von ruhig gestellten telomerischen Genen in der Abwesenheit der DNA-Replikation erfolgen kann [DE BRUIN et al. 2000]. Sie stellten ebenfalls fest, dass TPE durch den Knockout der *SIR*-Gene (Faktoren, die involviert im telomerischen Silencing sind) ausgeschaltet wird. Sie wiesen darauf hin, dass die telomere Transkription gleichzeitig vom Verlust des TPE und des subtelomerischen Rap1p-Proteins begleitet war.

Einen weiteren Hinweis auf eine Zellzyklus-Verknüpfung der G_{81} -Genchip-Daten gab die Anreicherung des *MCM21*-Transkriptes. Dieses akkumulierte ebenfalls in *upfΔ*- bzw. *xrn1Δ*-Stämmen und wird daher potentiell durch NMD gesteuert. Die mRNA enthält ein uORF-Cluster, wie es HE et al. beschrieben haben und wurde als Pre-mRNA eingruppiert.

Die konservierten *MCM*-Gene (Mini-Chromosome-Maintenance-Gene) sind mit TPE und der Vorbereitung der S-Phase verknüpft. Ihnen wird eine gut akzeptierte Rolle in der Initiation der Replikation und in der Elongation von Replikationsgabeln zugeschrieben. Man nimmt an, dass sie Bestandteil eines Steuerungsapparates sind, der das Auftreten der DNA-Replikation als einmaliges Ereignis pro Zellzyklusrunde beschränkt. Beim Ausschalten des *MCM5*-Gens in *S. cerevisiae* wurde eine erhöhte Expression subtelomerischer und Ty-Retrotransposonbenachbarter Gene festgestellt [DZIAK et al. 2003]. Eine mögliche Verknüpfung der *MCM*-Funktionen und Hypp kann auch aus der Tatsache abgeleitet werden, dass das *MCM3*-Gen unmittelbar stromaufwärts chromosomal benachbart zu *HYP2* ist. Ein solcher Zusammenhang rückt die Funktion der *MCM*-Gene an eine Kontrolle durch NMD heran, worauf die Anreicherung von *MCM21* hindeutet. In G_{81} waren hingegen die mRNAs der Gene *MCM3*, *MCM6*, *MCM10* und *MCM16* herunterreguliert und *MCM2* nicht reguliert, was als Anzeichen für eine verminderte *MCM*-Funktionalität in der Mutante gewertet werden kann. Unter den akkumulierten mRNAs fanden sich auch andere Gene, die einen Einfluss auf die Steuerung der S-Phase hatten, wie z.B. der Pre-mRNA-Splicingfaktor *CDC40*. Somit besteht die Möglichkeit, dass Hypp über den 5'-3'-mRNA-Abbau an der Steuerung des telomerischen Chromatinzustands und gleichzeitig an der Initiation der S-Phase beteiligt ist.

Auch eine direkte Regulation eines Zellzyklus- G_1 -Cyclins durch NMD ist möglich. In der *xrn1Δ*-Transkriptomanalyse erwies sich die *CLN3*-mRNA um einen Faktor von ca. 3 als angereichert. Auch von dieser mRNA ist das Vorhandensein eines uORFs an der Position -315 im 5'-UTR-Bereich (mRNA beginnt bei Basenpaar -364) bekannt, bei dessen Ausschalten nachweislich eine Verkürzung der G_1 -Phase durch schnelleres Überschreiten des G_1 -S-Kontrollpunktes ausgelöst wird [POLYMENIS und SCHMIDT 1997]. Es wurde auch beobachtet, dass die Cln3p-Synthese besonders empfindlich auf eine Rapamycin-vermittelte Inhibierung der Translation

reagiert [BARBET et al. 1996], was ein Anzeichen für einen posttranskriptionalen Mechanismus bei seiner Regulation ist. Die Halbwertszeit von Cln3p ist extrem gering. Auch deshalb ist eine Regulation seiner mRNA durch NMD und über Hypp denkbar. Damit würde eine direkte Steuerung des Zellzyklus am $G_1 \rightarrow S$ -Übergang durch Hypp als Kofaktor des NMD-Weges oder Regulators eines NMD-Faktors stattfinden. Ein solcher direkter Zusammenhang wäre jedoch noch zu beweisen.

Aus den oben dargelegten Zusammenhängen des 5'-3'-Abbauweges mit Telomer-Funktionen und der Zellzyklus-Kontrolle erwächst auch die Möglichkeit, dass Hypp ein Zellzyklusphasenabhängiger Schalter für NMD sein könnte. Eine generelle Beobachtung ist, dass Protein-Synthese-Inhibitoren die Halbwertszeiten sehr vieler mRNAs in somatischen Zellen höherer Eukaryonten sowie in Hefezellen wenigstens um den Faktor 4 erhöhen können. [ROSS 1997] postulierte, dass es sich hierbei auch um einen physiologischen Prozess handeln könnte, der während jeder Mitose auftritt und wichtig für das Überleben der Zelle ist. Dabei kommt es während der Mitose zu einer Inaktivierung von Komponenten des mRNA-Degradationssystems. Bei Ausfall dieses Effektes könnten labile mRNAs abgebaut werden, deren Proteinprodukte beim Eintritt und Fortschreiten der G_1 -Phase notwendig sind.

In diese Richtung wies eine Superinduktion von pflanzlichen *PDR*-Genen, die für ATP-Bindungskassetten-tragende Transporter (ABC-Transporter) codieren, nach Hemmung der Translation durch Cycloheximid [VAN DEN BRÛLE und SMART 2002]. Auch in G_{81} reichernten sich die Transkripte einiger ABC-Transporter-Gene (*PDR10*, *PDR11*, *PDR3*, *PDR12* und *PDR8*) an, die homolog zu den Pflanzengenen sind. Ob die Effekte von G_{81} im Zusammenhang mit der Hypothese von ROSS stehen, wäre in weiteren Forschungsprojekten zu untersuchen.

6.5.2 Hypp und die Zellalterung

Bei der *Hyp*-Mutante G_{81} wurde eine abnehmende Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme mit Zunahme der Generationszahl nach der Erzeugung des G_{81} -Geno- und Phänotyps festgestellt. Mit dem Wissen um die Verknüpfung der Telomeraseaktivität mit der Hypusinfunktion über NMD könnte dies mit einer abnehmenden Telomeraseaktivität und Alterungsprozessen der Hefezellen zusammenhängen.

Forscher haben Zusammenhänge zwischen der Hypusinsyntheserate (bzw. der sie beeinflussenden Aktivität von Deoxyhypusinsynthase) und Zellalterungsprozessen beschrieben. Bei den Pflanzen Tomate [WANG et al. 2001] und *Arabidopsis* [WANG et al. 2003] wurde mit wachsendem Alterungsgrad der Pflanzenzellen ein Anstieg der *DHS*- und *HYP*-mRNA beobachtet. Dementsprechend verzögerte eine ausfallende *HYP*-Funktion durch Hemmung der Hypusinsynthese Zellalterungsprozesse. Im Gegensatz dazu fanden [CHEN und CHEN 1997] eine starke Abnahme der Hypusinsynthese mit zunehmendem Alter von humanen IMR-90 Fibroblasten. Bei Humanzellen sinkt die Anzahl telomerischer Wiederholsequenzen mit jeder Zellteilung. Daher wurde vorgeschlagen, die Telomerlänge als mitotische Uhr zu sehen, welche die Anzahl der Zellteilungen von humanen somatischen Zellen limitiert, die von Tumorzellen jedoch nicht, in denen im Gegensatz zu somatischen Zellen Telomerase aktiviert ist [KIM et al. 1994]. Hefezellen, in denen Telomerase deaktiviert wurde, zeigten viele phänotypische Analogien zu

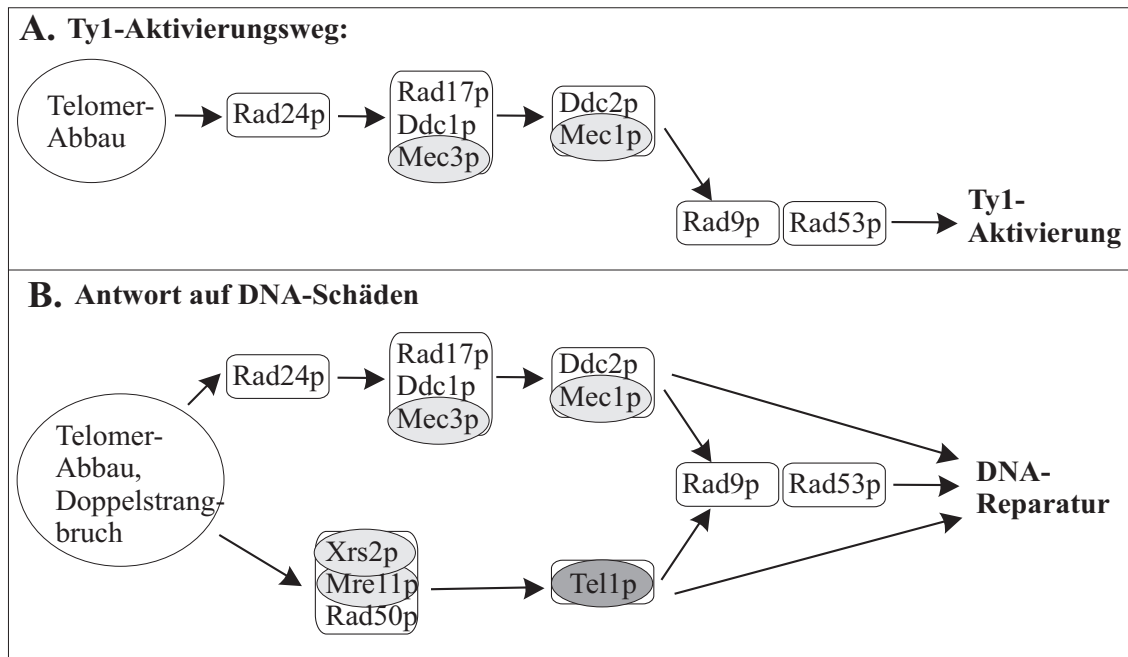


Abbildung 6.3: Modell für die Aktivierung von Ty1-Elementen durch einen Zweig der DNA-Schadens-Antwort, die durch Telomer-Erosion ausgelöst wird. Das Modell wurde aus den Daten von [SCHOLES et al. 2003] und bekannten Fakten zu den Komponenten der DNA-Schadens-Antwort und der Telomer-Kontrollpunktwege erstellt.

(Einzelheiten zu Erkenntnissen der Zellantwort auf Telomer-Erosion können folgenden Arbeiten entnommen werden: [ENOMOTO et al. 2002]; [IJPMA und GREIDER 2003]; [ROUSE und JACKSON 1997]; [ZHOU und ELLEDGE 2000]).

A: Die Aktivierung von Ty1-Retrotransposons kann durch Telomer-Abbau über den Telomer-Kontrollpunkt-Weg eingeleitet werden über Rad9p und Rad53p.

B: Die Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche führt entweder über den Rad24p-Mec1p-Arm oder den Mre11p-Tellp-Arm. Einkreiste Genprodukte werden vermutlich über NMD kontrolliert.

somatischen Humanzellen [ZAKIAN 1996]. Nullmutanten der Gene *EST1* oder *EST3* sind zwar überlebensfähig, entwickeln aber deutliche Phänotypen der Zellalterung mit dem fortschreitenden Verlust von chromosomalen DNA-Sequenzen, die für Telomerfunktionen wichtig sind [LENDVAY et al. 1996]. Es kam zu einer Abnahme der chromosomalen Stabilität und schließlich zum Zelltod.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Genaktivität des vor kurzem im menschlichen Genom gefundenen zweiten Hypusin-Proteins „eIF-5A2“ [JENKINS et al. 2001]. Eine deutliche Expression dieses Gens ist bislang nur in verschiedenen Krebszell-Linien, jedoch nicht in somatischen gesunden Zellen gefunden worden, was es als potentielles Onko-Gen ausweist und seine Funktion erneut mit der der Telomerase verknüpft.

6.5.3 Retrotransposable Elemente

Eine signifikante Anzahl von Ty-LTR-Elementen zeigte in G₈₁ mRNA-Akkumulationen, die auch bei Ausschaltung des NMD-Weges auftraten [HE et al. 2003].

Eine Regulation dieser Elemente durch Telomerfunktionen ist beschrieben. Viele der in G₈₁ akkumulierten Ty1-Elemente, die zu den Retrotransposons gehören, werden aktiviert, wenn DNA-Läsionen durch den Verlust der Telomerfunktion entstehen [SCHOLES et al. 2003]. Dabei

steigt die Ty1-Retrotransposition mit der Menge der gebildeten Ty1-cDNA. Diese Zellantwort wird über die Kinasen Rad24p, Rad17p, Mec3p, Ddc1p und Mec1p gesteuert. Sie wird auch als Telomer-Kontrollpunkt-Weg bezeichnet. Abbildung 6.3 stellt die Vorgänge an diesem Kontrollpunkt dar und zeigt Komponenten, die nach den Genchipdaten dieser Arbeit und aus der Studie von [HE et al. 2003] potentiell vom Upf-vermittelten Abbau kontrolliert werden. Das Gen *TEL1* zeigte dabei den stärksten Regulationseffekt. Deutlich wird, dass die Aktivierung der Ty1-Elemente durch eine Telomererosion ausgelöst werden kann, dass aber auch in diesen Prozessen Einflüsse einer NMD-Kontrolle an mehreren Stellen sichtbar werden. Die mögliche Deaktivierung von *TEL1*, *MEC3* und *XRS2* würde eine Arretierung des Zellzyklus zwischen G₂- und S-Phase verhindern und gleichzeitig in DNA-Reparaturmechanismen eingreifen. Damit geht der beobachtete Zellzyklus-Arrest am G₁- und nicht am G₂-Kontrollpunkt bei Inaktivierung Hypps konform. Der Einfluss der NMD-Kontrolle auf Vorgänge der DNA-Reparatur scheint jedoch noch komplizierter, wenn man miteinbezieht, dass auch die Gene *APN2*, *RADI*, *DNL4*, *RAD57*, *REV3*, *NTG2*, *MLH3*, *THI4* und *RNR3* von NMD beeinflusst sind, wie die Ergebnisse der Genchipstudien übereinstimmend belegen.

Die aufgezeigten Aspekte sprechen bei der Aktivierung der Ty-LTRs für einen synergistischen Effekt, hervorgerufen durch den Verlust der NMD-Funktion und dem daraus resultierenden Ausfall der Telomer-Funktionen.

Zu erwähnen ist, dass einige Ty2-LTRs ausschließlich Anreicherungen in G₈₁ zeigten (sieben Probensätze innerhalb der 533 Transkripte der G₈₁-HDOA-Studie). Dies trifft auch auf die mRNA von *RTT107* zu, einem negativen Regulator der Ty1-Transposition, der auch an der Etablierung von stillem Chromatin beteiligt ist [DZIAK et al. 2003]. Daraus kann abgeleitet werden, dass Hypp spezielle Einflüsse auf die Regulation der Ty-Expression hat, die zu den Auswirkungen der Telomer-Steuerung hinzukommen.

Auch die Aktivierung von Genen, die auf dem Chromosom in enger Nachbarschaft zu Ty-LTRs liegen und deren mRNAs zahlreich in der Hypp-Mutante angereichert gefunden wurden, kann sowohl im Zusammenhang mit einer direkten Kontrolle durch NMD als auch mit einer Koaktivierung zusammen mit Ty-Elementen, gesteuert durch den Verlust telomerer Funktionen, gesehen werden. DZIAK beobachtete eine Aktivierung Ty-benachbarter Gene in *mcm5*-Mutanten, die eine Reversion des telomeren Positionseffektes aufwiesen. Die Effekte wurden damit erklärt, dass ein Verlust von Telomerfunktionen z.B durch Ausschaltung der *mcm*-Funktionen zu einer Veränderung des Chromatins nicht nur im subtelomerischen Bereich, sondern auch an Ty-Elementen führt [DZIAK et al. 2003].

Transposable Elemente wurden in allen Eukaryonten gefunden und können aufgrund ihrer Eigenschaft, im Genom zu „springen“, für die Zelle schädlich sein. Daher ist die potentielle Inaktivierung dieser Elemente durch NMD sinnvoll. Das gleiche gilt für retrovirale RNA, die sich ähnlich wie Retrotransposons verhält und der Funktion der reversen Transkriptase bedarf. NMD unter der Beteiligung Hypps könnte hier als Schutzmechanismus gegen virale Infektionen fungieren.

Wie früher gezeigt wurde, ist Hypp als essentieller Faktor bei der Vermehrung von Retroviren wie HIV-1 als Kofaktor von Rev beim Kernexport der viralen RNA gefunden worden (vgl.

Einleitung). In dieser Arbeit ist die Proteininteraktion Hypps mit dem majoren Hüllenprotein Gag des doppelsträngigen Hefe-RNA-Virus L-A gezeigt worden (genauere Diskussion siehe weiter unten, Kapitel 6.9, Seite 184). Dieses Virus weist Ähnlichkeiten zu Retroviren auf und benötigt wie viele von diesen einen -1-Frameshift. Die Tatsache, dass Telomerase als Enzym eine spezielle reverse Transkriptase darstellt und ein integrales RNA-Templat benötigt, zeigt eine mechanistische Ähnlichkeit der Telomer-Längenregulation mit der Vermehrung von Retroviren wie HIV-1 in eukaryontischen Zellen. Auch für die Vermehrung und den Erhalt von Retro-Transposons ist die reverse Transkription und Erzeugung von RNA-Intermediaten erforderlich [WEINER et al. 1986].

Aus allen diesen Daten kann vermutet werden, dass Hypp nicht nur an der Steuerung von RNA-Abbauvorgängen oder Transportvorgängen, sondern auch direkt an Vorgängen der Genregulation beteiligt sein könnte, bei denen reverse Transkripte und RNA-Zwischenprodukte eine Rolle spielen. Eine weitere Erforschung dieser speziellen Vorgänge im Hinblick auf die Hypusinfunktion erscheint sinnvoll.

6.5.4 Verknüpfung der NMD- mit der Atmungs-Defizienz

Die Expressionsprofile von G_{81} und von Mutanten mit deaktivierten Upf-vermittelten RNA-Abbauwegen weisen übereinstimmend akkumulierte und damit potentiell durch NMD kontrollierte mRNA-Transkripte auf, die im Zusammenhang mit mitochondrialen Funktionen stehen. Die Anreicherung bzw. Stabilisierung der mRNAs dieser Gene könnte zu einer Anreicherung der zugehörigen Proteinprodukte führen und so die mitochondrialen Dysfunktionen mitbeeinflussen. Von einigen mitochondrialen Proteinen ist bekannt, dass sie bei Überexpression mitochondriale Funktionen an verschiedenen Stellen beeinträchtigen. Z.B. führt die Pet127p-Aktivierung zu einer vollständigen Blockierung des atmungsabhängigen Wachstums und zum Verlust des mitochondrialen Genoms [WIESENBERGER und FOX 1997]. Dem Protein wird eine Rolle im mitochondrialen RNA-Überwachungssystem zugeschrieben. Bei Überexpression der RNA-Splicing-Proteine Mrs3p oder Mrs4p kommt es zur Ausbildung eines temperaturabhängigen Petite-Phänotyps [WIESENBERGER et al. 1991].

Die Tabelle 6.1 listet mitochondriale Gene auf, deren Transkripte bei G_{81} -Punktmutierung von Hyp(hum)p bei restriktiver oder permissiver Temperatur akkumulierten. Unter den höchstangereicherten Genen dieser Gruppe finden sich wie bei den *upf* Δ -Mutanten [LELIVELT 1999] *PET18* und *PET122*. Die Funktion von ersterem ist nicht sicher bekannt. *pet18*-Nullmutanten weisen wie G_{81} Atmungsdefizienz und temperatursensitive Lethalität auf [LU et al. 2003]. *PET18* hat sich außerdem zusammen mit *MAK3* und *MAK10* für die Vermehrung doppelsträngiger RNA-Viren wie L-A (siehe unten) als notwendig erwiesen. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom zwischen den Genen *MAK32* und *MAK31*. Die etwa 30 *MAK*-Gene („maintenance of killer“) werden für die stabile Vermehrung der M_1 -dsRNA [WICKNER 1996] benötigt. Bei *PET122* handelt es sich um einen Translationsaktivator der in der mt-DNA codierten Cox3p-Untereinheit des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes.

Die *COX1*-mRNA besaß die geringste Expressionsrate in G_{81} . In der Literatur ist die Ausschaltung dieses Gens durch ungenügendes oder ausbleibendes Spleißen der Pre-*COX1*-mRNA

PobeSet	ORF	Gen	Beschreibung	FC (37°C) ± SD
4197_AT 3988_AT 8437_AT 6852_AT	YIL114C Q0115 YOR100C YCR020C	<i>POR2</i> <i>BI3</i> <i>CRC1</i> <i>PET18</i>	Spannungs-abhängiger Anionenkanal (YVDAC2) mitoch. mRNA-Maturase; Gruppe I-Intron-Spl. mitoch. Carnitin-Transporter, Fettsäure-Metabol. Nullmutante zeigt mitoch. Atmungsdefizienz; dsRNA-Virus L-A kann in <i>pet18</i> -Mutante nicht reifen	4,8 ± 0,5 4,1 ± 1,2 3,9 ± 0,9 3,8 ± 1,2
5547_AT	YER153C	<i>PET122</i>	Translationsaktivator der mitoch. codierten Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit <i>COX3</i>	3,6 ± 1,7
4456_AT 4427_AT 8553_AT 4570_AT 4413_AT	YHR075C YHR091C YOL009C YHL038C YHR120W	<i>PPE1</i> <i>MSR1</i> <i>MDM12</i> <i>CBP2</i> <i>MSH1</i>	mitoch. ribosomales Protein der kleinen Untereinheit Arginyl-tRNA-Synthetase, mitochondrial mitoch. Protein der äusseren Membran Cytochrom-B-Pre-mRNA-Prozessierungs-Protein mutS-Homolog beteiligt an der mitoch. DNA-Reparatur	3,4 ± 0,9 2,9 ± 1,2 2,7 ± 1,1 2,6 ± 0,4 2,4 ± 0,3
9963_AT 4498_AT 9668_AT 8334_AT 11044_AT	YLR382C YHR024C YML042W YOR222W YJL023C	<i>NAM2</i> <i>MAS2</i> <i>CAT2</i> <i>ODC2</i> <i>PET130</i>	mitoch. Leucin-tRNA-Synthetase mitoch. Prozessierungs-Peptidase Carnitin-O-Acetyltransferase, peroxisomal und mitoch. mitoch. Transporter für 2-Oxoacidat Protein benötigt für atmungsabhängiges Wachstum	2,3 ± 0,8 2,2 ± 0,7 2,2 ± 0,5 2,2 ± 1,4 2,1 ± 0,2
8513_AT 6875_AT 9600_AT 4512_AT	YOR040W YCL004W YMR023C YHR038W	<i>GLO4</i> <i>PGS1</i> <i>MSS1</i> <i>RRF1</i>	mitoch. Glyoxylase-II Phosphatidylglycerolphosphat-Synthase, mitoch. könnte eine Rolle in der mitoch. Translation spielen mitoch. ribosomaler Recycling-Faktor1; Translations-Terminations-Aktivität	2,1 ± 0,9 2,1 ± 0,9 2,0 ± 0,2 1,8 ± 0,2
7803_AT	YPL040C	<i>ISM1</i>	Kern-codierte mitoch. Isoleucyl-tRNA-Synthetase	1,8 ± 0,3
5775_AT 8914_AT 8510_AT 5751_AT 7687_AT	YEL059C-A YNL073W YOR037W YEL039C YPR067W	<i>SOM1</i> <i>MSK1</i> <i>CYC2</i> <i>CYC7</i> <i>ISA2</i>	High-Copy-Suppressor einer <i>imp1</i> - Mutante; könnte zur mitoch. Protein-Sortierungsmaschinerie gehören mitoch. Lysin-tRNA-Synthetase Cytochrom-c mitoch. Importfaktor Iso-2-Cytochrom-c mitoch. Eisen-Ionen-Transport	1,8 ± 0,0 1,8 ± 0,4 1,7 ± 0,3 1,7 ± 0,1 1,7 ± 0,6
6834_AT 4523_AT	YCR046C YHR005C-A	<i>IMG1</i> <i>MRS11</i>	benötigt für Atmung und die Erhaltung des mitoch. Genoms könnte kooperativ mit <i>Mrs5p</i> beim mitoch. Protein-Import und anderen verwandten Prozessen beteiligt sein.	1,7 ± 0,1 1,7 ± 0,4

Tabelle 6.1: Gene mit mitochondrialen Funktionen, die in der HDOA-Analyse der Hypp-Mutante G₈₁ von Kulturen nach Inkubation bei 37°C angereichert erschienen. Sie können potentiell durch den NMD- bzw. 5'-3'-mRNA-Abbauweg und damit durch die Hypp-Funktion reguliert sein.

beschrieben Cox1p [DECOSTER et al. 1993]. Die Autoren zeigten die Kontrolle dieses Spleißvorgangs durch *MSS1*. Das Spleißen der *COX1*-mRNA war in *mss1*-Mutanten blockiert und verursachte einen kompletten Verlust von Cox1p. Das *MSS1*-Transkript war sowohl in der G₈₁- als auch in den *upf123*⁻-Studie angereichert.

Ungenügendes Spleißen von Genen des mitochondrialen Genoms kann dessen Stabilität negativ beeinflussen. In diesen Kontext passt, dass das G₈₁-Suppressorgen *YHM2*, von dem eine Stabilisierung der mtDNA bekannt ist, als herunterregulierte RNA in den verschiedenen Genchipanalysen von *upfΔ*-, *xrn1Δ*-Mutanten und von G₈₁ gefunden wurde.

Zwei der Gene mit mitochondrialen Funktionen aus Tabelle 6.1 sind direkte Substrate für NMD. Die *PET130*-mRNA enthält ein uORF-Cluster mit den bei [HE et al. 2003] beschriebenen Eigenschaften. Das Gen *CAT2* wurde als Pseudogen eingruppiert.

Neben der Funktion von *UPF1* im NMD-Abbauweg gibt es eine weitere Verknüpfung des Gens mit mitochondrialen Vorgängen, beinhaltet doch der erste bekannt gewordene Phänotyp von *upfΔ*-Mutanten eine herabgesetzte mitochondriale Atmungsfähigkeit [ALTAMURA et al. 1992]. Das *UPF1*-Gen war ursprünglich als *NAM7* in einem Screeningansatz zur Suche nach Multicopy-

Suppressoren der mitochondrialen Spleißdefizienz (MSD), die bei cis-dominanten mitochondrialen intronischen Mutationen auftrat [ALTAMURA et al. 1992], isoliert worden. Diese Beeinträchtigung blieb auch in Stämmen erhalten, die intronfreie mitochondriale DNA trugen, was zeigte, dass die Mitwirkung an mitochondrialen Spleißprozessen nicht die Hauptfunktion des Proteins bei der Generierung eines atmungsdefizienten Phänotyps sein konnte. In einer aktuelleren Studie wurde gezeigt, dass nur Upf1p als Suppressor der Spleißeffizienz fungiert und nicht der Aktivität von *UPF2* oder *UPF3* bedarf [DE PINTO et al. 2004]. Die Autoren zeigten auch, dass es sich um einen indirekten Effekt handelt.

Upf1p selbst wurde nicht im Mitochondrium detektiert. Jedoch befindet es sich auf dem Chromosom direkt stromaufwärts in unmittelbarer Nähe zu *ISF1*, einem Faktor, der in der Mitochondrien-Biogenese involviert ist. Seine Genfunktion komplementierte einen Ausfall der Gene *HAP2*, *HAP3* und *HAP4*, transkriptionelle Aktivatoren des Sauerstoff-abhängigen Metabolismus und der Mitochondrien-Biogenese. Bei Ausschaltung des Gens *HAP1*, welches auch als Aktivator von *HYP2* und *CYC7* fungiert [ZITOMER und LOWRY 1992], kam es zu einer drei- bis vierfachen Anreicherung der *UPF1*-mRNA und gleichzeitig zur Bildung eines *ISF1-UPF1*-Kotranskriptes. Dabei ist von Interesse, dass das *UPF1*-Transkript selbst einen u-Openreading-Frame nach HE von ca. 260 Condons enthält, der in den ersten zehn Codons mit der codierenden Sequenz von *UPF1* überlappt [ALTAMURA et al. 1997].

Gen	ORF	Lage
<i>ARN1</i>	YHL040C	tel
<i>ARN2</i>	YHL047C	tel
<i>ARN3/SIT1</i>	YEL065W	tel
<i>ARN4/ENB1</i>	YOL158C	tel
<i>FIT1</i>	YDR534C	tel
<i>FIT2</i>	YOR382W	tel
<i>FIT3</i>	YOR383C	tel
<i>FRE1</i>	YLR214W	nicht tel
<i>FRE2</i>	YKL220C	tel
<i>FRE3</i>	YOR381W	tel
<i>FRE4</i>	YNR060W	tel
<i>FRE5</i>	YOR384W	tel
<i>FRE6</i>	YLL051C	tel
<i>FTR1</i>	YER145C	nicht tel
<i>FET3</i>	YMR058W	nicht tel
<i>FET4</i>	YMR319C	tel
<i>AFT2</i>	YPL202C	nicht tel

Tabelle 6.2: HDOA-akkumulierende mRNAs mit Funktionen bei der Eisen-Siderophoraufnahme. tel = subtelomerisch codiert

Zellen durch zwei deutlich abgegrenzte hoch affine Systeme [YUN et al. 2000]: Ein redukti-

In Mitochondrienfraktionen der Mutante G₈₁ wurde eine stark abgeschwächte cytochromale Braunfärbung festgestellt. Da die Färbung durch Fe³⁺-Ionen in der Hämgruppenumgebung mit hervorgerufen wird, war ein stark abgeschwächter Eisengehalt in der Mutante wahrscheinlich. Dies würde direkt in starkem Ausmaß die Funktion mitochondrialer Atmungsketten-Komplexe, in welchen viel chelatisiertes Eisen bzw. Kupfer enthalten ist, beeinflussen und zur Atmungsdefizienz synergistisch beitragen. Eine starke Abschwächung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ ist bei der Mutante in dieser Arbeit nachgewiesen worden (vgl. Kapitel 5.1.8.1, Seite 105).

Gene, die im Zusammenhang mit der Eisenaufnahme über Siderophore⁶ stehen, erwiesen sich in der HDOA-Analyse überrepräsentativ angereichert. Wie Tabelle 6.2 auflistet, sind Gene des gesamten Eisenaufnahmesystems betroffen. Siderophor gebundenes Eisen gelangt in Fungi-

⁶Als Siderophore werden kleine Metallionen-komplexierende Verbindungen bezeichnet, die von Hefezellen und anderen Einzellern in das sie umgebende Medium abgegeben werden und für die Zelle essentielle Metallionen chelatisieren. Hefezellen besitzen in der Plasmamembran spezielle Siderophor-Transporter, welche dann die Aufnahme der komplexierten Metalle vermitteln.

ves System funktioniert über die Plasma-Membran gebundenen Metalloreduktasen der *FRE*-Gene und transportiert reduziertes Eisen über den hoch affinen Eisentransportkomplex, der aus der Multi-Kupfer-Oxidase Fet3p und der Permease Ftr1p besteht [[ASKWITH et al. 1994]; [STEARMAN et al. 1996]].

Das nicht reduktive System hängt von den vier Transportproteinen Arn1p-Arn4p ab, die speziell Siderophor-Eisenchelate erkennen. Die Aufnahme von Siderophor-gebundenem Eisen wird auch durch die Zellwand-Mannoproteine Fit1p-Fit4p vermittelt, die die Menge des mit der Zellwand assoziierten Eisens erhöhen können [PROTCHENKO et al. 2001]. Alle aufgeführten Gene sind transkriptionell kontrolliert durch Aft1p, dem eisenabhängigen Haupt-Transkriptionsfaktor in Hefe [YAMAGUCHI-IWAI et al. 1996]. Der zweite eisenabhängige Transkriptionsfaktor Aft2p betrifft die Zellantwort auf Eisenmangel [BLAISEAU et al. 2001]. Die *AFT2*-mRNA war im Gegensatz zu der von *AFT1* in den G_{81} und *xrn1Δ*-Genchipstudien angereichert.

Aus den Daten ist ersichtlich, dass die Eisenaufnahme in Hefe eine Regulationskomponente durch den 5'-3'-mRNA-Abbauweg und durch Hypp besitzt. Viele der durch die *AFT*-Faktoren regulierten Gene sind subtelomerisch codiert. Dies betrifft alle *ARN* und viele der *FRE* und *FIT*-Gene. Einige der *FRE*-Gene enthalten zudem die oben angesprochenen uORF-Cluster. Demnach könnte die Regulation der Gene über NMD von direkter und indirekter Art über die Steuerung des telomeren Positionseffektes erfolgen.

Evident ist auch, dass eine mitochondriale Atmungsdefizienz vielfache Ursachen haben kann, die über die oben angesprochenen Aspekte hinaus gehen. So erzeugt z.B. auch der Ausfall der *EST1*-Funktion einen Atmungsdefekt. Alle Indizien zusammen implizieren jedoch, dass eine Defizienz des NMD-Weges vermittelt durch eine fehlerhafte Hypp-Funktion durchaus die in G_{81} beobachtete Atmungsdefizienz zu großen Teilen mitverursachen kann.

6.6 Weitere Funktionen Hypps neben NMD

Bei Ausschaltung des NMD-Weges wird ebenfalls eine mitochondriale Atmungsdefizienz erzeugt ([DE PINTO et al. 2004]; [HE et al. 2003]). Anhand des Mengenvergleiches der herunterregulierten mRNAs aus *upfΔ*-, *xrn1Δ*-Mutanten und aus G_{81} ist erkennbar, dass die mitochondriale Dysfunktion bei Ausschaltung des 5'-3'-Abbauweges deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei beeinträchtigter Hypp-Funktion. Im Vergleich zu *xrn1*-Stämmen lag die Anzahl mitochondrialer und anderer abgereicherter Transkripte doppelt so hoch. Daraus ist ablesbar, dass Hypp neben einer Funktion im 5'-3'-Abbauweg weitere Funktionen innehat. Dafür spricht zunächst, dass der Knockout der Hypusinfunktion einen lethalen Phänotyp in allen eukaryontischen Systemen erzeugt. Dagegen wirkt die Deaktivierung eines jeden der drei *UPF*-Gene nicht lethal. Auch die *XRNI*-Funktion ist nicht essentiell für das Überleben der Hefezelle [JOHNSON und KOLODNER 1995]. Erst die Ausschaltung von *XRNI* in Kombination mit *SKI2*, dessen Proteinprodukt antivirale Eigenschaften besitzt und die Translation von nicht-Poly-A-tragenden mRNAs blockiert, führt zu einem synthetischen Zellzyklusarrest in der späten G_1 -Phase, wie er auch ganz ähnlich bei der Ausschaltung der Hypp-Funktion ausgelöst wird, z.B. in G_{81} -Zellen bei 37°C.

Auch das Vorhandensein von funktionell verwandten Transkript-Untergruppen und einzelnen Transkripten, die ausschließlich in G_{81} akkumulierten (vgl. Tabelle Anhang), jedoch nicht in Mutanten mit ausgeschaltetem 5'-3'-Abbauweg, deuten auf zusätzliche Funktionen des Hypps hin. Dies betrifft z.B. eine Gruppe von Hexose-Transportproteinen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind (*HXT1- HXT4*). Ein anderes Beispiel bieten einige Gene der *STE*-Gruppe, die an der Paarungstyp-Signalkaskade (Pheromon induzierte Kaskade) sowie an der Etablierung der Paarungstypen beteiligt sind. Darunter der α -Faktor-Rezeptor *STE2*, der auch im Zusammenhang mit stillem Chromatin an *HML*- und *HMR*-Loci steht sowie *STE5*, *STE6* und *STE20*. Ste20p ist elementarer Bestandteil von drei (der vier) MAPK-Signalwegen in Hefe mit Ausnahme des PKC-Zellwandintegritätsweges, darunter die Pheromon-, Hyperosmolaritäts- und die durch filamentöses Wachstum induzierte Kaskade [ROBERTS et al. 2000]. Von der Pheromon-induzierten Signalkaskade wird auch *FAR1* gesteuert, das nur in G_{81} reproduzierbar akkumulierte und als G_1 -Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor einen Zellzyklus-Arrest am G_1 -Kontrollpunkt steuern kann [FU et al. 2003].

Auffallend war das Expressionsverhalten von allen Serin-(AGA)-tRNAs (siehe Abbildung 5.42). Im Gegensatz zu anderen Serin-triplet-tRNAs besaßen sieben Vertreter dieser Gruppe die stärkste Expressionsrate aller tRNAs im Transkriptom von G_{81} . An beiden *HYP*-Loci finden sich Serin-(AGA)-tRNAs unmittelbar stromaufwärts benachbart zu den ORFs beider *HYP*-Gene. Im Falle von *HYP2* auf Chromosom V ist es ts(AGA)E, im Falle von *HYP1* (Chromosom X) handelt es sich um ts(AGA)J, welche die höchsten Expressionsraten aufwiesen. Außerdem liegt *CYC7* [KANG et al. 1992] in der Nähe von *HYP2*, während sich *CYC1* nahe bei *HYP1* befindet. Diese für unterschiedliche Iso-Formen des Cytochrom-c codierenden Gene sind in Abhängigkeit von Sauerstoff bzw. Häm reziprok reguliert. *HYP1* selbst wird durch Häm und Sauerstoff reprimiert. Daher wird die *HYP1*-Expression als Indikator für anaerobes Wachstum der Bäckerhefe genutzt. *HYP2* ist dagegen aerob kontrolliert [ZITOMER und LOWRY 1992], ist aber auch bei Sauerstoffmangel aktiv [WÖHL 1994]. Diese unterschiedliche Kontrolle der *HYP*-Gene durch Sauerstoff und die stark ausgeprägte mitochondriale Atmungsdefizienz in G_{81} , in der beide *HYP*-Loci disruptiert sind, lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen der chromosomalen Lage von *HYP* benachbarten Genen und der Funktion *HYPs* gibt. Eine Kopplung von nah beieinander codierten Genen ist in der Genetik ein oft beobachtetes Phänomen. Für eine Genkopplung spricht auch die Lokalisation des *MCM3*-Genes, welches sich direkt benachbart zu ts(AGA)E und *HYP2* befindet und, wie vorher beschrieben, am Telomer-Silencing und der Einleitung der Replikation beteiligt ist. Das S-Phasen-relevante Gen *TAH11* liegt direkt benachbart zu ts(AGA)J am *HYP1*-Locus. Zu klären bleibt, ob es sich bei der Ähnlichkeit der beiden *HYP*-Loci wirklich nur um eine Duplikation eines größeren DNA-Abschnittes handelt [KANG et al. 1992], oder ob die Sicherstellung der Hypp-Funktion bei aeroben und anaeroben Bedingungen zugleich der Funktion der benachbarten Gene bedarf.

6.7 Keine Wachstumsverbesserung bei G₈₁ durch Sorbitol

In einer Studie, die drei mutierte Allele von *HYP2* untersuchte [VALENTINI et al. 2002], wurden *PKC1*, Schlüsselkinase in der Signalkaskade zur Steuerung der Zellwand-Integrität, und die stromaufwärts von *PKC1* agierenden Regulatoren *WSC1*, *WSC2* und *WSC3* als Multicopy-Suppressoren der dort beobachteten Hochtemperatur-Phänotypen gefunden. Dies deutete auf eine Verbindung zwischen Hyp2p und einem Stressantwortweg hin, der den Erhalt der Zellwand-Integrität mit beeinflusst. Der Pkc1-Signalweg wird durch hypotonischen Schock und Hitzeschock aktiviert. Es gibt auch Hinweise auf Mitbeeinflussung des Zellzyklus und der Zellwandbiogenese [POSAS et al. 1998]; [PEREZ und CALONGE 2002]. In der Studie von VALENTINI et al. erhöhte der Zusatz von Sorbitol als osmotischer Stabilisator signifikant die Fähigkeit der *ts-HYP2*-Mutanten zum Wachstum bei 37°C.

Im Gegensatz dazu zeigten Hefestämme, die die Mutante G₈₁ des humanen *HYP* in dem vorliegenden Stammhintergrund (pRSG313-Plasmid, *GAL*-Promotor) als einzige *HYP*-Gen-Quelle exprimierten, bei Zusatz von osmotischem Stabilisator kein verbessertes Wachstum bei restriktiver Temperatur. Die Wachstumsarretierung fand uneingeschränkt statt, was verdeutlicht, dass in G₈₁ neben einer eventuellen Beeinträchtigung des *PKC1*-Signalweges andere wachstumskritische Funktionen gestört vorliegen müssen. Auch zeigt dies, dass die Punktmutation des Restes V₈₁ gegen G₈₁ im humanen Protein heterolog in Hefe exprimiert einen temperatursensitiven Phänotyp erzeugt, der sich qualitativ von dem durch P₈₂S im hefeeigenen Hyp2p hervorgerufenen unterscheidet.

In der HDOA-Analyse zeigte keine der mRNAs der vier oben genannten Gene eine Anreicherung in der Mutante. Von den Genen der *PKC1*-Signalkaskade zeigte lediglich der Transkriptionsfaktor *RLM1* am Ende der Kaskade eine Akkumulation in G₈₁ und *xrn1Δ*-Stämmen und könnte vom 5'-3'-RNA-Abbau mitbeeinflusst sein. Im Gegensatz zu NMD-Knockout-Hefestämmen war in G₈₁ das mRNA-Level der *WSC4*-mRNA signifikant erhöht, was die Möglichkeit einer potentiellen Regulation dieses Gens durch Hypp unabhängig von NMD anzeigt.

Inwieweit posttranslationale Regulationsmechanismen der Hypusinsynthese im Hypp durch Deoxyhypusinsynthase, welche durch Pkc1p phosphoryliert wird [KANG et al. 2002a], die Funktion des Proteins steuern, müssen weitere Studien am Hypusin enthaltenden Protein klären.

Interessant aus der Sicht der Ergebnisse dieser Arbeit ist die Tatsache, dass *PKC1* selbst ein subtelomerisch kodiertes Gen ist. Die drei *WSC*-Gene (1-3) liegen alle chromosomal in unmittelbarer Nähe zu Ty-LTRs und für tRNA-codierende Sequenzen. Demnach könnten chromatinsteuernde Mechanismen, an denen NMD nachweislich beteiligt ist und daher potentiell auch die Hypp-Funktion, ebenfalls an der Steuerung der PKC-Kaskade beteiligt sein.

6.8 Apoptisches Verhalten bei arretierten G₈₁-Zellen

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass es auch im System eines niederen Eukaryonten wie Bäckerhefe, deren Fähigkeit zum programmierten Zelltod in zahlreichen Studien belegt ist (z.B. [MADEO et al. 1999]; [FROEHLICH und MADEO 2000]), bei Einschränkung der Hypp-Funktion wie in G₈₁-Zellen bei restriktiver Temperatur zur Auslösung von Apoptose

kommt. Dies war ableitbar aus der stark herabgesetzten Viabilität der Zellen bei 37°C und aus dem positiven Testergebnissen auf DNA-Doppelstrangbrüche (TUNEL-Assay) bei arretierten G₈₁-Zellen. Die Zellkernmorphologie überprüft durch DAPI-Fluoreszenzfärbung und Elektronenmikroskopie wies deutliche Veränderungen der Chromatinverteilung und Struktur auf, die mit Chromatin-Marginierungs-Prozessen bei Apoptose korrelieren können. Dieser Phänotyp weist starke Ähnlichkeit zu *Schizosaccharomyces pombe*-Zellen auf, welche durch eine *spe2*-Disruption der Fähigkeit zur Spermidin-Produktion beraubt wurden [CHATTOPADHYAY et al. 2002]. Diese Zellen zeigten auch eine stark verlängerte G₁-Phase des Zellzyklus. Diese Beobachtungen unter Einbeziehung weiterer Daten zur Zellzyklus-Arretierung bei defizienter Hypp-Funktion lassen folgern, dass beide Vorgänge, Zellzyklus-Arrest und Apoptose einander bedingende Abläufe sein könnten.

Aus dieser Sicht bestätigen die apoptotischen Beobachtungen in G₈₁-Zellen bei Hitzeschock Aussagen über die Wirkung Hypps als antiapoptotisches Protein. Die Messung der deutlich verringerten Protein- und mRNA-Expression des Gens *HSP26* in der Mutante bei restriktiver Temperatur hat eine Beeinträchtigung bzw. Ausbleiben der Hitzeschockantwort bestätigt, die ebenfalls einen programmierten Zelltod zur Folge haben kann. Hitzeschock ist ein Aktivator des Pkc1p-Signalweges [POSAS et al. 1998]. Mit den Hinweisen über mögliche Verknüpfungen Hypps mit diesem Weg über die Phosphorylierung von Deoxyhypusinsynthase durch Pkc1p (s.o.) ist die Beeinflussung der Hitzeschockantwort auf diese Weise diskutierbar. In Bäckerhefe ist auch eine regulatorische Verknüpfung des sog. „initiationsgesteuerten“ mRNA-Abbauweges mit den mRNAs einiger Hitzeschockproteine aus der Hsp90- und Hsp70-Familie gezeigt worden [HEIKKINEN et al. 2003]. Dieser spezielle mRNA-Abbauweg benötigt auch Upf1p und Upf2p sowie Dcp1p und Xrn1p, also den NMD-Abbauweg.

Das apoptotische Verhalten von G₈₁ bei 37°C belegt, dass es einen oder mehrere Wege der Apoptosis-Auslösung durch eine ausgeschaltete Hypusin-Funktion geben muss, die konserviert von niederen bis zu hoch entwickelten Eukaryonten vorliegen. Dies korreliert mit der Konserviertheit des Hypusin enthaltenden Proteins selbst und auch mit der Konserviertheit des NMD-Abbauweges (s. unten, Abschnitt 6.11, S. 189).

6.9 Die Proteininteraktion mit dem Hüllenprotein des L-A-Virus

Die Funktion des N-terminal GST-getaggten Hyp2-Proteins, welches die Grundlage der Affinitätsstudie bildete, war *in vivo* auf jeden Fall gegeben. Dies bewies die Fähigkeit des Fusionsproteins, die Hypp-Funktion in einem Hefestamm, in dem beide endogene *HYP*-Gene inaktiviert worden waren, uneingeschränkt zu übernehmen.

Es ist bekannt, dass die Überexpression Hypps in Hefe nur zu einer Teilhypusinylierung des Proteins führt. Dies wurde jedoch für diese Studie billigend in Kauf genommen.

Da die gefundene Interaktion Hypps mit dem Hüllenprotein des L-A-Virus auch bei einer GST-Hyp2p-I₅₁-Punktmutante, die keine Hypusinbildung erfährt, gefunden wurde, ergibt sich die Unabhängigkeit der Interaktion von der posttranslationalen Modifikation. Diese Beobachtung ist vereinbar mit der Postulierung, dass Hypp ein multimodulares Protein sein könnte, welches gleichzeitig sowohl RNA als auch andere Proteine bindet [YAO et al. 2003]

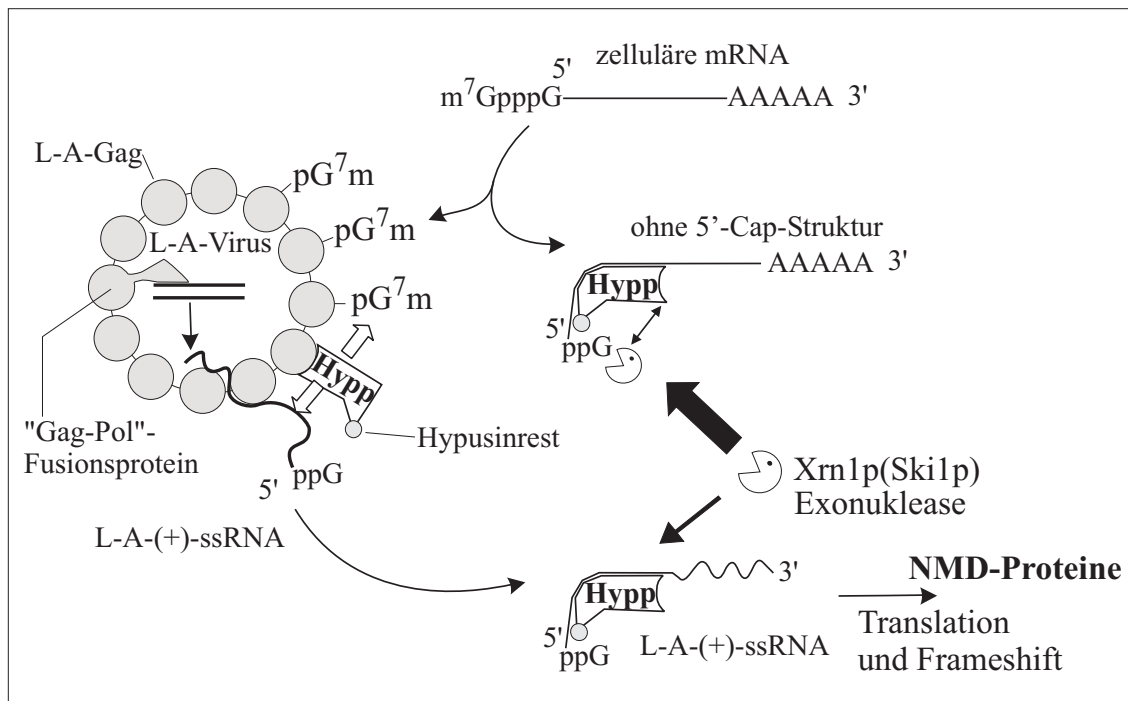


Abbildung 6.4: Mögliches Modell für die Interaktion Hypps mit dem Hüllenprotein des L-A-Virus. Hypps Rolle kann sowohl in der Unterstützung des L-A-Gag bei dessen Aktivität zur 5'-Cap-Abspaltung von zellulären mRNAs bestehen als auch in einer Kofaktoraktivität für die Exoribonuklease Xrn1p. Ebenso ist eine Rolle beim Transport und/oder bei der Translation der L-A-RNA denkbar, die selbst kein 5'-Cap trägt.

und dass die Hypusin-Modifikation als stark basische Aminosäure mit der hochkonservierten basischen Sequenz um sie herum eher ein RNA- als ein Protein-Bindungsmotiv darstellt.

L-A ist ein doppelsträngiges RNA-Virus (dsRNA-Virus), das sich ausschließlich in *Saccharomyces cerevisiae* vermehrt. Die doppelsträngige RNA codiert für das majore Hüllenprotein (GagSCLAp, 76 kDa) und das minore Gag-Pol-Fusionsprotein (ca. 180 kDa). Das komplette Virus besitzt ikosahedrale Symmetrie, wobei die Hülle aus einer Einzelschicht von 60 Gag-Dimeren gebildet wird [WICKNER 1996]. Die beiden Virus-ORFs überlappen in einem Bereich von 130 Basen-Paaren. Für die Bildung des Gag-Pol-Fusionsproteins, welches die Verdopplung einzelsträngiger viraler RNA katalysiert, ist ein -1-translatonaler Frameshift erforderlich.

MASISON et al. haben gezeigt, dass das Gag von L-A sowohl *in vitro* als auch *in vivo* kovalent an das m^7G -Nukleotid von 5'-Cap-tragenden mRNAs bindet. Sie zeigten durch Messung des Killer-Toxin-Levels und der Toxinproduktion ausgehend von M_1 , einer Satelliten-dsRNA von L-A, welche für ein Killertoxin-Protein codiert, dass diese Aktivität für die Expression viraler Information notwendig ist [MASISON et al. 1995]. Durch Ausschaltung von *XRN1* war die 5'-Cap-Bindungseigenschaft von Gag nicht mehr zu beobachten. Die Autoren bewiesen, dass das L-A-Virus selbst Cap-lose mRNAs im Überschuss produziert, um die 5'→3'-Exonuklease Xrn1p auszutitrieren, welche spezifisch 5'-Cap⁻-RNA abbaut. Durch diese Ausschaltung des RNA-Abbausystems wird es dem Virus ermöglicht, seine eigene kein 5'-Cap-tragende und kein Poly-A-3'-Ende besitzende einzelsträngige RNA vor zu starker Degradation zu schützen und ihre für Gag-Pol codierende Sequenz an cytosolischen Ribosomen zur Translation zu bringen.

Mit Blick auf die Funktionseinschränkung des Xrn1p-abhängigen 5'-3'-mRNA-Abbaus in G_{81} deutet die Proteininteraktion auf eine Funktion Hypps im Cytoplasma in Verbindung mit

der Xrn1p-Funktion. Das GagSCLAp ist wie oben beschrieben ein 5'-Cap-Abspaltungsenzym, das 5'-Cap-Gruppen an sich selbst bindet. Somit könnte Hypp auch Kofaktor dieser enzymatischen Reaktion sein.

ZUK et al. belegten die Anreicherung von mRNA ohne 5'-Cap-Struktur in der ts-Hyp2p-Mutante ts1159 bei 37°C und postulierten eine Funktion stromabwärts der 5'-Cap-Abspaltung im RNA-Abbau. Als Bestätigung dieser Schlußfolgerung wird in dieser Arbeit als Hypothese vorgeschlagen, dass Hypp ein Protein mit Bindungseigenschaft an mRNA ohne 5'-Cap sein könnte (vgl. Abb. 6.4) und dass diese Eigenschaft für die 5'-Cap-Abspaltungsaktivität des Gag-SCLAp notwendig sein könnte. Die Eigenschaft Hypps, mRNA ohne 5'-Cap-Struktur zu binden, wäre noch zu beweisen.

Denkbar in diesem Zusammenhang ist auch eine Rolle bei der Stabilisierung oder der Translation der viralen Einzelstrang-RNA des Virus, die kein 5'-Cap besitzt. In diesem Zusammenhang muss beachtet werden, dass die L-A-virale RNA selbst zu einer potentiellen Zielmolekülgruppe für den NMD-Weg gehört, da zur Translation des Gag und des Gag-Pol-Fusionsproteins ein -1-Frameshift erforderlich ist. Sowohl +1- als auch -1-Frameshift-mRNAs werden als Substrate des NMD-Abbauweges diskutiert. Für +1-Leserahmenverschiebungen ist dies aus den genomweiten Analysen von *upfΔ*-, *dcp1Δ*- und *xrn1Δ*-Mutanten deutlich geworden [HE et al. 2003]. Früh wurde Upf3p mit +1-Leserahmenverschiebungen in Verbindung gebracht [[RUIZ et al. 1998]; [DINMAN et al. 2000]]. Die Bezeichnung der drei Upf-Proteine als „up frameshift proteins (UPF)“ zeigt dies an.

Einen Hinweis auf die Beteiligung von NMD an -1-Leserahmenverschiebungen gab die Identifizierung von *UPF1* als eines von neun *MOF*-Allelen („maintenance of frame“). So erhöhten *UPF1*-Mutanten die Effizienz des -1-ribosomalen Frameshiftings des L-A-Virus und führten zum Verlust des M1-L-A-Satelliten-Virus [CUI et al. 1996]. Somit ist eine Beteiligung Hypps neben einer Rolle in NMD auch an ribosomalen Frameshift-Ereignissen viraler RNAs denkbar.

Eine direkte Verbindung zwischen Polyaminen und +1-ribosomalen Frameshifts wurde bereits 1994 gezeigt. Hefe-Mutanten, die nicht zur Spermidin-Synthese durch eine Disruption im *SPE2*-Gen fähig waren, wiesen eine erhöhte +1-Frameshift-, jedoch keine erhöhte -1-Frameshift-Effizienz auf. Daneben wurde eine deutliche Abnahme der Ty1-Retrotransposition festgestellt [BALASUNDARAM et al. 1994b], ein Ergebnis, das in dieselbe Richtung weist wie die Anreicherung retrotransposabler RNA in G₈₁.

Für eine mögliche Funktion bei Frameshift-Ereignissen spricht auch die Auffindung des ribosomalen Proteins L5 als Bindungspartner Hypps in Bäckerhefe [YOUNG 1998] und höheren Eukaryonten [SCHATZ et al. 1998]. L5 stellt eine zentrale Komponente des 5S-rRNA-Export-Systems dar. Die 5S-rRNA wiederum ist an +1- und -1-Frameshift-Ereignissen und der Erhaltung des Leserahmens während Translationsvorgängen beteiligt [DINMAN und WICKNER 1995]. Die gezielte Mutierung des L5-Proteins löste erhöhte Frameshifting-Effizienzen in beide Richtungen (+1 und -1) aus, erniedrigte die Ty1-Retrotranspositionsrate und verhinderte die Reifung des L-A-M1-Virus [MESKAUSKAS und DINMAN 2001]. Die Autoren sehen L5 als Helferprotein, welches Peptidyl-tRNA an der ribosomalen P-Bindungsstelle verankert.

Eine Beteiligung an Leserahmenverschiebungen bringt Hypp auch mit Translations-Elon-

gationsabläufen in Verbindung. In einer 2D-Gel-Studie zur Wirkung der Hypusinsynthese-Inhibitoren GC-7 und Mimosin in *Saccharomyces cerevisiae*, die in unserem Arbeitskreis mit dem Hefestamm WDHyp2Gal (trägt die Doppeldisruption beider *HYP*-Gene und das komplementierende Single-Copy-Plasmid pRSG313*HYP2*) als Ausgangsstamm durchgeführt wurde [VON ZYCHLINSKI 2001], konnte in beiden Fällen bereits nach 2 Stunden eine starke Proteinabnahme für EF-1 α , dem eukaryontischen Translations-Elongationsfaktor 1, beobachtet werden. Auch EF-1 α wird mit Leserahmenverschiebungen in Verbindung gebracht. Bestimmte mutierte Allele des Faktors zeigten erhöhte +1- und -1-Frameshift-Effizienzen und eine herabgesetzte Fähigkeit, den „Killer-Phänotyp“ des M1-Satelliten-Virus von L-A zu erhalten [DINMAN und KINZY 1997]. Ferner zeigt das L-A-antivirale Protein Ski7p Motivähnlichkeiten zu EF-1 α . Eine Überexpression reprimierte die Expression von nicht-polyadenylierter RNA und damit der L-A-viralen RNA. Die Gruppe der *SKI*-Gene wurde nach der Ausbildung eines „Superkiller-Phänotyps“ bei Mutierung eines der Gene *SKI1-8* benannt. Das Gen *SKI1* ist identisch mit *XRNI* und Doppeldisruptanten von *XRNI+SKI2* bzw. *XRNI+SKI7* führen zu temperatursensitiven Phänotypen und Arretierungen des Zellzyklus am G₁-Kontrollpunkt ähnlich zum ts-Phänotyp von G₈₁ [BENARD et al. 1999].

Aus den Ergebnissen von [MASISON et al. 1995] geht eine Interaktion des Gag-SCLAp mit normaler zellulärer mRNA, deren 5'-Cap es an sich bindet, hervor. In diesem Zusammenhang ist auch denkbar, dass die gefundene Interaktion Hypps mit Gag-SCLAp von indirekter Natur sein könnte, indem Gag mRNA bindet, die wiederum an Hypp gebunden ist. Als nächster Schritt wäre demnach zu überprüfen, ob die gesehene Interaktion auch bei völligem Fehlen von RNA auftritt. Träfe dies nicht zu, würde das gefundene Ergebnis immer noch die direkte Interaktion Hypps mit zellulärer mRNA *in vivo* beweisen und würde mit anderen Ergebnissen dieser Arbeit im Einklang stehen.

6.10 Direkte Suche nach mit Hypp interagierenden mRNA-Molekülen

Im Rahmen dieser Arbeit auch versucht, direkte *in vivo* RNA-Bindungspartner Hypps durch ein Affinitätschromatographisches Verfahren zu finden und so die gefundenen Ergebnisse der Genchipstudie durch eine direkte Methode zu überprüfen. Die beschriebenen Ergebnisse aus der Phänotypisierung der Mutante G₈₁ und der Proteininteraktion mit dem dsRNA-Virus-Hüllenprotein GagSCLAp sowie zahlreiche veröffentlichte Studien zum Hypusin enthaltenden Protein deuten auf eine Interaktion des Proteins mit RNA oder mRNA hin. Es liegen kaum Daten über die RNA-Interaktionspartner von RNA-bindenden Proteinen vor, da diese Analytik im RNA-Bereich als nach wie vor technisch schwierig gilt. In dieser Arbeit kam ein Verfahren zum Einsatz, dass die Affinitätschromatographie mit einem Differential-Display-Ansatz verbindet. Das Verfahren wurde als SNAAP („specific nucleic acids associated with proteins“) bezeichnet und wurde 1999 veröffentlicht [TRIFILLIS et al. 1999]. Im Affinitätsschritt wurden RNA-Gesamtextrakte mit den verschiedenen gereinigten GST-Hypp-Fusionsproteinen sowie mit GST (hefeexprimiert) als Negativkontrolle inkubiert, die entstehenden Protein-RNA-Komplexe RNA-optimiert gereinigt und der reversen Transkription zugeführt. Um die Komplexität des DNA-Primärstranggemisches nach der reversen Transkription zu verringern, wurde

konform nach der Differential-Display-Methode die PCR mit einem von vier möglichen Poly-T-3'-Primern und simultan mit vier 5'-Primern, die zufällige Sequenzen besitzen, durchgeführt. Die Polyacrylamidgele zur Auftrennung der amplifizierten Banden verdeutlichten, dass differentiell amplifizierte Banden im Vergleich zur Negativkontrolle (Bindung an unfusioniertes GST-Protein) sichtbar und reproduzierbar waren.

Wie im Fall der Protein-Proteininteraktion wurden gleiche RNA-Bindungspartner bei den drei eingesetzten GST-Hyp2-Fusionsproteinen unabhängig von der Hypusinmodifikation gefunden. Bisher ist nicht eindeutig erwiesen, ob der Hypusinrest für eine spezifische RNA-Interaktion Hypps unbedingt notwendig ist, wie von [LIU et al. 1997] hypothetisiert. Die Versuche mit rekombinant in *E. coli* exprimierten Hypp-GST-Fusionsproteinen bei der Komplexbildung mit Rev-Protein und der HIV-1-RRE-RNA [BEVEC et al. 1996] deuteten hingegen darauf hin, dass auch unmodifiziertes Protein RNA-Bindungseigenschaften besitzt.

Die vorläufige SNAAP-Analyse erbrachte drei ORFs mit unbekanntem Funktionen (YPL201C, YKL097C, YHR173C). Die Kopienzahlen der gefundenen Transkripte (vgl. Tabelle 5.26, Seite 156 [HOLSTEGE et al. 1998]) zeigen, dass es sich in allen drei Fällen um ORFs mit niedriger transkriptionaler Frequentierung und demnach um mRNAs mit kleinen Kopienzahlen in der Zelle handelte.

Im Fall von YHR173C ist auch eine Bindung von *SPC97* (liegt auf dem komplementären DNA-Strang), möglich, da dessen codierende Sequenz am 3'-Ende mit dem 5'-Ende von YHR173C überlappt. *SPC97* ist Teil des γ -Tubulinkomplexes, der in der G₁-Phase benötigt wird. In der sich durch Teilung vermehrenden Hefe zeigen *spc97*-Mutanten Lethalität vor Eintreten in die S-Phase [VARDY und TODA 2000]. Das Gen ist daher für Zellzyklus-Steuerung am G₁-Kontrollpunkt relevant. Zur genaueren Charakterisierung der gefundenen Interaktionen sind weitere Versuche notwendig.

YPL201C wurde auch in den HDOA-Studien von G₈₁- und *upf* Δ -Mutantenstämmen als akkumulierende mRNA gefunden, was die Möglichkeit eröffnet, dass Hypp in seinem Eingreifen in den 5'-3'-mRNA-Abbauweg direkt mit NMD-Substraten interagieren könnte. Zu YPL201C liegt auf dem Chromosom das Gen *AFT2* 5'-benachbart. Es handelt sich um den generellen Transkriptionsfaktor des Eisen-Metabolismus, der deutliche mRNA-Anreicherung in G₈₁ zeigte.

Auch die 5'- und 3'-Nachbargene von YKL097C zeigen Verbindungen zum Genchip. YKL098W fand sich reproduzierbar hochreguliert in den HDOA-Analysen von G₈₁ und von *UPF*⁻-Mutanten. Die *CWP*-Gene waren unerwartet nicht angereichert in der G₈₁-HDOA-Studie im Gegensatz zu vielen anderen Genen, die für Zellwand-Manno-Proteine codieren. Inwieweit die Funktionen der benachbarten Gene jedoch wirklich zusammenhängen, mag Gegenstand weiterer Studien sein.

Bandenverschiebungsexperimente der radioaktiv markierten mRNAs mit rekombinantem Hypp könnten die mRNA-Protein-Interaktionen verifizieren. Desweiteren sollte überprüft werden, ob die gefundenen mRNAs in der Negativkontrolle (Bindung an unfusioniertes GST-Protein) nicht oder kaum enthalten waren. Dazu müssten die Mengen der entsprechenden cDNAs in den Erststrang-cDNA-Gemischen – gereinigt nach Inkubation mit GST-Hyp2p und GST – getrennt quantifiziert werden, z.B. durch Taqman-Realtime-PCR-Analyse.

6.11 Das gewonnene Bild der funktionellen Zusammenhänge Hypps

Die Studien in dieser Arbeit zur Bestimmung zellfunktionaler Zusammenhänge Hypps in *S. cerevisiae* konnten keine direkten Beweise zur Beteiligung des Proteins an mRNA-Exportvorgängen aus dem Zellkern liefern. Dies bestätigen Ergebnisse von [VALENTINI et al. 2002], die das Protein in Bäckerhefe als prädominant cytoplasmatisch mit einer Anreicherung in der perinuklearen Region sehen. Für ein spezielles Ran-GTP abhängiges Exportin, Exportin 4 [LIPOWSKI et al. 2000], als spezieller Kernexportfaktor für Hypp in höheren Eukaryonten wurde in Bäckerhefe bislang keine homologe Form gefunden. Die Identität des generellen NES-abhängigen Exportrezeptors Crm1p als Exportfaktor für Hypp wurde bis jetzt ebenfalls nur in höheren Eukaryonten gezeigt.

Es wurden Hinweise auf Zusammenhänge mit cytosolischen Funktionen gefunden. Die G₈₁-Genchipstudie zeigt eine Verknüpfung Hypps mit dem 5'-3'-mRNA-Abbauweg, zu dem auch der Nonsense-Codon-mRNA-Abbauweg (NMD) gehört. Die Gruppe der in der Mutante temperaturunabhängig akkumulierenden Transkripte überschneidet sich signifikant mit in der Literatur veröffentlichten Transkriptomen von Mutanten, die ausgeschaltete Komponenten des 5'-3'-mRNA-Abbauweges besitzen. Diese Beobachtungen bestätigen Forschungsergebnisse von [ZUK und JACOBSON 1998], die als erste eine funktionelle Beteiligung Hypps an RNA-Abbauvorgängen postulierten. Ausgehend von der Defizienz des Xrn1p-abhängigen RNA-Abbaus bei beeinträchtigter Hypp-Funktion zeigt diese Arbeit neue Erklärungsmöglichkeiten für phänotypische Beobachtungen an Hypp-defizienten Zellen verschiedener eukaryontischer Spezies, die auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht und in dieser Arbeit bestätigt wurden. Dazu gehören die Zellzyklus-Arretierung am G₁-Kontrollpunkt sowie die in der Mutante nachgewiesene Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen.

Damit ergibt sich zugleich ein partieller Erklärungsansatz für die Verknüpfung Hypps mit der Zellproliferation, in dessen Zusammenhang Hypp eine Steuerungsfunktion 5'-3'-orientierter RNA-Abbauvorgänge eingeräumt werden könnte. Die von einigen Forschern aufgestellte Hypothese, dass Hypp an der Prozessierung einer Untergruppe zellulärer RNAs beteiligt ist [YOUNG 1998], kann demnach dahingehend gedeutet werden, dass es sich bei dieser Gruppe zumindest teilweise um die durch NMD-kontrollierten Transkripte realer Gene und ORFs handeln könnte. Die G₈₁-Genchipstudie bestätigte dabei die durch HE et al. vorgenommene Erweiterung der NMD-Substraklassen um Ty-LTR-Elemente, mRNAs, die +1-Frameshift-Ereignisse benötigen, und um die Klasse der Pseudogene. Die Studie von [HE et al. 2003] hat auch deutlich gemacht, dass durch den Upf- und Xrn1p-abhängigen mRNA-Abbau eine Mehrzahl von mRNAs betroffen sind, die zu den schwächer transkribierten Genen gehören. Dies stützt die Beobachtung, dass Hypp nicht in globalen Translationsprozessen wirkt.

Der Vergleich des Transkriptionsprofils der Hypp-Mutante G₈₁ mit NMD-defizienten Hefestämmen zeigt, dass eine Ausschaltung der Hypp-Funktion einen komplexeren transkriptomischen Phänotyp erzeugt, der sich zum Teil von Disruptanten des 5'-3'-Abbauweges unterscheidet und so auf weitere Funktionen Hypps neben RNA-Abbau hinweist.

Eine dieser Funktionen ist die Involvierung Hypps in apoptotische Vorgänge. Der apoptotische Phänotyp G₈₁-arretierter Zellen weist in diese Richtung und bestätigt Arbeitsergebnisse

an Säugetierzellen, bei denen die Anwendung von Inhibitoren der Hypusinsynthese zu Wachstumsarretierungen und apoptotischem Zellverhalten führte. Gleichzeitig unterstützt das beobachtete apoptotische Verhalten Hypothesen, die Hypp als antiapoptotisches Protein sehen.

Die nachgewiesene Proteininteraktion Hypps mit dem majoren Hüllenprotein des doppelsträngigen RNA-Virus L-A, welches selbst eine mRNA-5'-Cap-Lyase ist, weist auf weitere cytoplasmatische Funktionen Hypps im Bereich der RNA-Prozessierung stromabwärts der 5'-Cap-Abspaltung hin, wie von [ZUK und JACOBSON 1998] postuliert. Ferner deutet dieses Ergebnis auf neue Funktionszusammenhänge Hypps bei der Reifung der hefeeigenen dsRNA-Viren hin. Die Tatsache, dass zur Translation der ssRNA ein -1 -ribosomaler Frameshift notwendig ist, verknüpft die L-A-Proteinexpression mit dem NMD-Abbauweg, dessen Upf-Proteine derzeit als Kofaktoren für $+1$ - und -1 -Leserahmenverschiebungs-Ereignisse diskutiert werden. Vor dem Hintergrund der in der Literatur mehrfach gezeigten Interaktion Hypps mit dem HIV-1-Aktivatorprotein Rev und der Verwandtschaft zwischen der L-A-Prozessierung und der anderer Retroviren ergeben sich Hinweise auf eine Beteiligung des Proteins an retroviralen Reifungsprozessen.

In allen bis heute untersuchten Archaea sind Deoxyhypusin-Synthase und Hypp als hoch konservierte Proteine gefunden worden. Dies lässt vermuten, dass sie dort ähnliche Funktionen wie in höheren Eukaryonten übernehmen. Bei Hemmung des Deoxyhypusinbildungsschrittes zeigen Archaea-Zellen ähnlich wie höhere Eukaryontenzellen eine Arretierung des Zellzyklus [JANSSON et al. 2000]. Die Mechanismen der Transkription und Translation weisen zwischen Archaeen und Eukaryonten starke Gemeinsamkeiten auf. Es wird angenommen, dass sich Eukaryonten aus Archaeen entwickelten, die in Endosymbiose Prokaryonten aufgenommen hatten. Eine Rolle Hypps im RNA-Metabolismus ist mit diesen Fakten vereinbar. Ebenso ist das RNA-Metabolismus-System das am meisten konservierte unter allen zellulären funktionalen Systemen [ANANTHARAMAN et al. 2002].

Da sich die NMD-Helikase Upf1p mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem frühen Vorfahren von Archaea und Eukaryonten entwickelt hat [CULBERTSON und LEEDS 2003], ist im Hinblick auf die hohe Konserviertheit Hypps eine Funktion des Proteins während der evolutiven Entwicklung der RNA-Abbausysteme der Eukaryonten denkbar. Ferner besitzen Archea-Zellen keinen Zellkern. Demnach sollte die Urfunktion des Proteins nicht allein bei mRNA-Zellkernexportprozessen liegen, wie sie bei höheren Eukaryonten beobachtet wurden [ROSORIUS et al. 1999]. Da Prokaryonten kein Hypp besitzen und bei ihnen transkriptionale und translatorische Vorgänge lokal eng beieinander ablaufen, erscheint ein Wirkungsort Hypps im posttranskriptionalen Bereich zwischen Transkription und Translation bzw. im RNA-Metabolismus plausibel.

Der generelle mRNA-Abbau wird in Hefe neben der Tatsache, dass Upf3p und Hrp1p auch im Zellkern lokalisiert sind, überwiegend zu den cytosolischen Funktionen gerechnet. Am RNA-Abbau in höheren Eukaryonten sind – wie sich abzeichnet – wesentlich mehr Gene beteiligt als in Bäckerhefe und RNA-Abbauvorgänge sind hier bereits mit Kernexportvorgängen verknüpft (vgl. Abbildung über den Ablauf des NMD in höheren Eukaryonten, 169). Demnach kann in höheren Eukaryonten Hypps Funktion bei mRNA-Exportvorgängen mit einer konservierteren Rolle als Abbaufaktor vereinbar sein.

Vor kurzem wurde berichtet, dass 5'-Cap-Abspaltung und der 5'-3'-RNA-Abbau bei *Saccharomyces cerevisiae* in diskreten cytoplasmatischen Zentren abläuft, die P-Körper („processing bodies“) genannt wurden [SHETH und PARKER 2003]. Die Autoren zeigten, dass es bei Inhibierung des mRNA-Turnovers vor der 5'-Cap-Abspaltung zu einem Verlust der P-Körper kommt und wiesen nach, dass die Abbaufaktoren Dcp2p, Dhh1p, Lsm1p, Pat1p und Xrn1p in diesen Strukturen kolokalisierten. Die Ergebnisse der Lokalisation Hypps in *Dictostelium discoideum* erbrachten ein punktiertes cytoplasmatisches Muster bei der Immunofärbung mit einem Hypp-monoklonalen Antikörper [YOUNG 1998]. Parallel wurde eine Kolokalisation Hypps mit ringförmigen cytoplasmatischen Lamellen (Annulate Lamelli = AL) gezeigt [ROSORIOUS et al. 1999]. In diesen Strukturen ist das Vorhandensein von Poly-A-mRNA nachgewiesen. Zukünftige Studien werden die Frage beantworten, ob es eine Verbindung zwischen diesen beiden Strukturen, P-Körper und AL, gibt und so ein weiterer Beweis der Wirkung Hypps im 5'-3'-mRNA-Abbau aufgedeckt werden kann.

6.12 Ausblick

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit haben sich Hinweise für eine Beteiligung des Hypusin enthaltenden Proteins an 5'-3'-mRNA-Abbauprozessen konkretisiert, die auch den NMD-Weg betreffen. Im nächsten experimentellen Schritt ist die kausale Verknüpfung des Anreicherungs-transkriptomts der Mutante G₈₁ mit dem Ausfall des NMD-Weges zu untermauern. Die Messung von evtl. verlängerten mRNA-Halbwertszeiten ausgewählter mRNAs ist dazu parallel in G₈₁- und *upfΔ*-Hefestämmen durchzuführen. Hierbei könnte auch der Genchipansatz zur simultanen Bestimmung der Halbwertszeiten aller im Hefegenom vorhandenen ORFs von G₈₁- und *nmdΔ*-Stämmen angewendet werden. So wäre eine direkte Bestimmung von akkumulierenden Transkripten möglich, die im Zusammenhang mit der Funktion Hypps stehen, aber nicht von NMD beeinflusst sind.

Das Wissen um die Steuerung telomerischer Funktionen durch NMD und Hypps Beteiligung in diesem Stoffwechselweg eröffnet neue Perspektiven, den Einflüssen Hypps auf die Steuerung des Zellzyklus und der Zellalterung näher zu kommen. Da bekannt ist, dass das Ausschalten des NMD-Weges keinen Zellzyklusarrest hervorruft, ein Ausschalten der Hypp-Funktion jedoch sehr wohl, ist die Suche nach NMD-unabhängigen Transkripten sinnvoll, die von Hypp beeinflusst werden und Zellzyklus-relevant sind. Zusätzlich kann eine Bestimmung der Chromosomenstabilität in der Mutante G₈₁ Hinweise auf eine Einschränkung der Telomeraseaktivität und auf Zellalterung erhärten.

Die Hypothese, dass es sich bei den Ziel-mRNAs des NMD-Weges um mit Hypp interagierende RNA-Spezies handelt, sollte direkt überprüft werden. In den Genchipanalysen akkumulierende mRNAs, die mit hoher Wahrscheinlichkeit über NMD abgebaut werden, könnten aus Genbanken in Form von cDNA isoliert und so zur Quelle revers transkribierter radioaktiver RNA werden. Diese kann dann in Komigrations-Bandverschiebungs-Experimenten („electrophoretic mobility shift assays“ = EMSA) mit den isolierten Hypp-Protein-Formen (mit und ohne Hypusin-Modifikation) eingesetzt werden. Damit kann die Bindungseigenschaft Hypps

an diese RNAs Hypusin-abhängig getestet werden.

Mit der gleichen Technik sind auch die in dieser Arbeit durch Affinitätsbindung beschriebenen RNA-Interaktionspartner Hypps zu überprüfen. Als Positivkontrolle kann für alle Bandverschiebungsexperimente die RRE-mRNA des HIV-1-Virus verwendet werden, dessen DNA zu diesem Zweck in dieser Arbeit hergestellt wurde.

Auch die Auswirkungen der Anreicherungen spezieller mRNAs in der Mutante G₈₁ auf die Translationsraten sollten im Vergleich mit Genen überprüft werden, die nicht durch die Hypp-Funktion beeinflusst sind. Hierbei könnte mit Luciferase-Reportergenkonstrukten gearbeitet werden, die unter die Kontrolle eines steuerbaren Promotors (z.B. Tetracyclin-Off-Promotor) gestellt werden. So könnten weitere Kenntnisse der Regulation von Proteinspiegeln durch den Einfluss Hypps auf den RNA-Abbau gewonnen werden.

In-situ-Hybridisierungsexperimente mit cDNA der potentiell mit Hypp interagierenden NMD-mRNAs wären zur Klärung der Frage sinnvoll, ob die AL einen Akkumulationsort dieser mRNAs darstellen und ob es Hinweise auf eine Identität dieser Organellen mit den P-Körpern gibt.

Die beobachteten Effekte im RNA-Abbau sollten darüber hinaus in einem von der Mutante G₈₁ unabhängigen System überprüft werden. Dazu bietet sich z.B. die Anwendung des Deoxyhypusin-Hemmers GC7 oder auch die Arbeit mit Hypp-RNAi an.

Die Interaktion Hypps mit dem majoren Hüllenprotein des gut charakterisierten L-A-Virus, eröffnet zweifellos neue Möglichkeiten, die Interaktion des Proteins mit RNA, und speziell mit viraler RNA besser zu verstehen, die einen -1-Frameshift benötigt. Nach *in vitro*-Transkription der L-A-viralen RNA kann die EMSA-Technik Aufschluss darüber geben, ob Hypp direkt an die RNA von L-A bindet. Zu klären wäre auch die Frage, inwieweit Hypp für die 5'-Cap-Lyase-Aktivität des Gag-SCLAp notwendig ist. Es ist zu überprüfen, ob Hypp speziell mit RNA ohne 5'-Cap wie der L-A-RNA interagiert. In diesem Zusammenhang sollten *in vitro*-Versuche mit 5'-Cap-tragender und 5'-Cap-loser RNA derselben Gene Bindungsunterschiede aufdecken und auch Hinweise auf die Hypusin-Abhängigkeit einer solche Interaktion liefern. Von allgemeinem Interesse ist der Einfluss einer gestörten Hypp-Funktion auf die Fähigkeit der Erhaltung der L-A-RNA und L-A-Reifung. Hier ist an die Arbeit mit dem L-A-Satelliten M1 und an die Bestimmung des Killertoxinlevels in der Mutante G₈₁ im Vergleich mit Wildtypzellen zu denken.

6.13 Fazit

Die zellulären Funktionen des Hypusin enthaltenden Proteins mit seiner einzigartigen posttranslationalen Modifikation sind trotz Erforschung über fast 30 Jahre weitgehend im Dunkeln geblieben. Mit den Fortschritten auf dem Forschungsgebiet der posttranskriptionalen Genregulation werden mehr und mehr Hinweise sichtbar, dass Hypp funktionale Wurzeln in diesem Bereich besitzt. Die vorliegende Studie konnte einige dieser Zusammenhänge aufzeigen. Es liegt jedoch noch viel Arbeit vor uns, um genauere Erkenntnisse über das Wirken und die Wirkmechanismen des Proteins im RNA-Metabolismus zu erlangen.

7. Tabellen-Anhang zu Datenmaterial der G₈₁-HDOA-Analyse

Der folgende Anhang enthält spezielle Auszüge der in der Mutante G₈₁ bei 37°C akkumulierenden Transkripte. Genaues Tabellenmaterial aller in G₈₁ bei 37°C an- und abgereicherten ORFs kann unter „<http://www.biochem.mpg.de/Lottspeich/>“ (Stichwort Hypusin) eingesehen werden.

7.1 In G₈₁ akkumulierende Transkripte der HDOA-Analyse mit Zugehörigkeit zu NMD-Substratgruppen

Angegeben ist der Anreicherungsfaktor \overline{FC} , der das arithmetische Mittel aller Einzelfaktoren aus HDOA-Analysen von 37°C-Kulturen darstellt (unabhängig von der subzellulären RNA-Fraktion). Aus Übersichtsgründen wurden auch angereicherte Transkripte aufgenommen, deren mittlerer \bar{p} -Wert über 0,065 lag.

mRNA-Klasse	Probe Set	ORF	Gen	FC (37°C)	± SD	\bar{p} -Wert
uORF-enthaltend ¹	9196-S-AT	YNL335W	—	10,87	4,33	0,0201
	11384-AT	YAL064W	—	10,82	1,25	0,0009
	10413-AT	YLL063C	<i>AYT1</i>	7,58	2,49	0,0015
	8180-AT	YOR381W	<i>FRE3</i>	5,99	1,62	0,0165
	10792-AT	YKL220C	<i>FRE2</i>	5,82	0,42	0,0100
	10080-AT	YLR233C	<i>EST1</i>	5,82	0,53	0,0029
	4965-AT	YGR039W	—	4,67	1,45	0,0587
	4534-AT	YHR015W	<i>MIP6</i>	4,66	1,58	0,0345
	4065-AT	YIR029W	<i>DAL2</i>	4,35	0,02	0,0040
	4078-I-AT	YIR043C	—	4,10	0,78	0,0338
	9450-AT	YMR180C	<i>CTL1</i>	3,73	1,05	0,0304
	10790-AT	YKL222C	—	3,66	0,65	0,0277
	4284-AT	YIL167W	—	3,65	0,40	0,0442
	5536-AT	YER187W	—	3,56	0,33	0,0921
	7922-AT	YPL148C	<i>PPT2</i>	3,56	1,76	0,0844
	4400-AT	YHR150W	<i>PEX28</i>	3,51	1,55	0,0293
	8682-AT	YOL106W	—	3,48	0,96	0,0041
	4032-F-AT	YIR043C	—	3,29	0,22	0,0257
	7068-AT	YBR295W	<i>PCA1</i>	3,28	2,02	0,0213
	10379-AT	YLL051C	<i>FRE6</i>	3,16	0,88	0,0253
	6361-AT	YDR126W	—	3,13	0,06	0,0292
	8162-AT	YOR363C	<i>PIP2</i>	3,01	0,72	0,0795
	5262-AT	YGL251C	<i>HFM1</i>	2,97	0,52	0,0690
	5270-AT	YGL243W	<i>TAD1</i>	2,89	0,39	0,0388
	5537-AT	YER188W	—	2,85	0,08	0,1210
	10190-AT	YLR165C	<i>PUS5</i>	2,84	0,04	0,0621
	9100-AT	YNL249C	<i>MPA43</i>	2,74	0,15	0,1250
	6106-AT	YDR364C	<i>CDC40</i>	2,72	0,57	0,0379
	3187-S-AT	YHL050C	—	2,64	1,19	0,1097
	6921-AT	YCL056C	—	2,58	0,17	0,0164
	8239-AT	YOR304C-A	—	2,52	0,08	0,0386
	9145-AT	YNL294C	<i>RIM21</i>	2,47	0,44	0,0143
	4938-AT	YGR057C	<i>LST7</i>	2,41	0,65	0,0677

¹uORF, dessen Start-Sequenz die Motive AATGA bzw. ATGAA enthält.

	4951-AT	YGR070W	<i>ROM1</i>	2,34	0,36	0,0109
	7818-AT	YPL071C	—	2,30	0,10	0,1080
	6469-AT	YDR008C	—	2,27	0,60	0,2120
	10090-AT	YLR242C	<i>ARV1</i>	2,26	0,38	0,2090
	6465-AT	YDR004W	<i>RAD57</i>	2,22	0,75	0,0467
	9595-AT	YMR065W	<i>KAR5</i>	2,17	0,69	0,2140
	5696-AT	YER041W	<i>YEN1</i>	2,16	0,05	0,0944
	11044-AT	YJL023C	<i>PET130</i>	2,14	0,16	0,0855
	5181-AT	YGL154C	<i>LYS5</i>	2,00	0,25	0,0755
	4117-AT	YIL009C-A	<i>EST3</i>	1,92	0,26	0,0321
	7153-AT	YBR197C	—	1,92	0,01	0,0965
	4782-AT	YGR216C	<i>GPII</i>	1,91	0,47	0,0445
	9861-AT	YLR457C	<i>NBP1</i>	1,84	0,27	0,2940
	5403-AT	YFL027C	<i>GYP8</i>	1,82	0,24	0,1890
	7127-AT	YBR217W	<i>APG12</i>	1,82	0,13	0,1970
	4236-AT	YIL120W	<i>QDR1</i>	1,81	0,48	0,1780
	10590-AT	YKL017C	<i>HCS1</i>	1,76	0,11	0,2110
	5259-AT	YGL254W	<i>FZF1</i>	1,74	0,67	0,2940
	4718-AT	YGR288W	<i>MAL13</i>	1,69	0,12	0,1770
	4177-AT	YIL089W	—	1,69	0,15	0,2220
pre-mRNAs	3791-S-AT	YLL067C	—	3,66	1,16	0,0623
	3789-S-AT	YLL067C	—	3,58	1,54	0,1401
	10998-AT	YJR021C	<i>REC107</i>	3,45	2,31	0,0712
	9800-S-AT	YML133C	—	3,09	1,23	0,0048
	5262-AT	YGL251C	<i>HFM1</i>	2,97	0,52	0,0690
	4324-S-AT	YHR218W	—	2,82	1,16	0,1537
	3187-S-AT	YHL050C	—	2,64	1,19	0,1097
	10999-AT	YJR021C	<i>REC107</i>	2,55	0,37	0,0421
	3834-S-AT	YLL067C	—	2,55	1,41	0,0692
	10021-AT	YLR306W	<i>UBC12</i>	1,96	0,76	0,3720
	6466-AT	YDR005C	<i>MAF1</i>	1,95	0,30	0,0550
	6616-AT	YDL115C	—	1,80	0,25	0,0875
	3790-S-AT	YLL067C	—	1,69	0,49	0,1793
Pseudogene	9571-AT	YMR085W	—	5,38	0,45	0,0059
	6794-AT	YCR099C	—	5,36	0,12	0,0042
	8719-AT	YOL162W	—	5,18	1,25	0,0415
	4143-AT	YIL028W	—	4,31	0,37	0,0204
	8019-S-AT	YPL277C	—	4,17	0,71	0,0184
	4078-I-AT	YIR043C	—	4,10	0,78	0,0338
	8144-G-AT	YOR389W	—	3,93	0,37	0,0040
	8718-AT	YOL163W	—	3,91	0,54	0,0321
	6795-AT	YCR100C	—	3,51	0,07	0,0045
	4032-F-AT	YIR043C	—	3,29	0,22	0,0257
	5253-G-AT	YGL259W	<i>YPS5</i>	3,24	0,62	0,0116
	4324-S-AT	YHR218W	—	2,82	1,16	0,1537
	11304-AT	YAR061W	—	2,78	0,88	0,2040
	5683-AT	YER028C	—	2,65	0,51	0,1690
	11305-S-AT	YAR062W	—	2,63	0,63	0,2330
	9570-AT	YMR084W	—	2,58	0,03	0,0649
	9668-AT	YML042W	<i>CAT2</i>	2,21	0,45	0,0403
	8020-S-AT	YPL276W	<i>FDH2</i>	1,71	0,31	0,3330
dORFs²	11259-AT	YJL213W	—	7,07	2,74	0,0037
	9125-AT	YNL269W	<i>BSC4</i>	6,26	1,28	0,0269

²„disabled Open Reading Frames“ nach den Definitionen bei [HARRISON et al. 2002].

	8780-AT	YNR068C	—	4,59	1,42	0,0057
	8780-AT	YNR068C	—	4,59	1,42	0,0057
	3732-S-AT	YLR463C	—	4,24	0,53	0,0201
	3326-AT	YFL063W	—	4,09	0,31	0,0211
	5251-F-AT	YGL261C	—	3,82	0,61	0,0201
	10857-AT	YJR155W	<i>AAD10</i>	3,78	1,15	0,0590
	4284-AT	YIL167W	—	3,65	0,40	0,0442
	4336-AT	YHR176W	<i>FMO</i>	3,58	0,18	0,0107
	11287-F-AT	YAR020C	<i>PAU7</i>	3,39	0,68	0,0528
	9867-S-AT	YLR465C	<i>BSC3</i>	3,28	1,52	0,1190
	10683-AT	YKL101W	<i>HSL1</i>	3,07	0,65	0,0247
	11263-F-AT	YAR073W	<i>IMD1</i>	2,91	1,28	0,0564
	8727-AT	YOL153C	—	2,83	0,09	0,0172
	4238-AT	YIL164C	<i>NIT1</i>	2,78	0,93	0,0294
	8781-AT	YNR069C	<i>BSC5</i>	2,75	1,16	0,2450
	4237-AT	YIL165C	—	2,60	0,71	0,0273
	4179-AT	YIL087C	—	2,58	0,71	0,0429
	4283-AT	YIL168W	<i>SDL1</i>	2,44	0,39	0,1990
	10263-AT	YLR054C	—	2,21	0,63	0,2460
	6806-AT	YCR065W	<i>HCM1</i>	2,17	0,72	0,2407
	6406-AT	YDR082W	<i>STN1</i>	2,15	0,29	0,0598
	6875-AT	YCL004W	<i>PGS1</i>	2,08	0,94	0,3360
	6195-AT	YDR275W	<i>BSC2</i>	2,03	0,61	0,0303
	8504-AT	YOR031W	<i>CRS5</i>	1,96	0,07	0,0714
	6468-AT	YDR007W	<i>TRP1</i>	1,81	0,19	0,1280
	3853-F-AT	YJR162C	—	1,80	0,11	0,0759
	4485-AT	YHR057C	<i>CPR2</i>	1,77	0,05	0,0607
	4033-F-AT	YIR044C	—	1,72	0,20	0,1170
	10551-AT	YKR034W	<i>DAL80</i>	1,71	0,66	0,4150
	6800-AT	YCR106W	<i>RDS1</i>	1,69	0,40	0,3010
	3629-F-AT	YNR077C	—	1,54	0,05	0,1550
Ty-LTRs	3899-S-AT	YJLWTY4-1 Full length Ty4	—	5,96	0,48	0,0091
	3328-AT	YFLWDELTA1 Ty1 LTR	—	5,57	0,56	0,0101
	3324-AT	YERWOMEGA2 Ty5 LTR	—	4,75	0,59	0,0233
	3204-AT	YHRCDELTA4 Ty1 LTR	—	4,71	0,57	0,0172
	3259-AT	YGLCDELTA5 Ty1 LTR	—	4,28	0,98	0,0065
	3174-F-AT	YHRCDELTA12 Ty1 LTR	—	3,96	0,24	0,0519
	3730-AT	YLRCDELTA27 Ty1 LTR	—	3,85	0,37	0,0257
	3887-F-AT	YJLWTAU1 Ty4 LTR	—	3,81	0,50	0,0092
	3602-AT	YOLWDELTA10 Ty1 LTR	—	3,76	1,70	0,1260
	3196-F-AT	YHLWTAU1 Ty4 LTR	—	3,69	0,17	0,0132
	3264-F-AT	YGLWDELTA6 Ty1 LTR	—	3,61	0,91	0,0733
	3686-F-AT	YMRCDELTA18 Ty1 LTR	—	3,60	0,19	0,0319
	3876-AT	YJLWTAU4 Ty4 LTR	—	3,58	0,24	0,0243
	3301-F-AT	YGLWTAU1 Ty4 LTR	—	3,36	0,25	0,0047
	3207-I-AT	YHRCDELTA6 Ty1 LTR	—	3,36	1,13	0,0969
	3510-S-AT	YBLWDELTA8 Ty1 LTR	—	3,36	0,75	0,0444
	3175-I-AT	YHRWDELTA13 Ty1 LTR	—	3,35	0,41	0,0259
	3684-F-AT	YMRWTAU2 Ty4 LTR	—	3,32	0,33	0,0083
	3900-F-AT	YJLWTY4-1 Full length Ty4	—	3,30	0,19	0,0029
	3901-F-AT	YJLWTAU2 Ty4 LTR	—	3,20	0,29	0,0082
	3214-AT	YGRWDELTA23 Ty1 LTR	—	3,18	0,57	0,0523
	3663-F-AT	YNLWTAU2 Ty4 LTR	—	3,18	0,83	0,0609
	3661-AT	YNLWSIGMA2 Ty3 LTR	—	3,11	0,34	0,0140
	3162-AT	YHRWTAU3 Ty4 LTR	—	3,07	1,41	0,1950

3232-F-AT	YGRCTAU3 Ty4 LTR	—	2,97	0,59	0,0067
3541-AT	YPRWTAU4 Ty4 LTR	—	2,94	0,02	0,0215
3336-F-AT	YERCCTAU2 Ty4 LTR	—	2,91	0,23	0,0114
3137-S-AT	YILWTY3-1 Full length Ty3	—	2,91	1,40	0,1200
3691-F-AT	YMRCTAU3 Ty4 LTR	—	2,89	0,56	0,0057
3200-I-AT	YHLWDELTA2 Ty1 LTR	—	2,77	0,68	0,1920
3583-I-AT	YPLCDELTA1 Ty1 LTR	—	2,74	0,62	0,1040
3670-F-AT	YNRCTAU3 Ty4 LTR	—	2,70	0,74	0,0139
3553-F-AT	YPLCTAU1 Ty4 LTR	—	2,68	0,53	0,0465
3558-F-AT	YPLCTAU2 Ty4 LTR	—	2,66	0,24	0,0566
3274-AT	YGLWDELTA10 Ty1 LTR	—	2,62	0,69	0,1770
3631-S-AT	YOLWTAU1 Ty4 LTR	—	2,56	0,56	0,0884
3449-I-AT	YDRWDELTA10 Ty1 LTR	—	2,56	1,00	0,2450
3192-F-AT	YHLCOMEGA1 Ty5 LTR	—	2,55	0,21	0,1450
3404-F-AT	YDRWDELTA10 Ty1 LTR	—	2,54	0,74	0,0714
3850-AT	YJRWDELTA20 Ty1 LTR	—	2,52	0,73	0,2540
3584-F-AT	YPLCDELTA1 Ty1 LTR	—	2,50	0,96	0,2630
3617-F-AT	YORWTAU2 Ty4 LTR	—	2,45	0,23	0,0184
3475-F-AT	YDLWTAU1 Ty4 LTR	—	2,45	0,15	0,0274
3644-F-AT	YOLCDELTA7 Ty1 LTR	—	2,44	0,86	0,0691
3554-F-AT	YPLCTY4-1 Full length Ty4	—	2,36	0,18	0,0647
3650-F-AT	YNLWTAU1 Ty4 LTR	—	2,30	0,07	0,0393
3176-F-AT	YHRWDELTA13 Ty1 LTR	—	2,30	0,00	0,1400
3581-F-AT	YORWDELTA24 Ty2 LTR	—	2,29	0,87	0,0478
3208-F-AT	YHRCDELTA6 Ty1 LTR	—	2,29	0,45	0,2410
3573-F-AT	YORWTAU3 Ty4 LTR	—	2,29	0,29	0,0837
3752-F-AT	YLRCDELTA19 Ty1 LTR	—	2,28	0,84	0,0550
3568-F-AT	YPRCDELTA15 Ty1 LTR	—	2,24	0,20	0,1080
3746-AT	YLRWDELTA15 Ty1 LTR	—	2,24	0,59	0,2520
3496-F-AT	YCLWDELTA4 Ty2 LTR	—	2,23	0,63	0,0584
3904-F-AT	YJLWDELTA2 Ty1 LTR	—	2,23	1,04	0,0490
3801-F-AT	YLRCDELTA5 Ty1 LTR	—	2,18	1,32	0,4140
3833-F-AT	YKRWOMEGA1 Ty5 LTR	—	2,17	0,08	0,2220
3373-AT	YERCDELTA8 Ty1 LTR	—	2,16	0,68	0,2230
3799-F-AT	YLRCDELTA3 Ty1 LTR	—	2,12	0,43	0,0875
3422-F-AT	YDRWDELTA20 Ty1 LTR	—	2,12	0,51	0,0775
3908-I-AT	YALWDELTA1 Ty1 LTR	—	2,08	0,51	0,2970
3726-F-AT	YLRCDELTA25 Ty2 LTR	—	2,03	0,16	0,0559
3306-I-AT	YGLWDELTA4 Ty1 LTR	—	2,02	0,62	0,0659
3816-F-AT	YKLWDELTA3 Ty1 LTR	—	2,01	0,10	0,2480
3143-F-AT	YILWSIGMA3 Ty3 LTR	—	2,00	0,63	0,3170
3569-AT	YPRWDELTA16 Ty1 LTR	—	1,99	0,72	0,3450
3468-I-AT	YCRCDELTA14 Ty1 LTR	—	1,96	0,08	0,2720
3374-AT	YERWDELTA9 Ty1 LTR	—	1,95	0,35	0,2690
3448-S-AT	YDRCSIGMA2 Ty3 LTR	—	1,91	0,03	0,0699
3931-F-AT	YJLWDELTA1 Ty1 LTR	—	1,88	0,12	0,2740
3469-F-AT	YCRCDELTA14 Ty1 LTR	—	1,88	0,47	0,3340
3909-F-AT	YALWDELTA1 Ty1 LTR	—	1,88	0,21	0,2990
3402-AT	YDRWDELTA31 Ty1 LTR	—	1,86	0,49	0,3560
3343-I-AT	YERCDELTA15 Ty1 LTR	—	1,86	0,16	0,0609
3506-S-AT	YBLWTAU1 Ty4 LTR	—	1,82	0,34	0,1360
3344-F-AT	YERCDELTA15 Ty1 LTR	—	1,80	0,43	0,1750
3445-F-AT	YDRCSIGMA1 Ty3 LTR	—	1,71	0,11	0,1630

7.2 Anreicherungsverhalten der erweiterten Seripauperinfamilie

Seripauperin- und Zellwand-Manno-Gene bilden eine große Multigenfamilie in *Saccharomyces cerevisiae*, zu der die *PAU*-, *DAN*- und *TIR*-Gene gehören. Aufgrund ihres geringeren Serin-Gehaltes durch das Fehlen eines stark serinhaltigen C-terminalen Abschnitts im Gegensatz zu der mit ihnen verwandten Gruppe der Serin-reichen *SRP*-Gene, gab man ihnen den Namen „Seripauperine“ (von engl. „serine poor“) [VISWANATHAN et al. 1994].

Der überwiegende Teil der Gene ist in $G_{81}^{(ts)}$ stärker transkribiert als im zugehörigen Wildtyp-Stamm. Keine Regulation zeigten vier Zellwand-Proteine, darunter beide *CWP*-Gene, die in die *PAU*-Familie eingruppiert wurden [KWAIST et al. 2002]. Einige der ORFs gehören zu den am höchsten exprimierten Genen in der Mutante. Die Kerngruppe der 23 Seripauperin-Gene, wie in [RACHIDI et al. 2000] definiert, zeigte bis auf 5 ORFs auch Anreicherung in *nmd*-defizienten Hefestämmen [HE et al. 2003]; [LELIVELT und CULBERTSON 1999] (Tab. 7.2, Spalten 4 und 5). Die Tabelle zeigt die überlappende Eingruppierung vieler Gruppenmitglieder in mehrere Effektgruppen angereicherter ORFs in der *hyp(ts)*-Mutanten G_{81} .

ORF	Gen	\overline{FC} (37°C) ± SD	\bar{p}	Afg.InC	NMD-Defizienz	bei An-aerobie	subtelomer	nahe Ty-LTR	nicht subtelomer
YOL161C		7,53 ± 0,73	0,00356			•	•		
YIR041W		7,38 ± 0,08	0,00098	2,38	•	•	•		
YLL025W		7,12 ± 1,35	0,0304	2,82	•	•			•
YMR325W		5,37 ± 0,76	0,00052	2,58	•	•	•		
YOR009W	<i>TIR4</i>	5,25 ± 0,90	0,00051			•			•
YEL049W	<i>PAU2</i>	5,19 ± 1,01	0,01343	2,61	•	•			•
YGR294W		5,15 ± 2,53	0,014	1,84	•	•	•		
YLL064C		4,83 ± 0,96	0,0346	2,19	•	•	•		
YKL224C		4,67 ± 0,99	0,0023	2,64	•	•	•		
YDR542W		4,6 ± 1,18	0,00867	1,39	•	•	•		
YHL046C		3,99 ± 0,60	0,00301	3,28	•	•	•		
YBR301W	<i>DAN3</i>	3,92 ± 0,23	0,0082	2,96	•	•	•		
YGL261C		3,82 ± 0,61	0,02009	3,33	•	•	•		
YNR076W	<i>PAU6</i>	3,79 ± 0,42	0,03254	2,04	•	•	•		
YFL020C	<i>PAU5</i>	3,73 ± 1,35	0,02516	3,66	•	•		•	
YIL176C		3,4 ± 0,52	0,02474	2,02	•	•	•		
YAR020C	<i>PAU7</i>	3,39 ± 0,68	0,05282			•			•
YJL223C	<i>PAU1</i>	3,37 ± 1,06	0,06778	1,98	•	•	•		
YAL068C		3,27 ± 0,16	0,01018	1,41	•	•	•		
YLR461W	<i>PAU4</i>	3,0 ± 0,55	0,03486	2,46	•	•	•		
YJR151C	<i>DAN4</i>	2,93 ± 0,76	0,03283	2,06	•		•		
YLR037C	<i>DAN2</i>	2,75 ± 0,81	0,03615			•		•	
YOR394W		2,7 ± 0,26	0,0393			•	•		
YOR010C	<i>TIR2</i>	1,93 ± 0,23	0,289			•		•	
YIL011W	<i>TIR3</i>	1,47 ± 0,12	0,19			•		•	
YBR067C	<i>TIP1</i>	1,0 ± 0,15	0,372						•
YER011W	<i>TIR1</i>	0,96 ± 0,07	0,403					•	
YKL097W-A	<i>CWP2</i>	0,94 ± 0,09	0,391						•
YKL096W	<i>CWPI</i>	0,91 ± 0,09	0,399			•			•
YPL282C	nicht in der G_{81} -Studie enthalten; zeigt anoxische Anreicherung								

Tabelle 7.2: Expressionsverhalten der *PAU*-Genfamilie (Seripauperine) in den $G_{81}^{(ts)}$ -HDOA-Analysen. In der letzten Spalte (Avg FC) sind die entsprechenden Anreicherungsfaktoren aus den *upf*⁻-Analysen [LELIVELT und CULBERTSON 1999] angegeben. Für den ORF YPL282c, der nach Sequenzanalyse in die Seripauperin-Familie einzuordnen ist, war kein Probensatz auf dem Hochdichte-Chip vorhanden.

7.3 Angereicherte ORFs unabhängig von der RNA-Abbau-Defizienz

Die Tabelle listet 52 ORFs, die in den G₈₁-HDOA-Analysen eine signifikante Anreicherung zeigten und nicht augenscheinlich mit der gefundenen RNA-Abbau-Defizienz oder anderen angesprochenen Effekten in Verbindung stehen. Sie sind Ausdruck für weitere funktionelle Zusammenhänge Hypps.

Probe Set	ORF	Gen	Beschreibung	\overline{FC} (37°C) ± SD	\overline{p} -Wert
6131-AT	YDR345C	<i>HXT3</i>	hochaffiner Glukose-Transporter	5,77 ± 1,19	0,00139
5404-AT	YFL026W	<i>STE2</i>	α-Faktor-Pheromon- Rezeptor (sieben Transmembranhelices)	3,35 ± 0,70	0,11900
7960-I-AT	YPL198W	<i>RPL7B</i>	ribosomales Protein L7B (L6B) (rp11) (YL8)	3,87 ± 0,77	0,02461
4428-AT	YHR092C	<i>HXT4</i>	hochaffiner Glukose-Transporter	3,79 ± 0,33	0,01276
4430-AT	YHR094C	<i>HXT1</i>	hochaffiner Hexose-Transporter	3,73 ± 1,54	0,06364
4409-AT	YHR116W	—	unbekannte molekul. Funktion; Rolle bei der aeroben Atmung	3,28 ± 0,53	0,06190
6021-F-AT	YDR461W	<i>MFA1</i>	α-Faktor-Paarungs- Pheromon (Precursor)	3,24 ± 0,68	0,12260
4405-AT	YHR112C	—	Cystathionin β-Lyase- Aktivität	3,22 ± 0,45	0,00747
4365-AT	YHR160C	<i>PEX18</i>	Protein-Peroxisom- Zielsteuerung	3,20 ± 0,72	0,25800
10000-AT	YLR331C	—	unbekannte Funktion	3,11 ± 0,49	0,07220
7961-F-AT	YPL198W	<i>RPL7B</i>	ribosomales Protein L7B (L6B) (rp11) (YL8)	3,08 ± 0,87	0,04313
10932-AT	YJR094C	<i>IME1</i>	Masterregulator der Meiose	3,08 ± 0,16	0,02560
10683-AT	YKL101W	<i>HSL1</i>	Protein-Kinase mit Rolle beim G ₂ -M-Übergang des Zellzyklus	3,07 ± 0,65	0,02470
6483-AT	YDL024C	<i>DIA3</i>	Protein mit unbek. Funktion, involviert beim invasiven und pseudohyphalen Wachstum	2,94 ± 0,35	0,01010
11181-AT	YJL157C	<i>FAR1</i>	Cyclin-abhängiger Kinase- Inhibitor, der die Zellzyklus-Arretierung im Zuge einer Pheromon-Antwort steuert	2,90 ± 0,81	0,09951
4369-AT	YHR164C	<i>DNA2</i>	essentielle Tripartit-DNA-Replikations-Helikase	2,86 ± 0,18	0,05310
4427-AT	YHR091C	<i>MSR1</i>	Arginyl-tRNA-Synthetase	2,86 ± 1,17	0,05155
9633-AT	YMR011W	<i>HXT2</i>	hochaffiner Hexose-Transporter-2	2,86 ± 0,73	0,14153
4464-AT	YHR082C	<i>KSP1</i>	Serin/Threonin-Kinase ähnlich Casein-Kinase II	2,79 ± 0,59	0,02159
4359-AT	YHR154W	<i>RTT107</i>	Regulator der Tyl1 Transposition; etabliert stilles Chromatin	2,77 ± 0,18	0,05500
10208-AT	YLR134W	<i>PDC5</i>	Pyruvat-Decarboxylase	2,75 ± 0,28	0,04786
4402-AT	YHR109W	<i>CTM1</i>	Cytochrome-c-Lysin- Methyltransferase	2,74 ± 0,83	0,17000
4472-S-AT	YHR043C	<i>DOG2</i>	2-Deoxyglukose-6-phosphat- Phosphatase	2,68 ± 0,05	0,00933
9057-AT	YNL202W	<i>SPS19</i>	peroxisomale 2,4-Dienoyl-CoA- Reduktase	2,61 ± 0,69	0,01390
4476-AT	YHR047C	<i>AAP1</i>	Arginin/Alanin-Aminopeptidase	2,59 ± 0,53	0,03656
10661-AT	YKL079W	<i>SMY1</i>	Motor-Aktivität, Funktion als Kinesin unwahrscheinlich	2,59 ± 0,14	0,01240
5396-AT	YFL034C-A	<i>RPL22B</i>	ribosomales Protein L22B (L1c) (rp4) (YL31)	2,45 ± 0,84	0,07112
10299-AT	YLR047C	—	Oxidoreduktase-Aktivität	2,41 ± 0,01	0,06330
6587-AT	YDL099W	—	schwache Ähnlichkeit zu Myosin(schwere Kette)-Untereinheiten	2,37 ± 0,47	0,03428
11140-AT	YJL107C	—	unbekannte Funktion	2,36 ± 0,97	0,01810

4386-AT	YHR137W	<i>ARO9</i>	Aminotransferase II für aromatische Aminosäuren	2,32 ± 0,39	0,05105
6541-AT	YDL057W	—	unbekannte Funktion	2,30 ± 0,03	0,07290
4457-AT	YHR076W	<i>PTC7</i>	Protein-Phosphatase(Typ 2C)- Aktivität	2,29 ± 0,11	0,07720
9963-AT	YLR382C	<i>NAM2</i>	mitochondriale Leucyl-tRNA- Synthetase	2,29 ± 0,76	0,14000
4364-AT	YHR159W	—	unbekannte Funktion	2,28 ± 0,42	0,20300
6020-R-AT	YDR461W	<i>MFA1</i>	α- Faktor-Paarungs-Pheromon (Precursor)	2,27 ± 0,73	0,07900
5688-AT	YER033C	<i>ZRG8</i>	cytoplasmatisches Protein mit unbekannter Funktion	2,25 ± 0,13	0,02850
4498-AT	YHR024C	<i>MAS2</i>	53 kDa-Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungs-Protease	2,23 ± 0,69	0,14998
4202-AT	YIL109C	<i>SEC24</i>	Teil des Sec23p-Sec24p- Komplexes, ER/Golgi-Transport	2,21 ± 0,08	0,02820
6429-AT	YDR060W	<i>MAK21</i>	essentiell für die 60S-Ribosom- Biogenese; involviert in den Zellkernexport von Pre-Ribosomen	2,21 ± 0,94	0,18771
7786-AT	YPL012W	<i>RRP12</i>	benötigt für normale Pre-rRNA- Prozessierung	2,16 ± 0,98	0,15211
4407-AT	YHR114W	<i>BZZ1</i>	assoziiert mit Las17p/Bee1p	2,16 ± 0,04	0,04330
4370-AT	YHR165C	<i>PRP8</i>	RNA-Splicing-Faktor	2,15 ± 0,45	0,05666
10106-AT	YLR214W	<i>FRE1</i>	Eisen- und Kupfer-Reduktase	2,15 ± 0,47	0,14500
7884-AT	YPL141C	—	starke Ähnlichkeit zur Protein- Kinase Kin4p	2,07 ± 0,53	0,14200
4499-AT	YHR025W	<i>THR1</i>	Homoserine-Kinase	2,05 ± 0,74	0,13789
4373-AT	YHR168W	—	GTP-bindendes Protein	2,04 ± 0,01	0,07430
4932-AT	YGR096W	<i>TPC1</i>	Thiamin-Pyrophosphat-Transporter	2,04 ± 0,22	0,23700
4366-AT	YHR161C	<i>YAP1801</i>	Hefe- Assemblierungspolypeptid, bindet an Pan1p und Klathrin	2,03 ± 0,01	0,03810
10237-AT	YLR118C	—	Hydrolaseaktivität an Esterbindungen	2,01 ± 0,23	0,04130
6207-AT	YDR287W	—	Inositolmonophosphatase	2,01 ± 0,83	0,20500

7. Literaturverzeichnis

- [ABBRUZZESE et al. 1989] ABBRUZZESE, A., M. H. PARK, S. BENINATI und J. E. FOLK (1989). *Inhibition of deoxyhypusine hydroxylase by polyamines and by a deoxyhypusine peptide*. Biochim. Biophys. Acta, 997(3):248–55.
- [ABBRUZZESE et al. 1986] ABBRUZZESE, A., M. H. PARK und J. E. FOLK (1986). *Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterisation*. J. Biol. Chem., 261:3085–3089.
- [ALLEN 1988] ALLEN, E. D. (1988). .. J. Ultrastruc. Res. Mol. Struct., 98:19–31.
- [ALTAMURA et al. 1997] ALTAMURA, N., B. DE PINTO, R. CASTALDO und J. VERDIERE (1997). *The transcription of NAM7/UPF1 is enhanced in the absence of Cyp1p/Hap1p concomitant with the appearance of an ISF1-NAM7 cotranscript in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett., 409:96–100.
- [ALTAMURA et al. 1992] ALTAMURA, N., O. GROUDINSKY, G. DUJARDIN und P. P. SLO-NIMSKI (1992). *NAM7 nuclear gene encodes a novel member of a family of helicases with a Zn-ligand motif and is involved in mitochondrial functions in Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol., 224:575–587.
- [AMMER et al. 1991] AMMER, H., T. WÖHL und F. LOTTSPREICH (1991). *“In-Gel“ hybridization with genomic DNA-probes*. Elektrophorese Forum 1991. TU München, S. 92–95.
- [ANANTHARAMAN et al. 2002] ANANTHARAMAN, V., E. V. KOONIN und L. ARAVIND (2002). *Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism*. Nucl. Acids. Res., 30(7):1427–1464.
- [ANDERSON et al. 1998] ANDERSON, J., S. JACOBS und R. PARKER (1998). *The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex*. EMBO J., 17(5):1497–1506.
- [ANDRUS et al. 1998] ANDRUS, L., P. SZABO, R. W. GRADY, A. R. HANAUSKE, T. HUIMA-BYRON, B. SLOWINSKA, S. ZAGULSKA und H. M. HANAUSKE-ABEL (1998). *Antiretroviral effects of deoxyhypusyl hydroxylase inhibitors: a hypusine-dependent host cell mechanism for replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)*. Biochem. Pharmacol., 55(11):1807–1818.
- [ASKWITH et al. 1994] ASKWITH, C., D. EIDE, A. VAN HO, P. S. BERNARD, L. LI und DAVIS-KAPLAN, J. (1994). *The FET3 gene of S. cerevisiae encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake*. Cell, 76(2):403–10.
- [BABBAR et al. 2003] BABBAR, N., N. A. IGNATENKO, R. A. CASERO und G. E. W. (2003). *Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon cancer*. J. Biol. Chem., 278(48):47762–47775.

- [BALASUNDARAM et al. 1994a] BALASUNDARAM, D., J. D. DINMAN, C. W. TABOR und H. TABOR (1994a). *SPE1 and SPE2: two essential genes in the Biosynthesis of Polyamines that modulate +1 ribosomal frameshifting in Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol., 176(22):7126–7128.
- [BALASUNDARAM et al. 1994b] BALASUNDARAM, D., J. D. DINMAN, R. B. WICKNER, C. W. TABOR und H. TABOR (1994b). *Spermidine deficiency increases +1 ribosomal frameshifting efficiency and inhibits Ty1 retrotransposition in Saccharomyces cerevisiae*. Cell Biol., 91:172–176.
- [BARBET et al. 1996] BARBET, N. C., U. SCHNEIDER, S. B. HELLIWELL, I. STANSFIELD, M. F. TUIITE und M. N. HALL (1996). *TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast*. Mol. Biol. Cell, 7:25–42.
- [BARTIG et al. 1990] BARTIG, D., H. SCHÜMANN und F. KLINK (1990). *The unique post-translational modification leading to deoxyhypusine or hypusine is a general feature of the archaebacterial kingdom*. Syst. Appl. Microbiol., 13:112–116.
- [BEELMAN et al. 1996] BEELMAN, C. A., A. STEVENS, G. CAPONIGRO, T. E. LAGRANDEUR, L. HATFIELD, D. M. FORTNER und R. PARKER (1996). *An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover*. Nature, 382:642–646.
- [BENARD et al. 1999] BENARD, L., K. CARROLL, R. C. P. VALLE, D. C. MASISON und R. B. WICKNER (1999). *The Ski7 Antiviral Protein Is an EFl-alpha Homolog That Blocks Expression of Non-Poly(A) mRNA in Saccharomyces cerevisiae*. J. Virol., 73(4):2893–2900.
- [BENINATI et al. 1990] BENINATI, S., A. ABBRUZZESE und J. E. FOLK (1990). *High-performance liquid chromatographic method for determination of hypusine and deoxyhypusine*. Anal. Biochem., 184:16–20.
- [BENNE und HERSHEY 1978] BENNE, R. und J. W. B. HERSHEY (1978). *The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes*. J. Biol. Chem., 253:3078–3087.
- [BERNAS und DOBRUCKI 2002] BERNAS, T. und J. DOBRUCKI (2002). *Mitochondrial and Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT With TMRE, JC-1 and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes*. Cytometry, 47:236–242.
- [BEVEC et al. 1996] BEVEC, D., H. JACKSCHE, M. OFT, T. WÖHL, M. HIMMELSPACH, A. PACHER, M. SCHEBESTA, K. KOETTITZ, M. DOBROVNIK, R. CSONGA, F. LOTTSPEICH und J. HAUBER (1996). *Inhibition of HIV-1 Replication in Lymphocytes by Mutants of Rev Cofactor eIF-5A*. Science, 271:1858–1860.
- [BEVEC et al. 1994] BEVEC, D., H. KLIER, W. HOLTER, E. TSCHACHLER, P. VALENT, F. LOTTSPEICH und J. HAUBER (1994). *Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes*. PNAS, 91(23):10829–33.
- [BIEMANN 1988] BIEMANN, K. (1988). *Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure*. Biomed. Environ. Mass Spetrom., 16:99–111.
- [BIRNBOIM und DOILY 1979] BIRNBOIM, H. C. und J. DOILY (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Acids Res., 14:3911–3925.
- [BJELLQVIST et al. 1993] BJELLQVIST, B., G. J. HUGHES, C. PASQUALI, N. PAQUET, F. RAVIER, J. C. SANCHEZ, S. FRUTIGER und D. HOCHSTRASSER (1993). *The focussing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences*. Electrophoresis, 14(10):1023–31.

- [BLAISEAU et al. 2001] BLAISEAU, R. L., E. LESUISSE und J. M. CAMADRO (2001). *A novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast*. *Biol. Chem.*, 276:34221–34226.
- [BOEKE et al. 1987] BOEKE, J. D., J. TRUEHAERT, G. NATSOULIS und G. R. FINK (1987). *5-Fluororotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics*. *Methods Enzymol.*, 154:164–175.
- [BOUCHERIE et al. 1995] BOUCHERIE, H., G. DUJARDIN, M. KERMORGANT, C. MONRI-BOT, P. SLONIMSKI und P. M. (1995). *Two-Dimensional Protein Map of Saccharomyces cerevisiae: Construction of a Gene-Protein Index*. *Yeast*, 11:601–603.
- [BRADFORD 1976] BRADFORD, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem.*, 72:248–254.
- [BRESLAUER et al. 1986] BRESLAUER, K. J., R. FRANK, H. BLOCKER und L. A. MARKY (1986). *Predicting DNA duplex stability from the base sequence*. *PNAS*, 83:3746–3750.
- [DE BRUIN et al. 2000] BRUIN, D. DE, S. M. KANTROW, R. A. LIBERATORE und V. A. ZAKIAN (2000). *Telomere Folding Is Required for the Stable Maintenance of Telomere Position Effects in Yeast*. *Mol. Cell. Biol.*, 20(21):7991–8000.
- [BYERS und GOETSCH 1991] BYERS, B. und L. GOETSCH (1991). *Preparation of yeast cells for thin-section electron microscopy*. *Methods Enzymol.*, 194:602–608.
- [CARAGLIA et al. 2003] CARAGLIA, M., M. MARRA, G. GIUBERTI, A. M. D’ALESSANDRO, A. BALDI, P. TASSONE, S. VENUTA, P. TAGLIAFERRI und A. ABBRUZZESE (2003). *The eucaryotic initiation factor 5A is involved in the regulation of proliferation and apoptosis induced by interferon- α and EGF in Human Cancer Cells*. *J. Biochem.*, 133(6):757–765.
- [CHAMOT und KUHLMEIER 1992] CHAMOT, D. und Y. KUHLMEIER (1992). *Differential Expression of genes encoding the hypusine-containing translation initiation factor, eIF-5A, in Tobacco*. *Nucl. Acids Res.*, 20:665–669.
- [CHAN et al. 2002] CHAN, K. L., D. NEW, S. GHANDHI, F. WONG, C. M. LAM und J. T. WONG (2002). *Transcript levels of the eukaryotic translation initiation factor 5A gene peak at early G(1) phase of the cell cycle in the dinoflagellate Cryptocodinium cohnii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5):2278–2284.
- [CHATTOPADHYAY et al. 2002] CHATTOPADHYAY, M. K., C. W. TABOR und H. TABOR (2002). *Absolute requirement of spermidine for growth and cell cycle progression of fission yeast (Schizosaccharomyces pombe)*. *PNAS*, 99(16):10330–10334.
- [CHEN et al. 2003] CHEN, G., T. G. GHARIB, D. G. THOMAS, C. C. HUANG, D. E. MISEK, R. D. KUICK, T. J. GIORDANO, M. D. IANNETTONI, M. B. ORRINGER, S. M. HANASH und D. G. BEER (2003). *Proteomic analysis of eIF-5A in lung adenocarcinomas*. *Proteomics*, 3(4):496–504.
- [CHEN und CHEN 1997] CHEN, Z. P. und K. Y. CHEN (1997). *Dramatic attenuation of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A during senescence of IMR-90 human diploid fibroblasts*. *J. Cell. Physiol.*, 170(3):248–254.
- [CHEN und CHEN 1997b] CHEN, Z. P. und K. Y. CHEN (1997b). *Marked elevation of hypusine formation activity on eukaryotic initiation factor 5A in v-HA-RAS transformed mouse NIH3T3 cells*. *Cancer Lett.*, 115(2):235–41.

- [CHO et al. 1998] CHO, J. H., S. J. HA, L. R. KAO, T. L. MEGRAW und C.-B. CHAE (1998). *A Novel DNA-Binding Protein Bound to the Mitochondrial Inner Membrane Restores the Null Mutation of Mitochondrial Histone Abf2p in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 18:5712–5723.
- [CHOW et al. 2003] CHOW, K.-S., S. M. LIM und K.-H. HAN (2003). *Characterization of a family of eIF-5A cDNAs from Hevea brasiliensis*. *J. Rubber Res.*, 6(2):107–120.
- [CLEMENT et al. 2002] CLEMENT, P. M., H. M. HANAUSKE-ABEL, E. C. WOLFF, H. K. KLEINMAN und M. H. PARK (2002). *The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro*. *Int. J. Cancer*, 100(4):491–498.
- [CLEMENT et al. 2003] CLEMENT, P. M. J., C. A. HENDERSON, Z. A. JENKINS, Z. SMIT-MCBRIDE, E. C. WOLFF, J. W. B. HERSHEY, M. H. PARK und H. E. JOHANSSON (2003). *Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2*. *Eur. J. Biochem.*, 270:4254–4263.
- [COOPER et al. 1983] COOPER, H. L., M. H. PARK, J. E. FOLK, B. SAFER und R. BRAVERMAN (1983). *Identification of the hypusine-containing protein Hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D*. *PNAS*, 80(7):1854–1857.
- [CORNILLON et al. 1994] CORNILLON, S., C. FOA, J. DAVOUST, N. BUONAVISTA, J. D. GROSS und P. GOLSTEIN (1994). *Programmed cell death in dictyostelium*. *J. Cell Science*, 107:2691–2704.
- [COVEY et al. 1988] COVEY, T. R., R. F. BRONNER, B. I. SHUSHAN und J. HENION (1988). *The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weight by ion-spray mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 2:249–256.
- [CROWE et al. 1990] CROWE, J. S., H. J. COOPER, M. A. SMITH, D. PARKER und D. GEWERT (1990). *Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion*. *Nucl. Acids Res.*, 19:184.
- [CSONGA et al. 1996] CSONGA, R., P. ETTMAYER, R. M. AUE, C. ECKERSKORN, J. EDER und H. KLIER (1996). *Evaluation of the metal ion requirement of the human deoxyhypusine hydroxylase from HeLa cells using a novel enzyme assay*. *FEBS Lett.*, 380(3):209–214.
- [CUI et al. 1996] CUI, Y., J. D. DINMAN und S. PELTZ (1996). *Mof4-1 is an allele of the UPF1/IFS2 gene which affects both mRNA turnover and -1 ribosomal frameshifting efficiency*. *EMBO J.*, 15:5726–5736.
- [CULBERTSON und LEEDS 2003] CULBERTSON, M. R. und P. F. LEEDS (2003). *Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution*. *Curr. Op. Gen. Dev.*, 13:207–214.
- [DAHLSEID et al. 2003] DAHLSEID, J. N., J. LEW-SMITH, M. J. LELIVELT, S. ENOMOTO, A. FORD, M. DESRUISSEAU, M. MCCLELLAN, N. LUE, M. R. CULBERTSON und J. BERMAN (2003). *mRNAs Encoding Telomerase Components and Regulators Are Controlled by UPF Genes in Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 2(1):134–142.
- [DAS et al. 2003] DAS, B., J. S. BUTLER und F. SHERMAN (2003). *Degradation of Normal mRNA in the Nucleus of Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 23(16):5502–5515.
- [DE PINTO et al. 2004] DE PINTO, B., R. LIPPOLIS, R. CASTALDO und N. ALTAMURA (2004). *Overexpression of UPF1p compensates for mitochondrial splicing deficiency independently of its role in mRNA surveillance*. *Molec. Microbiol.*, 51(4):1129–1142.

- [DECKER C. J. 1993] DECKER C. J., PARKER R. (1993). *A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation*. *Genes Dev.*, 7(8):1632–43.
- [DECOSTER et al. 1993] DECOSTER, E., A. VASSAL und G. FAYE (1993). *MSS1, a nuclear-encoded mitochondrial GTPase involved in the expression of COX1 subunit of cytochrome c oxidase*. *J. Mol. Biol.*, 232(5):79–88.
- [DINMAN et al. 2000] DINMAN, J., M. RUIZ-ECHEVARRIA, W. WANG und S. PELTZ (2000). *The case for the involvement of the Upf3p in programmed -1 ribosomal frameshifting*. *RNA*, 6:1685–1686.
- [DINMAN und WICKNER 1995] DINMAN, J. und R. B. WICKNER (1995). *5S rRNA is involved in fidelity of translational reading frame*. *Genetics*, 141:95–105.
- [DINMAN und KINZY 1997] DINMAN, J. D. und T. G. KINZY (1997). *Translational misreading: mutations in translation elongation factor 1 α differentially affect programmed ribosomal frameshifting and drug sensitivity*. *RNA*, 3:870–881.
- [DRESSELHAUS et al. 1999] DRESSELHAUS, T., S. CORDTS und H. LORZ (1999). *A transcript encoding translation initiation factor eIF-5A is stored in unfertilized egg cells of maize*. *Plant Mol. Biol.*, 39(5):1063–71.
- [DUNCKLEY und PARKER 1999] DUNCKLEY, T. und R. PARKER (1999). *The DCP2 protein is required for mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae and contains a functional MutT motif*. *EMBO J.*, 18(19):5411–5422.
- [DZIAK et al. 2003] DZIAK, R., D. LEISHMAN, M. RADOVIC, B. K. TYE und K. YANKULOV (2003). *Evidence for a Role of MCM (Mini-chromosome Maintenance)5 in Transcriptional Repression of Sub-telomeric and Ty-proximal Genes in Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 278(30):27372–27381.
- [ECKERSKORN 1990] ECKERSKORN, C. (1990). *Charakterisierung und Identifizierung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen über Aminosäuresequenzanalyse und Aminosäureanalyse*. Doktorarbeit, Doktorarbeit, LMU München.
- [ELFANG et al. 1999] ELFANG, C., O. ROSORIUS, L. HOFER, H. JAKSCHE und J. HAUBER (1999). *Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals*. *Cell Biol.*, 96:6229–6234.
- [ENOMOTO et al. 2002] ENOMOTO, S., L. GLOWCZEWSKI und J. G. BERMAN (2002). *MEC3, MEC1, and DDC2 are essential components of a telomere checkpoint pathway required for cell cycle arrest during senescence in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 13:2626–2638.
- [ERLICH et al. 1991] ERLICH, H. A., D. GELFAND und J. J. SNINSKY (1991). *Recent advances in the polymerase chain reaction*. *Science*, 252:1643–1651.
- [FACCHIANO et al. 2001] FACCHIANO, A. M., P. STIUSO, M. L. CHIUSANO, M. CARAGLIA, G. GIUBERTI, M. MARRA, A. ABBRUZZESE und G. COLONNA (2001). *Homology modelling of the human eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A)*. *Protein Eng.*, 14(11):881–890.
- [FAZEKAS DE ST GROTH et al. 1963] FAZEKAS DE ST GROTH, S., R. G. WEBSTER und A. DAYTNER (1963). *Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips*. *Biochim. Biophys. Acta*, 71:377–391.

- [FEINBERG und VOGELSTEIN 1983] FEINBERG, A. P. und B. VOGELSTEIN (1983). *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity*. Anal. Biochem., 132:6–13.
- [FEY et al. 1997] FEY, S. J. ANF NAWROCKI, A., M. R. LARSEN, A. GÖRG, P. ROEPSTORFF, G. N. SKEWS, R. WILLIAMS und P. M. LARSEN (1997). *Proteome analysis of Saccharomyces cerevisiae: a methodological outline*. Electrophoresis, 18(8):1361–72.
- [FOLK et al. 1980] FOLK, J.E., M. H. PARK, S. I. CHUNG, J. SCHRODE, E. P. LESTER und H. L. COOPER (1980). *Polyamines as physiological substrates for transglutaminases*. J. Biol. Chem., 255:3695–3670.
- [FRIDEN und SCHIMMEL 1990] FRIDEN, P. und P. SCHIMMEL (1990). *LEU3 of Saccharomyces cerevisiae activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence*. Mol. Cell. Biol., 7:2690–7.
- [FRISCHMEYER et al. 2002] FRISCHMEYER, P. A., A. VAN HOOF, K. O'DONNELL, A. L. GUERRERIO, R. PARKER und H. C. DIETZ (2002). *An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons*. Science, 295(5563):2258–61.
- [FROEHLICH und MADEO 2000] FROEHLICH, KAI-UWE und F. MADEO (2000). *Apoptosis in yeast - a monocellular organism exhibits altruistic behaviour*. FEBS Lett., 473:6–9.
- [FU et al. 2003] FU, X., C. NG und C. LIANG (2003). *Cdc48p is required for the cell cycle commitment point at start via degradation of the G1-CDK inhibitor Far1p*. J. Cell Biol., 163(1):21–26.
- [GARÍ et al. 1997] GARÍ, E., L. PIEDRAFITA, M. ALDEA und E. HERRERO (1997). *A set of vectors with a tetracycline-regulatable promotor system for modulated gene expression in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 13:837–848.
- [GATFIELD et al. 2003] GATFIELD, D., L. UNTERHOLZNER, F. D. CICCARELLI, P. BORK und E. IZAURRALDE (2003). *Nonsense-mediated mRNA decay in Drosophila: at the intersection of the yeast and mammalian pathways*. EMBO J., 22(15):3960–3970.
- [GAVRIELI et al. 1992] GAVRIELI, Y., Y. SHERMAN und S. A. BEN-SASSON (1992). *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J. Cell Biol., 119:493–501.
- [GERNER et al. 1986] GERNER, E. W., P. S. MAMONT, A. BERNHARDT und M. SIAT (1986). *Post-translational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D by spermidine in rat hepatoma cells*. Biochem. J., 239(2):379–386.
- [GONZALES et al. 2001] GONZALES, C. I., A. BHATTACHARYA, W. WANG und S. W. PELTZ (2001). *Nonsense-mediated mRNA decay in Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 274:15–25.
- [GORDON et al. 1987] GORDON, E. D., R. MORA, S. C. MEREDITH, C. LEE und S. L. LINDQUIST (1987). *Eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein, is conserved among eukaryotes*. J. Biol. Chem., 262(34):16585–9.
- [GOTTSCHLING et al. 1990] GOTTSCHLING, D. E., O. M. APARICIO, B. L. BILLINGTON und V. A. ZAKIAN (1990). *Position effect at S. cerevisiae telomeres; reversible repression of Pol II transcription*. Cell, 63:751–62.
- [GÖRG et al. 2000] GÖRG, A., C. OBERMAIR, G. BOGUTH, G. HARDER, B. SCHEIBE, R. WILDGRUBER und W. WEISS (2000). *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 21:1037–1053.

- [GÖRG et al. 1988] GÖRG, A., W. POSTEL und S. GÜNTHER (1988). *Two-dimensional electrophoresis. The dients*. Electrophoresis, 9:531–546.
- [GÖRG 1999] GÖRG, ANGELIKA (1999). *IPG-Dalt of very Alkaline Proteins*. Meth. Mol. Biol., 112:197–208.
- [GRODBERG et al. 1988] GRODBERG, J., M. D. LUNDRIGAN, D. TOLEDO, W. F. MANGEL und J. J. DUNN (1988). *Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the ompT gene of Escherichia coli K-12*. Nucl. Acids Res., 16(3):1209.
- [GUAN et al. 2001] GUAN, X. Y., J. S. SHAM, T. C. TANG, Y. FANG, K. K. HUO und J. M. YANG (2001). *Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer*. Cancer Res., 61(9):3806–3809.
- [HANAHAHAN 1983] HANAHAHAN, D. (1983). *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. Mol. Biol., 110:557–580.
- [HANAUSKE-ABEL et al. 1995] HANAUSKE-ABEL, H. M., B. SLOWINSKA, S. ZAGULSKA, R. C. WILSON, L. STAIANO-COICO, A. R. HANAUSKE, T. MCCAFFREY und P. SZABO (1995). *Detection of a sub-set of polysomal mRNAs associated with modulation of hypusine formation at the G1-S boundary. Proposal of a role for eIF-5A in onset of DNA replication*. FEBS Lett., 366(2-3):92–98.
- [HARLOW und LANE 1988] HARLOW, E. und D. LANE (1988). *Antibodies - A laboratory manual*. In: Harlow, E. and Lane, D.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, 1. Aufl.
- [HARRISON et al. 2002] HARRISON, PAUL, A. KUMAR, N. LAN, N. ECHOLS, M. SNYDER und M. B. GERSTEIN (2002). *A small reservoir of disabled ORFs in the Saccharomyces cerevisiae genome and its implications for the dynamics of proteome evolution*. J. Mol. Biol., 316:409–419.
- [HART et al. 2002] HART, R. A., J. N. BILLAUD, S. J. CHOI und T. R. PHILLIPS (2002). *Effects of 1,8-diaminooctane on the FIV Rev regulatory system*. Virology, 304(1):97–104.
- [HE et al. 2003] HE, F., X. LI, P. SPATRICK, R. CASILLO, S. DONG und A. JACOBSON (2003). *Genome-Wide Analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast*. Mol. Cell, 12:1439–1452.
- [HE et al. 1993] HE, F., S. PELTZ, J. DONAHUE, M. ROSBASH und A. JACOBSON (1993). *Stabilization and Ribosome Association of Unspliced Pre-mRNAs in a Yeast upf1- Mutant*. PNAS, 90(15):7034–7038.
- [HEBY und PERSSON 1990] HEBY, O. und L. PERSSON (1990). *Molecular genetics of polyamine synthesis in eucaryotic cells*. Trends Biochem. Sci., 15(4):153–158.
- [HEIKKINEN et al. 2003] HEIKKINEN, H. L., S. A. LLEWELLYN und C. A. BARNES (2003). *Initiation-mediated mRNA decay in yeast affects heat-shock mRNAs, and works through de-capping and 5'-to-3' hydrolysis*. Nucl. Acids. Res., 31(14):4006–4016.
- [HEUKESHOVEN und DERNICK 1985] HEUKESHOVEN, J. und R. DERNICK (1985). *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining*. Electrophoresis, 6:103–112.
- [HINNEBUSCH 1992] HINNEBUSCH, A. G. (1992). *General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in Saccharomyces cerevisiae*. In: E. W. Jones, J. R. Pringle and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, 1. Aufl.

- [HO et al. 2000] HO, JENNIFER HEI-NGAM, G. KALLSTROM und A. W. JOHNSON (2000). *Nmd3p Is a Crm1p-dependent Adapter Protein for Nuclear Export of the Large Ribosomal Subunit*. J. Cell Biol., 151(5):1057–1066.
- [HOCHSTRASSER et al. 1988] HOCHSTRASSER, D. F., A. PATCHORNIK und C. R. MERRIL (1988). *Development of Polyacrylamide Gels that Improve the Separation of Proteins and their Detection by Silver Staining*. Anal. Biochem., 173:412–423.
- [HODGSON et al. 1994] HODGSON, V., G. M. WALKER und D. BUTTON (1994). *A rapid colorimetric assay of killer toxin activity in yeast*. FEMS Microbiol. Lett., 120:201–206.
- [HOFFMAN und WINSTON 1987] HOFFMAN, C.S. und F. WINSTON (1987). *A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli*. Gene, 57:267–272.
- [HOFMANN et al. 2001] HOFMANN, W., B. REICHART, A. EWALD, E. MULLER, I. SCHMITT, R. H. STAUBER, F. LOTTSPPEICH, B. M. JOCKUSCH, U. SCHEER, J. HAUBER und M. C. DABAUVALLE (2001). *Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin*. J. Cell Biol., 152(5):895–910.
- [HOLSTEGE et al. 1998] HOLSTEGE, F. C. P., E. G. JENNINGS, J. J. WYRICK, T. I. LEE, C. J. HENGARTNER, M. R. GREEN, T. R. GOLUB, E. S. LANDER und R. A. YOUNG (1998). *Dissecting the regulatory circuitry of a Eukaryotic Genome*. Cell, 95:717–728.
- [HOUGAARD 1992] HOUGAARD, D. M. (1992). *Polyamine cytochemistry: Localisation and possible functions of polyamines*. Int. Rev. Cytol., 138:55–88.
- [IJPMA und GREIDER 2003] IJPMA, A. S. und C. W. GREIDER (2003). *Short Telomeres Induce a DNA Damage Response in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell, 14(3):987–1001.
- [IMAOKA und NAKAJIMA 1973] IMAOKA, N. und T. NAKAJIMA (1973). *Hypusine n-6-4 amino-2-hydroxybutyl-2 6-diamino hexanoic-acid in tissue proteins of mammals*. Biochim. Biophys. Acta, 320:97–103.
- [JAKUS et al. 1993] JAKUS, J., E. C. WOLFF, M. H. PARK und J. E. FOLK (1993). *Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines*. J. Biol. Chem., 268(18):13151–9.
- [JANSSON et al. 2000] JANSSON, B. P. MATTIAS, L. MALANDRIN und H. E. JOHANSSON (2000). *Cell Cycle Arrest in Archaea by the Hypusination Inhibitor N1-Guanyl-1,7-Diaminoheptane*. J. Bacteriol., 182(4):1158–1161.
- [JAO und CHEN 2002] JAO, L. D. und K. Y. CHEN (2002). *Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging*. J. Cell Biochem., 86(3):590–600.
- [JENKINS et al. 2001] JENKINS, Z. A., P. G. HAAG und H. E. JOHANSSON (2001). *Human eIF-5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation factor 5A with tissue-specific expression*. Genomics, 71(1):101–109.
- [JIANG et al. 1997] JIANG, W., Y. HOU und M. INOUE (1997). *CspA, the major cold-shock protein of Escherichia coli is an RNA chaperone*. J. Biol. Chem., 272:196–202.
- [JIN et al. 2003a] JIN, B. F., K. HE, M. R. HU, M. YU, B. F. SHEN und X. M. ZHANG (2003a). *The effect of eIF-5A on the G1-S in cell cycle regulation*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi (Chinese), 11(4):325–328.

- [JIN et al. 2003b] JIN, B. F., K. HE, H. X. WANG, J. WANG, T. ZHOU, Y. LAN, M. R. HU, K. H. WEI, S. C. YANG, B. F. SHEN und X. M. ZHANG (2003b). *Proteomic analysis of ubiquitin-proteasome effects: insight into the function of eukaryotic initiation factor 5A*. *Oncogene*, 22(31):4819–4830.
- [JOE et al. 1997] JOE, Y. A., E. C. WOLFF, Y. B. LEE und P. M. H. (1997). *Enzyme-substrate intermediate at a specific lysine residue is required for deoxyhypusine synthesis. The role of Lys329 in human deoxyhypusine synthase*. *J. Biol. Chem.*, 272(51):32679–85.
- [JOHNSON und KOLODNER 1995] JOHNSON, A. W. und R. D. KOLODNER (1995). *Synthetic lethality of *sep1 (xrn1) ski2* and *sep1 (xrn1) ski3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* is independent of killer virus and suggests a general role for these genes in translation control*. *Mol. Cell. Biol.*, 15(5):2719–2727.
- [JONES 1991] JONES, E. W. (1991). *Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae**. *Methods Enzymol.*, 194:428–453.
- [KANG und HERSHEY 1994] KANG, H. A. und J. W. B. HERSHEY (1994). *Effect of initiation factor *eIF-5A* depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae**. *J. Biol. Chem.*, 269(6):3934–3940.
- [KANG et al. 1992] KANG, H. A., H. G. SCHWELBERGER und J. W. B. HERSHEY (1992). *The two genes encoding the protein synthesis initiation factor *eIF-5A* in *Saccharomyces cerevisiae**. *Mol. Gen. Genet.*, 233:487–490.
- [KANG et al. 2002a] KANG, K. R., J.-S. KIM, S. I. CHUNG, M. H. PARK, Y. W. KIM, D. LIM und S.-Y. LEE (2002a). *Deoxyhypusine synthase is phosphorylated by protein kinase C in vivo as well as in vitro*. *Exp. Mol. Med.*, 34(6):489–495.
- [KANG et al. 2002b] KANG, K. R., J.-S. KIM, S. I. CHUNG, M. H. PARK, Y. W. KIM, D. LIM und S.-Y. LEE (2002b). *Deoxyhypusine synthase is phosphorylated by protein kinase C in vivo as well as in vitro*. *Exp. Mol. Med.*, 69(5):489–495.
- [KATAHIRA et al. 1995] KATAHIRA, J., T. ISHIZAKI, H. SAKAI, A. ADACHI, K. YAMAMOTO und H. SHIDA (1995). *Effects of translation initiation factor *eIF-5A* on the functioning of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus Rev inhibited trans dominantly by a Rex mutant deficient in RNA binding*. *J. Virol.*, 69(5):3125–3133.
- [KAWAI und HAYASHIZAKI 2001] KAWAI, J. ET AL. und Y. HAYASHIZAKI (2001). *Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection*. *Nature*, 409:685–690.
- [KEMPER et al. 1976] KEMPER, W., K. BERRY und W. MERRICK (1976). *Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors *M2B α* and *M2B β** . *J. Biol. Chem.*, 251:5551–5557.
- [KESSEL 1992] KESSEL, R. G. (1992). *Annulate Lamellae: Last frontier in cellular organelles*. *Int. Rev. Cytol.*, 133:43–120.
- [KIM et al. 1998] KIM, K. K., L.-W. HUNG, H. YOKOTA, R. KIM und S.-H. KIM (1998). *Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 resolution*. *PNAS*, 95:10419–10424.
- [KIM et al. 1994] KIM, N. W., M. A. PIATYSZEK, K. R. PROWSE, C. B. HARLEY und M. D. WEST (1994). *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. *Science*, 266:2011–2015.
- [KING und BLAKESELEY 1986] KING, P. V. und R. W. BLAKESELEY (1986). *Optimizing DNA ligations for transformation*. *Focus*, 8:1–3.

- [KIVIRIKKO und MYLLYLÄ 1982] KIVIRIKKO, K. J. und R. MYLLYLÄ (1982). *Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes*. *Methods enzymol.*, 82:245–319.
- [KLIER 1994] KLIER, H. (1994). *Proteinchemische Charakterisierung und funktionelle Untersuchung der Hypusin-haltigen Proteine in Saccharomyces cerevisiae*. Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.
- [KLIER und LOTTSPREICH 1992] KLIER, H. und F. LOTTSPREICH (1992). *Detection of the hypusine-containing protein (HP=eIF-5A) in crude yeast extracts by two-dimensional Western blots*. *Electrophoresis*, 13:732–735.
- [KRUFT et al. 2001] KRUFT, V., H. EUBEL, L. JÄNSCH, W. WERHAHN und H.-P. BRAUN (2001). *Proteomic Approach to Identify Novel Mitochondrial Proteins in Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 127:1694–1710.
- [KWAIST et al. 2002] KWAIST, K. E., L.-C. LAI, D. T. JAMES, S. AREF und P. V. BURKE (2002). *Genomic Analyses of Anaerobically Induced Genes in Saccharomyces cerevisiae: Functional Roles of Rox1 and Other Factors in Mediating the Anoxic Response*. *J. Bacteriol.*, 184(1):250–265.
- [LAEMMLI 1970] LAEMMLI, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227:680–685.
- [LALANDE und HANAUSKE-ABEL 1990] LALANDE, M. und H. M. HANAUSKE-ABEL (1990). *A new compound which reversibly arrests T lymphocyte cell cycle near G1/S boundary*. *Exp. Cell. Res.*, 188:117–121.
- [LEE und FOLK 1998] LEE, Y. B. und J. E. FOLK (1998). *Branched-chain and unsaturated 1,7-diaminoheptane derivatives as deoxyhypusine synthase inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem.*, 6(3):253–270.
- [LEE et al. 2002] LEE, Y. B., H. K. KIM, H. E. PARK, M. H. PARK und Y. A. JOE (2002). *Effect of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on endothelial cell growth, differentiation and apoptosis*. *Mol. Cell. Biol.*, 23(1-2):69–76.
- [LELIVELT und CULBERTSON 1999] LELIVELT, M. J. und M. R. CULBERTSON (1999). *Yeast Upf Proteins Required for RNA Surveillance Affect Global Expression of the Yeast Transcriptome*. *Mol. Cell. Biol.*, 19(10):6710–6719.
- [LENDVAY et al. 1996] LENDVAY, T. S., M. D. K., J. SAH, B. BALASUBRAMANIAN und V. LUNDBLAD (1996). *Senescence mutants of Saccharomyces cerevisiae with a defect in telomere replication identify three additional EST genes*. *Genetics*, 144(4):1399–412.
- [LEW et al. 1998] LEW, J. E., S. ENOMOTO und J. BERMAN (1998). *Telomere Length Regulation and Telomeric Chromatin Require the Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway*. *Mol. Cell. Biol.*, 18(10):6121–6130.
- [LIANG und PARDEE 1992] LIANG, P. und A. B. PARDEE (1992). *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction*. *Science*, 257:967–971.
- [LIAO et al. 1998] LIAO, D. I., E. C. WOLFF, M. H. PARK und D. R. DAVIES (1998). *Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site*. *Structure*, 6(1):23–32.
- [LIN et al. 1996] LIN, R.-J., D.-H. KIM, D. CASTANOTTO, S. WESTAWAY und J. J. ROSSI (1996). *In: Krieg, P.A. (Hrg.) A laboratory guide to RNA*. Wiley Liss, New York, 1. Aufl.

- [LIPOWSKI et al. 2000] LIPOWSKI, G., F. R. BISCHOFF, P. SCHWARZMAIER, R. KRAFT, S. KOSTKA, E. HARTMANN, U. KUTAY und D. GÖHRLICH (2000). *Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes*. EMBO J., 16:4362–4371.
- [LIU et al. 1997] LIU, Y. P., M. NEMEROFF, Y. P. YAN und K. Y. CHEN (1997). *Interaction of Eukaryotic Initiation Factor 5A with the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Responsive Element RNA and U6 snRNA Requires Deoxyhypusine or Hypusine Modification*. Biol. Signals, 6:166–174.
- [LODI et al. 1995] LODI, P. J., J. A. ERNST, J. KUSZEWSKI, A. B. HICKMAN, A. ENGELMAN, R. CRAIGIE und A. M. GRONENBORN (1995). *Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase*. Biochemistry, 34:9826–9833.
- [LOSSON und LACROUTE 1979] LOSSON, R. und F. LACROUTE (1979). *Interference of non-sense mutations with eukaryotic messenger RNA stability*. PNAS, 76:5134–5137.
- [LOTTSPREICH und ZORBAS 1998] LOTTSPREICH, F. und H. ZORBAS (1998). *Bioanalytik. Spektrum*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1. Aufl.
- [LU et al. 2003] LU, Y.M., Y. R. LIN, A. TSAI, Y. HSAO, C. C. LI und M. Y. CHENG (2003). *Dissecting the pet 18-mutation in Saccharomyces cerevisiae: HTL1 encodes a 7-kDa polypeptide that interacts with components of the RSC-complex*. Mol. Genet. Genom., 269(3):321–30.
- [MADEO et al. 1999] MADEO, F., E. FRÖHLICH, M. LIGR, M. GREY, S. J. SIGRIST, D. H. WOLF und K.-U. FRÖHLICH (1999). *Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast*. J. Cell Biol., 144(4):757–767.
- [MAGDOLEN et al. 1994] MAGDOLEN, V., H. KLIER, T. WÖHL, F. KLINK, J. HAUBER und F. LOTTSPREICH (1994). *The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved*. Mol. Gen. Genet., 244(6):646–652.
- [MANGUS et al. 2003] MANGUS, D. A., M. C. EVANS und A. JACOBSON (2003). *Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression*. Genome Biol., 4(7):223.
- [MANN et al. 1989] MANN, M., C. K. MENG und J. B. FENN (1989). *Interpreting mass spectra of multiply charged ions*. Anal. Chem., 61:1702–1708.
- [MASISON et al. 1995] MASISON, D. C., A. BLANC, J. C. RIBAS, K. CARROLL, N. SONENBERG und R. B. WICKNER (1995). *Decoying the cap- mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)- mRNA surveillance by a yeast antiviral system*. Mol. Cell. Biol., 15(5):2763–2771.
- [MERRICK et al. 1975] MERRICK, W. C., W. M. KEMPER und W. F. ANDERSON (1975). *Purification and characterisation of homogeneous initiation factor M2 α from rabbit reticulocytes*. J. Biol. Chem., 250:556–5562.
- [MESKAUSKAS und DINMAN 2001] MESKAUSKAS, A. und J. D. DINMAN (2001). *Ribosomal protein L5 helps anchor peptidyl-tRNA to the P-site in Saccharomyces cerevisiae*. RNA, 7:1084–1096.
- [METHA und SMITH 1989] METHA, K. D. und M. SMITH (1989). *Identification of an upstream repressor site controlling the expression of an anaerobic gene (ANB1) in Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 264:8670–8675.

- [MEWES et al. 2002] MEWES, H.W., D. FRISHMAN, U. GÜLDENER, G. MANNHAUPT, K. MAYER, M. MOKREJS, B. MORGENSTERN, M. MÜNSTERKOETTER, S. RUDD und B. WEIL (2002). *MIPS: a database for genomes and protein sequences*. Nucl. Acids Res., 30(1):31–34.
- [MUHLRAD et al. 1994] MUHLRAD, D., C. J. DECKER und R. PARKER (1994). *Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-3' digestion of the transcript*. Genes Dev., 8:855–866.
- [MUHLRAD et al. 1995] MUHLRAD, D., C. DECKER und R. PARKER (1995). *Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA*. Mol. Cell. Biol., 15(4):2145–2156.
- [MUHLRAD und PARKER 1999] MUHLRAD, D. und R. PARKER (1999). *Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance*. RNA, 5(10):1299–1307.
- [MURZIN 1993] MURZIN, A. G. (1993). *OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences*. EMBO J., 12:861–867.
- [NAKAGAWA et al. 1999] NAKAGAWA, A., T. NAKASHIMA, T. TANIGUCHI, M. HOSAKA, H. KIMURA und I. TANAKA (1999). *The three-dimensional structure of the RNA-binding domain of ribosomal protein L2; a protein at the peptidyl transferase center of the ribosome*. EMBO J., 18:1459–1467.
- [NAKAJIMA et al. 1971] NAKAJIMA, T., T. MATSUBAYASHI, Y. KAKIMOTO und I. SANO (1971). *Distribution of hypusine N⁶-(4-amino-2-hydroxybutyl)-2,6-diaminohexanoic acid in mammalian organs*. Biochim. Biophys. Acta, 252:92–97.
- [NAMY et al. 2003] NAMY, O., G. DUCHATEAU-NGUYEN, I. HATIN, S. HERMANN-LE DENMAT, M. TERMIER und J. P. ROUSSET (2003). *Identification of stop codon readthrough genes in Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acid Res., 31(9):2289–2296.
- [NASS et al. 1997] NASS, R., K. W. CUNNINGHAM und R. RAO (1997). *Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺/ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance*. J. Biol. Chem., 272:26145–52.
- [NONATO et al. 2002] NONATO, M. C., J. WIDOM und J. CLARDY (2002). *Crystal structure of the N-terminal segment of human eukaryotic translation initiation factor 2 α* . J. Biol. Chem., 277:17057–17061.
- [NORAIS et al. 1991] NORAIS, N., D. PROMÉ und J. VELOURS (1991). *ATP synthase of yeast mitochondria*. J. Biol. Chem., 266(25):16541–16549.
- [OTASEK 1997] OTASEK, A. (1997). *vorl. Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried*.
- [PAGE 1996] PAGE, R. D. M. (1996). *TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers*. Comp. Appl. Biosci., 12:357–358.
- [PARK et al. 2003] PARK, J.-H., E. C. WOLFF, J. E. FOLK und M. H. PARK (2003). *Reversal of the Deoxyhypusine Synthesis Reaction*. J. Biol. Chem., 35:32683–32691.
- [PARK 1987] PARK, M. H. (1987). *Regulation of biosynthesis of hypusine in Chinese hamster ovary cells. Evidence for eIF-4D precursor polypeptides*. J. Biol. Chem., 262(26):12730–4.

- [PARK et al. 1982] PARK, M. H., H. L. COOPER und J. E. FOLK (1982). *The biosyntheses of protein-bound hypusine (N^ε-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine)*. J. Biol. Chem., 257:7217–7222.
- [PARK et al. 1998] PARK, M. H., Y. A. JOE und K. R. KANG (1998). *Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 273(3):1677–83.
- [PARK et al. 1993] PARK, M. H., E. C. WOLFF und J. E. FOLG (1993). *Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation?*. Trends Biochem. Sci., 18(12):475–479.
- [PARK et al. 1994] PARK, M. H., E. C. WOLFF, Y. B. LEE und J. E. FOLK (1994). *Anti-proliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines*. J. Biol. Chem., 269(45):27827–32.
- [PARK et al. 1981] PARK, M.H., H. L. COOPER und J. E. FOLK (1981). *Identification of Hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor*. PNAS, 78:2869–2873.
- [PAZ et al. 1984] PAZ, M. A., B. M. TORRELIO und P. M. GALLOP (1984). *Hydralazin inhibition of the post-translational hydroxylation of deoxyhypusine, a polyamine-derived amino acid*. Biochem. Pharmacol., 33(5):779–85.
- [PEARSON 1990] PEARSON, W. R. (1990). *Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA*. Methods Enzymol., 183:63–98.
- [PEAT et al. 1998] PEAT, T. S., J. NEWMAN, G. S. WALDO, J. BERENDZEN und T. C. TERWILLIGER (1998). *Structure of translation initiation factor 5A from Pyrobaculum aerophilum at 1.75 Å resolution*. Structure, 6(9):1207–1213.
- [PELTZ und JACOBSON 2000] PELTZ, S. W. und A. JACOBSON (2000). *Destabilization of nonsense-containing transcripts in Saccharomyces cerevisiae*. In *Translational Control (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N., eds.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1st Aufl.
- [PELTZ et al. 1993b] PELTZ, S. W., C. TROTTA, F. HE, A. BROWN, J. L. DONAHUE, E. WELCH und A. JACOBSON (1993b). *Identification of the cis-acting sequences and trans-acting factors involved in nonsense-mediated mRNA decay*. In *Protein Synthesis and Targeting in Yeast. M Truite, J McCarthy, A Brown and F Sherman, eds.*, Bd. H71. Berlin: Springer-Verlag.
- [PENEFSKY und CROSS 1991] PENEFSKY, H. S. und R. L. CROSS (1991). *Structure and Mechanism of F₁F₀-ATP-Synthases and ATPases*. Enzymol. Mol. Biol., 64:173–214.
- [PEREZ und CALONGE 2002] PEREZ, P. und T. M. CALONGE (2002). *Yeast Protein Kinase C*. J. Biochem., 132:513–517.
- [POCHON und COHEN 1972] POCHON, F. und S. S. COHEN (1972). *4-Thiouridine and the conformation of E. coli tRNA induced by spermidine*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47(4):720–726.
- [POLYMENIS und SCHMIDT 1997] POLYMENIS, M. und E. V. SCHMIDT (1997). *Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast*. Genes Dev., 11(19):2522–2531.
- [POSAS et al. 1998] POSAS, F., M. TAKEKAWA und H. SAITO (1998). *Signal transduction by MAP kinases in budding yeast*. Curr. Opin. Microbiol., 1:175–182.

- [PROTCHENKO et al. 2001] PROTCHENKO, O., T. FEREA, J. RASHFORD, J. TIEDEMAN, P. O. BROWN, D. BOTSTEIN und C. C. PHILPOTT (2001). *Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in Saccharomyces cerevisiae*. Biol. Chem., 276:49244–49250.
- [RABILLOUD 2000] RABILLOUD, T. (2000). *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*. Springer, 1. Aufl.
- [RACHIDI et al. 2000] RACHIDI, N., M. J. MARTINEZ, P. BARRE und B. BLONDIN (2000). *Saccharomyces cerevisiae PAU genes are induced by anaerobiosis*. Mol. Microbiol., 35(6):1421–1430.
- [RAMAGLI 1999a] RAMAGLI, L. S. (1999a). *Quantifying protein in 2-D PAGE Solubilization Buffers*. Methods Mol. Biol., 112:99–101.
- [RAMAGLI 1999b] RAMAGLI, L. S. (1999b). *Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers*. Methods Mol. Biol., 112:99–103.
- [RENÓ et al. 2000] RENÓ, F., A. TONTINI, S. BURATTINI, S. PAPA, E. FALCIERI und G. TARZIA (2000). *Mimosine induces apoptosis in the HL60 human tumor cell line*. Apoptosis, 4(6):469–477.
- [RIGAUT et al. 1999] RIGAUT, G., A. SHEVCHENKO, B. RUTZ, M. WILM, M. MANN und B. SÉRAPHIN (1999). *A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration*. Nature Biotech., 17:1030–1032.
- [ROBERTS et al. 2000] ROBERTS, C. J., B. NELSON, M. J. MARTON, R. STOUGHTON, M. R. MEYER, H. A. BENNETT, Y. D. HE, H. DAI, W. L. WALKER, T. R. HUGHES, M. TYERS, C. BOONE und S. H. FRIEND (2000). *Signaling and circuitry of multiple MAPK Pathways revealed by matrix of global gene expression profiles*. Science, 287:873–880.
- [ROSORIUS et al. 1999] ROSORIUS, O., B. REICHART, F. KRATZER, P. HEGER, M. DABAUVALLE und J. HAUBER (1999). *Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1*. J. Cell. Sci., 112(14):2369–2380.
- [ROSS 1997] ROSS, JEFF (1997). *A hypothesis to explain why translation inhibitors stabilize mRNAs in mammalian cells: mRNA stability and mitosis*. BioEssays, 19:527–529.
- [ROUSE und JACKSON 1997] ROUSE, J und S. P. JACKSON (1997). *Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage*. Science, 297:547–551.
- [RUHL et al. 1993] RUHL, M., M. HIMMELSPACH, G. M. BAHR, F. HAMMERSCHMID, H. JAKSCHE, B. WOLFF, H. ASCHAUER, G. K. FARRINGTON, H. PROBST und D. BEVEC (1993). *Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation*. J. Cell. Biol., 123:1309–1320.
- [RUIZ-ECHEVARRIA und PELTZ 2000] RUIZ-ECHEVARRIA, M. J. und S. W. PELTZ (2000). *The RNA Binding Protein Pub1 Modulates the Stability of Transcripts Containing Upstream Open Reading Frames*. Mol. Cell. Biol., 101:741–751.
- [RUIZ et al. 1998] RUIZ, M. J., J. M. YASEBCHAK, X. HAN, J. D. DINMAN und S. W. PELTZ (1998). *The Upf3p is a component of the surveillance complex that monitors both translation and mRNA turnover and affects viral maintenance*. PNAS, 95:8721–8726.
- [SAKAMATO et al. 1988] SAKAMATO, Y., N. KAWAKAMI und T. SASAGAWA (1988). .. J. Chromotogr., 442:69–79.

- [SAMBROOK et al. 1989] SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH und T. MANIATIS (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2. Aufl.
- [SANCHEZ et al. 1996] SANCHEZ, J. C., O. GOLAZ, S. FRUTIGER, D. SCHALLER, R. D. APPEL, A. BAIROCH, G. J. HUGHES und D. F. HOCHSTRASSER (1996). *The yeast SWISS-2DPAGE database*. Electrophoresis, 17:556–565.
- [SANDELL und ZAKIAN 1993] SANDELL, L. L. und V. A. ZAKIAN (1993). *Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss*. Cell, 75:729–39.
- [SANO et al. 1986] SANO, A., K. KOTANI und Y. KAKIMOTO (1986). *Isolation and identification of α -(γ -aminobutyryl)-hypusine from bovine brain*. J. Neurochem., 46(4):1046–9.
- [SANO et al. 1987] SANO, A., K. KOTANI und Y. KAKIMOTO (1987). *Distribution of α -(γ -aminobutyryl)-hypusine*. J. Neurochem., 48(3):681–3.
- [SARKAR und SOMMER 1990] SARKAR, G. und S. S. SOMMER (1990). *The megaprimer method of site-directed mutagenesis*. Biotechniques, 8(4).
- [SAWADA et al. 1997] SAWADA, K., N. KURODA, H. WATANABE, C. MORITANI-OTSUKA und H. KANAZAWA (1997). *Interaction of the delta and b subunits contributes to F_1 and F_0 interaction in the Escherichia coli F_1F_0 -ATPase*. J. Biol. Chem., 272(48):30047–53.
- [SCHATZ et al. 1998] SCHATZ, O., M. OFT, C. DASCHER, M. SCHEBESTA, O. ROSORIUS, H. JAKSCHE, M. DOBROVNIK, D. BEVEC und J. HAUBER (1998). *Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5*. PNAS, 95(4):1607–1612.
- [SCHIESTL und GIETZ 1989] SCHIESTL, R. H. und R. D. GIETZ (1989). *High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier*. Curr. Genet., 16(5-6):339–46.
- [SCHÜMANN und KLINK 1989] SCHÜMANN, M. H. und F. KLINK (1989). *Archaeobacterial protein contains hypusine, a unique amino acid characteristic for eucaryotic translation factor 4D*. System. Appl. Microbiol., 11:103–107.
- [SCHMITZ et al. 1991] SCHMITZ, G. G., T. WALTER, R. SEIBL und C. KESSLER (1991). *Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase*. Anal. Biochem., 192(1):222–231.
- [SCHOLES et al. 2003] SCHOLES, D. T., A. E. KENNY, E. R. GAMACHE, Z. MOU und M. J. CURCIO (2003). *Activation of a LTR-retrotransposon by telomere erosion*. PNAS, 100(26):15736–15741.
- [SCHREIER et al. 1977] SCHREIER, M. H., B. ERNI und T. STAEHELIN (1977). *Initiation of mammalian protein synthesis. I. Purification and characterization of seven initiation factors*. J. Mol. Biol., 116:727–753.
- [SETTE et al. 1997] SETTE, M., P. VAN TILBORG, R. SPURIO, R. KAPTEIN, M. PACI, C. O. GUALERZI und R. BOELENS (1997). *The structure of the translation initiation factor IF1 from E. coli contains an oligomer-binding motif*. EMBO J., 16:1436–1443.
- [SHERMAN 1991] SHERMAN, F. (1991). *Getting started with yeast*. Methods Enzymol., 194:3–21.
- [SHERMAN et al. 1986] SHERMAN, F., G. R. FINK und H. J. B. (1986). *Methods in yeast genetics: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1. überarbeitete Aufl.

- [SHETH und PARKER 2003] SHETH, U. und R. PARKER (2003). *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. Science, 300:805–808.
- [SHIBA et al. 1982] SHIBA, T., H. AKIYAMA, I. UMEDA, S. OKADA und T. WAKAMIYA (1982). *Synthesis and stereochemistry of hypusine, a new amino-acid in bovine brain*. Bull. Chem. Soc. Jap., 55.
- [SHIBA et al. 1971] SHIBA, T., H. MIZOTE, T. KANEKO, T. NAKAJIMA, Y. KAKIMOTO und I. SANO (1971). *Hypusine a new amino-acid occurring in bovine brain isolation and structural determination*. Biochim. Biophys. Acta, 244:523–531.
- [SIKORSKI und BOEKE 1991] SIKORSKI, R. S. und J. D. BOEKE (1991). *In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast*. Methods Enzymol., 194:302–318.
- [SIKORSKI und HIETER 1989] SIKORSKI, R. S. und P. HIETER (1989). *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 122:19–27.
- [SIMS et al. 1974] SIMS, P. J., A. S. WAGGONER, C. H. WANG und J. F. HOFFMAN (1974). *Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles*. Biochemistry, 13(16):3315–3330.
- [SMIT-MCBRIDE et al. 1989] SMIT-MCBRIDE, Z., T. E. DEVER, J. W. HERSHEY und W. C. MERRICK (1989). *Sequence determination and cDNA cloning of eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein*. J. Biol. Chem., 264(3):1578–1583.
- [SOUTHERN 1975] SOUTHERN, E. M. (1975). *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J. Mol. Biol., 98:503–517.
- [STADE et al. 1997] STADE, K., C. S. FORD, C. GUTHRIE und K. WEIS (1997). *Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor*. Cell, 90:1041–1050.
- [STAFSTROM und STAEHLEN 1984] STAFSTROM, J. P. und L. A. STAEHLEN (1984). *Are Annulate Lamellae in the Drosophila embryo the result of overproduction of nuclear pore compartment?*. J. Cell Biol., 98:699–708.
- [STAGE-ZIMMERMANN et al. 2000] STAGE-ZIMMERMANN, T., U. SCHMIDT und P. A. SILVER (2000). *Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo*. Mol. Biol. Cell, 11:3777–3789.
- [STEARMAN et al. 1996] STEARMAN, R., D. S. YUAN, Y. YAMAGUCHI-IWAI, R. D. KLAUSNER und A. DANCIS (1996). *A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast*. Science, 271:1552–1557.
- [SUTOVSKY et al. 1998] SUTOVSKY, P., C. SIMERLY, L. HEWITSON und G. SCHATTEN (1998). *Assembly of nuclear pore complexes and annulate lamellae promotes normal pro-nuclear development in fertilized mammalian oocytes*. J. Cell Sci., 111(19):2841–2854.
- [TABOR und TABOR 1984] TABOR, C. W. und H. TABOR (1984). *Polyamines*. Ann. Rev. Biochem., 53:749–790.
- [TAKEUCHI et al. 2002] TAKEUCHI, K., K. NAKAMURA, M. FUJIMOTO, S. KAINO, S. KONDOH und K. OKITA (2002). *Heat stress-induced loss of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) in a human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2, analyzed by two-dimensional gel electrophoresis*. Electrophoresis, 23(4):662–669.
- [TAO und CHEN 1995] TAO, Y. und K. Y. CHEN (1995). *Purification of deoxyhypusine synthase from Neurospora crassa to homogeneity by substrate elution affinity chromatography*. J. Biol. Chem., 270(1):383–386.

- [THOMAS et al. 1979] THOMAS, A., H. GOUMANS, H. AMESZ, R. BENNE und H. O. VOORMA (1979). *A comparison of the initiation factors of eukaryotic protein synthesis from ribosomes and from the postribosomal supernatant*. Eur. J. Biochem., 98:329–337.
- [THOMAS et al. 1981] THOMAS, A. A. M., R. BENNE und H. O. VOORMA (1981). *Initiation of eukaryotic protein synthesis*. FEBS Lett., 128:177–185.
- [TICE und GANEM 1983] TICE, C. M. und B. GANEM (1983). *Chemistry of naturally occurring polyamines 8. total synthesis of dextro hypusine*. J. Org. Chem., 48:5048–5050.
- [TOME et al. 1997] TOME, M. E., S. M. FISER, C. M. PAYNE und E. W. GERNER (1997). *Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and induces apoptosis*. Biochem. J., 328(Pt 3):847–854.
- [TORRELIO et al. 1987] TORRELIO, B. M., P. M. A. und P. M. GALLOP (1987). *The formation and stability of the hypusine containing protein in Chinese hamster ovary cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 145(3):1335–1341.
- [TRIFILLIS et al. 1999] TRIFILLIS, P., N. DAY und M. KILEDJAN (1999). *Finding the right RNA: Identification of cellular mRNA substrates for RNA-binding proteins*. RNA, 5:1071–1082.
- [UENO et al. 1991] UENO, S. I., K. KOTANI, A. SANO und Y. KAKIMOTO (1991). *Isolation and identification of α -(β -alanyl)hypusine form bovine brain*. Biochim. Biophys. Acta, 1073:233–235.
- [VALENTINI et al. 2002] VALENTINI, S.R., J. M. CASOLARI, C. C. OLIVEIRA, P. A. SILVER und A. E. M. BRIDE (2002). *Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5 A (eIF5A) reveal connections to poly (A)-binding protein and protein kinase C signaling*. Genetics, 160:393–405.
- [VAN DEN BRÛLE und SMART 2002] VAN DEN BRÛLE, S. und C. C. SMART (2002). *The plant PDR-family of ABC-transporters*. Planta, 216:95–106.
- [VAN HOOF et al. 2002] VAN HOOF, A., P. A. FRISCHMEYER, H. C. DIETZ und R. PARKER (2002). *Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon*. Science, 295(5563):2262–4.
- [VARDY und TODA 2000] VARDY, L. und T. TODA (2000). *The fission yeast γ -tubulin complex is required in G1 phase and is a component of the spindle assembly checkpoint*. EMBO J., 19(22):6098–6111.
- [VELCULESCU et al. 1997] VELCULESCU, V.E., L. ZHANG, W. ZHOU, J. VOGELSTEIN, M. A. BASRAI, D. E. BASSETT JR., P. HIETER, B. VOGELSTEIN und K. W. KINZLER (1997). *Characterization of the yeast transcriptome*. Cell, 88(2):243–51.
- [VILELA et al. 1998] VILELA, C., B. LINZ, C. RODRIGUES-POUSADA und J. E. G. MCCARTHY (1998). *The yeast transcription factor genes YAP1 and YAP2 are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability*. Nucl. Acid Res., 26(5):1150–1159.
- [VISWANATHAN et al. 1994] VISWANATHAN, M., G. MUTHUKUMAR, Y. S. CONG und J. LENARD (1994). *Seripauperin: a new multigene family of Saccharomyces cerevisiae encoding serine-poor relatives of serine-rich protein*. Gene, 148:149–153.
- [WAGGONER 1979] WAGGONER, ALAN S. (1979). *Dye Indicators of Membrane Potential*. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 8:47–68.

- [WALLACE et al. 2003] WALLACE, H. M., A. V. FRASER und A. HUGHES (2003). *A perspective of polyamine metabolism*. *Biochem. J.*, 376(1):1–14.
- [WANG et al. 2001] WANG, T.-W., L. LU, D. WANG und J. E. THOMPSON (2001). *Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eukaryotic translation initiation factor 5A from tomato*. *J. Biol. Chem.*, 276:17541–17549.
- [WANG et al. 2003] WANG, T. W., L. LU, C. G. ZHANG, C. TAYLOR und J. E. THOMPSON (2003). *Pleiotropic effects of suppressing deoxyhypusine synthase expression in Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.*, 52(6):1223–1235.
- [WATSON et al. 1991] WATSON, P., H. M. HANAUSKE-ABEL, FLINT A. und L. M. (1991). *Mimosine reversibly arrests cell cycle progression at G₁-S phase border*. *Cytometry*, 12:242–246.
- [WEINER et al. 1986] WEINER, A. M., P. L. DEININGER und A. EFSTRADIADIS (1986). *Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information*. *Ann. Rev. Biochem.*, 55:631–661.
- [WELCH und JACOBSON 1999] WELCH, E. M. und A. JACOBSON (1999). *An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast SPT10 mRNA*. *EMBO J.*, 18(21):6134–6145.
- [WERNER et al. 1990] WERNER, B., K. ANDERSSON, F. LOTTSPEICH und M. KEHL (1990). *Zweidimensionale Gelelektrophorese: Horizontale isoelektrische Fokussierung in der ersten und vertikale SDS-PAGE in der zweiten Dimension*. Pharmacia, SD 097.
- [WESTERMEIER 1990] WESTERMEIER, R. (1990). *Elektrophorese-Praktikum*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1. Aufl.
- [WÖHL 1994] WÖHL, T. (1994). *Struktur und funktionelle Bedeutung der hypusinenthaltenden Proteine aus Saccharomyces cerevisiae*. Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.
- [WÖHL et al. 1993] WÖHL, T., H. KLIER, H. AMMER und F. LOTTSPEICH (1993). *The HYP2 gene of Saccharomyces cerevisiae is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants*. *Mol. Gen. Gen.*, 241(3-4):305–311.
- [WICKNER 1996] WICKNER, REED B. (1996). *Double-stranded RNA-Viruses of Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 60(1):250–265.
- [WIESENBERGER und FOX 1997] WIESENBERGER, G. und T. D. FOX (1997). *Pet127p, a membrane-associated protein involved in stability and processing of Saccharomyces cerevisiae mitochondrial RNAs*. *Mol. Cell Biol.*, 17:2816–2824.
- [WIESENBERGER et al. 1991] WIESENBERGER, G., T. A. LINK, U. VON AHSEN, M. WALDHERR und R. J. SCHWEYEN (1991). *MRS3 and MRS4, two suppressors of mtRNA splicing defects in yeast, are now members of the mitochondrial carrier family*. *J. Mol. Biol.*, 217:23–37.
- [WILSON et al. 1992] WILSON, K. P., L. M. SHEWCHUK, R. G. BRENNAN, A. J. OTSUKA und B. W. MATHEWS (1992). *Escherichia coli biotin hole enzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains*. *PNAS*, 89:9257–9261.
- [WILUSZ et al. 2001] WILUSZ, C. J., M. WORMINGTON und S. W. PELTZ (2001). *The cap-to-tail guide to mRNA turnover*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:237–246.

- [WISE 1991a] WISE, JO ANN (1991a). *Analysis of mitochondrial function and assembly*. Methods Enzymol., 194:627–644.
- [WISE 1991b] WISE, JO ANN (1991b). *Preparation and analysis of Low Molecular Weight RNAs and small ribonucleoproteins - Isolating nuclear and cytoplasmic RNA*. Methods Enzymol., 194:409–411.
- [WODICKA et al. 1997] WODICKA, L., H. DONG, M. MITTMANN, M. H. HO und D. J. LOCKHART (1997). *Genome-wide expression monitoring in Saccharomyces cerevisiae*. Nat. Biotechnol., 15:1359–1367.
- [WOLFF et al. 1992] WOLFF, E. C., T. G. KINZY, W. C. MERRICK und M. H. PARK (1992). *Two isoforms of eIF-5A in chick embryo. Isolation, activity, and comparison of the hypusine-containing proteins*. J. Biol. Chem., 267:6107–6113.
- [WOODY und PUPENE 1973] WOODY, N. C. und M. B. PUPENE (1973). *Excretion of hypusine by children and by patients with familial hyperlysinemia*. Pediat. Res., 7(12):994–995.
- [XU und CHEN 2001] XU, A. und K. Y. CHEN (2001). *Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA*. J. Biol. Chem., 276(4):2555–2561.
- [YAMAGUCHI-IWAI et al. 1996] YAMAGUCHI-IWAI, Y., R. STEARMAN, A. DANCIS und R. D. KLAUSNER (1996). *Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast*. EMBO J., 15:3377–3384.
- [YANISCH-PERRON et al. 1985] YANISCH-PERRON, C., J. VIEIRA und J. MESSING (1985). *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors*. Gene, 33:103–119.
- [YAO et al. 2003] YAO, M., A. OHSAWA, S. KIKUKAWA, I. TANAKA und M. KIMURA (2003). *Crystal Structure of Hyperthermophilic Archaeal Initiation Factor 5A: A Homologue of Eukaryotic Initiation Factor 5A (eIF-5A)*. J. Biochem., 133:75–81.
- [YOUNG 1998] YOUNG, C. (1998). *The functional significance of the hypusine-containing protein*. Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.
- [YUN et al. 2000] YUN, C.-W., J. S. TIEDEMAN, R. E. MOORE und C. C. PHILPOTT (2000). *Siderophore-iron uptake in Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 275:16354–16359.
- [ZAKIAN 1996] ZAKIAN, VIRGINIA A. (1996). *Structure, function, and replication of Saccharomyces cerevisiae telomers*. Annu. Rev., 30:141–172.
- [ZAMENHOF und VILLAREJO 1972] ZAMENHOF, P. J. und M. VILLAREJO (1972). *Construction and properties of Escherichia coli strains exhibiting galactosidase fragments in vivo*. J. Bacteriol., 110:171–178.
- [ZHOU und ELLEDGE 2000] ZHOU, B. B. und S. J. ELLEDGE (2000). *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 408:433–439.
- [ZITOMER und LOWRY 1992] ZITOMER, R. S. und C. V. LOWRY (1992). *Regulation of gene expression by oxygen in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev., 56:1–11.
- [ZUK und JACOBSON 1998] ZUK, D. und A. JACOBSON (1998). *A single amino acid substitution in yeast eIF5A result in mRNA stabilization*. EMBO J., 17:2914–2925.
- [VON ZYCHLINSKI 2001] ZYCHLINSKI, A. VON (2001). *Blockade des Biosynthesewegs des Hypusins – vergleichende Proteomanalyse*. Diplomarbeit, Abteilung Lottspeich, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried.

Danksagung

Mein Dank gilt der Max-Planck-Gesellschaft, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte.

Herrn Dr. F. Lottspeich danke ich, dass er mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe am Hypusin-Projekt mitzuarbeiten und für den Freiraum, den er mir bei der Planung und Durchführung der experimentellen Arbeiten ließ. Sein wissenschaftlicher Rat und sein freundlicher Führungsstil waren sehr hilfreich. Dank geht auch an Dr. J. Kellermann für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Dankbar bin ich Dr. Craig Young, dass er mich in die Techniken des molekulargenetischen Forschens und in das Projekt einweihte. Seine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten hat mich stets motiviert. Sein offenes Ohr für die Probleme der Doktoranden (fachlicher und nicht fachlicher Natur) schätzte ich sehr.

Dr. Ehrenfried Mehl danke ich für seinen fachlichen Rat und seine Diskussionsbereitschaft auf allen Gebieten der Lebens-Wissenschaft. Seine Unterstützung und sein menschlicher Weitblick halfen mir oft sehr, die Tiefen des Doktorandendaseins durchzustehen. Erwähnen möchte ich auch Christian Suchanek, der mir viele handwerkliche Tricks der Biochemie vermittelte. Für seinen freundschaftlichen Beistand und Rat gebührt ihm tiefer Dank.

Ich danke Dr. Harald Schnürch für seine unkomplizierte Hilfsbereitschaft in technischen Fragen der Molekularbiologie und seine Einführung in das fluoreszenz-mikroskopische Arbeiten. Sein wissenschaftlicher Rat war für mich sehr wertvoll. Herzlichen Dank auch an Monika Matzner und Igor Weber für ihre Hilfe in mikroskopischen Fragen. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Dr. Bechinger und Prof. Dr. Gerisch ein herzliches Dankeschön für die wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung von unentbehrlichem Laborgerät.

Allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, vor allem Bärbel Rinke und Christine Baumhauer, sei für ihre Unterstützung herzlich gedankt. Besonders geholfen hat mir Brigitte Hartl durch ihre nette Hilfe, Herzlichkeit und ihren Zuspruch, ebenso Reinhard Mentele durch seine Sequenzierarbeit und seine herzliche Freundlichkeit. Dr. Cornelia Ciosto danke ich für aufrichtige Hilfsbereitschaft und Zuspruch.

Dank auch an meine Eltern, die an meiner Seite gestanden haben und mir Kraft gaben, diese Arbeit zum Abschluss zu bringen. Meiner Schwester Annette und ihrem Mann Elmar danke ich für ihre Unterstützung und Elmar insbesondere für seine Hilfsbereitschaft in Fragen der Informatik. Allen Freunden „da draußen“, die an mich geglaubt und mich während dieser Promotion nicht im Stich gelassen haben, sei ganz herzlich gedankt. Mein besonders lieber Dank geht an Sylvia, die mich in der harten Endphase dieser Arbeit begleitet hat, für ihr Verständnis und ihre Geduld.

Lebenslauf

Rainer Schrader
geboren am 26.10.1970 in Hildesheim

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1977-1981 Grundschule Diekholzen
1981-1983 Orientierungsstufe St. Augustinusschule Hildesheim
1983-1990 Bischöfliches Gymnasium Josephinum Hildesheim
9. Mai 1990 Abitur

Grundwehrdienst:

Juli 1990 - Juli 1991

Praktikum:

Juli 1991 - Sep. 1991 in einem umweltchemischen Analysenlabor der Stadt Hildesheim

Studium:

ab WS 91/92 Studium der Chemie an der Universität Hannover
Juni 1994 Vordiplom
April 1998 Diplomhauptprüfung mit Biochemie als 4. Prüfungsfach

Schwerpunktausbildung in Biochemie an der Medizinischen Hochschule Hannover bei Prof. Dr. H. Niemann und Prof. Dr. W. Müller

Zusatzschwerpunktausbildung in organischer Chemie (Natur- und Wirkstoffsynthese) bei Prof. Dr. E. Winterfeldt

Zusatzpraktikum in organischer experimenteller Analytik am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover

Mai - November 1998 Diplomarbeit am Niedersächsischen Institut für Peptidforschung (IPF) GmbH unter der Anleitung von Dr. M. Raida

Berufserfahrung:

Jan 1999- Feb 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Dr. phil. Dr. med. habil. F. Lottspeich im Bereich Membran-Proteomik

Promotion:

seit Februar 2000 Promotion bei Prof. Dr. Oesterhelt am Max-Planck- Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Dr. phil. Dr. med. habil. F. Lottspeich