

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

She4p,
ein Regulator der Myosinfunktion
in *Saccharomyces cerevisiae*

Stefanie Wesche

aus

Gifhorn

2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 30. August 2004

Stefanie Wesche

Dissertation eingereicht am: 28. August 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen
2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

Mündliche Prüfung am: 20. Oktober 2004

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
Unermüdliche Ausdauer
und die Bereitschaft, etwas,
in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,
wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2. Intrazellulärer Transport.....	3
1.3. Die molekularen Motoren der Hefe.....	4
1.4. Das Aktinzytoskelett der Hefe.....	6
1.5. Die Myosine der Hefe.....	7
1.6. Die Familie der UCS-Proteine.....	12
1.7. UNC-45 und UNC-45 verwandte UCS-Proteine.....	14
1.8. Die UCS-Proteine der Pilze.....	16
1.9. Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Ergebnisse	22
2.1. <i>She4Δ</i> Stämme zeigen einen temperatursensitiven Proliferationsstop.....	22
2.2. Myosine zeigen in <i>she4Δ</i> Zellen eine Misslokalisierung.....	23
2.3. She4p interagiert <i>in vivo</i> mit der Motordomäne der Typ I und Typ V Myosine.....	26
2.4. She4p lokalisiert Myo2p-abhängig an die Knospenspitze.....	29
2.5. Die She4p-Lokalisation ist essentiell für die Funktion der Typ I Myosine.....	36
2.6. She4p ist für eine korrekte Myosin-Aktin Interaktion notwendig.....	41
2.7. Die UCS-Domäne ist essentiell für die She4p Funktion.....	49
2.8. She4p interagiert mit Hsp90 und Komponenten aus der Prozessierung der ribosomalen RNA.....	53
2.9. She4p interagiert <i>in vivo</i> mit Hsp90, zeigt aber keine Kolokalisation.....	57
2.10. She4p interagiert mit nukleolären Proteinen.....	59
3. Diskussion	67
3.1. She4p ist für die Funktion der Klasse I und Klasse V Myosine essentiell.....	68
3.2. She4p interagiert mit der Myosin Motordomäne und vermittelt die Interaktion mit dem Aktinzytoskelett.....	71
3.3. She4p, ein Chaperon für die Myosinmotordomäne?.....	76
3.4. She4p, innerhalb oder ausserhalb des Kerns?.....	81
3.5. Ein Modell für die Funktion von She4p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
3.6. Zukünftige Aufgaben.....	88
4. Material	90
4.1. Laborausstattung.....	90
4.2. Verbrauchsmaterialien.....	91
4.3. Antikörper.....	91
4.4. Molekularbiologische Baukästen (Kits).....	92
4.5. Enzyme.....	92

4.6. Oligonukleotide.....	93
4.6.1. Primer für die Klonierung von GST-She4p in pETM30.....	93
4.6.2. Primer für die Epitopmarkierung.....	94
4.6.3. Primer für die Überprüfung der Epitopmarkierung.....	96
4.7. Vektoren und Plasmide.....	98
4.7.1. Vektoren.....	98
4.7.2. Plasmide.....	98
4.7.3. Für diese Arbeit erzeugte Plasmide.....	98
4.8. Bakterienstämme.....	99
4.9. Hefestämme.....	99

5. Methoden 102

5.1. Bestimmung der Zelldichte.....	102
5.2. Hefetransformation.....	102
5.3. Transformation von DNA in Bakterien.....	102
5.3.1. Generierung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	102
5.3.2. Hitzeschocktransformation.....	102
5.4. Präparation von Plasmid-DNA.....	103
5.5. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	103
5.6. PCR aus Hefekolonien.....	104
5.7. Epitop-Markierung.....	104
5.8. Mating, Sporulation und Tetradenanalyse.....	105
5.9. Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen.....	106
5.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).....	106
5.11. NuPAGE (Novex).....	107
5.12. Western Blot.....	107
5.13. Coomassie-Färbung zum Nachweis von Proteinen.....	109
5.14. Isolation von genomischer DNA aus Hefe.....	109
5.15. Immunfluoreszenz.....	110
5.15.1. Vorbereitung der Zellen.....	110
5.15.2. Immunfluoreszenz.....	110
5.15.3. Konfokale Mikroskopie.....	111
5.15.4. Aktinfärbung durch Rhodamin-Phalloidin.....	112
5.16. Immunpräzipitation.....	113
5.17. Kernisolation aus Hefe (Hurt et al., 1988).....	114
5.18. Aktin <i>Pelleting</i> Assay (Geli et al., 2000).....	115
5.19. Glycerolgradient (10-30%).....	116
5.20. Differentielle Zentrifugation.....	116
5.21. GST- <i>Pulldown</i> Assay.....	117
5.21.1. Herstellung von GST-She4p.....	117
5.21.2. Herstellung des Hefeextraktes.....	118
5.21.3. <i>Pulldown</i> Assay.....	119
5.21.4. TCA-Fällung.....	120
5.22. Tandem-Affinitäts Reinigung (Rigaut et al., 1999).....	120
5.22.1. Herstellung des Hefeextraktes.....	120
5.22.2. IgG-Bindung.....	121
5.22.3. Calmodulin-Bindung.....	121
5.22.4. Elution.....	122

6. Zusammenfassung	123
7. Referenzen	125
8. Abkürzungen	133
9. Publikationen	136
10. Danksagung	137

1. Einleitung

1.1. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört neben *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* zu den wichtigsten Modellorganismen für genetische und molekularbiologische Untersuchungen. Sie zeichnet sich nicht nur durch leichte Kultivierung und kurze Generationszeit aus, sondern auch durch die Fähigkeit, zwischen einem haploiden und einem diploiden Zellstadium zu wechseln. Bestimmte Umweltbedingungen führen dazu, dass von einem einzelligen auf ein filamentöses Wachstum umgestellt wird oder das nach einer Zellteilung zwei "unterschiedliche" Zellen entstehen (z.B. Paarungstypwechsel).

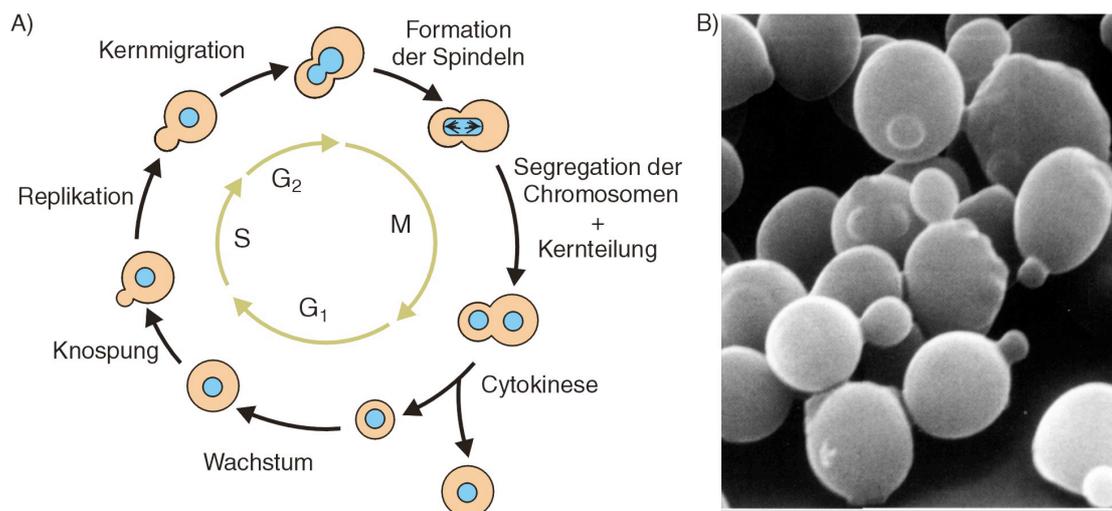


Abb.1.1. Der Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* (Quelle: Lodish et al., 1999).

A) Verlauf der mitotischen Teilung. Die Mutterzelle bildet gegen Ende der G₁-Phase eine Knospe aus, welche im Laufe des Zellzyklus fast zur Grösse der Mutterzelle heranwächst und sich anschliessend abschnürt. Die Kernhülle bleibt während der Mitose intakt. Die kleinere Tochterzelle durchläuft aufgrund ihrer geringeren Grösse anschliessend eine längere G₁-Phase, um eine neue Knospe zu bilden und in die S-Phase einzutreten. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hefezellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus.

Als niederer Eukaryont verfügt die Hefe damit über die gleichen zellulären Grundfunktionen wie höhere Eukaryonten, und erlaubt mit Hilfe hocheffizienter Techniken die Untersuchung nahezu aller wichtigen zellulären Prozesse, wie

Genregulation, Zellteilung oder –differenzierung. Ausserdem können Aspekte des Zytoskeletts, der Organellen oder auch der Polarität aufgeklärt werden. Eine breite Palette von Techniken wie Epitopmarkierung oder Deletion von Genen sowie induzierbare Expressionsysteme erlauben eine schnelle und relativ einfache Manipulation des Organismus.

Wie schon angesprochen kann *S. cerevisiae* bei bestimmten Umweltbedingungen zwischen einem haploiden und einem diploiden Zellstadium wechseln. Ist die Nährstoffversorgung günstig, liegt die Hefe diploid vor und vermehrt sich durch asexuelle Sprossung (Abb.1.1.). Bei diesem Prozess bildet sich gegen Ende der G1-Phase eine Knospe aus, die am Ende der M-Phase als Tochterzelle abgeschnürt wird, sobald sie die Grösse der Mutterzelle erreicht hat.

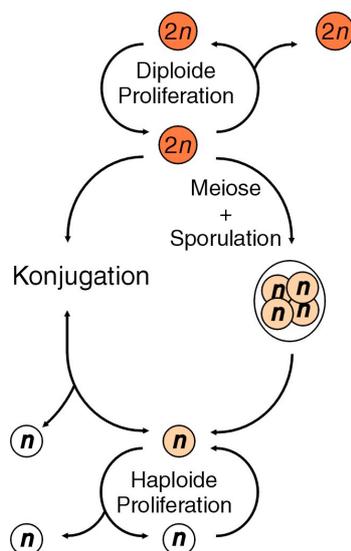


Abb.1.2. Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*. Bei guter Nährstoffversorgung vermehrt sich die Hefe vegetativ im diploiden Zustand. Kommt es zu einer Verarmung an Nährstoffen durchläuft die diploide Zelle eine Sporulation und bildet haploide Dauerstadien in einem Ascus. Ein Ascus enthält vier Sporen, von denen zwei den Paarungstyp a und zwei den Paarungstyp α haben. Bei guten Umweltbedingungen keimen die Sporen aus und vermehren sich entweder vegetativ oder kehren durch Konjugation mit einer Spore entgegengesetzten Paarungstyps zum diploiden Stadium zurück.

Kommt es zu einem Mangel an Nährstoffen, sporuliert die diploide Mutterzelle und bildet nach Durchlaufen einer Meiose vier haploide Tochterzellen (Abb.1.2.). Die Sporen solch einer Tetrade unterscheiden sich in ihrem Paarungstyp. Zwei Sporen tragen den Paarungstyp a und zwei den Paarungstyp α . Bei guter Nährstoffversorgung keimen die Sporen aus und können sich wie im diploiden Stadium durch Knospung vermehren. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass zwei Sporen unterschiedlichen Paarungstyps mit einander geschlechtlich konjugieren und somit wieder eine diploide Zygote bilden.

1.2. Intrazellulärer Transport

“Das Genie beherrscht das Chaos.” Treffender kann ein Sprichwort nicht sein, um meinen ersten Eindruck einer Zelle zu beschreiben. Eine unendliche Vielfalt von Organellen, Proteinen oder RNA schwimmt völlig ungeordnet umher und scheint keinem höherem Gesetz zu folgen. Dementsprechend gross war meine Verwunderung und Faszination, als ich erstmals in der Vorlesung für allgemeine Biologie von “Strassen” und “Motoren” in der Zelle hörte. Wie ein grosses Logistikunternehmen verwaltet und reguliert die Zelle Treffpunkte und das Timing von Transaktionen, um einen hohen Grad an räumlicher und zeitlicher Organisation ihrer Makromoleküle und Organellen zu gewährleisten. Ermöglicht wird dies durch eine Vielzahl von molekularen Transportproteinen, sogenannten Motorproteinen, die ihre Fracht über spezielle filamentöse Bahnen an den jeweiligen Bestimmungsort bringen. Diese Proteine nutzen die Energie von ATP um über Aktinfilamente oder Mikrotubuli zu laufen.

Solch intrazellulärer Transport wurde erstmals in der Alge *Chara* von Bonaventura Corti im späten 18. Jahrhundert beobachtet. Im 19. Jahrhundert wurde erstmals die Bewegung von Chromosomen dokumentiert. Mit Hilfe der heutigen Mikroskopiermöglichkeiten und der Markierung von Organellen, Proteinen und RNAs mit grün fluoreszierendem Protein konnte eine unglaubliche Vielfalt an intrazellulären Transportprozessen entdeckt werden. Die Liste der transportierten Frachten ist lang und berührt fast jeden Aspekt der Zell- und Entwicklungsbiologie. Neben grossen Membranorganellen (z.B. Golgi und Kern), kleinen Vesikeln und tubulären Intermediaten des sekretorischen und endozytotischen Signalwegs werden auch mRNAs, Filamente des Zytoskeletts, Proteinbausteine für die Synthese von makromolekularen Komplexen wie Cilien und Zentrosomen oder auch Proteine der Signalübertragung und Polaritätsbestimmung der Zelle transportiert.

1.3. Die molekularen Motoren der Hefe

Obwohl Prokaryonten zytoskeletale Filamente besitzen, scheinen die Motoren des Zytoskeletts eine "Erfindung" der frühen Eukaryonten zu sein. Im Gegensatz zur Diffusion von Molekülen im bakteriellen Zytosol, ist der Transfer in membranumschlossene Kompartimente oder in der Hefe von der Mutter- in die Tochterzelle sehr viel langsamer. Aus diesem Grund, hat die eukaryontische Zelle ein Zytoskelett entwickelt, welches eine limitierte Anzahl von "Strassen" (Aktin und Tubulin), dafür aber eine ganze Batterie von Motoren (Kinesin, Dynein und Myosin) nutzt, welche wiederum eine Vielzahl von Molekülen transportieren können. Sowohl Dynein als auch Kinesin interagieren mit Mikrotubuli, bipolaren Filamenten, die durch self-assembly der alpha- und beta-Tubulin Monomere entstehen und somit eine Polarität aufweisen (Hirokawa, 1998). Den Transport zum Plusende und zum Minusende der Mikrotubuli, also vom Zellinneren an die Zellperipherie und umgekehrt, vermitteln die Kinesine, wohingegen Dynein nur Transporter zum Minusende ist. Aktinfilamente (F-Aktin) entstehen durch die Polymerisierung von globulären Aktin-Monomeren (G-Aktin) zu helikalen Ketten und werden von Myosinen genutzt (Mermall et al., 1998), welche im allgemeinen zum Plusende der Aktinkabel lokalisieren.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verfügt über eine relativ überschaubare Anzahl an molekularen Motoren. Ein zytoplasmatisches Dynein und fünf der sechs Kinesine spielen während der Mitose bei der Positionierung, dem Zusammenbau und der Elongation der Spindel eine Rolle (Cottingham et al., 1999; Hoyt et al., 1997). Das sechste Kinesin scheint einen Einfluss auf die Zellpolarität zu haben (Lillie and Brown, 1994; Lillie and Brown, 1998). Das Aufgabenspektrum dieser Motoren ist in höheren Eukaryonten sehr viel umfangreicher. Kinesine transportieren z.B. synaptische Vesikel und Organellen oder sind als Spindel-Kinesine für den Zusammenbau der Spindel und die Chromosomen-Segregation während der Zellteilung zuständig (Hirokawa et al., 1998). Dynein ist unter anderem für die Positionierung des Kerns und der Spindel (Bloom, 2001) oder auch für das Schlagen von Cilien und Flagellen verantwortlich (Goodenough and Heuser, 1985).

Auf der “Aktinseite” der Hefe finden wir fünf Myosine, welche unterschiedliche Funktionen erfüllen wie den Transport von mRNA und Vesikeln, sowie Endozytose oder Zytokinese (Brown, 1997). Im Grundaufbau bestehen Myosine aus drei Komponenten (Abb.1.3.). Die N-terminale Motordomäne ist hochkonserviert, vermittelt den ATP-abhängigen Kontakt mit dem Aktinzytoskelett und ist die krafterzeugende Komponente (Mooseker and Cheney, 1995).

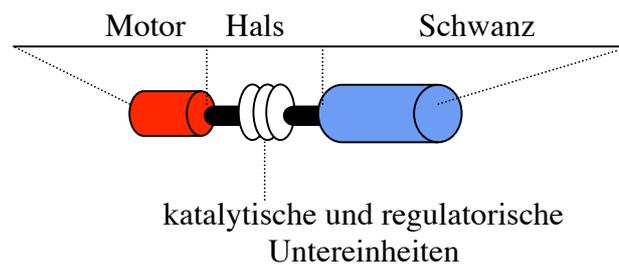


Abb.1.3. Allgemeine Struktur der Myosine. Die N-terminale Motordomäne und C-terminale Schwanzdomäne werden durch einen Halsbereich getrennt. Dieser enthält Bindestellen für katalytische (IQ-Domänen für Calmodulin) und regulatorische Untereinheiten, sogenannte leichte Ketten. Im Schwanzbereich finden sich coiled-coiled Bereiche für Oligomerisierungen und Bindestellen für die transportierte Fracht. Der Motor interagiert ATP-abhängig mit Aktinfilamenten und ist die krafterzeugende Komponente des Proteins.

An den Motor schliesst sich eine Halsdomäne an, die Bindestellen für katalytische und regulatorische Untereinheiten (leichte Ketten) enthält, welche die Aktivität oder die Stabilität des Myosins beeinflussen (Cheney and Mooseker, 1992). Am C-Terminus befindet sich die Schwanzdomäne, welche sequenzmässig am stärksten innerhalb der Myosine divergiert und für die Interaktion mit der jeweiligen Fracht und Lokalisation verantwortlich ist (Karcher et al., 2002; Reck-Peterson et al., 2000). Teil des Schwanzes können auch lange coiled-coiled Bereiche sein, welche eine Dimerisierung oder sogar die Organisation in Filamenten ermöglichen (Mooseker and Cheney, 1995). Ausserdem wurden Proteininteraktionsdomänen, oder auch saure Bereiche für die Interaktion mit Phospholipiden gefunden (siehe 1.5.) (Geli and Riezman, 1996; Goodson et al., 1996; Goodson and Spudich, 1995).

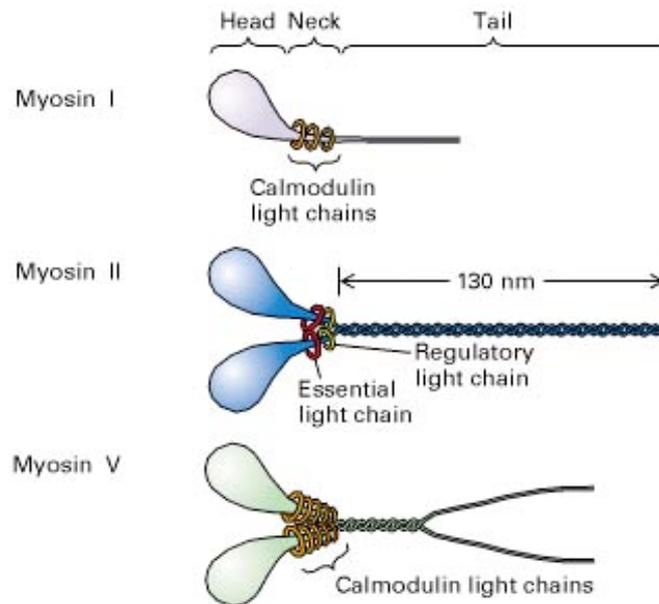


Abb.1.4. Myosinklassen der Hefe (Quelle: Lodish et al., 2000). In der Hefe findet man Myosine der Klasse I, II und V. Dieser unterscheiden sich zum einen in der Sequenz ihrer Motordomäne und in der Struktur ihres Domänenbaus.

Aufgrund ihrer grossen Vielfalt wurde die Superfamilie der Myosine nach ihrer Struktur und Homologie in achtzehn verschiedene Klassen eingeteilt (Berg et al., 2001). In der Hefe findet man Myosine aus drei dieser Klassen (Abb.1.4.). Ausserdem wird unterschieden zwischen konventionellen und unkonventionellen Myosinen (Tanaka and Matsui, 2001). Die konventionellen Myosine beinhalten die Muskelmyosine und die muskelähnlichen Myosine, die sich durch lange alpha-helikale Schwänze auszeichnen, welche Dimerisierung oder die Bildung von bipolaren dicken Filamenten ermöglichen. Alle anderen zählen zur Gruppe der unkonventionellen Myosine.

1.4. Das Aktinzytoskelett der Hefe

Was ist ein Motor ohne seine Strasse? Myosine interagieren ATP-abhängig mit Aktin, was die ATP-Hydrolyse und somit den Reaktionszyklus des Proteins stimuliert. In der Hefe spielt das Aktinzytoskelett eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären

Funktionen wie Morphogenese, Zellpolarität, Endozytose oder Zytokinese. Aktin-Monomere werden durch zwei verschiedene Verknüpfungs-Systeme, die Formine (Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002) und den Arp2/3-Komplex (Winter et al., 1997; Winter et al., 1999), in Filamente organisiert. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei verschiedene Aktin-Strukturen: kortikale Aktin *patches* und Aktin-Kabel. Dieses Netzwerk ist keinesfalls starr, sondern ständig einer hochdynamischen Reorganisation unterworfen, welche zeitlich und örtlich reguliert wird (Tanaka and Matsui, 2001). Kurz nach Entstehung der Knospe akkumulieren Aktin *patches* an der Knospenspitze, die Kabel dehnen sich von der Mutterzelle in die Tochter aus und es kommt zu einem apikalen Knospenwachstum. Anschliessend werden Patches und Kabel in der Tochter zufällig verteilt, wohingegen die Kabel in der Mutterzelle weiterhin zur Verbindungsstelle mit der Knospe führen. Ist die Knospe "ausgewachsen", sind Patches und Kabel zufällig in Mutter und Tochter verteilt, während sich an der Verbindungsstelle der zytokinetische filamentöse Aktinring bildet. Dieser Ring kontrahiert mit Hilfe von Myosinen und trennt somit die beiden Zellen voneinander ab, um sich anschliessend wieder abzubauen.

1.5. Die Myosine der Hefe

In der Hefe *S. cerevisiae* sind fünf verschiedene Myosine aus drei verschiedenen Klassen bekannt; Myo1p, das einzige Klasse II Myosin, zwei Klasse I Myosine, Myo3p und Myo5p, und zwei Klasse V Myosine, Myo2p und Myo4p (Abb.1.5.).

Myo1p gehört wie die Muskelmyosine in die Klasse der konventionellen Klasse II Myosine (Watts et al., 1987). Es bildet über eine lange c-terminale coiled-coiled Region Filamente aus und ist essentiell für die Separation von Mutter- und Tochterzelle bei der Zellteilung (Bi et al., 1998; Brown, 1997). Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass Myo1p wichtig für den Zusammenbau des Aktinringes während der Zytokinese ist (Bi et al., 1998). Eine Deletion von *MYO1* ist nicht lethal und führt zu Ketten von nicht-separierten Zellen. Myo1p ist als Doppelring an der Verbindungsstelle zwischen Mutter- und Tochterzelle sichtbar, sobald die Knospe gebildet wird (Lippincott and Li, 1998).

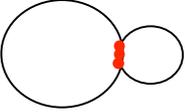
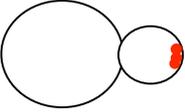
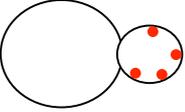
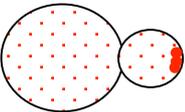
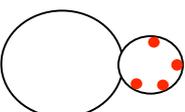
Lokalisation	Gen	Myosin Klasse	Funktion
	<i>MYO1</i>	Klasse II	Zellteilung
	<i>MYO2</i>	Klasse V	Zellpolarität Vesikeltransport
	<i>MYO3</i>	Klasse I	Endozytose
	<i>MYO4</i>	Klasse V	mRNA Transport
	<i>MYO5</i>	Klasse I	Endozytose

Abb.1.5. Liste der Myosine in *S. cerevisiae*. In der Tabelle ist für jedes Myosin die Lokalisation in einer knospenden Hefezelle, die Klassifikation und die bekannte Funktion aufgeführt. Details im Text.

Myo2p und Myo4p gehören zu den unkonventionellen Klasse V Myosinen (Haarer et al., 1994; Johnston et al., 1991) und bilden wahrscheinlich über einen coiled-coiled Bereich im Schwanz Dimere aus. Dies konnte bereits für das Klasse V Myosin aus dem Huhn gezeigt werden (Cheney et al., 1993). Beide zeigen eine Lokalisation in der Knospenspitze (Brockerhoff et al., 1994; Jansen et al., 1996; Lillie and Brown, 1992). Zusätzlich ist Myo2p während der Zellteilung an der Verbindungsstelle zwischen Mutter- und Tochterzelle zu sehen (Lillie and Brown, 1994). Die phänotypischen Defekte sowohl in Maus wie auch in Hefe lassen darauf schliessen, dass die Klasse V Myosine am intrazellulären Transport von verschiedenen Organellen, Proteinen und mRNAs beteiligt sind (Abb.1.6.) (Soldati, 2003). Die Motordomäne beider Klasse V Myosine ist in ihrer Sequenz sehr ähnlich, jedoch unterscheiden sie sich erheblich im Schwanzbereich (73% und 23% identisch).

Myo2p ist das einzige Hefemyosin, dessen Funktion und Lokalisation für die Zelle essentiell ist (Johnston et al., 1991). Als grosser "Allzweck"-Transporter werden neben Vakuolen (Catlett et al., 2000; Hill et al., 1996) und Polaritätsfaktoren auch eine grosse Anzahl weiterer Frachten transportiert. Verschiedene temperatursensitive *MYO2*-Mutanten gaben Hinweise darauf, dass Myo2p auch ein Einfluss auf die Lokalisierung sekretorischer Vesikel (Johnston et al., 1991), Kernmigration und Spindelpositionierung (Beach et al., 2000), Vererbung später Golgi-Vesikel (Rossanese et al., 2001) oder Verteilung der Mitochondrien hat (Tanaka and Matsui, 2001). Die Auswahl der transportierten Fracht wird wahrscheinlich durch Myo2p-interagierende Proteine wie Kar9p (Spindelorientierung im frühen Zellzyklus), Vac8/17p (Vakuolenvererbung) oder der Rho-verwandeten GTPase Rho3p (Lokalisation des Exocyst-Komplexes während der Exocytose) vermittelt (Robinson et al., 1999; Tang et al., 2003; Yin et al., 2000).

Für Myo4p konnte gezeigt werden, dass es hauptsächlich für die Lokalisation verschiedener mRNAs zuständig ist. Neben der *ASH1* mRNA wird zum Beispiel noch *IST1* und *WSC2* mRNA an die Knospenspitze transportiert (Jansen et al., 1996; Long et al., 1997; Takizawa et al., 2000; Takizawa and Vale, 2000). Die *ASH1* mRNA komplexiert mit dem RNA-bindenden Protein She2p, welches über ein Adapter-Protein She3p an den Motor Myo4p (She1p) gekoppelt wird (Bohl et al., 2000; Takizawa and Vale, 2000). Dieser Komplex lokalisiert dann entlang von Aktinkabeln von der Mutterzelle in die Tochter. Das Protein Puf6p inhibiert die Translation der *ASH1* mRNA während der Lokalisation, was für die Lokalisation selbst essentiell ist (Gu et al., 2004). Das entsprechende Protein Ash1p ist ein Transkriptions-Repressor, der ausschliesslich im Kern der Tochterzelle die Expression der HO-Endonuklease unterdrückt und somit den Wechsel des Paarungstyps verhindert (Bobola et al., 1996; Sil and Herskowitz, 1996; Takizawa et al., 1997).

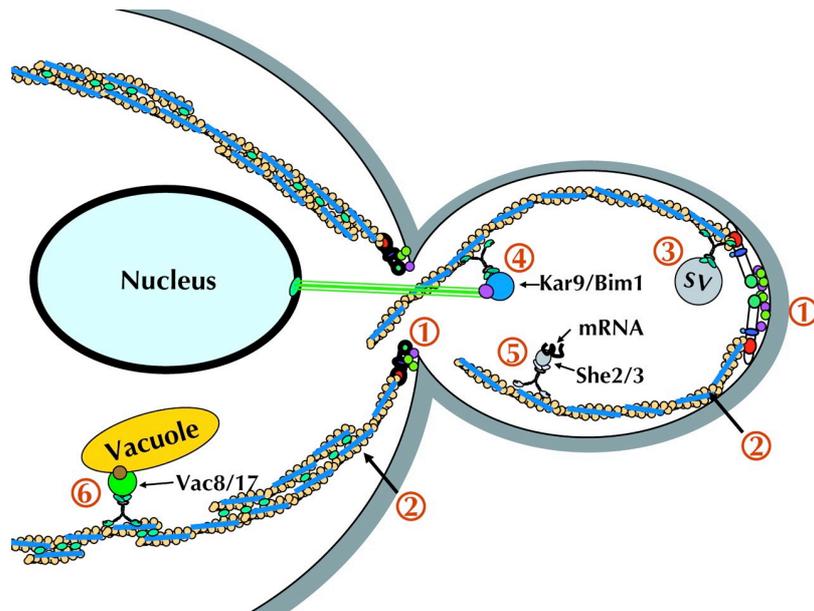


Abb.1.6. Myosin V vermittelter Transport von Organellen und mRNA (Quelle: Bretscher et al. 2003). (1) Aktivierte und lokalisierte Formine (Bni1p an der Knospenspitze und Bnr1p am Knospenhals) vermitteln den Zusammenbau von polarisierten Aktinkabeln. (2) Aktinkabel werden durch Tropomyosin (blau) und Verbindungsproteine (z.B. Fimbrin, grün) stabilisiert. (3) Myo2p transportiert sekretorische post-Golgi Vesikel in die Knospe. (4) Orientierung des Kerns beinhaltet den Myo2p-abhängigen Transport von Kar9/Bim1p in die Knospe. (5) Spezifische mRNAs werden durch den She2/3-Komplex erkannt und durch Myo4p in die Knospe transportiert. (6) Vakuolenfragmente werden von Myo2p durch die Interaktion mit Vac8/17p in die Knospe transportiert.

Die Lokalisation der *ASH1* mRNA hängt ausserdem von der Funktion der Proteine She4p und She5p (Bni1p) ab. Die Funktion von She4p war bisher völlig unbekannt und Bni1p gehört zu den Forminen der Hefe, welche die Integrität des Aktinzytoskeletts beeinflussen (Jansen et al., 1996). Neben dem Transport von mRNA konnte gezeigt werden, dass Myo4p auch bei der Verteilung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) von der Mutter- in die Tochterzelle eine Rolle spielt (Estrada et al., 2003). Diese Verteilung ist abhängig von F-Aktin, Myo4p und She3p, aber unabhängig von She2p und RNA.

Es wird vermutet, dass beide Klasse V Myosine prozessive Motoren sind. Dies bedeutet, dass sie eine hohe Affinität zum Aktinkabel zeigen und somit in der Lage sind, Schritt für Schritt über das Kabel zu wandern, ohne von diesem wegzudiffundieren. Dies erlaubt einem einzelnen oder wenigen Motoren, eine Fracht über eine längere Distanz zu transportieren. Für tierische Klasse V Myosine konnte dies bereits gezeigt werden (Mehta et al., 1999; Sakamoto et al., 2000). Im Gegensatz zu den Klasse V Myosinen gehören die Klasse II Myosine zu den nichtprozessiven

Motoren, was bedeutet, dass viele Motoren nötig sind, um eine Bewegung zu erzeugen. Sie zeichnen sich durch eine schnelle ATP-Hydrolyse und somit durch eine kurze Interaktionszeit mit dem Aktinfilament aus (Mehta et al., 1998).

Die unkonventionellen Klasse I Myosine Myo3p und Myo5p sind in Prozesse wie Endozytose, Membrantransport oder Zellbeweglichkeit involviert (Mooseker and Cheney, 1995). Grundlage für diese Prozesse ist die Polymerisation des kortikalen Aktins. Die Klasse I Myosine lokalisieren als kortikale Patches an Orten polarisierten Wachstums, welche mit kortikalen Aktin-Patches kolokalisieren (Goodson et al., 1996). Als sogenannte "Minimyosine" haben sie nur einen kurzen Schwanz und scheinen nicht zu dimerisieren, sondern als Monomere zu agieren (Brown, 1997; Hasson and Mooseker, 1995). Beide Myosine sind sich in der Sequenz sehr ähnlich und scheinen funktionell redundant zu sein (Geli and Riezman, 1996; Goodson et al., 1996; Lechler et al., 2000). Die Deletion von *MYO3* oder *MYO5* hat keinen besonderen Wachstumsphänotyp, wohingegen ein Doppelknockout abhängig vom genetischen Hintergrund entweder lethal oder konditional-lethal ist (Geli and Riezman, 1996; Goodson et al., 1996).

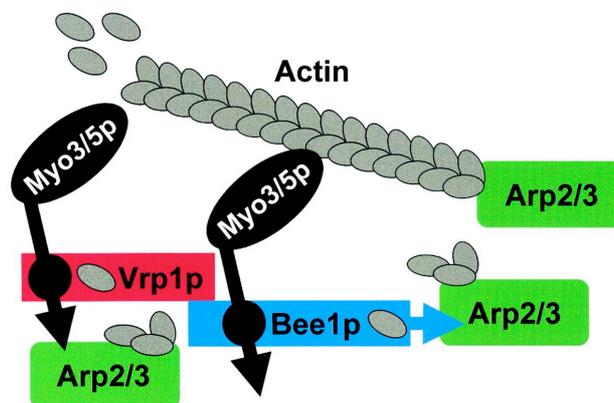


Abb.1.7. Funktion der Klasse I Myosine (Quelle: Evangelista et al., 2000). Die Myo3/5p SH3-Domäne (Kreis) bindet Vrp1p und Bee1p. Myo3/5p und Bee1p binden und stimulieren die Verknüpfungsaktivität des Arp2/3-Komplexes durch ihre C-terminale saure Domäne (Pfeil). Die WH2-Domäne von Bee1p und Vrp1p binden und koppeln für eine effiziente Verknüpfung Aktinmonomere an den Arp2/3-Komplex. Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führt zu dessen Inkorporation in das Aktinzytoskelett, entweder als Kappe auf dem Ende der Aktinfilamente oder angeheftet an die Filamentseite, um neue Verzweigungen und Verknüpfungen zu erzeugen. Die Motordomäne der Klasse I Myosine (Oval) organisiert die neugeformten Filamente oder transportiert den Vrp1p-Bee1p-Arp2/3 Aktinverknüpfungs-komplex an das Ende eines wachsenden Aktinfilaments.

Die Besonderheit dieser Myosine sind ihre Interaktionsdomänen im C-terminalen Schwanzbereich, die homolog zu anderen Mitgliedern der entsprechenden Proteinfamilien sind: eine putative Membran-Bindungsdomäne (TH1), eine Alanin-Prolin-reiche Domäne (TH2), eine Src-Homologie-Domäne (SH3) und eine C-terminale saure Domäne (Goodson et al., 1996; Goodson and Spudich, 1995).

Die SH3 Domäne findet man hauptsächlich bei Proteinen, die an der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Signaltransduktion beteiligt sind (Musacchio et al., 1994). Über diese Domäne interagieren Myo3/5p mit Bee1p, einem Homolog des humanen WASP (Wiskott Aldrich Syndrom Protein) (Evangelista et al., 2000; Lechler et al., 2000) und Verprolin (Vrp1p), einem Homolog des humanen WIP (WASP-interagierendes Protein) (Anderson et al., 1998; Evangelista et al., 2000). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Klasse I Myosine auch filamentöses Aktin über die SH3 Domäne binden können. Für diese Bindung ist eine Interaktion mit Verprolin (Vrp1p) notwendig (Geli et al., 2000). Die saure Domäne von Myo3/5p und Bee1p interagiert mit dem Arp2/3-Komplex, was eine Stimulation der Aktin-Polymerisation zur Folge hat (Evangelista et al., 2000; Lechler et al., 2000). Geli et al. konnten *in vitro* zeigen, dass diese Stimulation unabhängig von der Motordomäne von Myo3/5p ist. Die Funktion des Motors ist aber absolut essentiell für die Funktion und Lokalisation der Klasse I Myosine.

1.6. Die Familie der UCS-Proteine

Die rekombinante Expression voll funktionsfähiger Myosine für *in vitro* Studien ist bisher weitgehend fehlgeschlagen. Bakteriell exprimierte Myosinköpfe aggregieren irreversibel und zeigen keine Motorfunktion, was darauf hindeutet, dass für ihre Faltung fehlende Faktoren notwendig sind (McNally et al., 1988; Srikakulam and Winkelmann, 1999). Es ist jedoch möglich, funktionelle leichte Myosinketten oder Myosinschwänze rekombinant zu synthetisieren, da diese anscheinend spontan falten (Saraswat and Lowey, 1991; Sohn et al., 1997). Die Expression von Motordomänen als S1- oder schweres Meromyosin-Fragment (HMM) führte, auch wenn sie zusammen mit den leichten Ketten synthetisiert wurden, zu verschiedenen Resultaten. Erfolgreich war bisher nur die Expression von HMM der Klasse II, V und VI

Myosine aus zytoskeletalen und glatten Muskeln mit Hilfe des Baculovirus-Systems, welche löslich sind und Motorfunktion zeigen (Sweeney et al., 1998; Wang et al., 2000; Wells et al., 1999). Auch mit diesem System war es jedoch ebenfalls nicht möglich, funktionelles Herz- und Muskelmyosin zu exprimieren (Hutagalung et al., 2002; Price et al., 2002). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass es bestimmter Assemblierungs-Faktoren bedarf, die Myosinköpfe in ihre funktionelle Konformation falten.

Verschiedene Entdeckungen der letzten Jahre haben eine neue Proteingruppe in den Mittelpunkt des Interesses rücken lassen, welche wahrscheinlich an dem Prozess der Faltung von Myosinköpfen beteiligt ist; die UCS-Familie. Die Proteine dieser Familie sind von den niederen Eukaryonten bis hin zu höheren Vertebraten konserviert (Abb.1.8.). Sie zeigen als einzige Gemeinsamkeit eine ungefähr 400 Aminosäuren umfassende konservierte Region nahe des C-Terminus, die UCS-Domäne.

UCS proteins	Organisms	Potential interacting myosins	Mutant phenotypes
CRO1	Filamentous fungus <i>P. anserina</i> 	?	Failure in syncytial to cellular state transition Actin cytoskeleton disorganization
She4p	Budding yeast <i>S. cerevisiae</i> 	Myosin I  Myosin V 	<i>ASH1</i> mRNA mislocalization Endocytosis defects Actin cytoskeleton disorganization
Rng3p	Fission yeast <i>S. pombe</i> 	Non-muscle myosin II 	Disrupted actomyosin ring Cytokinesis failure
UNC-45 SM UNC-45	<i>C. elegans</i>  Vertebrates 	Muscle myosin II 	Fewer thick filaments (UNC-45) Defective sarcomere development Myofibril disorganization
GC UNC-45	Vertebrates 	Non-muscle myosin II 	Inhibited cell proliferation Reduced cell fusion

Current Biology

Abb.1.8. UCS-Proteine (Quelle: (Yu and Bernstein, 2003)). UCS-Proteine sind in diversen Organismen zu finden und interagieren direkt oder indirekt mit Myosinen verschiedener Klassen. Genetische Analysen zeigen, dass Mutanten mit funktionslosen UCS-Proteinen Defekte in myosin-vermittelten Prozessen wie Organisation des Aktinzytoskeletts, Muskel-Sarkomer Aufbau und Zellfusion aufweisen.

Der Name UCS leitet sich von den ersten Mitgliedern der Familie ab, die identifiziert wurden; UNC-45 aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, CRO1 aus dem filamentösen Pilz *Podospora anserina* und She4p aus der knospenden Hefe *S. cerevisiae* (Hutagalung et al., 2002). Weitere bekannte UCS-Proteine sind Rng3p aus der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, Tim34p aus *Drosophila melanogaster* und ein unc-45-verwandtes Protein im Zebrafisch.

1.7. UNC-45 und UNC-45-verwandte UCS-Proteine

Der bisher bestuntersuchte Vertreter der UCS-Familie ist UNC-45 aus *C. elegans* (Abb.1.9.) (Epstein and Thomson, 1974). Es ist in allen Muskelzellen zu finden und assoziiert mit den dicken Myosin-Filamenten (Ao and Pilgrim, 2000). Die Deletion von UNC-45 ist lethal und führt zu paralysierten Tieren mit verminderter Akkumulation von dicken Filamenten und schwerer Disorganisation der Myofibrillen (Ao and Pilgrim, 2000; Barral et al., 1998). Grund dafür ist die defekte Assemblierung von dicken Filamenten zu Sarkomeren während der Muskelentwicklung (Ao and Pilgrim, 2000; Epstein and Thomson, 1974). Mutationen im UNC-45, die solche Muskeldefekte zur Folge haben, sind meist Substitutionen konservierter Reste in der UCS-Domäne oder Stopcodons vor der Domäne (Barral et al., 1998). Dies deutet auf die funktionelle Wichtigkeit dieser Domäne hin. Neben der C-terminalen UCS-Domäne weist UNC-45 noch eine zentrale Domäne auf, deren Funktion unbekannt ist. Am N-Terminus befinden sich drei Tetracopeptid-Repeats (TPR), Protein-Protein-Interaktionsdomänen von 34 Aminosäuren welche in Wiederholungen von 3 bis 16 in verschiedenen Proteinen vorkommen (Barral et al., 2002; Venolia et al., 1999).

Barral et al. konnten zeigen, dass UNC-45 Chaperon-Aktivität besitzt und wahrscheinlich zusammen mit Hitze-Schock-Proteinen den Zusammenbau der Myosine zu dicken Filamenten im Nematoden *C. elegans* ermöglicht (Barral et al., 2002). *In vitro* Bindestudien zeigten zum einen die Interaktion von UNC-45 und Hitzeschock-Proteinen der Hsp90-Familie mittels der TPR-Domäne, zum anderen eine Bindung des Myosin S1-Subfragments, welches die Motordomäne der Klasse II Myosine darstellt, über die UCS-Domäne.

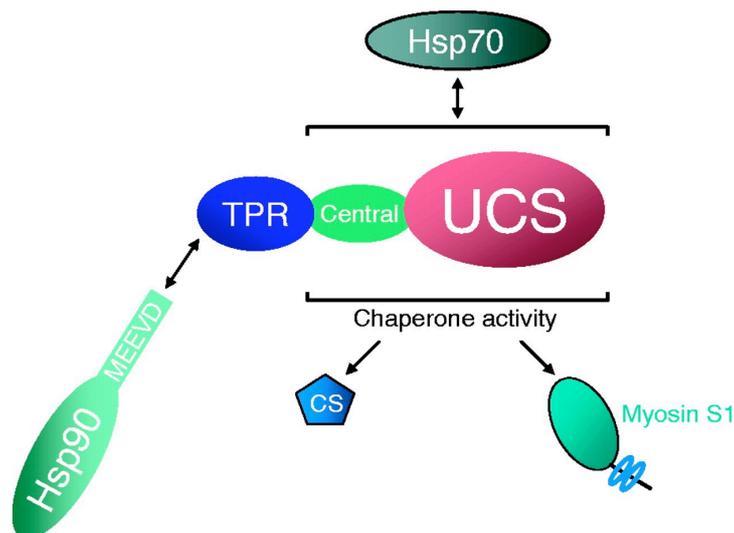


Abb.1.9. Funktion und interagierende Partner von UNC-45 (Quelle: Hutagalung et al., 2002). Die N-terminale TPR-Domäne von UNC-45 bindet direkt das C-terminale MEEVD-Motif von Hsp90p. Die zentrale Region und die UCS-Domäne binden das Myosin S1-Fragment (Motordomäne) und Hsp70p. Diese Domänen besitzen ausserdem eine Aktivität als Chaperone auf das S1-Fragment und standardisierte Chaperon-Substrate wie die Zitratsynthase (CS).

Ausserdem konnte Barral zeigen, dass UNC-45 nicht nur die Denaturierung der Zitratsynthase bei hohen Temperaturen verhindert, sondern auch die Denaturierung des S1-Fragments. Neben der Bindung von Hsp90p ist auch eine Interaktion mit Hsp70p bekannt, welche jedoch nicht durch die TPR-Domäne vermittelt wird. Es wird angenommen, dass UNC-45 als Kochaperon für den korrekten Zusammenbau der Klasse II Myosine zu Filamenten verantwortlich ist und deren spätere Stabilität gewährleistet.

Diese Funktion und die Domänenstruktur der UCS-Proteine scheint auch in höheren Vertebraten konserviert zu sein. Etheridge et al. konnten durch Doppel-in-situ Hybridisierung in Zebrafisch-Embryonen nachweisen, dass UNC45r (UNC-45 related) überlappend mit MyoD kolokalisiert. UNC-45r zeigt wie UNC-45 aus *C. elegans* einen Drei-Domänenbau von N-terminaler TPR- und C-terminaler UCS-Domäne (Etheridge et al., 2002). Im Gegensatz zu *C. elegans*, *Drosophila* oder auch dem Zebrafisch konnten durch Sequenz- und Datenbankvergleich in Maus- und humanen Genomen nicht nur ein, sondern zwei UNC-45 verwandte UCS-Proteine gefunden werden (Price et al., 2002). Diese Isoformen liegen auf zwei verschiedenen Chromosomen und zeigen unterschiedliche Expressionsmuster. Die generelle Form

(GC: general cell) wird in allen Organen exprimiert, wohingegen die andere Form nur im gestreiften Muskel (SM: striated muscle) hochexprimiert wird. Die Autoren vermuten, dass GC UNC-45 an der Zellproliferation und der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts von Myofibrillen beteiligt ist, nachdem diese gebildet wurden. SM UNC-45 scheint eine spezielle Rolle beim Zusammenbau und der Funktion von Sarkomeren zu haben. Auch bei diesen beiden Isoformen ist der Domänenbau (TPR-zentral-UCS) konserviert.

1.8. Die UCS-Proteine der Pilze

Wie die *unc-45*-verwandten Proteine scheinen auch die UCS-Proteine der Pilze an Myosin-vermittelten Prozessen beteiligt zu sein. Die entsprechenden Mutanten zeigen jedoch kaum Ähnlichkeit in ihrem Phänotyp, wohingegen alle UNC-45 verwandten Mutanten Störungen in der Muskelentwicklung aufweisen. Ausserdem fehlt allen bekannten UCS-Proteinen der Pilze die N-terminale TPR-Domäne.

RNG3, das UCS-Protein der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, wurde in einem Screen identifiziert, der nach Defekten im Zusammenbau des Aktomyosin-Rings und der Zytokinese während der Zellteilung suchte (Abb.1.10) (Balasubramanian et al., 1998; Wong et al., 2000). Es ist das einzige bekannte UCS-Protein der Pilze mit essentieller Funktion für die Zelle. Im Gegensatz zur Bäckerhefe vermehrt sich *S. pombe* nicht durch Knospung, sondern durch Spaltung, um zwei Tochterzellen zu erzeugen. Zu diesem Zweck bildet sich ein Aktomyosin-Ring in der Mitte der Zelle, welcher funktionell analog zur Trennungsfurche in tierischen Zellen zu sein scheint (Bezanilla et al., 1997; Kitayama et al., 1997; May et al., 1998). Dieser Ring besteht aus F-Aktin, Klasse II Myosin, leichten Myosinketten und zahlreichen anderen Proteinen (Feierbach and Chang, 2001). In der Interphase bildet Myo2p, das Hauptmyosin des kontraktiven Ringes, einen "Spot", welcher ein Vorläufer für den späteren Zusammenbau des Ringes ist (Wong et al., 2002). Dieser Spot wandert in der frühen Mitose in die mediale Region und assembliert dann in eine ringartige Struktur. Nach der Zelltrennung entsteht in jeder Tochterzelle ein neuer Spot als Überbleibsel

des alten Ringes (Wong et al., 2002). Während Myosin II im kontraktilen Ring eine hohe Fluktuation und Dynamik aufweist, zeigt es im Spot eine eher starre Struktur. Ausserdem ist die Aufrechterhaltung des Spots im Gegensatz zum Aktomyosin-Ring unabhängig von der Funktion des F-Aktin.

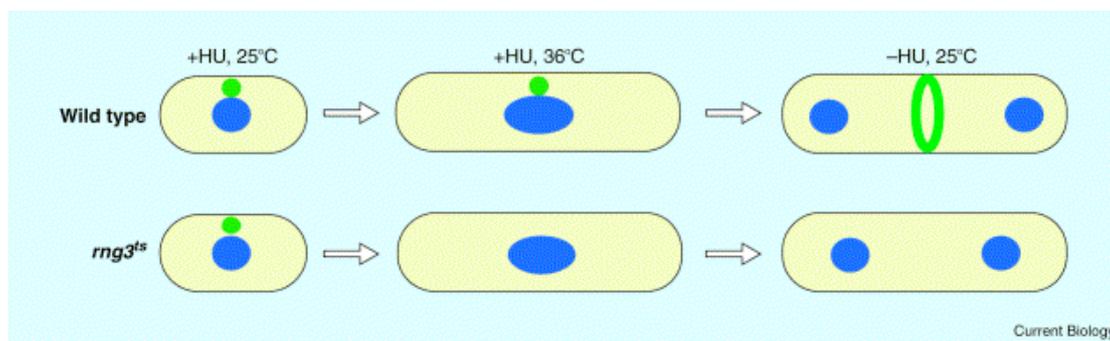


Abb.1.10. Rng3p ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Myosin II Spot. Werden mit Hydroxyharnstoff (HU) in der S-Phase blockierte Wildtyp und *rng3^{ts}* Zellen in Anwesenheit von HU bei 36°C inkubiert, verschwindet der Spot in *rng3^{ts}*-Zellen, aber nicht im Wildtyp. Wird HU wieder ausgewaschen und die Zellen bei 25°C inkubiert, bilden Wildtypzellen kontraktile Aktomyosin-Ringe. *Rng3^{ts}* Zellen sind nicht in der Lage einen Ring auszubilden.

RNG3 Mutanten durchlaufen keine Zytokinese, sondern bilden Sporen mit mehreren Kernen. Solche Mutanten sind nicht in der Lage, den Myosin II-Spot zu bilden und somit einen korrekten Ring aus Myo2p und F-Aktin aufzubauen (Wong et al., 2000). Das F-Aktin ist unorganisiert und die Septa an der Trennungsstelle sind fehlgeformt. Rng3p ist ausserdem für die Aufrechterhaltung des Aktomyosin-Ringes notwendig, nachdem sich dieser geformt hat (Wong et al., 2002). Für die Untersuchung der intrazellulären Verteilung von Rng3p wurden sowohl C-terminale wie auch N-terminale GFP-Fusionen hergestellt. Es konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden, obwohl das GFP-fusionierte Protein funktionell ist, da sowohl DNA, wie auch F-Aktin normal verteilt sind. Kommt es jedoch zu einer Koexpression von Rng3p-GFP und der temperatursensitiven Myosin-Mutante Myo2-E1, ist bereits bei permissiver Temperatur eine Akkumulation von Rng3p-GFP im kontraktilen Ring sichtbar. Dies deutet auf eine Interaktion zwischen Rng3p und dem Myosin-Kopf hin, da Myo2-E1 eine Punktmutation in der Motor-Domäne trägt. Es ist daher möglich, dass Rng3p den

Status der F-Aktin und Myosin Interaktion während des Ringzusammenbaus überprüft und diesen Ring dadurch aufrechterhält.

Cro1p ist das UCS-Protein des filamentösen Pilzes *Podospora anserina* und ist wichtig für die sexuelle Sporulation (Abb.1.11.) (Berteaux-Lecellier et al., 1998). Es reguliert dabei den Übergang zwischen dem syncytialen und dem zellulären Status. Das syncytiale (zellmembranlos; vegetativ) Stadium entsteht durch Verschmelzung von männlichen und weiblichen Organen und zeichnet sich durch mehrere Kerne aus, welche nicht durch Zellwände getrennt sind und sich synchron mitotisch teilen. Der Übergang zum zellulären Stadium geschieht anschliessend durch die Bildung von Zellwänden und durch Entstehung von einer dikaryotischen Zelle. Diese differenziert zu einem Ascus, in dem durch Meiose neue dikaryotische Sporen entstehen.

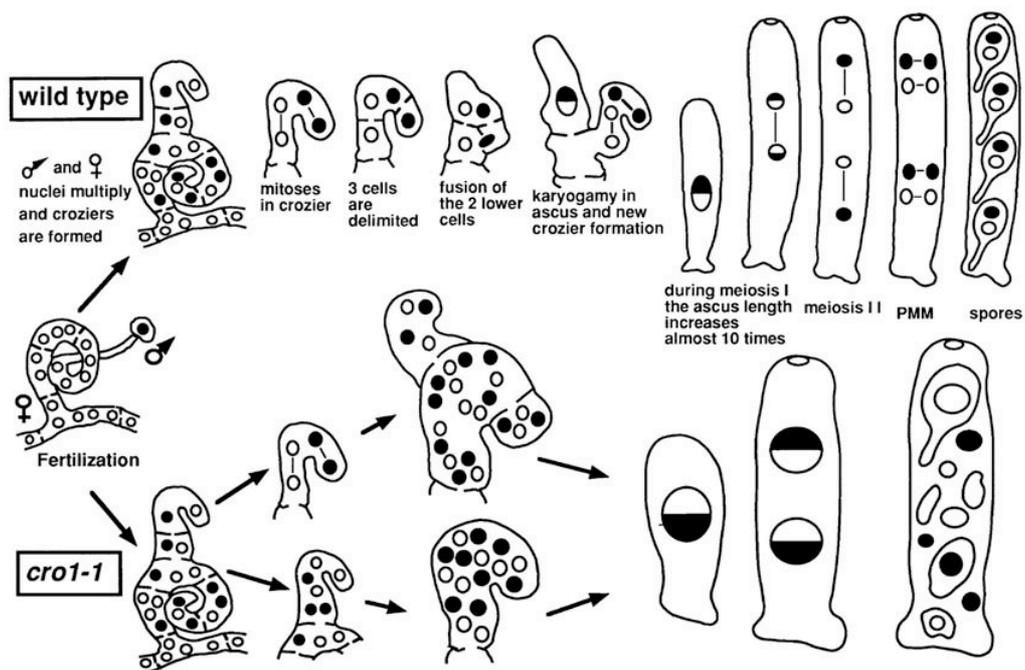


Abb.1.11. Sexueller Lebenszyklus von Wildtyp *Podospora anserina* und homozygoten *cro1-1* Mutanten bei der Bildung von Crozier und Ascus (Quelle: Berteaux-Lecellier et al., 1998). Im Mutantenstamm bilden sich mehrkernige Croziers durch zwei verschiedenen Mechanismen. Entweder werden wie im Wildtyp Dikaryon zwei Kerne isoliert, welche sich teilen ohne ein Septum zu bilden (unten), oder verschiedene Kerne wandern in einen Crozier (oben).

Homozygote *cro1-1* Mutanten erzeugen nach Befruchtung Fruchtkörper mit nur wenigen Asci, die durch Bildung grosser mehrkerniger Zellen anstatt diploider Zellen entstehen. Ein Grund dafür ist ein Defekt in der Bildung von Septen zwischen Mutter- und Tochterkern nach der Mitose. Ausserdem kommt es zu reduziertem filamentösem Wachstum, sowie einem Abbruch der Meiose, sodass polyploide Kerne entstehen. Sowohl das Mikrotubuli- wie auch das Aktin-Zytoskelett zeigen massive Störungen in *Cro1p* Mutanten. Zum Beispiel kommt es zu einer zufälligen Spindelpositionierung und zu fehlplazierten oder nicht vorhandenen Aktin-Gürteln und Septen. Insgesamt ähnelt der *cro1-1* Phänotyp dem von *rng3* Mutanten. Es konnte jedoch noch keine direkte Verbindung zwischen *Cro1p* und der Funktion von Myosinen gezeigt werden. In der Abwesenheit von *Cro1p* könnten nichtfunktionelle Myosine den Signalweg unterbrechen, der für die Regulation von Aktin- und Mikrotubuli-Aufbau notwendig ist. Dieser Signalweg könnte ähnlich dem in *S. pombe* sein, welche die Integrität des Aktin-Zytoskeletts überprüft und die Trennung der Tochterchromatiden blockiert, bis die mitotische Spindel orientiert ist (Gachet et al., 2001).

Der letzte bekannte Vertreter der UCS-Familie ist *She4p* aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Es wurde gleichzeitig in zwei verschiedenen Screens entdeckt (Jansen et al., 1996; Wendland et al., 1996). Wendland et al. suchten nach Mutanten mit Defekten in der Endozytose und Jansen et al. nach Mutanten mit misslokalisierter *ASH1* mRNA. Wendland et al. konnten zeigen, dass *she4Δ* Zellen eine signifikante Reduktion in der Aufnahme von Lipiden und \square -Faktor vorweisen. Die *ASH1* mRNA wird, wie schon angesprochen, in einem Komplex aus *She2p*, *She3p* und *Myo4p* in die Knospenspitze transportiert (Abb.1.12.). Im *she4Δ* Stamm zeigt die mRNA eine zytoplasmatische Verteilung in Mutter- und Tochterzelle. Jansen et al. konnten ausserdem zeigen, dass *She4p* nicht Teil des Transportkomplexes ist, also nicht mit der *ASH1* mRNA assoziiert, sondern einen anderen Einfluss auf deren Lokalisation haben muss.

Der *she4* Phänotyp ist sehr vielfältig und deutet daraufhin, dass das Protein in verschiedene zelluläre Prozesse involviert ist. Eine Deletion des Gens hat keine lethalen, sondern nur temperatursensitive Auswirkungen, welche sich darin äussern, dass die Zellen eine runde und aufgeblähte Morphologie zeigen (Wendland et al.,

1996). Neben verminderter Endozytose und misslokalisierter mRNA kommt es zu Defekten in der Polarität des Aktinzytoskeletts. Im Gegensatz zum Wildtyp lokalisieren die Aktin-*Patches* nicht am Kortex der Tochterzelle, sondern sind sowohl in Tocher- wie auch in der Mutterzelle gleichmässig verteilt. Die Folge ist ein Verlust der polarisierten Sekretion und somit der Wechsel zum isotropen Wachstum. Dieser Phänotyp ähnelt solchen, die durch Mutation anderer Komponenten des Endozytose-Signalweges entstehen. Ausserdem kommt es zu einem zufälligen Knospungsverhalten und es akkumulieren Vesikel und Membrankompartimente, ohne dass es zu Defekten in den sekretorischen Funktionen der Zelle kommt (Wendland et al., 1996).

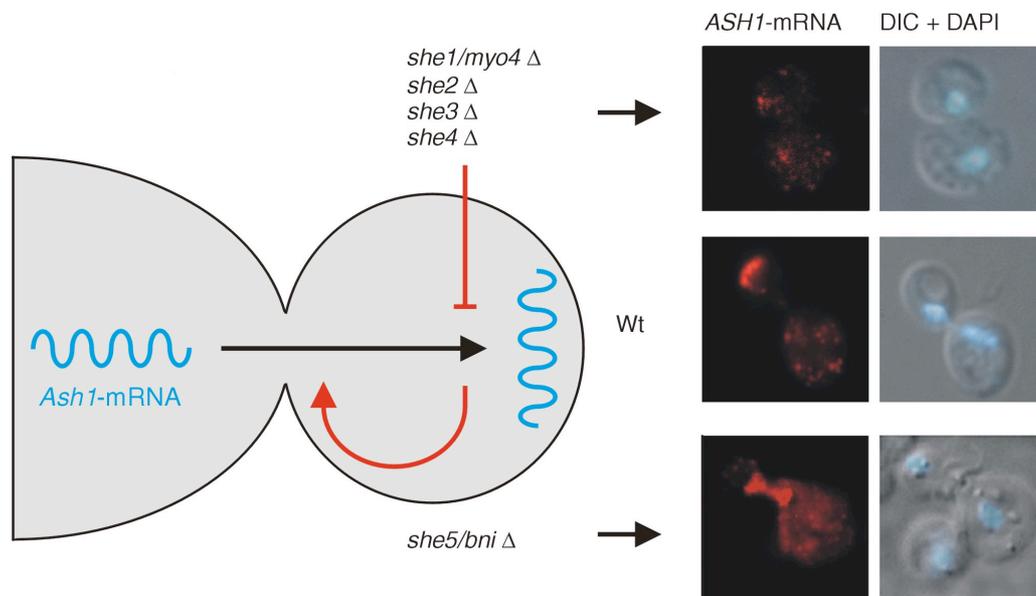


Abb.1.12. Effekt von *she*-Deletionen auf die Lokalisation der *ASH1* mRNA. Im Wildtyp lokalisiert die *ASH1* mRNA an die Knospenspitze der Tochterzelle (Wt). Die Deletion der *SHE*-Gene *SHE1*, *SHE2*, *SHE3* oder *SHE4* führt dazu, dass die *ASH1* mRNA in Mutter und Tochter zytoplasmatisch verteilt ist. Die *ASH1* mRNA wurde per *in situ* Hybridisierung mit CY3 gekoppelten *ASH1*-Antisense-Oligonukleotiden nachgewiesen. She5p (Bni1p) ist ein Formin, das die Integrität des Aktinzytoskeletts und somit indirekt die Lokalisation der *ASH1* mRNA beeinflusst.

Da sowohl Endozytose als auch mRNA-Lokalisation myosinabhängige Prozesse sind, liegt die Vermutung nahe, dass She4p wie die anderen Vertreter der UCS-Familie einen Einfluss auf die Myosin-Funktion hat. Mark Arnold konnte im Rahmen seiner

Diplomarbeit durch einen Two-Hybrid-Screen eine Interaktion zwischen der UCS-Domäne von She4p und den Klasse I Myosinen Myo3p und Myp5p nachweisen, welche essentiell für die Endozytose sind. Zusätzlich dazu konnte die Diplomandin Antje Brock mit Hilfe der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung zeigen, dass She4p in einem Komplex mit Myo2p vorliegt. Im Gegensatz zu den anderen UCS-Proteinen scheint She4p also keinen Einfluss auf Klasse II Myosine zu haben, sondern auf Myosine der Klasse I und V. Die Art des Einflusses und auch die zelluläre Funktion von She4p bleibt jedoch weiterhin unklar.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Verschiedene Arbeiten deuten daraufhin, dass die UCS-Proteine einen Einfluss auf myosin-vermittelte Prozesse haben. Welcher Art dieser Einfluss ist, konnte lediglich für UNC-45 aus *C. elegans* gezeigt werden, das als Kochaperone zusammen mit Hsp90p die Motordomäne von Klasse II Myosinen stabilisiert. Im Gegensatz dazu ist die Funktion von She4p aus *S. cerevisiae* weitgehend ungeklärt. Die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen deuten auch in Hefe auf eine Verbindung zwischen She4p und myosin-vermittelten Prozessen, wie Endozytose und mRNA Transport, hin. Ziel dieser Arbeit war daher die funktionelle Charakterisierung von She4p mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden. Es sollte geklärt werden, welcher Art die Interaktion zwischen She4p und den Myosinen ist und was die Ursachen für den pleiotropen *she4Δ* Phänotyp sind. Ausserdem sollte die Suche nach weiteren Interaktionspartnern Aufschluss über die zelluläre Funktion von She4p geben.

2. Ergebnisse

SHE4 wurde relativ gleichzeitig in zwei verschiedenen Screens identifiziert. Der eine Screen suchte nach Mutanten in der rezeptorabhängigen Endozytose (Wendland et al., 1996) und der andere nach Mutanten mit misslokalisierter *ASH1*-mRNA (Jansen et al., 1996). Die Funktion von She4p war bis dahin völlig unbekannt. Es konnte keiner spezifischen Protein-Familie zugeordnet werden und auch die Funktion eines homologen Proteins war nicht bekannt. Im Gegensatz dazu waren die essentiellen Proteine für Endozytose und mRNA-Lokalisation, die Myosine, bereits besser untersucht. Ausserdem stellten Jansen et al. fest, dass She4p nicht direkter Teil des *ASH1*-mRNA-Lokalisationskomplexes ist und konzentrierten sich auf die Aufklärung der direkten Partikelkomponenten. Erst als herausgefunden, dass das She4p Homolog UNC-45 die Zusammensetzung des Muskel in *C.elegans* beeinflusst (Ao and Pilgrim, 2000), rückte She4p wieder in den Blickpunkt des Interesses, ein möglicher Myosin-Interaktionspartner zu sein. Aus diesem Grund wurde die Funktion von She4p untersucht.

2.1. *She4Δ* Stämme zeigen einen temperatursensitiven Proliferationsstop.

Der *she4Δ* Phänotyp zeigt neben Defekten in der rezeptorabhängigen Endozytose und einem Defekt in der Lokalisation der *ASH1* mRNA auch ein temperatursensitives Wachstumsverhalten (Wendland et al., 1996). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es kein konditional-lethaler Phänotyp ist. Inkubation der Zellen bei 37°C führt zwar zu einem Wachstumsstop, welcher sich jedoch bei erneuter Inkubation bei der permissiven Temperatur (25°C) reverteren liess (Abb.2.1). *She4Δ* Zellen zeigen daher lediglich einen temperatur-abhängigen, umkehrbaren Proliferationsstop.

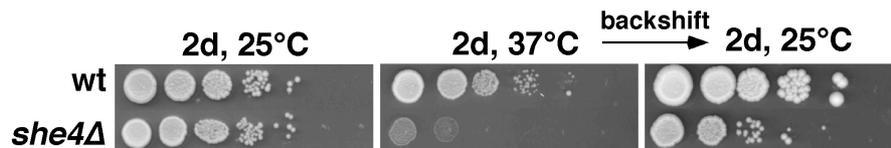


Abb.2.1. *She4*Δ Stämme zeigen einen temperatursensitiven Proliferationsstop. Nachdem Wildtyp (RJY358) und *she4*Δ Stämme (RJY311) zwei Tage bei 25°C inkubierten, wurde die Temperatur für weitere zwei Tage auf 37°C erhöht und anschliessend wieder auf 25°C erniedrigt. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt der *she4*Δ einen Wachstumsstopp bei 37°C, der sich jedoch mit der permissiven Temperatur wieder revertiert.

2.2. Myosine zeigen in *she4*Δ Zellen eine Misslokalisierung

Ao et al. konnten für UNC-45-Mutanten eine Missverteilung der Muskelmyosine nachweisen (Ao and Pilgrim, 2000). Die Ergebnisse des Two-Hybrid-Testes und der *she4*Δ Phänotyp lassen ebenfalls auf einen Defekt in der Funktion der Hefe-Myosine schliessen. Die Typ I Myosine Myo3p und Myo5p vermitteln die rezeptorabhängige Endozytose (Geli and Riezman, 1996) und das Typ V Myosin Myo4p den Transport der *ASH1* mRNA an die Knospenspitze (Long et al., 1997). Da alle Hefe-Myosine eine spezifische Lokalisation zeigen und diese Lokalisation essentiell für ihre Funktion ist, wurde die Myosin-Verteilung in Wildtyp und *she4*Δ-Zellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz verglichen (Abb.2.2A). Wie vermutet, zeigen Myo3p, Myo4p und Myo5p eine Misslokalisierung im Vergleich zum Wildtyp. Alle diese Myosine zeigen eine homogene Verteilung in Mutter- und Tochterzelle. Im Gegensatz dazu ist die Lokalisation des Typ II Myosins Myo1p und des Typ V Myosins Myo2p im *she4*Δ unbeeinflusst.

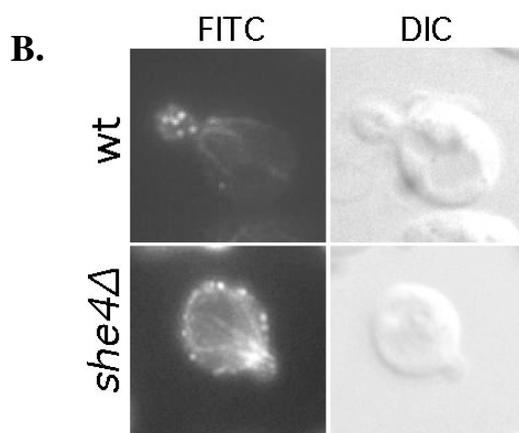
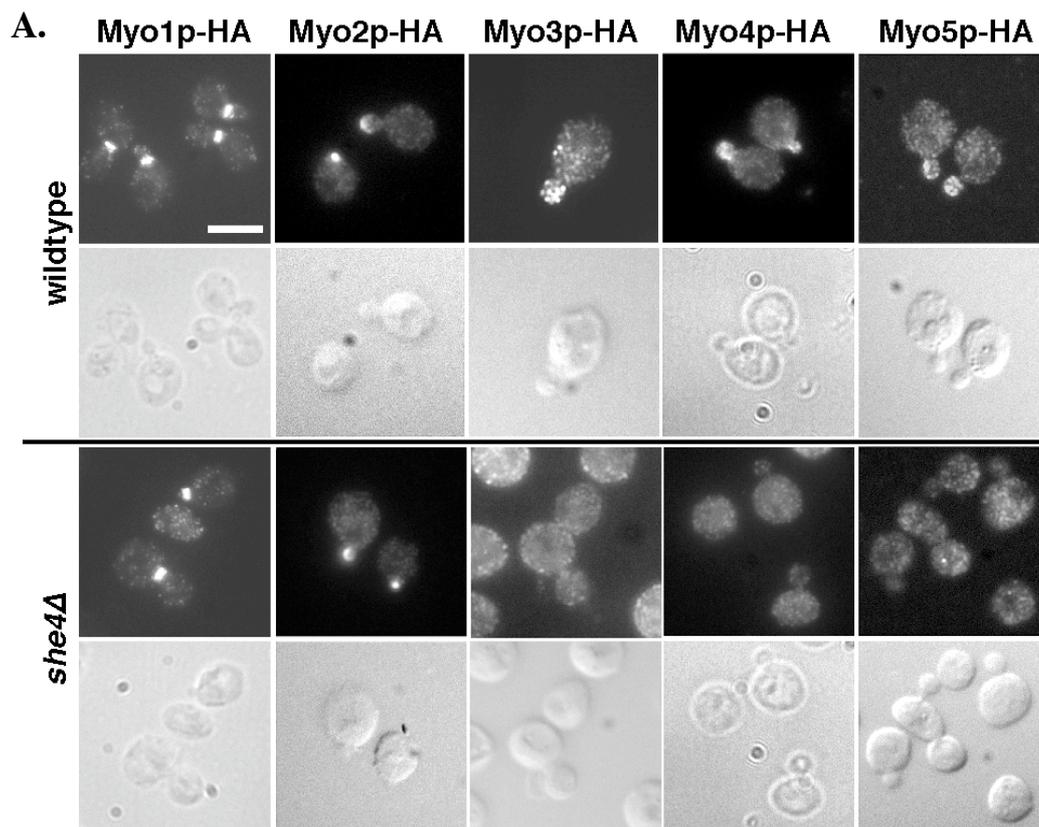


Abb.2.2. Lokalisation der Myosine im *she4Δ*. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von HA Epitop markierten Myosinen (A) und des Aktinzytoskeletts (B) in Wildtype (obere Abbildungen) und *she4Δ* Stämme verglichen. (A) Myo1p-HA (RJY1632/RJY1633) und Myo2p-HA (RJY1535/1536) zeigen in beiden Stammhintergründen wildtyp Lokalisation am Septum, bzw. der Knospenspitze. Im Gegensatz dazu ist bei Myo3p-HA (RJY1582/1583), Myo4p-HA (RJY530/599) und Myo5-HA (RJY1584/1586) eine Fehlverteilung im *she4Δ* Stamm sichtbar.

(B) Das Aktinzytoskelett wurde mit einem FITC-gekoppelten Phalloidin nachgewiesen. Aktin *Patches* sind im *she4Δ* Stamm (RJY311) nicht mehr ausschliesslich in der Knospe zu finden, sondern verteilen sich gleichmässig in den Zellen. Im Gegensatz dazu zeigen die Aktinfilamente eine normale Verteilung.

Die lokale Akkumulation all dieser Myosine ist abhängig von einem intakten Aktinzytoskelett. Aus diesem wurde die Integrität des Aktinzytoskelett durch

Phalloidin-vermittelte Dektektion untersucht (Abb.2B), einer Substanz, die an Aktin bindet und durch gekoppelten FITC-Farbstoff unter Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 488nm sichtbar gemacht werden kann. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigen die Aktin-*Patches* keine Akkumulation in der Knospe, sondern sind in Mutter- und Tochterzelle verteilt. Die Aktin-Kabel führen jedoch wie im Wildtyp von der Mutter- in die Tochterzelle. Ein weiterer Indikator für die Funktionalität der Kabel ist die Lokalisation von Myo2p (Abb.2.3.) (Lillie and Brown, 1994).

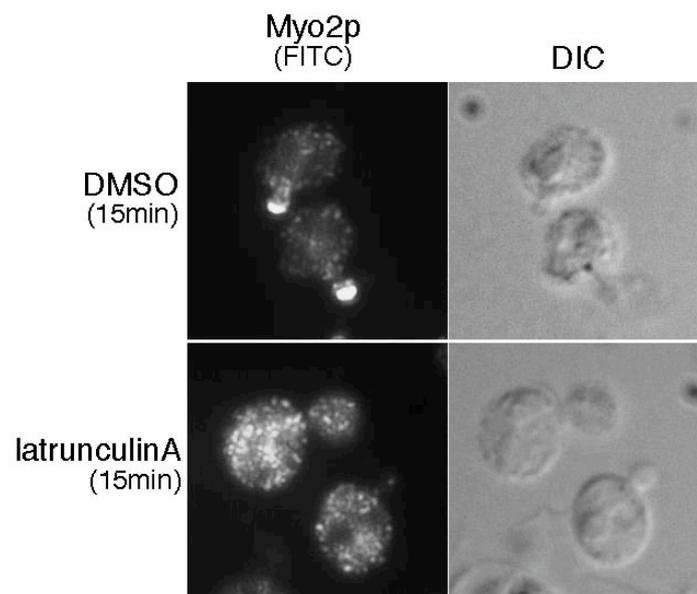


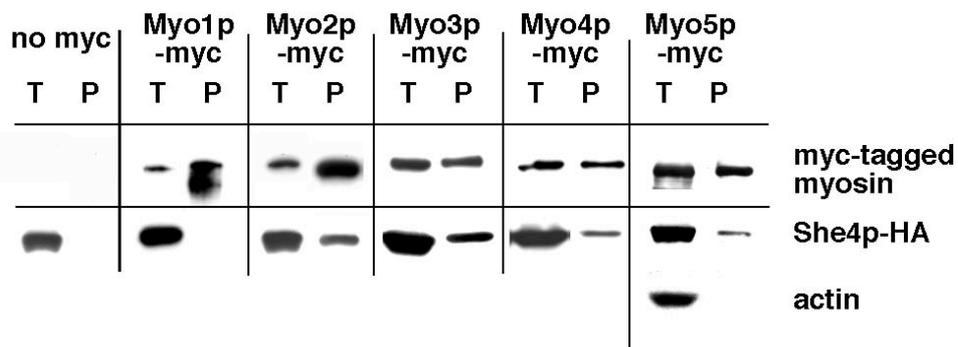
Abb.2.3. Myo2p lokalisiert aktinabhängig. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von Myo2p (RJY1556) nach Inkubation mit DMSO (Kontrolle) und LatrunculinA bestimmt. Mit Hilfe von Phalloidin-Färbung wurde die Integrität des Aktin-Zytoskeletts sichtbar gemacht. Inkubation mit LatrunculinA für 15min führt zu einer vollständigen Zerstörung des Aktinzytoskeletts und einer Misslokalisierung von Myo2p.

Inkubiert man die Zellen mit der depolymerisierenden Substanz LatrunculinA (Ayscough et al., 1997), ist ein Verschwinden der Aktinfilamente und damit eine Misslokalisierung von Myo2p sichtbar. She4p ist daher notwendig für die Lokalisation und Funktion von Myo3p, Myo4p, Myo5p und der Aktin *Patches*. Myo1p, Myo2p und die Aktinfilamente sind im *she4Δ* unbeeinflusst.

2.3. She4p interagiert *in vivo* mit der Motordomäne der Typ I und Typ V Myosine

Da der Two-Hybrid-Screen bereits Hinweise auf eine Interaktion zwischen She4p und den Myosinen gegeben hat, wurde diese mögliche Interaktion durch Immunpräzipitation weiter untersucht (Abb.2.4.A.). Für UNC-45 konnte zusammen mit Hsp90 und Hsp70 eine direkte Interaktion mit Myosin-Köpfen *in vitro* gezeigt werden (Barral et al., 2002). Für die Immunpräzipitation wurden Lysate der entsprechenden exponentiell wachsenden Hefestämme hergestellt. Dafür wurden Stämme mit myc-markierten Myosinen verwendet, welche mit Maus-Anti-Myc-Antikörper (9E10) an ProteinG-Sepharose immobilisiert wurden. Anschliessend wurde das Immunpellet durch Western-Analyse auf das Vorhandensein der Myc-Epitop-fusionierten Myosine und dem HA-markiertem She4p überprüft. Durch Vergleich der Banden konnte eine Assoziation mit Myo3p, Myo4p und Myo5p festgestellt werden, was zu erwarten war, da der *she4Δ* Phänotyp und die Lokalisationsstudien bereits Hinweise auf eine solche Interaktion gaben. Die Stöchiometrie dieser eher schwachen Interaktion deutet daraufhin, dass She4p nicht in einem festen Komplex mit den Myosinen vorliegt, sondern eher transient bindet. Für Myo5p konnte ausserdem gezeigt werden, dass die Bindung nicht vom Aktin vermittelt wird. Ausserdem konnte eine starke Interaktion mit Myo2p nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war eher überraschend, da die Lokalisation von Myo2p im *she4Δ* unbeeinflusst ist. Myo1p zeigt mit She4p wie erwartet keine Interaktion. Um das Ergebnis zu bestätigen, wurde die Immunpräzipitation wiederholt, indem HA-markiertes She4p mit dem Ratte-Anti-HA-Antikörper (3F10) an die Beads gebunden und dann die Myosine im Immunpellet nachgewiesen wurden (Abb.2.4.B). Dies liess sich aber nur mit Myo2p durchführen, da die Myo2p-She4p Interaktion sehr stark ist und Myo2p nicht so degradationsanfällig ist, wie die anderen Myosine. Es konnte also nachgewiesen werden, dass She4p mit den Typ I und Typ V Myosinen *in vivo* interagiert.

A.



B.

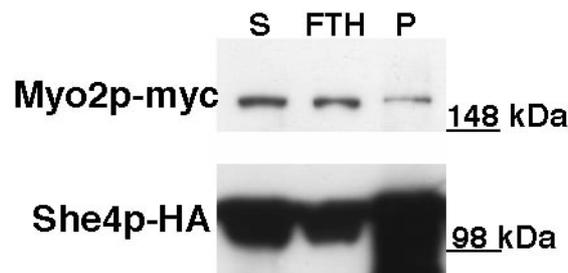


Abb.2.4. She4p bindet Typ I und Typ V Myosine. (A) Anti-myc Immunpräzipitation. HA-markiertes She4p kopräzipitiert mit immobilisierten myc-markierten Myo2p (RJY1556), Myo3p (RJY1550), Myo4p (RJY1549) und Myo5p (RJY1380). Typ II Myosin Myo1p (RJY1733) und die Kontrolle ohne myc-markierten Protein (RJY1340) zeigen keine Interaktion. Als zusätzliche Kontrolle wurde gezeigt, dass Myo5p nicht Aktin kopräzipitiert. T = Überstand, P = Pellet. (B) Anti-HA Immunpräzipitation. Myc-markiertes Myo2p kopräzipitiert mit immobilisierten HA-markierten She4p (RJY1556).

Als nächstes wurde versucht den Bereich des Myosins zu bestimmen, der mit She4p interagiert (Abb.2.5). Barral et al. konnten für UNC-45 *in vitro* zeigen, dass es mit dem S1-Subfragment des Myosins interagiert, welches die Motordomäne enthält (Barral et al., 2002). Diese Motordomäne vermittelt den Kontakt mit Aktin und erzeugt die motorische Kraft. Auf diese Weise wird den Myosinen in der Hefe eine spezifische Lokalisation ermöglicht. Es ist daher denkbar, dass She4p mit der Motordomäne interagiert und somit eine korrekte Myosin-Aktin-Interaktion und Lokalisation vermittelt. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurde das Myc-Epitop in den ORF von Myo4p (RJY1725) und Myo5p (RJY1807) integriert und somit verkürzte Myc-markierte Proteine erzeugt. Mit Hilfe der Immunpräzipitation wurde überprüft, ob diese verkürzten Myosine weiterhin She4p binden und kopräzipitieren

(Abb.2.5.). Von Myo4p wurde lediglich die Motordomäne exprimiert (Myo4 Δ 743p) und von Myo5p die Motor- und Halsdomäne (Myo5 Δ 996p), welche die Bindestellen für regulatorische Untereinheiten enthält (Abb.2.5.A) (Geli et al., 1998).

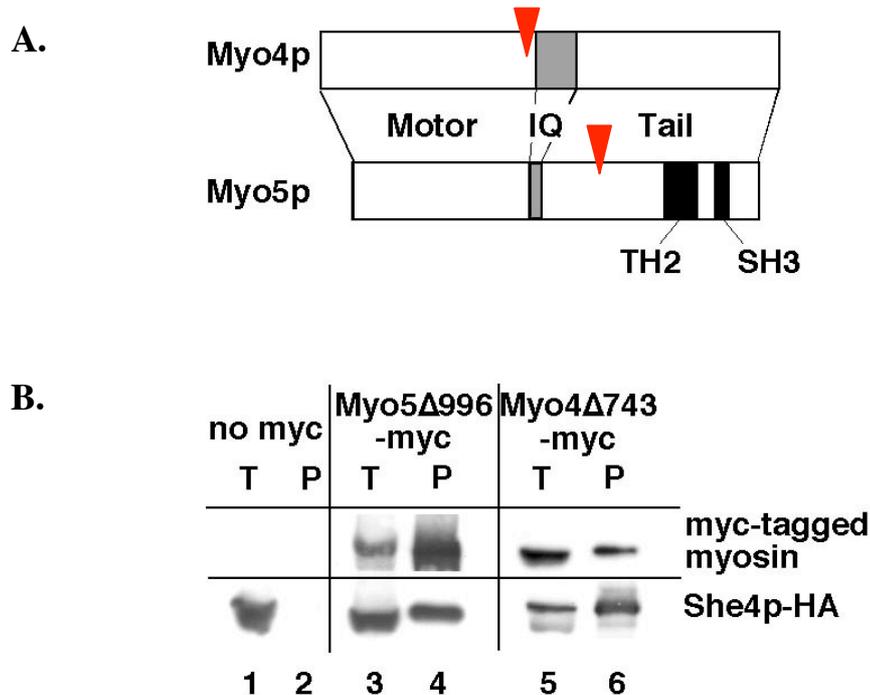


Abb.2.5. She4p interagiert mit der Myosin-Motordomäne. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Myo4p und Myo5p. Rote Pfeile markieren die Stelle der Myosin-Verkürzung. (B) Anti-myc Immunpräzipitation. HA-markiertes She4p kopräzipitiert mit immobilisierten Myo4 Δ 743p (RJY1725) und Myo5 Δ 996p (RJY1807). Die Kontrolle ohne myc-markiertes Protein zeigt keine unspezifische Bindung. T = Überstand, P = Pellet.

Die Lysate beider exponentiell wachsender Stämme wurden mit Maus-Anti-Myc-Antikörper inkubiert und an ProteinG-Sepharose immobilisiert. Durch Western-Blot-Analyse wurde das Immunpellet auf das Vorhandensein der Myosine und She4p untersucht. Beide Myosinen waren immer noch in der Lage, effektiv She4p zu präzipitieren. She4p interagiert also wie UNC-45 mit der Myosin-Motordomäne.

2.4. She4p lokalisiert Myo2p-abhängig an die Knospenspitze

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass She4p mit den Myosinen interagiert und ihre Lokalisation ermöglicht. Dies warf die Frage auf, ob She4p selbst auch eine spezifische Verteilung zeigt. Frühere Experimente mit C-terminalen GFP-Fusionen oder neunfach myc-markiertem She4p haben eine ubiquitäre Lokalisation gezeigt (Takizawa and Vale, 2000). Da sich jedoch an diesem Ende von She4p auch die UCS-Domäne befindet, wäre es möglich, dass grosse C-terminale *Tags* die Funktionalität des Proteins stören. Zu diesem Zweck wurde die Verteilung von dreifach, bzw. sechsfach HA-markiertem She4p mit indirekter Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 2.6.). Es konnte beobachtet werden, dass She4p genau wie die Typ I und Typ V Myosine an der Knospenspitze akkumuliert. Ein grosser Anteil des Proteins ist jedoch auch partikelartig in der Mutterzelle verteilt. Die Lokalisation von She4p an der Knospenspitze lässt sich durch den gesamten Zellzyklus beobachten und verschwindet erst kurz vor dem Abschnüren der ausgewachsenen Tochterzelle. Dies spricht wieder für eine Interaktion mit den Typ I und Typ V Myosinen, da dieses ein ähnliches Verteilungsverhalten zeigen.

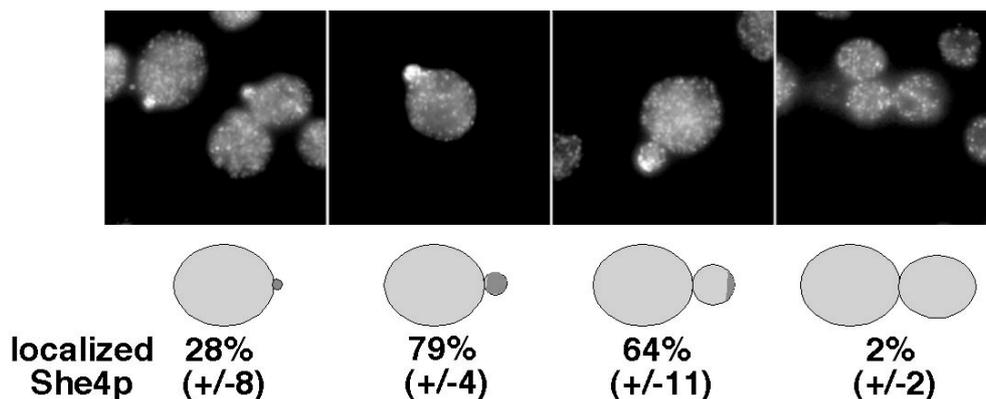


Abb.2.6. She4p lokalisiert an der Knospenspitze. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von HA Epitop markierten She4p (RJY1340) detektiert. Die schematischen Darstellungen zeigen das ausgezählte Zellstadium und die Zahl den Prozentanteil der Zellen, die lokalisiertes She4p aufweisen.

Wie vorher schon gesagt, lokalisiert Myo1p an der Mutter-Tochter-Verbindung während der Abschnürung der Knospe. Da She4p nie an dieser Stelle entdeckt werden konnte, bestätigt es wieder die Vermutung, dass She4p keinen Einfluss auf die Funktion von Typ II Myosinen hat. Als nächstes stellte sich die Frage, wie She4p an die Knospenspitze lokalisiert. Da She4p mit Myosinen interagiert, die ihrerseits an die Knospenspitze lokalisieren, liegt natürlich die Vermutung nahe, dass She4p myosin-abhängig transportiert wird. Da solch ein Prozess aktin-abhängig wäre, wurde zunächst der Einfluss des Aktinzytoskelett auf die She4p-Verteilung untersucht (Abb.2.7.). Zu diesem Zweck wurde ein exponentiell wachsender Stamm mit HA-Epitop markiertem She4p für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet und mit der aktin-depolymerisierenden Substanz LatrunculinA (gelöst in DMSO) inkubiert. Die Integrität des Aktinzytoskelett wurde erneut mit FITC-gekoppelten Phalloidin nachgewiesen. Wie in Abb.2.7. zu sehen, führt bereits eine zweiminütige Inkubation der Zellen mit LatrunculinA zu einer vollständigen Zerstörung des Aktinzytoskeletts. Weder Aktin *Patches*, noch Kabel sind in den Zellen zu erkennen. Zum gleichen Zeitpunkt konnte man auch eine Misslokalisierung von She4p erkennen. Die Verteilung in Form von Partikeln ist jedoch weiterhin sichtbar. Um einen Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Lokalisation auszuschliessen, wurden die Zellen als Kontrolle nur mit DMSO inkubiert. Weder She4p-Lokalisation, noch die Integrität des Aktinzytoskeletts werden durch DMSO beeinträchtigt.

She4p wird also aktinabhängig an die Knospenspitze transportiert. Dies spricht für eine Lokalisation mit Hilfe eines Myosins. Die Frage war nun, welches Myosin dies sein könnte.

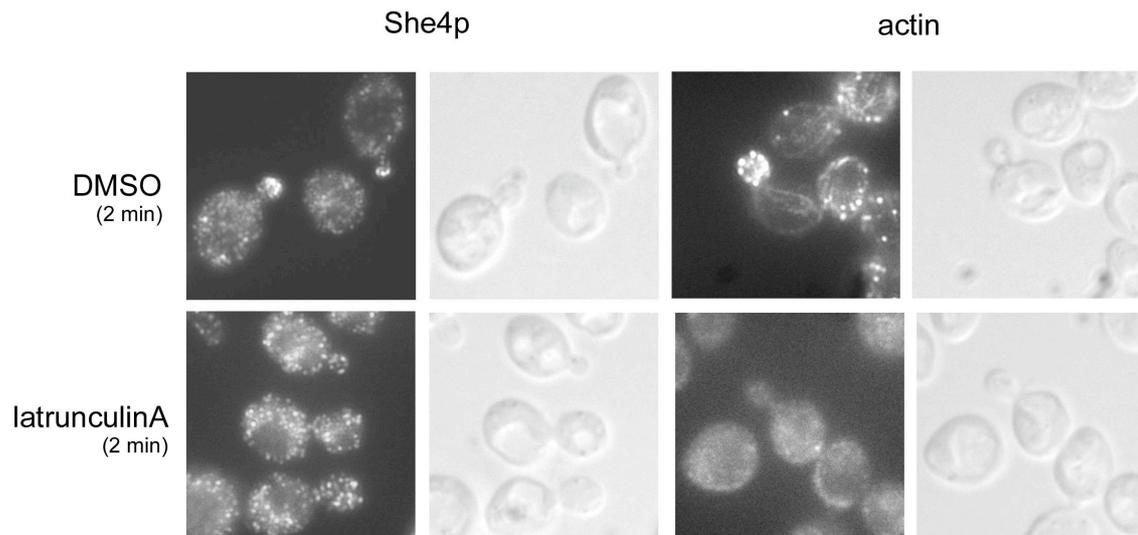


Abb.2.7. She4p lokalisiert aktinabhängig. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von HA Epitop markierten She4p (RJY1340) nach Inkubation mit DMSO (Kontrolle) und LatrunculinA bestimmt. Mit Hilfe von Phalloidin-Färbung wurde die Integrität des Aktin-Zytoskeletts sichtbar gemacht. Zweiminütige Inkubation mit LatrunculinA führt zu einer vollständigen Zerstörung des Aktinzytoskeletts und einer Misslokalisierung von She4p.

Aus diesem Grund wurde zunächst die Kollokalisierung der Myosine und She4p untersucht (Abb.2.8.). Zu diesem Zweck wurden exponentiell wachsende Stämme verwendet, welche myc-markierte Myosine und HA-markiertes She4p exprimieren. Myosin und She4p wurden dann mittels Koimmunfärbung in einer Zelle sichtbar gemacht, um eine mögliche Kollokalisierung zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen parallel mit den primären Maus-Anti-Myc-Antikörper und Ratte-Anti-HA-Antikörper inkubiert und anschliessend mit den sekundären FITC-gekoppelten Anti-Ratte-Antikörper (Anregung bei 488nm), sowie CY3-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (Anregung bei 546nm).

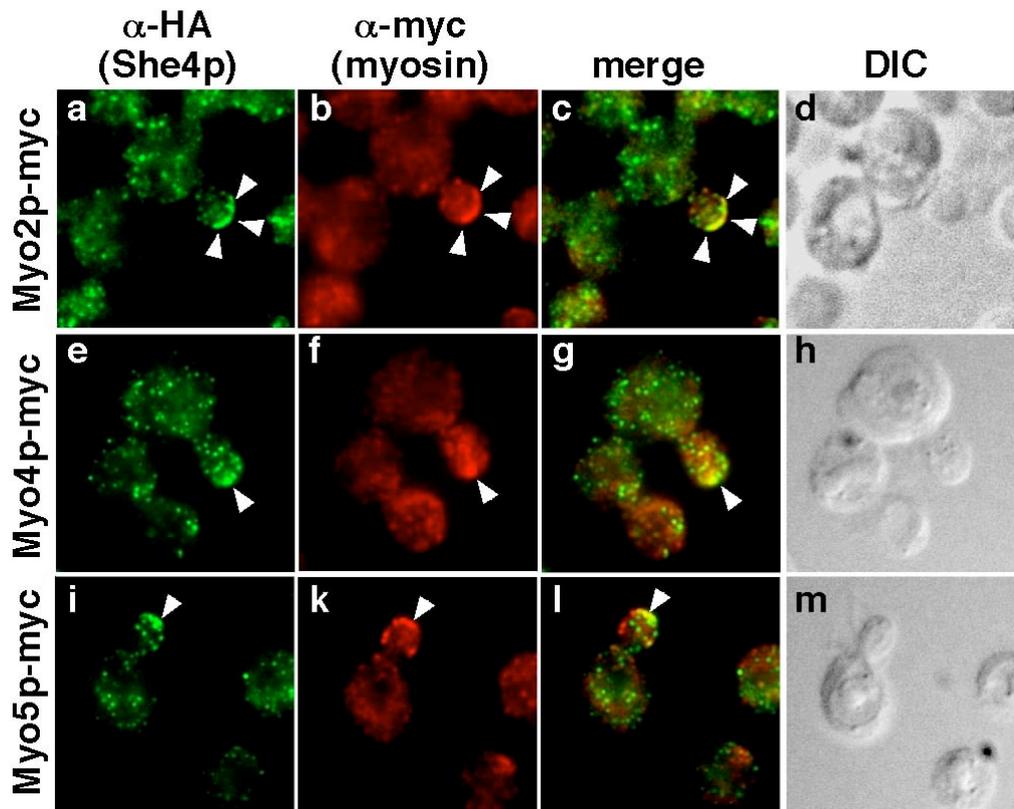


Abb.2.8. Kolokalisation von She4p und den Myosinen. Durch indirekte Koimmunfluoreszenz wurde die Lokalisation von HA markierten She4p und myc-markierten Myosinen detektiert. Die Kolokalisation wird durch Pfeile angezeigt. Myo4p (RJY1396) und Myo5p (RJY1380) zeigen nur eine partielle Überlappung mit She4p (Bilder g und i). Im Gegensatz dazu überlappen Myo2p (RJY1556) und She4p in einer kappenartigen Struktur an der Knospenspitze (Bild c).

Wie in Abb.2.9 zu sehen, zeigen Myo4p (RJY1396) und Myo5p (RJY1380) nur eine partielle Überlappung mit She4p an der Knospenspitze. Im Gegensatz dazu überlappen Myo2p (RJY1556) und She4p in einer kappenartigen Struktur in der Tochterzelle. In der Mutterzelle zeigen alle Myosine keinerlei erkennbare Kolokalisation mit She4p. Um herauszufinden, welches der Myosine für den She4p-Transport verantwortlich sein könnte, wurden *knock-out* Stämme von *MYO4* und *MYO5* konstruiert, welche zusätzlich HA-markiertes She4p exprimieren. Anschliessend wurde durch indirekte Immunfluoreszenz die She4p-Verteilung untersucht (Abb.2.9.). Beide Stämme zeigen keinen Einfluss auf die She4p-Lokalisation. Auch ein *myo3Δmyo5Δ* Stamm beeinträchtigt nicht die She4p-Verteilung in der Zelle (Daten nicht gezeigt). Es konnte also gezeigt werden, dass weder Myo4p noch die Typ I Myosine für die She4p-Lokalisation verantwortlich sind.

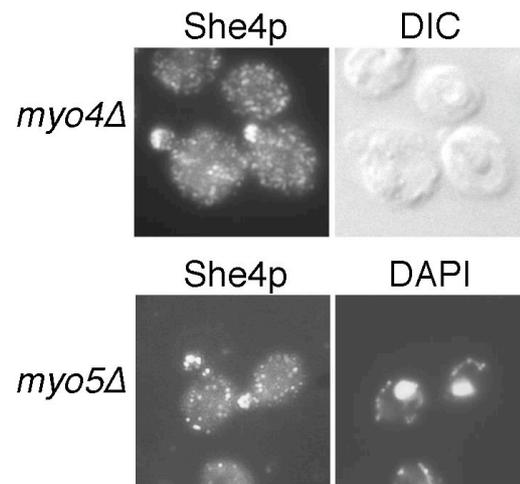


Abb. 2.9. She4p lokalisiert unabhängig von Myo4p und Myo5p. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von HA Epitop markierten She4p detektiert. Sowohl im *myo4Δ*, wie auch im *myo5Δ* ist eine deutliche Akkumulation von She4p in der Knospenspitze sichtbar.

Im Gegensatz zu den Typ I und Typ V Myosinen ist *MYO2* ein essentielles Gen und kann daher nicht deletiert werden. Um trotzdem den Einfluss von Myo2p auf die She4p-Lokalisation untersuchen zu können, wurde der temperatursensitive *myo2-66* Stamm verwendet (Lillie and Brown, 1994). Dieser Stamm trägt eine Punktmutation in der Motordomäne von Myo2p, welche bei der restriktiven Temperatur zu einer Dissoziation des Proteins vom Aktin führt. Dies hat dann eine Misslokalisierung und somit auch den Funktionsverlust von Myo2-66p zur Folge. In diesem Stamm wurde *SHE4* mit sechs HA-Epitopen fusioniert (RJY1803) und anschliessend die She4p-Verteilung durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert (Abb.2.10.).

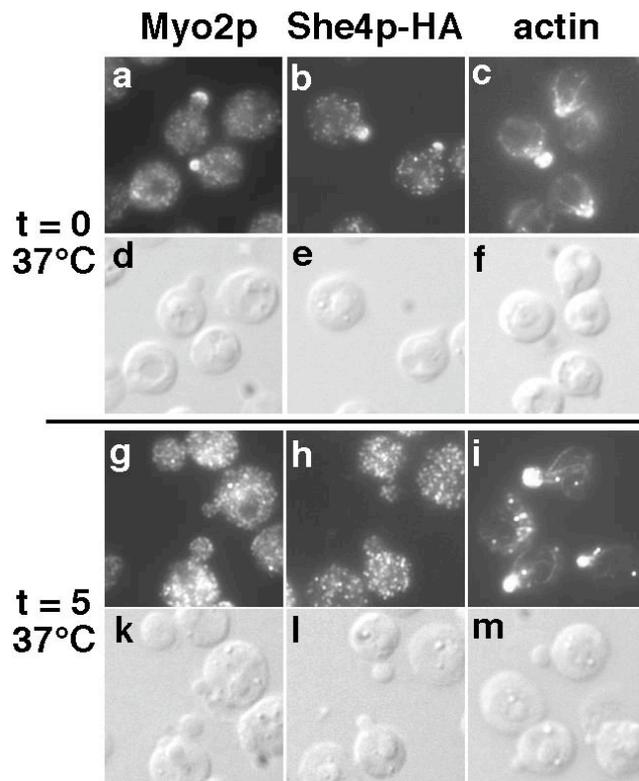


Abb.2.10. She4p lokalisiert Myo2p-abhängig. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von Myo2-66p und HA-markierten She4p detektiert. Die Integrität des Aktin-Zytoskeletts wurde durch Phalloidin-Färbung überprüft. Der temperatursensitive *myo2-66* Stamm (RJY1803) wurde für fünf Minuten bei 37°C inkubiert und anschliessend auf She4p und Myo2-66p Verteilung untersucht. Beide Proteine zeigen eine Misslokalisierung (Bild g und h), obwohl das Zytoskelett noch intakt ist (Bild i).

Die Zellen wurden zunächst bei 25°C bis zur exponentiellen Phase angezogen und anschliessend für 5 Minuten bei der restriktiven Temperatur (37°C) inkubiert. Vor und nach der Temperaturerhöhung wurden die Zellen fixiert und auf Lokalisation von Myo2-66p und She4p, sowie die Integrität des Aktinzytoskeletts untersucht. Zur Detektion von HA-markiertem She4p wurde Ratte-Anti-HA-Antikörper verwendet und für die Färbung des Aktinzytoskeletts FITC-gekoppeltes Phalloidin. Myo2p wurde durch einen speziellen Kaninchen-Anti-Myo2-Tail Antikörper sichtbar gemacht. Vergleicht man die Lokalisation von Myo2-66p und She4p vor und nach der Temperaturerhöhung, kann man erkennen, dass beide Proteine bereits nach 5 Minuten bei 37°C eine Misslokalisierung zeigen.

Ein sekundärer Effekt durch ein defektes Aktinzytoskelett kann ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zur Myo2-66p und She4p Lokalisation hat die Temperaturerhöhung keinen Einfluss auf das Aktinzytoskelett. Sowohl vor, als auch nach dem Shift sind Aktin-Kabel und lokalisierte Aktin *Patches* zu sehen. Dies Ergebnis macht deutlich, dass Myo2p für die She4p-Lokalisation an die Knospenspitze verantwortlich ist. Diese Theorie wird ausserdem durch die Interaktion in der Immunpräzipitation und die Koloalisations-Daten unterstützt.

In vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass She4p mit der Motordomäne der Myosine interagiert. Da Myo2-66p eine Punktmutation im Motor trägt, welche zu einer Dissoziation vom Aktinfilament führt, wurde untersucht, ob She4p auch bei der restriktiven Temperatur noch mit Myo2-66p *in vivo* interagiert (Abb.2.11). Zu diesem Zweck wurde der Stamm RJY1803 aus dem vorherigen Experiment verwendet, um genomisches Myo2-66p mit einem dreifachen myc-Epitop zu fusionieren (RJY1913). Zum Vergleich wurde ein Stamm verwendet, der ein myc-markiertes Wildtyp Myo2p exprimiert (RJY1556).

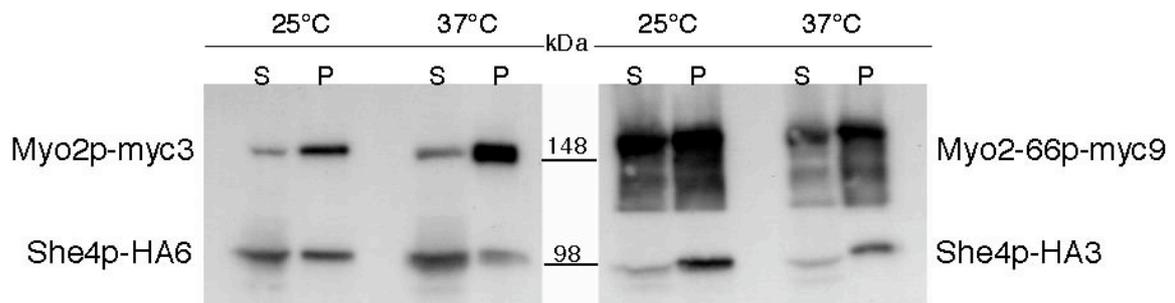


Abb.2.11. Interaktion von She4p und Myo2-66p. Anti-myc Immunpräzipitation. HA-markiertes She4p kopräzipitiert mit immobilisierten myc-markierten Myo2p (RJY1556) und Myo2-66p (RJY1913). Eine Inkubation der Zellen bei 25°C oder 37°C hat keinen Einfluss auf die Interaktion. S = Überstand, P = Pellet.

Beide Stämme wurden bei 25°C bis zur exponentiellen Phase angezogen und anschliessend für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lysate beider Stämme wurden dann mit Maus-Anti-Myc-Antikörpern immobilisiert und das Immunpellet anschliessend durch Western-Analyse auf das Vorhandensein von HA-markiertem She4p untersucht.

Sowohl Myo2p, wie auch Myo2-66p binden bei 37°C weiterhin She4p. Eine Besonderheit ist, dass im Fall des Myo2-66p sogar eine stärkere Interaktion mit She4p sowohl bei 25°C wie auch bei 37°C sichtbar ist.

2.5. Die She4p-Lokalisation ist essentiell für die Funktion der Typ I Myosine

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass Myo2p She4p bindet und in die Knospenspitze transportiert. Die Frage war nun, warum dieser Transport nötig ist. Da Myo4p und Typ I Myosine auch an der Knospenspitze akkumulieren, lag der Gedanke nahe, dass sie für ihre Funktion She4p ebenfalls dort brauchen. Durch den *myo2-66* Stamm hatte man nun ein interessantes System zur Verfügung, das die Untersuchung dieses Sachverhaltes ermöglichte. Auf der einen Seite steht funktionelles She4p in der Zelle zur Verfügung, auf der anderen Seite ist dieses jedoch misslokalisiert. Aus diesem Grund wurde in einem *myo2-66* Stamm *MYO4* (RJY1830) und *MYO5* (RJY1828) mit einem sechsfachen HA-Epitop fusioniert. Diese Stämme wurden dann zusammen mit den entsprechenden Wildtyp-Stämmen (Myo4p: RJY1054; Myo5p: RJY1584) für 5, 15 und 90 Minuten bei 37°C inkubiert und anschliessend die Myosin-Verteilung und die Integrität des Aktinzytoskeletts mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz verglichen (Abb.2.12). Dafür wurden der Ratte-Anti-HA-Antikörper und die Phalloidin-Färbung verwendet. Betrachtet man zunächst den Einfluss des *myo2-66* Hintergrundes auf die Myo4p-Lokalisation, so kann man erkennen, dass zwischen Wildtyp und *myo2-66* Stamm kein Unterschied in der Myo4p-Verteilung erkennbar ist.

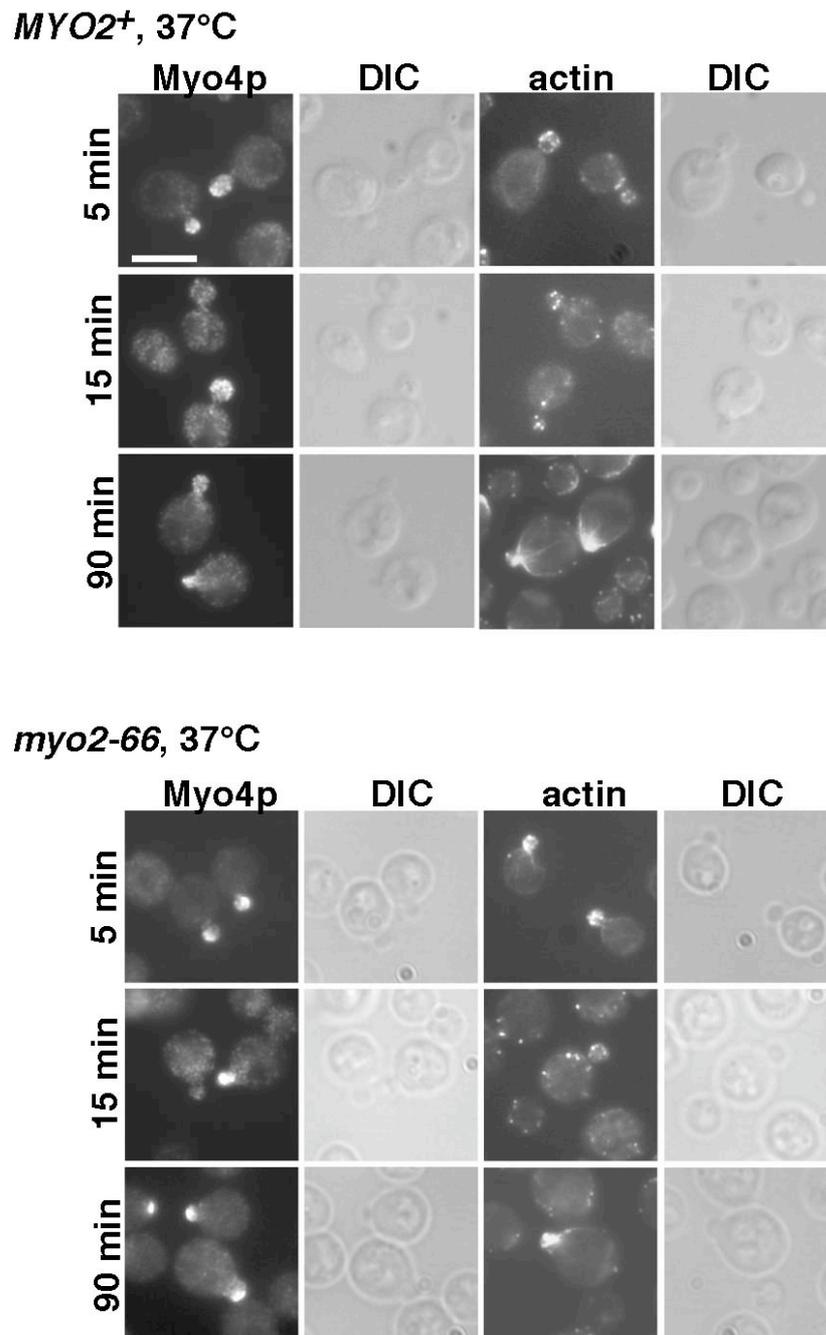


Abb.2.12. Myo4p Lokalisation benötigt kein funktionelles Myo2p. (A und B) (A) MYO2⁺ (RJY1054) und (B) myo2-66 Stämme (RJY1830) exprimieren HA markiertes Myo4p. Die Zellen wurden nach 5, 15 und 90 Minuten Inkubation bei der restriktiven Temperatur (37°C) fixiert und auf Myo4p-Lokalisation untersucht. Die Myo4p Lokalisation wurde durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert und die Integrität des Aktin-Zytoskeletts durch Phalloidin-Färbung. Wildtyp (A) und myo2-66 (B) Stamm zeigen nach 15min eine partielle Myo4-Misslokalisierung, die sich aber nach längerer Inkubation (90min) wieder durch Rekonstruktion des Aktinzytoskeletts normalisiert.

Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C zeigt sich eine partielle Misslokalisierung von Myo4p. Dies kann jedoch durch die Beeinträchtigung des Aktinzytoskeletts erklärt werden, welches bei längeren Inkubation bei 37°C kollabiert (Barral et al., 2000; Karpova et al., 1998). Nach 90 Minuten ist jedoch eine Rekonstitution des Aktinzytoskeletts und somit auch eine Rückführung der Myo4p-Lokalisation erkennbar. In Abb. 2.13 wurde dieser Sachverhalt noch quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden pro Zeitpunkt 5 verschiedene Zählung durchgeführt. Dabei wurden die Zellen bestimmt, welche ein misslokalisiertes Myo4p zeigten. Wie man in dem Diagramm erkennt, zeigen sowohl der Wildtyp, wie auch der *myo2-66* Stamm ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die Myo4p-Fehlverteilung. Diese steigt nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C um das ca. dreifache an, um dann aber in Zuge der Rekonstitution des Aktinzytoskeletts wieder auf den Wert der fünfminütigen Inkubation zurückzufallen. Der *myo2-66* Stamm zeigt zu allen Zeitpunkten eine leicht erhöhte Myo4p-Misslokalisierung verglichen zum Wildtyp. Dies könnte durch sekundäre Effekte des *myo2-66* Phänotyps zu erklären sein, da das gleiche Phänomen bei Myo5p im *myo2-66* Stamm nach 5 minütiger Inkubation bei 37°C zu beobachten ist (siehe Abb. 2.15).

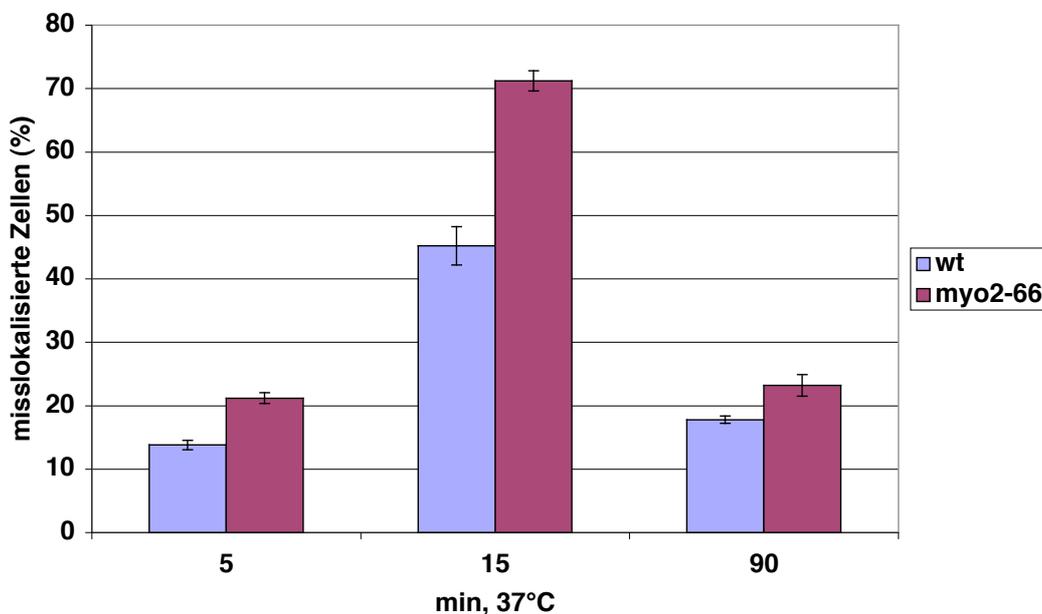


Abb.2.13. Quantifizierung der Myo4p-Misslokalisierung in *myo2-66*. Wildtyp und *myo2-66* Zellen aus Abb.13 wurden unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop nach 5, 15 und 90 Minuten Inkubation bei 37°C in Bezug auf Myo4p-Misslokalisierung ausgezählt. Beide Stämme verhalten sich nach dem Temperaturshift gleich. n = 5, insgesamt 3160 Zellen ausgezählt.

Es konnte also festgestellt werden, dass die Myo2p-Funktion und damit auch die She4p-Verteilung keinen längerfristigen Einfluss auf die Lokalisation von Myo4p an die Knospenspitze hat.

Als nächstes wurde der Einfluss des *myo2-66* Hintergrunds auf die Myo5p-Lokalisation untersucht. Wie im Falle von Myo4p wurden die Zellen nach 5, 15 und 90 Minuten Inkubation bei 37°C fixiert und anschliessend mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf Myo5p-Misslokalisierung analysiert (Abb.2.14). Im Gegensatz zur Myo4p ist hier ein ganz dramatischer Unterschied zwischen Wildtyp und *myo2-66* Stamm erkennbar. Im Wildtyp ist selbst nach 90 minütiger Inkubation bei 37°C keine Veränderung bei der Myo5p Lokalisation und der Kolokalisation von Myo5p mit den Aktin *Patches* erkennbar. Vergleicht man dies mit dem *myo2-66* Stamm, ist ganz deutlich erkennbar, dass es hier bereits nach 15 Minuten bei 37°C zu einer massiven Misslokalisierung von Myo5p kommt. Diese Misslokalisierung kann auch nicht durch Rekonstitution des Aktinzytoskeletts nach 90 Minuten revertiert werden.

In Abb. 2.15 wurde die Myo5p-Misslokalisierung quantifiziert. Auch hier wurden pro Zeitpunkt 5 verschiedene Zählung durchgeführt. Gezählt wurden wieder die Zellen, die misslokalisiertes Myo5p zeigten. Auch dieses Diagramm spiegelt sehr deutlich die Misslokalisierung von Myo5p nach 15 min im *myo2-66* Stamm wieder. Wie im Falle des Myo4p fällt die Myo5-Misslokalisierung im Wildtyp fast wieder auf den 5 Minuten Wert zurück, im *myo2-66* Hintergrund bleibt sie jedoch konstant bei über 80%. Für die Myo5p-Lokalisation reicht es also nicht aus, wenn funktionelles She4p in der Zelle vorhanden ist. Dieses She4p musste erst mit Hilfe von Myo2p an die Knospenspitze transportiert werden, um dort die Funktion der Typ I Myosine zu gewährleisten. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass Myo5p erst nach 15 Minuten eine Misslokalisierung zeigt und nicht nach 5 Minuten wie She4p. Anscheinend braucht es etwas Zeit zwischen dem She4p-Verlust an der Spitze und der Dissoziation der Typ I Myosine vom Kortex der Knospe.

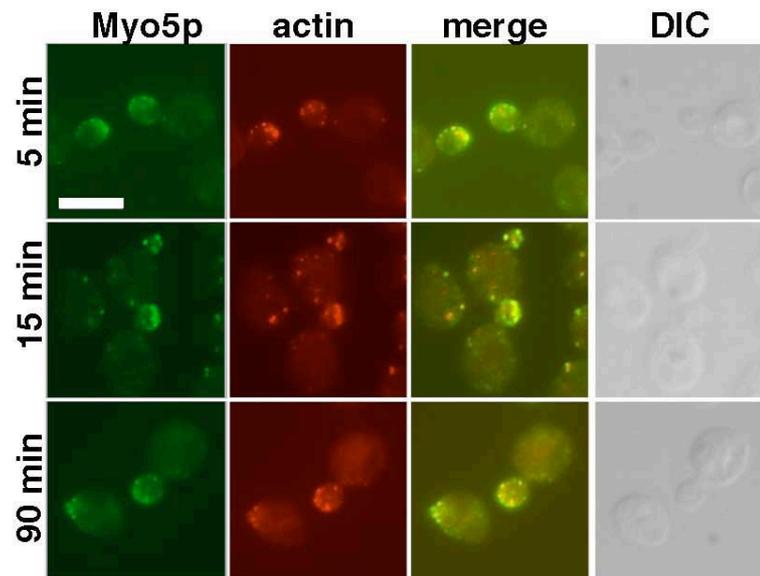
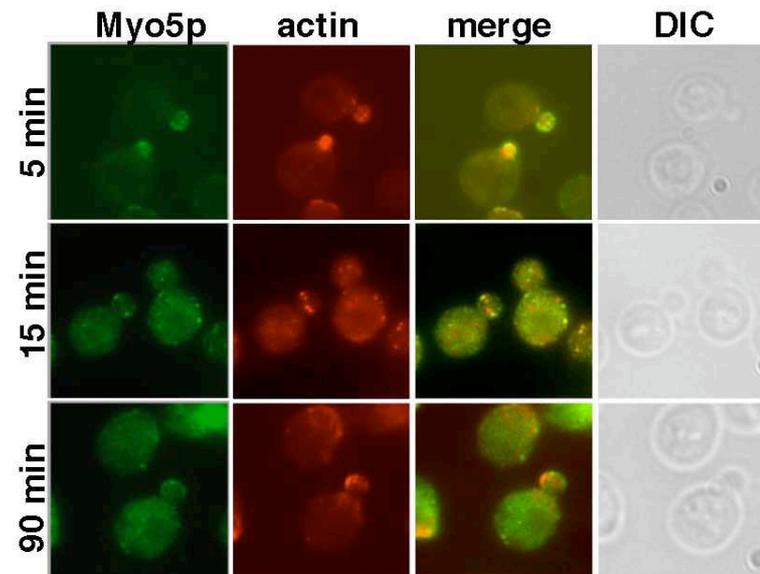
MYO2⁺*, 37°C**myo2-66*, 37°C**

Abb.2.14. Myo5p Lokalisation benötigt funktionelles Myo2p. (A und B) (A) *MYO2⁺* (RJY1584) und (B) *myo2-66* Stämme (RJY1828) exprimieren HA markiertes Myo5p. Die Zellen wurden nach 5, 15 und 90 Minuten Inkubation bei der restriktiven Temperatur (37°C) fixiert und auf Myo5p-Lokalisation untersucht. Die Myo5p Lokalisation wurde durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert und die Integrität des Aktin-Zytoskeletts durch Phalloidin-Färbung. Im Gegensatz zum Wildtyp (A) ist der *myo2-66* (B) Stamm nicht in der Lage, die Myo5p-Lokalisation am Knospen-Kortex nach 15 Minuten und länger aufrecht zu erhalten.

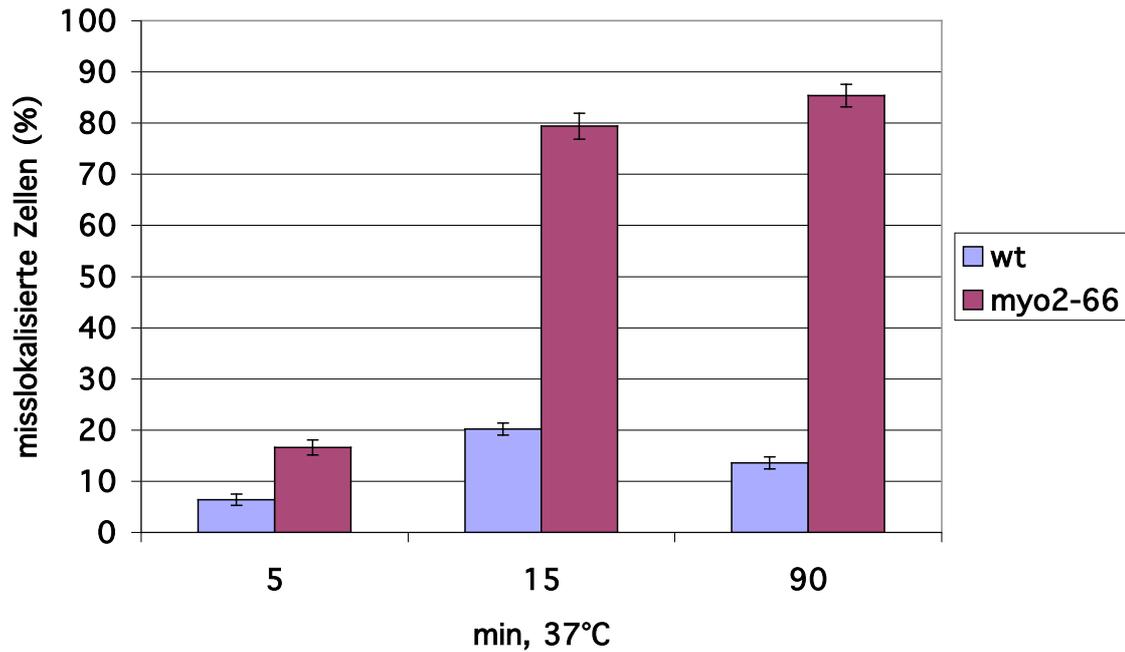


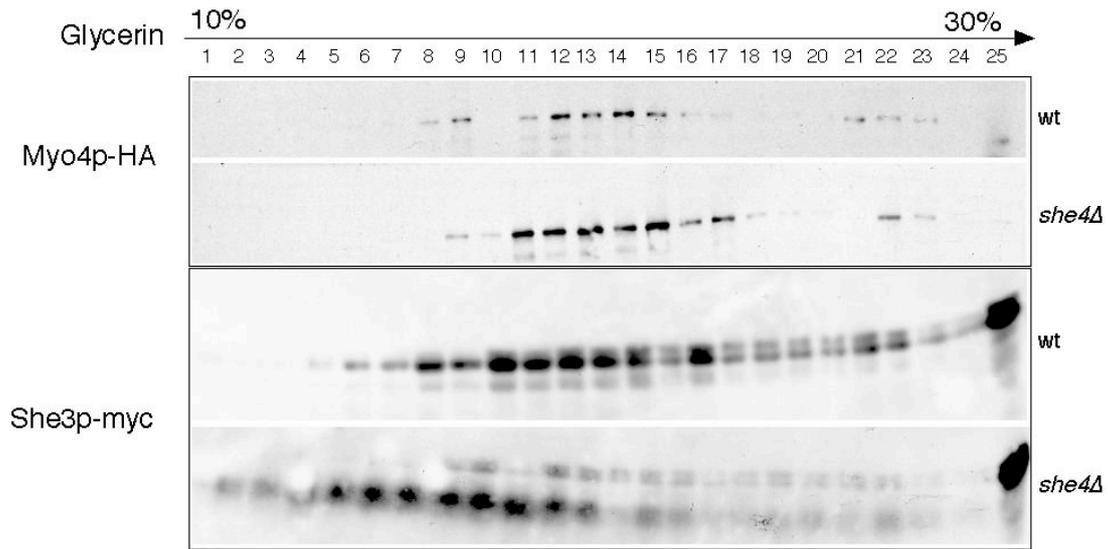
Abb.2.15. Quantifizierung der Myo5p-Misslokalisierung in *myo2-66*. Wildtyp und *myo2-66* Zellen aus Abb.15 wurden unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop nach 5, 15 und 90 Minuten Inkubation bei 37°C in Bezug auf Myo5p-Lokalisation ausgezählt. Im Vergleich zum Wildtyp ist der *myo2-66* Stamm nicht in der Lage die Myo5p-Lokalisation aufrecht zu erhalten. n = 5, insgesamt 1800 Zellen ausgezählt.

2.6. She4p ist für eine korrekte Myosin-Aktin Interaktion notwendig

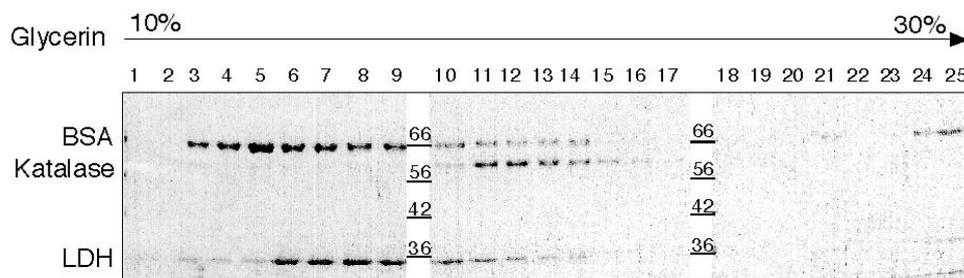
Wie Jansen et al. bereits beschrieben haben, beeinflusst She4p die Lokalisation des *ASH1*-mRNA Transportpartikels (Jansen et al., 1996). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von Myo4p und She3p essentiell für eine korrekte Lokalisation der mRNA ist (Bohl et al., 2000; Takizawa and Vale, 2000). Die nächste Frage war also, ob She4p vielleicht die Assoziation dieser beiden Komponenten beeinflusst. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde zunächst die Verteilung von She3p und Myo4p in einem Wildtyp und einem *she4Δ* Stamm mit Hilfe eines Glycerolgradienten verglichen (Abb.2.16). Zu diesem Zweck wurden ein Wildtyp (RJY530) und ein *she4Δ* Stamm (RJY599) verwendet, die sowohl HA-markiertes Myo4p als auch myc-markiertes She3p exprimieren. Die Lysate beider Stämme wurden auf einen linearen 10 bis 30%igen Glycerolgradienten aufgetragen. Dieser

Gradient wurde dann 24h bei 36.000 rpm zentrifugiert und anschliessend in 25 Fraktionen abgenommen. Proteine, die sich in einem Komplex befinden tauchen anschliessend in den gleichen Fraktionen auf. Für die Bestimmung der Komplexgrösse und der Qualität der Auftrennung wurde ausserdem ein Gradient mit Kontrollproteinen gefahren, deren Komplexgrösse bekannt ist.

A.



B.



BSA: 66, Monomer
 LDH: 35, Tetramer 140
 Katalase: 62.5, Tetramer 250

Abb.2.16. Auftrennung von Myo4p und She3p im Glycerolgradienten. (A) Wildtyp (RJY530) und *she4Δ* Stämme (RJY599), welche myc-markiertes She3p und HA-markiertes Myo4p, wurden auf einem linearen Glycerolgradienten (10%-30%) aufgetrennt. Beide Proteine zeigen in beiden Stämmen kaum einen Unterschied in ihrem Laufverhalten. (B) Als Kontrolle wurde die Auftrennung der Proteine Bovine-Serum-Albumin (BSA), Katalase und Lactat-Dehydrogenase (LDH) dargestellt, deren Komplexgrösse bekannt ist.

Vergleicht man die Verteilung von Myo4p im Wildtyp und *she4Δ* Stamm, ist kein Unterschied zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt die She3p-Verteilung im *she4Δ* Stamm eine leichte Verschiebung in die leichteren Fraktionen. Da es jedoch während der Western-Analyse zu Problemen kam wurde die Interaktion zwischen Myo4p und She3p in einer Immunpräzipitation weiter überprüft (Abb. 2.17). Hier wurde der gleiche Stamm wie im Glycerolgradienten-Experiment verwendet, welcher HA-markiertes Myo4p und myc-markiertes She3p exprimiert. Für die Immunpräzipitation wurde das Lysat mit Maus-Anti-Myc-Antikörper inkubiert und das Immupellet durch Western-Analyse auf Myo4p und She3p untersucht. Vergleich man Wildtyp und *she4Δ* ist deutlich zu erkennen, dass die Interaktion zwischen Myo4p und She3p nur einen leichten Unterschied zeigt. She4p hat also keinen Einfluss auf die Assoziation zwischen Myo4p und She3p. Dies ist daher nicht der Grund für die Misslokalisierung von Myo4p im *she4Δ* Stamm.

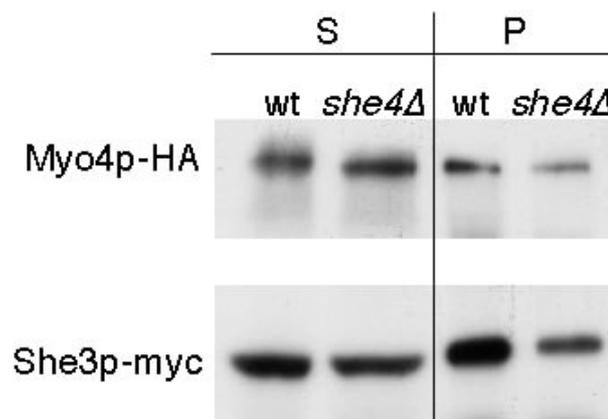
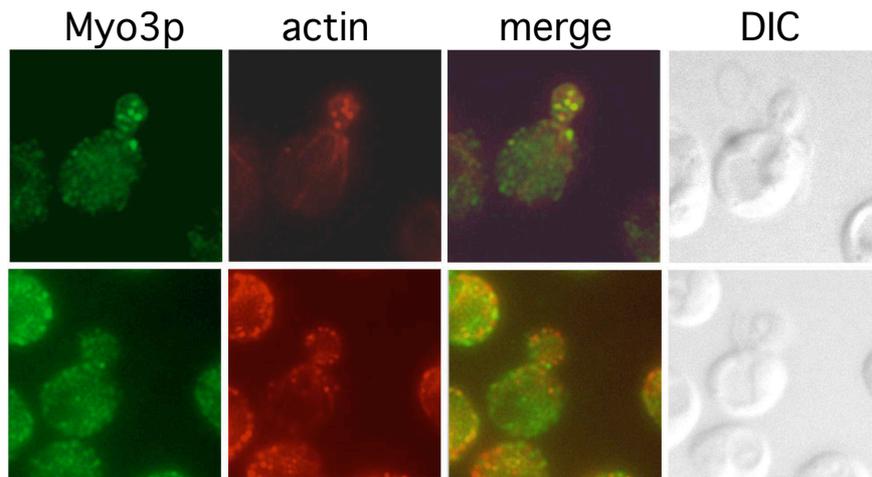


Abb.2.17. She3p und Myo4p interagieren unabhängig von She4p. Anti-myc Immunpräzipitation in Wildtyp (RJY530) und *she4Δ* (RJY599) Stämmen. In beiden Stämmen kopräzipitiert HA-markiertes Myo4p mit immobilisierten myc-markierten She3p. S = Überstand, P = Pellet.

Somit bleibt immer noch die Frage offen, warum Myosine im *she4Δ* Hintergrund misslokalisieren. Wie schon vorher erwähnt, ist für eine Lokalisation eine korrekte Myosin-Aktin Interaktion notwendig. Aus diesem Grund wurde als nächstes untersucht, ob She4p diese Interaktion beeinflusst.

Zunächst wurde die Kolokalisation der Typ I Myosine mit Aktin *Patches* bestimmt (Abb.1.18). Es ist bekannt, dass Myo3p und Myo5p sowohl über ihre Motordomäne wie auch über die SH3-Domäne im Schwanzbereich mit Aktin *Patches* interagieren und somit zusammen mit einer Vielzahl anderer Proteine das kortikale Zytoskelett aufbauen (Goodson et al., 1996; Lechler et al., 2000).

A.



B.

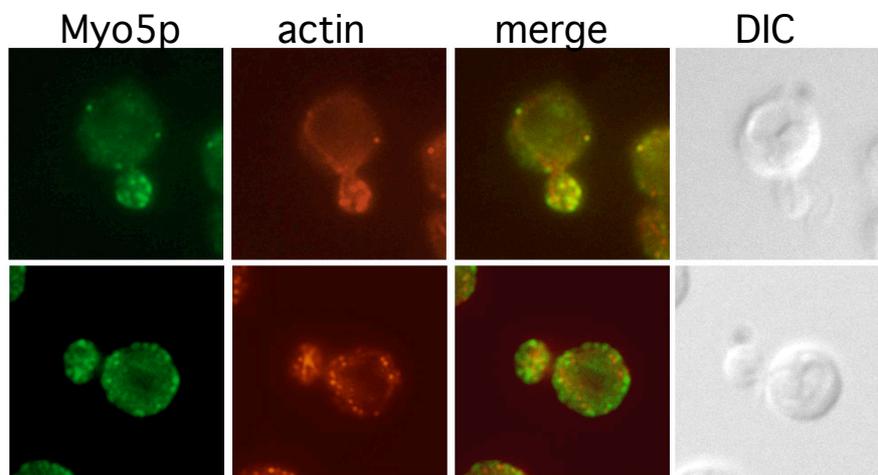


Abb.2.18. Kolokalisation von Typ I Myosinen und Aktin *Patches*. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Kolokalisation von HA-markierten Myo3p (A), bzw Myo5p (B) mit Phalloidin-markierten Aktin *Patches* in Wildtyp und *she4Δ* Stämmen untersucht. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigen beide Myosine und Aktin *Patches* in *she4Δ* Zellen eine gleichmässige Verteilung. Es ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp keine Überlappung mehr erkennbar. Myo3p: wt = RJY1582, *she4Δ* = RJY1583; Myo5p: wt = RJY1584, *she4Δ* = RJY1586

Aus diesem Grund wurde die Kolokalisation der Typ I Myosine und der Aktin *Patches* im Wildtyp und *she4Δ* Stamm mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz verglichen. Für die Detektion der Myosine wurde ein Ratte-Anti-HA-Antikörper und für das Aktinzytoskelett die Phalloidin-Färbung verwendet. Betrachtet man die Lokalisation von Myo3p und Aktin *Patches* im Wildtyp (RJY1582), erkennt man beim Überlagern der beiden Fluoreszenzkanäle eine eindeutige Kolokalisation. Im Gegensatz dazu sind im *she4Δ* (RJY1583) sowohl Myo3p, als auch Aktin *Patches* misslokalisiert und zeigen keine Überlappung mehr. Das gleiche Ergebnis wurde auch für die Kolokalisation von Myo5p und Aktin *Patches* festgestellt. Beide zeigen eine homogene Verteilung und keine Kolokalisation mehr. Es scheint daher, dass die Typ I Myosine in *she4Δ* Zellen die Interaktion mit dem kortikalen Aktinzytoskelett verlieren.

Im nächsten Experiment wurde versucht, die Interaktion zwischen Typ I Myosinen und Aktin in Wildtyp und *she4Δ* darzustellen. Im Gegensatz zu Typ V Myosinen binden Typ I Myosine Aktin nicht nur über die Motordomäne. Sie tragen ausserdem eine SH3-Domäne im Schwanzbereich, die es ihnen erlaubt mit anderen aktinbindenden Proteinen wie z.B. Verprolin zu interagieren und somit indirekt an Aktin zu binden (Abb.2.19.A) (Anderson et al., 1998; Evangelista et al., 2000). Die Affinität zum Aktin über die Motordomäne ist ATP-abhängig. Hat das Myosin ATP gebunden löst sich der Motor vom Aktin ab, hat er ADP gebunden kommt es zum Rigor und der Motor bindet an Aktin (Rayment and Holden, 1994). Die Affinität der SH3-Domäne zu ihren Bindungspartnern ist dagegen salzabhängig (persönliche Mitteilung von M.Geli). Bei hohen Salzkonzentrationen kommt es zu einer Ablösung vom Aktin. Um herauszufinden, welche der beiden Bindestellen von Myo5p im *she4Δ* nicht mehr mit Aktin interagiert, muss zwischen beiden Bindungs-Modi unterschieden werden. Zu diesem Zweck verwendeten wir einen Aktin *Pelleting* Assay für Typ I Myosine, der im Labor von Dr. Marie-Isabel Geli entwickelt wurde (Abb.2.19.B) (Geli et al., 2000).

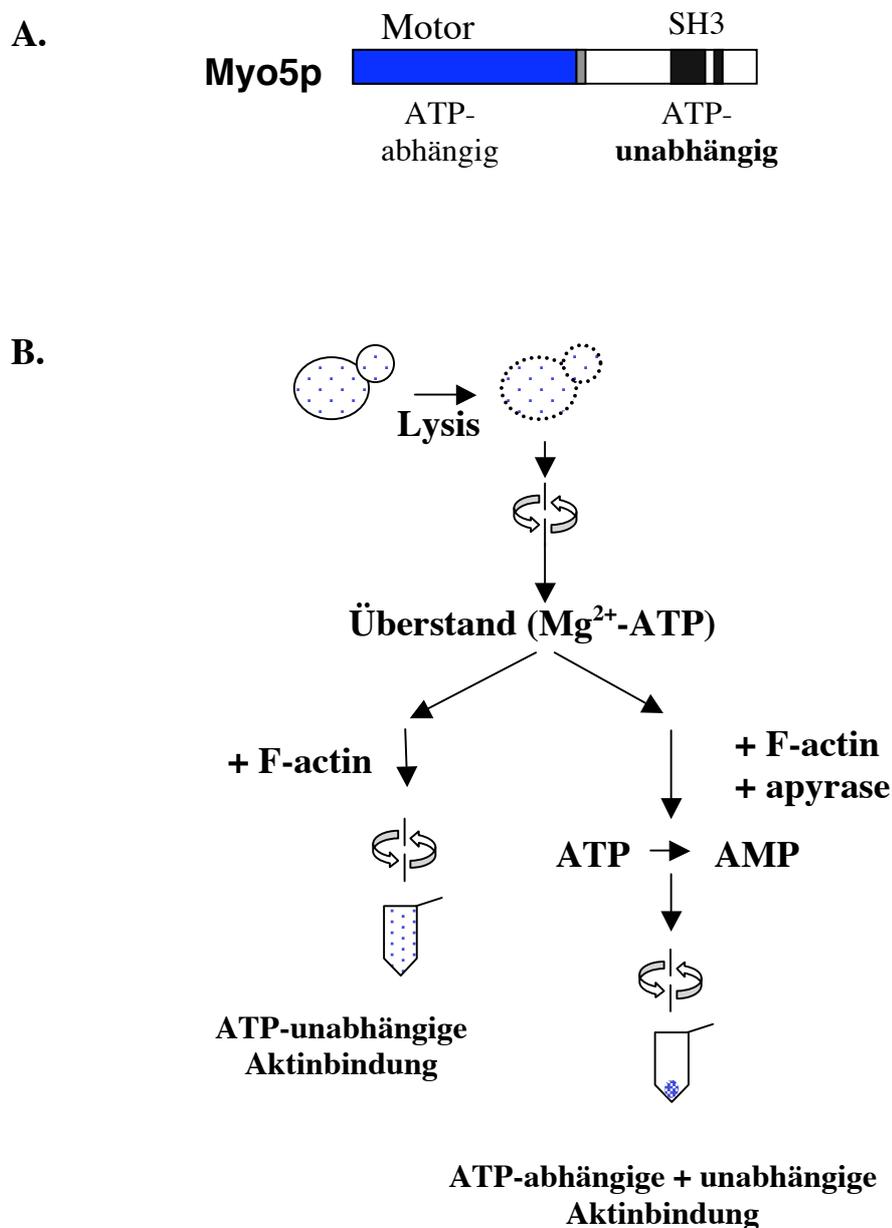


Abb.2.19. Durchführung des Aktin *Pelleting* Assays. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Myo5p. Myo5p besitzt zwei verschiedene Aktin-Bindestellen. Die Motordomäne bindet direkt ATP-abhängig an Aktin. Über die SH3-Domäne im Schwanzbereich interagiert Myo5p mit Proteinen, die ihrerseits an Aktin binden. Diese Art der Interaktion lässt sich durch hohe Salzkonzentration aufheben. (B) Durchführung des Assays. Die Zellen werden lysiert und einer Zentrifugation unterzogen. Der Extrakt wird mit ATP und Aktin inkubiert und in zwei Ansätze aufgeteilt. Einer der Ansätze wird mit Apyrase versetzt, welches ATP zu ADP und AMP spaltet. Beide Ansätze werden anschliessend zentrifugiert und das Pellet auf das Vorhandensein von gebundenem Myosin untersucht.

Hierbei wurden Zellysate mit Aktin und ATP inkubiert und anschliessend zentrifugiert, um das gebundene Myosin im Pellet nachzuweisen. Diese Bindung wird lediglich über die SH3-Domäne im Schwanzbereich vermittelt. Vor der Zentrifugation wird zusätzlich einer der Ansätze mit Apyrase behandelt, einem Enzym, welches ATP zu ADP und AMP spaltet. Auf diese Weise wird der Ansatz an ATP verarmt und die Myosine binden über ihre Motor- und SH3-Domäne an das Aktin. Vergleicht man die Ansätze mit und ohne Apyrase, sollte der Ansatz mit dem Enzym eine deutlich grössere Menge an gebundenem Myo5p zeigen.

Es stellte sich jedoch als problematisch heraus, direkt die Zellysate für den Assay zu verwenden. Die Myosine zeigen auch ohne Apyrase-Zugabe eine starke Aktin-Bindung. Dies konnte durch defektes Myo5p erklärt werden, welches bei der Lyse der Zellen entstanden ist und nicht mehr auf ATP-Konzentrationen reagiert (Persönliche Mitteilung von Maribel Geli). Aus diesem Grund mussten Myosine aus den Lysaten angereichert werden, welche in der Lage sind, sich im ATP-gebundenen Zustand vom Aktin abzulösen (Abb. 2.20.). Zu diesem Zweck wurden ein Wildtyp- und ein *she4Δ* Stamm verwendet, die HA-markiertes Myo5p exprimieren (RJY1584). Die Lysate wurden dann mit Aktin inkubiert, um das vorhandene Myo5p über Motor- und Schwanzdomäne zu binden und zu pelletieren. Die entstandenen Aktomyosin-Komplexe wurden dann in Puffer aufgenommen, der ATP und Hochsalzbedingen enthielt, um funktionsfähiges Myosin wieder vom Aktin abzulösen.

Da die benötigte Salzkonzentration nicht bekannt war, wurde zunächst untersucht, welche Konzentration zu einer effektiven Ablösung des Myo5p vom Aktin führt (Abb.2.20.A). Wie sich zeigte ist eine Salzkonzentration von 500mM KCl notwendig, um ausreichend Myo5p aus den Aktomyosinkomplexen herauszulösen. Es wurde anschliessend mit den ermittelten Bedingungen Myo5p aus Wildtyp (RJY1584) und *she4Δ* Stämmen (RJY1586) isoliert (Abb.2.20.B).

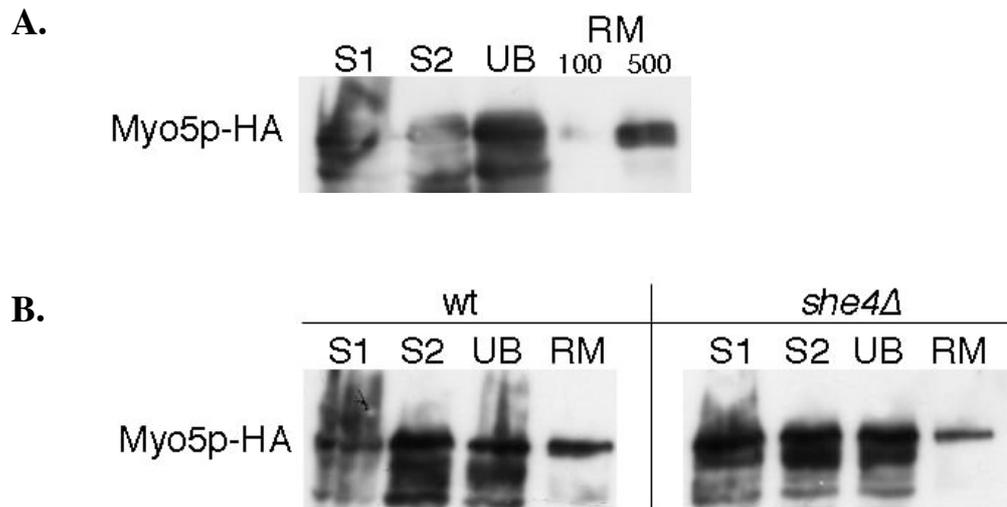


Abb.2.20. Isolation von funktionsfähigen Myo5p. (A) Austesten der geeigneten Salzkonzentration für die Ablösung des Myo5p vom Aktin. HA-markiertes Myo5p wurde aus dem Zellextrakt (RJY1584) nach Ultrazentrifugation durch Aktinzugabe ausgefällt. Anschliessend wurde das gebundene Myosin durch ATP- und Salzzugabe (100mM und 500 mM KCl) abgelöst. Eine Salzkonzentration von 500mM führte zu einer effizienteren Ablösung. (B) Isolation von Myo5p aus Wildtyp und *she4Δ* Zellen. Zum Ablösen des Myosins wurden 500mM Salz verwendet. Sowohl aus Wildtyp, wie auch aus dem *she4Δ* konnte Myo5p isoliert werden. S1 = Überstand nach Zellaufbruch, S2 = Überstand nach Ultrazentrifugation, UB = ungebundenes Myosin nach Aktinzugabe, RM = abgelöstes Myosin.

Das so vorgereinigte Myo5p aus Wildtyp und *she4Δ* Stamm konnte anschliessend für den Aktin *Pelleting* Assay verwendet werden (Abb.2.21). "Total" gibt die Menge des eingesetzten Myosins an. Es wurden drei verschiedene Ansätze hergestellt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, dem kein Aktin zugegeben wurde. Die ATP-unabhängige Bindung über die SH3-Domäne wurde durch Zusatz von ATP und Aktin deutlich gemacht. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Eluatzen aus der Vorreinigung, wurde diese jedoch grösstenteils unterdrückt. Dem dritten Ansatz wurde neben Aktin und ATP das Enzym Apyrase zugesetzt, welches das ATP spaltet und somit zusätzlich zur ATP-unabhängigen Aktin-Bindung auch die Bindung über die Motordomäne erlaubt. Betrachtet man die Myo5p-Bindung im Wildtyp, so ist ein starker Anstieg der pelletierten Myo5p-Menge nach Zugabe von Apyrase sichtbar (Vergleich Spur 3 und Spur 4).

Im Gegensatz dazu ist dieser Anstieg im *she4Δ* nicht erkennbar. Gereinigtes Myo5p aus einem *she4Δ* Stamm ist daher nicht mehr in Lage, Aktin über die Motordomäne zu binden.

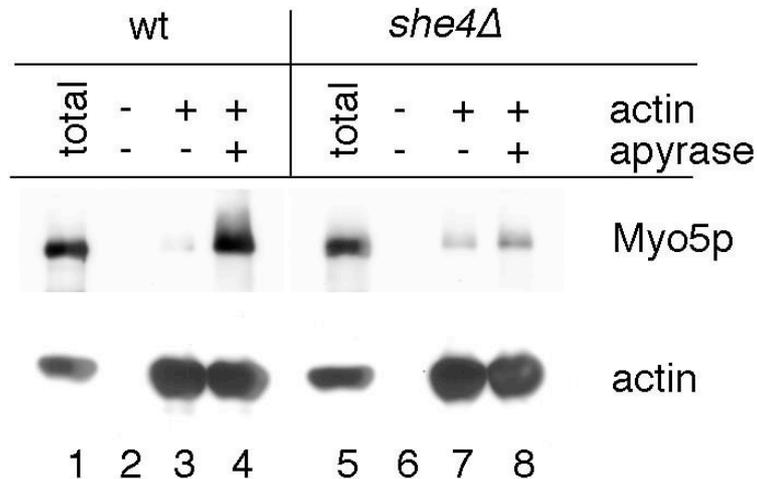


Abb.2.21. Myosin-Aktin Interaktion benötigt She4p. Funktionsfähiges HA-markiertes Myo5p wurde aus Wildtyp und *she4Δ* Zellen isoliert (Abb.2.21) und mit polymerisierten Aktin inkubiert. Anschliessend wurden die Aktin-Myosin-Komplexe abzentrifugiert. ATP-unabhängige Aktin Bindung über die Myosin Schwanzdomäne ist in Wildtyp und *she4Δ* Zellen vergleichbar (Spur 3 und 7). Eine ATP-Spaltung im Extrakt durch Apyrase-Behandlung verstärkt im Wildtyp die Motordomänen-abhängige Aktin-Bindung von Myo5p (Spur 4). Im Gegensatz dazu ist im *she4Δ* keine Erhöhung erkennbar (Spur 8). Dies deutet daraufhin, dass She4p für die Interaktion der Myosin-Motordomäne und Aktin notwendig ist.

2.7. Die UCS-Domäne ist essentiell für die She4p Funktion

Wie schon angesprochen gehört She4p zur Gruppe der UCS-Proteine. Alle diese Proteine zeigen nur Homologie in der C-terminalen UCS-Domäne. Für UNC-45 konnte gezeigt werden, dass es über seine UCS-Domäne mit den Myosin-Köpfen interagiert (Barral et al., 2002). Daher wurde als nächstes untersucht, ob die UCS-Domäne von She4p essentiell für die Funktion des Proteins ist. Barral et al. (1998) definierten die UCS-Domäne von Aminosäure 336 bis 773, die Datenbank Prodom (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php>) von Aminosäure 579 bis 692. Für die Erzeugung von She4ΔUCSp wurde nach der Aminosäure 579 ein

HA-Epitop und ein Stop-Codon ins Genom integriert (RJY1644). Anschliessend wurde das Verhalten dieses Stammes bei 37°C im Vergleich zum Wildtyp und *she4Δ* aus Abb.2.1 untersucht (Abb.2.22.A). Wie deutlich zu sehen ist, zeigt *She4ΔUCSp* den gleichen temperaturabhängigen Proliferationsstop wie der Wildtyp. Zusätzlich wurden die Zellen im Hellfeld auf ihre Morphologie hin untersucht (Abb.2.22.B). *SHE4ΔUCS* Zellen zeigen die gleiche vergrösserte Morphologie wie ein *she4Δ* Stamm.

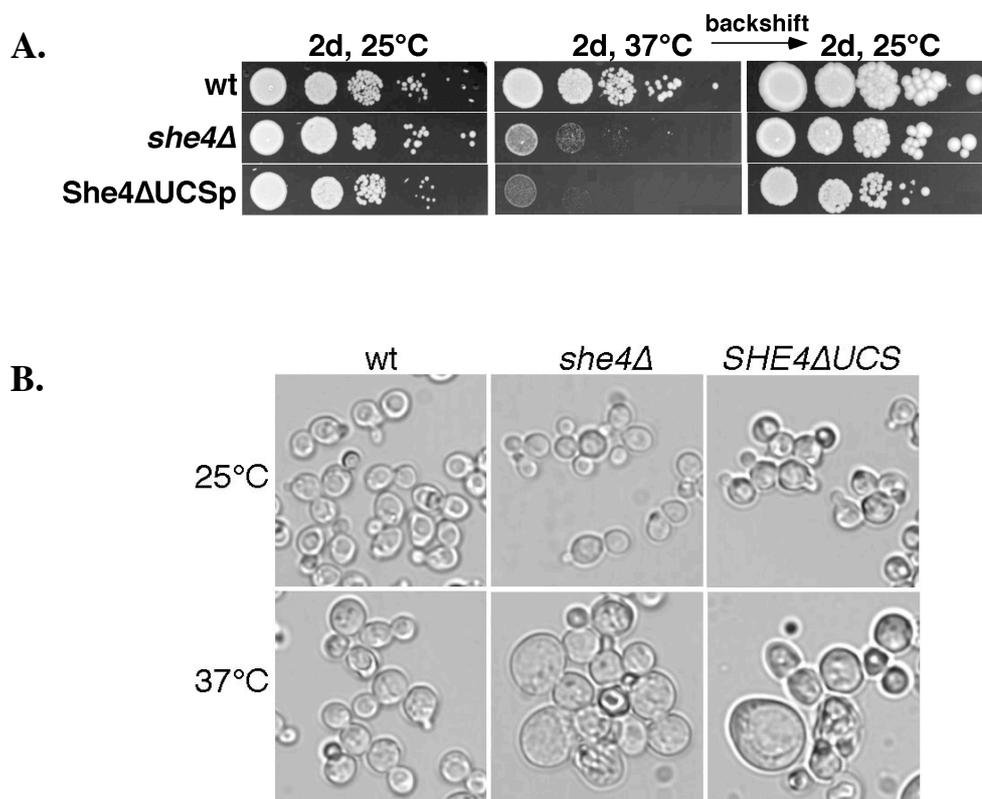


Abb.2.22. *SHE4ΔUCS* Stämme zeigen *she4Δ* Phänotyp. (A) Wildtyp (RJY358), *she4Δ* (RJY311) und *SHE4ΔUCS* (RJY1644) Stämme wurden nach zwei Tagen auf 37°C hochgeschiftet und anschliessend wieder bei 25°C inkubiert. Das um die UCS-Domäne verkürzte She4p zeigt das gleiche temperatursensitive Verhalten wie der *knock-out*. (B) Wildtyp (RJY358), *she4Δ* (RJY311) und *SHE4ΔUCS* (RJY1644) Stämme wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschliessend im Hellfeld-Mikroskop untersucht. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigen *SHE4ΔUCS*-Zellen wie der *knock-out* aufgeblähte Morphologie.

Als nächstes stellte sich die Frage, welchen Einfluss die Deletion der UCS-Domäne auf die Lokalisation der Myosine und von She4 Δ UCSp selbst hat (Abb.2.23). Zu diesem Zweck wurden die Myosine im *SHE4 Δ UCS* Stamm mit einem myc-Epitop fusioniert und durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Im Vergleich zum Wildtyp sind Myo3p, Myo4p und Myo5p nicht mehr in der Lage an die Knospenspitze zu lokalisieren (Abb.2.23.A). Ausserdem konnte man beobachten, dass She4 Δ UCSp ebenfalls eine Misslokalisierung zeigt (Abb.2.23.B).

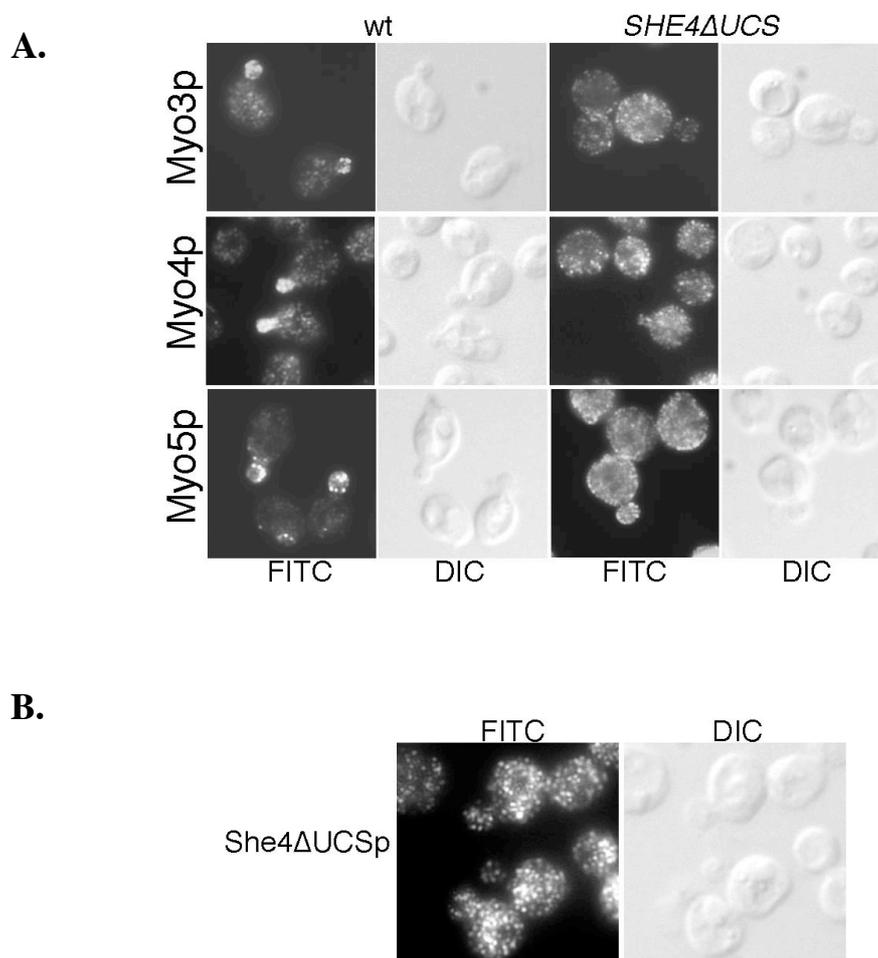


Abb.2.23. Lokalisation der Myosine im *SHE4 Δ UCS* Stamm. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde sowohl die Lokalisation von HA-markierten Myosinen in Wildtyp und *SHE4 Δ UCS* Stämmen (**A**), wie auch die Lokalisation von She4 Δ UCSp selbst (**B**), untersucht. (**A**) Im Gegensatz zum Wildtyp zeigen Myo3p (RJY1582/RJY1732), Myo4p (RJY1045/RJY1731) und Myo5p (RJY1584/RJY1747) im *SHE4 Δ UCS* Hintergrund eine Misslokalisierung wie der *knock-out* (siehe Abb.2.2). (**B**) Ohne UCS-Domäne ist auch das She4p nicht mehr in der Lage, an der Knospenspitze zu akkumulieren (RJY1644).

Die Frage war nun, was die She4 Δ UCSp Misslokalisierung verursacht. Wie schon gezeigt, interagiert She4p mit Myo2p und wird dadurch an die Knospenspitze transportiert. Als nächstes wurde untersucht, ob She4 Δ UCSp noch in der Lage ist, mit den Myosinen zu interagieren (Abb.2.24). Zu diesem Zweck wurde eine Immunpräzipitation unter gleichen Bedingungen wie in Abb.2.5 durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Stamm ohne myc-markiertes Protein. Ausserdem wurde zusätzlich ein Stamm verwendet, der myc-markiertes Myo2p und HA-markiertes Wildtyp She4p exprimiert (RJY1556), um zu zeigen, dass die Immunpräzipitation im Prinzip funktioniert. Im Gegensatz zu She4p ist She4 Δ UCSp nicht mehr in der Lage, mit Myo2p (RJY1800), Myo3p (RJY1801), Myo4p (RJY1802) oder Myo5p (RJY1776) zu interagieren. Die UCS-Domäne vermittelt daher nicht nur die Funktion von She4p auf die Lokalisation der Myosine, sondern auch die Interaktion mit dem Myosinkopf.

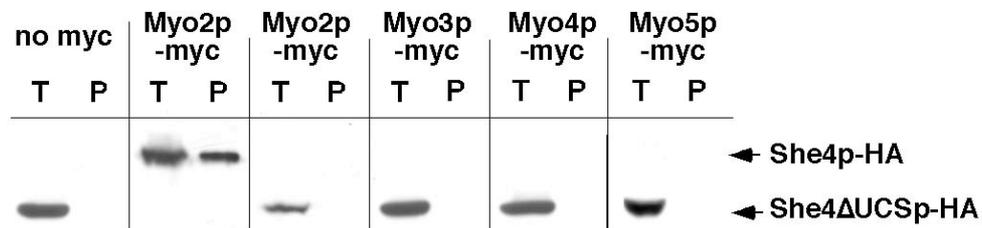


Abb.2.24. She4p interagiert über die UCS Domäne mit den Myosinen. Anti-myc Immunpräzipitation. HA-markiertes She4 Δ UCSp kopräzipitiert nicht mehr mit immobilisierten myc-markierten Myo2p (RJY1800), Myo3p (RJY1801), Myo4p (RJY1802) und Myo5p (RJY1776). Die Kontrolle ohne myc-markierten Protein (RJY1340) zeigt keine Interaktion. Unter identischen Bedingungen kopräzipitiert Wildtyp She4p mit Myo2p (RJY1556). T = Überstand, P = Pellet.

2.8. She4p interagiert mit Hsp90 und Komponenten aus der Prozessierung der ribosomalen RNA

Neben der Bindung von UNC-45 an die Myosinköpfe konnten Barral et al. (2002) auch noch eine Interaktion mit Hsp90 *in vitro* zeigen. Dies wird über die N-terminale TPR-Domäne (TPR: Tetratricopeptid Repeat) von UNC-45 vermittelt, einer Domäne, die im She4p nicht vorkommt. Um weitere Interaktionspartner von She4p zu identifizieren, wurde ein GST *Pulldown* Assay durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde She4p N-terminal mit einem GST-Tag fusioniert (pRJ792) und aus *E.coli* gereinigt (Abb.2.25). Parallel wurde als Kontrolle für den *Pulldown* das GST-Protein alleine aufgereinigt (Daten nicht gezeigt).

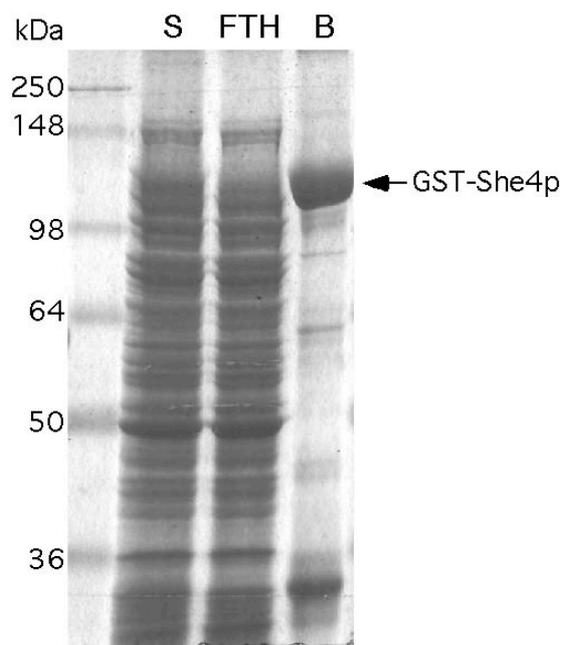


Abb.2.25. Aufreinigung von GST-She4p. GST-She4p wurde rekombinant in *E.coli* exprimiert. Die Zellen wurden durch Lysozym-Verdau und Sonifizierung aufgeschlossen und der Extrakt anschliessend bei 40.000g zentrifugiert. Der Überstand (S) wurde mit GST-Sepharose inkubiert (FTH = ungebundenes Protein). Anschliessend wurde ein Teil der Beads ausgekocht, um die gebundene Menge GST-She4p sichtbar zu machen (B = GST-She4p von 1 μ l Beads).

Das GST-Fusionsprotein wurde jedoch nicht von der Glutathion-Sepharose eluiert, sondern an die Beads gebunden als Affinitätsmatrix eingesetzt (Abb.2.25). Zu diesem Zweck wurden sowohl GST-Beads wie auch GST-She4p-Beads mit einem bei 20.000g zentrifugierten Hefeextrakt inkubiert und anschliessend gewaschen, um Kontaminationen zu entfernen. Danach wurden alle gebundenen Proteine mit Hochsalzpuffer (1M) von den Beads gewaschen. Das Eluat wurde 1:10 mit Wasser verdünnt, die Proteine mit TCA ausgefällt und anschliessend in SDS-Sample Puffer

resuspendiert auf einem 4-12% MOPS Gradientengel aufgetrennt (Abb.2.26).

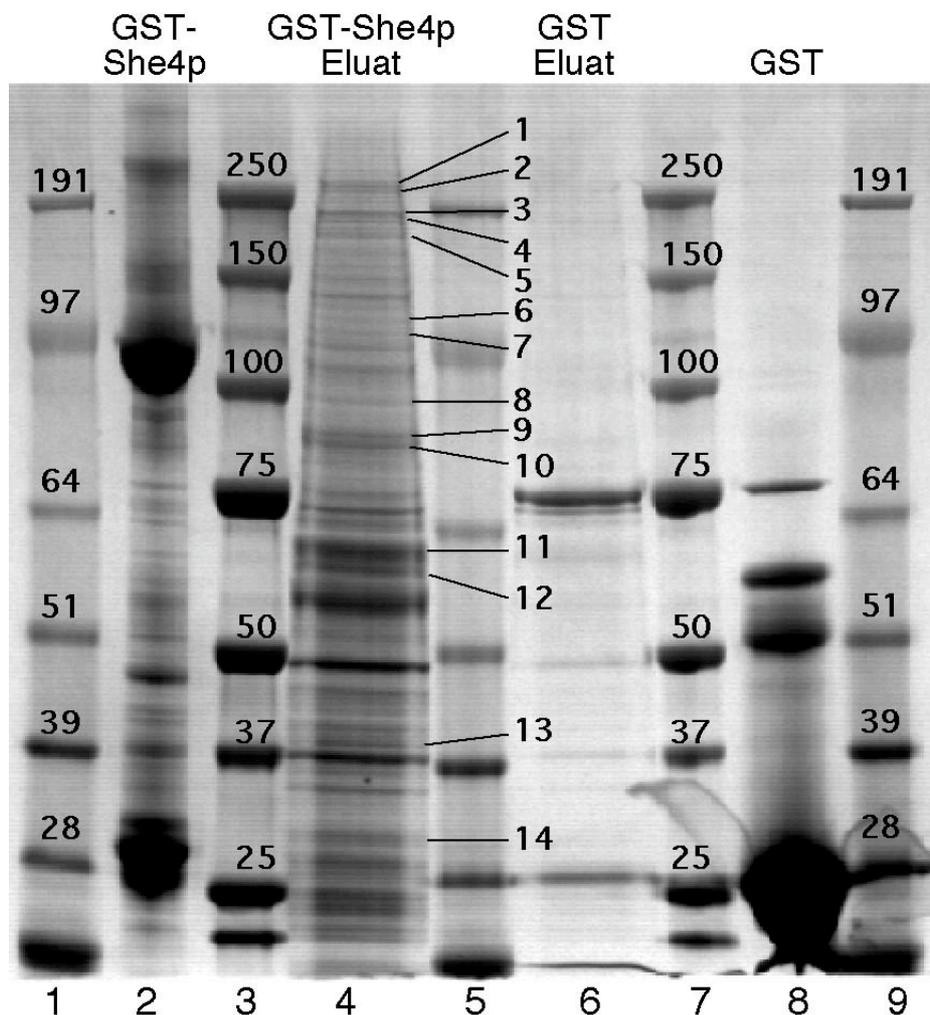


Abb.2.26. SDS-PAGE der GST und GST-She4p Pull-down Eluate. Immobilisiertes GST-She4p wurde mit einem vorgereinigten Hefeextrakt inkubiert. She4p interagierende Proteine wurden mit 1M Salz von den Beads gewaschen, gefällt und auf ein 4-12% MOPS-Gradientengel aufgetragen (Spur 4). Unter gleichen Bedingungen wurde als Kontrolle für unspezifische Bindungen das GST-Protein verwendet (Spur 5). Um Kontaminationen und Abbauprodukte aus der GST-Aufreinigung auszuschliessen wurden ausserdem die Lysate der ausgekochten GST-She4p-Beads (Spur 2) und GST-Beads (Spur 7) aufgetragen. Banden, die in Spur 4, aber nicht in Spur 2 oder 5 sichtbar waren, wurden einer Massenspektroskopie unterzogen (Zahlen 1 - 14). Als Grössenstandards wurden die Protein-Marker SeeBlue+2 (Spur 1, 8 + 5), sowie Broad-Range (Spur 3 + 4) aufgetragen (Angabe in kDa).

Zusätzlich wurden die GST-She4p Beads 5 min bei 95°C inkubiert und der Überstand aufgetragen, um eventuelle Abbauprodukte zu erkennen. Anschliessend wurden die Bandenmuster des GST- (Spur 6) und des GST-She4p Eluates (Spur 4) verglichen. Banden, die nur im GST-She4p Eluat auftauchten wurden dann mittels

Massenspektroskopie bestimmt (Tab.2.1.).

Bande	Protein	MW
1	ACC1 (Acetyl-CoA-Carboxylase)	250
2	?	
3	RRP5 (Teil des Processosomes für die kleine ribosomale Untereinheit; U3 snoRNP)	194
4	?	
5	UTP10 (Teil des Processosomes für die kleine ribosomale Untereinheit; U3 snoRNP)	200
6	YEF3 (Elongationsfaktor) RPG1 (Translations Initiation)	115 110
7	SHE4	90
8	EFT2 (Elongationsfaktor)	94
9	PRP43 (Pre-mRNA Prozessierungsfaktor; beteiligt am Zerfall von Splicisomen nach dem Freisetzen der reifen mRNA)	88
10	HSC82 (Hsp90) HSP82 (Hsp90)	81 81
11	Albumin	71
12	NOP58 (Teil des Processosomes für die kleine ribosomale Untereinheit; U3 snoRNP) CBF5 (Pseudouridyltransferase)	57 55
13	NOPI (Teil des Processosomes für die kleine ribosomale Untereinheit; Methyltransferase; U3 snoRNP)	35
14	RPL4 (ribosomales Protein)	28

Tab.2.1. She4p-interagierende Proteine aus dem GST Pulldown. Die markierten Banden aus Abb.2.26 wurden zur Bestimmung einer Massenspektroskopie unterzogen. Bande 2 und 4 konnten nicht analysiert werden. MW = Molekulargewicht.

Schaut man sich die Liste der sequenzierten Interaktionspartner an, fällt sofort auf, dass fast die Hälfte aller interagierenden Proteine an der Prozessierung der ribosomalen 35S rRNA beteiligt ist.

Dies Ergebnis ist sehr überraschend, da sich diese Proteine ausschliesslich im Nukleolus aufhalten und She4p eher zytoplasmatische Verteilung zeigt. Ein weiterer interessanter Interaktionspartner sind die Hsp90 Chaperone Hsc82p und Hsp82p. Wie schon vorher angesprochen interagiert auch UNC-45 *in vitro* mit Hitzeschock-Proteinen. Um die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses zu überprüfen, wurde der *Pulldown* bei gleichen Bedingungen wiederholt (Abb.2.27).

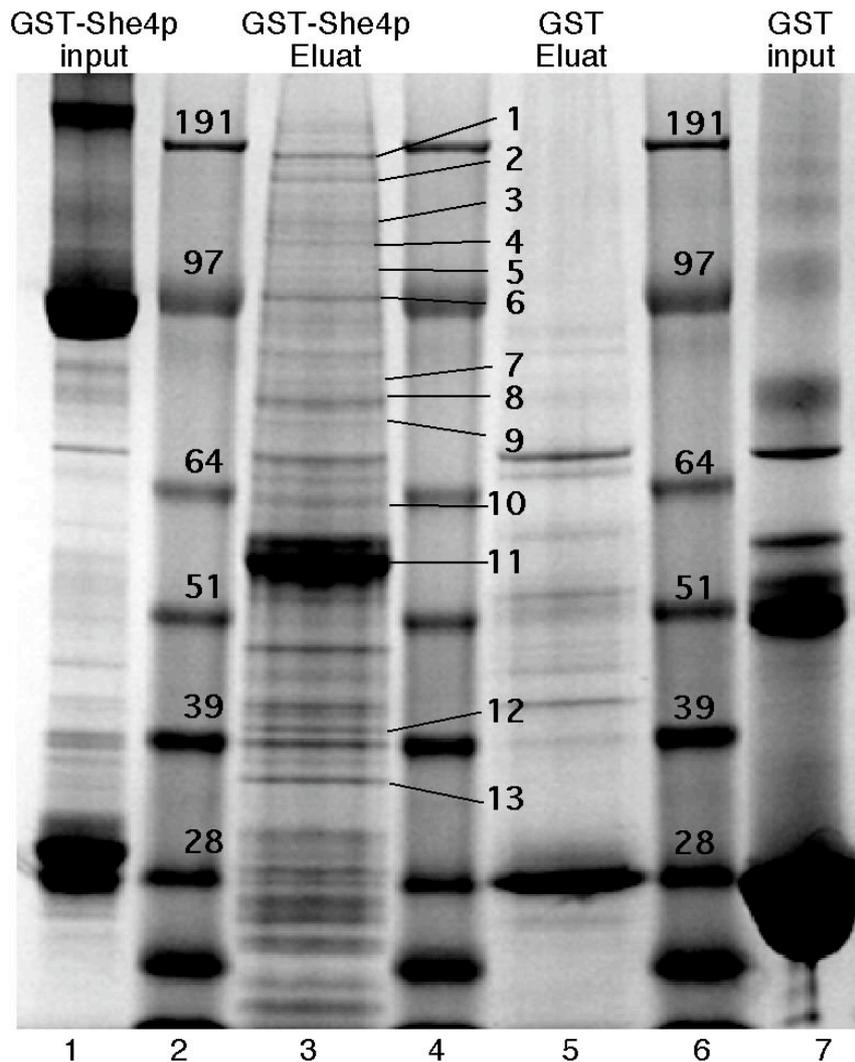


Abb.2.27. Wiederholung des GST-She4p Pull-down. Immobilisiertes GST-She4p wurde mit einem vorgereinigten Hefeextrakt inkubiert. She4p interagierende Proteine wurden mit 1M Salz von den Beads gewaschen, gefällt und auf ein 4-12% MOPS-Gradientengel aufgetragen (Spur 3). Unter gleichen Bedingungen wurde als Kontrolle für unspezifische Bindungen das GST-Protein verwendet (Spur 5). Um Kontaminationen und Abbauprodukte aus der GST-Aufreinigung auszuschliessen wurden ausserdem die Lysate der ausgekochten GST-She4p-Beads (Spur 1) und GST-Beads (Spur 7) aufgetragen. Banden, die in Spur 3, aber nicht in Spur 1 oder 5 sichtbar waren, wurden einer Massenspektroskopie unterzogen (Zahlen 1 - 13). Als Grössenstandard wurde der Protein-Marker SeeBlue+2 (Spur 2 + 6) aufgetragen (Angabe in kDa).

Leider konnten nicht alle Banden bestimmt werden, da es Probleme bei der Sequenzierung gab. Neben einigen neuen Proteinen konnten wieder Rrp5p und Nop1p, sowie die Hitzeschock-Proteine Hsc82p und Hsp82p identifiziert werden (Tab.2.2.).

Bande	Protein	MW
1	RRP5 (Teil des Processosomes für die kleine ribosomale Untereinheit)	194
2	?	
3	NSR1 (Bindepotein für die Kernlokalisations-Sequenz; interagiert mit U3 snoRNP und der pre-rRNA)	54
4	?	
5	?	
6	SHE4	90
7	HSC82 (Hsp90) HSP82 (Hsp90)	81 81
8	SHE4	90
9	PUF6 (Mitglied der PUF Protein Familie, nukleoläre Lokalisation)	75
10	PAB1 (Poly-A-Bindungsprotein; zytoplasmatisch and nukleär)	64
11	NSR1 (Bindepotein für die Kernlokalisations-Sequenz; interagiert mit U3 snoRNP und der pre-rRNA)	54
12	NOPI (Teil des Processosomes für die kleine ribosomale Untereinheit; Methyltransferase)	35
13	RPP0 (struktureller Teil des Ribosoms)	34

Tab.2.2. She4p-interagierende Proteine aus dem zweiten GST Pulldown. Die markierten Banden aus Abb.2.27 wurden zur Bestimmung einer Massenspektroskopie unterzogen. Bande 2, 4 und 5 konnten nicht analysiert werden. MW = Molekulargewicht. Fettgedruckte Proteine wurden in beiden Aufreinigungen identifiziert.

2.9. She4p interagiert *in vivo* mit Hsp90, zeigt aber keine Kolokalisation

Als nächstes wurde mit Hilfe der Immunpräzipitation die Interaktion zwischen den Hsp90 und She4p *in vivo* untersuchen (Abb.2.28.). Zu diesem Zweck wurde ein Stamm verwendet, der HA-markiertes She4p exprimiert (RJY1556), das über Ratte-Anti-HA Antikörper immobilisiert wurde. Koimmunpräzipitiertes Hsp90 wurde über eine spezifischen Kaninchen-Anti-Hsp90p Antikörper nachgewiesen. Wie deutlich zu sehen ist, konnte Hsp90p von She4p kopräzipitiert werden. Um die Spezifität der Bindung zu testen, wurde die Immunpräzipitation unter gleichen Bedingungen mit einem anderen HA-markierten Protein (Rli1p) durchgeführt. Auch dieses Protein pelletierte die Hitzeschockproteine. Es konnte also eine Interaktion von She4p und

Hsp90p nachgewiesen werden. Über die Spezifität dieser Bindung kann aber keine Aussage getroffen werden.

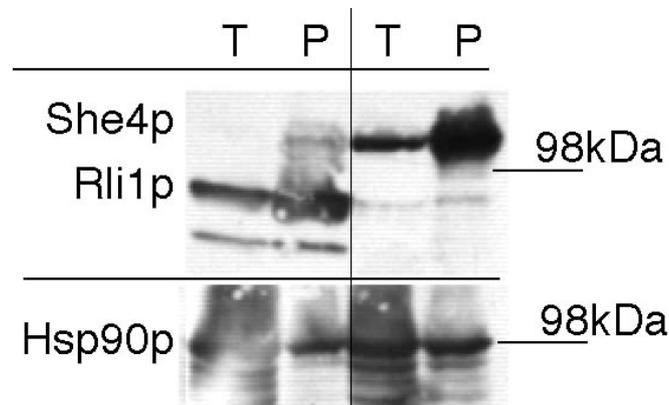


Abb.2.28. She4p und Hsp90p interagieren *in vivo*. Anti-HA Immunpräzipitation. Hsp90p kopräzipitiert mit immobilisierten HA-markiertem She4p (RJY1556). Als Kontrolle wurde HA-markiertes Rli1p verwendet. Leider wurde auch dieses Protein von Hsp90p gebunden. Daher kann keine Aussage über die Spezifität der Bindung von Hsp90p und She4p gemacht werden. T = Überstand, P = Pellet.

Als nächstes wurde eine mögliche Kolo-kalisation von She4p und Hsp90p durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht (Abb.2.29.). Zu diesem Zweck wurde der gleiche Stamm wie in der Immunpräzipitation verwendet (RJY1556). HA-markiertes She4p wurde über den Ratte-Anti-HA Antikörper nachgewiesen und Hsp90p über den spezifischen Kaninchen-Anti-Hsp90p Antikörper. Es konnte nach Überlagerung der Kanäle keine spezifische Kolo-kalisation festgestellt werden, da Hsp90 homogen in Mutter- und Tochterzelle verteilt ist. Ausserdem konnte festgestellt werden, dass sowohl She4p, wie auch Myo3p-GFP in einem *hsp82Δ* Stamm lokalisieren (Daten nicht gezeigt). Problem ist, dass sich in einem *hsp82Δ* Stamm noch funktionelles redundantes Hsc82p befindet.

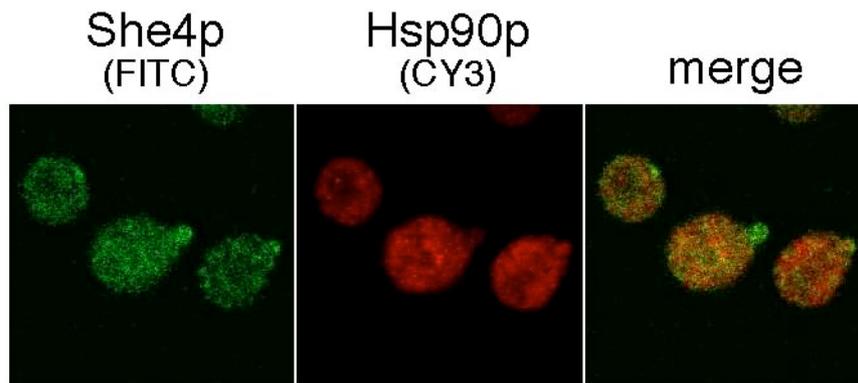


Abb.2.29. She4p und HSP90 zeigen keine Kollokalisierung. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Kollokalisierung von HA-markierten She4p und Hsp90p untersucht. Verwendet wurde der Stamm RJY1556. Beide Proteine zeigen eine unterschiedliche Verteilung in der Zelle.

2.10. She4p interagiert mit nukleolären Proteinen

Neben den Hitzeschockproteinen wurden im *Pulldown* noch zahlreiche Proteine aus der Prozessierung der ribosomalen pre-RNA gefunden. Für weitere Untersuchungen wie Immunpräzipitation, Isolation von Kernen und konfokale Mikroskopie wurden Nop1p und Cbf5p ausgewählt und mit dem HA-Epitop markiert. Als erstes wurde die Interaktion von Nop1p und Cbf5p mit She4p durch Immunpräzipitation untersucht (Abb.2.30). Zu diesem Zweck wurden Stämme verwendet, die zum einen HA-markiertes She4p und zum anderen myc-markiertes Nop1p (RJY2005), bzw Cbf5p (RJY2006) exprimieren. Die myc-markierten nukleolären Proteine wurde mit Maus-Anti-Myc-Antikörper immobilisiert. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Stamm verwendet, der kein myc-markiertes Protein exprimiert und als Positivkontrolle RJY1556, welches myc-markiertes Myo2p und HA-markiertes She4p trägt. Im Falle des Cbf5p konnte She4p präzipitiert werden (Spur 8). Im Gegensatz dazu zeigt Nop1p kaum Interaktion mit She4p, obwohl das Protein an die Sepharose-Matrix gebunden hatte (Spur 6).

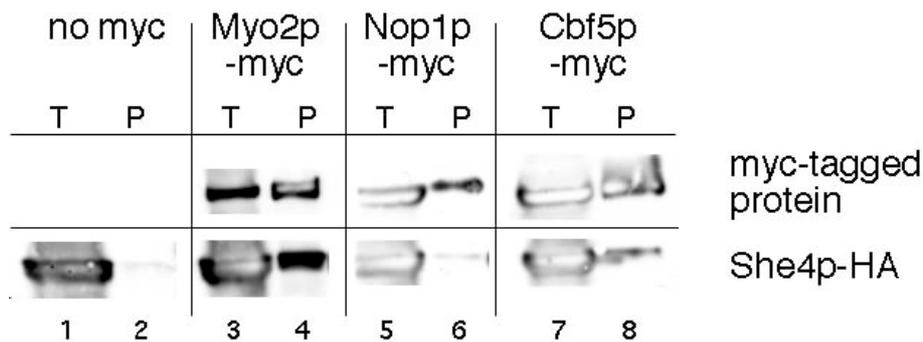


Abb.2.30. *In vivo* Interaktion von She4p und nukleolären Proteinen. Anti-myc Immunpräzipitation. HA-markiertes She4p kopräzipitiert mit immobilisiertem myc-markiertem Cbf5p (RJY2006). Myc-markiertes Nop1p (RJY2005) zeigt nur eine sehr schwache Interaktion (Spur 6), die sich kaum von der unspezifischen She4p-Präzipitation (RJY1340) unterscheidet (Spur 2). Als Positivkontrolle wurde die Interaktion mit Myo2p dargestellt (RJY1556). T = Überstand, P = Pellet.

Da Cbf5p bei Protein-Interaktions-Studien oft als Kontamination vorkommt, wurde versucht, die Spezifität der She4p-Cbf5p-Interaktion zu bestimmen (Abb.2.31). Zu diesem Zweck wurde das Pellet aus der Immunpräzipitation aus Abb.2.30 erneut auf ein Gel aufgetragen und dann das Pellet mit Hilfe spezifischer Antikörper nach dem Vorhandensein von Aktin oder Hsp90p untersucht. Wie man deutlich sehen kann, werden beide Proteine nicht mit Nop1p oder Cbf5p kopräzipitiert. Die Interaktion von Cbf5p mit She4p scheint daher spezifisch zu sein.

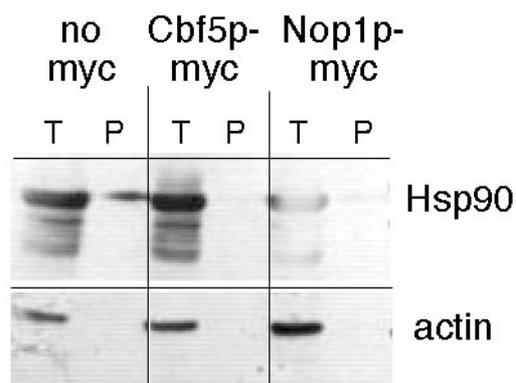


Abb.2.31. Spezifitätstest für die *in vivo* Interaktion von Nop1p und Cbf5p. Anti-myc Immunpräzipitation. Immobilisiertes myc-markiertes Nop1p (RJY2005) und Cbf5p (RJY2006) wurden auf die *in vivo* Interaktion mit HSP90 und Aktin getestet. Beide Proteine präzipitieren nicht mit Nop1p oder Cbf5p. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde ein Stamm ohne myc-markiertem Protein verwendet (RJY358). T = Überstand, P = Pellet.

Mit Hilfe der Immunpräzipitation konnte eine Interaktion zwischen Cbf5p und She4p nachgewiesen werden. Da Cbf5p im Nukleolus lokalisiert, wurde als nächstes untersucht, ob She4p auch im Kern zu finden ist. Zu diesem Zweck wurden Kerne aus Hefezellen nach dem Protokoll von Hurt et al. isoliert und anschliessend mit Western-Analyse auf das Vorhandensein von HA-markiertem She4p untersucht (Abb.2.32) (Hurt et al., 1988). Für die Isolation wurden aus Zellen, die HA-markiertes She4p und myc-markiertes Cbf5p exprimieren die Kerne isoliert und über einen Saccharose-Stufengradienten aufgetrennt. Isolierte Kerne sind in den Interphasen III bis V zu finden. Wie in Abb.2.32 zu sehen zeigt Cbf5p einen deutlichen Peak in Interphase II und IV, ist jedoch auch in Interphase I zu finden. Dies lässt darauf schliessen, dass die Kerne während der Isolation teilweise zerstört und somit Cbf5p freigesetzt wurde. Im Gegensatz zu Cbf5p ist She4p homogen in allen Interphasen zu finden.

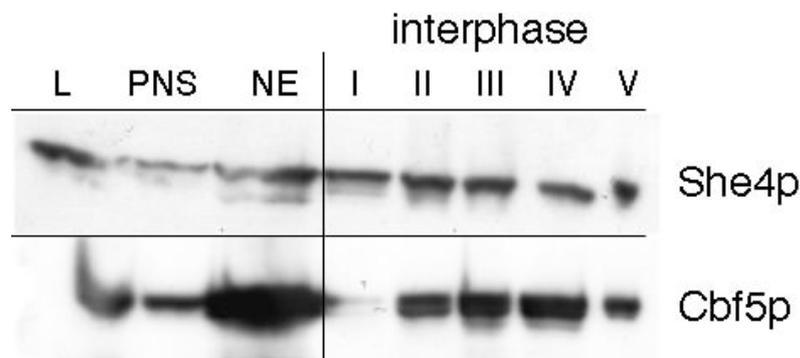


Abb.2.32. She4p kofraktioniert mit nukleolären Proteinen. Aus Zellen mit HA-markiertem She4p und myc-markierten Cbf5p (RJY2006) wurden die Kerne isoliert. Der Überstand (PNS = post-nuclear supernatant) wurde vom Pellet (NE = nuclear Extrakt), welches die Kerne enthält, getrennt. Isolierte Kerne konzentrieren sich zwischen den Interphasen III bis V. She4p zeigt eine homogene Verteilung durch alle Interphasen, wohingegen die Cbf5p Konzentration in den Kernfraktionen peakt.

Um eine schonendere Kernisolation zu gewährleisten, wurde das Ausgangsprotokoll abgeändert. Anstatt das nukleäre Pellet ein zweites Mal zu douncen, wurde es vorsichtig mit der Pipette resuspendiert und dann direkt auf den Gradienten gegeben (Abb.2.33). Um die Qualität der Isolation zu testen wurden die Interphasen nicht nur auf den nukleolären Marker Cbf5p untersucht, sondern auch mit Hilfe eines spezifischen Maus-Anti-Aktin Antikörpers auf Aktin. Ausserdem wurde noch ein spezfischer Maus-Anti-Kernporen Antikörper (MAB414) verwendet, um einen weiteren Marker für den Kern zu haben. Wie in Abb.2.34 zu sehen, hat sich die

Kernisolation deutlich verbessert. Cbf5p ist nun genau wie MAB414 deutlich in den Interphasen III bis V angereichert. Im Gegensatz dazu ist der zytoplasmatische Marker Aktin in diesen Interphasen nur in sehr geringen Mengen zu sehen. Dies kann auf eine Kontamination mit zytoplasmatischen Aktin während der Aufreinigung zurückzuführen sein. Eine andere Möglichkeit ist jedoch das Vorhandensein von nukleärem Aktin, das bereits im Kern tierischer Zellen identifiziert wurde und das an zahlreichen nukleären Prozessen beteiligt ist (Bettinger et al., 2004).

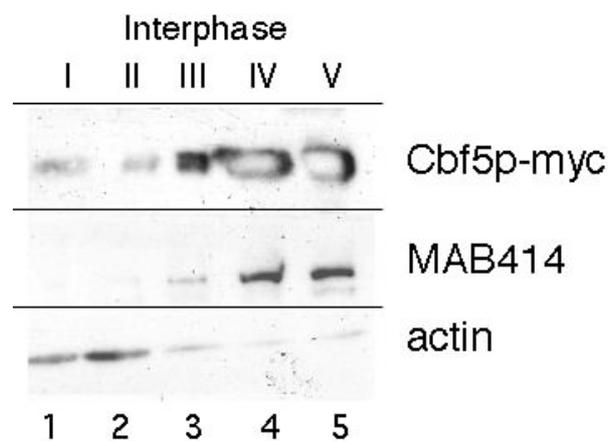


Abb.2.33. Optimierung der Kernisolation. Aus Zellen mit myc-markierten Cbf5p (RJY2006) wurden Kerne isoliert. Das nukleäre Extrakt wurde im Gegensatz zu Abb.30 direkt auf einen Saccharose-Gradienten gegeben. Die Cbf5p-Verteilung zeigt eine schärfere Konzentration in den Kernfraktionen (Spur 3 - 5). Als zusätzliche Kontrollen wurden Kernporen (MAB414) und Aktin detektiert. Die Kernporenfärbung komigriert mit Cbf5p (Spur 4 + 5), wohingegen das Aktin hauptsächlich in den ersten Fraktionen (Spur 1 + 2) zu finden ist.

Um eine schärfere Auftrennung der Kernkomponenten zu erzielen, wurde nach dem ersten Gradienten, die Interphasen auf einen zweiten Gradienten gegeben (Abb.2.34). Zu diesem Zweck wurden die Interphasen III bis V des ersten Saccharosegradienten vereinigt, verdünnt und mit Hilfe eines zweiten identischen Gradienten erneut aufgetrennt. Verwendet wurde der Stamm RJY1556, welcher myc-markiertes Myo2p und HA-markiertes She4p exprimiert. Als Kernmarker wurde der Antikörper MAB414 zur Detektion der Kernporen verwendet. Als zytoplasmatische Komponenten wurde durch spezifische Antikörper Aktin und Myo2p nachgewiesen. Wie man deutlich sehen kann, konzentrieren sich die Kernporen im ersten und zweiten Gradienten auf die Interphasen III und IV, was für eine gute Qualität der Kernisolation spricht. Dies wird ausserdem durch die Myo2p-Verteilung bestätigt,

welche nur in der Interphase I des ersten Gradienten zu finden ist. She4p zeigt im ersten Gradienten noch eine homogene Verteilung, konzentriert sich jedoch im zweiten Gradienten eindeutig auf die Interphasen III und IV. Dies Ergebnis ist auch bei Aktin-Verteilung im zweiten Gradienten sichtbar. Obwohl der erste Gradient kaum ein Aktin-Signal in den Interphasen III bis V zeigt, haben wir eine klare Anreicherung in Interphase IV des zweiten Gradienten. Durch die Optimierung der Kernisolation konnte erneut bestätigt werden, dass sich She4p zusammen mit Kernen isolieren lässt.

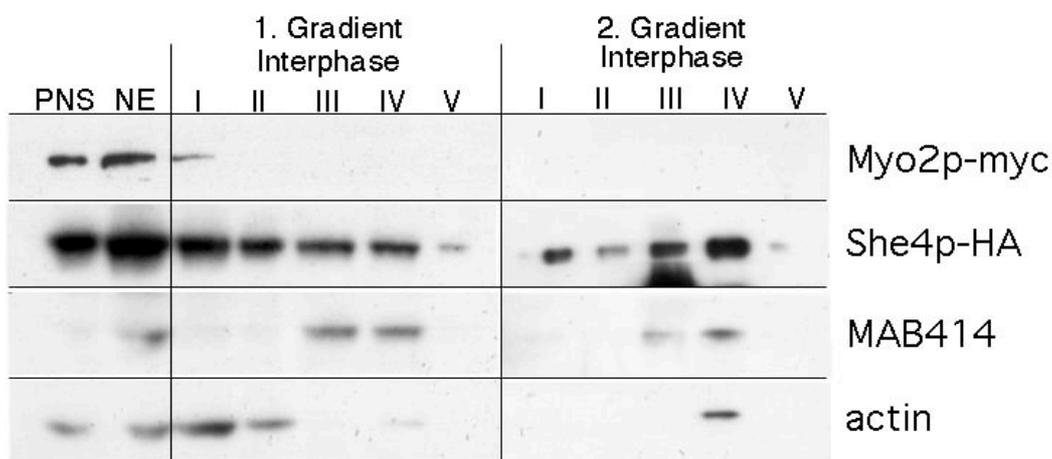


Abb.2.34. Aufreinigung der Kernextrakte über zwei Gradienten. Aus Zellen mit myc-markierten Nop1p und HA-markiertem She4p (RJY2005) wurden Kerne isoliert und über einen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Anschliessend wurden die Interphasen III bis V isoliert und auf einen zweiten Gradienten gegeben. Dadurch konnten She4p und Nop1p auf die Kernfraktion in Interphase IV konzentriert werden. Der cytoplasmatische Marker Myo2p ist ausschliesslich in Interphase I des ersten Gradienten zu finden. Der zweite Gradient führt auch zu einer Akkumulation von Aktin in der Kernfraktion. PNS = post-nuclear supernatant, NE = nuclear extrakt.

Sowohl Immunpräzipitation als auch die Präparation der Kernextrakte gaben eindeutige Hinweise auf eine Assoziation zwischen She4p und nukleolären Proteinen. Da sich diese Proteinen hauptsächlich im Kern aufhalten, wurde als nächstes die Lokalisation von She4p mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht (Abb.2.35). Diese Art der Mikroskopie ermöglicht das Setzen von definierten optischen Schnitten durch die Zelle und somit eine Aussage darüber, in welcher Schicht der Zelle sich das untersuchte Protein befindet. Für die Bestimmung einer möglichen Kernlokalisation

von She4p wurden drei verschiedene Marker verwendet. Zum einen Nop1p, welches im Nucleolus lokalisiert (Moy et al., 2002), einem Kompartiment des Kerns, welches als halbmondförmige Struktur im Mikroskop sichtbar ist. Als weiteren Kernmarker wurde der Antikörper MAB414 verwendet, welcher die Kernporen erkennt und als ringartige Struktur sichtbar ist, wenn man den mikroskopischen Schnitt durch den Kern gelegt hat (Aris and Blobel, 1989).

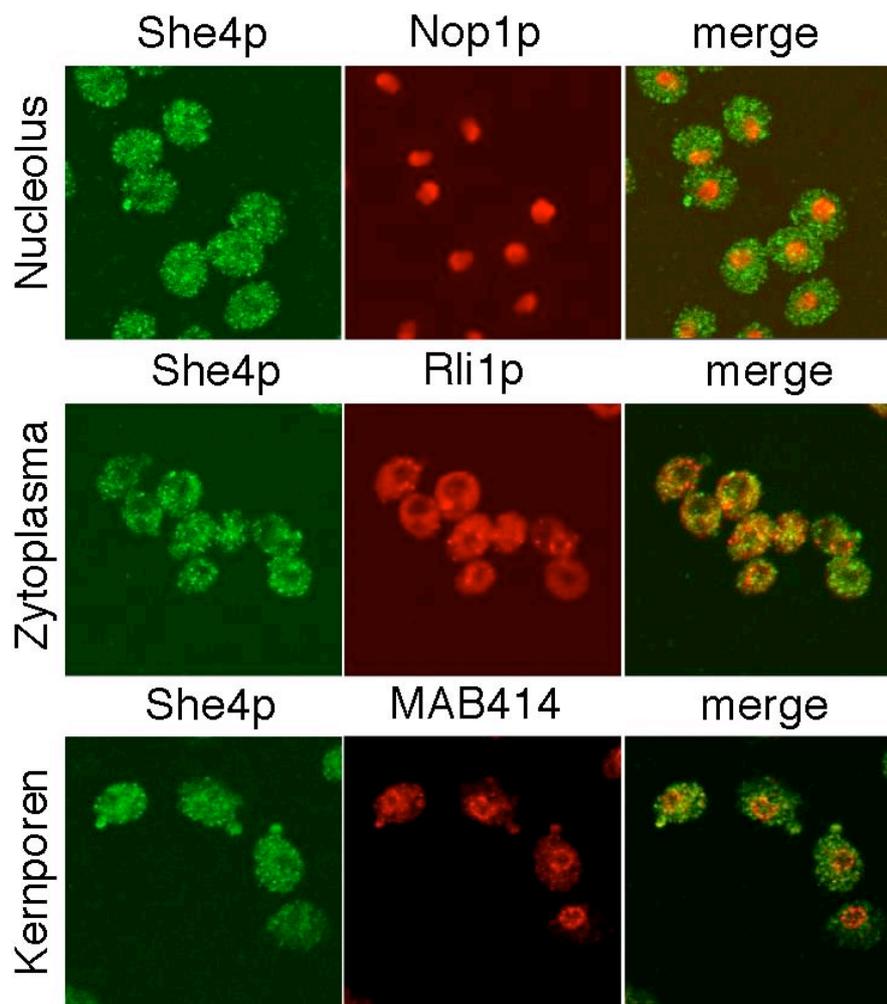


Abb.2.35. She4p ist nicht im Kern angereichert. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie sollte das mögliche Vorkommen von She4p im Kern untersucht werden. In exponentiell wachsende Stämme, welche HA-markiertes She4p exprimieren wurden zusätzlich verschiedene Markerproteine angefärbt. Für nukleoläre Lokalisation wurde myc-markiertes Nop1p detektiert (RJY2005), für cytoplasmatische Lokalisation Rli1p mit einem spezifischen Kaninchen-Anti-Rli1p-Antikörper (RJY1556) und für die Kernporen wurde der Antikörper MAB414 (RJY1556) verwendet. Die Überlappung von She4p und Rli1p, bzw MAB414 zeigt keine Kolokalisation. Die Kofärbung mit Nop1p ist nicht so eindeutig, da einige Zellen eine Kolokalisation zeigen, einige nicht.

Als ein zytoplasmatischer Marker wurde das Protein Rli1p verwendet. Birgit Märtens (AG Jansen) konnte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und spezifischen Kaninchen-Anti-Rli1p-Antikörpern zeigen, dass Rli1p ausschliesslich im Zytoplasma der Zelle zu finden ist. Der Kern ist als deutlich erkennbare Aussparung unter dem Mikroskop zu sehen. Vergleicht man nun die Verteilung von She4p in Bezug auf die Lokalisation der Marker-Proteine, ist leider keine eindeutige Aussage möglich. Im Fall von Nop1p sieht man in einigen Zellen eine deutliche Aussparung in der She4p-Verteilung, die mit dem Kern kolokalisiert, in anderen nicht. Im Gegensatz dazu spricht die Kolokalisation von She4p und Rli1p, bzw den Kernporen gegen ein nukleäres Vorkommen von She4p. Insgesamt gesehen sprechen die Ergebnisse nicht für ein direktes Vorkommen von She4p im Kern. Es ist jedoch auch möglich, dass She4p direkt am Kern sitzt und in nicht sichtbaren Mengen im Kern vorliegt. Dies muss jedoch durch weitere Experimente geklärt werden.

Als letztes wurde untersucht, ob She4p einen Einfluss auf die Bindungspartner von Cbf5p hat. Da weder Kernextrakte noch konfokale Mikroskopie eindeutig belegen konnten, dass She4p sich im Kern befindet und vielleicht an der Prozessierung der ribosomalen RNA beteiligt ist, wurde eine TAP-TAG-Aufreinigung mit Cbf5p durchgeführt (Rigaut et al., 1999). Diese Methode ist eine Zwei-Schritt-Aufreinigung, die es erlaubt, die Zusammensetzung von nativen Protein-Komplexen zu untersuchen und die beteiligten Proteine zu bestimmen. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Es sollte untersucht werden, ob sich das Muster der Interaktionspartner von Cbf5p in einem *she4Δ* Stamm verändert (Abb.2.36). Zu diesem Zweck wurden ein Wildtyp (RJY2029) und ein *she4Δ* Stamm (RJY2030) konstruiert, die ein TAP-TAG markiertes Cbf5p exprimieren. Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase geerntet und das Protein anschliessend über die TAP-TAG Methode aufgereinigt. Die Cbf5p-TAP-TAG Eluate aus Wildtyp und *she4Δ* wurden anschliessend auf einem 4-12% MOPS-Gradientengel aufgetragen und verglichen. Um unspezifische Banden auszuschliessen wurden ausserdem der entsprechende Wildtyp und *she4Δ* Stamm ohne TAG-TAG markiertes Protein aufgetragen.

Wie man sieht, ist kein Unterschied der Bandenmuster erkennbar. She4p hat also keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Interaktionspartner von Cbf5p.

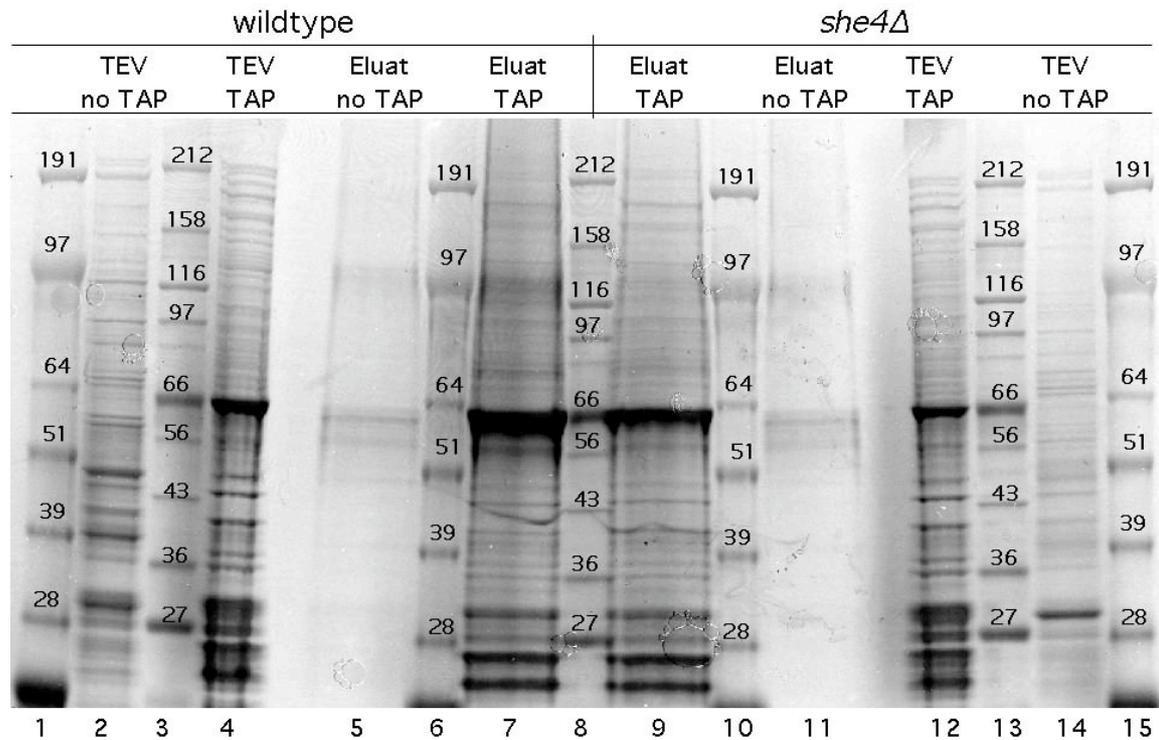


Abb.2.36. She4p hat keinen Einfluss auf die Bindungspartner von Cbf5p. Wildtyp (RJY2131) und *she4Δ* Stämme (RJY2132), welche TAP-Tag markiertes Cbf5p exprimieren wurden einer TAP-Tag-Aufreinigung unterzogen. Anschliessend wurden die Eluate auf einem 4-12% MOPS Gradienten SDS-Page aufgetragen und verglichen. Es konnte kein Unterschied zwischen dem Wildtyp (Spur 7) und *she4Δ* (Spur 9) Bandenmuster festgestellt werden. Die Eluate nach dem TEV-Verdau zeigen das gleiche Ergebnis (Spur 4 + 12). Zur Kontrolle wurden ausserdem die entsprechenden Eluate des Wildtyp (RJY358) und *she4Δ* Stamm (RJY311) ohne TAP-Tag markiertes Protein aufgetragen (Spur 2, 5, 11, 14). Als Protein-Grössenstandard wurden die Marker SeeBlue+2 (Spur 1, 6, 10, 15) und Broad Range (Spur 3, 8, 13) verwendet (Angaben in kDa).

3. Diskussion

Die Myosine bilden eine grosse Familie von Aktin-abhängigen Motorproteinen und sind für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Vesikeltransport, Zytokinese oder Endozytose verantwortlich (Berg et al., 2001). Mit Hilfe ihrer konservierten N-terminalen Motordomäne binden sie reversibel und ATP-abhängig an Aktin. Die rekombinante Expression von funktionellen Myosinen ist sehr problematisch, da sich die Motordomäne nicht in eine funktionelle Konformation faltet (Saraswat and Lowey, 1991; Sohn et al., 1997). Die Ergebnisse verschiedener Arbeiten deuten daraufhin, dass Myosin-Köpfe spezielle Assemblierungsfaktoren benötigen. Eine Gruppe von konservierten UCS-Proteinen regulieren von der Hefe bis zur Maus die Interaktion zwischen Myosinen verschiedenster Klassen und dem Aktin Zytoskelett (Hutagalung et al., 2002).

Allen UCS-Proteinen gemeinsam ist die konservierte ca. 250 Aminosäurereste lange UCS-Domäne am carboxyterminalen Ende (Barral et al., 1998). Im Gegensatz zu den Vertretern aus Pilzen weisen die UCS-Proteine mehrzelliger Eukaryonten eine N-terminale TPR-Domäne auf, die für die Interaktion mit dem Hsp90 Chaperon-System verantwortlich ist (Barral et al., 2002). *unc-45* Mutanten aus *C.elegans* zeigen Missbildungen in der Körperwandmuskulatur, welche durch Defekte beim Zusammenbau der dicken Filamente und Sarkomere verursacht werden. Barral et al. postulierten eine Chaperonfunktion von UNC-45 während der Assemblierung von Klasse II Myosinen. Sie konnten zeigen, dass UNC-45 über die UCS-Domäne an Myosinköpfe bindet und deren thermische Aggregation verhindert. Auch die UCS-Proteine der Pilze Rng3p aus *S. pombe* und Cro1p aus *P. anserina* sind an Myosin-vermittelten Prozessen beteiligt (Berteaux-Lecellier et al., 1998; Wong et al., 2000). *SHE4* Mutanten aus *S. cerevisiae* zeigen Defekte in Endozytose und Integrität des Aktinzytoskeletts, sowie eine Misslokalisierung der *ASH1* mRNA (Jansen et al., 1996; Wendland et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von She4p charakterisiert und den Einfluss auf die Funktion der Hefe-Myosine analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass She4p über die UCS-Domäne an die Motordomäne von Klasse I und Klasse V Myosinen bindet und für die Lokalisation von Myo3p, Myo4p und Myo5p, aber nicht Myo2p notwendig ist. Ausserdem wurde nachgewiesen, dass She4p über einen

Myo2p-abhängigen Mechanismus in die Knospenspitze transportiert wird und dort partielle Kolokalisation mit den Klasse I Myosinen und Myo4p zeigt. Mit Hilfe der temperatursensitiven *myo2-66* Mutante wurde gezeigt, dass die Verteilung von She4p unterschiedliche Einflüsse auf die Funktion der verschiedenen Myosin-Klassen hat. Bei der restriktiven Temperatur kommt es zu einer Misslokalisierung von Myo2p und She4p. Diese Situation ist für die Funktion des Klasse V Myosin Myo4p absolut ausreichend, wohingegen die Klasse I Myosine Misslokalisierung zeigen. Durch Kolokalisation-Studien wurde gezeigt, dass die Klasse I Myosine im *she4Δ* nicht mehr wie im Wildtyp mit Aktin *Patches* kolokalisieren, sondern sich in Mutter- und Tochterzelle gleichmässig verteilen. In einem Aktin *Pelleting* Assay wurde gezeigt, dass aus *she4Δ* Stämmen isoliertes Myo5p nicht mehr in der Lage ist, über die Motordomäne ATP-abhängig an Aktin zu binden. Es ist möglich, dass She4p wie sein Homolog UNC-45 die Faltung der Motordomäne als Chaperon oder Kochaperon vermittelt. Obwohl She4p keine N-terminale TPR-Domäne besitzt, ist eine Assoziation mit den Chaperonsystemen nicht ausgeschlossen, da eine Interaktion mit den Hsp90 Proteinen Hsp82p und Hsc82p nachgewiesen wurde. Neben Hsp90 konnten im GST *Pulldown* zusätzliche Proteine identifiziert werden, die die Prozessierung der ribosomalen RNA im Kern vermitteln. Obwohl durch konfokale Mikroskopie keine Akkumulation von She4p im Kern festgestellt wurde, zeigten die Ergebnisse der Kernisolationen eindeutig eine Assoziation von She4p und speziellen Kernmarker-Proteinen.

3.1. She4p ist für die Funktion der Klasse I und Klasse V Myosine essentiell

Im Gegensatz zu den anderen UCS-Proteinen ist She4p nicht essentiell, sondern hat bei Deletion eine Temperatursensitivität zur Folge. Wie bereits angesprochen zeigt eine *she4Δ* Mutante Defekte in Endozytose, mRNA-Lokalisation und in der Integrität des Aktinzytoskeletts. Dies deutet auf einen Einfluss von She4p auf verschiedene Myosin-vermittelte Prozesse hin. Mit Hilfe von Lokalisationsstudien wurde gezeigt,

dass Myo4p und die Klasse I Myosine in *she4Δ* Zellen misslokalisieren. Die Ursache dafür scheint ein Defekt in der Interaktion zwischen der Motordomäne und dem Aktinzytoskelett zu sein (siehe 3.2.). Die Defekte in Endozytose oder mRNA Lokalisation entstehen dabei durch die Fehlfunktion der jeweils beteiligten Myosine und sind nicht sekundärer Natur. Die Misslokalisierung von Myo3p, Myo4p und Myo5p ist z.B. keine Folge defekter Aktinfilamente, da Myo2p weiterhin an der Knospenspitze und Myo1p an der Verbindungsstelle zwischen Mutter und Tochter akkumuliert. Ausserdem konnte durch Phalloidin-Färbung gezeigt werden, dass die Filamente sich wie im Wildtyp verteilen. Mark Arnold konnte im Rahmen seiner Diplomarbeit zeigen, dass die Misslokalisierung der *ASH1* mRNA keine Folge der Fehlfunktion von Klasse I Myosinen ist. In einer *myo3Δmyo5Δ* Doppel-Mutante konnte er eine eindeutige Akkumulation von Myo4p und der *ASH1* mRNA in der Knospenspitze nachweisen.

Die in der Literatur beschriebenen Defekte in der Endozytose von *she4Δ* Zellen sowie die Missorganisation des Aktinzytoskeletts lassen sich durch die Fehlfunktion der Klasse I Myosine erklären. Ein *myo3Δmyo5Δ* Stamm zeigt neben verminderter Sekretion und Endozytose ebenfalls ein disorganisiertes Aktinzytoskelett, was z.B. zu Osmosensitivität oder zu einem zufälligen Knospungsmuster führt (Geli and Riezman, 1996; Lechler et al., 2000). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Deletion der SH3 Domäne von Myo5p zur Misslokalisierung von Myo5p selbst und zur Misslokalisierung und Depolarisation der Aktin *Patches* führt (Anderson et al., 1998). Die runde und "aufgeblähte" Morphologie der Zellen ist wahrscheinlich eine Folge der falschen Verteilung der Aktin *Patches*, welche für die Polaritätsbestimmung der Zelle wichtig sind. Da sie sowohl in der Mutter- wie auch in der Tochterzelle verteilt sind, kann es zu einem isotropen Wachstum kommen. Welche Ursache die Temperatursensitivität im *she4Δ* Stamm hat, ist unklar. Zum einen könnte es ebenfalls ein sekundärer Effekt durch die Misslokalisierung der Klasse I Myosine sein, da ein *MYO3/MYO5* Doppel-Knockout je nach genetischem Hintergrund temperatursensitiv oder lethal ist (Goodson et al., 1996; Riezman et al., 1996).

Zum anderen würde es eine mögliche Funktion von She4p als Chaperon erklären, da Deletions-Stämme dieser Protein-Familie oft temperatursensitiv sind. Die Substrate sind in Abwesenheit ihrer Chaperone meistens in der Lage ihre Konformation bei normaler Temperatur aufrecht zu erhalten, welche jedoch bei erhöhter Temperatur

oder Stress-Situationen denaturiert. Es könnte daher sein, dass eine Restaktivität der Myosine im *she4Δ* für das Überleben der Zelle ausreicht, es jedoch bei erhöhter Temperatur zur kompletten Denaturierung und somit zu einem Wachstumsstopp kommt. Die Rückkehr zur permissiven Temperatur könnte dann zu einer Wiederherstellung der Restaktivität führen.

Mit Hilfe des GroEL-Trap Systems wurde untersucht, ob in *she4Δ* Zellen missgefaltetes Myosin akkumuliert. Dieses System erlaubt durch die irreversible Bindung an eine in Hefe exprimierte GroEL-Mutante die Identifizierung missgefalteter Proteine (Siegerts et al., 1999). Durch Westernblot-Analyse sollte dann verglichen werden, ob es zu einer erhöhten Bindung von epitopmarkiertem Myosin in *she4Δ* Zellen kommt. Leider liess sich das System nicht im verwendeten genetischen Hintergrund exprimieren.

Neben einer korrekten Faltung sind auch die Interaktion mit regulatorischen leichten Ketten oder Modifikationen wie Phosphorylierung für die Lokalisation der Myosine wichtig. Z.B. ist die Interaktion zwischen Myo4p und She3p für die Lokalisation der *ASH1* mRNA essentiell (Bohl et al., 2000). Es wurde jedoch biochemisch gezeigt, dass die beiden Proteine im *she4Δ* Stamm weiterhin miteinander assoziieren. Für die Lokalisation der Klasse I Myosine und die Kolokalisation mit Aktin *Patches* ist die Bindung an Verprolin notwendig, da *vrp1Δ* Stämme misslokalisierte Myo5p- und Aktin *Patches* zeigen (Anderson et al., 1998). Verprolin und der Arp2/3-Komplex interagieren physikalisch mit Myo3/5p Schwanz und sind in die Aktivierung der Aktinpolymerisation involviert. Es ist durchaus möglich, dass She4p zusätzlich einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Vrp1p und Myo5p hat, da eine *she4Δ vrp1Δ* Mutante bereits bei 25°C nur schwaches Wachstum zeigt (Toi et al., 2003). Ausserdem konnte durch systematische genetische Analysen eine synthetische Lethalität von *she4Δ* mit *arp2-33* und *arc40-40* festgestellt werden. Beide Gene kodieren für Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes (Tong et al., 2001).

3.2. She4p interagiert mit der Myosin Motordomäne und vermittelt die Interaktion mit dem Aktinzytoskelett

Durch Immunpräzipitationen wurde gezeigt, dass She4p mit Myosinen der Klasse I und V interagiert. Dies steht im Gegensatz zur Spezifität der anderen UCS-Proteine, welche hauptsächlich mit den Klasse II Myosinen interagieren, oder Klasse II vermittelte Prozesse beeinflussen. Es gibt jedoch bereits Hinweise darauf, dass auch UNC-45 mit Klasse V Myosinen im Two-Hybrid-Test interagiert (Huatagalung et al., 2002). Eine Spezifität von She4p für Klasse II Myosine ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, da auch in diesem Fall Two-Hybrid-Daten eine Interaktion zwischen dem Klasse II Myosin Myo1p und She4p zeigen (Toi et al., 2003). Diese Resultate deuten daraufhin, dass UCS-Proteine hauptsächlich die Faltung der konservierten Motordomäne der verschiedenen Myosin-Isoformen vermitteln, anstatt ausschliesslich Klasse II Myosine in Filamenten zu organisieren (Abb.3.1.). Die UCS-Domäne zeigt in allen Organismen eine hohe Konservierung, wohingegen der N-terminale Teil sehr variabel ist.

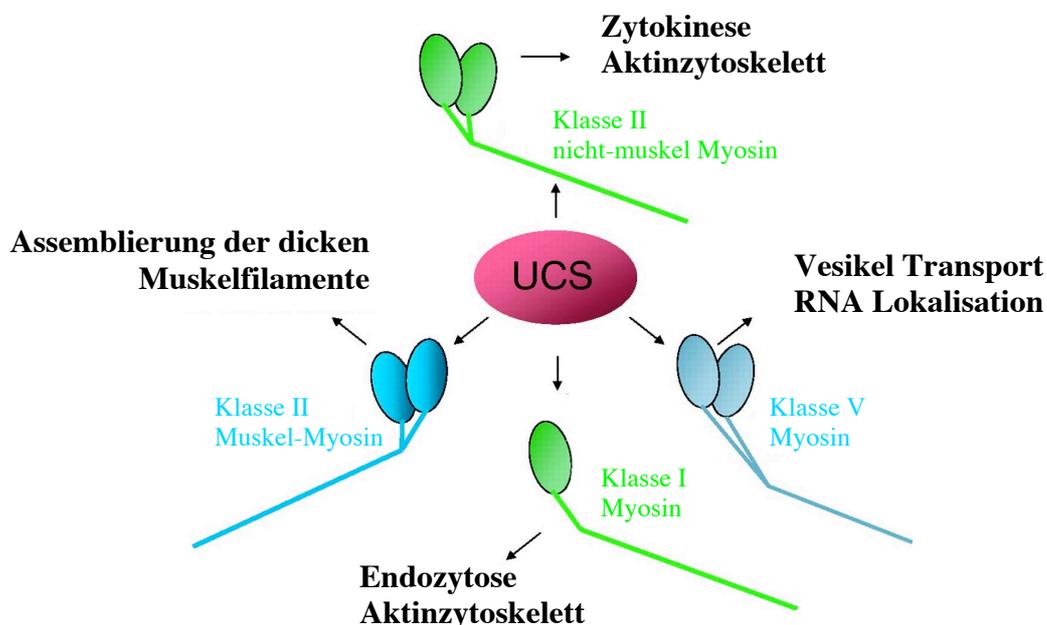


Abb.3.1. Interaktion zwischen der UCS-Domäne und Myosinen (angelehnt an Huatagalung et al., 2002). Genetische und biochemische Analysen von UCS-Proteinen aus *S. pombe* (Rng3p), *S. cerevisiae* (She4p) und *C. elegans* (UNC-45) zeigen eine funktionelle Interaktion von UCS-Proteinen mit Klasse I, II und V Myosinen.

Im Gegensatz zu den UCS-Proteinen aus Pilzen findet man in *D. melanogaster* oder *C. elegans* eine N-terminale TPR-Domäne, welche mit dem Hsp90 System interagiert. Eine andere Besonderheit ist in höheren Vertebraten zu finden. Durch Genomanalysen wurden in Pufferfisch, Maus und Mensch zwei verschiedene UCS-Proteine gefunden, eine wird hauptsächlich in Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert (SM-Form), wohingegen die andere in fast allen Geweben zu finden ist (GC-Form) (Price et al., 2002). Es wäre durchaus denkbar, dass sich hier bestimmte UCS-Proteine für verschiedene Myosinklassen entwickelt haben, die SM-Form für die Klasse II Myosine und die GC-Form für die skeletalen Klasse V oder Klasse I Myosine.

Die Verwendung C-terminal verkürzter Konstrukte von Myo4p, Myo5p und She4p zeigte, dass She4p über die UCS-Domäne mit der Motordomäne der Myosine interagiert. Diese Interaktion ist nur sehr schwach und deutet daraufhin, dass die Proteine nicht in einem festen Komplex vorliegen, sondern nur transient interagieren. Für UNC-45 konnte bereits gezeigt werden, dass es ebenfalls über die UCS-Domäne mit dem S1 Fragment von Klasse II Myosin interagiert und dass Mutationen konservierter Reste in der UCS-Domäne lethale Folgen haben (Barral et al., 2002; Venolia et al., 1999). Rng3p aus *S. pombe* scheint auch einen Einfluss auf die Motordomäne von Klasse II Myosinen zu haben. Myo2-E1 aus *S. pombe* trägt eine temperatursensitive Mutation in der Aktinbindestelle der Motordomäne, ähnlich der *myo2-66* Mutation in *S. cerevisiae* und zeigt eine genetische Interaktion mit temperatursensitiven Rng3p (Wong et al., 2000). Ausserdem konnten Toi et al. im Two-Hybrid-Test eine Interaktion zwischen Rng3p und der Motordomäne von *S. pombe* Myo2p feststellen (Toi et al., 2003).

Die Frage war nun, welcher Teil der Myosin-Motordomäne mit She4p interagiert. Die mit She4p im Two-Hybrid interagierenden Myo5-Fragmente überlappen im Bereich von Aminosäure 250 bis 527 (Wesche et al., 2003) innerhalb des Motors. Durch Vergleich mit *Dictyostelium discoideum* Klasse I Myosin MyoE enthält dieser Bereich Teile der Aktinbindungsfläche der Motordomäne (Kollmar et al., 2002). Toi et al. konnten den Interaktions-Bereich in der Myo3p Motordomäne sogar auf die Aminosäuren 471 bis 572 eingrenzen (Toi et al., 2003). Da die Myosinsuperfamilie eine starke Konservierung in der Motordomäne aufweist, verglichen die Autoren Myo3p mit der bereits bekannten dreidimensionalen Struktur von skeletalen Hühnermuskulmyosin. Sie stellten dabei fest, dass das She4p-interagierende Segment

von Myo3p den Aminosäuren 527 bis 631 im Muskelmyosin entspricht, ein Bereich, welcher drei der vier voraussichtlichen Kontaktflächen zwischen Aktin und der Motordomäne enthält (Abb.3.2.).

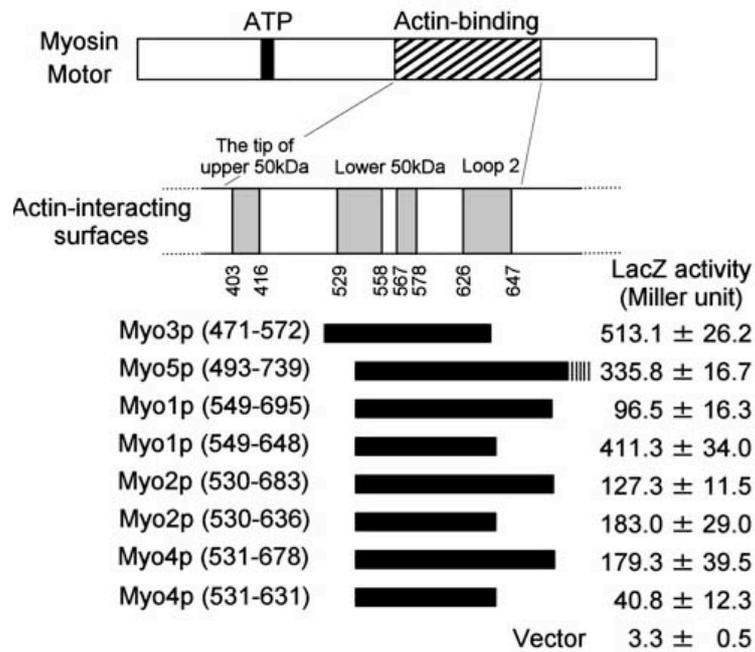


Abb.3.2. Two-Hybrid Interaktion zwischen She4p und Myosinen (Toi et al., 2003). Die Interaktion zwischen der UCS-Domäne von She4p und den Myosinen wurde quantitativ durch β -Galaktosidase Aktivitätstests analysiert. Interagierende Myosinfragmente wurden mit der Aktinbindedomäne von skeletalen Hühnermuskelmyosin verglichen. Die Nummern unter der schematischen Aktinbindedomäne stehen für die Aminosäure-Positionen im Hühnermuskelmyosin.

Durch die Kollokalisationsstudien mit Aktin *Patches* sowie durch den Aktin *Pelleting* Assay wurde gezeigt, dass die Klasse I Myosine in *she4Δ* Zellen nicht mehr über die Motordomäne an Aktin binden können und somit eine Misslokalisierung zeigen. Dies deutet daraufhin, dass She4p die Interaktion zwischen der Motordomäne und dem Aktinzytoskelett vermittelt. Es ist durchaus möglich, dass She4p als Chaperon für die Faltung der Motordomäne, und somit auch der Aktinbindestelle, notwendig ist. Toi et al. konnten zeigen, dass die Überexpression von She4p in einem *myo3Δ myo5Δ myo5-1* Stamm bei 35°C toxisch für die Zelle ist. Myo5-1p trägt eine Mutation in der Aktinbindestelle der Motordomäne und zeigt bei 35°C normales Wachstum. Es wäre

möglich, dass She4p mit der Aktinbindestelle von Myo5-1 interagiert, die defekte dreidimensionale Struktur nicht wieder herstellen kann und somit die Interaktion zwischen Myo5-1p und Aktin verhindert.

Die Ursache für die Misslokalisierung von Myo4p ist weiterhin unklar, da sich kein Aktin *Pelleting* Assay mit dem Protein durchführen lässt. Im Gegensatz zu den Klasse I Myosinen bindet Myo4p lediglich über die Motordomäne an Aktin und liess sich daher nicht aus *she4Δ* Zellen isolieren. Es ist jedoch durchaus möglich, dass She4p ebenfalls mit der Aktinbindestelle im Myo4p Motor interagiert. Toi et al. konnten durch Two-Hybrid-Analysen feststellen, dass der interagierende Bereich von Myo2p und Myo4p mit She4p ungefähr equivalent zum She4p-interagierenden Segment von Myo3/5p ist. Zusätzlich dazu stellten sie eine Two-Hybrid-Interaktion zwischen der Motordomäne des Klasse II Myosins Myo1p und She4p fest. Das konnte jedoch nicht bestätigt werden. Weder die Immunpräzipitation, noch Kolokalisationsstudien deuteten auf eine Interaktion zwischen Myo1p und She4p hin. Es ist jedoch durchaus möglich, dass die Interaktion sehr schwach ist und durch die verwendeten Ansätze nicht sichtbar gemacht werden kann. Zum Beispiel ist keine spezifische Lokalisation von Rng3p-GFP in *S. pombe* Zellen sichtbar. Wird jedoch ein *myo2-E1* Stamm verwendet, ist eine Kolokalisation von Rng3-GFP und dem kontraktilen Ring bereits bei permissiver Temperatur sichtbar. Dies könnte man dadurch erklären, dass durch die Mutation in der Aktinbindestelle Rng3p rekrutiert wird und somit unter dem Mikroskop zu sichtbaren Menge akkumuliert. Die Verwendung einer ähnlichen Myo1p-Mutante könnte vielleicht die Frage klären, ob She4p und Myo1p tatsächlich interagieren. Da jedoch She4p nicht essentiell für die Funktion von Myo1p und Myo2p ist, muss es einen anderen Mechanismus oder andere Proteine geben, die alleine, oder zusammen mit She4p die Aktivität der Motordomäne vermitteln. Es wäre auch denkbar, dass sich die Motordomänen der beiden Myosine spontan falten können. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass es noch nicht gelungen ist, Myo2p rekombinant zu exprimieren.

In Wildtypzellen ist She4p partikelartig in Mutter- und Tochterzelle verteilt und zeigt zusätzlich eine Akkumulation in der Knospenspitze. Es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt im Zellzyklus She4p an der Verbindungsstelle zwischen Mutter- und Tochterzelle gesehen werden, weder während der Knospentstehung, noch kurz vor der Zytokinese, was wiederum gegen eine Interaktion mit Myo1p spricht. Die

Akkumulation in der Knospenspitze wird von Myo2p vermittelt, einem Klasse V Myosin, dessen Funktion nicht von She4p abhängig ist. Die Interaktion mit diesem Myosin dient anscheinend nur dem Transport von She4p in die Knospe, um dort als lokaler Regulator mit den Klasse I Myosinen zu interagieren. Es wurde gezeigt, dass die Funktion von Myo3p und Myo5p von diesem Transport abhängig ist, wohingegen Myo4p nur funktionelles She4p innerhalb der Zelle benötigt. Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Klassen erklären. Klasse V Myosine scheinen prozessive Motoren zu sein (Mehta et al., 1999; Sakamoto et al., 2000), die “Schritt für Schritt” über Aktinfilamente von der Mutter- in die Tochterzelle wandern und somit ihren Regulator überall in der Zelle benötigen. Im Gegensatz dazu sind die Klasse I Myosine fest mit dem kortikalen Aktinzytoskelett verankert und vermitteln dessen Integrität und Polarität. Aus diesem Grund muss der Regulator She4p in die Knospenspitze transportiert werden, um dort lokal die Interaktion zwischen Motordomäne und Aktinzytoskelett zu vermitteln.

Für die Untersuchung der Dynamik von She4p in lebenden Zellen wurde eine GFP-Fusion hergestellt. Die Expression einer C-terminalen She4p-GFP-Fusion unter dem endogenen Promotor führte zu einer homogenen Verteilung in Mutter- und Tochterzelle, ähnlich der Verteilung von 9xMyc markiertem She4p. Es scheint, dass ein grosser *Tag* am C-Terminus die Funktion der UCS-Domäne oder die Lokalisation beeinträchtigt. Toi et al. zeigten jedoch, dass She4p-GFP funktionell ist, indem sie eine Wildtyp-Verteilung der Aktin *Patches* nachweisen konnten. Dies steht jedoch im Widerspruch zu dem Ergebnis, dass lokalisiertes She4p für die Funktion der Klasse I Myosine und somit der Lokalisation von Aktin *Patches* essentiell ist. Die Klonierung eines Plasmids mit N-terminaler GFP-She4p Fusion unter Kontrolle des eigenen Promotors (900 bp) zeigte ebenfalls keinen Erfolg, da das Fusionsprotein nicht exprimiert wurde. Die Verwendung des starken *NOPI*-Promotors hatte erneut eine homogene Verteilung von GFP-She4p in Mutter- und Tochterzelle zur Folge. Es scheint, dass der Promotor allein für die Expression nicht ausreicht, da auch plasmidexprimiertes Wildtyp She4p unter eigener Promotorkontrolle den knock-out nicht supplementieren kann. Dies war bisher nur mit einem Library-Plasmid möglich, das den She4p-ORF mit flankierenden 3'- und 5'-Regionen enthielt.

3.3. She4p, ein Chaperon für die Myosinmotordomäne?

Wie schon angesprochen besteht der Myosinmotor aus mehreren Domänen, die für eine Faltung in die funktionelle Konformation zusätzliche Faktoren benötigen. Verschiedene Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Familie der UCS-Proteine für diese Faltung notwendig ist. Es ist bereits bekannt, dass die Faltung und Dimerisierung von Myosinschwänzen oder die Bindung der leichten Ketten durch das zytosolische Chaperonin CCT katalysiert wird (Srikakulam and Winkelmann, 1999). Die Faltung der Motordomäne verläuft jedoch sehr langsam und kann nur durch Zugabe von Muskelextrakten beschleunigt werden. Der genaue Einfluss von She4p auf die Motordomäne der Myosine ist weiterhin unbekannt. Es scheint jedoch in *she4Δ* Zellen zu einem Defekt in der ATP-abhängigen Aktinbindung durch die Motordomäne zu kommen. Wie schon angesprochen konnten Barral et al. zeigen, dass UNC-45 wahrscheinlich als Kochaperon zusammen mit Hsp90 und Hsp70 die korrekte Faltung der Myosinmotordomäne vermittelt. Ausserdem besitzt UNC-45 selbst eine Chaperonaktivität, da es sowohl die Motordomäne von Klasse II Myosin wie auch Zitratsynthase vor thermaler Aggregation schützt.

Chaperone katalysieren die Faltung denaturierter oder neusynthetisierter Proteine in ihre native dreidimensionale Struktur (Gottesman and Hendrickson, 2000; Grantcharova et al., 2001), indem sie hydrophobe Bereiche binden und somit eine Aggregation der Intermediate verhindern. Die Substrataffinität wird über die ATPase-Aktivität des Chaperons und durch Kofaktoren reguliert. Hsp70 ist beteiligt an der Faltung neusynthetisierter Proteine und deren Schutz bei Zellstress (Srikakulam and Winkelmann, 1999). Im Gegensatz dazu scheint die Rolle von Hsp90 spezifischer zu sein. Es ist hauptsächlich an der Faltung und Assemblierung von Proteinen beteiligt, die z.B. Signal-Transduktion oder Transkriptionsaktivierung vermitteln. Es scheint dabei Teil eines Multichaperon-Komplexes zu sein, der neben zahlreichen Kochaperonen auch mit Hsp70 interagiert. Viele mit Hsp90 und Hsp70 interagierende Kochaperone haben eine gemeinsame N-terminale Domäne, welche ein bis drei TPR-Motive enthält. Mit Hilfe dieser Motive können funktionell unterschiedliche Proteine die Aktivität oder Spezifität der Chaperon-Komplexe modulieren. Hsp70 und Hsp90 kommen sowohl in Muskel- wie auch Nichtmuskelzellen vor und können daher notwendig aber nicht ausreichend für die Faltung von Muskelmyosin sein. Es ist

denkbar, dass UNC-45 als muskelspezifischer Adapter über die TPR-Domäne die Hsp70/Hsp90-Maschinerie zum Muskelmyosin rekrutiert und somit eine effiziente Faltung ermöglicht (Abb.3.3.).

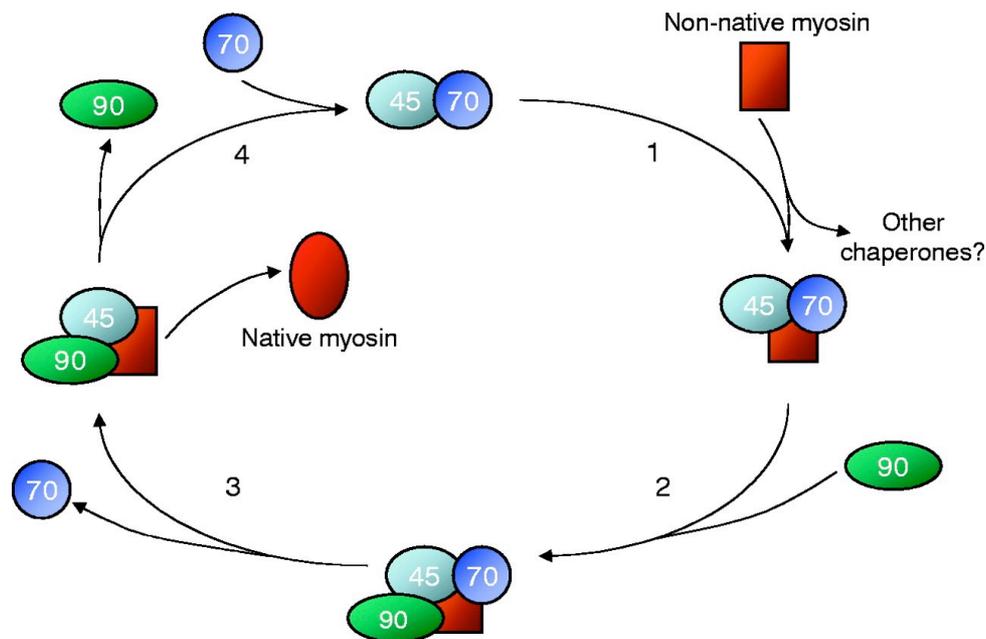


Abb.3.3. Modell für die Funktion von UNC-45 bei der Faltung von Myosinmotoren (Hutagalung et al., 2002). Durch Interaktion mit den Chaperonen Hsp70 und Hsp90 könnte UNC-45 als Kochaperone dienen, dass Hsp70 (1) und Hsp90 (2) zu ungefaltetem Myosin rekrutiert. Unter physiologischen Bedingungen könnte Hsp70 mit Hsp40 und Hsp90 mit p23 komplexieren. Nach der Faltung des Myosins würde Hsp70 den Komplex verlassen (3) und Hsp90 würde mit der Faltung fortfahren, da es eher mit fast nativen Intermediaten assoziiert (Jakob et al., 1995). Sobald der Myosinkopf seine endgültige funktionelle Form erreicht hat, dissoziieren Hsp90 und UNC-45 (4), um einen neuen Faltungszyklus zu beginnen.

Obwohl She4p wie alle UCS-Proteine der Pilze keine TPR-Domäne besitzt, ist ein ähnliches Funktionsprinzip nicht ausgeschlossen. Zum einen konnten Hsp82p und Hsc82p, die Hsp90 der Hefe, im GST *Pulldown* als mögliche She4p-Bindungspartner identifiziert werden. Zum anderen bindet beispielsweise UNC-45 Hsp70 über seinen zentralen Bereich, der ebenfalls keine TPR-Domäne enthält. Obwohl die Interaktion zwischen Hsp90 und She4p in der Immunpräzipitation bestätigt wurde, kann keine Aussage über die Spezifität dieser Bindung gemacht werden, da Hsp90 ebenfalls mit dem Kontrollprotein Rli1p interagiert.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte keine spezifische Kolokalisation von She4p und Hsp90 festgestellt werden, da die hoch abundanten Hitzeschockproteine homogen innerhalb der Zelle verteilt sind. Die Untersuchung einer genetischen Interaktion (Daten nicht gezeigt) von She4p und Hsp90 gab ebenfalls keine weiteren Hinweise auf ein Zusammenspiel der Proteine. Hsp82p und Hsc82p sind redundant in ihrer Funktion, da die Deletion eines der beiden Gene keinen Phänotyp zeigt, wohingegen der Doppelknockout lethal ist. Eine Tetradenanalyse zeigte, dass weder *she4Δ hsc82Δ* noch *she4Δ hsp82Δ* lethale Folgen für die Sporen hatten. Auf eine erhöhte Temperaturempfindlichkeit dieser Stämme konnte ebenfalls nicht getestet werden, da *she4Δ* allein bereits temperatursensitiv ist. Es kann daher keine Aussage darüber gemacht werden, ob She4p mit Hsp90 interagiert und eventuell wie UNC-45 als Kochaperone bei der Myosinfaltung agiert. Für eine mögliche Chaperon-Funktion von She4p spricht jedoch der temperatursensitive Phänotyp von *she4Δ* Zellen, sowie die schwache Interaktion mit den Myosinen.

Chaperone sind nicht permanent mit ihren Substraten assoziiert, sondern werden erst durch Denaturierung und Exposition hydrophober Bereiche rekrutiert. Die UCS-Proteine könnten daher den Faltungsstatus der nativen Myosinmotordomäne überwachen, um bei Bedarf zusammen mit dem Chaperonsystem zu agieren. Diese Theorie wird durch verschiedene Untersuchungen in Pilzen und tierischen Systemen unterstützt. Barral et al. konnten zeigen, dass UNC-45 temperaturabhängig mit der Myosinmotordomäne interagiert (Barral et al., 2002). Toi et al. konnten ebenfalls eine stärkere Interaktion zwischen GST-She4p und Myo5p-TAP bei hohen Temperaturen zeigen. Dies deutet auf eine Chaperonaktivität der UCS-Proteine hin, da bereits bekannt ist, dass erhöhte Temperaturen notwendig sind, damit sich *in vitro* Hsp90 mit seinen Substraten komplexiert (Toi et al., 2003). Mit Hilfe einer Immunpräzipitation wurde gezeigt, dass She4p eine stärkere Interaktion mit Myo2-66p-9Myc zeigt, wie mit Myo2p-3HA. Diese Zunahme könnte zwei Gründe haben, die sich nicht gegenseitig ausschließen. Zum einen zeigen 9xMyc markierte Proteine stärkere Degradation wie z.B. 3xMyc markierte und könnten somit verstärkt She4p rekrutieren. Zum anderen trägt Myo2-66p eine Punkt-Mutation in der Motordomäne, die vielleicht zu Missfaltung und somit wie bei Myo2-E1 in *S. pombe* zu einer stärkeren Interaktion mit She4p führt. Wie schon erwähnt, kolokalisiert Rng3p in *S. pombe* mit einem Myo2p-enthaltenden Komplex, welcher ein Vorläufer für den

Zusammenbau des Aktomyosin-Ringes ist (Wong et al., 2000). In diesem Komplex könnte Myo2p in einem partiell gefalteten Zustand vorliegen, der durch das UCS-Protein bis zum Zusammenbau stabilisiert wird. Für die Assoziation von Hsp70 und Hsp90 mit Muskelmyosin wurden ähnliche Ergebnisse veröffentlicht. Es konnte gezeigt werden, dass Hsp70 und Hsp90 mit GFP-markierten Myosinintermediaten, aber nicht mit reifen Myofibrillen kolokalisieren (Srikakulam and Winkelmann, 1999). Sie benutzten dafür post-mitotische C2C12 Myocyten und GFP-getaggttes embryonales Muskelmyosin und analysierten dessen Einbau in das kontraktile Zytoskelett. Sie konnten zeigen, dass neusynthetisiertes GFP-Myosin in frühen Phasen der Muskeldifferenzierung in hellen globulären Spots und kurzen ungeordneten filamentösen Strukturen vorliegt, ähnlich dem Myo2-Spot in *S. pombe*. Während dieser Phase sind die Myosinschwänze bereits dimerisiert, obwohl die Motordomäne noch nicht gefaltet ist. Mit fortlaufender Differenzierung werden diese Strukturen durch gestreifte Myofibrillen ersetzt. Hsp70 und Hsp90 kolokalisieren mit den globularen Intermediaten und kurzen Filamenten, jedoch nicht mit Myosin, das bereits zu Myofibrillen assembliert ist. Dies deutet erneut daraufhin, dass das Chaperonsystem und wahrscheinlich auch die UCS-Proteine für die Faltung neusynthetisierten Myosins wichtig sind und fertig-gefaltete Motorproteine lediglich überwachen. Dies könnte auch erklären, warum She4p mit Myo3p, Myo4p und Myo5p nur partiell kolokalisiert. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass sich der temperatursensitive UNC-45 Phänotyp nur in Embryos oder Larven, nicht aber in erwachsenen Tieren auslösen lässt (Epstein and Thomson, 1974). Eine weitere interessante Entdeckung konnten Toi et al. machen, indem sie vier *MYO5* Mutanten identifizierten, die den *she4Δ* Phänotyp in einem *she4Δmyo3Δmyo5Δ* Stamm selbst bei erhöhten Temperaturen supprimieren (Abb.3.4.) (Toi et al., 2003). Die Expression dieser Suppressormutanten in einem *she4Δ* Stamm zeigte normal polarisierte Aktin *Patches* und rezeptorvermittelte Endozytose. Interessanterweise liegen alle Substitutionen innerhalb einer Spalte, die die obere von der unteren 50 kDa Motor-Subdomäne trennt. Es wird vermutet, dass sich diese Spalte nach ATP-Bindung öffnet und nach dessen Hydrolyse wieder schliesst, und dass dieses Öffnen und Schliessen im Zusammenhang steht mit starker und schwacher Aktinbindung (Rayment et al., 1993).

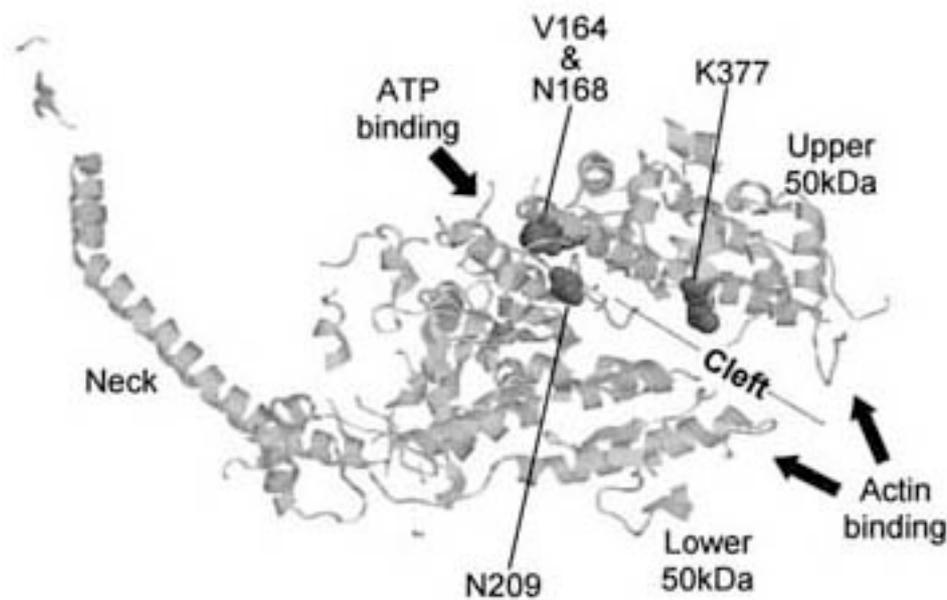


Abb.3.4. Punktmutationen in der Myo5p Motordomäne können den *she4Δ* Phänotyp suppressieren (Toi et al., 2003). Dargestellt wird die dreidimensionale Struktur von von skeletalem Hühnermuskelmyosin S1 (Protein Datenbank Code, 2MYS) und die korrespondierenden Aminosäurereste von V164, N168, N209 und K377 von Hefe Myo5p. Diese Reste liegen innerhalb der Spalte, die zwischen der ATP-Bindungsstasche und der Aktinbindestelle liegt und somit die obere von der unteren 50-kDa Subdomäne trennt.

Es wäre durchaus möglich, dass diese Suppressor-Mutanten in der Lage sind, sich schneller selbst zu falten oder eine bessere Stabilität bei hohen Temperaturen aufweisen. Dies lässt vermuten, dass She4p eher die Konformation dieser Spalte kontrolliert, als die Faltung der gesamten Motordomäne. Die Myo5-Mutanten konnten jedoch nicht die Misslokalisierung von Myo4p im *she4Δ* wiederherstellen. Es war den Autoren nicht möglich Supressor-Mutanten von Myo4p für den *she* Phänotyp im *she4Δ* Stamm zu erzeugen. Dies wird auch durch das Ergebnis gestützt, dass die Überexpression der UCS-Domäne ausreichend ist, um den temperatursensitiven Phänotyp von *she4Δ* zu suppressieren, aber nicht den *she* Phänotyp. Es ist daher möglich, dass im N-terminalen Teil von She4p eine spezifische Funktion in der Lokalisation der *ASH1* mRNA liegt. Um eine tatsächliche Chaperon-Aktivität von She4p nachzuweisen, müssten *in vitro* Assays wie für UNC-45 durchgeführt werden. Für diese Assays ist jedoch aufgereinigtes Myosin notwendig und es war bisher nicht möglich, dieses herzustellen. Zum einen konnten weder komplette schwere Ketten

noch Motordomänen rekombinant in *E.coli* hergestellt werden, selbst wenn She4p koexprimiert wurde. Zum anderen war eine Reinigung von überexprimierten Myosinen direkt aus Hefe ebenfalls nicht möglich, da das synthetisierte Motorprotein nicht in löslicher Form vorlag.

3.4. She4p, innerhalb oder ausserhalb des Kerns?

Im GST *Pulldown* wurden neben Hsp90 hauptsächlich Proteine identifizieren, die an der Prozessierung der rRNA beteiligt sind und im Nukleolus zu finden sind. Dazu gehören Nop1p, Nop58p, Nsr1p, Rrp5p, Utp10p und Cbf5p. Es handelt sich dabei um die Enzyme, die die Hauptprozessierungs-Schritte der 35S rRNA wie Pseudouridylierung oder Methylierung katalysieren. Einige Proteine konnten bei der Wiederholung des GST *Pulldown* erneut gefunden werden (Hsp90, Nop1p und Rrp5p). Leider wurden keine Myosine identifiziert, obwohl zahlreiche spezifische Banden im entsprechenden Molekulargewichtsbereich zu finden waren. Es war jedoch nicht möglich, diese Banden durch Massenspektroskopie zu identifizieren. Die Interaktion von She4p mit den nukleolären Proteinen konnte z.B. für Cbf5p in der Immunpräzipitation nachgewiesen werden.

Was aber könnte ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein, das die Interaktion zwischen Myosin-Motordomänen und dem Aktinzytoskelett vermittelt, mit nukleolären Proteinen zu tun haben? Die Isolation von Hefekernen zeigte eindeutig, dass sich She4p am oder im Kern befindet, obwohl sich dies mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie nicht bestätigen liess. Es ist jedoch möglich, dass She4p nur zu bestimmten Zeitpunkten oder unter bestimmten Bedingungen im Kern akkumuliert. Zum Beispiel reichert sich das RNA-Bindeprotein She2p erst dann zu sichtbaren Mengen im Kern an, wenn man den mRNA-Export blockiert (Kruse et al., 2002). Es ist nicht ausgeschlossen, dass She4p auch im Kern Myosin-Aktin-Interaktionen vermittelt, da auch innerhalb des Kerns viele Transport- und Lokalisationsprozesse stattfinden. Bereits 1982 gab es Hinweise auf das Vorhandensein von Aktin in der Kernmatrix, da es bei Kernaufreinigungen und Kernmatrixfraktionierungen detektiert werden konnte (Capco et al., 1982; Nakayasu and Ueda, 1983). Zunächst wurde die

Entdeckung von Aktin im Kern als Kontamination während der Präparation abgetan. Mit Hilfe sensiblerer Techniken wie *in vivo* cross-linking oder Ultrastrukturanalysen permeabilisierter Kerne konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Aktin mit filamentösen Strukturen im Kern kolokalisiert (Nakayasu and Ueda, 1985). Die Konzentration von Aktin im Kern wird über zwei Export-Signale im Protein (Wada et al., 1998), sowie zwei *Shuttle*-Systeme reguliert. Exportin-6 vermittelt den Export eines Profilin-Aktin Komplexes (Stuven et al., 2003), wohingegen ein Cofilin-Shuttle Aktin in den Kern transportiert (Pendleton et al., 2003). Mittlerweile gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung von Aktin an verschiedenen nukleären Prozessen wie z.B. Transkription, mRNA-Export oder Chromatin-Remodeling (Bettinger et al., 2004). Es wird vermutet, dass nukleäres Aktin nicht in der filamentösen cytoplasmatischen Form vorliegt, da es sich nicht durch Phalloidin-Färbung, sondern durch einen monoklonalen Antikörper (2G2) nachweisen lässt, der nur G-Aktin erkennt (Gonsior et al., 1999). Neben Aktin selbst wurden ausserdem noch Aktin-verwandte und Aktin-bindende Proteine im Kern nachgewiesen (Shumaker et al., 2003). Es wäre durchaus möglich, dass She4p neben der Aktinbindedomäne im Myosinmotor auch Interaktionsdomänen in anderen Aktin-bindenden Proteinen beeinflusst.

In tierischen Zellen konnte eine nukleäre Isoform von Klasse I Myosin (NMI \square) identifiziert werden, die über ein alternatives Startcodon hergestellt wird und sich dadurch am N-Terminus durch 16 zusätzliche Aminosäuren von der zytoplasmatischen Form unterscheidet (Pestic-Dragovich et al., 2000). Dieses Myosin scheint einen Einfluss auf die Funktion der RNA-Polymerase II zu haben, da es mit dieser kolokalisiert und koimmunpräzipitiert. Spezifische Antikörper gegen NMI \square inhibieren sogar *in vitro* die RNA-Synthese. Mit einer kürzlich erschienen Veröffentlichung kam dann der Nachweis für einen Aktin-Myosin-Komplex auf aktiv transkribierten Genen (Fomproix and Percipalle, 2004). Die Autoren konnten zeigen, dass Aktin und Klasse I Myosin NM1 in einem Komplex vorliegen, der indirekt oder transient mit der RNA-Polymerase I im Nukleolus interagiert. Die Inhibierung der ATPase Aktivität von NM1 hat einen 50-70% Abfall in der rDNA Transkription zur Folge. Es wäre durchaus möglich, dass She4p auch in diesem Fall die Interaktion zwischen der Motordomäne und dem Aktin vermittelt, da das nukleäre NM1 sich nur durch die 16 zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus von der zytoplasmatischen

unterscheidet und somit die gleichen Motorbindestellen aufweisen müsste. Die RNA-Polymerase I synthetisiert ein 35S rRNA Transkript, aus dem die ribosomalen 24S/28S, 5.8S und 18S rRNAs hergestellt werden, die während und nach der Synthese mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren und als Preribosomen ins Zytoplasma transportiert werden (Tschochner and Hurt, 2003). Es ist nicht auszuschliessen, dass She4p die ribosomalen Proteine, welche im GST *Pulldown* identifiziert wurden, indirekt über ein nukleäres Myosin präzipitiert, das mit der RNA Pol I interagiert. Die RNA Pol I würde dann über die 35S rRNA die nukleolären Proteine kopräzipitieren. Dies würde auch erklären, warum z.B. keine Interaktion zwischen She4p und Nop1 mit Hilfe der Immunpräzipitation festgestellt wurde.

Die 35S rRNA ist der Vorläufer für die spätere 25S, 18S und 5.8S rRNAs. Diese werden durch zahlreiche Modifikationen wie z.B. Pseudouridylierung durch Cbf5p oder verschiedene Spaltungen durch Endo- und Exonukleasen hergestellt. Die identifizierten Proteine Nop1p, Nop58p, Rrp5p und Utp10p bilden zusammen mit vielen anderen ribosomalen Proteinen und der 35S rRNA das *Processosome* der kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU) (Dragon et al., 2002). Sie gehören alle zu den BoxC/D U3 snoRNPs, eine Proteinfamilie, die mit der kleinen nukleolären U3 RNA (snoRNA) assoziiert ist. Diese *guide* RNA ist zu bestimmten Sequenzen in der pre-rRNA komplementär und leitet somit die Proteine zu dem Ort ihrer Funktion. Cbf5p interagiert nicht mit der U3 snoRNA, sondern mit verschiedenen Box H/ACA snoRNAs und vermittelt die Pseudouridylierung der 35S rRNA (Lafontaine et al., 1998), wohingegen Nop1p für die 2'-O-Ribose-Methylierung verantwortlich ist (Galardi et al., 2002). Mit Hilfe der Immunpräzipitation wurde die Interaktion mit She4p bestätigt. Es könnte sein, dass She4p am Zusammenbau der Komplexe für die Prozessierung der ribosomalen RNA beteiligt ist. Prof. Dr. David Tollervey vom Wellcome Trust Zentrum für Zellbiologie in Edinburgh hat jedoch festgestellt, dass ein *she4Δ* Stamm keinen Defekt in der Prozessierung der rRNA aufweist (persönliche Mitteilung). Mit Hilfe der Cbf5p-TAP-TAG-Analyse wurde untersucht, ob sich die Zusammensetzung der kopräzipitierten Banden in einem *she4Δ* Stamm vom Wildtyp unterscheidet. Die Methode erlaubt die native Aufreinigung und Bestimmung von Proteinkomplexen. Es konnte jedoch keine Veränderung im Muster der Bindungspartner von Cbf5p in einem *she4Δ* Stamm festgestellt werden. Der Prozessierungskomplex scheint also auch im *she4Δ* Stamm intakt zu sein. Wenn

She4p also an der Prozessierung beteiligt ist, hat es keinen essentiellen Einfluss darauf.

Eine andere Erklärung für die Präzipitation dieser nukleolären Proteine könnte die Vermittlung des Transports der U3 snoRNA durch die verschiedenen Kompartimente des Kerns der Hefe sein (Verheggen et al., 2002; Verheggen et al., 2001). Der Vorläufer für die U3 snoRNA wird im Nukleoplasma transkribiert und prozessiert. Anschliessend wird die U3 snoRNA in die Cajal bodies transportiert und assoziiert dort mit Proteinen, die das Box C/D Motiv erkennen, wie z.B. Nop1p und Nop58p. Danach werden die U3 snoRNPs in den Nukleolus transportiert. Das Protein Nsr1p (Nucleolin) ist für den Transfer von U3 snoRNA Komplexen und der Box C/D U14 snoRNA von den Cajal bodies in den Nukleolus zuständig (Verheggen et al., 2001). Auch dieses Protein konnte im She4p *Pulldown* identifiziert werden. Man könnte sich daher vorstellen, dass She4p am Transport verschiedener snoRNPs innerhalb des Kerns beteiligt ist. Neben dem Transport der U3 snoRNA vermittelt Nucleolin in tierischen Zellen die Interaktion zwischen dem U3 snoRNP und der pre-rRNA (Ginisty et al., 1998). Es ist also wie die anderen identifizierten Proteine an den ersten Prozessierungsschritten der rRNA beteiligt.

Es könnte jedoch auch möglich sein, dass She4p mit den ribosomalen Proteinen im Zytoplasma interagiert, da zahlreiche Komponenten der U3 snoRNA Komplexe in HeLa Zellen zwischen Zytoplasma und Kern pendeln. Dazu gehören unter anderem Nop1p, Nop58p und Nsr1p (Borer et al., 1989; Leary et al., 2004). Das Pendeln dieser Proteine findet unabhängig von Synthese und Export preribosomaler Partikel statt. Es ist daher möglich, dass es eher der Regulation der U3 snoRNPs dient, oder den Ribosomen-Export moduliert. Welchen Einfluss She4p auf die nukleolären Prozesse und Proteine hat und ob eine mögliche Interaktion überhaupt innerhalb des Kerns stattfindet, ist absolut unklar und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Das Vorhandensein einer Klasse I Myosin-Isoform innerhalb des Kerns tierischer Zellen ist jedoch eine gute Voraussetzung dafür, dass auch She4p eine Rolle bei der Transkription oder der Ribosomen-Synthese haben könnte.

3.5. Ein Modell für die Funktion von She4p in *Saccharomyces cerevisiae*

Mit Hilfe der Ergebnisse verschiedener Publikationen und den Daten dieser Arbeit lässt sich ein hypothetisches Modell der She4p Funktion erstellen (Abb.3.5.). Das UCS-Protein der Hefe scheint ein neuartiges Protein zu sein, dass mit der Motordomäne von Myosinen interagiert und als lokalisierter Regulator für die Funktion der Myosine verantwortlich ist. Über die konservierte C-terminale UCS-Domäne interagiert She4p mit Myosinen der Klasse I und V und ermöglicht dadurch die Lokalisation von Myo3p, Myo4p und Myo5p. Es gibt auch Hinweise auf eine mögliche Interaktion mit Myo1p (Toi et al., 2003). Der She4p-bindende Bereich in den Motordomänen der verschiedenen Myosine enthält Teile der Aktinbindedomäne (Toi et al., 2003; Wesche et al., 2003). Mit Hilfe eines Aktin *Pelleting* Assays wurde gezeigt, dass Klasse I Myosine in einem *she4Δ* Stamm nicht in der Lage sind, über die Motordomäne an Aktin zu binden.

In welcher Weise She4p diese Interaktion vermittelt, ist weiterhin unbekannt. Das *C. elegans* Homolog UNC-45 bindet ebenfalls über seine UCS-Domäne die Motordomäne von Myosinen (Barral et al., 2002). Als mögliches Chaperon für die Motordomäne verhindert UNC-45 alleine, oder als Kochaperone zusammen mit Hsp90 die thermale Aggregation des S1-Fragments von Klasse II Myosin. Es wäre daher möglich, dass die UCS-Proteine über ihre UCS-Domäne die Faltung oder Integrität der Motordomäne vermitteln und somit ihre Interaktion mit dem Aktinzytoskelett regulieren.

Eine Assoziation von She4p mit dem Hsp90-System ist nicht ausgeschlossen, da trotz der fehlenden N-terminalen TPR-Domäne Hsp90 als Interaktionspartner identifiziert wurde. Ob She4p selbst die Faltung der Motordomäne vermittelt oder als Kochaperone Hsp90 rekrutiert ist unbekannt. Untersuchungen von Rng3p ergaben, dass das Protein nicht nur für die Bildung des Aktomyosinringes, sondern auch für dessen Aufrechterhaltung notwendig ist (Wong et al., 2000). Die UCS-Proteine scheinen daher nicht nur neusynthetisiertes Myosin zu falten, sondern überprüfen ausserdem den aktuellen Status der fertigen Motorproteine.

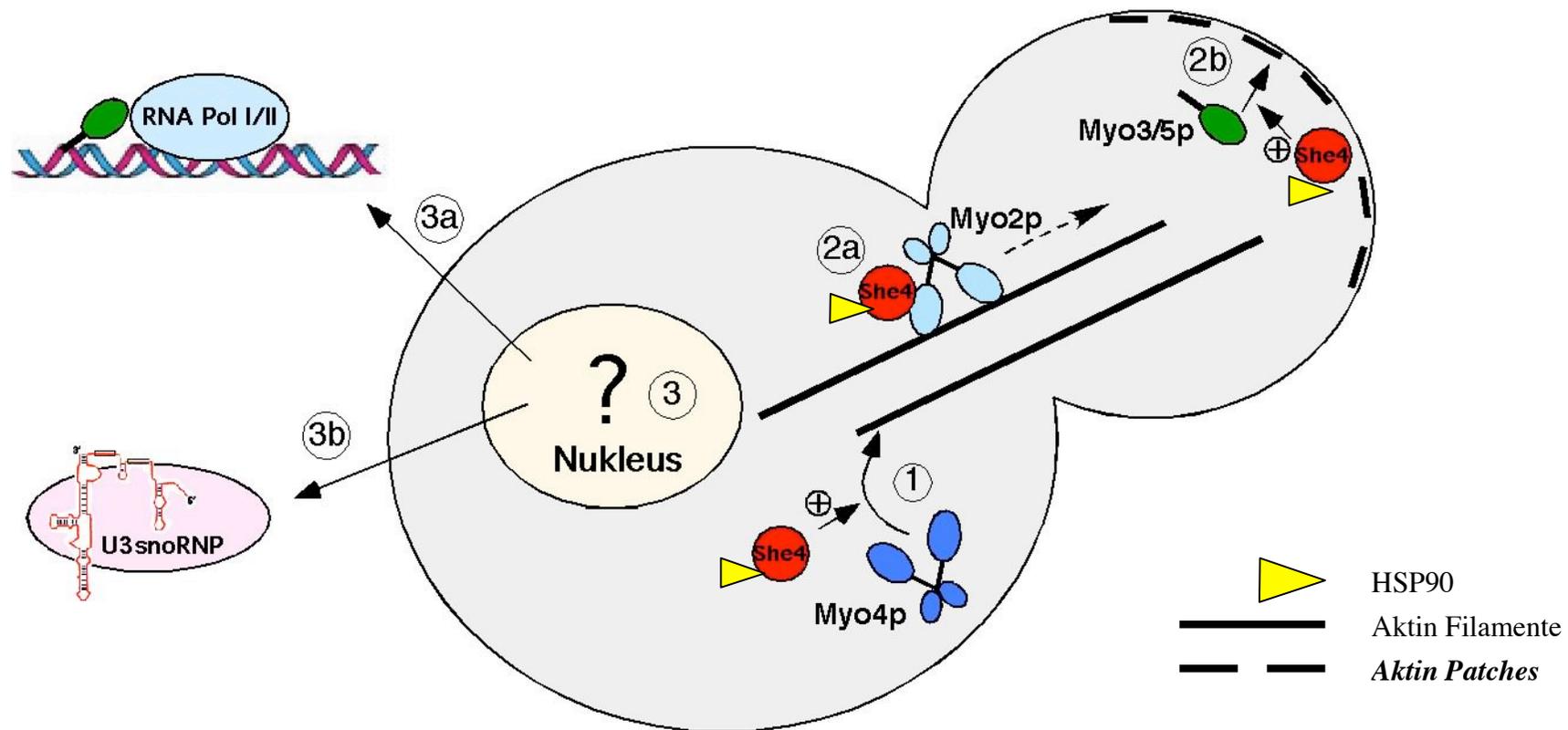


Abb.3.5. Hypothetisches Modell für die Funktion von She4p in der Hefe. Das UCS-Protein She4p interagiert über die C-terminale UCS-Domäne mit der Motordomäne von Myosinen und vermittelt wahrscheinlich zusammen mit dem Hsp90-System deren Faltung in eine funktionelle Konformation. She4p ist für die Lokalisation des Klasse V Myosins Myo4p notwendig. Diese Funktion von She4p ist unabhängig von dessen Akkumulation in der Knospenspitze (1). Mit Hilfe des Klasse V Myosins Myo2p wird She4p zusammen mit anderen Frachten an die Knospenspitze transportiert (2a). Dort lokalisiert vermittelt es die Aktin-Myosin-Interaktion von Klasse I Myosinen Myo3p und Myo5p mit den kortikalen Aktin *Patches*. (2b). Eine nukleäre Funktion von She4p ist rein spekulativ. Z.B. könnte She4p an der Transkription durch die RNA Polymerase I und II (3a) oder an U3 snoRNP vermittelten Prozessen des Kerns beteiligt sein (3b).

Da weder Myo1p, noch Myo2p im *she4Δ* misslokalisieren, scheinen diese Myosine ihre Motordomäne über einen anderen Weg zu falten. Die Spezifität zu den verschiedenen Myosinklassen äussert sich in einem speziellen Verteilungsmuster von She4p. Neben einer homogenen Verteilung im Zytoplasma zeigt She4p auch eine Akkumulation in der Knospenspitze, die von Myo2p abhängig ist. Die Bindung an das Klasse V Myosin scheint daher nicht der Faltung der Motordomäne zu dienen, sondern dem Transport zusammen mit anderen Frachten zum Kortex der Knospe. Dort vermittelt She4p die Interaktion zwischen dem kortikalen Aktinzytoskelett und den Klasse I Myosinen. Für die Lokalisation von Myo4p ist dagegen lediglich funktionelles She4p innerhalb der Zelle notwendig. Es wird angenommen, dass Myo4p als prozessiver Motor durch die Zelle wandert und somit im Gegensatz zu den nichtprozessiven Klasse I Myosinen seinen Regulator überall benötigt. Im N-terminalen Teil von She4p scheint noch eine weitere Myo4p-spezifische Funktion zu liegen, da die Expression der UCS-Domäne nur die Funktion der Klasse I Myosine komplementiert (Toi et al., 2003).

Neben der zytoplasmatischen Funktion von She4p scheint es noch eine nukleäre zu geben, die jedoch noch unklar ist und weiterer Untersuchungen bedarf. Zum einen scheint She4p in einem Komplex mit nukleolären U3 snoRNPs vorzuliegen und zum anderen konnte durch Kernisolationen She4p im oder am Kern nachgewiesen werden. Da in Kernen sowohl Aktin und Myosin wie auch andere Aktin-bindende und Aktin-verwandte Proteine gefunden wurden (Shumaker et al., 2003), ist es nicht ausgeschlossen, dass She4p auch im Kern Interaktionen mit Aktin vermittelt. Zum Beispiel wurde in tierischen Zellen ein Aktin-Myosin-Komplex identifiziert, der für die Funktion der RNA-Polymerase I notwendig ist (Fomproix and Percipalle, 2004). She4p könnte die Interaktion zwischen Myosin und Aktin im Kern vermitteln und somit die Transkription der ribosomalen DNA durch die RNA-Polymerase I unterstützen. Die synthetisierte 35S rRNA assembliert posttranslational mit nukleolären Proteinen und reift abschliessend im Zytoplasma zur kleinen ribosomalen Untereinheit. Da alle identifizierten Proteine eine Funktion in den ersten Prozessierungsschritten der rRNA haben, könnte She4p auch an diesem Prozess beteiligt sein und vielleicht als Assembly den Komplex unterstützen. Eine andere Erklärung wäre, dass She4p den Transport der U3 snoRNA oder U3 snoRNPs durch die verschiedenen Kompartimente des Kern vermittelt, da es ausschliesslich mit U3

snoRNPs interagiert. Die dritte Möglichkeit ist, dass diese U3 snoRNPs ins Zytoplasma *shutteln* und dort mit She4p interagieren. Dies sind jedoch nur Spekulationen, die intensiver Untersuchungen bedürfen.

3.6. Zukünftige Aufgaben

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass She4p die Interaktion zwischen Aktin und Myosin vermittelt. Es müsste nun wie für UNC-45 gezeigt werden, ob She4p selbst Chaperonaktivität aufweist, oder als Kochaperon zusammen mit Hsp90 agiert. Zu diesem Zweck müsste funktionelles She4p aufgereinigt werden und in einem Aggregations-Assay mit den Standard-Substraten BSA oder Citratsynthase getestet werden. Absolute Klarheit würde erst ein Aggregations-Assay mit Myosin-Motordomänen bringen. Dafür müsste jedoch erst eine Methode entwickelt werden, um funktionelle Motordomänen zu synthetisieren. In diesem Fall sollte eine Aufreinigung aus Hefe weiter verfolgt werden. Es müssten Bedingungen gefunden werden, die den Motor in der löslichen Form halten. Vielleicht wäre dabei eine Überexpression der leichten Ketten und She4p hilfreich. Da die Motordomänen eine hohe Konservierung aufweisen, könnte man eventuell auch das Muskelmyosin S1 Fragment verwenden, welches Barral et al. für ihre Assays eingesetzt haben (Barral et al., 2002). Sollte She4p eine Chaperonaktivität aufweisen wäre die nächste Fragestellung, ob diese Aktivität ko- oder posttranslational benötigt wird. Eine weitere interessante Frage ist die Spezifität von She4p für die verschiedenen Myosine. Zu diesem Zweck müssten die interagierende Reste sowohl in der UCS-Domäne wie auch in den Motordomänen genau lokalisiert werden. Da der N-terminalen Teil des Protein eine Funktion in der Myo4p, aber nicht der Myo3/5p Lokalisation aufweist, muss auch in diesem Teil des Proteins eine spezifische Funktion für die Klasse V Myosine verborgen sein. Weitere Bindungsstudien könnten mit Myosinen aus anderen Organismen durchgeführt werden, um die Konservierung der Interaktion mit der Motordomäne zu untersuchen. Zusätzlich dazu könnte getestet werden, ob z.B. ein anderes UCS-Protein aus Pilzen wie Rng3p Myosine in *S. cerevisiae* bindet und wenn ja, welche.

Weiterer Untersuchung bedarf auch der Myo2p-abhängige Transport von She4p in die Knospenspitze. Es ist noch nicht geklärt, ob She4p auch mit der Motordomäne von Myo2p interagiert und wenn ja, warum ist es dann nicht für dessen funktionelle Faltung zuständig? Mit Hilfe von GFP-markiertem She4p könnte man in Wildtyp-Zellen die Dynamik dieses Transportes untersuchen. Bis jetzt ist es jedoch nicht gelungen, eine funktionelle She4p-GFP-Fusion zu erzeugen. Die genomische Integration des GFP-Tags am N-Terminus führte zu einer Misslokalisierung von She4p-GFP. Exprimiert man GFP-She4p über den starken *NOPI*-Promotor kommt es zu dem gleichen Ergebnis und mit dem *SHE4*-Promotor wird keine nachweisbare Proteinmenge synthetisiert. Vielleicht würde die Expression über einen mittelstarken Promotor wie den *MET*-Promotor zu einem positiven Ergebnis führen. Neben der Dynamik des She4p Transports wäre auch die Kinetik der Misslokalisierung der Klasse I Myosine in einer *myo2-66* Mutante nach Erhöhung der Temperatur interessant.

Rein spekulativ ist weiterhin eine mögliche Funktion von She4p bei Prozessen innerhalb des Kerns. Mit Hilfe der Kernextrakte wurde gezeigt, dass She4p innerhalb oder direkt am Kern vorkommt. Die Interaktion mit den nukleolären Proteinen müsste in weiteren Bindungsanalysen wie z.B. Two-Hybrid untersucht werden. Sollte She4p wirklich innerhalb des Kern vorkommen, kann dies eventuell durch die Verwendung verschiedener Kernexport-Mutanten sichtbar gemacht werden. Es wäre auch interessant zu sehen, ob das *shuttlen* der U3 snoRNPs innerhalb der Kerns oder vom Kern ins Zytoplasma im *she4Δ* eine Veränderung zeigt. Ungeklärt ist auch weiterhin, ob She4p tatsächlich mit Hsp90 interagiert. Eine Möglichkeit wäre, die Interaktion über das Two-Hybrid-System zu überprüfen, da dies *in vivo* geschieht und nicht unter *in vitro* Bedingungen, die zu einer partiellen Denaturierung von She4p und somit zu einer Bindung von Hsp90 führen könnten.

Sollte sich herausstellen, dass die UCS-Proteine zusammen mit dem Chaperon-System tatsächlich die Faltung oder Integrität der Myosinmotordomänen gewährleisten, ist es durchaus denkbar, in Zukunft rekombinant Myosine zu synthetisieren.

4. Material

4.1. Laborausstattung

Akku-Jet	Neolab, Heidelberg
Analytische Waage	Sartorius Universal
Autodiagnostiekassetten	Sigma, Deisenhofen
Fluoreszenzmikroskop Olympus	Olympus
Konfokales Mikroskop TLC100	Leica
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick
Gel-Elektrophoreseapparaturen	ZMBH
Gel-Fotoausdruck Video Copy Processor	Mitsubishi
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop Labovert	Leitz
Magnetrührer	Janke & Kunkel
Mikrowellenherd	Bosch
Netzgerät Desatronic 500/400	Desaga
PCR-Maschine	Biometra
PCR-Maschine	MWG
Pipetman Gilson P2, P10, P200, P1000	Abimed
Rotoren SS-34, GS-3, GSA	DuPont
Schüttelinkubatoren	New Brunswick
Tischzentrifuge	Heraeus
Timer	Neolab
Ultrazentrifuge	Beckmann
Vortex	Neolab
Wasserbad	Julabo
Douncer 7ml, 60ml	Neolab
Pulverisette 6	Fischer

4.2. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Roth
Objektträger	Roth
Hybond-P	Amersham
ECL Hyperfilm	Amersham
Nagellack	Jade
Pipettenspitzen	Steinbrenner
ProteinG-Sepharose	Amersham
Glutathion-Sepharose	Amersham
CL4B-Sepharose	Pharmacia
Calmodulin-Sepharose	Stratagene
BSA	Sigma
LDH	Sigma
Katalase	Sigma
Reaktionsgefäße 1.5ml, 2ml	Sarstedt
PCR-Reaktionsgefäße 0.5ml	Biozym
Impfösen	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Beckmann
Human-Platelet non-muscel Aktin	Tebu

4.3. Antikörper

3F10; Maus-Anti-HA	Roche
16B12; Maus-Anti-HA	Convance
9E10; Maus-Anti-Myc	(Evan et al., 1985)
Anti-Maus-IgG-Meeretich-Peroxidase	Dianova
Anti-Ratte-IgG-Meeretich-Peroxidase	Dianova
Anti-Kaninchen-IgG-Meeretich-Peroxidase	Dianova
Alexa-Fluor-488 Kaninchen-Anti-Maus-IgG	MoBiTec
Alexa-Fluor-488 Ziege-Anti-Ratte	MobiTec

Alexa-Fluor-546 Esel-Anti-Ratte-IgG	MobiTec
Alexa-Fluor-488 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	MobiTec
Alexa-Fluor-546 Kaninchen-Anti-Maus-IgG	MobiTec
Kaninchen-Anti-Myo2p-Motordomäne-IgG	Samara Reck-Petersen
Kaninchen-Anti-Rli1p	Birgit Märtens
MAB1501R; Maus-Anti-Aktin	Chemicon
MAB414; Maus-Anti-Nuklear Pore Complex	Convance
PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase Konjugat)	Sigma
IgG-Sepharose	Amersham Pharmacia

4.4. Molekularbiologische Baukästen (Kits)

Nucleobond AX 100 Midiprep Kit Machery&Nagel
 QIAquick Gel Extraction Kit Quiagen, Hilden
 QIAprep Spin Miniprep Kit Quiagen, Hilden
 QIAquick PCR Purification Kit Quiagen, Hilden
 Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen

4.5. Enzyme

Akalische Phosphatase	Roche, Mannheim
CIP (Calf intestinal phosphatase)	Roche, Mannheim
DNaseI (RNase-frei)	Roche, Mannheim
Lysozym	Biomol
Platinum- <i>Pfx</i> -Proofreading Polymerase	Invitrogen
Restriktionsenzyme	New England BioLabs (NEB)
RNase A	Roche, Mannheim
Quick-T4-DNA-Ligase	NEB
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs
Zymolase 100.000T	ICN

Zymolase 20.000T	ICN
Apyrase	Sigma
TEV-Protease	Invitrogen

4.6. Oligonukleotide

4.6.1. Primer für die Klonierung von GST-She4p in pETM30

Primer für die Amplifizierung von She4p

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 841	GCGAATTCTTAGACTTTAATTTTAGC
RJO 1280	TTTTTCCATGGCACTGTGTGAGAAAGGG

4.6.2. Primer für die Epitopmarkierung

Primer für C-terminales She4p "tagging" mit 3xHA, 6xHA, 3xMyc ("Schiebel-Tagging")

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 911	CAGAGTTTTTCAGCGGCAATCCCGTTATCCTTGCTA
RJO 913	ATTTCTTAGTGAAAATTAAGAAGAGTTAAACATGGC

Primer für die Herstellung von She4 Δ UCSp "tagging" mit 3xHA, 6xHA, 3xMyc ("Schiebel-Tagging")

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1101	GGTCTACGCCAGTGGATGACAATCCGTTACATAACGACCGTA CGCTGCAGGTCGAC
RJO 1102	GCTAATAGTGCCTCGTAATTGTCTGTCAGCTTTATTTGTTTCAT CGATGAATTCGAGCTCG

Primer für C-terminales Myo1p “tagging” mit 6xHA, 3xMyc (“Schiebel-Tagging”)

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1026	CTCGAAAAATATTGATAGTAACAATGCACAGAGTAAAA TTTTCAGCGTACGCTGCAGGTCGAC
RJO 1027	AAATAAAGGATATAAAGTCTTCCAAATTTTTAAAAAAA GTTCGTATCGATGAATTCGAGCTCG

Primer für C-terminales Myo2p “tagging” mit 6xHA, 3xHA, 3xMyc (“Schiebel-Tagging”)

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1028	ATAGTTGACCTTGTTGCCCAACAAGTCGTTCAAGACGGCCAC CGTACGCTGCAGGTCGAC
RJO 1029	TTTTTTTAGCATTTCATGTACAATTTTGTTCCTCGCGCCATCAGT TATCGATGAATTCGAGCTCG

Primer für C-terminales Myo3p “tagging” mit 6xHA, 3xMyc (“Schiebel-Tagging”)

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1030	GCTGACGATGATGATAATGACGATGGCGATGATGATGATG ACTGGCGTACGCTGCAGGTCGAC
RJO 1031	AACCATTCTATAAGAGACTAAACATCTATATATTCATGTTA AATCGATGAATTCGAGCTCG

Primer für C-terminales Myo4p “tagging” mit 6xHA, 3xMyc (“Schiebel-Tagging”)

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 547	GAGGGCTTAGCTACTGTCAGTAAAATTATAAAATTAGACAGAAAA CGTACGCTGCAGGTCGAC
RJO 548	ATACATATATACATATATGGGCGTATATTTACTTTGTTTCATCGATG AATTCGAGCTCG

Primer für C-terminales Myo5p “tagging” mit 6xHA, 9xMyc (“Schiebel-Tagging”)

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 909	GAGGCTAACGAAGATGAAGAGGAAGATGATTGGCGTACGCTG CAGGTCGAC
RJO 910	GTATAGAGTATATACTCGCTAAATACATTTTGAATCGATGAAT TCGAGCTCG

Primer die Erzeugung von Myo5 Δ 996p “tagging” mit 9xMyc (“Schiebel-Tagging”)

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1078	GCAACGAGGAGGCCAGTTTCGATTGCTGCAGCCCGTACGCTG CAGGTCGAC
RJO 1079	GCCTAGAAGCCGGGGCGGTGGGAACATGCTGATCGATGAATT CGAGCTCG

Primer für C-terminales Nop1p “tagging” mit 6xHA (“Schiebel-Tagging”)

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1539	GTCGTTGGTAGATACATGAGAAGCGGTTTGAAGAAACGTACGC TGCAGGTCGAC
RJO 1540	CCAGAACTTTTGACTAATTTCTTTATTCAACTTAATCGATGAA TTCGAGCTCG

Primer für C-terminales Cbf5p “tagging” mit 6xHA (“Schiebel-Tagging”)

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1535	GGTGATTCTGAGGAAAAGAAATCTAAGAAATCTAAGAAACG TACGCTGCAGGTCGAC
RJO 1536	CTGTTAAATATATAGGATGAGATGGAGTGATGAGAATCAATC GATGAATTCGAGCTCG

 Primer für C-terminales Cbf5p “tagging” mit TAP

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1735	CTGAAGACGGTGATTCTGAGGAAAAGAAATCTAAGAAATCTA AGAAATCCATGGAAAAGAGAAG
RJO 1736	GCTGTAAATATATAGGATGAGATGGAGTGATGAGAATCATA CGACTCACTATAGGG

 Primer für C-terminales Nop1p “tagging” mit TAP

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1733	CCATTGTATCGTCGTTGGTAGATACATGAGAAGCGGTTTGAAGA AATCCATGGAAAAGAGAAG
RJO 1734	GCAAGCTACCAGAACTTTTGACTAATTCCTTTATTCAACTTAT ACGACTCACTATAGGG

4.6.3. Primer für die Überprüfung der Epitopmarkierung

 Primer für die Überprüfung des C-terminalen She4p “tagging”

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 264	GTGTTTCATTATCAGGGTGCTG
RJO 1467	CGGAGACCTCTGATGGTG

 Primer für die Überprüfung des C-terminalen Myo1p “tagging”

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1174	GCGCTACAGATATCAAACGCAGC
RJO 1235	GGATACGGGGTGAAAGAGTTCATGCC

 Primer für die Überprüfung des C-terminalen Myo2p “tagging”

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1175	CCGCTAAGCTACTGCAAGTCCG
RJO 1236	GCTAACGCTCATCGGTTCCCG

Primer für die Überprüfung des C-terminalen Myo3p "tagging"

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1176	CCCCATGGGCCAACCAAAGGATCCG
RJO 1237	GTGGGAGTTTTTCAAACGGG

Primer für die Überprüfung des C-terminalen Myo4p "tagging"

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1177	GCATGCTTCAGCCCACATCGAGATCTTCG
RJO 1238	GGGAGCTTCCAATGTAGTGTAGG

Primer für die Überprüfung des C-terminalen Myo5p "tagging"

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1178	CAGGATATCATGCTAGTTCCTCGC
RJO 1239	GGCAATAACAAGTGGGGGTTACGCC

Primer für die Überprüfung des C-terminalen Nop1p "tagging"

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1545	GCAGATGTTGCCAGCCTGATCAAGC
RJO 1546	GCTTGCTCTTAACAATTAATGACC

Primer für die Überprüfung des C-terminalen Cbf5p "tagging"

Name	Sequenz (5'-3')
RJO 1541	GGCCGTGTTAACGAAAACACCCC
RJO 1542	GTCATGAAATTCGTCAATGGCC

4.7. Vektoren und Plasmide

4.7.1. Vektoren

pETM30	EMBL (G.Stier)
YCplac111	(Gietz and Sugino, 1988)
PYM Serie	(Knop et al., 1999)

4.7.2. Plasmide

pRJ 93	genomischer Klon (5600 bp) in YCplac111; enthält <i>SHE4</i> mit flankierenden Regionen
pRJ 276	pYM2 (Knop et al., 1999)
pRJ 277	pYM3 (Knop et al., 1999)
pRJ 279	pYM5 (Knop et al., 1999)
pRJ 280	pYM6 (Knop et al., 1999)
pRJ 292	pBS1479 "TAP-TAG vector" (Rigaut et al., 1999)
pRJ 756	p1746, Myo3-GFP (Evangelista et al., 2000)

4.7.3. Für diese Arbeit erzeugte Plasmide

pRJ 792	GST-She4p. Das She4p PCR-Fragment wurde mit den Primern RJO 841/1280 aus Plasmid pRJ93 amplifiziert und durch EcoR1/BamH1-Verdau in pETM-30 kloniert.
---------	---

4.8. Bakterienstämme

E.coli BL21 Stratagene
E.coli TOP10

4.9. Hefestämme

W303a *Mata; ade2; trp1-1; can1-100, leu2-3; his3-11,15; ura3; GAL; psi⁺*
W303□ *Mat□; ade2; trp1-1; can1-100, leu2-3; his3-11,15; ura3; GAL; psi⁺*

Alle verwendeten Stämme sind Derivate von *Saccharomyces cerevisiae* W303. Die Abweichungen von diesem genetischen Hintergrund werden gesondert erwähnt.

Name	Genotyp
77	<i>Mat □, she1::URA3 (myo4::URA3)</i>
214	<i>Mat a, myo2-66</i>
311	<i>Mat □, she4::URA3</i>
358	<i>Mat a</i>
361	<i>Mat a, his1</i>
362	<i>Mat □, his1</i>
369	<i>Mat a, pep4::LEU2, bar1::hisG</i>
530	<i>Mat a, SHE3-myc6, MYO4-HA6 (in C-term. of MYO4 gene), omnc pep4::URA3</i>
599	<i>Mat a, SHE3-myc6, MYO4-HA6 (in C-term. of MYO4 gene), omnc pep4::URA3, she4::HIS3MX6</i>
614	<i>Mat a, pep4::URA3, Myo4head-myc9::klTRP1</i>
1054	<i>Mat □, MYO4-HA6::HIS3MX6</i>
1280	<i>Mat a, myo5D::TRP1 (Marie-Isabel Geli)</i>
1338	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA3::HIS3MX6</i>

Name	Genotyp
1340	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA6::klTRP1</i>
1367	<i>Mat a, MYO5-myc9::klTRP1</i>
1380	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA3::HIS3MX6, MYO5-myc9::klTRP1</i>
1396	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA3::HIS3MX6, MYO4-myc9::klTRP1</i>
1535	<i>Mat [], she4::URA3, MYO2-HA3::HIS3MX6</i>
1536	<i>Mat a, MYO2-HA3::HIS3MX6</i>
1549	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA6::klTRP1, MYO4-myc3::HIS3MX6</i>
1550	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA6::klTRP1, MYO3-myc3::HIS3MX6</i>
1556	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA6::klTRP1, MYO2-myc3::HIS3MX6</i>
1582	<i>Mat a, pep4::LEU2, bar1::hisG, MYO3-HA6::k.l Trp1</i>
1583	<i>Mat [], she4::URA3, MYO3-HA6::kl Trp1</i>
1584	<i>Mat a, pep4::LEU2, bar1::hisG, MYO5-HA6::k.l Trp1</i>
1586	<i>Mat [], she4::URA3, MYO5-HA6::kl Trp1</i>
1630	<i>Mat a, myo5D::TRP1, SHE4-HA3::HIS3MX6</i>
1631	<i>Mat a, pep4::LEU2, bar1::hisG, MYO1-HA6::klTRP1</i>
1632	<i>Mat [], she4::URA3, pep4::LEU2, MYO1-HA6::kl TRP1</i>
1644	<i>Mat a, pep4::LEU2, bar1::hisG, SHE4ΔUCS-HA6::klTRP1</i>
1725	<i>Mat a, pep4::URA3, Myo4head-myc9::klTRP1, SHE4-HA3::HIS3MX6</i>
1731	<i>Mat a, MYO4-HA6 (C-term. of MYO4), SHE4ΔUCS-myc3::HIS3MX6</i>
1732	<i>Mat a, pep4::LEU2, bar1::hisG, MYO3-HA6::klTRP1, SHE4-UCS-myc3::HIS3MX6</i>
1733	<i>Mat [], pep4::URA3, She4-HA6::klTRP1, MYO1-myc3::HIS3MX6</i>
1747	<i>Mat [], MYO5-HA6::klTRP1, SHE4-UCS-myc3::HIS3MX6</i>
1760	<i>Mat [], myo4::URA3, SHE4-HA6::klTRP1</i>
1776	<i>Mat a, MYO5-myc9::klTRP1, SHE4ΔUCS-HA3::HIS3MX6</i>
1800	<i>Mat a, SHE4-UCSΔHA6::klTRP1, MYO2-myc3::HIS3MX6, pep4::LEU2</i>
1801	<i>Mat a, SHE4-UCSΔHA6::klTRP1, MYO3-myc3::HIS3MX6, pep4::LEU2</i>
1802	<i>Mat a, SHE4-UCSΔHA6::klTRP1, MYO4-myc3::HIS3MX6, pep4::LEU2</i>

Name	Genotyp
1803	<i>Mat a, myo2-66, SHE4-HA3::HIS3MX6</i>
1807	<i>Mat a, pep4::URA3, She4-HA3::HIS3MX6, MYO5-tail-myc9::klTRP1</i>
1828	<i>Mat a, myo2-66, MYO5-HA6::klTRP1</i>
1830	<i>Mat a, myo2-66, MYO4-HA6::klTRP1</i>
1913	<i>Mata, myo2-66-myc9::klTRP1, SHE4-HA3::HIS3MX6</i>
2005	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA6::klTRP1, NOP1-myc3::HIS3MX6</i>
2006	<i>Mat a, pep4::URA3, SHE4-HA6::klTRP1, CBF5-myc3::HIS3MX6</i>
2131	<i>Mat a, CBF5-TAP::klTRP1</i>
2132	<i>Mat [], she4::URA3, CBF5-TAP::klTRP1</i>

5. Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Methoden wurden nach allgemeinen oder hefespezifischen Standardverfahren und Standardprotokollen durchgeführt (Adams et al., 1997; Ausubel et al., 1995; Maniatis et al., 1989). Daher werden im Folgenden lediglich Methoden wiedergegeben, die keine Standardverfahren sind oder von bereits veröffentlichten Protokollen abweichen.

5.1. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Hefekulturen wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600nm gegen Medium als Leerwert gemessen. Die optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) von 1 entspricht dabei etwas 2.5×10^7 Zellen.

5.2. Hefetransformation

Die schnelle Hefetransformation ("One step transformation") wurde nach Chen et al. (Chen et al., 1992) durchgeführt, die Hoch-Effizienz-Transformation nach Gietz et al. (Gietz et al., 1995).

5.3. Transformation von DNA in Bakterien

5.3.1. Generierung kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente *E. coli* Zellen für die Hitzeschocktransformation wurden nach Hanahan et al. generiert (Hanahan, 1983).

5.3.2. Hitzeschocktransformation

Etwa 100ng vorgekühlte DNA wurden zu 100 μ l eisgekühlten kompetenten Bakterienzellen gegeben. Die Ansätze wurden vorsichtig mit -20 °C kalten

Pipettenspitzen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90sec und 5min Abkühlung auf Eis wurden 900µl vorgewärmtes LB-Medium (30°C) zugegeben. Die Bakterien wurden dann 60min bei 37°C geschüttelt, mit Hilfe von sterilen Glaskugeln auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.4. Präparation von Plasmid-DNA

Hochreine Plasmid-DNA zur Sequenzierung oder Restriktionsanalyse wurde unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Quiagen) gewonnen. Zur präparativen Isolierung grösserer Mengen an relativ reiner Plasmid-DNA wurde der Nucleobond-AX-100 Midiprep Kit (Machery&Nagel) genutzt.

5.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* und automatisiert amplifizieren (Ehrlich, 1989; Mullis et al., 1986). Zum qualitativen Nachweis von Epitopmarkierungen wurde *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas) verwendet. Die effiziente und möglichst fehlerfreie Amplifikation von DNA-Fragmenten für Epitopmarkierung oder Subklonierung in Expressionsvektoren erfolgte mittels der „Proofreading-Polymerase“ Platinum-*Pfx*-Polymerase (Invitrogen). Für die PCR-Reaktionen wurde folgender Ansatz hergestellt (pro 100µl): 200pmol/Primer, 0,15mM dNTPs, 1xReaktionspuffer, 1mM MgCl₂, 5U Polymerase, 50-200ng DNA. Verwendet wurde ein „Hot Start“-Protokoll, dem vor dem eigentlichen Amplifikationsprotokoll eine vier bis fünf Minuten lange Erhitzung auf 95°C vorausgeht. Erst nach diesem initialen 95°C Schritt wurde die Polymerase zugegeben oder aktiviert. Dem Hot-Start folgen dreissig Zyklen mit einer jeweils einminütigen Denaturierungsphase. Gefolgt wird dies von einer Hybridisierungsphase des Primers an die DNA, das „Annealing“ und eine je nach zu amplifizierenden Fragment variable Extensionszeit zwischen 0,5min und 3min (ca. 1kb

Extension/Minute) bei 68°C (*Pfx*) oder 72°C (*Taq*). Nach Ablauf der dreissig Zyklen wurden in einer 7min andauernden Extensionsphase bis dahin noch nicht komplett synthetisierte Produkte beendet.

5.6. PCR aus Hefekolonien

Die zu testende Kolonie wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze in 30 μ l 0.2% SDS resuspendiert und 4min bei 90°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei voller Leistung wurde der Überstand abgenommen und anschliessend 5 μ l für die PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz:

- 5 μ l 10x colony PCR buffer
- 5 μ l DNA
- 1.5 μ l 50mM MgCl₂
- 1 μ l 10mM dNTP mix
- 10pmoles Primer
- 2 μ l 25% Triton X-100
- 0.3 μ l Taq Polymerase (5U/ μ l)

Mit H₂O auf 50 μ l auffüllen.

5.7. Epitop-Markierung

Für die Epitop-Markierung von Proteinen wurde die von Knop et al. entwickelte Ein-Schritt-Markierung (“one-step-tagging”) verwendet (Knop et al., 1999). Mit Hilfe der PCR wurde ein Epitop-Modul amplifiziert, welches den gewünschten Tag und einen Selektionsmarker trägt. Diese Kasette wurde mit Primern amplifiziert, welche ca. 50bp Homologie zur 5’- bzw 3’-Region der Zielsequenz aufweisen. Das Modul wurde nach der PCR mit dem PCR-Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt und in Wasser aufgenommen. Für die Integration wurde das Modul mit der Hoch-Effizienzmethode in Hefe transformiert und durch homologe Rekombination an die

entsprechende Stelle im Genom integriert. Anschliessend wurden die Zellen auf die entsprechenden Selektivplatten ausplattiert, um positive Transformanten zu selektieren. Die korrekte Integration des Epitops wurde anschliessend durch Western-Blot-Analyse mit dem entsprechenden Antikörper überprüft. Mit Hilfe dieser Methode können auch C-terminale Gendeletionen erzeugt werden

5.8. Mating, Sporulation und Tetradenanalyse

Durch die Verpaarung von haploiden Hefezellen des entgegengesetzten Paarungstypes können Stämme mit neu kombinierten genetischen Eigenschaften hergestellt werden. Ausserdem kann diese Methode für analytische Zwecke eingesetzt werden (z.B. für genetische Interaktion). Zu diesem Zweck wurden die zu verpaarenden Stämme frisch ausgestrichen und am nächsten Tag eine Impfösenzpitze von jedem auf einer YEPD Platte vermischt. Alle 2h wurde mit dem Mikroskop überprüft, ob sich bereits Zygoten gebildet haben. War dies der Fall, wurden die Zellen mit Wasser gemischt und anschliessend mit dem Tetradenmikroskop Zygoten isoliert. Tragen die Stämme unterschiedliche Marker, wurden die Stämme in YEPD gemischt und nach ca. 6h auf der entsprechenden Selektivplatte ausplattiert. Die Zygoten oder Kolonien auf den Selektivplatten wurden anschliessend nochmal auf YEPD-Platten ausgestrichen und einen Tag später eine Impföse auf Sporulationsmedium inkubiert. Nach 3-4 Tagen wurde unter dem Mikroskop nach Tetraden gesucht. Anschliessend wurde eine Impföse voll Zellen in 100 μ l Wasser mit 5 μ l Zymolase 20T (5mg/ml 1M Sorbitol) resuspendiert und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden 10 μ l auf einer YEPD-Platte ausgestrichen und mit Hilfe des Tetradenmikroskops die Tetraden isoliert, wobei die einzelnen Sporen getrennt wurden. Diese Masterplatten wurden dann auf die entsprechenden Selektivplatten gestempelt, um die Verteilung der Marker zu verfolgen. Die Bestimmung des Paarungstyps erfolgt durch Stempeln auf Minimalplatten, auf denen zuvor Testerstämme ausgestrichen wurden, die nur durch Verpaarung mit dem entgegengesetzten Paarungstyp wachsen können und Kolonien bilden.

5.9. Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Für die Überprüfung von korrekten Epitopmarkierungen oder Expressionen wurden Proteinextrakte aus Hefezellen hergestellt. Dazu wurden 2ml einer YEPD-Übernachtskultur abzentrifugiert (10.000g) und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in 200 μ l 2x Laemmli-Puffer (zuvor auf 80°C erhitzt) aufgenommen und 30sec lang gevortext. Nach Zugabe von etwa 100 μ l kleinen Glaskügelchen (0,2mm) wurden die Zellen 1min auf dem Ika-Vibrax-VXR bei maximaler Einstellung aufgebrochen. Anschliessend erfolgte eine Inkubation von 2min bei 95°C und eine einminütige Inkubation auf Eis. Dieser Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Zuletzt wurde der Ansatz noch einmal 1min auf 95°C erhitzt und 2min bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand enthielt das denaturierte Protein gelöst in Laemmli-Puffer und konnte direkt auf ein entsprechendes SDS-Gel geladen oder bei -20°C gelagert werden.

Lösungen:

- 2xLaemmli-Puffer: 100mM Tris-Cl (pH 6.8) , 4% SDS, 2% beta-Mercaptoethanol, 20% Glycerol und 0,002% Bromphenolblau.

5.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Mit Hilfe der SDS-PAGE werden Proteinextrakte im elektrischen Feld nach ihrer Masse aufgetrennt. Durch das verwendete Detergenz SDS wurde dem Protein eine negative Ladung gegeben und durch Erhitzen mit DTT oder Mercaptoethanol denaturiert. Für kleine Gele wurde das Minigel-System "Mighty Small SE260" der Firma Hoefer Scientific verwendet, für grössere ein im ZMBH hergestelltes System (Gelgrösse: 20 x 20 cm). Die Proben wurden vor dem Auftragen im gleichen Volumen 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95°C für 5min inkubiert und dadurch denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 15mA/Gel im Sammelgel bzw. 25 mA/Gel im Trenngel bei Raumtemperatur. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinen durch Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert oder mit Coomassie angefärbt.

Lösungen:

- 2x Laemmli-Puffer: 100mM Tris-Cl (pH 6.8) , 4% SDS, 2% beta-Mercaptoethanol, 20% Glycerol und 0,002% Bromphenolblau.
- 5x Laufpuffer (1l): 15,1g Tris , 72g Glycin , 50ml 10% SDS.
- 10(12)%-Trenngel (40ml): 13,3(16)ml Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 8ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 17,9(15,2)ml bid. H₂O, 400 μ l 10% SDS, 200 μ l 10%APS,18 μ l TEMED.
- Sammelgel (20ml): Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 4ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 12,7ml H₂O, 200 μ l 10% SDS, 100 μ l 10% APS, 15 μ l TEMED.

5.11. NuPAGE (Novex)

Um eine durchgängig schärfere Auftrennung von Proteinen in allen Grössenbereichen zu erreichen, wurde das NuPAGE-Elektrophoresesystem von Novex (Invitrogen) verwendet. In diesem System können Proteine auf 4-12%-Gradientengelen und unter pH-neutralen Bedingungen separiert werden.

5.12. Western Blot

Der Proteintransfer erfolgte nach dem "Semi-dry"-Verfahren auf PVDF-Membran (Hybond P, Amersham Pharmacia) in einer Biometra Semidry Blot Apparatur nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde ein "Sandwich", von unten nach oben, aus drei Filterpapieren (in 1x Semi-dry Transferpuffer getränkt), PVDF-Membran, Polyacrylamidgel und nochmal drei Filterpapieren aufgebaut. Die PVDF-Membran wurde zuvor kurz 3sec in Methanol aktiviert und anschliessend 1min in H₂O gewaschen, während das SDS-Polyacrylamidgel für ca. 10min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 0,8mA/cm² Gelfläche für 2-4h bei Raumtemperatur. Alternativ wurde auch bei 5V-Einstellung über Nacht geblottet. Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran für 5min in 1x PBS gewaschen und dann für 30min-1h in

Blockierungspuffer inkubiert. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockingpuffer für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach zwei 10-minütigen Waschschritten in Waschpuffer und einem weiteren in Blockingpuffer wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper 60min inkubiert und erneut zweimal in Waschpuffer und einmal in 1x PBS gewaschen. Der indirekte Nachweis der Proteine erfolgte durch Zugabe von Chemilumineszenz-Substratlösung (2,5ml/Blot), die von der Meerettich-Peroxidase in ein chemilumineszentes Produkt katalysiert wird. Die Fluoreszenz wurde durch Expositionszeiten zwischen 1min und 30min in einer Autoradiographiekassette auf Amersham-Röntgenfilmen dokumentiert.

Lösungen:

- 10x PBS: 73g NaCl, 24g Na₂HPO₄, 14g NaH₂PO₄, auf 1l mit H₂O, pH7,0 – 7,2
- 10x Semi-dry-Puffer: 30.3g Tris, 144.1g Glycin, 10ml 20% SDS, auf 1l mit H₂O
- Blockingpuffer: 1x PBS, 0,1% Tween, 3% Magermilchpulver.
- Waschpuffer: 1x PBS, 0,1% Tween.
- Chemilumineszenz-Substrat: ECL™ (Amersham Pharmacia)

Primäre Antikörper:

- Maus-Anti-Myc, 9E10, 1:1000 verdünnt
- Ratte-Anti-HA, 3F10, 1:1000 verdünnt
- Anti-ProA, PAP, 1:5000 verdünnt (bereits HRP-gekoppelt)

Sekundäre Antikörper:

- HRP-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen; 1:5000
- HRP-gekoppelter Schaf-Anti-Maus; 1:5000
- HRP-gekoppelter Kaninchen-Anti-Ratte; 1:5000

5.13. Coomassie-Färbung zum Nachweis von Proteinen

Mit Hilfe der Coomassie-Blaufärbung lassen sich Protein ab 200ng pro Bande im SDS-Polyacrylamidgel direkt nachweisen. Die Färbung wurde durchgeführt, um qualitativ und quantitativ die Aufreinigung von GST-Fusions-Protein für den GST *Pulldown* in dieser Arbeit zu kontrollieren. Für die Coomassie-Färbung wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach dem Lauf für 15-30min in Entfärberlösung inkubiert. Danach wurde das Gel für 15-20min in die Coomassie-Färbelösung gelegt und anschliessend kurz mit Wasser gespült. Zuletzt wurde das Gel mit Hilfe der Entfärberlösung 2-3x für 15-20min oder einmal über Nacht entfärbt, bis die Proteinbanden zu sehen sind.

Lösungen:

- Entfärberlösung: 40% Methanol, 10% Essigsäure, 50% H₂O.
- Coomassie-Färbelösung: 40% Methanol, 10% Essigsäure, 49,75% H₂O, 0,25% Coomassie brilliantblau.

5.14. Isolation von genomischer DNA aus Hefe

Über Nacht wurden 5ml Hefekultur in YEPD bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden mit Wasser gewaschen, in 500µl Lysis-Puffer resuspendiert und mit Glaskugeln auf 1.25ml (ungefähr 800 – 1000µl Kugeln) aufgefüllt. Anschliessend wurde der Ansatz 2min gevortext und zentrifugiert (1200g, 3min). Der Überstand wurde abgenommen, mit 275µl 7M Ammoniumacetat (pH7) versetzt und 5min bei 65°C inkubiert. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz mit 500µl Chloroform versetzt und 2min bei maximaler Leistung zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1ml Isopropanol versetzt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei voller Leistung wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl Wasser aufgenommen. Für eine anschliessende PCR wurden 5µl der DNA-Lösung eingesetzt.

Lösungen:

Lysis Puffer: 100mM Tris pH8.0; 50mM EDTA; 1% SDS

5.15. Immunfluoreszenz

5.15.1. Vorbereitung der Zellen

Zunächst wurden Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Kultur fixiert. Hierzu wurden 10 ml Kultur mit 3.7% Formaldehyd versetzt und 1h unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschliessend abzentrifugiert und dreimal mit 1 ml Sphäroblastierungspuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 500µl Sphäroblastierungspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 50µg Zymolase 100.000 und 1µl 2-Mercaptoethanol für 30min bei 30°C sphäroblastiert. Nach der Sphäroblastierung wurden die Zellen für 3min bei 1000g in der Tischzentrifuge (~3000rpm) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml Sphäroblastierungspuffer gewaschen und erneut für 3min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200µl Sphäroblastierungspuffer aufgenommen. Die Zellen konnten direkt für die Immunfluoreszenz verwendet, oder bei -80°C gelagert werden.

Lösungen:

- Sphäroblastierungspuffer: 1,2M Sorbitol, 0,1M Kaliumphosphat (pH7,4), 0,5mM MgCl₂.

5.15.2. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden „Multi-Well“-Objektträger (Neolab) verwendet. Die einzelnen Felder des Objektträgers wurden 5min mit 0,02% Poly-L-Lysin behandelt und anschliessend mit Wasser gewaschen, um ein Anheften der Zellen zu ermöglichen. Auf je ein Feld wurden dann 10µl Zellsuspension gegeben. Nach ca. 5min wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 30µl Blockierungslösung gewaschen, die nach 10min abgesaugt wurde. Die haftenden Zellen eines Feldes wurden dann für 2h bei Raumtemperatur mit 10µl des in Blockierungslösung verdünnten Antikörpers in einer angefeuchteten verschlossenen Schale inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen 3x je 1min mit Waschlösung gewaschen, bevor sie für 1h mit 10µl des in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörper in Dunkelheit und in angefeuchteter Schale inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen 3x 1min mit Waschlösung inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen für 10min mit 0,1µl/

DAPI in 1x PBS behandelt, bevor sie einmal mit 1x PBS gewaschen und mit Decklösung und einem Deckgläschen versiegelt wurden. Bei einer Doppelfärbung wurden die primären, bzw. sekundären Antikörper in einer Blockierlösung vermischt und parallel auf die Zellen gegeben.

Lösungen:

- Blockierlösung: 1x PBS, 1% BSA, 0.05% Na-Azid
- Waschlösung: 1x PBS, 1% BSA, 0.05% Na-Azid, 0,1% Triton-X-100.
- Decklösung: 1x PBS, 80% Glycerin.

Primäre Antikörper:

- Maus-Anti-Myc: 9E10, 1:500 verdünnt
- Maus-Anti-HA: 16B12, 1:500 verdünnt
- Ratte-Anti-HA: 3F10, 1:100 verdünnt

Sekundäre Antikörper (Molecular Probes):

- Alexa488-Anti-Maus, 1:500 verdünnt
- Alexa488-Anti-Ratte, 1:100 verdünnt
- Alexa488-Anti-Kaninchen, 1:500 verdünnt
- Alexa546-Anti-Maus, 1:500 verdünnt
- Alexa546-Anti-Ratte, 1:500 verdünnt
- Alexa546-Anti-Kaninchen, 1:500 verdünnt

5.15.3. Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie erlaubt die Visualisierung bestimmter Schichten in der Zelle, was eine genaue Aussagen über die Lokalisation eines Proteins ermöglicht. Die Herstellung der Zellen, sowie Fixierung und Probenvorbereitung auf den Multi-Well-Objektträgern erfolgte wie bei der Immunfluoreszenz. Unterschiedlich war jedoch die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern bei einer Doppelfärbung. Hierbei wurden die primären und sekundären Antikörper nicht parallel, sondern sequentiell auf die Zellen gegeben. Dies bedeutet, dass z.B. zuerst der primäre Anti-Myc-Antikörper und danach der sekundäre Anti-Maus-Antikörper verwendet wurde. Im Anschluss daran wurde mit dem primären Antikörper des zweiten Epitops (z.B. Anti-HA) und dann mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Anti-Ratte) inkubiert.

Die DAPI-Färbung wurde weggelassen, da das verwendete konfokale Mikroskop keinen UV-Laser hatte.

5.15.4. Aktinfärbung durch Rhodamin-Phalloidin

Das aus dem Pilz *Amanita phalloides* isolierte Toxin Phalloidin bindet spezifisch F-Aktin und stabilisiert die Filamente. Das hier benutzte Phalloidin ist mit dem grünfluoreszierenden Farbstoff Rhodamin gekoppelt und erlaubt somit die Detektion des Aktinzytoskeletts bei einer Wellenlänge von 488nm in der Hefe. Im Gegensatz zum ersten Antikörper in der Immunfluoreszenz wurden 5µl 1:10 verdünntes (in BSA/PBS/NaAzid) Rhodamin-Phalloidin auf die sphäroblastierten Zellen gegeben und 20min inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann mit Decklösung und –gläschen verschlossen.

5.16. Immunpräzipitation

Logarithmisch wachsende Zellen einer 100ml Kultur (OD_{600} 1) wurden abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen in 500µl 2x Breaking Buffer resuspendiert, der ausserdem Protease-Inhibitoren (EDTA-Free, Roche) und 1mM PMSF enthält. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mit 200µl Glaskugeln auf dem Vibrax durch 3 minütiges Schütteln bei 4°C und anschliessender Inkubation von 3min auf Eis. Diese Prozedur wurde 3x wiederholt. Danach wurden die Ansätze 5min, bei 3000rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und 50µl vom Extrakt als Total-Kontrolle für den späteren Western-Blot abgenommen. Für die Immunpräzipitation wurde ProteinG-Sepharose FastFlow (Amersham) verwendet. Um unspezifische Bindung an die Sepharose zu verhindern, wurden die Proteinextrakte zunächst mit CL4B-Sepharose inkubiert (Amersham). Zu diesem Zweck wurden 400µl CL4B-Sepharose-Beads mit 1x Breaking Puffer gewaschen und anschliessend als 50:50 Slurry mit Breaking Puffer verdünnt. 500µl Proteinextrakt wurden dann 30min bei 4°C mit 100µl CL4B-Slurry rotierend inkubiert. Die Beads wurden bei 1000rpm abzentrifugiert und der Überstand mit 5µl 9E10 Antikörper 1h auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die ProteinG-Sepharose mit 1x Breaking Puffer gewaschen

und zu einem 50:50 Slurry verdünnt. Von diesem Slurry wurden 60 μ l zum Proteinextrakt-Antikörper-Gemisch gegeben und 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschliessend wurden die Beads bei 1500rpm abzentrifugiert, dreimal mit 1x Breaking Buffer (+ Protease-Inhibitoren und 1mM PMSF) gewaschen und dann mit 30 μ l 2x Laemmli-Puffer 5min bei 95°C ausgekocht (Pellet-Extrakt). Für die Bindungsanalyse wurden dann 15 μ l des Total- und 8 μ l des Pellet-Extraktes aufgetragen.

Lösungen:

- 2x Breaking buffer: 100mM HEPES, 100mM KOAc, 10mM MgOAc, 0.2% Triton, 10% Glycerol

5.17. Kernisolation aus Hefe (Hurt et al., 1988)

Die Kernisolation wurde nach dem Protokoll von Hurt et al. durchgeführt. Abweichungen und Änderungen sind den Resultaten zu entnehmen. Die Hefezellen wurden in einer 500ml YEPD-Kultur ca. 14h bei 25°C auf OD₆₀₀ 1 angezogen. Angeimpft wurde mit 250 μ l einer stationären Kultur. Die Zellen wurden dann in einem Sorvall GS3-Rotor für 5min bei 3000rpm abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen schüttelnd in 25ml 0.1M Tris-HCl (pH=9.4, 10mM DTT) für 5min bei 25°C inkubiert. Für die anschliessende Sphäroblastierung wurden die Zellen mit 25ml Sphäroblastierungs Puffer (1.2M sorbitol, 20mM KPi, pH=7.4) gewaschen und anschliessend in 25ml Sphäroblastierungs-Puffer resuspendiert, der 5mg Zymolase 20T pro Gramm feuchter Zellen enthielt. Für den Verdau der Zellwand wurde der Ansatz 20min bei 25°C sanft geschüttelt und anschliessend im SS34-Rotor für 5min bei 3500rpm abzentrifugiert. Die Sphäroblasten wurden dann in 10ml Sphäroblastierungs-Puffer gewaschen. Zum Aufreissen der Zellen wurden die Sphäroblasten in 50ml Osmotic-Lysis-Puffer resuspendiert und in einen 60ml Douncer (Neolab) mit losen Pistill überführt. Durch dreimaliges langsames Hoch- und Runterführen des Douncers wurden die Zellen aufgerissen, ohne die Kerne zu zerstören. Zellbruchstücke und intakte Zellen wurden bei 5000rpm im SS34-Rotor für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde für 25min bei 15.000rpm im SS34-Rotor zentrifugiert, was zu einer Auftrennung in drei

Fraktionen führte. Auf dem Ansatz akkumulierten Lipide und Vakuolen, der Überstand (PNS) enthielt das Zytosol und Ribosomen und das post-nukleäre Pellet (NE) enthielt Kerne, Mitochondrien und Membranmaterial. Vom PNS wurde 1ml für die spätere SDS-PAGE aufgehoben und mit 2x Laemmli-Puffer versetzt. Das nukleäre Pellet wurde in 2ml Nuklear-Pellet-Resuspendierung-Puffer aufgenommen, 100 μ l für die SDS-PAGE abgenommen und der Rest in einen 7ml Douncer überführt. Mit einem losen Pistill wurde die Suspension einmal gedounct und anschliessend auf einen 5-stufigen Saccharose-Gradienten (2M, 1.8M, 1.5M, 1.3M, 1.2M Saccharose) in einem SW40-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) gegeben. Dieser Gradient wurde anschliessend 1h bei 25.000rpm zentrifugiert und die Interphasen I bis V (ca. 200 μ l) mit Hilfe von Kanülen und 1ml Spritzen durch die Wand des Zentrifugenröhrchens abgenommen. Anschliessend wurden die abgenommenen Fraktionen mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert: PNS, NE, Interphasen I bis V. Die Kerne befanden sich in den Interphasen III-V und konnten durch Behandlung mit Hoechst 33258 (Sigma) sichtbar gemacht werden. Die Qualität der Kernisolation wurde mit verschiedenen zytoplasmatischen und nukleären Markern überprüft.

Lösungen:

- Spheroblastierungs Puffer: 1.2M Sorbitol; 20mM KPi, pH=7.4
- Alkalischer DDT Puffer: 0.1M Tris-HCl, pH=9.4; 10mM DTT
- Osmotic Lysis Puffer: 18% Ficoll DL-400 (w/v); 0.5mM MgCl₂; 20mM KPi, pH=6.45
- Nuclear pellet resuspension buffer: 0.3 M Saccharose, 16.6% Ficoll; 0.5mM MgCl₂; 20mM KPi, pH=6.45

Puffer für den Saccharose Gradient (jede Stufe enthält 2ml): 2, 1.8, 1.5, 1.3 und 1.2 M

Saccharose in 9 % Ficoll Puffer:

- Puffer A: 9% Ficoll (w/v); 0.5 mM MgCl₂, 20 mM KPi, pH=6.45
- Puffer B: 2 M Saccharose, 9% Ficoll, 0.5mM MgCl₂, 20mM KPi, pH=6.45

Mischung für die verschiedenen Saccharose-Dichte-Stufen:

- 1.8M Puffer A : B = 1 : 9 (v/v)
- 1.5M Puffer A : B = 2.5 : 7.5 (v/v)
- 1.3M Puffer A : B = 3.5 : 6.5 (v/v)
- 1.2M Puffer A : B = 4 : 6 (v/v)

5.18. Aktin *Pelleting* Assay (Geli et al., 2000)

Der Aktin *Pelleting* Assay mit HA-markierten Myo5p wurde basierend auf der Methode von Geli et al. durchgeführt. 7.5×10^8 logarithmisch wachsende Zellen wurden mit Glaskugeln in 1ml 3x EB (1mM PMSF und Proteaseinhibitoren) aufgerissen. Die Extrakte wurden 5min bei 6000g zentrifugiert und anschliessend einer Ultrazentrifugation für 30min bei 100.000g in einem TL100-Rotor unterzogen. Der Überstand wurde mit 10 μ g/ml Human Platelet non-muscle Aktin (TEBU, Frankfurt, Germany) versetzt und 2h auf Eis inkubiert. Aktin-gebundenes Myo5p wurde durch Ultrazentrifugation im TLA45-Rotor 30min bei 45.000rpm pelletiert. Für eine effiziente Myo5p-Ablösung vom Aktin wurde das Pellet in EB-500 (EB mit 500mM K-Acetate und 5mM Mg-ATP) resuspendiert, 1h auf Eis inkubiert und wieder ultrazentrifugiert. Der Überstand enthielt abgelöstes funktionelles Myo5p und diente als Einsatz für die Bindungs-Studie (Total). 50 μ l Aliquots wurden in Eppis mit 45 μ l EB (+5mM ATP und 50 μ g/ml Aktin (Doppelansatz)) oder nur 50 μ l EB gegeben und 2h bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurde zu einem der Aktin-enthaltenen Ansätze 2 μ l Apyrase (0.1U/ μ l, Sigma) gegeben, um eine ADP-abhängige Aktinbindung zu ermöglichen. Der Ansatz wurde 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden alle Ansätze 30min bei 100.000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden einmal mit 100 μ l EB (+ 5mM ATP) gewaschen, jeweils mit und ohne Apyrase-Behandlung (für ADP-abhängige Bindung). Nach einer Zentrifugation bei 100.000g für 30min wurden die Pellets in 30 μ l Laemmli-Puffer aufgenommen und für den Western-Blot weiterverarbeitet.

Lösungen:

- EB-Puffer: 20 mM PIPES pH6.8, 100mM Sorbitol, 100mM K-Acetate, 25mM KCl, 0.5% Triton X-100, 5mM MgCl₂, 0.5mM EGTA

5.19. Glycerolgradient (10-30%)

Bei dem hier beschriebenen Glycerolgradienten handelt es sich um eine Dichtegradientenzentrifugation. Proteine werden nach ihrer Grösse und Dichte aufgetrennt. Eine 100ml Hefekultur wurde bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,8-1 inkubiert, abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen in 600µl 2x Lysis-Puffer (+ Protease-Inhibitoren und 1mM PMSF) resuspendiert und mit Glaskugeln auf dem Vibrax aufgebrochen (3x 3min aufbrechen, zwischendurch 3min auf Eis). Nach einer Zentrifugation von 5min bei 3600rpm wurden 500µl des Überstandes auf den Gradienten geladen. Für die Herstellung des Gradienten von 10% Glycerol bis 30% wurden in SW40-Zentrifugenröhrchen 6ml 30% Glycerollösung mit 6ml 10% Glycerollösung überschichtet und bei -20°C eingefroren. Die Glycerollösungen wurden durch Verdünnung einer 60% Glycerollösung mit Lysis-Puffer hergestellt. Vor der Verwendung wurden die Gradienten langsam auf Eis aufgetaut, wodurch ein linearer Gradient entstand. Als Marker wurde ein Mix von verschiedenen Proteinen hergestellt: 400µl Laktat-Dehydrogenase (LDH, 5mg/ml), 200µl BSA (10mg/ml) und 200µl Katalase (10mg/ml) wurden gemischt und mit Wasser auf 10ml aufgefüllt. Die Lösung wurde anschliessend über Nacht und danach 4h gegen 1x Lysis-Puffer dialysiert. Vom Dialysat wurden 500µl auf den Gradienten aufgetragen. Die Gradienten wurden bei 36.000rpm für 24h bei 4°C zentrifugiert und anschliessend in 500µl Fraktionen von oben beginnend abgenommen. Diese Fraktionen wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert.

Lösungen:

- 2x Lysispuffer: 100mM K-Acetat, 50mM Hepes (pH 7,4), 10mM MgAcetat, 10% Glycerol, 0,2% Triton

5.20. Differentielle Zentrifugation

Eine 100ml Hefekultur wurde bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,8-1 inkubiert, abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen in 20µl Polysomen-Puffer (+ Protease-Inhibitoren und 1mM PMSF) resuspendiert und mit

Glaskugeln auf dem Vibrax aufgebrochen (3x 3min aufbrechen, zwischendurch 3min auf Eis). Der Extrakt wurde dann 2min bei 1200g zentrifugiert, der Überstand (S1) abgenommen und erneut für 20min bei 7000g zentrifugiert. Der Überstand (S7) wurde abgenommen, ein 100 μ l Aliquot aufgehoben und das Pellet (P7) im gleichen Volumen des Überstandes in 1x Polysomen-Puffer aufgenommen (100 μ l Aliquot). Der S7-Überstand wurde dann bei 20.000g für 30min zentrifugiert und anschliessend wieder in Überstand (S20) und Pellet (P20) getrennt, wobei das Pellet im Volumen des Überstandes in Polysomen-Puffer resuspendiert und ein Aliquot abgenommen wurde. Als letztes wurde der S20-Überstand bei 125.000g zentrifugiert und erneut der Überstand und Pellet wie in vorherigen Zentrifugationen behandelt. Anschliessend wurden die Fraktionen S1, S7, S20 und S125 zusammen mit den Pellets P7, P20 und P125 für die SDS-PAGE mit Laemmli-Puffer versetzt und 5min bei 95°C inkubiert.

Lösungen:

- Polysomenpuffer: 20mM Hepes (pH 7.6), 50mM K-Acetat, 5mM Mg-Acetat, 1mM EDTA, 1mM DTT, Protease-Inhibitoren

5.21. GST *Pulldown* Assay

Im Rahmen der Arbeit habe ich nach weiteren Interaktionspartnern von She4p gesucht. Zu diesem Zweck wurde ein GST *Pulldown* Assay verwendet, der die Inkubation von immobilisiertem rekombinanten GST-She4p mit Hefeextrakt und die anschliessende Bestimmung der gebundenen Proteine beinhaltet. She4p wurde in den pETM30-Vektor kloniert, der GST für eine N-terminale Fusion und einen IPTG-induzierbaren Promotor trägt.

5.21.1. Herstellung von GST-She4p

Für die rekombinante Expression von GST-She4p wurde das Plasmid pRJ 792 und zur Kontrolle pETM-30, in kompetente BL21 *E. coli* transformiert. Anschliessend wurde eine Übernacht-Kultur in LB und dem entsprechenden Antibiotikum (Kanamycin) bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag 1:100 in einem Liter LB-Kanamycin angeimpft. Diese Kultur wurde bei 30°C inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ 0.6-0.8 erreicht hatte.

Durch Zugabe von 0.5mM IPTG wurde die Expression von GST-She4p, bzw. GST induziert. Nach zweistündiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen abzentrifugiert und in 10%igen Glycerol schockgefroren (flüssiger Stickstoff). Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Schwenken im 37°C warmen Wasser schnell aufgetaut und mit 15ml HEMG (0.5M NaCl/0.1% NP40) versetzt. Für die Zellyse wurden 100mg Lysozym zugegeben und der Ansatz 30min bei 4°C rotierend inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingefroren und schnell wieder aufgetaut (37°C Wasserbad). Diese Prozedur wurde 3x wiederholt. Danach wurde der Ansatz 3x 30sec mit Ultraschall behandelt und zwischendurch 1min auf Eis gestellt. Die Zellbruchstücke wurden dann im SS34-Rotor bei 18.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde im gleichen Volumen wie der Überstand resuspendiert. Davon, sowie vom Überstand, wurde ein Aliquot für die Analyse der Löslichkeit des GST-Proteins entnommen. Für die Bindung des GST-Proteins wurde 1ml Glutathion-Sepharose Fast Flow Slurry (Amersham) 2x mit 15ml HEMG (0.5M NaCl/0.1% NP40) gewaschen, zum Proteinextrakt gegeben und 2h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschliessend wurden die Beads jeweils 5min 3x mit HEMG (0.7M NaCl/0.1% NP40) und 3x mit HEMG (0.7M NaCl/0.01% NP40) gewaschen. Für die spätere Inkubation mit Hefeextrakt wurden die Beads mit Hefe-Lysispuffer äquilibriert und als 50:50 Slurry in Hefe-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren bei 4°C gelagert. Für die Überprüfung der gebundenen GST-She4p-, bzw. GST-Menge und die Bestimmung unspezifischer Bindung an die Matrix wurden 10µl 50:50 Slurry in 50µl Laemmli-Puffer bei 95°C ausgekocht.

Lösungen:

- 1x HEMG: 25 mM Hepes (pH 7,6), 0,1mM EDTA (pH 8), 12,5mM Mg Cl₂, 10% Glycerol

5.21.2. Herstellung des Hefeextraktes

Die stationäre Übernachtskultur eines Hefe-Wildtypstammes wurde in 2l YEPD auf eine OD₆₀₀ 0.2 angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ 1.0 inkubiert. Die Zellen wurden bei 3000rpm im GS3-Rotor abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und in 20ml Hefe Lysispuffer (+ Proteaseinhibitoren und 1mM PMSF) resuspendiert. Für den Zellaufbruch wurde der Ansatz mit einem halben Volumen an kleinen Glaskugeln

versetzt und bei 4°C 2.5min gevortext und 2min auf Eis inkubiert. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt und anschliessend der Extrakt 5min bei 4000rpm im SS34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde auf vier SW40 Zentrifugenröhrchen verteilt und 30min bei 17.000rpm im SW40-Rotor zentrifugiert. Für die Minimierung der unspezifischen Bindung an Sepharose wurde der Überstand wieder vereinigt und zweimal mit 1ml CL4B-Sepharose Slurry (Amersham) versetzt und 30min bei 4°C rotierend inkubiert. Anschliessend wurden die Beads abzentrifugiert und der Extrakt für den *Pulldown* Assay verwendet.

Lösungen:

- Hefe-Lysispuffer: 50mM HEPES (pH7.5), 1mM EDTA (pH8), 120mM KCl, 1mM DTT

5.21.3. *Pulldown* Assay

Für die Bindungsstudie wurden 600µl GST-She4p, bzw. GST-Slurry (50:50) mit 15-20ml Hefeextrakt versetzt und 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf eine BioRad-Säule gegeben und die Flüssigkeit durch Gravitation abtropfen lassen. Die Beads wurden dann in der Säule 3x mit 20ml Hefe Lysispuffer gewaschen. Für die Elution wurden der Säulenabfluss verschlossen und die Beads mit 1ml Hefe-Lysispuffer (1M KCl) versetzt, um alle Bindungspartner, aber nicht das GST-Protein selbst abzuwaschen. Der Ansatz wurde 10min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei zwischendurch die Beads mit einer Pasteurpipette aufgewirbelt wurden. Danach wurden die Säulen geöffnet und das Eluat aufgefangen. Dies wurde zweimal wiederholt und die drei Eluate anschliessend vereinigt. Für eine Erniedrigung des Salzgehaltes wurde das Eluat mit Wasser auf 10ml aufgefüllt und die Proteine durch Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt. Das Pellet wurde in 50µl Laemmli-Puffer gelöst und 5min bei 95°C inkubiert, auf einem Novex-Gradienten Gel aufgetragen und durch Coomassie-Färbung (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen) analysiert. Zu diesem Zweck wurde das Bandenmuster des GST-She4p- und des GST-Ansatzes verglichen, um unspezifisch gebundene Proteine zu bestimmen. Um ausserdem Abbauprodukte des GST-Proteins zu identifizieren wurde ausserdem der Extrakt der ausgekochen Beads nach der GST-Aufreinigung aufgetragen. Banden, die nur im GST-She4p Ansatz zu finden sind, wurden einer

Massenspektroskopie unterzogen.

5.21.4. TCA-Fällung

Das Eluat wurde mit 10% TCA versetzt und 15min auf Eis inkubiert. Anschliessend werden die ausgefällten Proteine 15min bei 13.000rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 μ l Laemmli-Puffer resuspendiert. Die Säurerückstände führen zu einer Gelbfärbung der Lösung und zu einer verminderten Löslichkeit der präzipitierten Proteine. Zu diesem Zweck wurde die Lösung mit gesättigtem Tris-Puffer versetzt, bis die Gelb- in eine Blaufärbung umschlägt. Dann wurde der Extrakt 5min bei 95°C aufgeköcht und für die Gelanalyse eingesetzt.

5.22. Tandem-Affinitäts Reinigung (Rigaut et al., 1999)

Die Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP) ermöglicht die Aufreinigung nativer Proteinkomplexe. Zu diesem Zweck wurde das zu untersuchende Protein mit dem TAP-Tag fusioniert, welcher zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte erlaubt. Zunächst wurde das Protein mit Hilfe des ProteinA über IgG-Sepharose aufgereinigt und von dieser mit der TEV-Protease abgespalten. Der zweite Reinigungsschritt erfolgt über Calmodulin-Bindeprotein welches Calmodulin-Sepharose bindet. Von dieser wurde der gebundene Komplex eluiert und auf einem Novex Gradientengel analysiert.

5.22.1. Herstellung des Hefeextraktes

Für die Aufreinigung wurde eine 2l Kultur logarithmisch wachsender Hefen auf eine OD₆₀₀ 3-4 bei 30°C angezogen, abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 25ml LB Puffer gewaschen und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Das Pellet wurde schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut und in einem Pelletvolumen LB Puffer (1mM DTT) resuspendiert. Für die Lysis wurde ein Extraktvolumen kleiner

Glaskugeln für den Zellaufbrauch zugegeben. Mit Hilfe der Pulverisette 6 (Fritsch) wurden die Zellen 4x 4min aufgebrochen und das Lysat bei 4.000rpm für 10min zentrifugiert. Die zurückbleibenden Glaskugeln wurden mit 25ml LB gewaschen, erneut zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Anschliessend wurde der Extrakt bei 20.000g im SS34-Rotor zentrifugiert und sowohl die fettige obere Phase wie auch das Pellet verworfen. Der Überstand wurde mit 5% Glycerol versetzt und in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Lösungen:

- 10x LB Puffer: 1M NaCl, 0.5M TrisHCl (pH7.5), 15mM MgCl₂, 1.5% NP40

5.22.2. IgG-Bindung

Für die Bindung über ProteinA wurden 400 μ l IgG-Sepharose Slurry (Amersham) 3x mit LB gewaschen und der Hefeextrakt im 37°C Wasserbad aufgetaut. Die equilibrierten Beads wurden zum Extrakt gegeben und 1h rotierend bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads bei 1.800rpm für 3min abzentrifugiert und der Überstand bis auf ein Restvolumen (ca. 1ml) abgesaugt. Die Beads wurden in diesem Restvolumen resuspendiert und in ein verschlossenes Mobicol mit Filter (M1002, MobiTec) überführt. Das Mobicol wurde mit einer 20ml Spritze verschraubt und geöffnet. Der restliche Überstand floss durch Gravitation ab und die Beads wurden mit 10ml LB (0.5mM DTT) gewaschen. Die Säule wurde wieder verschlossen und die Beads mit 150 μ l LB (0.5mM DTT) und 4 μ l TEV Protease (1mg/ ml) versetzt. Die Spaltung erfolgte rotierend bei einer Inkubation für 1h bei 16°C.

5.22.3. Calmodulin-Bindung

Für Bindung über das Calmodulin-Bindeprotein wurden 500 μ l CMD-Sepharose (Stratagene) mit LB Puffer (2mM CaCl₂, 1mM DTT) gewaschen. Die Beads wurden in ein neues Mobicol überführt und mit 150 μ l LB (4mM CaCl₂, 1mM DTT) versetzt. Für die Elution wurde das Mobicol in ein Eppendorf Gefäss überführt und 1min bei 2000rpm zentrifugiert. Vom Durchfluss wurden 30 μ l für die spätere Gelanalyse abgenommen und 150 μ l auf die CMD-Beads gegeben. Die Inkubation erfolgte rotierend 1h bei 4°C. Danach wurde die Säule mit einer 5ml Spritze verschraubt und

die Beads mit 5ml LB (2mM CaCl₂, 1mM DTT) durch Gravitation gewaschen.

5.22.4. Elution

Die Säule wurde verschlossen und die Beads mit 600 μ l Elutionspuffer versetzt. Der Ansatz wurde dann 10min bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert und anschliessend durch Zentrifugation (2000rpm, 1min) im Eppendorfgefäss eluiert. Die enthaltenen Proteine wurden durch TCA-Fällung präzipitiert und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach dem Gellauf wurden die Bandenmuster mit der Kontrolle verglichen, um unspezifisch gebundene Proteine zu identifizieren.

Lösungen:

- Elutionspuffer: 10mM TrisHCl (pH8), 5mM EGTA

6. Zusammenfassung

Myosine sind molekulare Motoren, die an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Bewegung, Zellteilung oder Polarität beteiligt sind. Ihr Grundaufbau gliedert sich in Motordomäne, Hals- und Schwanzdomäne. Der Motor interagiert ATP-abhängig mit dem Aktinzytoskelett und ist die kraft erzeugende Komponente. Vergleicht man die verschiedenen Myosine miteinander, zeigt der Kopfbereich die höchste Konservierung. An den Motor schließt sich der Halsbereich an, der die Bindestellen für regulatorische Untereinheiten wie z.B. Calmodulin beinhaltet. Der Schwanzbereich dient zum einem der Interaktion mit der transportierten Fracht und zum anderen der Dimerisierung oder Organisation in Filamente. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* findet man fünf Myosine aus drei verschiedenen Klassen. Myo1p ist das einzige Klasse II Myosin und gehört zu den muskelähnlichen Myosinen, die sich in Filamenten organisieren. Myo2p und Myo4p gehören zu den Klasse V Myosinen und vermitteln Prozesse wie Vesikel-Transport, mRNA-Lokalisation und Vererbung von Organellen und Endoplasmatisches Retikulum. Es wird vermutet, dass sie Dimere bilden, die als prozessive Motoren, also eigenständig, durch die Zelle wandern und so ihre Fracht an den Ort ihrer Bestimmung bringen. Myo3p und Myo5p sind in ihrer Funktion redundant und vermitteln als Klasse I Myosine die Endozytose, sowie die Integrität und Polarität des kortikalen Aktinzytoskeletts. Sie liegen als Monomere vor und interagieren über spezifische Domänen in ihren Schwanzbereich mit einer Vielzahl von Proteinen wie z.B. Verprolin oder Komponenten des Arp2/3-Komplexes. Die rekombinante Expression von Myosinen stellt sich als sehr problematisch dar, da sich die Motordomäne nicht spontan in eine funktionelle Konformation falten kann. Verschiedene Publikationen deuten daraufhin, dass für die Faltung dieser Multidomänenstruktur die UCS-Proteine notwendig sind. UCS leitet sich von den Namen der zuerst identifizierten Mitglieder ab (UNC-45 aus *C. elegans*, Cro1p aus *P. anserina* und She4p aus *S. cerevisiae*), welche lediglich die C-terminale UCS-Domäne gemeinsam haben. Für UNC-45 konnte bereits gezeigt werden, dass es über die UCS-Domäne mit der Motordomäne von Muskelmyosin interagiert und als Chaperon dessen thermale Aggregation verhindert. Ausserdem interagiert UNC-45 über eine N-terminale TPR-Domäne mit Hsp90 und über den zentralen Bereich mit Hsp70. Im Rahmen meiner Arbeit wurde

der Einfluss von She4p auf die Funktion der Myosine untersucht. Es wurde gezeigt, dass She4p über die UCS-Domäne mit der Motordomäne von Klasse I und Klasse V Myosinen interagiert und somit die Lokalisation von Myo3p, Myo4p und Myo5p ermöglicht. Mit Hilfe eines Aktin *Pelleting* Assays konnte gezeigt werden, dass die Misslokalisierung der Klasse I Myosine im *she4Δ* Hintergrund durch einen Defekt in der Aktinbindedomäne im Motorbereich verursacht wird. Die Spezifität von She4p für verschiedene Myosinklassen spiegelt sich in der zellulären Verteilung des Proteins wieder. Das UCS-Protein wird Myo2p-abhängig in die Knospenspitze transportiert, um dort die Interaktion zwischen Klasse I Myosinen und dem Aktinzytoskelett zu vermitteln. Im Gegensatz dazu benötigt Myo4p lediglich funktionelles She4p innerhalb der Zelle, da dieses Myosin durch Mutter- und Tochterzelle wandert und somit seinen Regulator überall benötigt. Die Tatsache, ob She4p wie UNC-45 als Chaperon an der Faltung der Motordomäne beteiligt ist, ist weiterhin unklar. Es konnte jedoch in einem *Pulldown* Experiment und einer Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen She4p und Hsp90 festgestellt werden. Es ist daher durchaus möglich, dass She4p als Kochaperon das Hsp90 System zum Myosin rekrutiert, damit die Motordomäne in eine funktionelle Konformation gefaltet wird. Neben der zytoplasmatischen Funktion von She4p scheint es noch eine nukleäre zu geben, da im *Pulldown* Experiment zahlreiche Proteine gefunden wurden, die Teil des Processosomes der kleinen ribosomalen Untereinheit sind und im Nucleolus lokalisieren. Die Funktion von She4p in diesem Prozess ist noch unbekannt.

7. Referenzen

- Anderson, B.L., Boldogh, I., Evangelista, M., Boone, C., Greene, L.A. and Pon, L.A. (1998) The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization. *J Cell Biol*, **141**, 1357-1370.
- Ao, W. and Pilgrim, D. (2000) *Caenorhabditis elegans* UNC-45 is a component of muscle thick filaments and colocalizes with myosin heavy chain B, but not myosin heavy chain A. *J Cell Biol*, **148**, 375-384.
- Aris, J.P. and Blobel, G. (1989) Yeast nuclear envelope proteins cross react with an antibody against mammalian pore complex proteins. *J Cell Biol*, **108**, 2059-2067.
- Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P. and Drubin, D.G. (1997) High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol*, **137**, 399-416.
- Balasubramanian, M.K., McCollum, D., Chang, L., Wong, K.C., Naqvi, N.I., He, X., Sazer, S. and Gould, K.L. (1998) Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics*, **149**, 1265-1275.
- Barral, J.M., Bauer, C.C., Ortiz, I. and Epstein, H.F. (1998) Unc-45 mutations in *Caenorhabditis elegans* implicate a CRO1/She4p-like domain in myosin assembly. *J Cell Biol*, **143**, 1215-1225.
- Barral, J.M., Hutagalung, A.H., Brinker, A., Hartl, F.U. and Epstein, H.F. (2002) Role of the myosin assembly protein UNC-45 as a molecular chaperone for myosin. *Science*, **295**, 669-671.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M.S. and Snyder, M. (2000) Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell*, **5**, 841-851.
- Beach, D.L., Thibodeaux, J., Maddox, P., Yeh, E. and Bloom, K. (2000) The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *Curr Biol*, **10**, 1497-1506.
- Berg, J.S., Powell, B.C. and Cheney, R.E. (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell*, **12**, 780-794.
- Berteaux-Lecellier, V., Zickler, D., Debuchy, R., Panvier-Adoutte, A., Thompson-Coffe, C. and Picard, M. (1998) A homologue of the yeast SHE4 gene is essential for the transition between the syncytial and cellular stages during sexual reproduction of the fungus *Podospora anserina*. *Embo J*, **17**, 1248-1258.
- Bettinger, B.T., Gilbert, D.M. and Amberg, D.C. (2004) Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 410-415.
- Bezanilla, M., Forsburg, S.L. and Pollard, T.D. (1997) Identification of a second myosin-II in *Schizosaccharomyces pombe*: Myp2p is conditionally required for cytokinesis. *Mol Biol Cell*, **8**, 2693-2705.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D.J., Salmon, E.D., McMillan, J.N., Yeh, E. and Pringle, J.R. (1998) Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol*, **142**, 1301-1312.
- Bloom, K. (2001) Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein. *Curr Biol*, **11**, R326-329.

- Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H. and Nasmyth, K. (1996) Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell*, **84**, 699-709.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D. and Jansen, R.P. (2000) She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *Embo J*, **19**, 5514-5524.
- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M. and Nigg, E.A. (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, **56**, 379-390.
- Brockerhoff, S.E., Stevens, R.C. and Davis, T.N. (1994) The unconventional myosin, Myo2p, is a calmodulin target at sites of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **124**, 315-323.
- Brown, S.S. (1997) Myosins in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 44-48.
- Capco, D.G., Wan, K.M. and Penman, S. (1982) The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. *Cell*, **29**, 847-858.
- Catlett, N.L., Duex, J.E., Tang, F. and Weisman, L.S. (2000) Two distinct regions in a yeast myosin-V tail domain are required for the movement of different cargoes. *J Cell Biol*, **150**, 513-526.
- Chen, D.C., Yang, B.C. and Kuo, T.T. (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet*, **21**, 83-84.
- Cheney, R.E. and Mooseker, M.S. (1992) Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol*, **4**, 27-35.
- Cheney, R.E., O'Shea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, R.E. and Mooseker, M.S. (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*, **75**, 13-23.
- Cottingham, F.R., Gheber, L., Miller, D.L. and Hoyt, M.A. (1999) Novel roles for *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle motors. *J Cell Biol*, **147**, 335-350.
- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A.L., Hunt, D.F. and Baserga, S.J. (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, **417**, 967-970.
- Epstein, H.F. and Thomson, J.N. (1974) Temperature-sensitive mutation affecting myofilament assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **250**, 579-580.
- Estrada, P., Kim, J., Coleman, J., Walker, L., Dunn, B., Takizawa, P., Novick, P. and Ferro-Novick, S. (2003) Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **163**, 1255-1266.
- Etheridge, L., Diiorio, P. and Sagerstrom, C.G. (2002) A zebrafish unc-45-related gene expressed during muscle development. *Dev Dyn*, **224**, 457-460.
- Evangelista, M., Klebl, B.M., Tong, A.H., Webb, B.A., Leeuw, T., Leberer, E., Whiteway, M., Thomas, D.Y. and Boone, C. (2000) A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, **148**, 353-362.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C. and Bretscher, A. (2002) Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol*, **4**, 260-269.
- Feierbach, B. and Chang, F. (2001) Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 713-719.
- Fomproix, N. and Percipalle, P. (2004) An actin-myosin complex on actively transcribing genes. *Exp Cell Res*, **294**, 140-148.

- Gachet, Y., Tournier, S., Millar, J.B. and Hyams, J.S. (2001) A MAP kinase-dependent actin checkpoint ensures proper spindle orientation in fission yeast. *Nature*, **412**, 352-355.
- Galardi, S., Fatica, A., Bachi, A., Scaloni, A., Presutti, C. and Bozzoni, I. (2002) Purified box C/D snoRNPs are able to reproduce site-specific 2'-O-methylation of target RNA in vitro. *Mol Cell Biol*, **22**, 6663-6668.
- Geli, M.I., Lombardi, R., Schmelzl, B. and Riezman, H. (2000) An intact SH3 domain is required for myosin I-induced actin polymerization. *Embo J*, **19**, 4281-4291.
- Geli, M.I. and Riezman, H. (1996) Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science*, **272**, 533-535.
- Geli, M.I., Wesp, A. and Riezman, H. (1998) Distinct functions of calmodulin are required for the uptake step of receptor-mediated endocytosis in yeast: the type I myosin Myo5p is one of the calmodulin targets. *Embo J*, **17**, 635-647.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.
- Ginisty, H., Amalric, F. and Bouvet, P. (1998) Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *Embo J*, **17**, 1476-1486.
- Gonsior, S.M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B.M. and Hinssen, H. (1999) Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci*, **112** (Pt 6), 797-809.
- Goodenough, U.W. and Heuser, J.E. (1985) Outer and inner dynein arms of cilia and flagella. *Cell*, **41**, 341-342.
- Goodson, H.V., Anderson, B.L., Warrick, H.M., Pon, L.A. and Spudich, J.A. (1996) Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **133**, 1277-1291.
- Goodson, H.V. and Spudich, J.A. (1995) Identification and molecular characterization of a yeast myosin I. *Cell Motil Cytoskeleton*, **30**, 73-84.
- Gottesman, M.E. and Hendrickson, W.A. (2000) Protein folding and unfolding by Escherichia coli chaperones and chaperonins. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 197-202.
- Grantcharova, V., Alm, E.J., Baker, D. and Horwich, A.L. (2001) Mechanisms of protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 70-82.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D. and Singer, R.H. (2004) A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev*, **18**, 1452-1465.
- Haarer, B.K., Petzold, A., Lillie, S.H. and Brown, S.S. (1994) Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast. *J Cell Sci*, **107** (Pt 4), 1055-1064.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hasson, T. and Mooseker, M.S. (1995) Molecular motors, membrane movements and physiology: emerging roles for myosins. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 587-594.
- Hill, K.L., Catlett, N.L. and Weisman, L.S. (1996) Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*, **135**, 1535-1549.

- Hirokawa, N. (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, **279**, 519-526.
- Hirokawa, N., Noda, Y. and Okada, Y. (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 60-73.
- Hoyt, M.A., Hyman, A.A. and Bahler, M. (1997) Motor proteins of the eukaryotic cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12747-12748.
- Hurt, E.C., McDowall, A. and Schimmang, T. (1988) Nucleolar and nuclear envelope proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Cell Biol*, **46**, 554-563.
- Hutagalung, A.H., Landsverk, M.L., Price, M.G. and Epstein, H.F. (2002) The UCS family of myosin chaperones. *J Cell Sci*, **115**, 3983-3990.
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. and Buchner, J. (1995) Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem*, **270**, 7288-7294.
- Jansen, R.P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M. and Nasmyth, K. (1996) Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell*, **84**, 687-697.
- Johnston, G.C., Prendergast, J.A. and Singer, R.A. (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J Cell Biol*, **113**, 539-551.
- Karcher, R.L., Deacon, S.W. and Gelfand, V.I. (2002) Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol*, **12**, 21-27.
- Karpova, T.S., McNally, J.G., Moltz, S.L. and Cooper, J.A. (1998) Assembly and function of the actin cytoskeleton of yeast: relationships between cables and patches. *J Cell Biol*, **142**, 1501-1517.
- Kitayama, C., Sugimoto, A. and Yamamoto, M. (1997) Type II myosin heavy chain encoded by the myo2 gene composes the contractile ring during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol*, **137**, 1309-1319.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, **15**, 963-972.
- Kollmar, M., Durrwang, U., Kliche, W., Manstein, D.J. and Kull, F.J. (2002) Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *Embo J*, **21**, 2517-2525.
- Kruse, C., Jaedicke, A., Beaudouin, J., Bohl, F., Ferring, D., Guttler, T., Ellenberg, J. and Jansen, R.P. (2002) Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J Cell Biol*, **159**, 971-982.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lafontaine, D.L., Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M. and Tollervey, D. (1998) The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev*, **12**, 527-537.
- Leary, D.J., Terns, M.P. and Huang, S. (2004) Components of U3 snoRNA-containing complexes shuttle between nuclei and the cytoplasm and differentially localize in nucleoli: implications for assembly and function. *Mol Biol Cell*, **15**, 281-293.
- Lechler, T., Shevchenko, A. and Li, R. (2000) Direct involvement of yeast type I myosins in Cdc42-dependent actin polymerization. *J Cell Biol*, **148**, 363-373.
- Lodisch, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell J.E. (1999). *Molecular Cell Biology*, fourth edition edn (New York, W.H: Freeman and Company)

- Lillie, S.H. and Brown, S.S. (1992) Suppression of a myosin defect by a kinesin-related gene. *Nature*, **356**, 358-361.
- Lillie, S.H. and Brown, S.S. (1994) Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **125**, 825-842.
- Lillie, S.H. and Brown, S.S. (1998) Smy1p, a kinesin-related protein that does not require microtubules. *J Cell Biol*, **140**, 873-883.
- Lippincott, J. and Li, R. (1998) Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J Cell Biol*, **140**, 355-366.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K. and Jansen, R.P. (1997) Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science*, **277**, 383-387.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, Second Edition edn (New York, Cold Spring Harbour Press)
- May, K.M., Win, T.Z. and Hyams, J.S. (1998) Yeast myosin II: a new subclass of unconventional conventional myosins? *Cell Motil Cytoskeleton*, **39**, 195-200.
- McNally, E.M., Goodwin, E.B., Spudich, J.A. and Leinwand, L.A. (1988) Coexpression and assembly of myosin heavy chain and myosin light chain in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7270-7273.
- Mehta, A.D., Finer, J.T. and Spudich, J.A. (1998) Use of optical traps in single-molecule study of nonprocessive biological motors. *Methods Enzymol*, **298**, 436-459.
- Mehta, A.D., Rock, R.S., Rief, M., Spudich, J.A., Mooseker, M.S. and Cheney, R.E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*, **400**, 590-593.
- Mermall, V., Post, P.L. and Mooseker, M.S. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*, **279**, 527-533.
- Mooseker, M.S. and Cheney, R.E. (1995) Unconventional myosins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 633-675.
- Moy, T.I., Boettner, D., Rhodes, J.C., Silver, P.A. and Askew, D.S. (2002) Identification of a role for *Saccharomyces cerevisiae* Cgr1p in pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis. *Microbiology*, **148**, 1081-1090.
- Musacchio, A., Wilmanns, M. and Saraste, M. (1994) Structure and function of the SH3 domain. *Prog Biophys Mol Biol*, **61**, 283-297.
- Nakayasu, H. and Ueda, K. (1983) Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes. *Exp Cell Res*, **143**, 55-62.
- Nakayasu, H. and Ueda, K. (1985) Ultrastructural localization of actin in nuclear matrices from mouse leukemia L5178Y cells. *Cell Struct Funct*, **10**, 305-309.
- Pendleton, A., Pope, B., Weeds, A. and Koffer, A. (2003) Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol Chem*, **278**, 14394-14400.
- Pestic-Dragovich, L., Stojiljkovic, L., Philimonenko, A.A., Nowak, G., Ke, Y., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hozak, P. and de Lanerolle, P. (2000) A myosin I isoform in the nucleus. *Science*, **290**, 337-341.
- Price, M.G., Landsverk, M.L., Barral, J.M. and Epstein, H.F. (2002) Two mammalian UNC-45 isoforms are related to distinct cytoskeletal and muscle-specific functions. *J Cell Sci*, **115**, 4013-4023.

- Rayment, I. and Holden, H.M. (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem Sci*, **19**, 129-134.
- Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C. and Milligan, R.A. (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, **261**, 58-65.
- Reck-Peterson, S.L., Provance, D.W., Jr., Mooseker, M.S. and Mercer, J.A. (2000) Class V myosins. *Biochim Biophys Acta*, **1496**, 36-51.
- Riezman, H., Munn, A., Geli, M.I. and Hicke, L. (1996) Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia*, **52**, 1033-1041.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, **17**, 1030-1032.
- Robinson, N.G., Guo, L., Imai, J., Toh, E.A., Matsui, Y. and Tamanoi, F. (1999) Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol Cell Biol*, **19**, 3580-3587.
- Rossanese, O.W., Reinke, C.A., Bevis, B.J., Hammond, A.T., Sears, I.B., O'Connor, J. and Glick, B.S. (2001) A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **153**, 47-62.
- Sagot, I., Klee, S.K. and Pellman, D. (2002) Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol*, **4**, 42-50.
- Sakamoto, T., Amitani, I., Yokota, E. and Ando, T. (2000) Direct observation of processive movement by individual myosin V molecules. *Biochem Biophys Res Commun*, **272**, 586-590.
- Saraswat, L.D. and Lowey, S. (1991) Engineered cysteine mutants of myosin light chain 2. Fluorescent analogues for structural studies. *J Biol Chem*, **266**, 19777-19785.
- Shumaker, D.K., Kuczmarski, E.R. and Goldman, R.D. (2003) The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 358-366.
- Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M.R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E. and Hartl, F.U. (1999) Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *Embo J*, **18**, 75-84.
- Sil, A. and Herskowitz, I. (1996) Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell*, **84**, 711-722.
- Sohn, R.L., Vikstrom, K.L., Strauss, M., Cohen, C., Szent-Gyorgyi, A.G. and Leinwand, L.A. (1997) A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation. *J Mol Biol*, **266**, 317-330.
- Soldati, T. (2003) Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic*, **4**, 358-366.
- Srikakulam, R. and Winkelmann, D.A. (1999) Myosin II folding is mediated by a molecular chaperonin. *J Biol Chem*, **274**, 27265-27273.
- Stuven, T., Hartmann, E. and Gorlich, D. (2003) Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *Embo J*, **22**, 5928-5940.
- Sweeney, H.L., Rosenfeld, S.S., Brown, F., Faust, L., Smith, J., Xing, J., Stein, L.A. and Sellers, J.R. (1998) Kinetic tuning of myosin via a flexible loop adjacent to the nucleotide binding pocket. *J Biol Chem*, **273**, 6262-6270.

- Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E. and Vale, R.D. (2000) Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science*, **290**, 341-344.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I. and Vale, R.D. (1997) Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature*, **389**, 90-93.
- Takizawa, P.A. and Vale, R.D. (2000) The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5273-5278.
- Tanaka, K. and Matsui, Y. (2001) Functions of unconventional myosins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Struct Funct*, **26**, 671-675.
- Tang, F., Kauffman, E.J., Novak, J.L., Nau, J.J., Catlett, N.L. and Weisman, L.S. (2003) Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature*, **422**, 87-92.
- Toi, H., Fujimura-Kamada, K., Irie, K., Takai, Y., Todo, S. and Tanaka, K. (2003) She4p/Dim1p interacts with the motor domain of unconventional myosins in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **14**, 2237-2249.
- Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M. and Boone, C. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, **294**, 2364-2368.
- Tschochner, H. and Hurt, E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, **13**, 255-263.
- Venolia, L., Ao, W., Kim, S., Kim, C. and Pilgrim, D. (1999) unc-45 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a muscle-specific tetratricopeptide repeat-containing protein. *Cell Motil Cytoskeleton*, **42**, 163-177.
- Verheggen, C., Lafontaine, D.L., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J.M., Bordonne, R. and Bertrand, E. (2002) Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *Embo J*, **21**, 2736-2745.
- Verheggen, C., Mouaikel, J., Thiry, M., Blanchard, J.M., Tollervey, D., Bordonne, R., Lafontaine, D.L. and Bertrand, E. (2001) Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *Embo J*, **20**, 5480-5490.
- Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M. and Nishida, E. (1998) Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *Embo J*, **17**, 1635-1641.
- Wang, F., Chen, L., Arcucci, O., Harvey, E.V., Bowers, B., Xu, Y., Hammer, J.A., 3rd and Sellers, J.R. (2000) Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V. *J Biol Chem*, **275**, 4329-4335.
- Watts, F.Z., Shiels, G. and Orr, E. (1987) The yeast MYO1 gene encoding a myosin-like protein required for cell division. *Embo J*, **6**, 3499-3505.
- Wells, A.L., Lin, A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain, S.M., Hasson, T., Carragher, B.O., Milligan, R.A. and Sweeney, H.L. (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature*, **401**, 505-508.
- Wendland, B., McCaffery, J.M., Xiao, Q. and Emr, S.D. (1996) A novel fluorescence-activated cell sorter-based screen for yeast endocytosis mutants identifies a yeast homologue of mammalian eps15. *J Cell Biol*, **135**, 1485-1500.
- Wesche, S., Arnold, M. and Jansen, R.P. (2003) The UCS domain protein She4p binds to myosin motor domains and is essential for class I and class V myosin function. *Curr Biol*, **13**, 715-724.

- Winter, D., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. and Li, R. (1997) The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol*, **7**, 519-529.
- Winter, D.C., Choe, E.Y. and Li, R. (1999) Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7288-7293.
- Wong, K.C., D'Souza V, M., Naqvi, N.I., Motegi, F., Mabuchi, I. and Balasubramanian, M.K. (2002) Importance of a myosin II-containing progenitor for actomyosin ring assembly in fission yeast. *Curr Biol*, **12**, 724-729.
- Wong, K.C., Naqvi, N.I., Iino, Y., Yamamoto, M. and Balasubramanian, M.K. (2000) Fission yeast Rng3p: an UCS-domain protein that mediates myosin II assembly during cytokinesis. *J Cell Sci*, **113** (Pt 13), 2421-2432.
- Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T.C. and Bretscher, A. (2000) Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature*, **406**, 1013-1015.
- Yu, Q. and Bernstein, S.I. (2003) UCS proteins: managing the myosin motor. *Curr Biol*, **13**, R525-527.

8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	Cirka
CIP	Alkalische Phosphatase
C-terminal	Carboxyterminal
DAPI	4, 6-Diamino-2-Phenylindol
DIC	Digital Interference Contrast
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Didesoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Schwerefeldbeschleunigung der Erde
gr	Gramm
GST	Gluthathion-S-Transferase
GFP	green fluorescence protein
h	Stunde
Hsp	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin

IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Liquid-Broth-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NP-40	Nonidet P-40 (Igepal-CA-630)
nt	Nukleotide
N-terminal	Aminoterminal
OD ₆₀₀ Optische	Dichte bei Wellenlänge 600 Nanometer
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii, Wasserstoffstärke
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonucleoprotein
rNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
RT	Raumtemperatur
<i>S. pombe</i>	<i>Schizzosaccharomyces pombe</i>

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
snoRNA	kleine nucleoläre RNA
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	Tandem-Affinität-Aufreinigung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
TPR	Tetracopeptid Repeat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
YEP	Yeast Extrakt Peptone
YNB	Yeast Nitrogen Base
ZMBH	Zentrum für molekulare Biologie Heidelberg

9. Publikationen

- **Stefanie Wesche**, Marc Arnold and Ralf-Peter Jansen. "The UCS domain protein She4p binds to myosin motor domains and is essential for class I and class V myosin function". *Current Biology*, Vol. 13, 715-724, April 29, 2003

Wissenschaftliche Kongresse

- 2004. **Poster** beim Meeting der European Life Scientist Organisation (ELSO) in Nizza (Frankreich).
- 2003. **Eingeladener Sprecher** bei der EURESCO Konferenz and FEBS advanced course "Biology of molecular chaperones" in Tomar (Portugal).
- 2002. **Poster** beim 42th Annual meeting der The American Society for cell Biology (ASCB) in San Fransisco (USA).
- 2002. **Poster** beim Meeting der European Life Scientist Organisation (ELSO) in Nizza (Frankreich).

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für molekulare Biologie in Heidelberg und am Genzentrum München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen angefertigt. An dieser Stelle möchte ich meinen Dank all jenen aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen für die interessante und reizvolle Themenstellung, die grosszügige Förderung und die hervorragenden Möglichkeiten in seiner Abteilung wissenschaftlich zu arbeiten. Sowohl in fachlichen wie auch in menschlichen Fragen war er jederzeit ein geduldiger Ansprechpartner. Ausserdem danke ich ihm für die Möglichkeit meine Arbeiten vor wissenschaftlichen Fachpublikum auf zahlreichen internationalen Kongressen zu präsentieren.

Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer danke ich ganz herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Weiterer Dank gilt allen momentanen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Jansen für die freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre, ohne die ein erfolgreiches Arbeiten nicht möglich gewesen wäre. Besonders zu erwähnen sind hierbei Marc Arnold, dessen Diplomarbeit der Initiator für die vorliegende Thematik war und Esther Zanin, die als motivierte und interessierte Praktikantin am Projekt mitgearbeitet hat.

Frau Dr. Marie-Isabel Geli danke ich für die Hilfe beim Aktin *Pelleting* Assay und Herrn Dr. José Barral für die Einführung in die Welt der molekularen Chaperone.

Manfred Schüle, Michael Till und Michael Engelschall danke ich ganz herzlich für die vielen netten Stunden innerhalb und ausserhalb des Genzentrums und die Einführungen in die bayrische Lebensart. Die vielen Wanderungen, Radtouren und abendlichen Unternehmungen waren eine absolute Bereicherung.

Danken möchte ich auch meinen Freunden, die sich jederzeit geduldig meine aktuellen Laborprobleme angehört haben.

Zum Abschluss gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die meine Arbeit jederzeit unterstützten und mich in frustrierten Tagen durch Trost und Motivation immer wieder aufgebaut haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Wesche
 Geburtsdatum: 28. August 1976
 Geburtsort: Gifhorn
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstand: ledig

Ausbildung

Schulbildung

1981 - 1995 Grundschule Leiferde, Orientierungsstufe Meinersen, Realschule Meinersen, Humboldt Gymnasium Gifhorn, Otto Hahn Gymnasium Gifhorn

Akademische Ausbildung

1995 - 1997 Studium der Biologie an der Carolo-Wilhelmina Universität Braunschweig
 Vordiplom in Biologie

1997 - 2001 Georg-August-Universität Göttingen
 Hauptfach: Mikrobiologie
 Nebenfächer: Humangenetik, Biochemie

2001 Diplomarbeit im Labor von Herrn Prof. Dr. Gerhard Braus mit dem Thema: "Die Rolle des Transkriptionsfaktors Tec1p bei der Regulation des invasiven Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae*."

2001 - 2003 Beginn der Promotion im Labor von Herrn Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen (Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg) mit dem Thema: "Das UCS-Protein She4p ist essentiell für die Myosin-Funktion in *Saccharomyces cerevisiae*"

2003 Ortswechsel der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jansen an das Genzentrum, Fakultät für Biochemie in München