

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

Yor179c – ein neuer mRNA-3'-Prozessierungsfaktor der Hefe
Saccharomyces cerevisiae

Ulrike Sterzer

aus

Altötting

2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. H. Domdey betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 21.05.2001

Ulrike Sterzer

Dissertation eingereicht am: 12.06.2001

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Domdey

2. Gutachter: Privatdozent Dr. M. Meisterernst

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2001

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Domdey danke ich sehr herzlich für die Vergabe des Themas und seine Unterstützung, wann immer ich Hilfe nötig hatte. Außerdem danke ich ihm dafür, daß ich immer selbständig und eigenverantwortlich arbeiten konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Susanne Braun, für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, ihr ständiges Interesse und ihre freundliche Unterstützung in allen Lebenslagen. Niemand kann Sachverhalte so gut erklären und veranschaulichen wie sie. Für ihre unermüdliche wissenschaftliche Hilfe auch nach Beendigung ihrer eigenen Promotion kann ich ihr nicht genug danken. Dennoch war sie immer für ein Schwätzchen oder ein Kännchen zu haben und hat damit die Arbeit ein bißchen leichter gemacht. Ganz besonders muß ich mich auch für das Korrigieren der Arbeit, das meistens auch noch „möglichst schnell“ erledigt werden mußte, bedanken. Ohne ihre tatkräftige Hilfe hätte diese Arbeit wohl nie zu einem erfolgreichen Abschluß gefunden.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Gabi Stumpf bedanken, die mir gezeigt hat, dass wissenschaftliches Arbeiten Freude bereiten und sogar erfolgreich sein kann. Mein Basiswissen in der Molekularbiologie verdanke ich größtenteils ihr.

„Meiner“ Diplomandin Ute Schultheiss, möchte ich für eine gute wissenschaftliche Zusammenarbeit danken, aber auch für die vielen kleinen Anekdoten (die sie nicht müde wurde, zum Besten zu geben), die das Laborleben mitunter sehr aufgelockert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Heidi Feldmann, die mir bei allen Problemen die Hefemethodik und –genetik betreffend zu jeder Zeit und mit unerschöpflicher Geduld zur Seite stand.

Frau Dr. Karin Wiebauer hat sich, ohne Mühen und Aufwand zu scheuen, in die Diskussion vertieft und mir mit unzähligen neuen Ideen und Vorschlägen das Schreiben sehr erleichtert. Vielen Dank dafür! Auch im Laboralltag war sie immer bereit, Ergebnisse zu diskutieren und zu bewerten und hat so einige weniger erfolgreiche Tage und Wochen optimistisch gefärbt.

Bei Christoph Hundt und dem „Steipe-Labor“ (Peter Wirtz, Volker Rohde, Jan Barnikow und Jens Wiehler) möchte ich mich ganz besonders für die vielen netten Stunden und interessanten Diskussionen bedanken, die das nüchterne wissenschaftliche Leben bereichert haben. Bei Bettina Meier, Daniela Proske, Angelika Helmbrecht, Horst Würfl, Hans Gassenhuber, Moritz von Specht, Josef Gabelsberger und Sascha Röhrig möchte ich mich für ihre ständige moralische und geistige Unterstützung bedanken, die mir in „Notzeiten“ (und nicht nur da) zuteil wurden.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Sigi Kastenmüller, die immer für die Verlängerung meines Vertrages Sorge getragen hat und auch im größten Trubel ein offenes Ohr für alle Sorgen hatte.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung, die sie mir während meiner gesamten Ausbildung zukommen ließen.

Zu guter Letzt gilt mein Dank noch „Schatzi“, der mir liebevoll über viele hoffnungslose Tage hinweggeholfen hat und mir zu gegebener Zeit auch mit konstruktiver Kritik den „Kopf gewaschen“ hat.

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1997 bis Dezember 2000 im Institut für Biochemie
-Genzentrum- der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn
Prof. Dr. H. Domdey durchgeführt.

FÜR MEINEN GROSSVATER

Auch das ist Kunst, ist Gottes Gabe,
sich an sonnenhellen Tagen, soviel Licht ins Herz zu tragen,
dass, wenn der Sommer längst verweht,
das Leuchten immer noch besteht.

unbekannt

Es kann nicht lauter große Lichter geben.
Die Großen leuchten ja weithin,
aber die Kleinen wärmen.

K.H. Waggerl

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	15
2.1.3	Radiochemikalien	18
2.1.4	Enzyme	18
2.1.5	Antikörper	19
2.1.6	Lösungen, Puffer und Kulturmedien	20
2.1.6.1	Lösungen und Puffer	20
2.1.6.2	Kulturmedien	21
2.1.7	Molekularbiologische Hilfsmittel	23
2.1.8	Hefe- und Bakterienstämme	24
2.1.8.1	Hefestämme	24
2.1.8.2	Bakterienstämme	24
2.1.9	DNA- und Proteinlängenstandards	25
2.1.9.1	DNA-Längenstandards	25
2.1.9.2	Protein-Längenstandards	26
2.1.10	Plasmide	26
2.1.11	Oligonukleotide	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Kulturtechniken	28
2.2.1.1	Steriles Arbeiten mit Bakterienkulturen und mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.2.1.2	Anzucht von Bakterienkulturen	29
2.2.1.3	Anzucht von Hefekulturen	29
2.2.1.4	Anlegen von Dauerkulturen	29
2.2.1.5	Paarung zweier haploider Hefezellen zu einer diploiden Hefezelle	30
2.2.1.6	Bestimmung des Paarungstyps eines haploiden Hefestammes	30
2.2.1.7	Sporulation diploider Hefezellen	31
2.2.1.8	Tetradenanalyse	32
2.2.1.9	Mikroskopische Analyse eines Gfp-Yor179c-Fusionsproteins	32
2.2.2	DNA-Arbeitstechniken	33
2.2.2.1	Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	33
2.2.2.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	34
2.2.2.3	Plasmidpräparation aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.2.2.4	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	37
2.2.2.5	Isolierung von genomischer Hefe-DNA	37
2.2.2.6	Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.2.2.7	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	41
2.2.2.8	Herstellung einer radioaktiven Sonde mittels „Random Hexamer Priming“	42
2.2.2.9	Southern-Blot-Analyse	43
2.2.2.10	Amplifikation von DNA Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
2.2.2.11	Phosphorylierung von PCR-Fragmenten	46
2.2.2.12	Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm	47
2.2.2.13	Ligation von DNA in Low-Melting-Agarose	47
2.2.2.14	DNA-Sequenzierung	48
2.2.2.15	Agarose-Gelelektrophorese	51
2.2.2.16	Restriktionshydrolyse	51

2.2.2.17	Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-kb-Leiter	52
2.2.3	RNA-Arbeitstechniken	52
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus Hefezellen durch Phenolextraktion	52
2.2.3.2	Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA	53
2.2.3.3	RNase-Protection-Assay	55
2.2.3.4	Northern-Blot-Analyse	56
2.2.3.5	Herstellung von radioaktiv markierten RNA-Fragmenten durch <i>in vitro</i> Transkription ...	58
2.2.3.6	<i>In vitro</i> mRNA-3'-Prozessierungsreaktion von definierten mRNA-Fragmenten	59
2.2.3.7	<i>In vitro</i> Polyadenylierungsreaktion von vorgeschrittenen RNA-Fragmenten	60
2.2.3.8	Test auf unspezifische Poly(A)-Polymerase Aktivität	62
2.2.3.9	<i>In vivo</i> Polyadenylierungsreaktion	62
2.2.4	Protein-Arbeitstechniken	63
2.2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.2.4.2	Coomassie-Färbung von Proteingelen	65
2.2.4.3	Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford	65
2.2.4.4	Western-Blot-Analyse	66
2.2.4.5	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	68
2.2.4.6	Aufschluß von <i>E. coli</i> Bakterienzellen mit Ultraschall	68
2.2.4.7	Aufreinigung von Proteinen über Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	69
2.2.4.8	Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen	71
2.2.4.9	Affinitätsreinigung von Antikörpern an Protein-A-Sepharose	71
2.2.4.10	Immundepletion eines Hefe-Ganzzellextraktes	72
2.2.4.11	Coimmunpräzipitation durch Protein A-Sepharose	73
2.2.4.12	Präparation eines Hefe-Ganzzellextraktes für die <i>in vitro</i> 3'-Prozessierung	74
2.2.4.13	Partielle Fraktionierung eines Hefe-Ganzzellextraktes über Ammoniumsulfat-fällung ...	76
2.2.4.14	<i>In vitro</i> Translation rekombinanter Proteine in einem Retikulozyten - Lysat	77
2.2.4.15	Untersuchung von Interaktionen <i>in vitro</i> translatierter Proteine durch Coimmunpräzipitation	78
3	Ergebnisse	79
3.1	Sequenzähnlichkeit des mRNA-3'-Prozessierungsfaktor Brr5 zu dem Genprodukt des offenen Leserahmens YOR179c	79
3.2	Nachweis der mRNA des offenen Leserahmens YOR179c	82
3.3	Expression des YOR179c-Gens zur Herstellung polyklonaler Antikörper	84
3.4	Klonierung und Lokalisierung eines Gfp-Yor179c-Fusionsproteins innerhalb der Hefezelle	86
3.5	Gendisruption des YOR179c-Gens	88
3.6	Erzeugung und Charakterisierung eines homozygoten diploiden Hefestammes, der für das YOR179c-Gen defizient ist	92
3.7	Komplementationsanalysen eines Brr5-defizienten Stammes	96
3.7.1	Komplementation mit dem intakten <i>BRR5</i> -Gen	96
3.7.2	Komplementation mit C-terminal deletierten Mutanten des <i>BRR5</i> -Gens	102
3.7.3	Konstruktion eines chimären <i>BRR5/YOR179c</i> -Gens durch Austausch der sequenzähnlichen Bereiche	104
3.7.3	Mutation der p-loop-Domäne innerhalb des C-terminalen Bereichs des <i>BRR5</i> -Gens	108
3.8	Identifizierung von Brr5 als Interaktionspartner von Yor179c	112

3.9	Charakterisierung des Yor179c-Proteins als redundanter Polyadenylierungs-faktor	115
3.9.1	Vergleich der 3'-Prozessierungsaktivität von Hefeextrakten, die aus einem Wildtyp- und dem USY3-Stamm hergestellt worden sind	115
3.9.2	Inaktivierung der 3'-Prozessierungsaktivität eines Hefeextraktes durch Immundepletion mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein	117
3.9.3	Inhibierung der spezifischen Polyadenylierung von vorgeschchnittener prä-mRNA in einem mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein depletierten Hefe-Ganzzellextrakt (AS-gefällt)	119
3.9.4	Rekonstitution der spezifischen Polyadenylierung mittels extrachromosomal exprimiertem Yor179c-Protein	121
3.9.5	Test auf Anwesenheit der Poly(A)-Polymerase in einem mit Ammoniumsulfat gefällten USY3-Extrakt	122
3.9.6	<i>In vivo</i> Analyse des Polyadenylierungspotentials eines USY3-Stammes	123
3.9.7	Rekonstitution der spezifischen Polyadenylierung mittels des Überstandes einer Ammoniumsulfatfällung des USY3-Stammes	125
3.9.8	Identifizierung des Polyadenylierungsfaktors Fip1 als Interaktionspartner von Yor179c	127
4	Diskussion	132
4.1	Homologievergleich von mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren in <i>S. cerevisiae</i> und höheren Eukaryonten	132
4.2	Strukturelemente des Yor179c-Proteins	134
4.3	Mutationsexperimente zur Identifizierung essentieller Bereiche innerhalb des BRR5-Gens	137
4.4	Der offene Leserahmen YOR179c codiert für ein nicht-essentielles Protein	138
4.5	Yor179c ist ein Faktor im mRNA-3'-Prozessierungsapparat von <i>S. cerevisiae</i>	140
4.6	Ist Yor179c für die Aufhebung der Fip1-vermittelten Inhibierung der Poly(A)-Polymerase verantwortlich?	142
5	Zusammenfassung	145
6	Literaturverzeichnis	147
7	Anhang	158
7.1	Klonierung von Yor179c in pET15b-Vektor	158
7.2	Klonierung von Yor179c in pGFP-Vektor	159
7.3	Gendisruption von Yor179c	161
7.4	Klonierung von Yor179c in den pAH ⁺ -Vektor	161
7.5	Klonierung von Brr5flank, sowie die hieraus resultierenden C-terminalen Mutanten	162
7.6	Klonierung der chimären Gene BRR5 ΔYOR179cH und BRR5 ΔYOR179cZ	168
7.7	Klonierung der Punktmutationen in der p-loop-Domäne des BRR5-Gens	171

1 Einleitung

„We have isolated this oncogene (ras) and we know what it is doing only because of studies of its homologue in yeast,...“ (Wickner, 1998). Dieses Zitat zeigt anschaulich, wie wichtig „Modellorganismen“ wie zum Beispiel die beiden Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sind, um komplexe biochemische Reaktionen aufzuklären. Gerade die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist wegen ihrer kosten-, zeit- und materialsparenden Untersuchungsmöglichkeiten als Forschungsobjekt sehr beliebt. Ein weiterer Vorteil ist ihre extrem kurze Generationszeit: Bereits nach zwei Tagen können durchgeführte genetische Manipulationen analysiert werden. Auch ihre Stabilität sowohl im haploiden als auch im diploiden Zustand stellt einen großen Vorteil bei Analysen von rezessiv vererbten Mutationen und Genfunktionsanalysen dar.

Neben der Hefe werden heute auch der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der Zebrafisch *Danio rerio* und die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismen verwendet. So werden zum Beispiel neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer im Nematoden *C. elegans* untersucht (Brockhaus *et al.*, 1998; Wittenburg *et al.*, 2000), die Wirkungsweise des blutbildenden Systems und damit die Entstehung von Leukämie zu ergründen, ist das erklärte Forschungsziel einiger Laboratorien, die mit dem Zebrafisch arbeiten (Amatruda und Zon, 1999), der Prozess des Alterns ist ein Aufgabenfeld, das in *S. cerevisiae* untersucht wird (Greider, 1998; Sinclair *et al.*, 1998a; Sinclair *et al.*, 1998b), ebenso das noch weitgehend unerforschte Gebiet der Creutzfeld-Jakob- und die damit eng verknüpfte BSE-Erkrankung (Wickner, 1994; Wickner *et al.*, 1999).

Bereits 1988 war bekannt, dass höhere Eukaryonten und die Bäckerhefe Gene besitzen, die für sehr ähnliche Proteine codieren (Botstein und Fink, 1988). Einige dieser Homologien waren keine Überraschung, wenn es sich zum Beispiel um Proteine handelte, die in ubiquitär vorkommenden Zellorganellen verbreitet sind, wie Ribosomen oder Mitochondrien. Andere Proteine, wie die beiden Ras-Proteine der Hefe, waren hingegen – zumindest zum damaligen Zeitpunkt - eine Überraschung, denn sie stellen homologe Entsprechungen des menschlichen Protoonkogens ras dar (Kataoka *et al.*, 1985). Bereits vor vier Jahren konnte für 31 % aller Hefegene ein entsprechendes homologes Gen des bis dahin veröffentlichten menschlichen Genoms identifiziert werden (Botstein *et al.*, 1997). Aber nicht nur einzelne Proteinfaktoren sind zwischen diesen Organismen konserviert, sogar komplexe biochemische Prozesse, wie

die mRNA-Synthese (Guarente, 1988), die DNA-Replikation (Feldmann und Winnacker, 1993), die Transkription (Myers und Kornberg, 2000) oder das Spleißen (Sharp, 1988).

Das beste Beispiel für den hohen Stellenwert von *S. cerevisiae* als Modellorganismus ist aber das Forschungsgebiet der Erbkrankheiten. Gewöhnlich ist über derartige Gene nicht viel mehr als ihre Sequenz bekannt. Über Datenbankanalysen mit diesen Sequenzen (diese Daten sind verfügbar über die XREF-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) konnte herausgefunden werden, dass allein 50 % dieser Gene eine homologe Entsprechung in der Hefe besitzen (Botstein *et al.*, 1997). Dadurch konnte beispielsweise aufgeklärt werden, dass das MSH2-Gen in der DNA-Reparatur eine Rolle spielt. Ein Defekt in diesem Gen führt zu erblichem, nicht Polypen-bildendem Dickdarmkrebs [(Horii *et al.*, 1994; Jeyaprakash *et al.*, 1996), (Hefegene: Msh1 und Mlh1)]. Auch das RASA1-Gen [Ira1 in der Hefe; (Ballester *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1990)], ein Aktivatorprotein der ras-Signaltransduktionskette, das bei der Ausprägung der Krankheit Neurofibromatosis eine Rolle spielt, sowie das WRN-Gen, das für eine Helikase codiert und zur Ausprägung der Progerieerkrankung des Werner Syndroms führt [(Balajee *et al.*, 1999); Hefehomologes: Sgs1], konnten als Interaktoren des DNA-Reparaturmechanismus identifiziert werden.

Aber die Hefe *S. cerevisiae* ist auch deshalb so gut als Modellorganismus geeignet, weil sogar Proteine, die erwiesenermaßen keine homologe Entsprechung im Hefesystem aufweisen, dennoch dort, einmal über Transformation eingeführt, die ihnen eigene, charakteristische Funktion zeigen. So konnte für die Spalthefe *S. pombe*, die durch genetische Manipulation das Wildtyp-Gen für p53 exprimieren kann, ein dosisabhängiger Wachstumsdefekt, sowie eine im Wildtyp-Stamm nicht detektierbare Sensitivität für UV-Licht beobachtet werden. Dieser Effekt ist durch den Suppressor CDC25C wieder komplementierbar (Bureik *et al.*, 1997; Rief *et al.*, 2000).

Aber nicht nur traditionelle genetische Experimente werden mit dem Hefesystem durchgeführt, auch neue Methoden, die in großem Maßstab Funktionen von bisher unbekannt Genen entschlüsseln sollen [von den insgesamt rund 6200 Genen der Hefe *S. cerevisiae* konnten bisher nur 3780 eine eindeutigen Funktion zugeordnet werden (Kumar und Snyder, 2001)], werden in dem ersten, komplett sequenzierten eukaryontischen Organismus (Botstein *et al.*, 1997) erprobt. So wird versucht, durch Einführung von bakteriellen Transposons Mutationen herbeizuführen, um anschließend das Expressionsniveau der Gene festzustellen, sowie den aus den Mutationen resultierenden Phänotyp zu bestimmen.

Weiterhin wird mit Ansätzen wie der „Schrotschuß“- (shotgun), oder der „Massenmörder“-Methode (mass murder) versucht, parallel die einzelnen Gene auf einem Chromosom zu deletieren und den hieraus resultierenden Phänotyp zu detektieren (Fairhead *et al.*, 1998). Ein weiteres ehrgeiziges Projekt sind DNA-„Microarrays“. Diese Methode hat den herkömmlichen Northern Blot revolutioniert. Es zeichnet sich ab, dass in den nächsten Jahren, das „ein Gen – ein Forscher“-Modell (Wickner, 1998) der Vergangenheit angehören wird. Anhand dieser Microarrays können 6000 mRNAs pro Chip und pro Woche analysiert werden (Hughes *et al.*, 2000).

Aufgrund dieser mannigfachen Vorteile und Möglichkeiten dieses einfachsten eukaryontischen Organismus wurde auch in der vorliegenden Arbeit versucht, einen bisher noch unaufgeklärten Prozess, die 3'-Prozessierung von mRNA-Vorläufern, sowie ein noch unbekanntes Protein der Hefe *S. cerevisiae* zu charakterisieren.

So unterschiedlich die verschiedenen Modellorganismen sind, sie können nur als solche fungieren, weil sie gemeinsamen molekularen Mustern und Prinzipien unterliegen. So ist der Fluß der genetischen Information von der DNA zur mRNA („messenger“ RNA) und weiter zum Protein im wesentlichen in allen Organismen derselbe. Wichtige Kontrollstellen der Proteinbiosynthese (posttranskriptionale Modifikationen und Abbau) befinden sich auf der Ebene der RNA. Verschiedene komplexe Prozesse sind für die Herstellung einer „reifen“, translationskompetenten mRNA nötig. Zunächst wird in der Transkription die DNA in RNA umgeschrieben. Das entstandene mRNA-Molekül ist wesentlich länger als die reife mRNA, weshalb es auch als prä-mRNA oder mRNA-Vorläufer bezeichnet wird, und geht weit über die proteincodierende Sequenz hinaus. Mehrere Reifungsschritte (Prozessierungen) sind nötig, damit die mRNA in ihrer reifen Form den Zellkern verlassen und an den Ort der Proteinbiosynthese, an die Ribosomen ins Cytoplasma, wandern kann. So wird kurz nach dem Transkriptionsstart an das erste Nukleotid der neu gebildeten RNA-Kette eine „Cap“-Struktur angehängt, die dem Schutz vor exonukleolytischem Abbau dient. Zusätzlich werden intervenierende Sequenzen (Introns), die in der reifen mRNA nicht mehr enthalten sind, durch den Prozess des mRNA-Spleißens aus dem Primärtranskript entfernt.

Schließlich werden die derartig modifizierten mRNAs noch an ihrem 3'-Ende prozessiert. Bei diesem Vorgang, der ebenfalls noch im Zellkern stattfindet, verlieren die mRNA-Vorläufer-Moleküle einen Teil ihrer 3'-terminalen, nicht proteincodierenden RNA-Sequenzen durch einen endonukleolytischen Schnitt und erhalten stattdessen mehrere

Adenosinreste, die den sogenannten Poly(A)-Schwanz bilden [Übersichtsartikel: (Keller und Minvielle-Sebastia, 1997; Wahle und Rueggsegger, 1999; Zhao *et al.*, 1999)].

Während alle bisher untersuchten eukaryontischen mRNAs an ihrem 3'-Ende einen Teil des Primärtranskripts durch einen endonukleolytischen Schnitt verlieren, werden nicht alle mRNAs mit einem Poly(A)-Schwanz versehen: Prä-mRNAs, die für die Haupthistone codieren, werden nach einer definierten Haarnadelschleifen-Struktur zwar auch endonukleolytisch geschnitten, jedoch nicht polyadenyliert (Adesnik und Darnell, 1972; Adesnik *et al.*, 1972).

Der Poly(A)-Schwanz spielt eine Rolle bei der Translationsinitiation (Sachs und Wahle, 1993), wobei auch eine Protein-vermittelte Interaktion mit der Cap-Struktur am 5'-Ende der RNA dazu beiträgt, die 40S-Untereinheit des Ribosoms an der RNA anzuheften (Sachs *et al.*, 1997). Eine weitere Funktion des Poly(A)-Schwanzes ist seine Beteiligung an der Regulation der RNA-Stabilität, da Deadenylierung den ersten und limitierenden Schritt während des mRNA-Abbaus darstellt (Sachs *et al.*, 1997). Schließlich nimmt man an, dass der Poly(A)-Schwanz auch eine Rolle beim Transport der reifen mRNA aus dem Nukleus in das Cytoplasma spielt (Eckner *et al.*, 1991; Huang und Carmichael, 1996). Obwohl diese mRNA-3'-Prozessierungsreaktionen in der Hefe und in höheren Eukaryonten ähnlich ablaufen, gibt es doch einige interessante Unterschiede. So ist in der Hefe der Schnitt und die Polyadenylierung nicht wie in Vertebraten eng aneinander gekoppelt; dies wurde von Butler und Platt postuliert, nachdem sie unter üblichen *in vitro* Bedingungen bereits geschnittene, jedoch noch nicht polyadenylierte mRNA-Intermediate identifizieren konnten (Butler und Platt, 1988; Butler *et al.*, 1990). Darüberhinaus unterscheidet sich auch die Zahl der angefügten Adenosinreste: Diese beträgt in Hefe nur ungefähr 70, im Gegensatz zu Vertebraten, die rund 250 Reste aufweisen (Groner und Phillips, 1975). Außerdem unterscheiden sich die cis-agierenden Faktoren, also die auf der RNA lokalisierten Signalsequenzen. In Abb. 1 ist die Konstellation dieser Faktoren sowohl für Hefe als auch für höhere Eukaryonten schematisch dargestellt, wie sie sich zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit präsentierte. Hierbei soll besonders die Tatsache Erwähnung finden, dass im Hefemodellsystem ein stromabwärts der Polyadenylierungsstelle gelegenes zusätzliches Element in beinahe allen untersuchten Hefegenen fehlt. Untersuchungen von Sadhale und Mitarbeitern zeigten, dass Substrate, die nach der Polyadenylierungsstelle nur über 7-10 Nukleotide verfügten, effizient geschnitten wurden. Die einzige bekannte Ausnahme stellt das ADH2-Transkript dar. Dieses benötigt für

eine korrekte 3'-Prozessierung *in vivo* ein zusätzliches stromabwärts gelegenes Element (Hyman *et al.*, 1991).

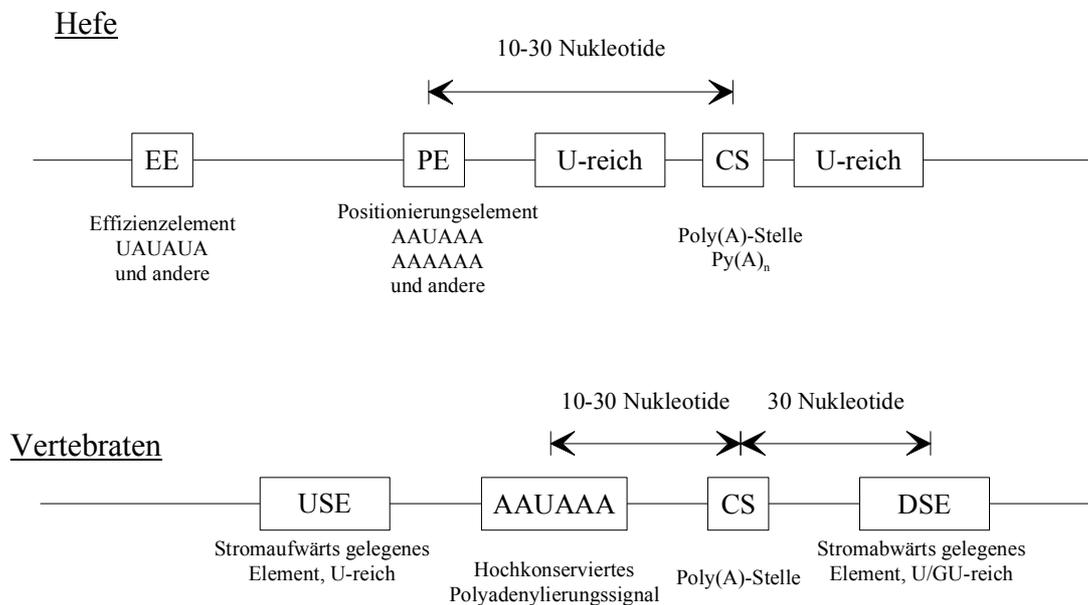


Abb. 1: Schematische Darstellung von Polyadenylierungssignalen in der Hefe *S. cerevisiae* und höheren Eukaryonten. Das Hefesystem verfügt über die Signalsequenzen EE („efficiency element“), PE („positioning element“) und der eigentlichen Polyadenylierungsstelle CS („cleavage site“). In Vertebraten ist zusätzlich zu einem ebenfalls vorhandenen „upstream element“ USE und dem hochkonservierten AAUAAA-Hexamer, ein weiterer, stromabwärts gelegener Bereich an der Erkennung der korrekten Polyadenylierungsstelle beteiligt, das „downstream element“ DSE.

Säugetiere benötigen drei unterschiedliche RNA-Signalsequenzen, die die Position der Polyadenylierungsstelle definieren: Ein weiter oberhalb von dieser gelegenes, Uracil-reiches „upstream element“, ein entsprechend unterhalb der Polyadenylierungsstelle lokalisiertes „downstream element“, sowie die AAUAAA-Signalsequenz, die die exakte Polyadenylierungsstelle rund 10-30 Nukleotide stromabwärts festlegt. Nur das zuletzt angeführte Element ist hochkonserviert, die beiden anderen verfügen nur über Präferenzen für bestimmte Nukleotide. Es wird sowohl für den endonukleolytischen Schnitt, als auch für die anschließende Polyadenylierung benötigt. Diese AAUAAA-Sequenz ist zwar ebenfalls in 50 % aller Hefegene anzutreffen (Hyman *et al.*, 1991), Mutationen innerhalb dieser Sequenz haben aber im Gegensatz zu höheren Eukaryonten keinen Einfluß auf die nachfolgende Prozessierung in Hefe; es werden in diesem Fall alternative Polyadenylierungsstellen benutzt

(Abe *et al.*, 1990). Die am häufigsten verwendete Variante dieser Sequenz ist das Hexamer AAAAAA. Aber auch verwandte Nukleotidabfolgen werden verwendet, allgemein könnte das AAUAAA-Element in der Hefe als A-reich charakterisiert werden. Es wird als „positioning element“ (PE) bezeichnet. Ein vollständiges Polyadenylierungssignal in der Hefe verfügt noch über zwei weitere Elemente: Das rund 60 bis 120 Nukleotide weiter stromaufwärts gelegene „efficiency element“ (EE), welches das PE aktiviert und für die Wahl der Polyadenylierungsstelle sogar von größerer Bedeutung als das AAUAAA-Signal sein soll (Guo und Sherman, 1996), sowie die eigentliche Polyadenylierungsstelle (CS = „cleavage site“). Ein optimales EE stellt die Sequenz UAUUA dar (Guo und Sherman, 1995; Russo *et al.*, 1991). Die Polyadenylierung beginnt meist nach dem Sequenzelement Py(A)_n, (Py = Pyrimidin) (Heidmann *et al.*, 1994; Russo *et al.*, 1993). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Polyadenylierungsstelle meist von einer Uracil-haltigen Sequenz umgeben ist (Graber *et al.*, 1999a), welche Bedeutung diese zusätzlichen Bereiche auf die 3'-Prozessierung besitzen, konnte bisher allerdings noch nicht experimentell nachgewiesen werden, sondern wurde nur statistisch erhoben. Diese hier angegebenen mRNA-Signalsequenzen der Hefe sind allerdings im Vergleich zur hochkonservierten AAUAAA-Sequenz der höheren Eukaryonten nicht nur degeneriert, sondern auch redundant. Viele Hefe-Polyadenylierungssignale sind weitaus komplexer, als die hier beschriebenen. Dies erklärt auch, weshalb Zerstörung der Sequenzabfolge bzw. komplette Deletion derselben keinen oder nur einen schwachen Effekt aufweist. So hat die Entfernung der AAUAAA-Sequenz oberhalb des ADE8 Transkripts keinen erkennbaren Einfluß, was an dem Vorhandensein von zwei AAAAA-Stellen in der Nähe der AAUAAA-Sequenz liegen könnte (Henikoff *et al.*, 1983). Das *CYCI*-Gen verfügt über mehrere schwache Polyadenylierungsstellen, die additiv ein starkes Signal bilden (Guo *et al.*, 1995). Viele Hefegene verfügen im Gegensatz zu Vertebraten außerdem über einen ganzen Satz an Polyadenylierungsstellen, die bei Mutationen der verschiedenen Signalsequenzen alternativ verwendet werden (Aranda *et al.*, 1998; Irmiger *et al.*, 1991). Interessant ist weiterhin, dass für die 3'-Prozessierung mancher Hefegene auch die Sekundärstruktur der mRNA eine Rolle zu spielen scheint (Sadhale und Platt, 1992). So konnte im *MFA1*-Gen der Hefe eine Interaktion der 5'- und 3'-untranslatierten Region über einen sehr langen Bereich gefunden werden. Nur wenn man eine Schleifenbildung der RNA voraussetzt, könnte sich diese Interaktion ausbilden (Doktycz *et*

al., 1998). Dies würde auch erklären, dass bestimmte Polyadenylierungsstellen unabhängig von ihrer Orientierung funktionieren (Aranda *et al.*, 1998; Peterson und Myers, 1993).

Graber und Mitarbeiter postulierten anhand von computergestützten Versuchen an mehr als 20.000 ESTs (3'-expressed sequence tags), dass nicht allein die Abfolge der Nukleotidbausteine auf der mRNA für einen korrekten Schnitt und anschließende Polyadenylierung von Bedeutung ist, sondern vielmehr das Zusammenspiel von mehreren Sequenzen, die nicht notwendigerweise konserviert sein müssen, an die die jeweiligen Proteinfaktoren binden können (Graber *et al.*, 1999b). Ein solch komplexes Polyadenylierungssignal ist im Gegensatz zu einem einzelnen, definierten Polyadenylierungssignal weit weniger anfällig, durch Mutationen verändert zu werden und anschließend nicht mehr funktionsfähig zu sein. In jüngster Zeit wurde sogar ein Autoregulationsmechanismus der Polyadenylierung gefordert. So werden differenzielle Polyadenylierungsstellen für die Genexpression des „suppressor of forked“ [su(f)] Gens aus *D. melanogaster* benutzt. Das su(f)-Wildtypprotein, das zu einem 3'-Prozessierungsfaktor in Hefe und in höheren Eukaryonten homolog ist, reguliert seine eigene Expression, indem es die Bildung eines verkürzten su(f)-Transkriptes durch Polyadenylierung innerhalb eines Introns anregt. Dieses Produkt ist nicht funktionsfähig und verhindert damit einen möglichen Überschuß an su(f)-Protein in der Zelle. (Audibert und Simonelig, 1998).

Als im Jahre 1996 die ersten Veröffentlichungen über 3'-Prozessierungsfaktoren, die zwischen der Hefe und Säugetieren konserviert sind, erschienen (Chanfreau *et al.*, 1996; Jenny *et al.*, 1996; Stumpf und Domdey, 1996), herrschte große Überraschung, denn nach den bis zu diesem Zeitpunkt entdeckten Divergenzen auf mRNA-Ebene hielt man derartige Übereinstimmungen nicht für möglich. Mittlerweile sind wahrscheinlich alle an der mRNA-3'-Prozessierung beteiligten essentiellen Faktoren charakterisiert, von denen die meisten über ein homologes Gegenstück in höheren Eukaryonten verfügen. Es zeigt sich aber zunehmend, dass der Reaktionsmechanismus des endonukleolytischen Schnittes und der daran anschließenden Polyadenylierung nicht so hoch konserviert ist, wie die Proteinfaktoren es vermuten ließen.

Der endonukleolytische Schnitt in Vertebraten involviert sechs Komponenten, die durch biochemische Trennungsvorgänge identifiziert wurden: Die aus mehreren Untereinheiten bestehenden Schneidefaktoren I und II [C]leavage factor (CF I_m / II_m), wobei das m für das englische Wort mammalian = Säugetier- steht, um Verwechslung mit dem

Hefesystem zu vermeiden (Rueggsegger *et al.*, 1996)], den „cleavage and polyadenylation specificity factor“ (CPSF), den „cleavage stimulatory factor“ (CstF) und die Poly(A)-Polymerase (PAP), wohingegen die Polyadenylierung die Poly(A)-Polymerase, CPSF, sowie das Poly(A)-bindende Protein (PAB II) benötigt. Im Gegensatz hierzu benötigt die Hefe nur fünf Faktoren, die durch chromatographische Trennungen nachgewiesen werden konnten (Chen und Moore, 1992). Die Schneidefaktoren CF I_y und II_y (y bezeichnet in diesem Fall das englische Wort yeast = Hefe) erkennen die Prozessierungssignale der mRNA und führen anschließend den endonukleolytischen Schnitt aus. Für die darauffolgende Polyadenylierung sind CF I_y, der Polyadenylierungsfaktor PF I, ein einzelnes Polypeptid, die Poly(A)-Polymerase, sowie das Poly(A)-bindende Protein (Minvielle-Sebastia *et al.*, 1997) notwendig. Einen Überblick über die beteiligten Faktoren, ihre Untereinheiten und ihre Homologien zeigt Tabelle 1.

Faktor	Beteiligt an	Größe	Name des Gens	Essentiell?	Homologe Komponente aus Säugetierzellen (% Identität)
CF IA	Schnitt und Polyadenylierung	76 kDa	<i>RNA14</i>	Ja	CstF-77 (24 %)
		72 kDa	<i>PCF11</i>	Ja	hPcf11 (de Vries <i>et al.</i> , 2000)
		50 kDa	<i>CLP1</i>	Ja	hClp1 (de Vries <i>et al.</i> , 2000)
		38 kDa	<i>RNA15</i>	Ja	CstF-64 (43 %)
Pab1	Polyadenylierung	70 kDa	<i>PAB1</i>	Ja	PAB1 (51 %)
CF IB	Schnitt und Polyadenylierung	73 kDa	<i>HRP1</i>	Ja	-
CF II	Schnitt und Polyadenylierung	150 kDa	<i>CFT1</i>	Ja	CPSF-160 (24 %)
		105 kDa	<i>CFT2</i>	Ja	CPSF-100 (24 %)
		100 kDa	<i>BRR5</i>	Ja	CPSF-73 (53 % über die ersten 500 Aminosäuren)
		90 kDa	<i>PTA1</i>	Ja	-
PF I	Polyadenylierung	58 kDa	<i>PFS1</i>	Ja	-
		55 kDa	<i>FIP1</i>	Ja	-
	Schnitt und Polyadenylierung	53 kDa	<i>PFS2</i>	Ja	-
		24 kDa	<i>YTH1</i>	Ja	CPSF-30 (40 %)
Pap1	Polyadenylierung	64 kDa	<i>PAP1</i>	Ja	PAP (47 %)

Tab.1: Übersicht der in die beiden Schritte der Hefe mRNA-3'-Prozessierung involvierten Komponenten und deren Untereinheiten. Zusätzlich angegeben sind die Größen der jeweiligen Untereinheiten, das hierfür codierende Gen, sowie der Phänotyp bei Deletion. Die homologen Faktoren aus Säugetierzellen sind zusammen mit dem Grad ihrer Identität in Prozent (soweit bekannt) aufgelistet. Da CF II und PF I wie in einigen Veröffentlichungen beschrieben, chromatographisch nicht voneinander getrennt werden konnten, werden diese beiden Fraktionen auch unter dem Namen CPF (für cleavage and polyadenylation factor) zusammengefaßt (Ohnacker *et al.*, 2000).

Obwohl in den letzten fünf Jahren die meisten der hier aufgelisteten Proteinfaktoren neu identifiziert wurden (1996 waren neben der Poly(A)-Polymerase nur Rna14, Rna15, sowie Fip1 bekannt), konnte noch immer kein Mechanismus der mRNA-3'-Prozessierungsreaktion gefunden werden; es war bisher nicht einmal möglich, einen stabilen Prozessierungskomplex zu isolieren (Wahle und Ruegsegger, 1999). Nichtsdestotrotz soll der Versuch unternommen werden, ein Modell zu postulieren, das anhand von Protein-Protein-Interaktionen und RNA-Bindungen entwickelt wurde. Da einige der veröffentlichten Daten widersprüchlich sind, kann bei einem derartigen Modell nicht allen Angaben Rechenschaft gezollt werden.

Der erste Schritt der mRNA-3'-Prozessierung dürfte die Erkennung und Bindung der jeweiligen Faktoren an definierte mRNA-Elemente sein. Für einige Untereinheiten der 3'-Prozessierungsfaktoren konnten auch RNA-Bindungsdomänen identifiziert werden, so für Hrp1, Rna15, Yth1 und das Poly(A)-bindende Protein Pab1. Die exakten Bindungsstellen sind allerdings auch aufgrund der Degeneration der RNA-Signalsequenzen noch nicht näher beschrieben worden, es ist aber bekannt, dass Hrp1 nur in Abhängigkeit eines Effizienzelements an RNA binden kann (Kessler *et al.*, 1997), wohingegen andere Daten Hrp1 eine Rolle in der Stabilisierung des Komplexes durch Bindung an die Poly(A)-Stelle zusprechen (Minvielle-Sebastia *et al.*, 1998). Dies könnte bedeuten, dass es nach dem Schnitt eventuell eine Reorganisation der Faktoren gibt, so wie im Modell der Abb. 2 gezeigt, oder dass mehrere Bindungsstellen für Hrp1 auf der mRNA lokalisiert sind, die je nach vorhandenem Transkript benutzt werden.

Auch Rna15 besitzt eine RNA-Bindungsstelle und zeigt Präferenz für U-reiche RNAs. Es könnte also die U-reichen Bereiche erkennen, die die Poly(A)-Stelle flankieren (s. Abb. 2). Neueste Untersuchungen bestätigen die Bildung eines heterodimeren Komplexes aus Rna14 und Rna15 (Gross und Moore, 2001; Kessler *et al.*, 1996), wobei Rna14 eine Brücke zu Hrp1 bildet. Pcf11 ist wiederum direkt mit Clp1, Rna14 und Rna15 verbunden (Gross und Moore,

2001). Cft2, eine Untereinheit der CF II-Komponente, bindet *in vitro* nur an prä-mRNA-Substrate, die nicht vorgeschritten sind, was bedeuten könnte, dass es die Poly(A)-Stelle selbst erkennt (Zhao *et al.*, 1997).

Keine RNA-Bindung konnte bisher für Cft1 gefunden werden, dessen homologes Gegenstück in Vertebraten (CPSF-160) die hochkonservierte AAUAAA-Sequenz bindet (Jenny *et al.*, 1994; Keller *et al.*, 1991). Es könnte aber durchaus sein, dass diese Bindung zu schwach ist, um *in vitro* detektierbar zu sein. Auch die Bindung von rekombinantem CPSF-160 (rCPSF-160) allein an die AAUAAA-Sequenz ist sehr schwach und benötigt das Zusammenspiel des kompletten CPSF-, sowie auch des CstF-Faktors (Moore *et al.*, 1988), was darauf hindeutet, dass die anderen Untereinheiten für die Erkennung der Bindungsstelle von Bedeutung sind. Diese Hypothese ist auf das Modell der Hefefaktoren in Abb. 2 übertragen worden.

Es ist nicht bekannt, wie oder wodurch nach der Assoziation der erwähnten Faktoren auf der prä-mRNA der endonukleolytische Schnitt erfolgt. Es ist aber wahrscheinlich, dass nach erfolgtem Schnitt einige der bis zu diesem Zeitpunkt beteiligten Faktoren die mRNA verlassen und nun die Polyadenylierungsfaktoren, wie z.B. die Poly(A)-Polymerase, die nur für die Polyadenylierungsreaktion benötigt wird, rekrutiert werden (Lingner *et al.*, 1991a; Lingner *et al.*, 1991b). Eine bedeutende Rolle spielen hierbei die beiden Faktoren Fip1 und Yth1. Fip1 verbindet wahrscheinlich durch Interaktion mit Rna14 den Schneide- und den Polyadenylierungskomplex (Preker *et al.*, 1995); außerdem ist es der einzige bisher identifizierte Faktor, der direkt an die Poly(A)-Polymerase bindet (Zhelkovsky *et al.*, 1998).

Gleichzeitig kann er diese aber auch in ihrer Funktion inhibieren. Neueste Ergebnisse lassen vermuten, dass nach erfolgtem Schnitt diese Inhibierung durch Konformationsänderung von Fip1 aufgehoben wird und die Poly(A)-Polymerase dann beginnt, an das 3'-Ende der mRNA Adenosinreste anzufügen (Helmling *et al.*, 2001). Moore und Mitarbeiter vermuten, dass das Signal für den Inaktivierungsstop der Poly(A)-Polymerase von Yth1 über die Vermittlung von Fip1 initiiert wird (Helmling *et al.*, 2001). Dies liegt nahe, wenn man sich vor Augen führt, dass Yth1 in der Lage ist, RNA in der Nähe der CS zu binden (Barabino *et al.*, 1997), eine Rolle im Schneideprozess spielt (Barabino *et al.*, 2000) und direkt mit Fip1 interagiert (Barabino *et al.*, 1997).

Eine weitere wichtige Rolle scheint das ebenfalls am Schnitt und an der Polyadenylierung beteiligte Pfs2-Protein zu spielen. Keller und Mitarbeiter beschreiben es als einen „propellerähnlichen“-Faktor (Ohnacker *et al.*, 2000), der in der Lage ist, drei Faktoren miteinander zu verbinden: CF I durch Interaktion mit Rna14, CF II durch Wechselwirkung mit Brr5, sowie PF I durch Bindung an Fip1. Das Poly(A)-bindende Protein ist nicht nur im Zellkern an den Poly(A)-Schwanz assoziiert, es verläßt diesen auch zusammen mit der reifen mRNA und gelangt ins Cytoplasma. Ihm wird auch eine Rolle in der Translationsinitiation zugeschrieben (Tarun und Sachs, 1996).

Auftretende Fehler in diesem komplexen Mechanismus der mRNA-3'-Prozessierung, sei es durch Mutationen auf mRNA-Ebene oder durch nicht-funktionelle Proteinfaktoren, können zu verändertem Wachstum, Entwicklung und Lebensfähigkeit der betreffenden Zelle führen. Die Depletion eines der an der 3'-Prozessierung beteiligten Proteine, z.B. CstF-64, das in mehrzelligen Organismen (Metazoen) eine mRNA-Signalsequenz erkennt und bindet, führt zu Zellzyklusarrest und sofortigem apoptotischem Zelltod (Takagaki und Manley, 1998). Krankheiten, die mit einer fehlerhaften 3'-Prozessierung in Zusammenhang stehen, sind die oculopharyngeale Muskeldystrophie, die bei Erkrankten zu Lähmungen vor allem im Bereich des Gesichts führt. Untersuchungen ergaben, dass das Poly(A)-bindende Protein II (PAB II), welches an den Poly(A)-Schwanz bindet, an seinem N-terminalen Ende über einen erheblich längeren Alaninanteil verfügt als das Wildtypprotein. Dies wird hervorgerufen durch zusätzliche GCG-Wiederholungen in dem Gen, das für PAB II codiert. Im Gegensatz zu dem Wildtypgen, das nur über sechs GCG-Wiederholungen verfügt, konnten in dem mutierten PAB II-Gen bis zu 13 registriert werden (Brais *et al.*, 1998). Da Alanin eine sehr hydrophobe Aminosäure ist, wird vermutet, dass es aufgrund dieser Anhäufung von Alaninresten zu Dimerisierungen und Oligomerisierungen des PABII-Proteins kommt, die im Nukleus von Muskelzellen abgelagert werden und lange Filamente bilden.

Punktmutationen in der hochkonservierten AAUAAA-Polyadenylierungsstelle des $\alpha 2$ -Globingens verhindern einen korrekten endonukleolytischen Schnitt, das Resultat sind verlängerte, instabile mRNA-Transkripte, die vermutlich nicht ins Cytoplasma transportiert werden. Patienten mit diesem Gendefekt weisen einen erheblich geringeren Anteil an $\alpha 2$ -Globin auf, ihr Hämoglobin kann dadurch nicht korrekt gebildet werden und es kommt meist zum intrauterinen Tod des Individuums, auf jeden Fall aber zu schweren Anämien.

Dieses Krankheitsbild bezeichnet man als Thalassämie (Higgs *et al.*, 1983; Orkin *et al.*, 1985).

Seit der Entwicklung eines *in vitro* Systems, in dem der endonukleolytische Schnitt einer exogen zugeführten prä-mRNA getrennt von der Polyadenylierung untersucht werden kann, wurden bedeutende Fortschritte im Verständnis der mRNA-3'-Prozessierung erzielt (Butler *et al.*, 1990; Moore und Sharp, 1985), der konkrete Mechanismus der biochemischen Abläufe während der 3'-Prozessierung konnte bislang jedoch noch immer nicht aufgeklärt werden. Vor kurzem ist es jedoch zum ersten Mal gelungen, einen Faktor (CF IA/B) mit sämtlichen rekombinant hergestellten Untereinheiten zu ersetzen (Gross und Moore, 2001). Dies dürfte einer der entscheidenden Fortschritte in der Entschlüsselung der mRNA-3'-Prozessierung in der Hefe *S. cerevisiae* sein.

Zielsetzung

Anhand einer Datenbankanalyse konnte eine interessante Sequenzähnlichkeit des uncharakterisierten offenen Leserahmens YOR179c der Bäckerhefe *S. cerevisiae* zu einem bereits charakterisierten 3'-Prozessierungsfaktor (Brr5) aus demselben Organismus gefunden werden. Dies ließ die Vermutung zu, dass es sich bei diesem offenen Leserahmen um einen neuen mRNA-3'-Prozessierungsfaktor handeln könnte. Im Zuge dieser Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob der offene Leserahmen YOR179c exprimiert wird. Falls dies der Fall wäre, sollte seine potentielle Beteiligung an der mRNA-3'-Prozessierung untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank	WTC Binder
Elektroblot-Apparatur	BioRad
Elektrophoreseapparaturen	Harnischmacher
Elektroporator	BioRad Gene Pulser
Entwicklermaschine	Amersham Hyperprocessor
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss; Laser Science inc.
Filme	Kodak: X – Omat, XAR 5
Gefrierschränke	Forma Scientific
Geldokumentation	Stratagene Eagle Eye II
Geltrockner	BioRad
Handcounter	Berthold LB 122, LB 1200
Heizblöcke	Eppendorf Thermostat
	Werkstatt Eigenbau
Magnetrührer	IKA-Combimag REO
Mikromanipulator	MSM System, Singer Instruments
Mikroskop	Olympus CH
pH-Meter	Bachofer pH-Meter 761 Calimatic
Pipetten	Gilson Pipetman P2, P20, P200 und P1000
	Molecular Dynamics Storm
Phosphorimager	UVIKON Spektrometer, Kontron
Photometer	Eppendorf-Thermomixer 5437,
Reaktionsgefäß-Schüttler	Sorvall SS34, GS3
Rotoren	Beckman F3602 S4180
	Beckman SW60Ti

Schüttelinkubatoren	Kühner ISF-1-V
Sonifier	Branson Sonifier W 250
Spannungsgeräte	Consort E 455, E 734
Speed Vac	Bachofer
Sterile Werkbank	BDK UVF 6.12S
Szintillationszähler	Beckman LS 6000 TA
Thermocycler (PCR-Maschine)	Perkin Elmer
Ultrazentrifuge	Beckmann
UV-Illuminatoren	Bachofer (254nm, 366nm)
Vortex	Scientific Industries Vortex-Genie
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5417
	Beckman GS-15R
	Sorvall RC5C, RC5B
	Sigma 2K15

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamidlösung 40 %, Liqui Gel	ICN
Acrylamidlösung 30 % Rotiphorese Gel 30	Roth
Agarose	Gibco BRL
4-(2-Aminoethyl)-Benzylsulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF)	ICN
Aminosäuren	Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniak	Riedel de Haën
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Roche Diagnostics GmbH
Aprotinin	Roche Diagnostics GmbH
Bacto Agar	Difco

Bacto Pepton	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Benzamidin	Sigma
Borsäure	Merck
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roche Diagnostics GmbH
BSA, Fraktion V	Roche Diagnostics GmbH
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Riedel de Haën
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
4',6-diamidino-2-phenylindolhydrochlorid (DAPI)	Sigma
Deoxyribonukleosidtriphosphate	Roche Diagnostics GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH
Essigsäure	Riedel de Haën
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Titriplex)	Merck
Formamid	Merck
Galaktose	ICN
Geneticin (G418-Sulfat)	Gibco
Glukose	Merck
Glycerin	Roth
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
Harnstoff	Merck
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	BIOMOL
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	JT Baker
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roche Diagnostics GmbH
Kaliumacetat	Merck

Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Lithiumacetat	Merck
Lithiumchlorid	Sigma
Leupeptin	Roche Diagnostics GmbH
Magermilchpulver	Frema
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Merck
Methanol	JT Baker
β -Mercaptoethanol	Merck
[3-(N-morpholino)-propansulfonsäure] (MOPS)	Sigma
Mounting Medium	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BDH
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natronlauge	Merck
Ni ²⁺ -Nitrilotetraessigsäure (NTA)-Agarose	Qiagen
Nonidet P40 (NP-40)	Sigma
Phenol	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
<u>P</u> iperazin-1,4-bis(2- <u>e</u> thansulfon <u>s</u> äure) (PIPES)	Roth
Polyethylenglykol (PEG) 4000, 8000	Serva
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20®)	Sigma
Protein A-Sepharose	Sigma
Ribonuklease-Inhibitor (aus humaner Plazenta)	Promega
RNA-Cap-Struktur-Analogon [m ⁷ G(5')ppp(5')G]	New England Biolabs

Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics GmbH
Ribi Adjuvant System (RAS)	Sigma
Roti-Phenol/Chloroform Lösung	Roth
Saccharose	Merck
Salzsäure (1 M)	Merck
Salzsäure (konz. ~ 37 %)	Riedel de Haën
Tetrazyclin	Roche Diagnostics GmbH
N-Tosyl-L-Phenylalaninchlormethylketon (TPCK)	Sigma
Transfer RNA (tRNA) aus <i>E. coli</i>	Roche Diagnostics GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris)	Riedel de Haën
Triton® X-100	Sigma
Yeast Extract	Difco
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Difco
Xylencyanol	BioRad

2.1.3 Radiochemikalien

α -[³² P]-ATP	NEN Life Science Products
α -[³² P]-UTP	NEN Life Science Products
α -[³² P]-dATP	NEN Life Science Products
α -[³⁵ S]-dATP	NEN Life Science Products
[³² P]-pCp	NEN Life Science Products

2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm; (CIP)	New England Biolabs
DNA-Polymerase I (Klenow Fragment)	Roche Diagnostics GmbH
Glusulase	Du Pont de Nemours
Lysozym	Roche Diagnostics GmbH

Lyticase	Sigma
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Roche Diagnostics GmbH, MBI Fermentas
RNase A	Roche Diagnostics GmbH
RNase H	Roche Diagnostics GmbH
RNase T1	Roche Diagnostics GmbH
SP6-RNA-Polymerase	Stratagene
Taq/Pwo-DNA-Polymerase Mix	Roche Diagnostics GmbH
T3-RNA-Polymerase	Stratagene
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	Promega
T4-RNA-Ligase	New England Biolabs
T7-RNA-Polymerase	Stratagene
Zymolyase 20.000	Seikagaku Corporation

2.1.5 Antikörper

Anti-Kaninchen IgG (Fc), konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	Promega
Anti-Brr5	Eigenproduktion*
Anti-Cft1	Eigenproduktion*
Anti-Cft2	Eigenproduktion*
Anti-Fip1	Eigenproduktion*
Anti-Pap1	Eigenproduktion*
Anti-Rna14	Eigenproduktion*
Anti-Rna15	Eigenproduktion*
Anti-Yth1	Eigenproduktion*

* => Eigenproduktion im Labor Prof. Domdey in Zusammenarbeit mit der AG Wolf

2.1.6 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

2.1.6.1 Lösungen und Puffer

10x TBE	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA
10x TGS	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
10x M9	39 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 30 g KH_2PO_4 10 g NH_4Cl H_2O ad 1.000 ml
20x PBS	13 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM KH_2PO_4 5 mM KCl 150 mM NaCl H_2O ad 1.000 ml (pH 7,2 bis 7,4)
20x SSC	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat (pH 7,0)
10x TE	100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 7,5)

Dialysepuffer D-50	20 mM Tris-HCl (pH 7,9) 0,2 mM EDTA 50 mM KCl 20 % (v/v) Glycerin
5x Saccharose-Auftragspuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 40 % Saccharose
Formamid-Auftragspuffer	98 % (v/v) Formamid, deionisiert 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

2.1.6.2 Kulturmedien

LB (Luria Bertani)-Medium	1 % (w/v) Bacto Trypton 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (nur für Festmedien)
YPD (Yeast-Extract-Pepton-Dextrose)-Medium	1 % (w/v) Bacto Yeast Extract 2 % (w/v) Bacto Pepton 2 % (w/v) Glukose 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (nur für Festmedien)
TBG-Medium	5,0 g Bacto Trypton 2,5 g NaCl H ₂ O ad 500 ml

TBG-M9-Medium	440 ml TBG 50 ml 10x M9 0,5 ml 1 M MgSO ₄ (sterilfiltriert) 10 ml 20 % (w/v) Glukose jeweiliges Antibiotikum
Hefe-Selektionsmedium	0,67 % (w/v) YNB 2 % (w/v) Glukose 0,1 % (w/v) Aminosäuremix
Aminosäuremix	
100x Ura ⁻ -Mix	200 mg L-Histidin 600 mg L-Leucin 400 mg L-Tryptophan H ₂ O ad 100 ml
100x Trp ⁻ -Mix	600 mg L-Leucin 200 mg L-Histidin 200 mg Uracil H ₂ O ad 100 ml
100x His ⁻ -Mix	600 mg L-Leucin 400 mg L-Tryptophan 200 mg Uracil H ₂ O ad 100 ml
100x Leu ⁻ -Mix	200 mg L-Histidin 400 mg L-Tryptophan 200 mg Uracil H ₂ O ad 100 ml

Minimal Sporulationsmedium	1 % Kaliumacetat 2 % Bacto Agar (nur für Fest- medien)
Sporulationsmedium für auxotrophe Stämme	1 % Kaliumacetat 0,1 % (w/v) Bacto Yeast Extract 0,05 % (w/v) Glukose 2 % Bacto Agar (nur für Fest- medien) 0,025 % der Aminosäure, für die der Stamm defizient ist

2.1.7 Molekularbiologische Hilfsmittel

Dialysefilter (0,025 µm Durchmesser)	Millipore
Elektroporationsküvetten	BioRad, Eurogentec
Gelfiltrationssäulen	Mikrospin-S200, Pharmacia
Glasperlen (0,25-0,5 mm Durchmesser)	Roth
Mikrotiterplatten (versch. Größen)	Greiner
Nitrocellulosemembranen (0,45 µm Durchmesser)	Protran, Schleicher&Schull
Nylonmembranen	Hybond-N+, Amersham
Petrischalen	Greiner
Sterilfilter (0,22 µm Durchmesser)	Millipore
Verstärkerfolien	DuPont
Whatman-2MM Papier	Bender&Hobein

2.1.8 Hefe- und Bakterienstämme

2.1.8.1 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Quelle
IL 993-5C	Mata, ilv5	Wolf <i>et al.</i>	AG Feldman, Genzentrum, München
KL114-4A	Mata, his1, trp2	Wolf <i>et al.</i>	AG Feldman, Genzentrum, München
CenPK2a	Mata, leu2-3, 112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL	Prof.K.-D. Entian, Frankfurt	Arbeitskreis
CenPK2α	Mata, leu2-3, 112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL	Prof.K.-D. Entian, Frankfurt	Arbeitskreis
CenPK2αα	Mata, Mata, leu2-3, 112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL	Prof.K.-D. Entian, Frankfurt	Arbeitskreis
HKY1	Mata, Yor179c::G418, leu2-3, 112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL	diese Arbeit	Arbeitskreis
HKY2	Mata, Yor179c::G418, leu2-3, 112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL	diese Arbeit	Arbeitskreis
USY3	CenPK2a G418 x CenPK2α G418	diese Arbeit	diese Arbeit
YSN378	Mata, Mata, brr5Δ::LEU/BRR5, his3Δ, ura3Δ, lys2, leu2, ade2	Science 274, S. 1511-1514	C. Guthrie, UCSF, San Francisco
EGY 48	Mata, try1', ura3, his3, Leu2::pLexAop6-Leu2	Zervos <i>et al.</i> 1993	AG Feldmann, Genzentrum, München

2.1.8.2 Bakterienstämme

E.coli XL1 Blue (Bullock *et al.*, 1987)

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'pro AB lacI^qZΔM15Tn10(tet)] (Stratagene)

E.coli BL21(DE3) (Studier und Moffat, 1986)

[F'ompTr_B-m_B-(DE3)] (Novagen)

2.1.9 DNA- und Proteinlängenstandards

2.1.9.1 DNA-Längenstandards

1.) Längenstandard VI Roche Diagnostics GmbH
 (pBR328 – DNA geschnitten mit *Bgl*II und *Hin*fI)

2.) 1 Kilobasen (kb) DNA-Leiter Gibco BRL
 Fragmentlängen (bp) der DNA Molekulargewichtsstandards

Boehringer Marker VI	kb-DNA-Leiter
2.176	12.216
1.766	11.198
1.230	10.180
1.033	9.162
653	8.144
517	7.126
453	6.108
394	5.090
298	4.072
234	3.054
220	2.036
154	1.636
	1.018
	517*
	506*
	396*
	344*
	298*
	220*
	201*
	154*
	134*
	75*

* *Hin*fI Fragmente des Vektors; diese können radioaktiv markiert werden

2.1.9.2 Protein-Längenstandards

- 1.) SDS-PAGE Protein-Standard, niedriger Molekulargewichtsbereich BioRad
- 2.) SDS-PAGE Protein-Standard, hoher Molekulargewichtsbereich BioRad

Zusammensetzung und ungefähre Molekulargewichte des vorgefärbten Kaleidoskop-Markers

Protein	Molekulargewicht in Dalton	Protein Standard niedriger Bereich	Protein Standard hoher Bereich
Myosin	200.000		X
β-Galactosidase	116.250		X
Phosphorylase B	97.400	X	X
Rinderserumalbumin	66.200	X	X
Ovalbumin	45.000	X	X
Carboanhydrase	31.000	X	
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	21.500	X	
Lysozym	14.400	X	

- 3.) Vorgefärbter Kaleidoskop-Marker BioRad

Zusammensetzung und ungefähre Molekulargewichte des vorgefärbten Kaleidoskop-Markers

Protein	Farbe	Molekulargewicht in Dalton
Myosin	Blau	202.000
β-Galactosidase	Magenta	133.000
Rinderserumalbumin	Grün	71.000
Carboanhydrase	Violett	41.800
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	Orange	30.600
Lysozym	Rot	17.800
Aprotinin	Blau	6.900

2.1.10 Plasmide

Plasmid-Bezeichnung	Referenz	Quelle
pBluescript II KS ⁺ , KS ⁻	Alting Mees und Short, 1989	Stratagene
pEG202	Ruden <i>et al.</i> , 1991	AG Feldmann, Genzentrum, München
pJG4-5	Gyuris <i>et al.</i> , 1993	AG Feldmann, Genzentrum, München
pSH18-34	West <i>et al.</i> , 1984	AG Feldmann, Genzentrum, München
pAH+		AG Feldmann, Genzentrum, München
pRS315	Sikorski und Hieter, 1989	AG Feldmann, Genzentrum, München
pRS316	Sikorski und Hieter, 1989	AG Feldmann, Genzentrum, München
pGFP-N-FUS	Mumberg <i>et al.</i> ,	AG Feldmann, Genzentrum, München
pET15b	Chen und Hai, 1994	Novagene
pFA6a-kanMX4	Wach und Brachat, 1994	AG Feldmann, Genzentrum, München
pGEX-2T-B	Smith und Johnsson, 1988	AG Meisterernst, Genzentrum, München

2.1.11 Oligonukleotide

Oligodeoxyribonukleotide

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
Yor179cI	Klonierung	5' -ACT CGA GCA TAT GGA TTT ACC CAA GGA CAA A-3'
Yor179cII	Klonierung	5' -AGG TGG ATC CTC ATC AGC AGC ACA ATG GAG TTG TTA A-3'
pAH-Yor-Xba	Klonierung	5' -CTA GTC TAG ATC ATC AGC ACA ATG G-3'
Yor-PEG1	Klonierung	5' -CCG GAA TTC ATG GAT TTA CCC AAG GAC-3'
US8 YorDisII	Gendisruption	5' -GGG GAT CCG TCG ACC TGC AGC GTA CGT TTA CGT TAT AAT GCA AAT TAC GTG AGC CGC TC-3'
US10 YorDisIV	Gendisruption	5' -GTT TAA TCG TGC TCG AAT TCA TCG ATA CGT CAT TAC TTA CCT TTT TAT TTT CTT GTA TGT GC-3'
US11 YorDisSeqI	Sequenzierung	5' -TTC GGA TGT TCT TCT TCG GG-3'
US12 YorDisSeqII	Sequenzierung	5' -TGC GTT CTC CGC CCC CGC AC-3'
US15 YorDis	Gendisruption	5' -GCT CTA GAC CTC TTA AGG TTG AAA TCC GC-3'
US16 YorDis	Gendisruption	5' -GGG GTA CCG AGG GAT GCA TAT GAA ATC TAG CC-3'
US20 YorDisSBI	Southern-Blot	5' -TTC TTC CAG ACA AGA GGC-3'
US21 YorDisSBII	Southern-Blot	5' -CGG CTA GAT TTC ATA TGC-3'
Cycl-preI	Klonierung	5' -ATT TAG GTG ACA CTA TAG GGG AGA CCC AAG CTT GAT-3'
Cycl-preII	Klonierung	5' -GGA ATT CCA TAT GAA ATA TAA ATA ACG TTC TTT AA-3'
US24 YorpGFPI	Klonierung	5' -ATC CCC CGG GAT GGA TTT ACC C-3'
US25 YorpGFPII	Klonierung	5' -GAG AAG CTT TCA TCA GCA CAA TGG-3'
FlankBrr5KpnI	Klonierung	5' -GCC GGT ACC AAT GGT AAG TAC TCT CC-3'
FlankBrr5BamHI	Klonierung	5' -CGC GGA TCC GAC GCA AAG CCC AAC TCC-3'
Y100-3	Deletion	5' -ACT CGA GCA TAT GCT GCA AAG TGG GTT ATC-3'
Y100-5	Deletion	5' -AGG TGG ATC CTC ACA TAT TGT TGA AGT CAA TCT TAG-3'
FlankBrr5XhoI	Deletion	5' -GGC GAG CTC GCC AAT GGT AAG TAC TCT CC-3'
Brr5Mut1	Deletion	5' -CGG GAT CCT AAA AAC AGT TAC GC-3'

Brr5Mut2	Deletion	5' -CGG GAT CCA ATC AAT TTA CCT GTA TTG G-3'
Brr5YorMut1	Klonierung	5' -GCG GAT CCC TTC ATA TTG TCC-3'
Brr5YorMut2	Klonierung	5' -GAC TTC AAC AAT ATG AAG CTG ATT GAT TG-3'
Brr5YorMut1/SeqI	Sequenzierung	5' -TTA CAA ATG TTT GGA GAG GC-3'
Brr5YorMut2/SeqII	Sequenzierung	5' -AAA GAG GAA ACT ATA ACT GGA G-3'
Brr5YorMutI/II/Seq	Sequenzierung	5' -AAA GTA GTC TAC TTA GTA TGC G-3'
Brr5loopMut1	Mutation	5' -TTG AAG TAG ATC TTG AAT TTC AAG GTG TC-3'
Brr5loopMut2	Mutation	5' -ATG AAT GAC ACT GTA GCA GAC TCC-3'
US26 MutaT->V	Mutation	5' -TGG TTG TCA TAG GTA AAA GCA CTG C-3'
US27 MutaK->N	Mutation	5' -TAG GTG ACA GCA CTG CTA AGA TTG ACT TC-3'
US28 MutaK->H	Mutation	5' -TAG GTC ACA GCA CTG CTA AGA TTG ACT TC-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturtechniken

2.2.1.1 Steriles Arbeiten mit Bakterienkulturen und mit *Saccharomyces cerevisiae*

Alle Arbeiten mit Bakterien oder Hefen wurden unter einer sterilen Werkbank oder direkt neben einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Kunststoffgegenstände, wie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen, wurden autoklaviert. Glaswaren wurden für drei Stunden auf 180°C erhitzt. Platinösen wurden in offener Flamme durch Ausglühen sterilisiert, andere hitzebeständige Geräte oder Gefäße durch kurzes Abflammen keimfrei gemacht. Die Anzucht der Bakterien- und Hefekulturen erfolgte in sterilen Glasgefäßen, üblicherweise in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben, sowie in mit β -Strahlen vorbehandelten Plastikröhrchen. Die verwendeten Nährmedien wurden vor Zugabe des jeweiligen Antibiotikums sterilisiert. Lösungen, wie z.B. 20 % Glukose in Wasser, die nicht autoklaviert werden können, wurden sterilfiltriert.

2.2.1.2 Anzucht von Bakterienkulturen

Das Animpfen von Flüssigkulturen erfolgte mit einer sterilen Platinöse oder sterilen Zahnstochern. Als Kulturmedium wurde LB verwendet, das zur Selektion auf bestimmte Antibiotika-Resistenzen das entsprechende Antibiotikum enthielt. Die Resistenzen konnten entweder durch den Bakterienstamm selbst (*E. coli* XL1 Blue => Tetracyclin Resistenz) oder durch ein in den Bakterienstamm transformiertes Plasmid vermittelt werden. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in Flüssigkultur unter guter Belüftung bei 37°C in einem Schüttler bei 160-180 Umdrehungen pro Minute. Auf Festmedien wurden *E. coli*-Stämme mit einer sterilen Platinöse im Verdünnungsausstrich überimpft und bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

Antibiotika:

Ampicillin 100 µg/ml
Tetracyclin 12,5 µg/ml

2.2.1.3 Anzucht von Hefekulturen

Zur Vermehrung von *S. cerevisiae* in Flüssigkultur wurde diese unter guter Belüftung bei 30°C in einem Schüttler bei 160–180 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Als Vollmedium wurde YPD-Medium verwendet, als Selektionsmedium hingegen ein Minimalmedium (Aminosäure-Selektionsmedium), dem eine oder mehrere essentielle Aminosäuren nicht beigemischt wurden. Ein zweites Selektionsmedium, das für die Gendisruption des offenen Leserahmens YOR179c verwendet wurde, bestand aus YPD, dem Geneticin (G418) in einer Konzentration von 200 mg/l zugesetzt war. Auf Festmedien wurde *S. cerevisiae* mit einer sterilen Platinöse oder sterilen Plastikösen im Verdünnungsausstrich überimpft und bei 30°C in einem Brutschrank angezogen.

2.2.1.4 Anlegen von Dauerkulturen

Zur Konservierung einzelner Bakterienkolonien wurden 850 µl einer stationären Bakterienkultur steril entnommen und in einem verschraubbaren Reaktionsgefäß (Nunc, 1,5 ml) mit 150 µl sterilem 100 %igem Glycerin gründlich vermischt und bei –80°C gelagert.

Eine Dauerkultur von Hefezellen wurde angelegt, indem der dicht gewachsene Ausstrich einer Hefekolonie von einem Festmedium vollständig abgeschabt und in 1 ml sterilem 50 %igem Glycerin suspendiert wurde. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80°C .

2.2.1.5 Paarung zweier haploider Hefezellen zu einer diploiden Hefezelle

Haploide Hefestämme gehören einem bestimmten Paarungstyp (a oder α) an. Zwei haploide Hefezellen mit unterschiedlichem Paarungstyp können zu einer diploiden Zelle gepaart werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Kreuzung oder Konjugation.

Die zwei Stämme, die gepaart werden sollten, wurden in getrennten Ansätzen in YPD-Medium bis zu einer OD_{600} von 2 vermehrt. Je 200 μl der Zellsuspensionen wurden auf einer YPD-Platte aufeinander getropft. Anschließend wurde die Platte mit Parafilm umwickelt und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Von dem gewachsenen Zellrasen wurden einige Zellen mit einer sterilen Impfüse entnommen und auf einer frischen Platte vereinzelt. Wenn die Stämme unterschiedliche Auxotrophiemarker besaßen (z.B. MATa-Stamm URA^+ , leu^- und MAT α -Stamm $\text{ura}^- \text{LEU}^+$), wurden die Zellen auf Doppelselektionsplatten (Ura^- , Leu^-) ausgestrichen, um so auf diploide Zellen zu selektionieren, die beide Auxotrophien komplementieren konnten. Die Platten wurden 2-4 Tage bei 30°C inkubiert, gewachsene Einzelkolonien gepickt und die Zellen durch Sporulation auf Diploidie getestet.

Hatten die Zellen den gleichen Genotyp oder nur einen unterschiedlichen Auxotrophiemarker, wurde in die jeweiligen haploiden Stämme ein Leerplasmid durch Transformation eingeführt, das den Stämmen die Fähigkeit verlieh, auf zwei unterschiedlichen Selektionsmedien zu wachsen. Anschließend wurde wie oben beschrieben weiterverfahren.

2.2.1.6 Bestimmung des Paarungstyps eines haploiden Hefestammes

Der Paarungstyp eines haploiden Hefestammes (MATa oder MAT α) läßt sich mit sogenannten Testerstämmen, deren Paarungstyp bekannt ist, bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Testerstämme IL993-5C (MAT α , ilv) und KL14-4A (MATa, his1 , trp2)

verwendet. Diese Stämme unterscheiden sich von den zu Untersuchenden durch ihre Auxotrophiemarker. Der IL993-5C Stamm besitzt als Selektionsmarker einen Defekt im ILV2 Gen. Dieses Gen spielt im kombinierten Isoleucin/Valin-Stoffwechsel eine Rolle. Eine aus einem der Testerstäme und dem zu untersuchenden Stamm entstandene diploide Zelle war damit in der Lage, auf synthetischem Nullmedium ohne einen Zusatz von Aminosäuren und Nukleosiden zu wachsen.

Die zwei Testerstäme wurden in je 5 ml YPD-Medium bis zu einer OD_{600} von 4 bis 5 kultiviert. Je 1 ml dieser Kulturen wurde auf Festmedium ohne Zusatz von Aminosäuren und Nukleosiden ausplattiert. Nachdem die Zellsuspension getrocknet war, wurde auf diese eine Suspension des zu untersuchenden Stammes aufgetropft und bei 30°C für 2-4 Tage inkubiert. Trafen Zellen des entgegengesetzten Paarungstyps aufeinander, konnten sich diploide Zellen ausbilden, die in der Lage waren, auf diesem Nullmedium ohne weitere Zusätze zu wachsen. Dazu waren die jeweiligen haploiden Stämme nicht befähigt. Kolonien, die sich auf der Platte mit dem α -Teststamm bildeten, besaßen also den Paarungstyp α ; dementsprechend konnte dem zu untersuchenden Stamm der Paarungstyp a zugeordnet werden, der sich auf der α -Teststamm-Platte entwickelte.

2.2.1.7 Sporulation diploider Hefezellen

Diploide Hefezellen können durch Sporulation einen Ascus mit vier haploiden Sporen bilden. Die Induktion der Sporenbildung erfolgte unter „Hunger“-Bedingungen in Flüssig- oder auf festem Sporulationsmedium (Guthrie und Fink, 1991). Zur Sporulation in Flüssigmedium wurden 10 ml YPD-Medium oder das entsprechende Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 1-2 Tage bei 30°C unter starkem Schütteln (250 Umdrehungen pro Minute) inkubiert. Sobald die Kultur eine OD_{600} von 2-3 erreicht hatte, wurden die Zellen abzentrifugiert (Beckman-Zentrifuge, 4.000 rpm, 5 min) und anschließend in 10 ml Sporulationsmedium resuspendiert. Die Kultur wurde weitere fünf Tage bei 30°C unter starkem Schütteln inkubiert. Die sich innerhalb einer Sporenhülle entwickelnden vier Tochterzellen konnten im Lichtmikroskop anhand ihrer charakteristischen Rautenform erkannt werden. Bei Sporulation auf Festmedium wurde eine Einzelkolonie zuerst auf YPD oder dem entsprechendem Selektionsmedium vermehrt und anschließend auf eine

Sporulationsplatte umgestrichen. Die Platte wurde mit Parafilm umwickelt und 2-4 Tage bei 30°C inkubiert. Die Ausbildung der Asci (= Tetraden) wurde mikroskopisch kontrolliert.

2.2.1.8 Tetradenanalyse (modifiziert nach Olempska-Beer, 1987)

Die Tetradenanalyse wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, um die Auswirkung einer Gendisruption auf die Lebensfähigkeit eines haploiden, disruptierten Hefestammes zu untersuchen. Auch der korrekte Ablauf einer Konjugation konnte damit überprüft werden (s. 2.2.1.5). Zu diesem Zweck wurden nach der Sporulation (Sherman und Hicks, 1991) einige Zellen der Kultur entnommen und in 100 µl sterilem Wasser suspendiert. Um die Sporenhülle zu zerstören, wurden 10 µl des Enzyms Glusulase zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation der Suspension bei 37°C und anschließendem Zentrifugieren (Eppendorf-Tischzentrifuge 14.000 rpm, 30 sek, RT) wurde das Sediment erneut in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen und 40 µl davon an den Rand einer YPD-Platte pipettiert. Mit dem Mikroskop des Mikromanipulators wurde eine Tetrade ausgewählt und die enthaltenen vier Sporen mechanisch mit einer Glasnadel in einer Reihe vereinzelt. Nach Inkubation von 2-3 Tagen konnten die entstandenen Kolonien mit bloßem Auge erkannt werden. Zur Überprüfung des Genotyps wurden die ausgekeimten Sporen auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen oder, nach Suspension in einer Mikrotiterplatte in YPD-Flüssigmedium, aufgetropft. Die Bestimmung des Genotyps konnte nach einer Inkubationsdauer von weiteren 2-3 Tagen bei 30°C analysiert werden.

2.2.1.9 Mikroskopische Analyse eines Gfp-Yor179c-Fusionsproteins

Um das Yor179c-Protein in der Hefezelle zu lokalisieren, wurde ein Fusionskonstrukt kloniert, welches am 5'-Ende das *GFP*-Gen (Gen für das „green fluorescent protein“) und unmittelbar daran anschließend den offenen Leserahmen von *YOR179c* enthielt. Diese Vorgehensweise ermöglichte der Vektor pGFP-N-fus (enthält auxotrophen Ura-Marker), wobei das Konstrukt unter der Kontrolle des induzierbaren *MET25* Promotors stand. Durch Zusatz von 1 mM Methionin in Hefe-Selektionsmedium wird eine basale Transkription

aufrechterhalten, wohingegen bei einem vollständigen Mangel an Methionin im umgebenden Medium der Promotor „angeschaltet“ wird und eine zehnfach erhöhte Transkriptionsrate erzielt werden kann (Mumberg *et al.*, 1994).

Nach Klonierung des offenen Leserahmens YOR179c in den Vektor pGFP-N-fus und daran anschließender Kontrolle durch Sequenzierung wurde das Konstrukt in den Wildtyp-Hefestamm CEN PK2 transformiert. Nach Wachstum einer transformierten Hefekolonie auf synthetischem Ura⁻-Selektionsmedium ohne Methionin wurden die Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, für eine halbe Stunde mit einer DAPI-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Chemikalie - wie Gfp ebenfalls ein Fluorophor - ermöglicht es, DNA im Zellkern und in Mitochondrien „anzufärben“. Diese „Färbung“ beruht auf einer Bindung des Moleküls in den Furchen auf der Oberfläche der DNA-Helix und einer bei Anregung mit der Wellenlänge $\lambda=395$ nm hervorgerufenen Emission von blauem Licht. Die Zellsuspension wurde auf einen Objektträger aufgebracht und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Durch Bestrahlung der Fluorophore werden diese zur Lichtemission angeregt. Da die DAPI-Emission diejenige von Gfp überstrahlen würde, muß ein FITC-Filter, der nur das von Gfp emittierte Licht durchläßt, zwischengeschaltet werden.

DAPI-Lösung

2,5 µg/ml in H₂O

2.2.2 DNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Die Phenol/Chloroform-Extraktion ist eine Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen, die Nukleinsäuren und Proteine enthalten.

Der Reaktionsansatz wurde mit einem Volumen Roti-Phenol/Chloroform-Lösung versetzt, 20 Sekunden auf dem Vortex gemischt und anschließend 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14.000 rpm, RT). Daraufhin wurde die obere wäßrige Phase vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Eventuell noch vorhandenes Phenol/Chloroform verbleibt bei einer nachfolgenden Ethanol-fällung im Überstand. Bei Zugabe von Alkohol (2,5 Volumenteile absoluter Ethanol) kommt es in Gegenwart hoher

Konzentrationen monovalenter Kationen [1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5,5)] zur Aggregation der Nukleinsäure-Moleküle und zur nachfolgenden Präzipitation. In Lösung bleiben dabei niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze. Das Präzipitat (Sorvall-Kühlzentrifuge, 15.000 rpm, 30 min, 4°C) wurde mit 2,5 Volumenteilen 70 %igem Ethanol versetzt, nochmals unter gleichen Bedingungen für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand komplett abgenommen und bis zur vollständigen Entfernung des Ethanols in einer Speed-Vac getrocknet. Die so erhaltene DNA respektive RNA wurde in einem geeigneten Volumen 1x TE-Puffer respektive Wasser aufgenommen und bei –20°C gelagert.

Roti-Phenol/Chloroform-Lösung: Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (v/v)
Gesättigt mit TE-Puffer

1x TE-Puffer 10 mM Tris/HCl (pH 7,5–8,0)
1 mM EDTA-Na₂ (pH 8,0)

2.2.2.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Mini-Präparation von Plasmid-DNA nach der modifizierten „Boiling“-Methode

(modifiziert nach Holmes und Quigley, 1981 und Wilmzig, 1985)

Eine schnelle und effiziente Methode, kleinere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, ist die sogenannte „Boiling“-Präparation von DNA. Hierfür wurden die mit einem Plasmid transformierten *E. coli*-Zellen über Nacht in LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterienzellen in einer Tischzentrifuge für 15 Sekunden abzentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen des Mediums wurde das Sediment in 250 µl Lysis-Puffer suspendiert und 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde auf dem Vortex gut gemischt und 1 Minute im kochenden Wasserbad erhitzt. Hierbei wird die DNA denaturiert. Nach Abkühlung der Lösung (5 Minuten auf Eis) wurden die Zellreste zusammen mit chromosomaler DNA, die an die Zellwand assoziiert vorliegt, durch Zentrifugation sedimentiert (Eppendorf-Tischzentrifuge 14.000 rpm, 15 min, RT) und mit einem Zahnstocher entfernt. Zum plasmidhaltigen Überstand wurden 500 µl 100 %iger Ethanol gegeben, durch mehrmaliges Umschwenken vermischt und 15 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (Bedingungen s. oben, 10 Minuten), mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und schließlich in 40 µl 1x TE aufgenommen.

Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 62,5 mM EDTA 0,4 % (v/v) Triton®X-100 2,5 M LiCl
--------------	---

Midi-Präparation von Plasmid-DNA mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen

Die Präparation größerer Mengen von Plasmid-DNA erfolgte weitgehend nach Anleitung der Firma Qiagen. Für high-copy Plasmide wurden 50 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum verwendet, für low-copy Plasmide bis zu 500 ml Medium. Die jeweiligen Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und ~180 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden daraufhin bei 4.500 rpm für 10 Minuten in einer Hettich-Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Bakterien in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 und vorsichtigem Mischen, wodurch ein Zellaufschluß durch alkalische Lyse erfolgt (Birnboim und Doly, 1979), wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, währenddessen die DNA durch die in Puffer P2 vorhandene Natronlauge denaturiert. Nun wurden noch 4 ml eiskalter Puffer P3 hinzugefügt, wobei wieder vorsichtig umgeschwenkt wurde. Hierbei macht man sich die schnellere Reassoziationskinetik der Plasmid- im Gegensatz zur chromosomalen DNA zunutze, die Plasmid-DNA renaturiert, während die chromosomale DNA, assoziiert an das Kalium-SDS-Salz des Puffers P3, ausfällt. Die Zelltrümmer wurden zentrifugiert (SS34, Sorvall, 13.000 rpm, 4°C, 30 min).

Eine Anionenaustauschersäule (modifizierte Silicagelmatrix, Qiagen) wurde mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert und mit dem Überstand der Zentrifugation beladen. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml des Puffers QC gewaschen und die adsorbierte Plasmid-DNA mit 5 ml QF eluiert. Die in Lösung befindliche DNA wurde mit 3,5 ml 100 %igem Isopropanol gefällt und anschließend durch Zentrifugation (SS34, Sorvall, 13.000 rpm, 4°C, 30 min) sedimentiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in einer Speed-Vac getrocknet. Die erhaltene DNA wurde

in einem geeigneten Volumen, üblicherweise 70 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und anhand einer Restriktionshydrolyse analysiert (s. 2.2.2.16).

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) RNaseA (100 µg/ml)
Puffer P2 (Lysispuffer)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer)	750 mM NaCl 50 mM MOPS (pH 7,0) 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % (v/v) Triton®X-100
Puffer QC (Waschpuffer)	1 M NaCl 50 mM MOPS (pH 7,0) 15 % Isopropanol
Puffer QF (Elutionspuffer)	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) 15 % Isopropanol

2.2.2.3 Plasmidpräparation aus *S. cerevisiae*

Um zu kontrollieren, ob ein Plasmid auch tatsächlich erfolgreich in *S. cerevisiae* transformiert werden konnte, ist meist eine Plasmidpräparation - zusätzlich zu einem Wachstumstest auf Selektionsmedium - nötig.

Hierfür wurden die Zellen einer 10 ml Übernachtskultur des entsprechenden Stammes zentrifugiert (2.000 rpm, 5 min, RT), in 1 ml Wasser suspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das entstandene Zellsediment in 5 Volumenteilen Waschpuffer aufgenommen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Hefezellen in 2 Volumenteilen Lyticase-Puffer aufgenommen und bei 37°C 45 Minuten inkubiert. Mit dem Enzym Lyticase wird die Zellwand der Hefezellen angedaut, die Zellen sphäroblastieren und sind durch eine Erhöhung des osmotischen Druckes im Anschluß leicht zu öffnen. Zu dem Ansatz gab man daraufhin 1/10 Volumen 10 % SDS und stellte diesen für 10 Minuten in einen 65°C heißen Heizblock. Um die Zellen endgültig zu öffnen,

mußte man sie noch mit 4/10 Volumen 5 M Kaliumacetat versetzen und für 30 Minuten auf Eis stellen. Die Mischung wurde anschließend für 20 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, RT) und der erhaltene Überstand mit 1 Volumenteil Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in einer Speed-Vac getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst. Das erhaltene Plasmid wurde durch geeignete Restriktionshydrolyse analysiert (s. 2.2.2.16).

Waschpuffer	100 mM Tris (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 7,5) 100 mM β-Mercaptoethanol
Lyticasepuffer	100 mM Tris (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 7,5) 50 U Lyticase

2.2.2.4 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Zur groben Abschätzung der DNA-Konzentrationen wurde die DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese neben einer definierten Menge DNA-Standard aufgetrennt. Durch Vergleich der jeweiligen Intensitäten der DNA-Banden unter dem UV-Illuminator konnten sogar Konzentrationen im Nanogramm-Bereich ungefähr abgeschätzt werden.

Um DNA-Konzentrationen exakt bestimmen zu können, bedient man sich eines Spektralphotometers. Die Absorption der DNA-Lösung wurde bei den Wellenlänge $\lambda=260$ nm und 280 nm bestimmt, wobei eine OD_{260} von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die molare Konzentration konnte dann mit Hilfe des Molekulargewichtes der DNA (660 g/mol für ein Basenpaar, 330 g/mol für ein Nukleotid) berechnet werden. Das Verhältnis der beiden Wellenlängen zueinander gibt außerdem einen Hinweis auf die Reinheit der DNA. Werte unter 1,8 deuteten auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

2.2.2.5 Isolierung von genomischer Hefe-DNA

Für die Amplifizierung von Hefe-DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion wurde genomische Hefe-DNA aus *S. cerevisiae* als Matrize verwendet. Zu deren Isolierung

wurden 20 ml Hefe-Übernachtskultur in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt und in einer Hettich-Zentrifuge bei 4.500 rpm 5 Minuten lang sedimentiert, der Überstand verworfen und das entstandene Sediment in 400 µl sterilem Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von ~200 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,5 mm) wurde die Zellsuspension für 3 Minuten rigide auf einem Vortex gemischt und der entstandene Extrakt ohne die Glasperlen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in welches 100 µl Proteinase-K-Mix vorgelegt wurden. Dieser Ansatz wurde nun für 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Abtrennung der proteolytisch gespaltenen Proteine wurde ein Volumenteil (500 µl) Phenol zugegeben, vorsichtig gemischt bis die Mischung einheitlich weiß gefärbt und homogen war und anschließend die beiden Phasen durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 10.000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge wieder voneinander getrennt.

Der wäßrige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und die Extraktion mit einer Phenol/Chloroform-Mischung zweimal wiederholt. Danach wurde zur Entfernung eventuell noch vorhandener Phenolreste im Ansatz mit einem Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol [im Verhältnis 24:1 (v/v)] extrahiert.

Der wäßrige Überstand wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl RNaseA Lösung versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde die gewonnene genomische DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) und 0,7 Volumenteilen 100 % Isopropanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in einer Speed-Vac getrocknet. Das Präzipitat wird nach der Trocknung in 50 µl 1x TE vorsichtig suspendiert und über Nacht im Kühlschrank zur vollständigen Lösung inkubiert. Am darauffolgenden Tag konnte die genomische DNA anhand eines 1 %igen Agarosegels kontrolliert werden (s. 2.2.2.15).

Proteinase-K-Mix	25 µl 10 % (w/v) SDS 25 µl 0,1 M EDTA (pH 8,0) 50 µl Proteinase K, 10 mg/ml
Phenol-Chloroform-Mischung	50 % Phenol 50 % Chloroform 1 h (unter Rühren) äquilibriert mit 0,5 Volumenteilen ANE-Puffer
ANE-Puffer	10 mM NaOAc 100 mM NaCl 1 mM EDTA
RNase A-Lösung	s. Puffer P1 Abschnitt 2.2.2.2

2.2.2.6 Transformation von *E. coli*

Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation (EMBL-DNA-Sequencing Manual, 1990)

1 l LB-Flüssigmedium mit Tetracyclin (Konzentration 12,5 µg/ml) wurde mit 10 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue angeimpft und in einem Schüttler bei 37° bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 vermehrt (ca. 4 Stunden). Die Bakteriensuspension wurde zuerst 10 Minuten auf Eis gekühlt, daraufhin 10 Minuten abzentrifugiert (GS3-Rotor, 4°C, 5.000 rpm) und das entstandene Sediment vorsichtig in 1 l sterilem, eiskaltem Wasser resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, zuerst mit 500 ml, dann mit 20 ml sterilem, eiskaltem Wasser. Zuletzt wurden die Bakterien in 2,5 ml 10 %igem sterilem Glycerin aufgenommen, in Portionen zu je 40 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so gewonnenen elektrokompetenten Bakterienzellen konnten bei einer Lagerung von -70°C bis zu einem Jahr verwendet werden.

Transformation durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

Ein 40 µl Aliquot der oben beschriebenen kompetenten *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 25 ng eines zu transformierenden Ligationsansatzes bzw. von 5 ng eines zu transformierenden Plasmids wurde die Bakteriensuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser Küvetten von BioRad, Abstand der Elektroden 1 mm) transferiert und bei 1,25 kV/0,5 cm, 200 W, 25 µF transformiert. Die Pulszeiten betragen ca. 3,0 bis 3,5 µsek für die Transformation von Ligationsansätzen und ca. 4,5 bis 5,3 µsek bei Plasmid-DNA-Transformationen. Anschließend wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben, die Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 Stunde lang in einen 37°C warmen Brutschrank gestellt. Üblicherweise wurden 300 µl der transformierten Bakterien auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto Trypton 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl	}	autoklavieren, dann folgende sterile Lösungen zugeben:
	1mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose		

Blau-Weiß-Selektion auf rekombinante Plasmide

Bei dieser Form der Klonierung macht man sich das Phänomen der sogenannten α -Komplementation zunutze. Es beruht auf der nichtkovalenten Reassoziaton von Peptidfragmenten, bei der aus zwei enzymatisch inaktiven Teilen desselben Enzyms, in diesem Fall der β -Galactosidase, eine biologisch aktive Form rekonstituiert wird. So kann das native Enzym aus dem α -Peptid (entspricht den ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren des Proteins) und einem zweiten Fragment, dem die aminoterminalen Aminosäuren 11-41 fehlen (Δ M15 Deletion) ein enzymatisch aktives Protein bilden. Dieses Protein kann das unphysiologische Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) spalten. Es entsteht ein blauer Indigofarbstoff, der die jeweiligen Kolonien blau färbt. Der zu transformierende Vektor enthält das Reporter-gen lacZ', welches für das α -Peptid codiert, wohingegen das Wirtsbakterium das Gen mit der Δ M15 Deletion enthält. Trägt der lacZ' genannte Bereich jedoch Fremd-DNA, nämlich das zu klonierende DNA-Fragment, so kann das α -Peptid nicht mehr korrekt gebildet werden und damit auch nicht die intakte β -Galactosidase. Die Kolonie bleibt weiß.

Sollte eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden, so pipettierte man kurz vor dem Ausplattieren der Bakterienzellen 40 μ l einer 1 %igen X-Gal-Lösung mit 100 μ l einer 0,1 M IPTG-Lösung auf die Platte und verteilte sie mit einem sterilen Glasspatel. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf die getrocknete Mischung aufgebracht, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend mehrere Stunden bei 4°C gelagert, um die Blaufärbung deutlich werden zu lassen.

IPTG-Lösung	100 mM IPTG in H ₂ O
X-Gal-Lösung	1 % (w/v) X-Gal in Dimethylformamid

2.2.2.7 Transformation von *S. cerevisiae*

„Lazy Bones“ Methode (Elble, 1992)

Plasmide wurden in *S. cerevisiae* mittels der schnellen und effizienten „lazy bones“-Methode transformiert. Von einer ca. 3 Tage bei 30°C inkubierten Platte mit dem gewünschten Stamm wurde mit einer sterilen Impföse eine Einzelkolonie gepickt und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser Hefekolonie wurden nun 10 µl (ca. 0,1 bis 10 µg) Plasmid-DNA gegeben und 1 Minute auf einem Vortex geschüttelt. Zu dieser Mischung wurden noch 500 µl PLATE-Lösung gegeben und noch einmal 1 Minute lang geschüttelt. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen und am nächsten Morgen einem Hitzeschock von 42°C in einem Wasserbad für 15 Minuten unterworfen. Anschließend wurden die Hefezellen abzentrifugiert (8.000 rpm, 10 sek, Eppendorf-Zentrifuge, RT), in 200 µl sterilem, destilliertem Wasser resuspendiert und auf einer geeigneten Selektionsplatte verteilt. Falls die Plasmid-DNA nach dem Qiagen-Protokoll (s. 2.2.2.2) hergestellt worden war, also unter Beigabe des Enzyms RNaseA, mußten zusätzlich noch 100 µg Heringsperma-DNA dem Ansatz beigegeben werden. Wurde die Plasmid-DNA nach der „Boiling“-Methode gereinigt, übernimmt deren Aufgabe die noch vorhandene tRNA.

PLATE-Lösung:	40 % Polyethylenglycol (MW 3350)
	0,1 M Lithiumacetat
	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM EDTA

Lithiumacetat-Methode (Schiestl und Gietz, 1989)

Sollten für eine Gendisruption DNA-Fragmente in Hefezellen eingeführt werden, wofür eine höhere Effizienz der Transformation benötigt wird, so wurde die Lithiumacetat-Methode verwendet. Dazu wurden 10 ml Übernachtskultur derartig verdünnt, dass eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,2 in 300 ml gemessen wurde. Diese Verdünnung wurde solange weiter bei 30°C inkubiert bis sie eine OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 erreichte. Die Zellen wurden sedimentiert (GS3-Rotor, 5.000 rpm, RT, 5 min), der Überstand wurde verworfen, die Hefezellen anschließend in 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert

(GS3-Rotor, 5.000 rpm, RT, 5 min). Die gewaschenen Hefezellen wurden nun in 1,5 ml frisch hergestelltem 1x TE/Lithiumacetat resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 Stunde bei 30°C geschüttelt.

Parallel dazu wurde Heringssperma-DNA (10 µg/µl) durch Kochen bei 100°C im Wasserbad für 10 Minuten denaturiert und die resultierende einzelsträngige DNA auf Eis gestellt. Das zu transformierende PCR-Produkt (0,5 bis 6 µg) wurde nun hinzugefügt, sowie auch die kompetenten Hefezellen (s. oben). Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach mischte man vorsichtig 1 ml 40 %iges PEG 4.000 zu und inkubierte nochmals für 30 Minuten. Die Aufnahme der DNA in die Hefezellen erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für 20 Minuten. Es folgte eine kurze Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, 13.000 rpm, 5 sek, RT), gefolgt von zwei Waschschritten mit 0,5 ml 1x TE (Eppendorf-Zentrifuge, 13.000 rpm, 5 sek, RT). Das erhaltene Sediment wurde in 10 ml YPD aufgenommen, in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und für 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (Hettich-Zentrifuge, 4.000 rpm, 5 min, RT) und zweimaligem Waschen mit 0,5 ml 1x TE (Hettich-Zentrifuge, 4.000 rpm, 5 min, RT) wurden die Zellen in 150 µl 1x TE aufgenommen und auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert.

1x TE/Lithiumacetat	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 7,5) 100 mM Lithiumacetat (pH 7,5) sterilfiltrieren
40 % PEG 4000-Lösung	40 % (w/v) PEG 4000 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 7,5) 100 mM Lithiumacetat (pH 7,5) sterilfiltrieren

2.2.2.8 Herstellung einer radioaktiven Sonde mittels „Random Hexamer Priming“

Sowohl für die Southern-, aber auch für eine Northern-Blot-Analyse benötigt man „Sonden“. In dieser Arbeit handelt es sich dabei um einzelsträngige DNA, die die auf einer Trägermembran eventuell vorhandenen, komplementären Sequenzen erkennen und binden soll. Die zu hybridisierende DNA wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion aus genomischer Hefe-DNA erzeugt und über ein Low-Melting Agarosegel gereinigt. Die erhaltene DNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, für 5 Minuten bei 94°C

geschmolzen, wobei die DNA denaturiert. Um diese radioaktiv zu markieren, wurde die sogenannte Feinberg-Vogelstein-Technik verwendet (Feinberg und Vogelstein, 1984). Die eigentliche Reaktion erfolgte in einem Endvolumen von 50 µl mit folgenden Komponenten: 50 ng denaturierte DNA, 5 µl einer Mischung aus den Nukleotiden dATP, dGTP und dTTP, die 0,5 mM konzentriert war, 5 µl Hexanukleotid-Mix (Boehringer), 125 µCi [α - 32 P]-dCTP, 5 U Klenow-Enzym. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Die überschüssigen radioaktiven Nukleotide wurden mittels einer Mikrospin-S200 Säule abgetrennt und die Aktivität der markierten DNA durch Messung im Szintillationszähler bestimmt.

10x Hexanukleotid-Mix	0,5 M Tris/HCl (pH 7,2) 0,1 M MgCl ₂ 1 mM DTE 2 mg/ml BSA Hexanukleotide, 62,5 A ₂₆₀ Einheiten/ml
-----------------------	---

2.2.2.9 Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975)

Auftrennung der DNA in einem Agarosegel, sowie anschließender Transfer der DNA auf eine Nylonmembran

DNA-Aufbereitung: Ein Southern-Blot wurde in der vorliegenden Arbeit, zusammen mit analytischen PCR-Reaktionen, dazu verwendet, den korrekten Einbau von Fremd-DNA in das Hefegenom zu kontrollieren. Dies war der Fall bei der Gendisruption des offenen Leserahmens YOR179c. Hierfür wurden 5-10 µg genomische DNA mit einem oder mehreren geeigneten Restriktionsenzymen in einem 60 µl Ansatz über Nacht hydrolysiert.

Behandlung des Gels: Die entstandenen Fragmente wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 5 V/cm über Nacht aufgetrennt (üblicherweise bei 50 V, ungefähr 15 Stunden lang). Nach beendeter Elektrophorese erfolgte eine Inkubation mit 0,25 N HCl für zweimal 10 Minuten. Dadurch konnte eine partielle Hydrolyse der Fragmente erzielt werden. Dies ist beim anschließenden Transfer der DNA von Vorteil, da kleinere Fragmente besser übertragen werden als große. Die Säure wurde daraufhin durch

0,4 N NaOH ersetzt, um die DNA in dem Gel zu denaturieren, eine nachfolgende Hybridisierung wäre sonst nicht möglich.

Transfer: Die DNA wurde in einer Vakuum-Blot-Apparatur (Pharmacia), die ein wesentlich schnelleres Wandern der DNA im Gegensatz zu einem herkömmlichen Kapillarblot ermöglicht, auf eine Nylonmembran transferiert. Die Nylonmembran wurde auf die passende Gelgröße zugeschnitten, für 10 Minuten in destilliertem Wasser, sowie 20 Minuten in 20x SSC äquilibriert. Die so vorbehandelte Membran legte man auf die poröse Transferplatte der Apparatur. Darauf folgte eine um ca. 0,5 cm kleiner zugeschnittene Maske aus Plastikfolie, die ein Durchlaufen des Transferpuffers durch die poröse Platte nach Anlegen des Vakuums verhindern soll. Zum Abschluß wurde das Gel auf die Membran gelegt, für 1 Stunde Vakuum angelegt und das Gel mit 0,4 N NaOH überschichtet.

Immobilisierung: Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese für 30 Minuten bei 80°C in einem Vacuumofen gebacken und zusätzlich 2 Minuten mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=254$ nm bestrahlt.

Hybridisierung nach Church (Church und Gilbert, 1984)

Prähybridisierung: Die mit 5x SSC angefeuchtete Membran wurde mit der Seite, auf der die DNA gebunden ist, nach innen in eine Hybridisierungsröhre geeigneter Größe plaziert. Zum Abblocken unspezifischer Bindungen wurde die Membran für 1 Stunde mit 5 ml Church-Puffer/50cm² Membran bei 65°C in einem Rollinkubator inkubiert.

Hybridisierung: Die Prähybridisierungslösung wurde durch frischen Church-Puffer ersetzt, dem eine nach der „Random Hexamer Methode“ hergestellte radioaktiv markierte Sonde (s. 2.2.2.8), die zuvor für 5 Minuten bei 100°C denaturiert worden war, hinzugefügt wurde. Pro 50 cm² wurden dabei 2-3 ml Hybridisierungslösung und 3×10^6 cpm radioaktiv markierte DNA verwendet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Rollinkubator.

Waschen: Die Membran wurde mit niedrig-stringentem Waschpuffer für dreimal 20 Minuten bei RT gewaschen und falls die Membran noch mehr als 100 cps auf einem Handcounter zeigte, wurde noch zwei- bis dreimal mit hoch-stringentem Puffer (eventuell auch bei höheren Temperaturen) gewaschen. Die feuchte Membran wurde abschließend in Frischhaltefolie eingeschlagen und autoradiografiert.

Church-Hybridisierungspuffer	7 % SDS 1 % BSA 0,5 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) = Mischung aus 1 M Na ₂ HPO ₄ und 1 M NaH ₂ PO ₄ , in einem Verhältnis, dass der gewünschte pH erzielt wird 1 mM EDTA
Niedrig-stringenter Waschpuffer	5 % SDS 0,5 % BSA 40 mM NaHPO ₄ (pH 7,2) 1 mM EDTA
Hoch-stringenter Waschpuffer	1 % SDS 40 mM NaHPO ₄ (pH 7,2) 1 mM EDTA

2.2.2.10 Amplifikation von DNA Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion überwiegend zur Herstellung definierter DNA-Fragmente zum Zweck der nachfolgenden Klonierung verwendet. So war eine PCR-Reaktion (Saiki *et al.*, 1988) der erste Schritt zur Klonierung der Gene *YOR179c* und *BRR5*. Eine typische Reaktion wurde im 50 µl Maßstab durchgeführt und enthielt folgende Bestandteile: je 1 µM Primer, 100 ng genomische DNA respektive ≥ 1 ng Matrizen-DNA, je 350 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5 µl PCR-Puffer, sowie 0,75 µl eines Enzymmixes (Boehringer), welcher die beiden thermostabilen Taq- und Pwo-DNA-Polymerasen enthielt (Barnes, 1994). Die Pwo-DNA-Polymerase besitzt eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität, was im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase zu einer zehnfach höheren Genauigkeit der DNA-Synthese führt.

Um sicherzustellen, dass die Matrizen-DNA vollständig einzelsträngig vorlag, wurde der eisgekühlte Ansatz vor Zugabe der Enzyme für 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach Zugabe der beiden Enzyme wurde die Mischung mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen von Wasser während der Reaktion zu verhindern. Um unspezifische Paarungen der Primer in der ersten Amplifikationsrunde und anschließende Synthese durch die Polymerase zu unterbinden, wurde die PCR immer mit einem „Hot Start“ bei 94°C begonnen. Die Hybridisierungstemperatur hängt dabei von der Länge und dem GC-Gehalt des jeweiligen Primers ab. Wobei jedes G oder C im hybridisierenden Bereich des Primers einen Beitrag zur Hybridisierungstemperatur um 4°C, jedes A oder T hingegen nur eine Erhöhung um 2°C bedeutet (ausgehend von 0°C). Die Dauer der Polymerasereaktion wurde durch die

Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Da die Geschwindigkeit der DNA-Synthese der beiden verwendeten Polymerasen bei 72°C bekannt ist, nämlich 1500 Nukleotide/min, konnte sie leicht berechnet werden. Im Anschluß sind beispielhaft die Bedingungen für die Amplifikation von YOR179c in einer Perkin Elmer PCR-Maschine angegeben:

Amplifikation von YOR179c						
Zyklen		1	2-5		6-25	26
Denaturierung	94°C	2'	30''	94°C	30''	30''
Hybridisierung	50°C	30''	30''	60°C	30''	30''
Elongation	72°C	30''	30''	72°C	2'	10'

Wegen zusätzlicher DNA-Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen, die für die anschließende Klonierung der amplifizierten Fragmente benötigt wurden, mußte die Hybridisierungstemperatur nach 5 Zyklen erhöht werden. Jeweils 5 µl eines PCR-Ansatzes wurden anschließend über eine Agarosegelelektrophorese analysiert (s. 2.2.2.16).

10x PCR-Puffer:

500 mM Tris-HCl (pH 9,2)
160 mM (NH₄)₂SO₄
17,5 mM MgCl₂

2.2.2.11 Phosphorylierung von PCR-Fragmenten

Für eine typische PCR-Amplifikation werden in der Regel Oligonukleotide mit einem 5'-OH Ende eingesetzt. Will man das erhaltene Fragment anschließend in einen dephosphorylierten Vektor klonieren, müssen diese Enden vorher zuerst phosphoryliert werden, um für eine Ligation als Substrat dienen zu können. Hierfür wurde nach der Amplifikation in der PCR-Maschine das erhaltene PCR-Produkt ohne vorherige Reinigung mit 1 nmol ATP, sowie 5 U T4-Polynukleotidkinase (PNK) versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (s. 2.2.2.1) und die DNA anschließend mit Ethanol gefällt. Das phosphorylierte PCR-Fragment wurde nun noch über ein Low-Melting-Agarosegel aufgetrennt und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dieses Gelstück konnte bei -20°C gelagert werden.

Durch Restriktionshydrolyse eines PCR-Fragmentes nach Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Fällung erhält die erzeugte DNA ebenfalls ein 5'-Phosphatende und eine zusätzliche Phosphorylierung ist in diesem Fall nicht nötig. Wurden die Schnittstellen durch die Oligonukleotide während der PCR eingeführt und lagen somit an den Fragmentenden, so mußte die DNA über Nacht bei Raumtemperatur geschnitten werden. Befanden sich die Schnittstellen hingegen weiter innerhalb des Fragmentes, wurde die Hydrolyse wie unter Punkt 2.2.2.15 angegeben durchgeführt.

2.2.2.12 Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm

Die alkalische Phosphatase wird verwendet, um endständige Phosphatgruppen in einem linearen DNA-Molekül abzuspalten. Diese Behandlung wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem durchgeführt, um eine durch DNA-Ligase katalysierte Zirkularisierung eines Vektors mit sich selbst zu verhindern. Da dem Vektor dieses 5'-Phosphatende nach enzymatischer Behandlung fehlt, wird der Einbau von Fremd-DNA, z.B. von PCR-Fragmenten, die phosphoryliert wurden (s. 2.2.2.11), begünstigt und somit die Klonierungseffizienz gesteigert.

Nach der Linearisierung eines zirkulären Vektors durch geeignete Restriktionsenzyme wurde dem Ansatz 1 U Enzym zugesetzt und dieser 1 Stunde bei 37°C im Restriktionspuffer inkubiert. Zur Abtrennung der alkalischen Phosphatase wurde in diesem Fall eine Low-Melting-Agarosegelelektrophorese durchgeführt, der linearisierte Vektor unter UV-Licht (Wellenlänge $\lambda=366$ nm) aus dem Gel ausgeschnitten und für eventuelle Klonierungen verwendet.

2.2.2.13 Ligation von DNA in Low-Melting-Agarose

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat und einer 3'-OH-Gruppe. Diese Phosphodiesterbindungen bilden

das Rückgrat der DNA. Dabei können sowohl kompatible überhängende als auch glatte Enden verbunden werden.

Zwei zu ligierende DNA-Fragmente, z.B. ein dephosphorylierter, linearisierter Vektor (s. 2.2.2.12) und ein phosphoryliertes PCR-Produkt (s. 2.2.2.11) wurden nach ihrer Auftrennung durch ein Low-Melting-Agarosegel und anschließendem Ausschneiden aus dem Gel bei 70°C aufgeschmolzen. Das molare Verhältnis des Vektors zu seinem Insert betrug 1:3 bis 1:10, wobei die DNA-Mengen der Reaktionspartner aus der Intensität der Banden auf dem Gel abgeschätzt wurden. Das Volumen des Ligationsansatzes wurde so gewählt, dass die darin enthaltene Agarosekonzentration 0,3 % nicht überschritt. Die Reaktion erfolgte in 1x Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur für 1 Stunde, falls es sich um kohäsive Enden handelte; bei glatten Enden wurden 5 U T4-DNA-Ligase verwendet und über Nacht inkubiert.

10x Ligationspuffer:

500 mM Tris/HCl (pH 7,5)
100 mM MgCl₂
100 mM DTT
10 mM ATP
25 µg/ml BSA

2.2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden durchweg mit dem Sequenzier-Kit der Firma Pharmacia bewerkstelligt, der auf dem durch Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren beruht (Sanger *et al.*, 1977). Dieser wurde für die Sequenzierung mit doppelsträngiger Plasmid-DNA modifiziert (Chen und Seeburg, 1985).

Sequenzreaktion

Denaturierung der DNA: Da für eine Sequenzreaktion einzelsträngige DNA verwendet werden muß, wurden als erstes 10 µl Plasmid-Mini-Präparation mit 2 µl einer Mischung aus 2 M Natronlauge und 2 mM EDTA versetzt und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt, um die DNA zu denaturieren. Es erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Fällen der DNA: Durch Zugabe von 8 µl einer 5 M Ammoniumacetatlösung und 112 µl 100 %igem Ethanol wurde die denaturierte DNA anschließend gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 10 µl Wasser aufgenommen.

Primerannealing: Zu dieser Lösung wurden sofort 2 µl Annealing-Puffer, sowie 10 pmol Primer gegeben. Die Hybridisierung des Primers erfolgte bei 37°C für 20 Minuten.

Markierung und Kettenabbruch: Zur Vorbereitung der Kettenabbruchreaktion wurden für jedes Nukleotid, also insgesamt vier, je 2,5 µl der ddNTP-Terminationsgemische in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und 1 Minute lang bei 37°C vorinkubiert. Die Markierung wurde mit 3 µl eines Gemisches aus dNTP ohne dATP, 1 µl [α -³⁵S]-dATP (10 µCi/µl und 3.000 Ci/mmol) und 2 µl der im Verhältnis 1:5 verdünnten T7-DNA-Polymerase durchgeführt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 4,5 µl dieser Ansätze zu den oben erwähnten Terminationsgemischen pipettiert und diese anschließend weitere 5 Minuten, diesmal aber bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Formamid-Auftragspuffer gestoppt, 3 Minuten lang bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und anschließend auf ein 6 %iges, 20 x 40 cm großes denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Annealing-Puffer:	1 M Tris/HCl (pH 7,6) 100 mM MgCl ₂ 160 mM DTT
ddATP-Terminationsgemisch	je 840 µM dCTP, dGTP, dTTP 93,5 µM dATP 14 µM ddATP 40 mM Tris/HCl (pH 7,6) 50 mM NaCl
ddCTP-Terminationsgemisch	je 840 µM dATP, dGTP, dTTP 93,5 µM dCTP 17 µM ddCTP 40 mM Tris/HCl (pH 7,6) 50 mM NaCl
ddGTP-Terminationsgemisch	je 840 µM dATP, dCTP, dTTP 93,5 µM dGTP 14 µM ddGTP 40 mM Tris/HCl (pH 7,6) 50 mM NaCl
ddTTP-Terminationsgemisch	je 840 µM dATP, dGTP, dCTP 93,5 µM dTTP 14 µM ddTTP 40 mM Tris/HCl (pH 7,6) 50 mM NaCl

Markierungsgemisch (Labelling-Mix)	je 1,375 μ M dCTP, dGTP, dTTP 333,5 mM NaCl
Enzym-Verdünnungspuffer	20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 5 mM DTT 100 μ g/ml BSA 5 % (v/v) Glycerin

Anfertigung eines Sequenzgels und Durchführung der Gelelektrophorese

Für die Anfertigung eines Polyacrylamid-Gels wurden eine Glasplatte und eine „Ohrenplatte“ gründlich mit Spülmittel gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und mit 100 %igem Ethanol trocken gewischt. Beide Platten wurden - durch zwei Abstandshalter 0,5 mm voneinander getrennt - waagrecht plaziert. Die Gellösung wurde wie folgt vorbereitet: 1/200 Volumen 10 %iges APS und 1/1.000 Volumen TEMED wurden mit einer 6 %igen Acrylamid-Gellösung gemischt und sofort zwischen die bereitgestellten und gereinigten Platten gegossen, anschließend wurde ein geeigneter Geltaschenformer eingesetzt – in diesem Fall ein Former mit 32 Taschen für acht verschiedene Sequenzreaktionen. Das Gel benötigte zum Auspolymerisieren etwa 1 Stunde.

Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Apparatur, wobei 1x TBE als Laufpuffer diente. Kurz vor dem Auftragen wurden die Geltaschen noch mit 1x TBE gespült, um aus dem Gel diffundierten Harnstoff zu entfernen. Um einen gleichmäßigen Gellauf zu gewährleisten, wurde vor die „Ohrenplatte“ noch eine Aluminiumplatte geklemmt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst für 5 Minuten bei 10 mA zum Einlaufen der Proben, anschließend wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht und solange durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Farbmarker das Gelende erreicht hatte. Nach der Elektrophorese wurde die „Ohrenplatte“ vorsichtig entfernt und das Gel in destilliertem Wasser für 10 Minuten gewässert, um Harnstoff zu entfernen. Anschließend wurde das freigelegte Gel mit einem Stück Whatman-Papier bedeckt, mit dem daran anhaftenden Gel von der Glasplatte abgezogen, umgedreht, mit Klarsichtfolie abgedeckt und auf einem Gelrockner für ½ h bei 80°C Oberhitze unter Vakuum getrocknet. Bei diesem Verfahren konnte ca. 20 Basen nach dem verwendeten Primer begonnen werden zu lesen. Die vom Hersteller mitgelieferten und überwiegend verwendeten „short range“ Nukleotidpräparationen ermöglichten eine Analyse von bis zu 350 Nukleotiden.

Acrylamid-Gellösung	6 % (w/v) Acrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1) 7 M Harnstoff in 1x TBE
---------------------	---

2.2.2.15 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Art der Elektrophorese wird im Gegensatz zu der in Punkt 2.2.2.14 beschriebenen in horizontalen Gelapparaturen durchgeführt. Die Prozentigkeit des Gels hängt jedoch genau wie bei den Acrylamidgelen von der Größe der aufzutrennenden Fragmente ab und rangierte in der vorliegenden Arbeit zwischen 0,8 und 1,5 %. Die Agarose (gilt auch für Low-Melting Agarose) wurde mit 1x TBE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C mit 1 %iger Ethidiumbromidlösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Aufgrund der Eigenschaft des Ethidiumbromids, sich zwischen die Bausteine der DNA einzulagern (Interkalation), kann man diese Komplexe unter UV-Licht detektieren. Die zu analysierenden Proben wurden mit 5x Saccharose-Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese mit 5 V/cm gefahren. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Um das Gel zu analysieren, wurde es bei einer Wellenlänge von $\lambda=254$ nm betrachtet und fotografiert.

2.2.2.16 Restriktionshydrolyse

Gewöhnlich wurden ca. 300-500 ng einer Mini-Plasmid-Präparation in einem Gesamtvolumen von 10 µl verwendet. Das Volumen des benötigten Restriktionsenzym sollte wegen des enthaltenen, relativ hohen Gehalts an Glycerin 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Ein typischer Restriktionsansatz umfaßte 0,5 bis 1,0 µl Enzym (0,4 bis 20 U), 1 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffers und, falls es das jeweilige Enzym erforderte, 4 µg/µl BSA in 10 µl Gesamtvolumen. Die Inkubation erfolgte meist bei 37°C für 1 Stunde, außer es wurden vom Hersteller ausdrücklich andere Bedingungen vorgeschrieben. Sollte ein Doppelverdau durchgeführt werden, so war dies in einem Ansatz möglich, falls beide Enzyme unter denselben Pufferbedingungen hydrolysierten. War dies jedoch nicht der Fall, so wurde die DNA zuerst mit einem Enzym inkubiert, dann die Pufferbedingungen für

das zweite Enzym durch Zugabe der erforderlichen Reagenzien angepaßt und anschließend mit dem zweiten Enzym für eine weitere Stunde bei 37°C hydrolysiert.

2.2.2.17 Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-kb-Leiter

Der verwendete Standard wurde von der Firma Gibco erworben. Dieser wurde vom Hersteller durch eine Restriktionshydrolyse des pBR322-Vektors mit mehreren Restriktionsenzymen hergestellt. Diejenigen Fragmente, welche durch Restriktionshydrolyse mit dem Enzym *Hinf*I erhalten wurden, können radioaktiv markiert werden. Es handelte sich bei den dadurch entstandenen Enden um 5'-Überhänge. Da die Klenow-Untereinheit der Polymerase I aus *E. coli* 5'->3' Polymeraseaktivität besitzt, konnten diese Enden mit ihr aufgefüllt werden. Die Markierung erfolgte mit [α -³²P] dATP, wobei die Wahl des radioaktiven Nukleotids von der Schneidesequenz des jeweiligen Restriktionsenzym abhängt.

Eine Markierungsreaktion enthielt 2 µg geschnittenes Plasmid, 1 µl [α -³²P]-dATP (10 µCi/ µl, 3.000 Ci/mmol), 100 µM dNTP ohne dATP und 1 U Klenow-Fragment in 1x Klenow-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit Wasser auf ein Endvolumen von 30 µl aufgefüllt und mit Hilfe einer Mikrosphin-S200 Säule die überschüssigen Nukleotide abgetrennt. Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt.

5x Klenow-Puffer:	250 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	25 mM MgCl ₂
	5 mM DTT

2.2.3 RNA-Arbeitstechniken

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus Hefezellen durch Phenolextraktion

(modifiziert nach Köhrer und Domdey, 1991)

Es wurde eine 200 ml Hefe-Übernachtskultur mit einer OD₆₀₀ von 1-2 verwendet. Die Zellen wurden sedimentiert (Sorvall-Zentrifuge, GS3 Rotor, 5.000 rpm, 10 min, 4°C), in 10 ml Natriumacetat-Puffer aufgenommen und in 50 ml Plastikröhrchen überführt. Nach weiterer

Zugabe von 1 ml 10 %iger SDS-Lösung und 12 ml auf 65°C vorgewärmtem, mit Natriumacetat-Puffer äquilibriertem Phenol wurde im 65°C warmen Wasserbad für 4 Minuten kräftig geschüttelt. Die Mischung wurde danach schnell in einem Trockeneis-Ethanol-Bad auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei darauf zu achten ist, dass die Lösung im Reaktionsröhrchen immer in Bewegung gehalten wird, damit eine möglichst gleichmäßige und schnelle Abkühlung eintritt. Die wäßrige und organische Phase wurden nun durch Zentrifugation voneinander getrennt (Beckman-Zentrifuge, 10 min, 4.800 rpm, RT). Die obere, wäßrige Phase wird im Anschluß vorsichtig von der organischen mit einer Pipette abgezogen und in ein neues Plastkröhrchen überführt. Die Extraktion wird mit einer Phenol/Chloroform-Mischung wiederholt, wobei die beiden Phasen vor dem Abzentrifugieren für 2-3 Minuten kräftig auf dem Vortex geschüttelt wurden. Der letzte Extraktionsschritt erfolgte mit Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 24:1).

Nach einer Isopropanolfällung wurde die getrocknete RNA in 300 µl Wasser aufgenommen und zur Kontrolle der Präparation 1 µl davon auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht betrachtet (s. 2.2.2.15).

Natriumacetat-Puffer:	50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH mit Essigsäure auf 5,0 einstellen
Phenol	2/3 Phenol im Wasserbad schmelzen mit 1/3 Natriumacetat-Puffer 1 h unter Rühren äquilibrieren
ANE-Puffer	10 mM Natriumacetat 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Phenol/Chloroform-Mischung	1/3 Phenol 1/3 Chloroform mit 1/3 ANE-Puffer 1 h unter Rühren äquilibrieren

2.2.3.2 Isolierung von Poly(A)⁺-RNA

Isolierte Gesamt-RNA enthält sowohl tRNA, mRNA als auch rRNA. Durch eine Anreicherung der mRNA sollte bei einer nachfolgenden Northern-Blot-Analyse die Detektion derselben erleichtert werden. Hierfür wurde ein Kit der Firma Stratagene benutzt, der

polyadenylierte mRNA durch eine Säulenaufreinigung mit Oligo(dT)-Cellulose von den anderen RNA-Spezies trennte.

Die im Kit enthaltene Säule mit Oligo(dT)-Cellulose wurde zu Beginn senkrecht in eine Halterung gestellt, damit sich das Säulenmaterial am Boden sammeln konnte. 500µg Gesamt-RNA (s. 2.2.3.1) wurden dann bei 65°C für 5 Minuten erhitzt, um Sekundärstrukturen zu zerstören, anschließend wurde sofort auf Eis gestellt und 10x Verdünnungspuffer so zugegeben, dass eine Konzentration von 1x erreicht wurde. Nun wurden die beiden Verschlüsse der Säule entfernt und mit einer Spritze, die auf die Säule aufgesetzt wurde, der enthaltene Aufbewahrungspuffer mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen/2 Sekunden entfernt. Nach dem Entfernen der Spritze wurde das Säulenmaterial zweimal mit 200 µl Hochsalzpuffer gewaschen und anschließend die vorbereitete Gesamt-RNA auf das Säulenmaterial appliziert. Der Durchfluß wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und dieser anschließend ein zweites Mal auf die Säule gegeben.

Das Säulenmaterial mit der daran gebundenen Poly(A)⁺-RNA wurde noch zweimal mit Hochsalzpuffer und dreimal mit Niedrigsalzpuffer gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, dass nur 1 Tropfen/1 Sekunde austrat. Die RNA wurde im Anschluß viermal mit 200 µl des auf 65°C erwärmten Elutionspuffers von der Säule eluiert. Um die Konzentration der isolierten Poly(A)⁺-RNA zu bestimmen, wurde das Eluat bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm vermessen, wobei eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA bedeutet. Zur Überprüfung der Reinheit der RNA kann zusätzlich auch noch das Verhältnis der gemessenen optischen Dichten bei den Wellenlängen $\lambda=260$ nm und 280 nm bestimmt werden. Ein Verhältnis von 2 wäre ein optimales Ergebnis. Falls die RNA zu verdünnt sein sollte, kann diese mit Ethanol gefällt und in einer höheren Konzentration gelöst werden.

10x Verdünnungspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 5 M NaCl
Hochsalzpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 0,5 M NaCl
Niedrigsalzpuffer	wie Hochsalzpuffer nur mit 0,1 M NaCl
Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA

2.2.3.3 RNase-Protection-Assay

Eine Möglichkeit, mRNA nachzuweisen, ist der RNase-Protection-Assay. Hierbei wird eine Sonde, die komplementär zur gesuchten mRNA ist, mit Gesamt-RNA aus Hefe hybridisiert. Anschließend wird die gesamte einzelsträngig vorliegende RNA mittels zweier RNasen abgebaut. Nur die hybridisierten Bereiche sind als Doppelstrang vor dem Verdau durch RNase A und T1 geschützt und können anschließend auf einem Gel aufgetrennt und detektiert werden.

Ein DNA-Fragment, das den offenen Leserahmen YOR179c enthält, wurde in den Vektor pBluescriptI^{KS} (Alting-Mees und Short, 1989) kloniert und mit dem Restriktionsenzym PvuII geschnitten. Von diesem DNA-Abschnitt, wurde ein radioaktiv markiertes antisense-Transkript angefertigt. 25.000 cpm von diesem Transkript wurden mit 10 µg Gesamt-RNA aus Hefe in einer Speed-Vac zur Trockne eingeeengt und in 10 µl PIPES-Puffer aufgenommen. Die Mischung wurde für 5 Minuten bei 90°C denaturiert und ohne Abzukühlen in einen vorgeheizten Hybridisierungssofen gestellt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 45°C. 100 µl eines Puffers, der eine Mischung der RNasen A und T1 enthielt, wurde im Anschluß zugegeben. Die Probe wurde gut gemischt, abzentrifugiert und für 40 Minuten bei 26°C inkubiert. Die vorhandenen Proteine wurden schließlich durch Hinzupipettieren von 2 µl 10 % SDS, sowie 1,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) und anschließender 20 minütiger Inkubation bei 37°C zerstört. 100 µl dieses Gemisches wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt; dieser Schritt war notwendig, um zu verhindern, dass eventuell nicht-hybridisierte RNA, die an der Wand des Reaktionsgefäßes adsorbiert ist, bei der nun folgenden Phenol/Chloroform-Extraktion mit erfaßt würde. Aus diesem Grund wurde ein Transkript angefertigt, das 200 Nukleotide länger ist als das eigentliche Gen, so dass eine Verwechslung, falls es zu Verunreinigungen kommen sollte, aufgrund der unterschiedlichen Länge also kaum möglich wäre. Wie bereits erwähnt, wurde das erzeugte RNA-RNA-Hybrid nun noch mit Roti-Phenol/Chloroform extrahiert (s. 2.2.2.1) und nach Zugabe von 1 µl tRNA (10 µg/ µl) mit 2,5 Volumenteilen absolutem Ethanol gefällt und auf einem 6 %igem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

PIPES-Hybridisierungspuffer

80 % Formamid
40 mM PIPES (pH 6,7)
0,4 M NaCl
1 mM EDTA

RNase A/T1-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 200 mM NaCl 100 mM LiCl 40 µg/ml RNase A 2 µg/ml RNase T1
-------------------	--

2.2.3.4 Northern-Blot-Analyse

Eine weitere Methode, mRNA nachzuweisen, ist die Northern-Blot-Analyse.

Vorbereitung des Gels: RNAs können durch intramolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen ausbilden, wobei sich ihr Laufverhalten während einer elektrophoretischen Auftrennung entscheidend verändern kann. Deshalb müssen sie unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden. 2,4 g Agarose wurden in 174 ml Wasser suspendiert und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 20 ml 10x MOPS-Puffer, sowie 6 ml 37 %iges Formaldehyd hinzugefügt und das Gel in eine horizontale Apparatur gegossen.

Vorbereitung der Proben: Nachdem das Gel sich verfestigt hatte, konnten die Proben aufgetragen werden. 11 µl Gesamt-RNA (10 µg), 9 µl 37 % Formaldehyd und 25 µl Formamid wurden gemischt, in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 30 Sekunden lang zentrifugiert, bei 62°C 10 Minuten lang inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Vor dem Auftragen wurden noch 5 µl 10x MOPS-Laufpuffer, sowie 10 µl Formamid-Auftragspuffer hinzugefügt.

Elektrophorese: Die Elektrophorese wurde bei 5 V/cm für 2½ Stunden in 1x MOPS-Laufpuffer durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben ein zweites Mal auf einen zweiten Teil des Gels aufgetragen. Diese sollten einer anschließenden Kontrolle durch Ethidiumbromid-Anfärbung dienen. Nach der Elektrophorese wurde dieser Teil des Gels vom restlichen Stück abgetrennt und in einer Lösung von 0,5 M Ammoniumacetat 20 Minuten renaturiert; dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die Färbung mit einer Lösung von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5 M Ammoniumacetat durchgeführt. Die Färbezeit betrug 40 Minuten, danach folgten mehrere Waschschrte mit Wasser. Anschließend konnte das Gel unter UV-Licht betrachtet werden.

Transfer und Membranvorbereitung: Das zweite Gelstück, welches zum Nachweis der mRNA verwendet werden sollte, wurde zuerst mehrmals mit Wasser gespült, um das Formaldehyd zu entfernen, welches beim Transfer der RNA auf die Membran stören würde, im Anschluß wurde es für 40 Minuten in 20x SSC-Puffer geschwenkt. Der Transfer wurde mittels der Kapillarblotmethode vollzogen. Zuerst legte man ein Filterpapier auf ein umgedrehtes Gelschiffchen in einen mit Blottingpuffer (20x SSC) gefüllten Plastikbehälter, so dass die Enden des Papiers auf beiden Seiten in Puffer tauchten, das Gel mit der Oberseite nach unten darauf, dann die Membran und abschließend mehrere saugfähige Papiertücher. Der Transfer vollzog sich über Nacht. Anschließend wurde die Membran in 2x SSC gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Um die RNA auf der Membran zu fixieren, mußte diese 15 Minuten lang in einem Vakuumofen bei 80°C gebacken werden. Vor der eigentlichen Hybridisierung mußte die Membran noch gleichmäßig mit 6x SSC angefeuchtet werden, bevor man sie in eine Hybridisierungsröhre gab. Pro 10 cm² wurde 1 ml Prähybridisierungslösung zugegeben und in einem Rollinkubator bei 60°C für 3 Stunden inkubiert.

Herstellung der radioaktiv markierten Sonde: s. 2.2.2.8

Hybridisierung: Die Sonde mußte vor einer Hybridisierung noch denaturiert werden (10 Minuten bei 100°C, sofort auf Eis stellen). 500.000 cpm der Sonde wurden in 10 ml Hybridisierungslösung verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen.

Waschen: Der erste Waschschrift wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2x SSC/0,1 % SDS durchgeführt. Es folgte ein zweiter Waschschrift mit 0,2x SSC/0,1 % SDS für weitere 5 Minuten. Nur selten waren zusätzliche stringenteren Waschvorgänge, z.B. 15 Minuten bei 42°C, nötig. Die Membran wurde, um sie vor dem Austrocknen zu schützen, in Klarsichtfolie gewickelt und autoradiografiert.

10x MOPS-Laufpuffer	0,4 M MOPS (pH 7,0) 0,1 M Natriumacetat 0,01 M EDTA
100x Denhardts Reagenz	10 g Ficoll 400 10 g Polyvinylpyrolidon 10 g BSA, Fraktion V H ₂ O ad 500 ml

Prähybridisierungslösung	25 mM (pH 7,4) einer Mischung aus Kaliumdihydrogen- und Dikaliumhydrogenphosphat, in einem Verhältnis, dass der gewünschte pH erzielt wird 5x SSC 20x Denhardts Reagenz 50 µg/ml Heringsperma-DNA 50 % Formamid
Hybridisierungslösung	25 mM (pH 7,4) einer Mischung aus Kaliumdihydrogen- und Dikaliumhydrogenphosphat, in einem Verhältnis, dass der gewünschte pH erzielt wird 5x SSC 5x Denhardts Reagenz 1 % SDS 100 µg/ml Heringsperma-DNA 50 % Formamid

2.2.3.5 Herstellung von radioaktiv markierten RNA-Fragmenten durch *in vitro* Transkription (modifiziert nach Melton *et al.*, 1984)

Bei der *in vitro* Transkription wird einzelsträngige, markierte RNA mit definierter Länge von einer exogen zugegebenen DNA als Matrize synthetisiert. Die zu transkribierende DNA war dabei auf einem Plasmid stromabwärts von einem Phagenpromotor (T3, T7, SP6) lokalisiert und wurde von den entsprechenden DNA-abhängigen RNA-Polymerasen aus Bakteriophagen abgelesen (Studier und Moffatt, 1986). Um in der nachfolgenden Transkriptionsreaktion ein definiertes 3'-Ende zu erhalten, sollte das Plasmid zuerst mittels Restriktionshydrolyse linearisiert werden. Dabei mußte man beachten, dass das verwendete Enzym glatte oder 5'-überhängende Enden erzeugt, denn die Polymerase könnte bei 3'-überhängenden Enden auf den Gegenstrang wechseln.

Ein typischer Ansatz enthielt: 200-500 ng linearisierte DNA, 2 µl 5x Transkriptionspuffer (Stratagene), 20 U RNase-Inhibitor, 30 mM DTT, je 0,5 mM ATP, CTP, GTP, 50 µM UTP, 20-40µCi α -[³²P]-UTP, 5 mM m⁷G(5')ppp(5')G-Cap, und 5 U der entsprechenden RNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Diese Mischung wurde für 45 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend die Reaktion mit Formamid-Auftragspuffer gestoppt, 2 Minuten auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Das Fragment wurde über ein 6 %iges denaturierendes Gel gereinigt (Vorlauf ½ Stunde bei 10 mA, gefolgt von 1 Stunde bei 25 mA). Im Anschluß daran wurde die Deckplatte des Gels abgenommen, das Gel mit Klarsichtfolie bedeckt, Lumineszenzmarker aufgeklebt und für 2 Minuten autoradiografiert. Die Position des gewünschten RNA-Fragmentes im Gel ließ sich durch Übereinanderlegen des Röntgenfilms und des Gels auf einer Leuchtplatte bestimmen. Das

Transkript wurde mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und zum Herauslösen aus der Gelmatrix in 300 µl Elutionspuffer überführt. Nach einer Extraktionszeit von 3 Stunden unter kräftigem Schütteln wurde das Eluat vorsichtig vom Gelstück abgezogen und in ein Reaktionsgefäß mit 300 µl Roti-Phenol/Chloroform pipettiert. Nach 1 minütigem Mischen auf einem Vortex wurde der Ansatz zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14.000 rpm, RT, 2 min) und die obere wäßrige Lösung vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß mit 3 Volumenteilen absolutem Ethanol gegeben. Das entstandene Präzipitat wurde zentrifugiert (Sigma Kühlzentrifuge, 14.000 rpm, 4°C, 30 Minuten), mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in einer Speed-Vac getrocknet und zuletzt in 10 µl Wasser aufgenommen. Ein Mikroliter davon wurde im Szintillationszähler vermessen.

5x Transkriptionspuffer (Stratagene)	200 mM Tris-HCl (pH 8,0) 40 mM MgCl ₂ 10 mM Spermidin 250 mM NaCl
Elutionspuffer	500 mM Ammoniumacetat 10 mM MgCl ₂ 0,1 mM EDTA 0,1 % (w/v) SDS 3 ng/µl tRNA

2.2.3.6 *In vitro* mRNA-3'-Prozessierungsreaktion von definierten mRNA-Fragmenten

Bei der *in vitro* mRNA-3'-Prozessierungsreaktion werden radioaktiv markierte RNA-Transkripte (s. 2.2.3.5) zusammen mit einem Hefe-Ganzzellextrakt unter 3'-Prozessierungsbedingungen inkubiert (modifiziert nach Butler und Platt, 1988 und Butler *et al.*, 1990). Die aus den 3'-terminalen Bereichen eines Hefegens stammenden Transkripte werden hierbei von den im Extrakt vorhandenen 3'-Prozessierungsfaktoren an einer spezifischen Stelle der RNA – der Polyadenylierungsstelle – endonukleolytisch geschnitten und das oberhalb der Schnittstelle liegende Produkt wird in Anwesenheit von ATP polyadenyliert.

In einem Reaktionsansatz wurden 6-10 fmol eines *in vitro* synthetisierten (2.2.2.3) und radioaktiv markierten RNA-Transkriptes (25.000-40.000 cpm) mit 5 µl 2x Prozessierungspuffer, 0,3 µl DTT, 8 U RNase Inhibitor und 2 µl eines mit Ammoniumsulfat gefällten Hefe-Ganzzellextraktes in einem Volumen von 10 µl für

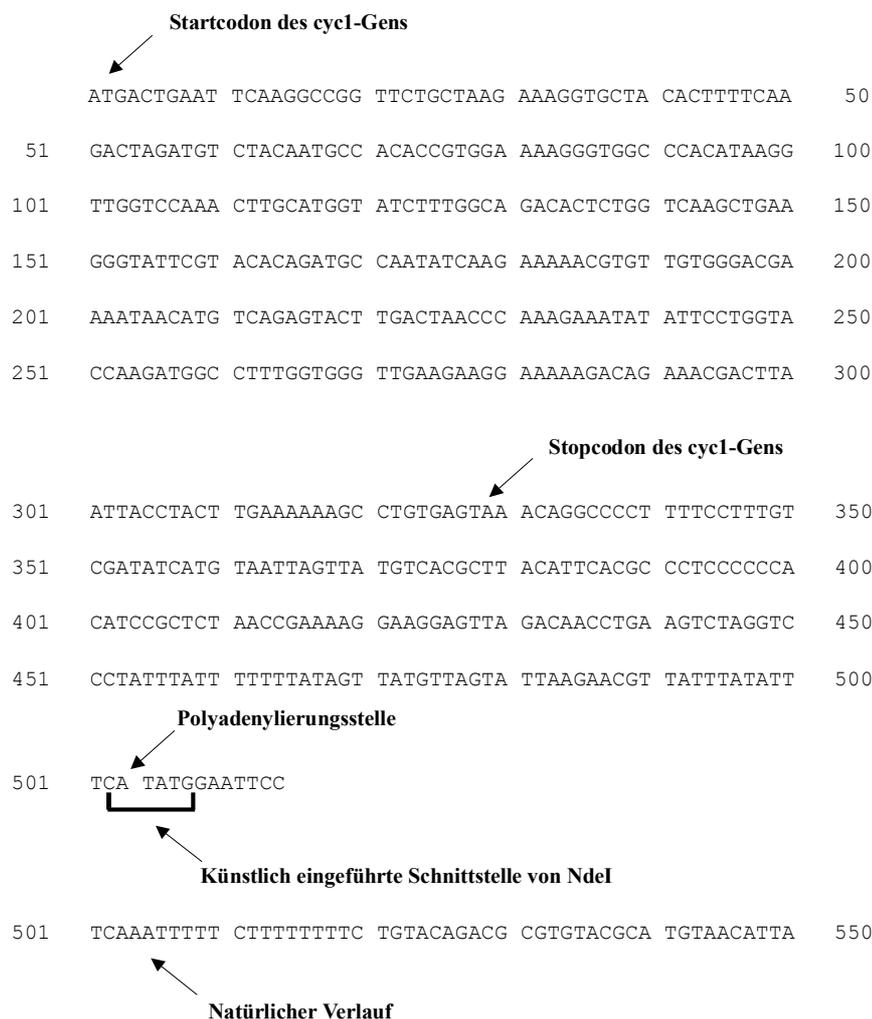
15 Minuten bei 30°C inkubiert. Sollte der endonukleolytische Schnitt allein untersucht werden, wurde statt des 2x Prozessierungspuffers ein 2x Schneidepuffer verwendet, der kein Magnesium und ATP, stattdessen jedoch EDTA und CTP enthielt. Unter diesen Bedingungen kann die Poly(A)-Polymerase inhibiert, der Schnitt jedoch ausgeführt werden. Zusätzlich werden durch EDTA eventuell im Extrakt vorhandene Nukleasen gehemmt, so dass auch das instabile zweite Produkt des endonukleolytischen Schnittes, welches unterhalb („stromabwärts“) der Schnittstelle liegt, detektiert werden kann. Unter polyadenylierenden Bedingungen würde es dagegen schnell abgebaut werden, da ihm im Gegensatz zum zweiten Spaltprodukt die stabilisierende Cap-Hülle am 5'-Ende fehlt. Durch Zugabe von 2 µl Stop-Puffer und anschließender Inkubation für 15 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion beendet. Vor einer Elektrophorese müssen überschüssige Proteine des Extraktes, die diese beeinträchtigen könnten, noch entfernt werden. Dies wurde durch die in dem Stop-Puffer enthaltene Proteinase K gewährleistet. Der Ansatz wurde gefällt und die RNA in 8 µl Formamid-Puffer aufgenommen, wovon 2 µl nach 2 minütigem Denaturieren bei 95°C und sofortigem Abschrecken auf Eis auf ein 6 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem der Bromphenolblau-Farbmarker das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde zur Entfernung von überschüssigem Harnstoff gewässert, auf Filterpapier aufgezogen, für ½ Stunde in einem Gelrockner getrocknet und autoradiografiert.

2x Prozessierungspuffer	2 mM Magnesiumacetat 150 mM Kaliumacetat 4 % (w/v) PEG 8000 4 mM ATP
2x Schneidepuffer	150 mM Kaliumacetat 4 % (w/v) PEG 8000 4 mM CTP 2 mM EDTA
Stop-Puffer	2 mg/ml Proteinase K 130 mM EDTA 2,5 % (w/v) SDS

2.2.3.7 *In vitro* Polyadenylierungsreaktion von vorgeschnittenen RNA-Fragmenten

Die spezifische Polyadenylierung eines RNA-Abschnitts kann auch unabhängig von dem zuvor erfolgten endonukleolytischen Schnitt betrachtet werden, wenn ein

vorgeschnittenes Substrat benutzt wird, das an der natürlichen Polyadenylierungsstelle endet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fragment des iso-Cytochrom c-Gens (*cyc*) verwendet. Da die natürliche Polyadenylierungsstelle durch die in diesem Labor durchgeführten Arbeiten von Stefan Heidmann bekannt war, konnte das Fragment so kloniert werden, dass direkt an die Polyadenylierungsstelle eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NdeI eingeführt wurde. Durch endonukleolytischen Verdau mit NdeI konnte ein lineares DNA-Molekül erzeugt werden, das tatsächlich an seiner natürlichen Polyadenylierungsstelle endet:



Die unter 2.2.3.5 erwähnten Reaktionsbedingungen entsprachen denen der *in vitro*-Polyadenylierungsreaktion mit der Ausnahme, dass ein vorgeschchnittenes RNA-Transkript verwendet wurde. Die Reaktion mußte weiterhin für 1 Stunde bei 30°C inkubiert werden. Anschließend wurde wie oben beschrieben weiterverfahren.

2.2.3.8 Test auf unspezifische Poly(A)-Polymerase Aktivität

(modifiziert nach Zhelkovsky *et al.*, 1998)

Dieser Versuch sollte ausschließen, dass eine Veränderung der Polyadenylierungseffizienz auf einem Fehlen des Enzyms Poly(A)-Polymerase beruht. Dies kann bei der komplizierten Herstellung eines Hefe-Ganzzellextraktes, der für den Einsatz in einer 3'-Prozessierungsreaktion geeignet ist, nicht ausgeschlossen werden.

Die Spezifität der Poly(A)-Polymerase ist von der Konzentration an Magnesiumionen abhängig. Werden im Reaktionspuffer diese durch Manganionen ersetzt, geht die Spezifität verloren und es wird jedes beliebige, vorgegebene RNA-Substrat polyadenyliert – unabhängig von Signalsequenzen und anderen 3'-Prozessierungsfaktoren.

In einem derartigen Reaktionsansatz wurden 1 μ M RNA-Substrat mit 10 % Glycerin, 20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 50 mM $MnCl_2$, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 20 mg/ml BSA, 1 mM ATP, sowie 1 μ Ci α [^{32}P]-ATP und 2 μ l eines mit Ammoniumsulfat gefällten Hefe-Ganzzellextraktes bei 30°C für jeweils 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten inkubiert. Die verschiedenen Ansätze wurden mit 2 μ l Stop-Puffer (s. 2.2.3.5) versetzt und auf Eis gestellt. Nun wurden die Ansätze mit Roti-Phenol/Chloroform auf 100 μ l aufgefüllt und wie in Punkt 2.2.3.5 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.3.9 *In vivo* Polyadenylierungsreaktion (modifiziert nach Brown *et al.*, 1996)

Da *in vitro* Daten nicht den Anspruch erheben können, Reaktionen so zu veranschaulichen, wie sie in der Natur tatsächlich ablaufen, sollten in dieser Arbeit auch *in vivo* Untersuchungen vorgenommen werden. Hierbei sollte die Länge eines *in vivo* erzeugten Wildtyp Poly(A)-Schwanzes im Gegensatz zu einem Poly(A)-Schwanz eines anderen mutierten Stammes analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurde mittels der T4-RNA-Ligase an das 3'-Ende von RNA das Radionukleosid [^{32}P] pCp angehängt (Gumpert und Uhlenbeck, 1981). Ein Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 20 μ l 2,5 μ g Gesamt-RNA (s. 2.2.3.1), 2 μ l 100 % DMSO, 2 μ l 10x T4-RNA-Ligase Puffer, 3 μ l 100 % Glycerin, 3 μ l [^{32}P]-pCp, sowie 15 U T4-RNA-Ligase. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz

auf 30 µl verdünnt und überschüssige, nicht eingebaute Nukleotide über eine Mikrospin-S200 Säule entfernt. Um die einzelnen angehängten ATP-Bausteine betrachten zu können, mußte die RNA vom 5'-Ende her abgedaut werden, ansonsten wären auf dem Gel nur schwarze Streifen zu erkennen. Dieser Schritt wurde mit Hilfe der Ribonuklease A durchgeführt, die nur Pyrimidine erkennt und nach diesen spaltet. Es wurden 13 µl des Ansatzes verwendet und mit 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM Magnesiumchlorid, 0,5 M Natriumchlorid, 1 mg/ml tRNA, sowie 0,1 mg/ml RNaseA in einem Gesamtvolumen von 100 µl gemischt. Dieser Ansatz wurde ½ h bei 37°C inkubiert und anschließend einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit nachfolgender Fällung unterworfen. Die erhaltenen Präzipitate wurden in Formamid-Auftragspuffer* aufgenommen und auf ein 12 %iges Polyacrylamid Sequenzgel aufgetragen.

10x T4-RNA-Ligase Puffer	50 mM MgCl ₂ 250 mM HEPES-KOH (pH 8,3) 16 mM DTT 0,25 mM ATP
Formamid-Auftragspuffer*	95 % Formamid 20 mM EDTA 0,5 % Bromphenolblau 0,5 % Xylencyanol
Acrylamid-Gellösung	12 % (w/v) Acrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1) 7 M Harnstoff 0,5x TBE 1/200 Volumen 10 %iges APS 1/1.000 Volumen TEMED

2.2.4 Protein-Arbeitstechniken

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE werden Polypeptide aufgrund ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Gleichspannung voneinander getrennt. Eine wesentliche Voraussetzung dafür ist, dass die zu trennenden Polypeptide alle eine etwa gleiche Nettoladung tragen, ihre unterschiedlichen Eigenladungen bei der Trennung somit kaum eine Rolle spielen. Dies wird durch eine Beladung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) gewährleistet. SDS bindet in einem Verhältnis von 1,4 g SDS/g

Protein an hydrophobe Bereiche der Proteine. Dadurch erhalten diese eine gleichmäßig starke negative Ladung. Komplexe Proteine zerfallen dabei in ihre Untereinheiten, da gleichzeitig Disulfid-Brücken mit β -Mercaptoethanol gespalten und dabei reduziert werden. Für die Erzielung optimaler Trennergebnisse hat sich die Verwendung diskontinuierlicher Gele als hilfreich erwiesen. Das Polyacrylamid-Gel besteht aus einem hochprozentigen Trenngel und einem weniger konzentrierten Sammelgel. In dieser Arbeit wurden nur denaturierende, eindimensionale Elektrophoresen durchgeführt (Laemmli, 1970). Zum Gießen und für die Elektrophorese wurden Mini-Gelapparaturen, Abstandshalter und Teflon-Geltaschenformer der Firma BioRad verwendet. Zwei Glasplatten, mit den Ausmaßen von 8 x 10 und 7 x 10 cm wurden mit Spülmittel und destilliertem Wasser gesäubert und mit absolutem Ethanol trocken gerieben. Mit Hilfe zweier Abstandhalter (0,75 mm) wurden die Platten dann in einer Gießapparatur vertikal fixiert. Die Komponenten des Trenngels wurden gemischt und sofort mit einer Glaskapillare 6 cm hoch zwischen die beiden Platten pipettiert. Um eine glatte Gelfront zu erhalten und ein Austrocknen während der Polymerisation zu verhindern, wurde das Trenngel mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach Polymerisation wurde dieses abgegossen, die Lösung des Sammelgels auf das nun feste Trenngel pipettiert und sofort ein Kamm eingesetzt. Nach rund 20 Minuten ist die Polymerisation des Sammelgels beendet, der Kamm konnte nun entfernt werden. Nachdem die Proben in 5x SDS-Auftragspuffer aufgenommen, 3 Minuten bei 95°C denaturiert und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 2 Minuten, 14.000 rpm, RT) worden waren, konnte das fertige Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur eingespannt und beladen werden. Als Laufpuffer diente 1x TGS. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V und war nach Erreichen des unteren Plattenrandes durch den Bromphenolblaumarker beendet. Das Gel wurde anschließend entweder als Matrize zum Blotten auf eine Nitrocellulosemembran oder zum Anfärben durch Coomassie-Brillant Blau weiterverwendet.

Trenngel
(für 2 Gele)

Angaben in ml	8 %	9 %	10 %	12 %	15 %
Wasser	4,6	4,3	4,0	3,3	2,3
Acrylamidmix	2,7	3,0	3,3	4,0	5,0
1,5 M Tris (pH8.8)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
10 % (w/v) SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10 % (w/v) APS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,003	0,006	0,004	0,004	0,004

Sammelgel
(für 2 Gele)

Wasser	2,7 ml
Acrylamidmix	0,67 ml
1,5 M Tris (pH 6,8)	0,5 ml
10 % (w/v) SDS	0,04ml
10 % (w/v) APS	0,04ml
TEMED	0,004 ml

Acrylamidmix

30 % (w/v) Rotiphorese Gel 30
(Acrylamid:Bisacrylamid, im Verhältnis: 30:0,8)

5x SDS-Auftragspuffer

312,5 mM Tris (pH 6,8)
25 % (w/v) SDS
25 % β -Mercaptoethanol
30 % Glycerin
0,01 % Bromphenolblau
0,01 % Xylencyanol

2.2.4.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Analyse eines Proteingels nach einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte über eine Coomassie-Färbung (Laemmli, 1970). Das Gel wurde in eine Coomassie-Färbelösung gelegt und 5 Minuten in der Mikrowelle auf Stufe 1 inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel mehrere Male in Entfärbelösung gelegt und für 10 Minuten geschwenkt. Zum Trocknen mußte das Gel luftblasenfrei zwischen zwei in Wasser getränkte Cellulose-Blätter in den Rahmen einer Proteingel-Trockner-Apparatur (Promega) eingespannt werden. Der Rahmen wurde über Nacht zum Trocknen vertikal plaziert.

Coomassie-Färbelösung

40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue

Entfärbelösung

40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

2.2.4.3 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde über die Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Die Messung beruht auf einer Absorptionsänderung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm in Abhängigkeit der

Proteinkonzentration. Der Farbstoff geht wahrscheinlich elektrostatische Wechselwirkungen mit freien Aminogruppen der Proteine ein und bindet außerdem nichtkovalent an apolare Bereiche (z.B. aromatische Reste). Durch Erstellung einer Eichgeraden mit bekannten Mengen eines Standardproteins, wie BSA, konnte die unbekannte Proteinkonzentration ermittelt werden.

Praktisch wurde eine käuflich zu erwerbende Farblösung der Firma BioRad verwendet, die 1:5 mit Wasser verdünnt werden mußte. 1 ml dieser Mischung versetzte man anschließend mit 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung, sowie 5 µl des in der Proteinlösung verwendeten Puffers. Als Referenz dienten 10 µl dieses Puffers.

2.2.4.4 Western-Blot-Analyse

Die auch als Immunoblot bekannte Western-Blot-Analyse dient der Identifizierung eines spezifischen Antigens mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen dieses Antigen gerichtet ist. Die Detektion dieses Komplexes erfolgt über einen zweiten Antikörper, der einen konservierten Bereich des ersten Antikörpers erkennt. Dieser zweite Antikörper ist mit dem Enzym Peroxidase, welche eine Reaktion katalysiert, die zu einer Freisetzung von Licht führt, die als Chemolumineszenz detektierbar ist, gekoppelt. Die Proteinlösungen mit den entsprechenden Antigenen wurden über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.2.4.1) aufgetrennt. Als Marker diente ein vorgefärbter Protein-Standard, dessen Banden bereits während der Elektrophorese zu erkennen sind. Nach der Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

Hierfür wurde in eine Wanne eiskalter Transfer-Puffer gegeben, so dass die verwendeten Geräte und Materialien ständig mit Puffer bedeckt waren. Eine Transferzelle der Firma BioRad wurde in die Wanne gegeben und folgendes „Sandwich“ hergestellt. Zuerst legte man einen Schwamm auf diejenige Seite der Transferzelle, die im Anschluß an den Minuspol des Transfertanks angeschlossen wurde, darauf mehrere Lagen saugfähiges Papier und darauf das zu blottende Gel. Es folgte die Membran, mehrere Lagen Papier und zuletzt noch ein Schwamm. Die Transferzelle wurde verschlossen und in die Apparatur gestellt. Der Tank wurde mit Transfer-Puffer gefüllt und der Transfer bei 70 V, 200 mA gestartet. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine (< oder > als 100 kDa) wurde die Übertragung für 2 bis

4 Stunden im Kühlraum, also bei 4°C unter ständiger Umwälzung des Puffers durchgeführt. Bei geglücktem Transfer konnte man die Banden des vorgefärbten Protein-Standards auf der Membran erkennen.

Nach kurzer Trocknung der Membran zwischen zwei Filterpapieren wurde diese in eine Suspension aus 6 % Magermilch in 1x PBS gelegt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde geschüttelt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem polyklonalen Antikörper, der im Verhältnis 1:1000 mit 1x PBS-T verdünnt wurde. Handelte es sich hingegen um Präimmenserum, das noch keine spezifischen Antikörper enthält, betrug die Verdünnung nur 1:500. Die Membran wurde anschließend einmal für 15 Minuten, dann zweimal für 5 Minuten mit 1x PBS-T gewaschen. Der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5.000 in 1x PBS-T eingesetzt. Die Inkubationsdauer mit der Membran betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Auch nach dieser Inkubation mußte die Membran gewaschen werden, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Dies geschah einmal für 15 Minuten und viermal für 5 Minuten mit 25 ml 1x PBS-T. Der Nachweis der emittierten Chemolumineszenz erfolgte in der Dunkelkammer mit Hilfe des „ECL-Western-blotting-kit“ der Firma Amersham. Die darin enthaltenen zwei Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 0,125 ml/cm² auf die Membran pipettiert. Das konjugierte Enzym Peroxidase katalysiert eine Oxidation von Luminol, die in einer Lichtemission resultiert. Nach 1 minütiger Inkubation konnte die Membran mit Klarsichtfolie umwickelt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL) aufgelegt werden. Die Expositionszeit betrug zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten.

Man kann die Membran auch bereits direkt nach dem Transfer als Kontrolle mit Ponceau-Lösung anfärben, so dass alle übertragenen Proteine rot gefärbt erscheinen. Dazu wird die Membran für 5 Minuten in 20 ml Ponceau-Lösung inkubiert und dann zur teilweisen Entfärbung für rund 2 Minuten gewässert. Wollte man noch einen immunochemischen Nachweis durchführen, wurde die Membran durch 5-minütiges Waschen vollständig entfärbt und wie oben beschrieben weiter verfahren.

Transfer-Puffer

192 mM Glycin
25 mM Tris
20 % Methanol

Ponceau-Lösung

500 mg Ponceau S in 1 ml Eisessig lösen
H₂O ad 100 ml, Lösung filtrieren

2.2.4.5 Expression von rekombinanten Proteinen in *E.coli*

Vorraussetzung für dieses Experiment ist die Klonierung des entsprechenden Gens sowie die Transformation dieses Vektors in einen *E. coli* Expressionsstamm (s. 2.2.2.6). In der vorliegenden Arbeit wurden als Expressionsvektoren pET15b bzw. pET28b verwendet. Diese Vektoren enthalten außer einer T7-Promotorsequenz den lac-Operator. An diese Sequenz ist normalerweise ein Repressorprotein gebunden. Durch Zugabe des unphysiologischen Substrats IPTG (Isopropylthiogalactosid) kommt es zu einer Konformationsänderung des Repressorproteins, so dass es von dem Operator-Bereich abdiffundiert und die T7-Polymerase das stromabwärts liegende Gen transkribieren kann. Der Stamm BL21(DE3) enthält das Gen für die T7-Polymerase, die unter der Kontrolle eines induzierbaren lac-Promotors steht.

500 ml TBG-M9 Medium wurden mit einer rekombinanten *E. coli*-Kultur des Expressionsstammes BL21(DE3) angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler auf eine OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 0,4 mM IPTG für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Durch geeignete Expressionstemperaturen und -zeiten konnte die Bildung von Einschlusskörperchen (inclusion bodies), in denen aufgrund zu starker Überexpression denaturiertes Protein abgelagert wird, kontrolliert werden. Die Zellen wurden anschließend gesammelt (GS3-Rotor, 20 min, 4°C, 4.000 rpm) und das Naßgewicht des Bakteriensediments bestimmt. Die Zellen können, wenn sie nicht sofort weiterverarbeitet werden, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert werden.

2.2.4.6 Aufschluß von *E. coli* Bakterienzellen mit Ultraschall

Dieser Schritt wird routinemäßig durchgeführt, um Bakterienzellen aufzuschließen, aber auch um einen ersten Reinigungsschritt durchzuführen. Hierbei werden lösliche Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen, wie den in Punkt 2.2.4.5 erwähnten Einschlusskörperchen, getrennt. Für eine nachfolgende denaturierende Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine wurde das aus der Ultraschallbehandlung resultierende Sediment weiterverarbeitet,

der Überstand kann zur nativen Aufreinigung des Proteins verwendet werden. Der Aufschluß selbst wurde unter nativen Bedingungen auf Eis durchgeführt.

Zunächst wurden die Bakterienzellen (s. 2.2.4.5) in 20 ml Lysispuffer pro 200 ml Kultur vorsichtig resuspendiert und zweimal für 10 Minuten auf Eis mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier W250, spitze Form, Pulsdauer 30 %, Pulsstärke 3). Zwischen den Ultraschallbehandlungen mußte die Suspension für 10 Minuten auf Eis gekühlt werden. Die lysierten Bakterienzellen wurden im Anschluß in ein SS34-Röhrchen überführt und zentrifugiert (SS34-Rotor, 14.000 rpm, 30 min 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Das Sediment wurde erneut mit 20 ml/200 ml Kultur Lysispuffer resuspendiert und zur Abkühlung für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und im Anschluß zentrifugiert (SS34-Rotor, 14.000 rpm, 30 min 4°C). Das entstandene Sediment konnte, wenn es nicht sofort weiterbehandelt wurde, bei -20°C gelagert werden.

Nativer Lysispuffer

500 mM NaCl
 10 % Glycerin
 20 mM Tris-HCl (pH 7,3)
 0,1 % NP-40
 1 mM AEBSF
 20 µg/ml Leupeptin
 10 µg/ml Aprotinin
 20 µg/ml Benzamidin
 2 µg/ml TPCK

2.2.4.7 Aufreinigung von Proteinen über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung beruht auf einer Chelatbildung zwischen den Nickelionen und Imidazolringen. Wie in 2.2.4.5 bereits erwähnt, wurde das Gen, von dem rekombinantes Protein exprimiert werden sollte, in einen Expressionsvektor kloniert. Dieser Schritt verknüpft das Gen an seinem 5'-Ende mit einer DNA-Sequenz, die für sechs Histidin-Reste codiert. Es resultiert nach der Expression der kompletten DNA-Sequenz also ein Fusionsprotein, das aus dem rekombinanten Protein und dem sogenannten „His-Tag“, der sich am N-Terminus des eigentlichen Proteins befindet, besteht. Die Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine erfolgte nun unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff bzw 6 M Guanidiniumhydrochlorid. Die einzelnen Schritte wurden alle im sogenannten „Batchverfahren“ bei Raumtemperatur durchgeführt. Das aus der Ultraschallbehandlung

erhaltene Bakteriensediment (s. 2.2.4.6) wurde in 5 ml denaturierendem Lysispuffer A pro Gramm Naßgewicht für 1 Stunde auf einem Drehrad inkubiert. Das Lysat wurde anschließend abzentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, SS34-Rotor, 4°C) und der erhaltene Überstand mit Säulenmaterial inkubiert. Als Säulenmaterial diente mit Ni²⁺-Ionen beladene immobilisierte Nitrilotriessigsäure (NTA) (Hochuli *et al.*, 1987). Zur Aufreinigung wurden pro 500 ml Bakterienkultur 1 ml reine Ni²⁺-NTA-Agarose mit Lysispuffer A* äquilibriert. Die Bindung des gekoppelten Proteins an die Säulenmatrix erfolgte für 1 Stunde in einem 15 ml Plastikröhrchen auf einem Drehrad. Das Säulenmaterial wurde dann zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge, GS-15R, 2.500 rpm, 2 min, RT) und dreimal mit drei Säulenvolumen Lysispuffer A* gewaschen (jeweils 10 Minuten Drehrad, 2 Minuten abzentrifugieren, Beckman, 2.500 rpm, 2 min, RT). Nun wurde das Säulenmaterial dreimal mit drei Säulenvolumen Puffer B gewaschen. Diese Waschschrirte wurden mit Puffer C und D wiederholt.

Die Elution des gebundenen Proteins von der Agarose vollzog sich in einem Säulenvolumen Puffer E für 1 Stunde auf dem Drehrad. Schließlich wurde die Säulenmatrix erneut zentrifugiert und der Überstand, der die gelösten Proteine enthielt, vorsichtig abgenommen. Diese Elutionsschrirte wurden noch fünfmal wiederholt, um das gesamte Protein abzulösen. Die so gesammelten Wasch- und Elutionsfraktionen wurden durch eine SDS-Gelelektrophorese analysiert und ausgewertet.

Denaturierender Lysispuffer A	6 M Guanidiniumhydrochlorid 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris pH mit NaOH auf 8,0 einstellen, filtrieren
Lysispuffer A*	6 M Guanidiniumhydrochlorid 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris pH mit NaOH auf 8,0 einstellen, filtrieren 100 mM NaCl 1 mM Imidazol
Puffer B	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris pH mit NaOH auf 8,0 einstellen, filtrieren 100 mM NaCl 1 mM Imidazol
Puffer C	wie Puffer B, mit 5 mM Imidazol
Puffer D	wie Puffer B, mit 15 mM Imidazol
Puffer E (Elutionspuffer)	wie Puffer B, mit 200 mM Imidazol

2.2.4.8 Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Tierzucht in München hergestellt. Vor der ersten Immunisierung der Tiere, wurde ihnen 3-5 ml Blut entnommen, um zu testen, ob sich das Kaninchen nicht schon einmal mit Hefepilzen infiziert hatte und damit bereits störende Antikörper in seinem Serum enthalten waren (= Präimmuserum). Von den Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Tierzucht wurde das frisch aus der Ohrvene abgenommene Blut für 1 Stunde in einen Brutschrank bei 37°C gestellt und über Nacht in einem Kühlschrank gelagert. Dies und eine anschließende Zentrifugation (Sorvall, 10 min, 4°C, 14.000 rpm) dienten der Abtrennung der festen Blutbestandteile, die bei diesen Bedingungen agglomerieren (Harlow *et al.*, 1988).

Für die Immunisierung wurde denaturierend aufgereinigte Proteinlösung (2.2.4.7) mit 1x PBS in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml gemischt (200-250 µg Protein/ml PBS). Dieser Ansatz wurde in ein auf 42°C vorgewärmtes Gefäß mit Rib-Adjuvant (SIGMA) gegeben und 3 Minuten heftig auf einem Vortex gemischt. 1 ml der Emulsion wurde mit mehreren Einstichen subkutan injiziert, die übrige Emulsion für die nächste Immunisierung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Nach 21 und 42 Tagen wurde die spezifische IgG Antikörperproduktion durch erneute Injektionen (1 ml) stimuliert. Nach 52 Tagen wurde das Kaninchen ausgeblutet und genau wie das Präimmuserum behandelt. Allerdings mußte in diesem Fall das koagulierte Blut bei einer höheren Umdrehung zentrifugiert werden, nämlich für 10 Minuten bei 9.000 rpm und 4°C in einem GS3-Rotor, der Überstand wurde in ein SS34-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (18.000 rpm, 4°C, SS34-Rotor, 30 min). Es wurden durchschnittlich zwischen 60 bis 70 ml Serum gewonnen, die in 50 µl Aliquots bei – 20°C gelagert wurden.

2.2.4.9 Affinitätsreinigung von Antikörpern an Protein-A-Sepharose

Protein A ist ein aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* isoliertes Protein; es bindet an die konstante Fc-Region von Immunglobulinen und läßt somit die beiden Antigen-Bindungsstellen unbeeinflußt. Protein A erkennt die meisten Typen von Immunglobulinen verschiedener Spezies und kann daher zur Reinigung von diesen, aber auch von Antigen-

Antikörper-Komplexen eingesetzt werden. Protein A dient hierbei als Ligand, der an eine Trägermatrix immobilisiert wurde. Eine Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern (2.2.4.8) ist notwendig, um Verunreinigungen durch RNasen oder DNasen zu beseitigen, dient aber auch der spezifischen Anreicherung im Serum.

Die Protein A-Sepharose wurde zweimal mit 1 ml Puffer D-50 für 10 Minuten äquilibriert. Die verwendete Suspensionsmenge war von der Antikörperkonzentration abhängig: Die Bindekapazität der verwendeten Sepharose beträgt 6 mg Antikörper/ml Suspension. Üblicherweise wurden 80 µl Suspension verwendet (Suspension im Verhältnis 1:1 mit 20 % Ethanol). Anschließend wurde kurz abzentrifugiert. (Eppendorf-Zentrifuge, 2.000 rpm, 1 min, RT). Die Kopplung erfolgte im Anschluß mit 50 µl Präimmun-, bzw. Antiserum in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 2 Stunden auf einem Drehrad bei 4°C. Das Säulenmaterial wurde schließlich abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min, 4°C, 2.000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde nun noch zweimal mit 500 µl und einmal mit 300 µl Puffer D-50 gewaschen, wobei die einzelnen Waschfraktionen 10 Minuten auf einem Drehrad inkubiert und anschließend abzentrifugiert wurden (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min, 4°C, 2.000 rpm). Wurde die Säulenmatrix nicht sofort weiterverwendet, konnte sie in Puffer D-50 bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Dialysepuffer D-50

20 mM Tris-HCl (pH 7,9)
0,2 mM EDTA
50 mM KCl
20 % (v/v) Glycerin
0,01 % (v/v) NP-40

2.2.4.10 Immundepletion eines Hefe-Ganzzellextraktes

Bei einer Immundepletion werden durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion spezifisch Proteine aus einem Extrakt möglichst vollständig entfernt. Eine Immundepletion wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, um zu testen, ob ein derartig präparierter „depletierter“ Extrakt, der also das fragliche Protein nicht mehr enthält, noch diesselbe Aktivität aufweist wie ein entsprechender Wildtypextrakt.

50 µl eines mit Ammoniumsulfat fraktionierten Hefe-Ganzzellextraktes (2.2.4.12 und 13) wurden hierfür mit 40 µl an Antikörper gekoppelte Protein A-Sepharose (s. 2.2.4.9) in

einem Eppendorfgefäß für 4 Stunden auf einem Drehrad im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend sedimentiert (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min, 4°C, 2.000 rpm) und der Überstand erneut mit 40 µl gekoppelte Protein A-Sepharose unter den bereits erwähnten Bedingungen inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min, 4°C, 2.000 rpm), wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.4.11 Coimmunpräzipitation durch Protein A-Sepharose

Anhand einer Coimmunpräzipitation kann ein durch Immundepletion erhaltener Komplex aus Protein-A-Sepharose, Antikörper und hieran gebundenem Protein (s. 2.2.4.10), auf mögliche Interaktionspartner, die eventuell zusammen mit dem gesuchten Protein in einem Komplex assoziiert vorliegen, untersucht werden.

Hierzu wurde das Sediment zweimal mit 300 µl Puffer D-150 gewaschen und nach Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min, RT, 2.000 rpm) in 30 µl 2x SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Diese Suspension wurde für 10 Minuten bei 100°C gekocht um den Antigen-Antikörper-Komplex von der Säulenmatrix zu lösen, wobei zwischendurch mehrmals kräftig auf dem Vortex gemischt wurde. Nach einer abschließenden Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min, RT, 2.000 rpm) wurde der Überstand vorsichtig, ohne Säulenmaterial aufzuwirbeln, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 µl auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nylonmembran geblottet und entsprechend der Vorschrift 2.2.4.4 eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

2x SDS-Auftragspuffer

150 mM Tris-HCl (pH 6,8)
8 M Harnstoff
4 % (w/v) SDS
0,5 % (w/v) Bromphenolblau
immer frisch zugeben: 1/100 Volumen 1 M DTT

2.2.4.12 Präparation eines Hefe-Ganzzellextraktes für die *in vitro* 3'-Prozessierung

Die Präparation eines Hefe-Ganzzellextraktes erfolgte nach der Methode von Lin (Lin *et al.*, 1985) sowie deren Modifikation nach Butler (Butler *et al.*, 1990).

20 ml YPD Medium wurden mit einer Kolonie des frisch ausgestrichenen *S. cerevisiae* CEN PK2 Stammes angeimpft und diese Vorkultur ca. 10 Stunden bei 30°C geschüttelt (180 rpm). Nach Ermittlung der optischen Dichte (OD_{600}) dieser Hefesuspension wurde diese in einem 3 Liter Erlenmeyerkolben derart verdünnt, dass, ausgehend von einer Verdopplungszeit der Hefezellen von 1½ Stunden, die OD_{600} nach weiteren 16 Stunden 2,5-3,0 betrug. Nachdem die gewünschte optische Dichte erreicht war, wurden 1 ml 1 M PMSF zugegeben und die Kultur für weitere 15 Minuten bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden in 1 Liter Zentrifugenbechern abzentrifugiert (5.000 rpm, Sorvall RC5C-Zentrifuge, 10 min, RT) und das Hefesediment, nach Bestimmung des Naßgewichts, mit 50 ml Waschpuffer gewaschen, wobei es in GS-3-Zentrifugenbecher überführt wurde. (Die folgenden Volumenangaben beziehen sich auf 7 g Naßgewicht). Daran schloß sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an (GS-3 Rotor, 5.000 rpm, 5 min, RT), gefolgt von der Wiederaufnahme der Hefezellen in 30 ml SB30-Puffer. Diese Suspension wurde in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (120 rpm). Nach 5 minütiger Zentrifugation (Beckman GS-15R-Zentrifuge, S4180 Rotor, 2.500 rpm, RT) wurde das entstandene Hefesediment in Puffer SB3 aufgenommen. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden dieser Suspension 10 µl entnommen und zusammen mit 1 ml 10 %iger (w/v) SDS-Lösung in einer Plastikkuvette gut gemischt. Zur restlichen Suspension gab man 2 mg/g Zellen-Naßgewicht Zymolyase 20.000-Lösung in 200 µl Puffer. Dieses Enzym soll die Zellwand der Hefezellen andauen und damit zu deren Sphäroblastierung führen. Diese sind durch einen Wechsel des Salzgehaltes im Puffer leicht zum Platzen zu bringen, während dies mit Zellen, die eine intakte Zellwand besitzen, nicht möglich wäre. Der Ansatz wurde für 1 Stunde in einem 30°C-Schüttler bei 120 rpm inkubiert, wobei nach 10, 20 und 40 Minuten die OD_{800} von 10 µl in 1 ml 10 % SDS bestimmt wurde. Als Referenz diente die der Suspension zuerst entnommene Probe. Das Detergens SDS solubilisiert die bereits sphäroblastierten Hefezellen, wovon Zellen mit noch intakter Zellwand nicht betroffen sind. Das Fortschreiten der Sphäroblastierung kann also mit abnehmender OD_{800} beobachtet werden.

Die optische Dichte sollte dabei innerhalb 1 Stunde auf 10-15 % des Ausgangswertes gesunken sein, sonst ist der Ansatz zu verwerfen. Die sphäroblastierten Hefezellen wurden zentrifugiert (Beckman GS-15R-Zentrifuge, S4180 Rotor, 5 min, 2.500 rpm, RT), in 30 ml SB3-Puffer, dem 0,5 mM PMSF in DMSO zugesetzt wurden, resuspendiert und erneut zentrifugiert (Beckman GS-15R-Zentrifuge, S4180 Rotor, 2.500 rpm, RT). Das erhaltene Zellsediment wurde für 20 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend in 10 ml 1x Puffer A aufgenommen und in einen 40 ml Glashomogenisator überführt. Ab dem nun folgenden Arbeitsschritt wurden alle Vorgänge bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Mit einem Pistill wurde die Suspension mehrfach bearbeitet, zwischen den einzelnen Stößen wurde die Mischung immer wieder für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Die durch Puffer A gegebenen hypotonen Bedingungen führen zusammen mit der mechanischen Reibung des Pistills zu einem Platzen der Sphäroblasten. Zwischenzeitlich wurden einige µl der Suspension unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Erst nach Erhalt eines einheitlichen Bildes komplett lysierter Zellen konnte die Homogenisierung beendet werden. Nachdem das Volumen des Ansatzes bestimmt worden war, wurde dieser in ein Becherglas überführt, 2 M KCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 200 mM zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten gerührt. Um eventuell noch intakt gebliebene Hefezellen und Zellbruchstücke zu entfernen, wurde der Ansatz zentrifugiert (SS 34 Rotor, 30 Minuten, 17.000 rpm, 4°C). Der erhaltene Überstand wurde auf SW60 Ti-Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und 60 Minuten lang bei 37.000 rpm zentrifugiert (Beckman L7/65 Ultrazentrifuge, SW60 Ti-Rotor, 4°C), um die löslichen Proteine von Zellorganellen wie Mitochondrien und Ribosomen abzutrennen.

Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde vorsichtig, ohne die Lipidschicht, die auf der Oberfläche schwimmt, aufzuwirbeln, in einen Spectra/Por Dialyseschlauch (Molekulargewichtsausschlußgrenze 6.000-8.000 Da) pipettiert und über Nacht gegen 3 Liter Puffer E50 dialysiert. Der Dialyseschlauch war vorher mit Wasser und Puffer E50 äquilibriert worden. Der Extrakt wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Waschpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,2 mM EDTA (pH 8,0)
SB30 Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,8) 1 M Sorbit 10 mM MgCl ₂ frisch zugeben: 30 mM DTT

SB3 Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,8) 1 M Sorbit 10 mM MgCl ₂ frisch zugeben: 3 mM DTT
Zymolyase Puffer	20 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) Mischung aus 1 M K ₂ HPO ₄ und 1 M KH ₂ PO ₄ Lösung, in einem Verhältnis, dass der gewünschte pH erzielt wird 5 % Glukose
10x Puffer A	100 mM HEPES-KOH (pH 7,8) 15 mM MgCl ₂ 100 mM KCl vor Gebrauch 1x Puffer mit sterilem H ₂ O herstellen und darin eine complete™ Mini-Proteinase-Inhibitor-Tablette von Boehringer lösen 0,5 mM DTT 1 mM AEBSF
Dialysepuffer E-50	20 mM HEPES-KOH (pH 7,8) 0,2 mM EDTA 50 mM KCl 20 % Glycerin frisch zugeben: 0,5 mM DTT 0,5 mM AEBSF

2.2.4.13 Partielle Fraktionierung eines Hefe-Ganzzellextraktes über Ammoniumsulfatfällung

Dieser allgemeine Aufreinigungsschritt wurde nach einer Beschreibung von Butler (Butler *et al.*, 1990) ausgeführt. Bei einer 40 %igen Ammoniumsulfatfällung fallen alle an der mRNA-3'-Prozessierung beteiligten Faktoren aus und können durch diese Vorreinigung leichter untersucht werden.

Alle Arbeiten fanden im Kühlraum bei 4°C statt. Ein 500 µl Aliquot eines Hefe-Ganzzellextraktes (s. 2.2.4.12) wurde auf Eis aufgetaut und mit 330 µl einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt. Allerdings wurde die Lösung nicht auf einmal zugegeben, sondern tropfenweise unter ständigem vorsichtigem Umschwenken. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf einem Drehrad inkubiert und im Anschluß in einer vorgekühlten Zentrifuge das gebildete Präzipitat konzentriert (Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 rpm, 30 min). Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Das Präzipitat wurde in 125 µl D-50* Puffer aufgenommen und zum Lösen für 1 Stunde auf Eis

gestellt. Diese Lösung wurde schließlich in 50 µl-Portionen über eine Mikro-Dialyse Membran (Millipore Ø 0,025 µm) gegen Puffer D-50 in einer großen Petrischale für 1 Stunde dialysiert. Die Portionen wurden nach vollendeter Dialyse von der Membran vorsichtig abgenommen, in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Dialysepuffer E-50*

s. Punkt 2.2.4.11

36 µl eines 7x konz. Mixes einer Tablette complete™ Mini-Proteinase-Inhibitor (Boehringer)
0,5 mM DTT
1 mM AEBSF

gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung

4,2 M Ammoniumsulfat
pH mit 25 %iger NH_3 -Lösung bei 4°C auf 7,5 einstellen

2.2.4.14 *In vitro* Translation rekombinanter Proteine in einem Retikulozyten - Lysat (modifiziert nach Pelham und Jackson, 1976)

Um Wechselwirkungen von Proteinen miteinander oder mit Nukleinsäuren zu untersuchen, müssen native, also funktionelle Proteine verwendet werden. Da oft nicht die Möglichkeit besteht, die Funktionalität eines Proteins zu testen, und eine Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen sehr diffizil ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Weg über ein kombiniertes Transkriptions-/Translationssystem (TNT-gekoppeltes Retikulozyten-Lysat-System der Firma Promega) gewählt. Dieses System erlaubt sowohl die Transkription als auch die anschließende Translation eines Gens, welches unter der Kontrolle des T7-, T3- oder SP6- Promotors auf einer linearisierten Plasmid-DNA lokalisiert ist, in einem mit Nuklease behandelten Retikulozyten-Lysat. Ein 50 µl Translationsansatz enthält üblicherweise 1 µl 25x TNT-Puffer, 20 µM Aminosäuremix ohne Methionin, 40 U RNase-Inhibitor, 500 ng zirkuläre Plasmid-DNA, 1 µl TNT T7-RNA-Polymerase (oder eine der anderen), 50 % (v/v) TNT Retikulozyten Lysat aus Kaninchen und 40 µCi L-[^{35}S] Methionin. Sollte das Protein hingegen nicht radioaktiv markiert werden, wurde ein vollständiger Aminosäuremix verwendet und auf einen Zusatz von L-[^{35}S] Methionin verzichtet. Der Ansatz wurde für 1½ Stunden bei 30°C inkubiert. Von dieser Reaktion wurden 5 µl abgenommen und diese mit 20 µl 2x SDS-Auftragspuffer (s. 2.2.4.1) versetzt, der übrige Ansatz wurde bei -20°C

gelagert. Die nun denaturierten Proteine konnten anhand eines SDS-Polyacrylamidgels analysiert werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf ein Filterpapier gelegt, unter Vakuum getrocknet und über Nacht autoradiografiert.

2.2.4.15 Untersuchung von Interaktionen *in vitro* translaterter Proteine durch Coimmunpräzipitation

Zur Untersuchung von möglichen Protein-Komplexbildungen wurden affinitätsgereinigte Antikörper (s. 2.2.4.9) mit *in vitro* translatierten (s. 2.2.4.14) und radioaktiv markierten Proteinen inkubiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden im Anschluß über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und das Gel autoradiografiert.

Zunächst wurden 40 µl Protein-A-Sepharose in 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM KCl und 0,25 % NP-40 äquilibriert. Alle nun folgenden Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C ausgeführt. Das Säulenmaterial wurde mit 5 µl Antiserum gegen das jeweilige Protein oder mit dem entsprechenden Präimmunsrum in demselben Puffer unter Zusatz von 5 mg/ml BSA versetzt und für 1 Stunde auf einem Drehrad inkubiert. Die Matrix wurde dreimal mit 300 µl des oben erwähnten Puffers gewaschen (10 min Drehrad, Kühlzentrifuge, 30 sek, 2.000 rpm) und danach in 300 µl Puffer mit 5 mg/ml BSA aufgenommen. Zum Beladen des Säulenmaterials wurden 5 µl nicht radioaktiv markiertes, *in vitro* translatiertes Yor179c bzw. Fip1-Protein zugegeben und für weitere 1½ Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Erneut wurde dreimal mit 300 µl Puffer gewaschen und in 300 µl Puffer mit 5 mg/ml BSA aufgenommen. Nun wurden je 5 µl der *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Proteine zugegeben und noch einmal 1½ Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 300 µl Puffer wurde die Säulenmatrix in 20 µl 2x SDS-Auftragspuffer (s.2.2.4.1) aufgenommen und 15 Minuten lang bei 100°C, unter mehrmaligem Mischen auf einem Vortex inkubiert. Der Ansatz wurde dann abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 14.000 rpm, 2 min, RT) und, ohne Säulenmaterial aufzuwirbeln, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. 5 µl dieses Ansatzes wurden über eine 10 %ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und wie unter 2.2.4.14 beschrieben weiterbehandelt und autoradiografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzähnlichkeit des mRNA-3'-Prozessierungsfaktor Brr5 zu dem Genprodukt des offenen Leserahmens YOR179c

In den letzten Jahren konnte wiederholt gezeigt werden, dass mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren evolutionär zwischen Säugern und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konserviert sind. Mit der im Jahre 1996 vollständig abgeschlossenen Sequenzierung des Hefegenoms bestand eine völlig neue Möglichkeit, Proteinaktivitäten aufgrund ihrer Homologie zu bereits bekannten Faktoren aus höheren Eukaryonten zu identifizieren. Durch Datenbanksuche mit dem BLAST-Algorithmus wurde ein offener Leserahmen (YOR179c, Accession Number Z75087) auf Chromosom XV gefunden, der eine starke Sequenzähnlichkeit zu dem bereits bekannten mRNA-3'-Prozessierungsfaktor Brr5 in *S. cerevisiae* (Noble und Guthrie, 1996) aufwies. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz dieses offenen Leserahmens ist in Abb. 3 dargestellt. Eine weitere vergleichbare Verwandtschaft (37,1 % Identität und 52 % Sequenzähnlichkeit über einen Bereich von 197 Aminosäuren) wurde zu keinem anderen Protein, sei es in Hefe- oder Säugetierzellen, gefunden. Allerdings weist das Brr5-Protein eine starke Homologie zu der 73 kDa-Untereinheit des „cleavage and polyadenylation specificity factor“ (CPSF, Jenny *et al.*, 1994) auf, dessen spezifische Funktionsweise innerhalb der 3'-Prozessierung bis zu Beginn dieser Arbeit noch nicht aufgeklärt war. Da diese 73 kDa-Untereinheit wiederum eine 23 %ige Identität, sowie eine 49 %ige Sequenzähnlichkeit zu der 100 kDa-Untereinheit des CPSF aufweist (Jenny *et al.*, 1994; Jenny *et al.*, 1996), wurde untersucht, ob ein potentielles Yor179c-Protein aufgrund seiner ausgeprägten Ähnlichkeit zu der Proteinsequenz von Brr5 ebenfalls ein Element der mRNA-3'-Prozessierung in *S. cerevisiae* darstellt.

```

ATGGATTACCCAAGGACAAAAGTGACAGAACTCATCAAAGAATTAATCTAAATAACAGT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACCTAAATGGGTTCTGTTTTCTACTGTCTTGAGTAGTTTTCTTAATTAGATTTATTGTCA

M D L P K D K S D R T H Q R I N L N N S -

GGGACAGATCGAACTAATGATTTGTACCTTCATATTGTCCAAACGTTTCGGTTGCATAGAA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCCTGTCTAGCTTGATTACTAAACATGGAAGTATAACAGGTTTGCAAGCCAACGTATCTT

G T D R T N D L Y L H I V Q T F G C I E -

```

```

          ACAACTGCAACGGAAAATGCCACGAAACTGTTAATGCTGGGTGACGTCGAAGTAGAAATA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
          TGTTGACGTTGCCTTTTACGGTGCTTTGACAATTACGACCCACTGCAGCTTCATCTTTAT

          T T A T E N A T K L L M L G D V E V E I -

          TCTGCGAGCAGCGTTTCAATTGAGTGGACACAGAAGTCAATGATAAGCCAAACAATTGCC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
          AGACGCTCGTCGCAAAGTTAACTCACCTGTGTCTTCAGTTACTATTCGGTTTGTAAACGG

          S A S S V S I E W T Q K S M I S Q T I A -

          GATAGTATAGTAATAATGATCATCGGTTTGTGTGCAAGCGACAAGAACGTGCTATCTGAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
          CTATCATATCATTATTACTAGTAGCCAAACACACGTTTCGCTGTTCTTGCACGATAGACTT

          D S I V I M I I G L C A S D K N V L S E -

          TCAGAATTGAAAGAGAGAAACCATAACGTTTGGGAAGATCCAAGAATTGCAAAATCTGTTT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
          AGTCTTAACTTTCTCTCTTTGGTATTGCAAACCTTCTAGGTTCTTAACGTTTTAGACAAA

          S E L K E R N H N V W K I Q E L Q N L F -

          CGAGAACAATTTGGAGACAGTTTTAGCATCGATGAAGGAATAGGAAAAAAGAAAATGTA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
          GCTCTTGTTAAACCTCTGTCAAATCGTAGCTACTTCCTTATCCTTTTTTCTTTTACAT

          R E Q F G D S F S I D E G I G K K E N V -

          AAGAATGGTAGCGTCACCATAGGCAAGAGTAAAGCCACGATCGATTTCTCCACCATGAAG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
          TTCTTACCATCGCAGTGGTATCCGTTCTCATTTCGGTGCTAGCTAAAGAGGTGGTACTTC

          K N G S V T I G K S K A T I D F S T M K -

          CTGATTGATTGTAATTCGAACCCACTAAAGGGAAGAGTGGAGAGCATACTAAGCATTGGC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
          GACTAACTAACATTAAGCTTGGGTGATTTCCCTTCTCACCTCTCGTATGATTTCGTAACCG

          L I D C N S N P L K G R V E S I L S I G -

          CAGAAATTAACAACTCCATTGTGCTGA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 567
          GTCTTTAATTGTTGAGGTAACACGACT

          Q K L T T P L C * -

```

Abb. 3: Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens YOR179c (Accession Number: Z75087) und die daraus abgeleitete Proteinsequenz. Der Stern (*) markiert das Stop-Codon. Ein + markiert jede 10. Base. Die DNA-Sequenz entspricht den Nukleotiden 671843-672409 auf dem *S. cerevisiae*-Cosmid 9129 (Chromosom XV).

Die Sequenzähnlichkeit eines potentiellen Yor179c-Proteins, abgeleitet von dem offenen Leserahmen und dem mRNA-3'-Prozessierungsfaktor Brr5, erstreckt sich über einen Bereich von rund 190 Aminosäuren, was im Falle von Yor179c beinahe das gesamte Protein betrifft, bei dem aus 779 Aminosäuren aufgebauten Brr5-Protein nur einen vergleichsweise kleinen Bereich am C-Terminus (Abb. 4A). Innerhalb dieses konservierten Bereichs befindet sich eine p-loop-Domäne, also eine eventuelle Bindungsstelle für ATP oder GTP, sowie ein potentielles „Leucin-Zipper“-Motiv (Abb. 4B).

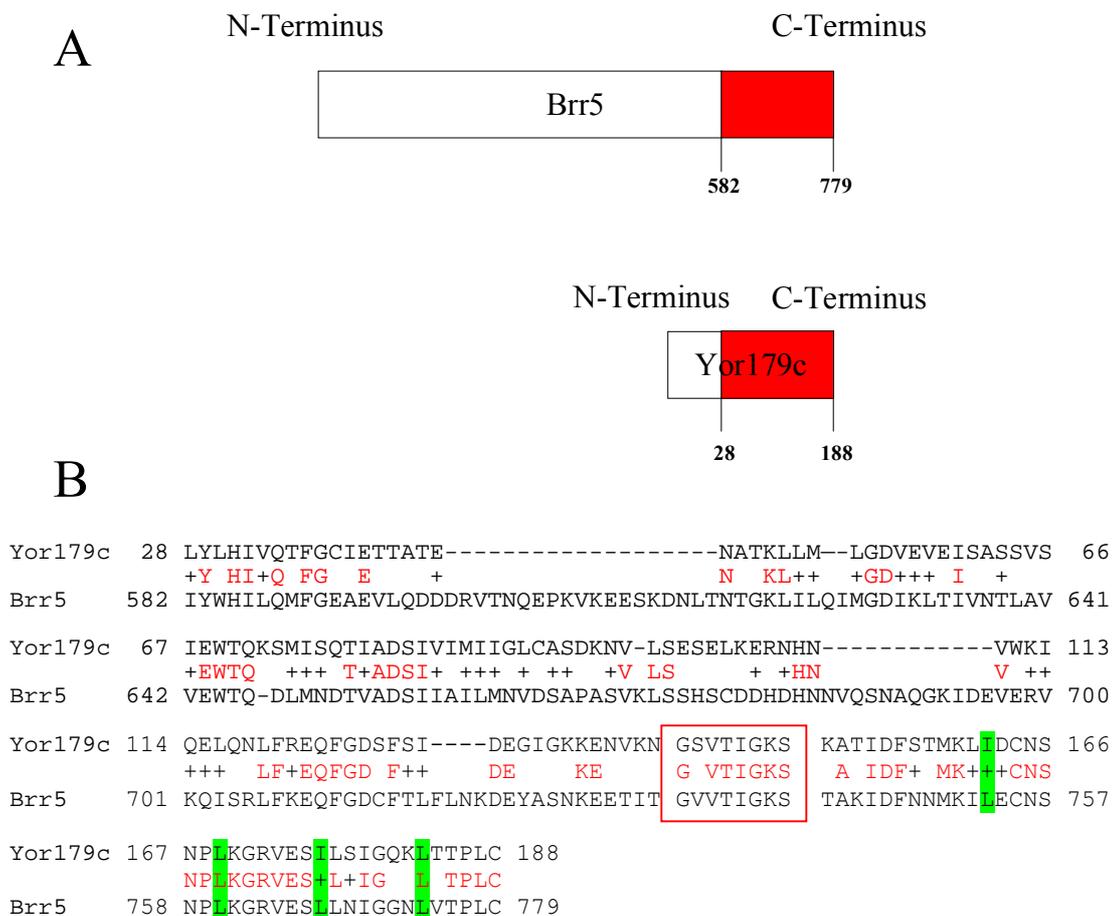


Abb. 4: A) Schematische Darstellung der homologen Bereiche, hier rot unterlegt, des Brr5- und des potentiellen Yor179c-Proteins. Die Zahlen bezeichnen die jeweilige Aminosäure innerhalb der Sequenz.
 B) Sequenzvergleich des Brr5- und des potentiellen Yor179c-Proteins. Identische Aminosäuren sind rot dargestellt. Es besteht eine Identität von 37,1 % über einen Bereich von 197 Aminosäuren, wobei im Yor179c-Protein der homologe Bereich durch 4 Lücken, die insgesamt 37 Aminosäuren umfassen, unterbrochen ist (gekennzeichnet durch -). + bedeutet, dass die jeweiligen zwei Aminosäuren miteinander verwandt sind, wie z.B. Leucin und Isoleucin. Die Ähnlichkeit der beiden Sequenzen beträgt 52 %. Die Sequenz der p-loop-Domäne ist rot umrandet und die Leucinreste des „Leucin-Zipper“-Motivs sind grün unterlegt.

3.2 Nachweis der mRNA des offenen Leserahmens YOR179c

Da ein offener Leserahmen nicht notwendigerweise eine für die Synthese eines Proteins codierende Region darstellt, wurde zunächst untersucht, ob YOR179c in eine entsprechende mRNA transkribiert wird, welches den ersten Schritt in der Expression eines Gens bedeuten würde. Der Nachweis der mRNA erfolgte durch einen RNase-Protection-Assay, sowie durch Northern-Blot-Analyse (Abb. 5 und 6).

Nach Klonierung des offenen Leserahmens YOR179c in den pBluescript-Vektor wurde dieser mit dem Restriktionsenzym *PvuII* geschnitten. Da der pBluescript-Vektor über keinen Terminationsstop verfügt (Alting-Mees und Short, 1989), die T3-Polymerase aber ein definiertes Stoppsignal benötigt, wurde dieses durch einen nukleolytischen Schnitt erzeugt. Von diesem DNA-Abschnitt wurde anschließend mit Hilfe der T3-Polymerase ein *in vitro* antisense-Transkript hergestellt, welches größer als der offene Leserahmen von YOR179c, nämlich rund 700 Nukleotide, war. Dieses antisense-Transkript wurde nun mit Gesamt-RNA, die aus *S. cerevisiae* isoliert wurde, hybridisiert und anschließend mit RNase behandelt, die einzelsträngige RNA hydrolysiert (Spuren 10 und 11 in Abb. 5). Es wurde ein Produkt erwartet, das der Größe des offenen Leserahmens von rund 560 Nukleotiden entsprach. Nur wenn YOR179c exprimiert wird, kann ein doppelsträngiges Hybridmolekül entstehen, das vor einem Nuklease-Angriff geschützt ist. Der gesamte Versuch, einschließlich aller Kontrollen, wurde zum Vergleich zusätzlich auch mit einem antisense-Actin-Transkript (Spuren 1-7) durchgeführt.

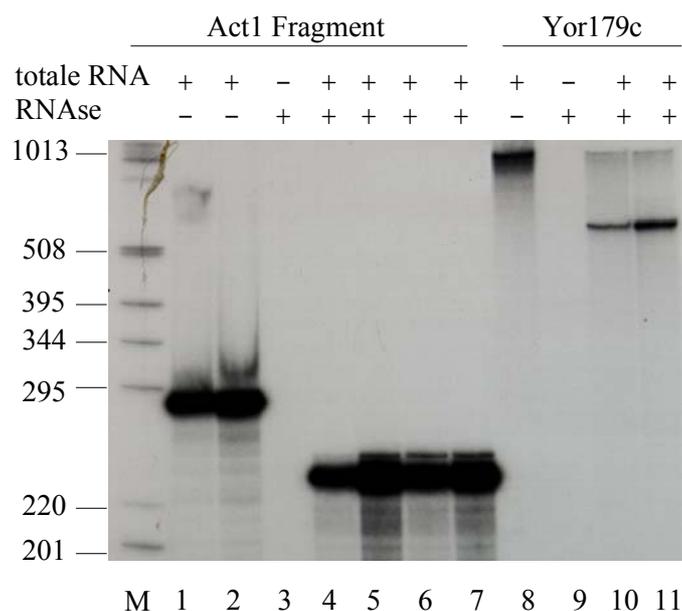


Abb. 5: RNase-Protection-Assay zum Nachweis der mRNA des offenen Leserahmens YOR179c. Als Positivkontrolle (Spuren 1-7) diente ein Teil des Actin-Gens, das in den pBluescript Vektor kloniert worden war (Schindewolf und Domdey, 1995). Die erwarteten Fragmentlängen betragen rund 250 Nukleotide für die Actin-mRNA und rund 560 Nukleotide für die *YOR179c*-mRNA. Sollte das Transkript durch einen Systemfehler an der Wand des Reaktionsgefäßes adsorbiert und damit vor einem anschließenden RNase Angriff geschützt sein, könnte dies durch die unterschiedliche Größe der Produkte als falsch positives Ergebnis identifiziert werden. Spuren 1 und 2 zeigen zur Unterscheidung ein nicht mit RNase behandeltes, jedoch mit Gesamt-RNA hybridisiertes Actin-Fragment unter Einsatz verschiedener Mengen an radioaktiv markiertem Transkript (25.000 bzw. 50.000 cpm). Dieses entspricht mit seinen rund 300 Nukleotiden dem gesamten antisense-Transkript. Zusätzlich wurde eine weitere Kontrollreaktion durchgeführt, in der das Transkript ohne vorherigen Schutz durch Gesamt-RNA mit den RNasen A und T1 inkubiert wurde (Spur 3). Wie zu erwarten, ist hier keine Bande zu erkennen, denn die Nukleasen haben die ungeschützte RNA abgebaut. Die Spuren 4-7 zeigen das Produkt des eigentlichen Versuchs, wobei unterschiedliche Mengen an Gesamt-RNA [2 µg (Spuren 4 und 6) bzw. 8 µg (Spuren 5 und 7)], sowie verschiedene Zusätze an radioaktiv markiertem Transkript [25.000 (Spuren 4 und 5) bzw. 50.000 cpm (Spuren 6 und 7)], verwendet wurden. Die Spuren 8-11 zeigen den Versuch mit einem *YOR179c*-antisense-Transkript. In den Spuren 8 und 9 wurden Kontrollen aufgetragen: in Spur 8 wurde keine RNase, bzw. in Spur 9 keine Gesamt-RNA zugegeben. Spuren 10 und 11 zeigen die erwarteten rund 560 Basenpaare, wobei wiederum verschiedene Mengen an Gesamt-RNA (2 µg bzw. 8 µg) eingesetzt wurden. M, 1 kb-DNA-Leiter; die einzelnen Fragmentgrößen sind in bp seitlich angegeben. Die Proben wurden auf ein 6 %iges Polyacrylamidgel geladen.

Nachdem festgestellt werden konnte, dass tatsächlich ein Transkript von *Yor179c* in der Hefezelle synthetisiert wird (Spuren 10 und 11 in Abb. 5), sollte nun die Größe der *YOR179*-mRNA genauer ermittelt werden. Dies sollte eine Northern-Blot-Analyse zeigen. Ein Northern-Blot dient dem Nachweis einer bestimmten RNA-Sequenz durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt Abb. 6. Anhand der 1 kb-DNA-Leiter, die ebenfalls radioaktiv markiert worden war, konnte eine RNA-Spezies von rund 600 Nukleotiden Länge sowohl in Gesamt-RNA als auch in Poly(A)⁺-RNA zweifelsfrei nachgewiesen werden.

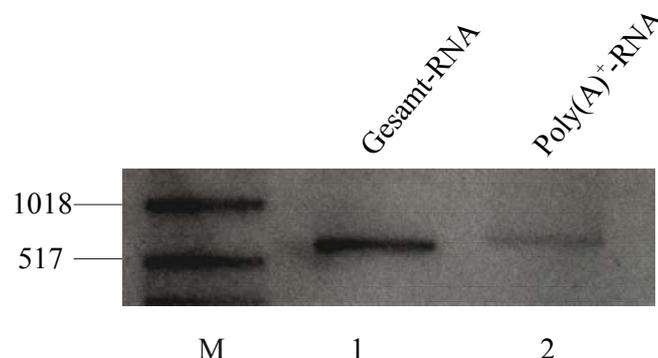


Abb. 6: Northern-Blot-Analyse zum Nachweis der mRNA des offenen Leserahmens YOR179c. In der ersten Spur eines 1,2 %igen Formamidgels wurden 20 µg Gesamt-RNA aus Hefe aufgetragen, in der zweiten Spur 6 ng Poly(A)⁺-RNA. M, 1kb-DNA-Leiter; zwei Fragmentgrößen sind in bp seitlich angegeben.

Anhand dieser Ergebnisse konnte als sicher angenommen werden, dass es sich bei dem in der Datenbank gefundenen offenen Leserahmen YOR179c tatsächlich um eine Sequenz handelt, die in mRNA transkribiert wird.

3.3 Expression des YOR179c-Gens zur Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Aufklärung der Frage, ob vom offenen Leserahmen YOR179c auch ein Protein exprimiert wird, wurden zunächst für immunochemische Untersuchungen polyklonale Antikörper hergestellt. Hierbei mußte darauf geachtet werden, dass das verwendete Yor179c-Antigen nicht den gesamten zum Brr5-Protein sequenzähnlichen Bereich umfasst, um eventuelle Kreuzreaktionen mit Brr5 zu vermeiden. Ein rund 250 Nukleotide zählender, 5'-terminaler Bereich des *YOR179c*-Gens (Nukleotid 1-247) wurde in den pET15b-Vektor kloniert (YorMut1, ausführliche Klonierungsstrategie siehe Anhang). Dieser Vektor ermöglicht es, das 5'-Ende des Gens mit einer Sequenz zu verbinden, die für sechs Histidine codiert (Chen und Hai, 1994). Die Histidine sollten eine spätere Aufreinigung durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie ermöglichen. Das Fusionsprotein 6His-YorMut1 stand unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren Lac-Operons. Das fertige Konstrukt wurde in den BL21(DE3) - *E. coli*-Expressionsstamm transformiert und durch Zugabe von IPTG induziert. Die erfolgte Expression vor und nach 4 Stunden Induktion, die anschließend durchgeführte, erste Aufreinigung durch eine Ammoniumsulfatfällung, sowie die Aufreinigung des entstandenen Fusionsproteins an einer Ni²⁺-NTA-Säule, wurde anhand eines SDS-Polyacrylamidgels kontrolliert (Abb. 7). Das berechnete Molekulargewicht des carboxyterminal verkürzten 6His-YorMut1-Proteins von 9,4 kDa stimmte annähernd mit der beobachteten Proteinbande zwischen 7 und 14 kDa überein. Die Proteinkonzentration der drei Elutionsfraktionen (Spuren 7–9, insgesamt 3 ml) wurde nach der Bradford-Methode bestimmt und ergab 2,1 mg/ml Fraktion, also eine Gesamtmenge von 6,3 mg Protein, die aus 500 ml Kultur gewonnen werden konnten.

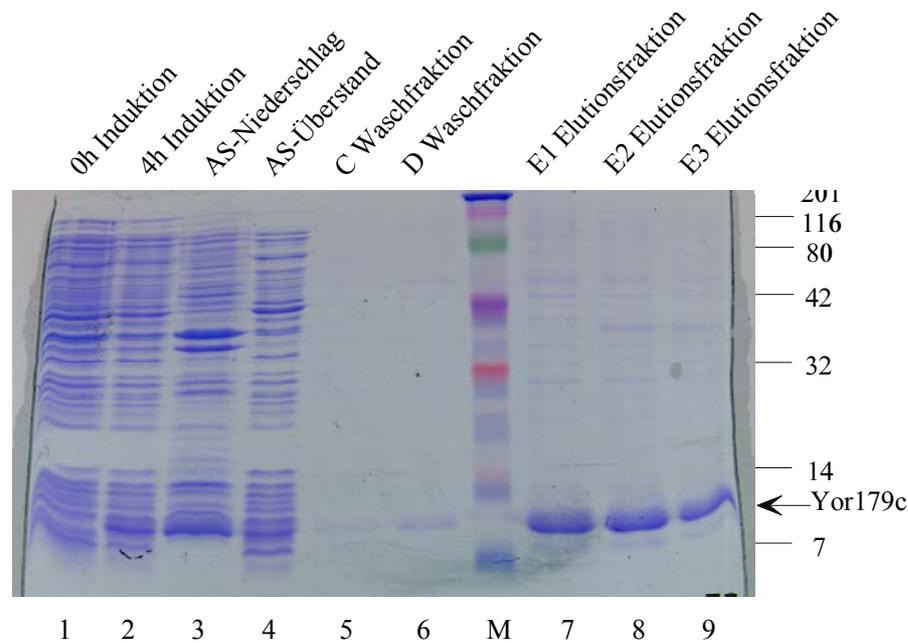


Abb. 7: 12 %iges Polyacrylamidgel zur Analyse der Expression von rekombinantem 6His-YorMut1-Protein in einer mit 0,4 mM IPTG induzierten *E. coli* BL21(DE3)-Kultur. *E. coli* Proteinlysate vor (Spur 1) und 4 Stunden nach IPTG-Induktion (Spur 2). Eine 40 %ige Ammoniumsulfatfällung und anschließende Zentrifugation diente der Konzentrierung des Lysates (AS-Niederschlag und -Überstand, Spuren 3 und 4). In den Spuren 5 und 6 sind Waschfraktionen aufgetragen worden. E1 mit E3 (Spuren 7-9) bezeichnen Elutionsfraktionen. M markiert den Kaleidoskop-Proteinlängenstandard von BioRad, dessen Molekulargewichte seitlich in kDa angegeben sind.

Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern erfolgte durch Immunisierung eines Kaninchens mit 250 µg Protein/ml Injektion aus den aufgereinigten Elutionsfraktionen (Abb. 7, Spuren 7-9). Das nach rund 50 Tagen durch Ausbluten des Kaninchens erhaltene Antiserum wurde in einer Western-Blot-Analyse (Abb. 8) eingesetzt, um vorhandenes Yor179c-Protein zu detektieren.

Der Antikörper gegen das Yor179c-Protein erkannte sowohl in einem Hefe-Ganzzellextrakt, als auch in einem mit 40 % Ammoniumsulfat gefällten Hefe-Extrakt ein einziges Protein oberhalb der 18 kDa Markerbande (Abb. 8, Spuren 1 und 2). Die elektrische Mobilität dieses Proteins entsprach ungefähr der für das Yor179c-Protein errechneten von 21 kDa. In diesem Hefe-Ganzzellextrakt waren alle für eine *in vitro* 3'-Prozessierungsreaktion benötigten Aktivitäten vorhanden. Im Überstand des mit Ammoniumsulfat gefällten Extraktes (Spur 3) war hingegen kein spezifisches Signal zu erkennen. Der offene Leserahmen YOR179c ist also tatsächlich ein für ein spezifisches Protein codierender Sequenzabschnitt.

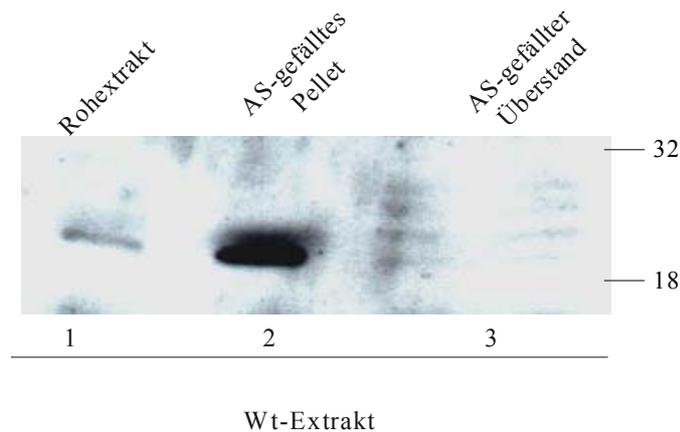


Abb. 8: Western-Blot-Analyse eines 12 %igen Polyacrylamidgels mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Yor179c-Protein. Es sind ein diploider Hefe-Ganzzellextrakt des Wildtypstammes CEN PK2 (Spur 1), sowie Fraktionen einer 40 %igen Ammoniumsulfatfällung desselben aufgetragen. Den Niederschlag dieser Fällung zeigt Spur 2, den Überstand Spur 3. Seitlich sind zwei Banden des Kaleidoskop-Proteinlängensstandards in kDa angegeben.

3.4 Klonierung und Lokalisierung eines Gfp-Yor179c-Fusionsproteins innerhalb der Hefezelle

Ein entscheidendes Kriterium für einen potentiellen mRNA-3'-Prozessierungsfaktor ist seine Lokalisation im Zellkern, denn der endonukleolytische Schnitt, sowie die Polyadenylierung finden in diesem Zellkompartiment statt.

Durch die Eingabe der Proteinsequenz des offenen Leserahmens YOR179c in eine Domänen-Suchmaschine konnte eine Lokalisation desselben innerhalb des Zellkerns mit einer 74 %igen Wahrscheinlichkeit anhand des Vorhandenseins verschiedener Kernlokalisierungssignale vorrausgesagt werden. Um eine solche Lokalisation *in vivo* zu zeigen, wurde ein Fusionsprotein von Yor179c mit dem „green fluorescent protein“ (Gfp) hergestellt (Niedenthal *et al.*, 1996). Hierfür wurde *YOR179c* in den Vektor pGFP-N-FUS kloniert (zur Verfügung gestellt von Heidi Feldmann). Dieser Vektor ermöglicht eine Fusion des *GFP*-Gens an das 5'-Ende des zu untersuchenden Gens, wobei die Expression des entstandenen Konstrukts von einem induzierbaren *MET25*-Promotor kontrolliert wird (genaue Klonierungsstrategie siehe Anhang).

Das Plasmid mit dem Fusionskonstrukt wurde in den CEN PK2-Wildtyp-Stamm transformiert. Um die Expression des Fusionsgens zu induzieren, wurde ein Methionin-

defizientes Medium verwendet. Unter diesen Bedingungen sollte der induzierbare Promotor „angeschaltet“ und als letzte Konsequenz das gewünschte Fusionsprotein erzeugt werden. Parallel hierzu wurde das Expressionsexperiment auch unter Verwendung von 1 mM Methionin im Medium durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wird eine basale Transkription aufrechterhalten. Dieser zusätzliche Ansatz diente als Negativkontrolle. Die Expression wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von $\lambda=340$ nm untersucht. Bei Anregung des Gfp-Proteins unter diesen Bedingungen emittiert dieses auch ohne exogene Zugabe von Cofaktoren oder anderen Proteinen grünes Licht. Die Resultate dieses Experiments sind in Abb. 9 zu sehen. Um festzustellen, ob es sich bei dem grün fluoreszierenden Kompartiment innerhalb der Hefezelle auch tatsächlich um den Zellkern handelt, wurde gleichzeitig eine DAPI-Färbung vorgenommen. Dieser Farbstoff bindet an DNA im Zellkern und in den Mitochondrien und wird durch Licht zur Emission von blauem Fluoreszenzlicht angeregt.

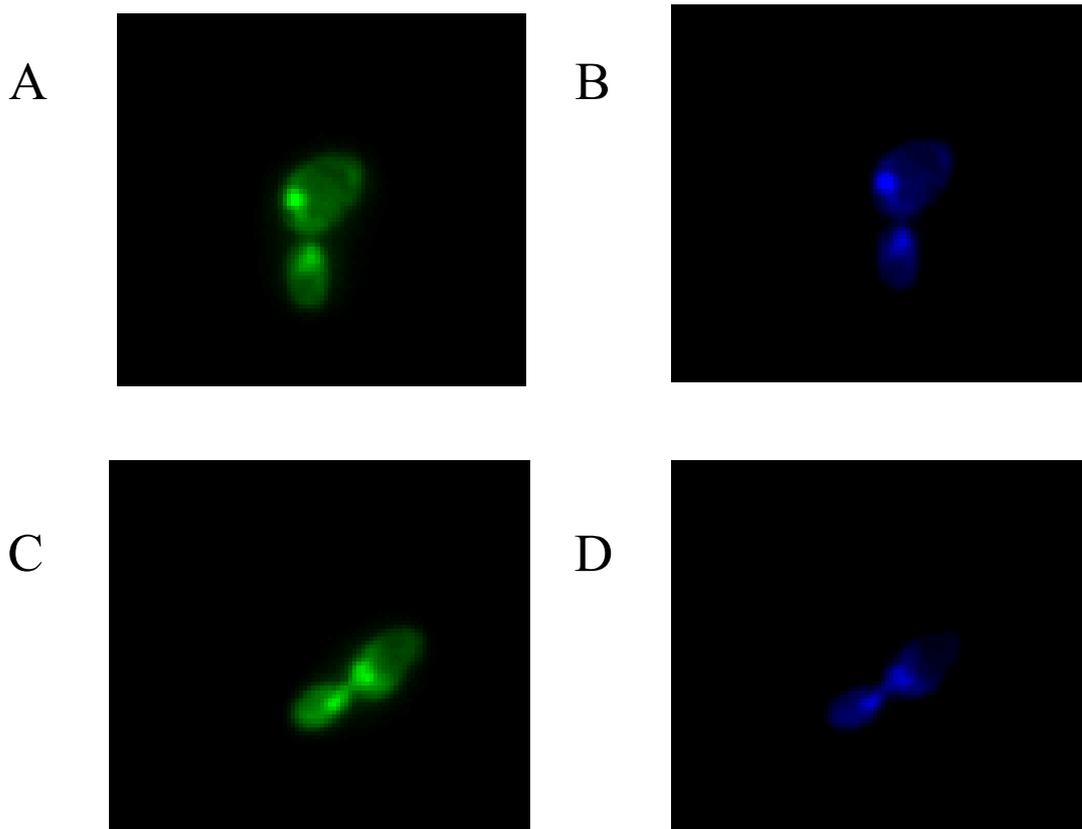


Abb. 9: A-D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier verschiedener, lebender *S. cerevisiae* Zellen einer Kultur, in der das enthaltene Gfp-Yor179c-Fusionsprotein durch Wachstum in Methionindefizientem Medium exprimiert wurde. A und B, sowie C und D zeigen jeweils diesselben Zellen. Die rechten Bilder zeigen Zellen, deren DNA mit DAPI angefärbt wurde und deren Zellkern durch

die Interaktion blau erscheint. Die linken Bilder zeigen die gleichen Zellen, bei denen jedoch ein FITC-Filter zwischengeschaltet wurde, der selektiv grünes Licht aus dem Spektrum filtert. Dies ist notwendig, da die Lichtemission der DAPI-Interaktion diejenige des Gfp-Fusionsproteins überstrahlen würde. Der Zellkern weist hier aufgrund der Expression des fusionierten *GFP-YOR179c*-Gens eine grüne Färbung auf.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die grünen und blauen Lichtpunkte sich hinsichtlich ihres Aufenthaltsortes innerhalb der Zelle entsprechen, was eine Lokalisation im Kern bestätigte. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis für eine mögliche Beteiligung des Yor179c-Proteins an der mRNA-3'-Prozessierung, da diese im Zellkern stattfindet.

3.5 Gendisruption des *YOR179c*-Gens

Alle bisher anhand von chromatographischen Experimenten identifizierten, an der mRNA-3'-Prozessierung in *S. cerevisiae* beteiligten fünf basalen Aktivitäten (CF I, CF II, PF I, Poly(A)-Polymerase, Pab1) sowie deren Untereinheiten sind für das Überleben des Organismus essentiell. Aus diesem Grund wurde versucht festzustellen, ob auch das *YOR179c*-Gen essenziell für die Hefe ist.

In Zusammenarbeit mit Ute Schultheiss wurde eine auf der Polymerase-Ketten-Reaktion basierende Methode (Wach, 1996) verwendet, mittels der das gesamte Gen durch ein Kanamycin-Resistenzgen (*kanMX*) ersetzt wurde. Dieses Gen ermöglicht dem Organismus, sowohl das Aminoglycosid-Antibiotikum Kanamycin als auch Geneticin (G418) zu verstoffwechseln. Bei der chemischen Substanz G418 handelt es sich um ein Struktur analogon des Kanamycins. G418 inhibiert, im Gegensatz zu Kanamycin, auch die Proteinbiosynthese eukaryontischer Zellen und wurde deshalb in diesem Experiment verwendet. Das für die Gendisruption verwendete Konstrukt (Abb. 10B), setzt sich aus einem 400 Nukleotide umfassenden Bereich aus der *YOR179c*-Promotorregion, dem *kanMX6*-Modul (amplifiziert aus dem in Abb. 10A dargestellten Vektor), sowie einem rund 300 Nukleotide zählenden Bereich aus der *YOR179c*-Terminatorregion zusammen (ausführliche Klonierungsstrategie siehe Diplomarbeit Ute Schultheiss). Durch Transformation des Konstrukts und anschließend stattfindender homologer Rekombination in

das Hefegenom des haploiden, sowie des diploiden CEN PK2-Stammes, wurde das *YOR179c*-Gen zerstört.

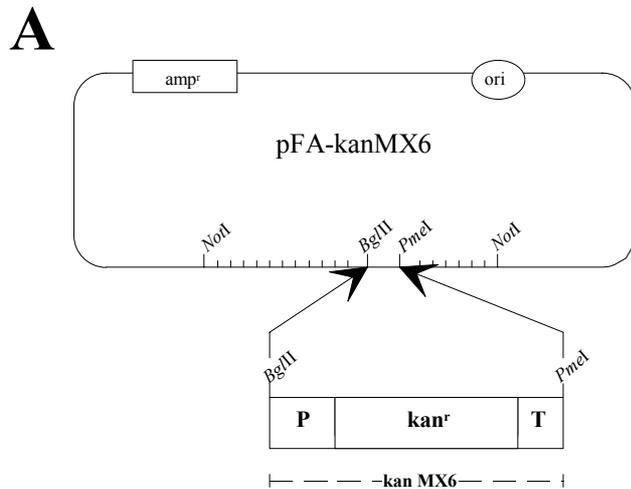


Abb. 10A: Schematische Darstellung des pFA-kanMX6 Plasmids mit integriertem kanMX6-Modul, das über einen eigenen Promotor P und Terminator T verfügt (nach der Diplomarbeit von Ute Schultheiss). Der Vektor besitzt einen Replikationsursprung (ori), sowie ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase-Gen), welches eine Selektion in *E. coli* ermöglicht. Das kanMX6-Modul wurde über homologe Rekombination an Stelle des *YOR179c*-Gens in das *S. cerevisiae* Genom eingeführt.

Während einer dreitägigen Inkubation bei 30°C konnte kein Unterschied zwischen

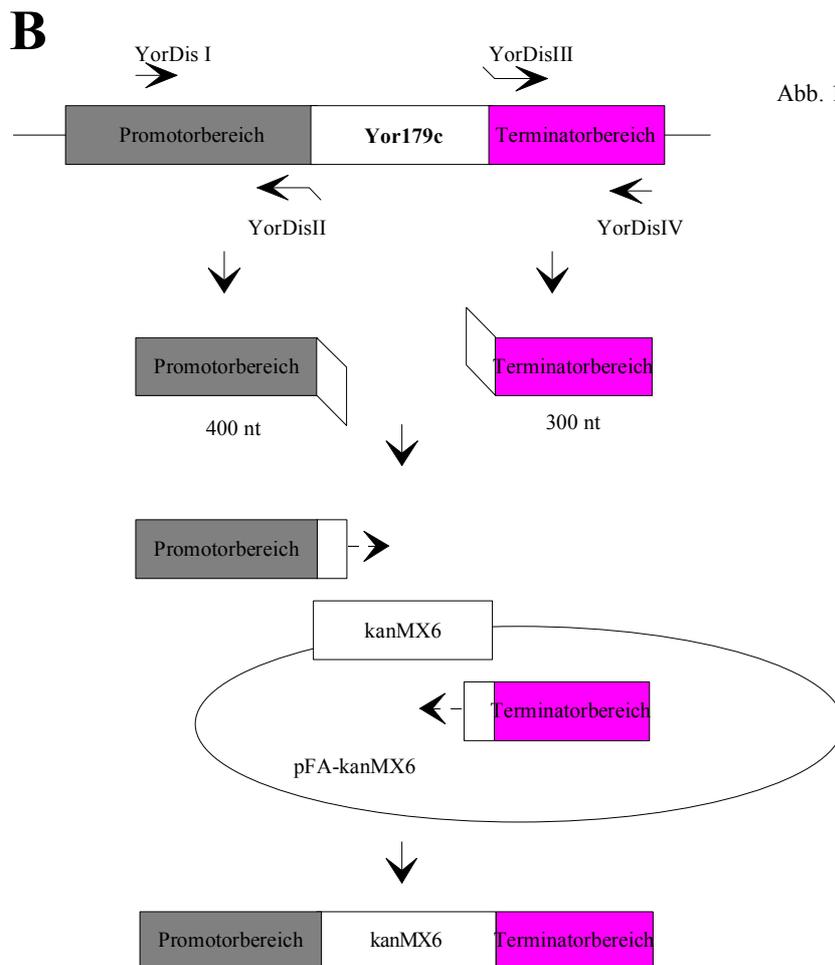


Abb. 10B: Mit den Oligonukleotiden YorDisI und YorDisII wurde ein rund 400 Nukleotide großes Fragment aus dem Promotorbereich des offenen Leserahmens *YOR179c* durch PCR-Amplifikation synthetisiert. Analog wurde mit den Primern YorDisIII und -IV eine ungefähr 300 Nukleotide große Region aus dem Terminatorbereich hergestellt. Die abgeknickten Pfeile in der Skizze, die die Primer YorDisII und YorDisIII versinnbildlichen, sollen andeuten, dass diese ebenfalls komplementär zu der 5'- bzw. 3'-Region des kanMX6-Moduls sind. Diese zwei 400 und 300 nt großen Fragmente wurden nun als „Maxiprimer“ in einer weiteren PCR verwendet, um mit dem pFA-kanMX6 Plasmid als Matrize die kanMX6-Kassette zu isolieren. Das erhaltene Konstrukt setzt sich aus einem 400 Nukleotide umfassenden Teil des Promotorbereichs, der kanMX6-Kassette, gefolgt von 300 Nukleotiden aus dem Terminatorbereich des *YOR179c*-Gens zusammen. Diese Disruptionskassette wurde für die Transformation in den CEN PK2-Stamm verwendet.

dem haploiden und diploiden Stamm hinsichtlich ihres Wachstums auf YPD/G418-Platten beobachtet werden. Dies legte bereits die Vermutung nahe, dass die Gendisruption von *YOR179* keinen Einfluß auf die Lebensfähigkeit des CEN PK2-Stammes hatte. Falls dem nicht so wäre, müßte der diploide Stamm einen deutlichen Wachstumsvorteil vor dem haploiden besitzen, denn dieser verfügt noch über eine intakte Kopie des *YOR179c*-Gens. Zunächst wurde jedoch mittels einer analytischen PCR-Amplifikation überprüft, ob das Konstrukt korrekt in das Genom integriert worden war. Abb. 11A veranschaulicht die Lage der für die PCR verwendeten Primer, sowie die zu erwartenden Fragmentgrößen. Da die *kanMX6*-Kassette deutlich grösser ist als das *YOR179c*-Gen, wird bei einer PCR-Reaktion mit Oligonukleotiden, die im Promotor- bzw. Terminatorbereich des *YOR179c*-Gens liegen, ein größeres Fragment amplifiziert, als im Wildtyp-Stamm. Tatsächlich erhielt man bei Verwendung von genomischer DNA aus dem CEN PK2-Wildtyp-Stamm nur eine Bande (Abb. 11B, Spur 1). Wurde jedoch genomische DNA aus dem disruptierten Stamm CEN PK2 *yor179c::KAN* eingesetzt (Abb. 11B, Spur 2), konnten 2 Banden, die sowohl das Wildtyp-Gen (2390bp), als auch den korrekten Einbau des Moduls in das 2. Allel (3260bp) erkennen lassen, beobachtet werden. Die Banden stimmten mit den erwarteten Fragmentgrößen überein. Der parallel untersuchte, haploide disruptierte Stamm wurde in diesem Versuch nicht berücksichtigt.

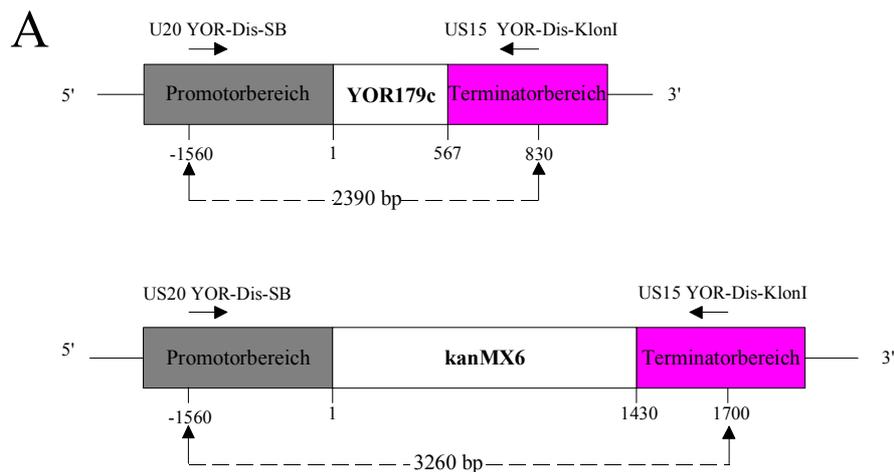


Abb. 11: Analytische PCR zum Nachweis des korrekten Einbaus der *kanMX6*-Disruptionskassette in das Genom des Wildtyp-Hefestammes CEN PK2.

- A) Schematische Darstellung der Primer US20YOR-Dis-SB und US15YOR-Dis-KlonI und deren Bindungsstellen in den jeweiligen Promotor- bzw. Terminatorbereichen des *YOR179c*-Gens. Die zu erwartenden Fragmentgrößen des PCR-Produktes betragen im Falle des Wildtypstammes 2390 Basenpaare, respektive 3260 Basenpaare in dem disruptierten Stamm CEN PK2 yor179c::KAN.

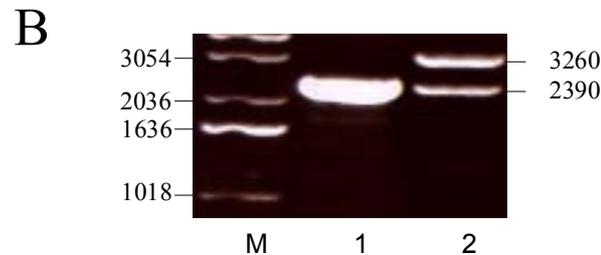


Abb. 11: B) 0,8 %ige Agarosegelelektrophorese der analytischen PCR, die Aufschluß über den korrekten Einbau der Disruptionskassette geben sollte. M bezeichnet die 1 kb-DNA-Leiter, die jeweiligen Fragmentgrößen in Basenpaaren sind links daneben angegeben. Spur 1: Hier wurde in der PCR genomische DNA aus dem diploiden Wildtypstamm verwendet. Es ist nur eine Bande zu erkennen, die dem Wildtyp-Allel entspricht. Spur 2: Verwendung von genomischer DNA aus dem disruptierten Stamm CEN PK2 yor179c::KAN. Hier sind zwei Banden zu erkennen, von denen die eine das Wildtyp-Allel (2390bp), die andere (3260 bp) die Disruptionskassette repräsentiert.

Zur Bestätigung der Wachstumsuntersuchungen wurde noch eine Tetradenanalyse durchgeführt, die Aufschluß über einen möglichen letalen Phänotyp geben sollte (Abb. 12). Wie bereits anhand des Wachstums des haploiden und diploiden transformierten CEN PK2-Wildtypstammes vermutet, hatte die Gendisruption des *YOR179c*-Gens keinen Einfluß auf die Lebensfähigkeit des CEN PK2 yor179c::KAN-Stammes. Alle vier von vier Sporen konnten auskeimen. In einem Fall konnten nur 3 Sporen (A 1-4) auskeimen, aber dies dürfte auf eine Zerstörung während der mechanischen Ausbringung mit dem Mikromanipulator zurückzuführen sein.

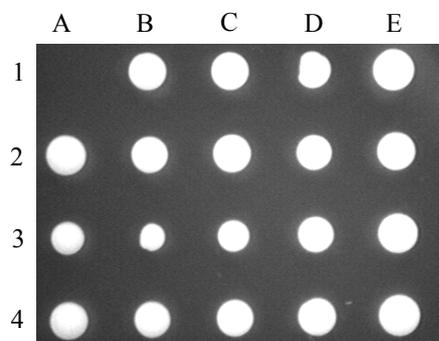


Abb. 12: Tetradenanalyse des diploiden CEN PK2 yor179c::KAN-Stammes, in dem eines der beiden *YOR179c* Allele durch ein kanMX6-Modul ersetzt wurde. Vier Sporen (1-4) von fünf unabhängigen Tetraden (A-E) wurden auf einer YPD-Platte mit Hilfe eines Mikromanipulators vereinzelt und nach zweitägiger Inkubation bei 30°C untersucht.

Dieses Ergebnis muß allerdings noch nicht notwendigerweise bedeuten, dass das Yor179c-Protein nicht in die 3'-Prozessierung involviert ist. Es sind durchaus auch Faktoren bekannt, die nicht essentiell sind, aber in der mRNA-3'-Prozessierung eine Rolle spielen. Solche Faktoren sind z.B. die Nucleasen Pan2 und Pan3, die an der korrekten Poly(A)-Schwanz-Ausbildung beteiligt sind (Boeck *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996).

3.6 Erzeugung und Charakterisierung eines homozygoten diploiden Hefestammes, der für das YOR179c-Gen defizient ist

Ein Gen, welches ausschließlich in der Meiose exprimiert wird, hätte bei Deletion unter den standardmäßig angewendeten Wachstumsbedingungen keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Hefe. Um diese Möglichkeit für das *YOR179c*-Gen zu untersuchen, wurde ein diploider, homozygoter Stamm aus zwei haploiden, *YOR179c*-defizienten Stämmen konjugiert und sein Wachstumsverhalten während der beiden meiotischen Teilungen untersucht.

Um zwei Hefe-Stämme, die den gleichen Genotyp aufweisen, zu einem identifizierbaren, diploiden Stamm konjugieren zu können, mußte ein Trick angewandt werden. Nach Bestimmung des Paarungstyps zweier CEN PK2 *yor179c::KAN*-Stämme, wurde deshalb in den Stamm mit dem Paarungstyp α der Vektor pRS315 transformiert. Dieser verfügt über einen LEU-Selektionsmarker, der es dem Stamm ermöglicht, auf Leucin-freiem Medium zu wachsen. Außerdem wurde das Plasmid pRS316, das einen URA-Selektionsmarker trägt, in den Stamm mit dem Paarungstyp α transformiert, um diesem Stamm entsprechend die Möglichkeit zu verschaffen, auf Uracil-freiem Medium zu wachsen. Die beiden Stämme wurden übereinander auf Festmedium, welches für die Aminosäure Leucin sowie für das Nukleosid Uracil defizient war, aufgebracht und bei 30°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien stellten notwendigerweise Konjugationsprodukte dar, da nur bei erfolgter Konjugation zu einem diploiden Stamm auf diesem Medium Wachstum möglich war. Eine der entstandenen Kolonien wurde im Anschluß auf Sporulationsmedium ausgestrichen, um die Diploidie des Stammes zu bestätigen. Das Ergebnis der Sporulationsanalyse zeigt Abb. 13.

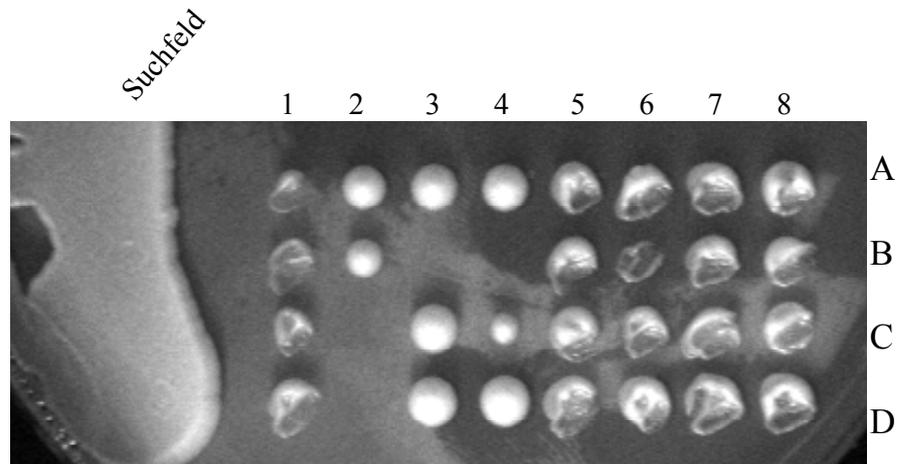


Abb. 13: Tetradenanalyse des homozygoten, diploiden Stammes, der für das *YOR179c*-Gen defizient ist. Die vier Sporen (A-D) von acht voneinander unabhängigen Tetraden (1-8) wurden auf einer YPD-Platte vereinzelt und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Im Suchfeld wurden die einzelnen Tetraden mit der Nadel eines Mikromanipulators aufgenommen. Diese konnten nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen mit bloßem Auge analysiert werden.

Zur Kontrolle der Konjugation wurden die 5 Tetraden, deren vier Sporen (1 A-D, 5 A-D, 6 A-D, 7 A-D und 8 A-D) auskeimen konnten, anschließend auf einer G418-haltigen Vollmedium-Platte aufgebracht. Hierauf konnten nur diejenigen Sporen auskeimen, die das *KAN*-Resistenzgen stabil in ihr Genom integriert hatten. Abb. 14 zeigt, dass alle vier Sporen auf dieser Platte wachsen konnten. Dies bestätigte also die korrekt abgelaufene Konjugationsreaktion. Dieser Stamm, der keine intakte Kopie des *YOR179c*-Gens mehr enthält, wurde USY3 genannt.

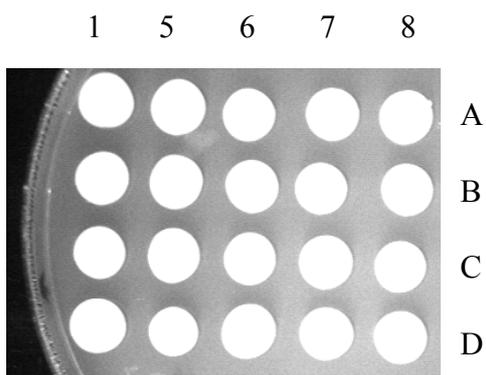


Abb. 14: Replikaanalyse der Tetraden aus Abb. 13. Fünf Tetraden des homozygoten, diploiden USY3-Stammes wurden auf ihre Fähigkeit getestet, auf einer YPD-Platte, die mit 200 mg Geneticin/l Medium versetzt wurde, zu wachsen. Dies diente der Kontrolle der erfolgreich abgelaufenen Konjugation zweier haploider, *YOR179c*-defizienter Stämme.

Eine Western-Blot-Analyse (Abb. 15) zeigte darüberhinaus, dass auch kein Yor179c-Protein mehr in einem USY3-Extrakt vorhanden war (Spuren 2-4). Als Kontrolle diente ein CEN PK2-Wildtyp-Extrakt, der eine Bande bei einer Größe von ungefähr 21 kDa aufwies

(Spur 1). In den Spuren, die sowohl den unbehandelten Rohextrakt (Spur 2), als auch das Präzipitat (Spur 3) und den Überstand einer 40 %igen Ammoniumsulfatfällung (Spur 4) dieses Extraktes zeigen, ist jedoch keine Bande zu erkennen.

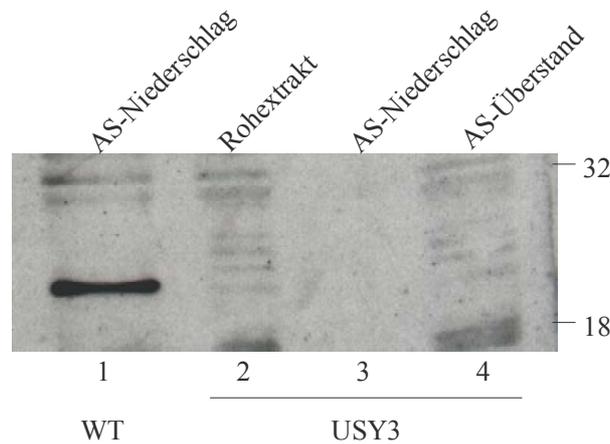
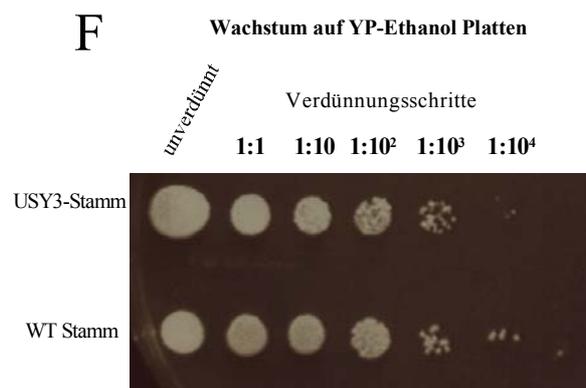
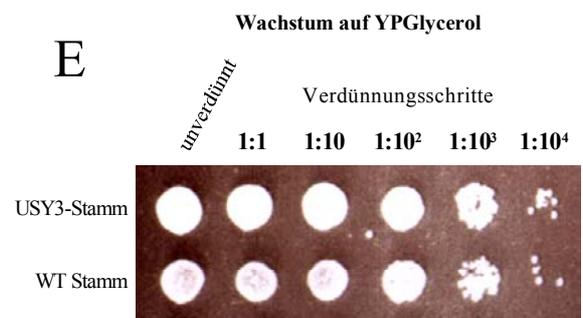
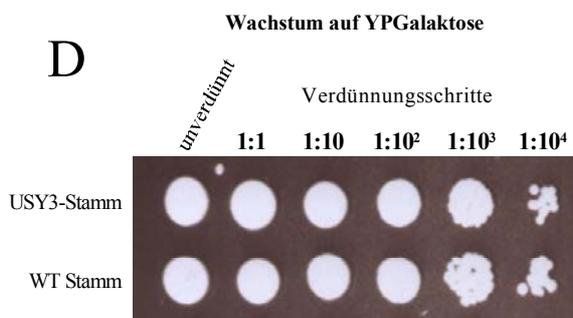
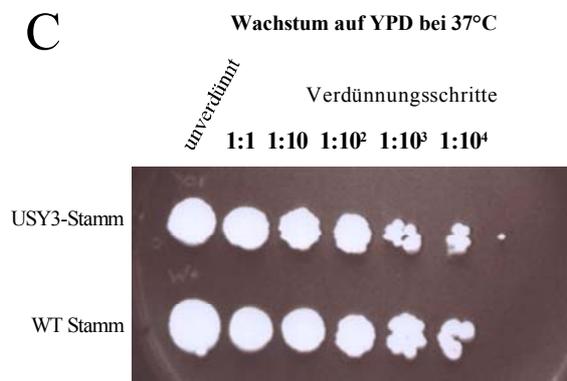
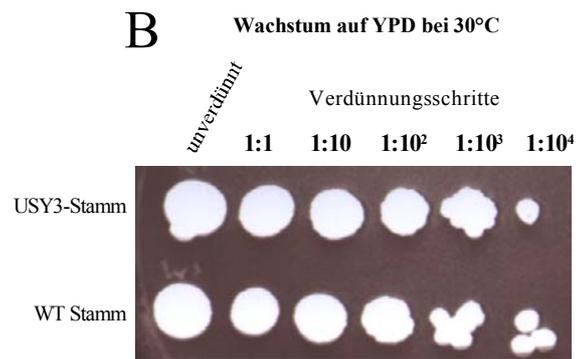
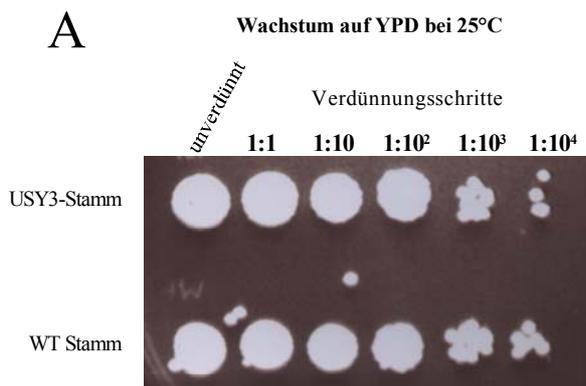


Abb. 15: Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Yor179c-Protein. In der ersten Spur eines 12 %igen Polyacrylamidgeles wurde als Kontrolle der Niederschlag einer 40 %igen Ammoniumsulfatfällung des Wildtypstammes aufgetragen. Alle übrigen Spuren zeigen verschiedene Fraktionen des USY3-Stammes. Spur 2 zeigt den unbehandelten Rohextrakt. Dieser Rohextrakt wurde ebenfalls einer 40 %igen Ammoniumsulfatfällung unterzogen, von der in Spur 3 das Präzipitat und in Spur 4 der Überstand aufgetragen wurde. Seitlich sind zwei Fragmente des Kaleidoskop-Proteinlängenstandards angegeben. Die errechnete Größe des Yor179c-Proteins beläuft sich auf 21 kDa.

Dies war die Bestätigung, dass der USY3-Extrakt wie erwartet über kein Yor179c-Protein mehr verfügt. Die Tetradenanalyse zeigte aber auch, dass das *YOR179c*-Gen während der beiden meiotischen Teilungen keinen Einfluß auf das Wachstum der Hefe hat.

Als nächstes wurde der Versuch unternommen, diesen Stamm unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu inkubieren, um so einen möglichen Phänotyp zu identifizieren (Abb. 16). So würde eingeschränktes Wachstum der Kultur während der Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen auf eine Expression während eines Temperaturschocks hindeuten, vermindertes Wachstum unter mutagenen Bedingungen (auf MMS-haltigem Medium oder bei UV-Bestrahlung) würde auf eine Beteiligung des Gens innerhalb der DNA-Reparatur hinweisen. Ein Defizit hätte der USY3-Stamm in der Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen, falls er schlechteres Wachstum als der Wildtyp auf Galaktose-, Glycerol- oder Ethanol-haltigem Medium zeigen sollte.



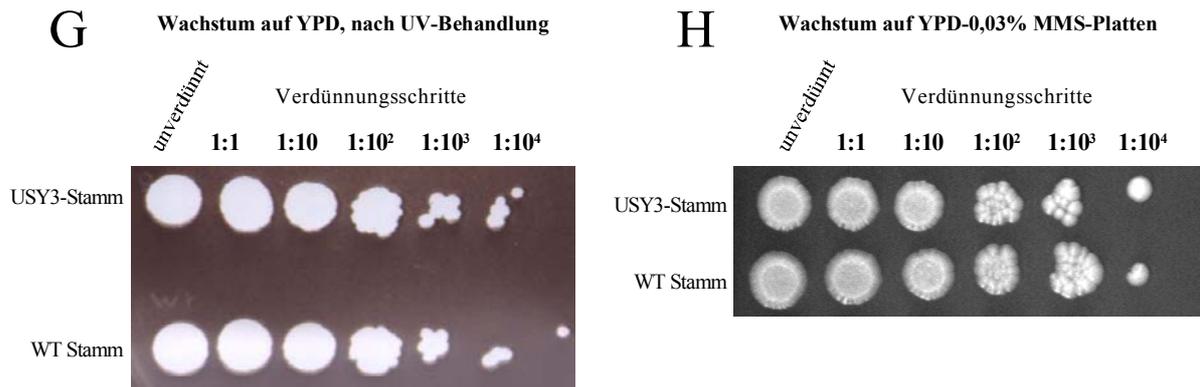


Abb. 16: Versuch der Phänotypbestimmung des homozygoten, diploiden USY3-Stammes, der für das *YOR179c*-Gen defizient ist. Hierzu wurde der Stamm zusammen mit einem diploiden Wildtyp-CEN PK2-Stamm auf seine Fähigkeit getestet, unter bestimmten Temperaturbedingungen und auf unterschiedlichen Kulturmedien zu wachsen. Wachstum bei 25°C (A), 30°C (B), und 37°C (C). Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen: Galaktose- (D), Glycerol- (E), sowie Ethanol-haltigem (F) Medium. Wachstum auf YPD nach UV-Bestrahlung (G). Wachstum unter mutagenen Bedingungen auf YPD mit 0,03 % MMS (Methansulfonsäuremethylester) (H).

Wie aus Abb. 16 ersichtlich ist, konnte bezüglich der hier untersuchten Parameter, kein erkennbarer Unterschied im Wachstumsverhalten der beiden Stämme ermittelt werden.

3.7 Komplementationsanalysen eines *Brr5*-defizienten Stammes

3.7.1 Komplementation mit dem intakten *BRR5*-Gen

Da eine Gendisruption, sowie die Erzeugung eines homozygoten diploiden Stammes, der für das *YOR179c*-Gen defizient ist, keinerlei Hinweis auf einen Phänotyp ergaben, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, inwiefern der C-terminale, sequenzähnliche Bereich von *Brr5* Anteil an der Funktionsweise dieses Proteins ausübt. Nur falls dieser sequenzähnliche Bereich, den beide Proteine aufweisen, einen Einfluß auf die Funktionalität des *Brr5*-Proteins besitzt, könnten auch Rückschlüsse auf eine mögliche Funktionsweise des *Yor179c*-Proteins gezogen werden. Wie die meisten anderen an der mRNA-3'-Prozessierung in Hefe beteiligten Faktoren ist auch *Brr5* essentiell für das Hefewachstum, eine Zerstörung des Gens führt zu einem letalen Phänotyp (Noble und Guthrie, 1996). Ein diploider YSN378 *brr5::LEU2*-Stamm (zur Verfügung gestellt von C. Guthrie) wurde auf Sporulationsmedium für auxotrophe Stämme ausgestrichen und die entstandenen Tetraden mit Hilfe eines

Mikromanipulators auf einer YPD-Platte vereinzelt (Abb. 17). Im Gegensatz zu einem Wildtyp-Hefestamm, bei dem alle vier Tetraden auskeimen, können aufgrund des Fehlens des *BRR5*-Gens, nur diejenigen Sporen auskeimen, die während der Meiose eine Kopie dieses Gens erhalten haben. Diejenigen Sporen, die das Chromosom mit der Deletion tragen, sind nicht lebensfähig.

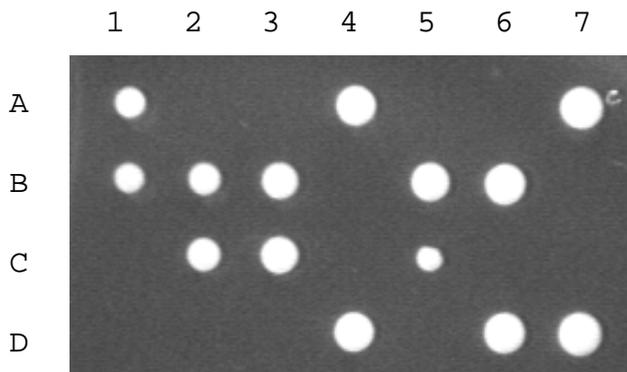


Abb. 17: Tetradenanalyse des diploiden YSN378 *brr5::LEU2* Stammes, in dem das *BRR5*-Gen zerstört wurde. Die vier Sporen (A-D) von 7 unabhängigen Tetraden (1-7) wurden auf einer YPD-Platte mit Hilfe eines Mikromanipulators vereinzelt. Nach zweitägiger Inkubation konnten die ausgekeimten Sporen analysiert werden.

Um diesen letalen Phänotyp aufzuheben, wurde das *BRR5*-Gen extrachromosomal auf einem Plasmid in die Hefe eingebracht. Dazu wurde das Gen zusammen mit dem Promotor und dem stromabwärts liegenden Terminator mittels PCR aus genomischer CEN PK2-Wildtyp-DNA amplifiziert und in den Vektor pRS316 kloniert. Da die genaue Länge des Promotors und des Terminators nicht bekannt war, wurde ein rund 1.400 Nukleotide langes Sequenzstück stromaufwärts, sowie ein ungefähr 900 Nukleotide langer Sequenzbereich am 3'-Ende des translatierten Bereichs zusätzlich kloniert. Diese empirisch ermittelten Fragmentgrößen sollten den gesamten Promotor- und Terminatorbereich umfassen. Nach Klonierung in den „shuttle“-Vektor pRS316, der eine Vermehrung des Plasmids durch zwei speziesspezifische Replikationsursprungspunkte der DNA sowohl in *E. coli*, als auch in *S. cerevisiae* erlaubt, wurde das Konstrukt pRS316 *BRR5*flank in den YSN378 *brr5::LEU2*-Stamm transformiert (zur genauen Klonierungsstrategie siehe Anhang). Abb. 18 zeigt schematisch die Vorgänge bei der anschließend durchgeführten Sporulation.

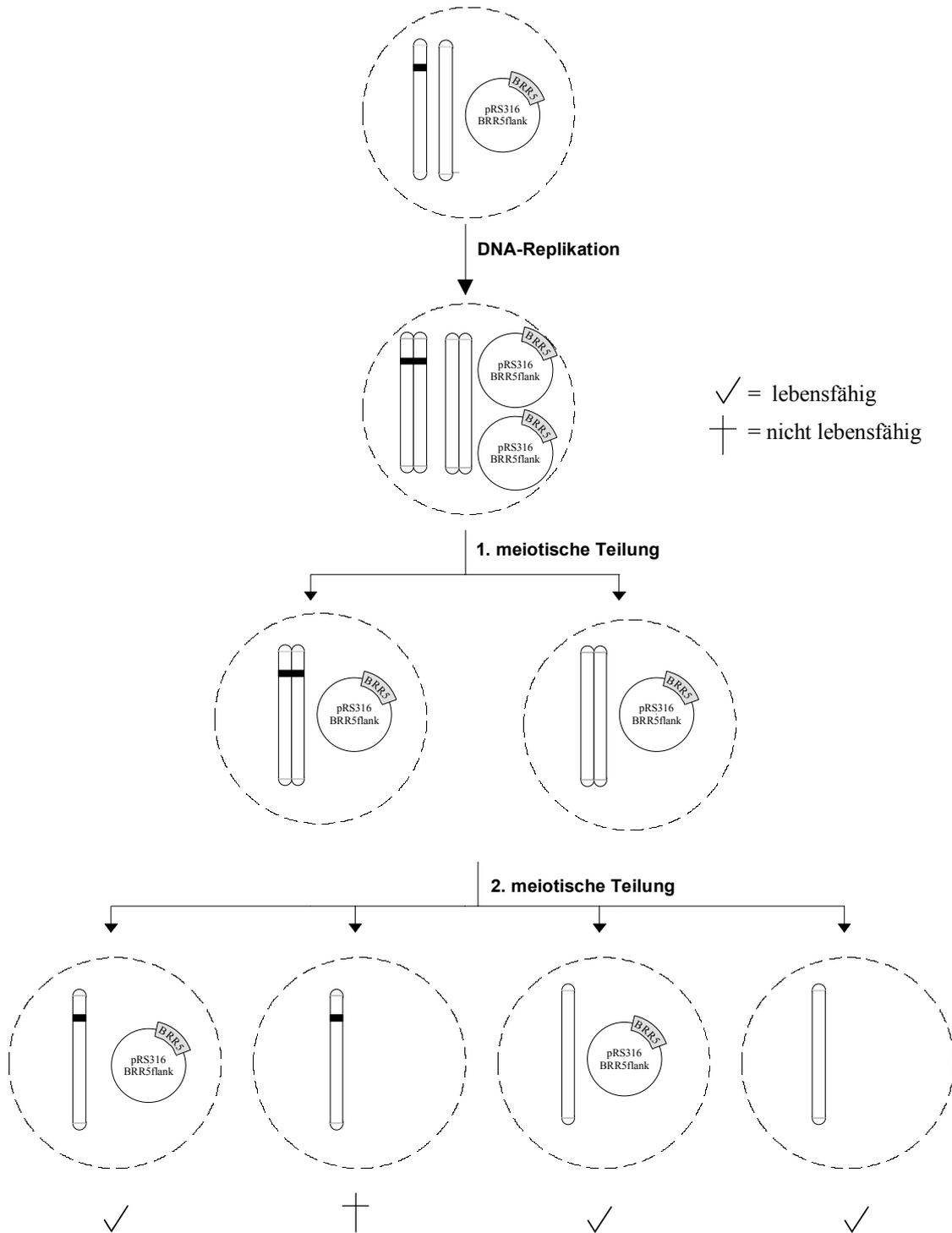


Abb. 18: Schematische Darstellung der Verteilung des pRS316 *BRR5*flank-Plasmids während der beiden meiotischen Teilungen der Sporulation. Durch eine CEN-DNA-Sequenz wird das Plasmid in einer YSN378 *brr5::LEU2*-Zelle wie gewöhnliche Chromosomen, jedoch unabhängig von diesen, auf die Tochterzellen verteilt. Das Chromosom XII, auf dem das *BRR5*-Gen lokalisiert ist, wurde als rein weißer Balken dargestellt, das zweite Chromosom XII, welches durch eine zuvor erfolgte Gendisruption nun das *LEU2*-Gen trägt, also keine Kopie eines intakten *BRR5*-Gens aufweist, ist als weißer Balken mit einem schwarzen Streifen dargestellt, der das Fehlen des *BRR5*-Gens versinnbildlichen soll. (Abb. modifiziert aus Diplomarbeit Ute Schultheiss)

Da das eingeführte pRS316-Plasmid eine ARS/CEN6-Sequenz enthält, die dafür verantwortlich ist, dass es in *S. cerevisiae* nur in einer Kopie vorliegt, autonom repliziert werden kann und wie ein Chromosom bei der meiotischen Teilung auf die Tochterzellen übertragen wird, sollte eine Tetradenanalyse eine 3:1-Verteilung zeigen. Nach erfolgter Sporulation wurden die Sporen der entstandenen Tetraden vereinzelt (Abb. 19). Im Gegensatz zu dem YSN378 *brf5::LEU2*-Stamm ohne zusätzliches Plasmid keimen hier stets mehr als zwei Sporen aus. Das bedeutet, dass das pRS316 *BRR5*flank Plasmid den letalen Phänotyp des YSN378 *brf5::LEU2* Stammes komplementieren kann. Das vom Plasmid exprimierte Gen ist also funktionell.

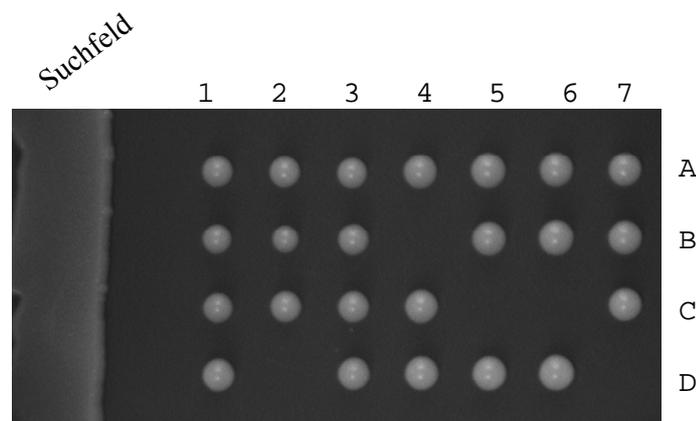


Abb. 19: Tetradenanalyse des diploiden YSN378 *brf5::LEU2* Stammes, in den das Plasmid pRS316 *BRR5*flank transformiert wurde. Dieses Plasmid enthält das intakte Gen *BRR5*, sowie dessen eigenen Promotor- und Terminatorbereich. Vier Sporen (A-D) von sieben unabhängigen Tetraden (1-7) wurden auf einer YPD-Platte vereinzelt. Nach zweitägiger Inkubation bei 30°C, konnten die ausgekeimten Sporen untersucht werden.

Zusätzlich zur erwarteten 3:1- ist auch eine 4:0 Verteilung zu beobachten, die auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein kann. Zwei Erläuterungsversuche sollen die Abb. 20 und 21 veranschaulichen.

Die meiotische Teilung ist ein Schritt, bei dem der Organismus durch homologe Rekombination genetische Information austauschen kann. Sie trägt unter anderem zur genetischen Vielfalt einer Population bei. Da eine Rekombination mit gleicher Wahrscheinlichkeit an beinahe jeder Stelle längs der homologen Chromosomen auftreten kann und dies ein relativ häufig auftretendes Ereignis in der Hefe ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch der deletierte Bereich davon betroffen wurde. Wie Abb. 20

zeigt, können nun bei den nachfolgenden Teilungen die Plasmide so verteilt werden, dass sämtliche Sporen einer Tetrade auskeimen.

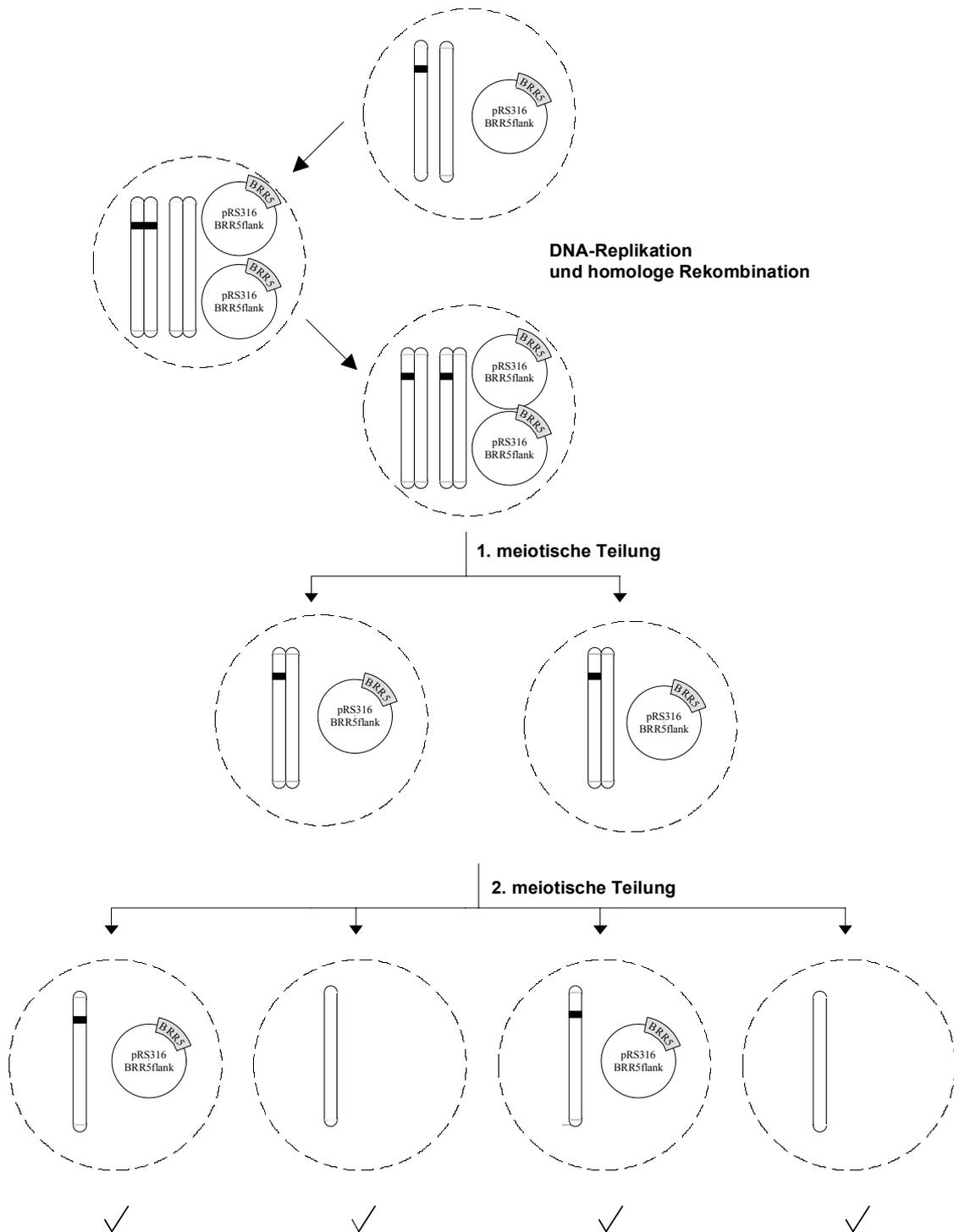


Abb. 20: Schematische Darstellung der meiotischen Teilung einer YSN378 *brr5::LEU2* Hefezelle, die ein *pRS316 BRR5flank*-Plasmid enthält. In der Prophase I der Meiose sind die Chromatiden zu Paaren angeordnet und können durch homologe Rekombination genetische Information austauschen. So kann der Fall eintreten, dass nach den beiden meiotischen Teilungen alle 4 Sporen lebensfähig sind.

Eine weitere Möglichkeit, die Lebensfähigkeit aller vier Sporen zu erklären, basiert auf einer fehlerhaften Verteilung der verdoppelten Plasmide während der ersten meiotischen Teilung (Abb. 21). Auch hier würde der Fall eintreten, dass alle vier Sporen einer Tetrade auskeimen können. Diese Konstellation dürfte aber im Gegensatz zum Modell der homologen Rekombination eher selten sein.

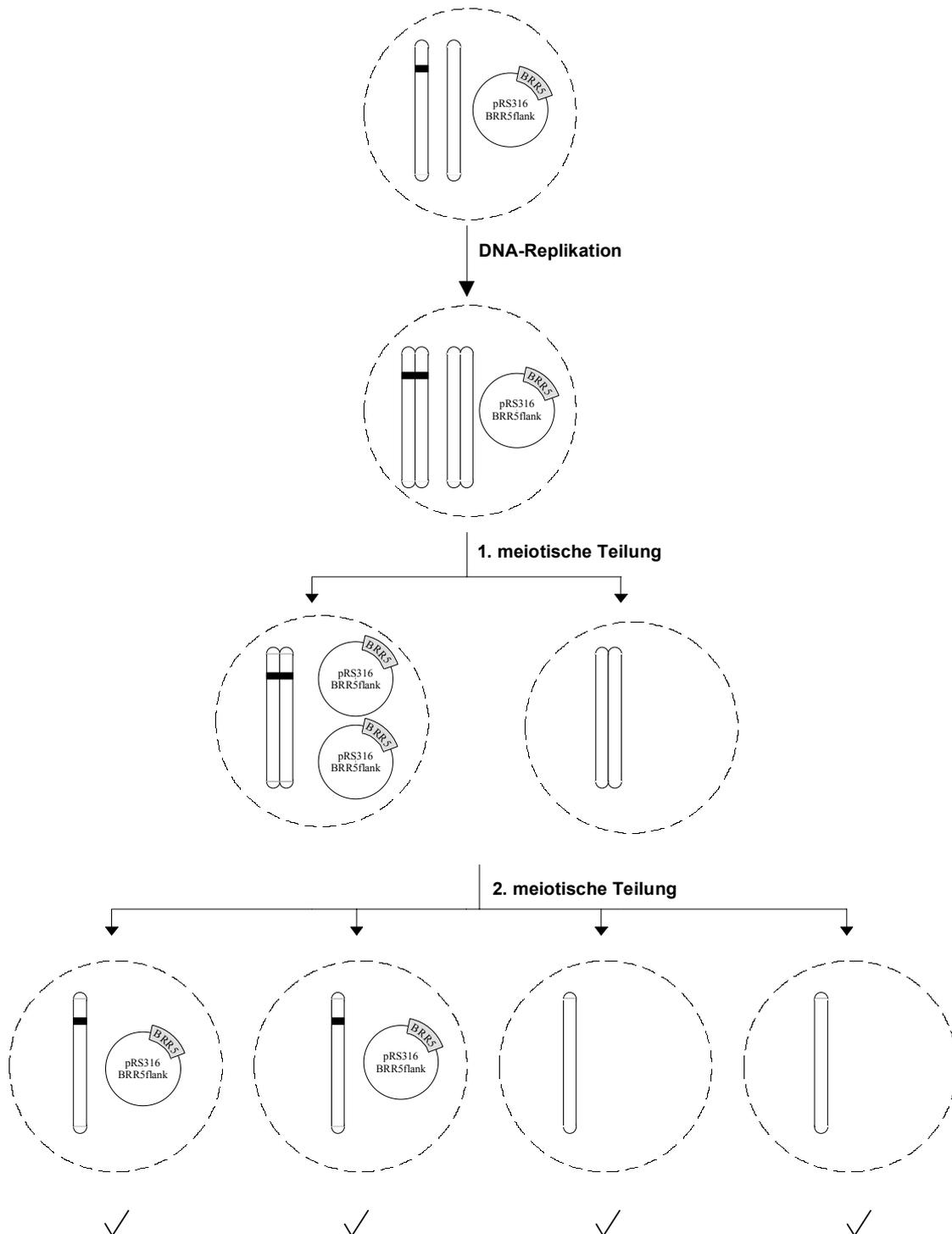


Abb. 21: Schematische Darstellung der meiotischen Teilung einer YSN378 *brr5::LEU2* Hefezelle unter Annahme einer fehlerhaften Verteilung des darin zusätzlich enthaltenen pRS316 *BRR5*flank Plasmids. Alle vier Sporen besitzen einen lebensfähigen Genotyp.

3.7.2 Komplementation mit C-terminal deletierten Mutanten des *BRR5*-Gens

Um nun zu untersuchen, ob der sequenzähnliche Bereich des Brr5-Proteins, also dessen C-Terminus, für die Funktion des Brr5-Proteins während der 3'-Prozessierung von Bedeutung ist, wurden Deletionsmutanten (*BRR5ΔH*, *BRR5ΔL*) konstruiert, denen dieser Sequenzbereich fehlte (Abb. 22A und 23A). Eine erste Deletionsmutante, *Brr5ΔH*, enthält eine 3'-terminale Verkürzung um 480 Basenpaare. Dieser Bereich stellt den gesamten sequenzähnlichen Abschnitt zu *YOR179c* dar (ausführliche Klonierungsstrategie siehe Anhang). Das so erhaltene pRS316 *BRR5ΔH*flank-Plasmid, das die Deletionsmutante trägt, wurde in den YSN378 *brr5::LEU2*-Stamm transformiert und nach erfolgter Sporulation die Tetraden auf YPD-Platten vereinzelt (Abb. 22B).

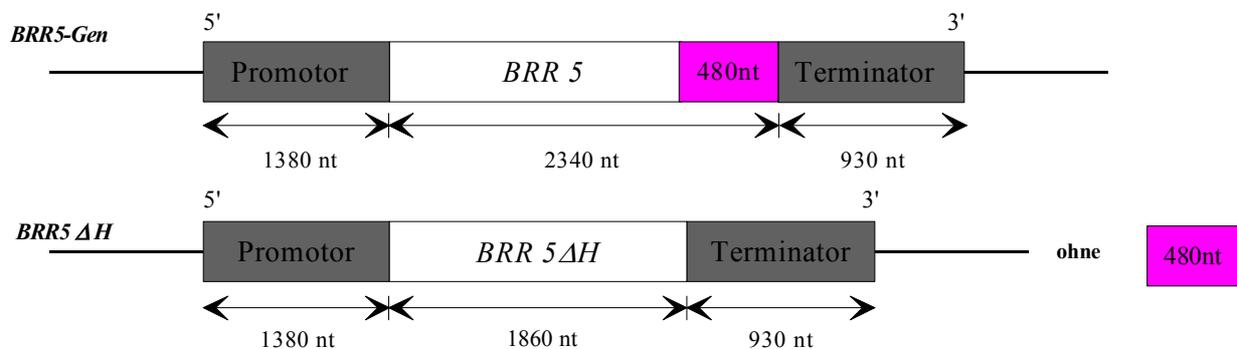


Abb. 22A: Konstruktion der Deletionsmutante *BRR5ΔH*. „*BRR5-Gen*“ bezeichnet das intakte Gen, die zu deletierende Domäne ist in pink dargestellt. Der Mutante *Brr5ΔH* fehlen die C-terminalen 480 Nukleotide, daraus resultiert ein Protein, das den zu *Yor179c* sequenzähnlichen Bereich vollständig verloren hat.

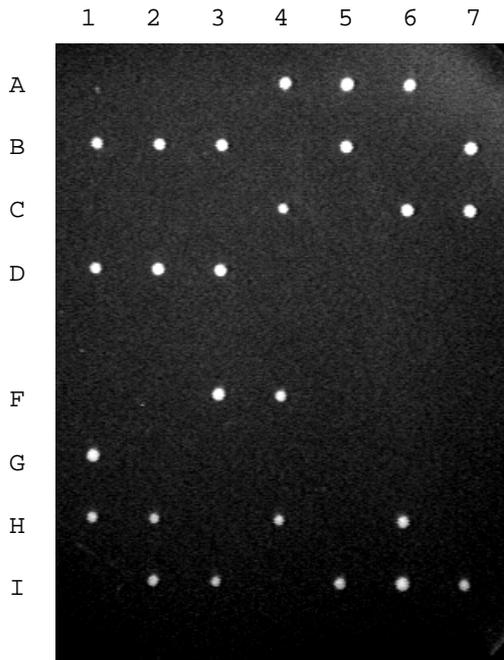


Abb. 22B: Tetradenanalyse des YSN378 *brr5::LEU2* Stammes, in den das Plasmid pRS316 *BRR5ΔHflank* transformiert wurde. Dieses Plasmid enthält im Gegensatz zu pRS316 *BRR5flank* eine 3'-terminal verkürzte Version des *BRR5*-Gens (s. Abb. 22A). Die vier Sporen (A-D und F-I) von 14 unabhängigen Tetraden (2x 1-7) wurden auf einer YPD-Platte vereinzelt. Die ausgekeimten Sporen konnten nach zweitägiger Inkubation mit bloßem Auge untersucht werden. Von der Tetrade 7 F-I ist nur eine einzelne Spore ausgekeimt: 7I, dies kann auf der mechanischen Zerstörung einer Spore während des Ausbringens mit dem Mikromanipulator beruhen.

Deutlich ist zu erkennen, dass nie mehr als zwei der vier Sporen auskeimen konnten, was bedeutet, dass diese Deletionsmutante im Gegensatz zu dem Wildtyp-Gen den letalen Phänotyp des YSN378 *brr5::LEU2*-Stammes nicht aufheben konnte. In der Konsequenz bedeutet dies auch, dass die Funktion des intakten *BRR5*-Gens in der 3'-Prozessierung von dieser Mutante nicht wahrgenommen werden konnte.

Eine weitere Deletionsmutante wurde kloniert, dieser fehlten nur 90 Nukleotide am 3'-terminalen Ende (Abb. 23A). Dieser 90 Basenpaare umfassende Bereich ist nicht nur derjenige der höchsten Sequenzähnlichkeit zu Yor179c, sondern enthält auch das Leucin-Zipper-Motiv. Das erhaltene pRS316 *BRR5ΔZflank* Plasmid wurde in den YSN378 *brr5::LEU2*-Stamm transformiert und dessen Phänotyp anhand einer Tetradenanalyse untersucht. Wie man in Abb. 23B erkennen kann, ist auch diese Deletionsmutante, der nur 90 von insgesamt 2340 Basenpaaren fehlen, nicht in der Lage, den letalen Phänotyp des YSN378 *brr5::LEU2*-Stammes aufzuheben, da wiederum nur zwei von insgesamt vier Sporen auskeimen konnten. Aus diesen Deletionsanalysen konnte gefolgert werden, dass der C-terminale Bereich des Brr5-Proteins zur Ausübung der spezifischen Funktion in der 3'-Prozessierung von entscheidender Bedeutung ist. Ein nicht einmal 5 % des gesamten Gens betragender DNA-Abschnitt konnte also als essentiell für die Funktion des Proteins definiert werden, allerdings ist dieser auch der Bereich der höchsten Sequenzähnlichkeit.

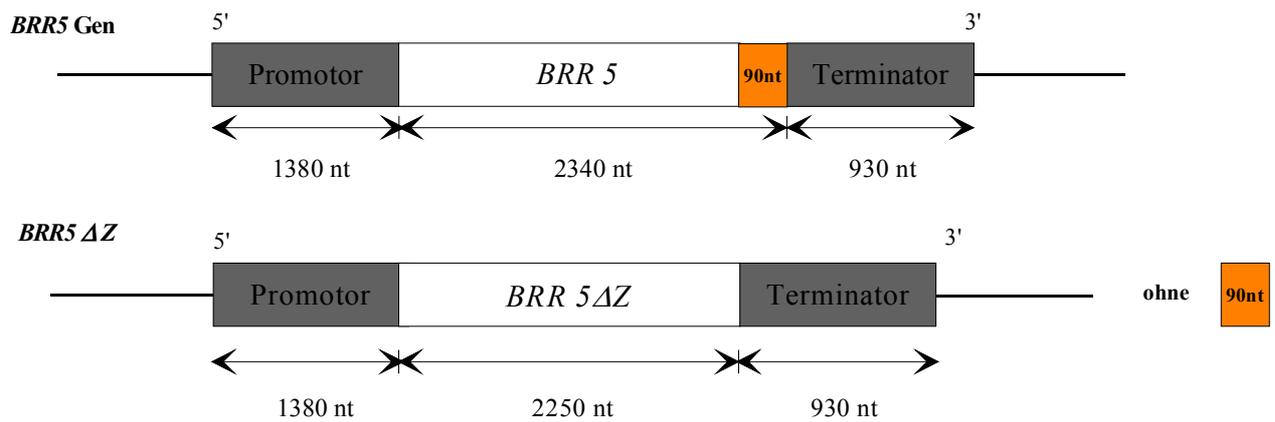


Abb. 23A: Konstruktion der Deletionsmutante *BRR5ΔZ*. „*BRR5 Gen*“ bezeichnet das intakte Gen, die zu deletierende Domäne ist in orange dargestellt. Der Mutante *Brr5ΔZ* fehlen die 3'-terminalen 90 Nukleotide. Dem hieraus resultierenden Protein fehlt nur der potentielle Leu-Zipper-Bereich.

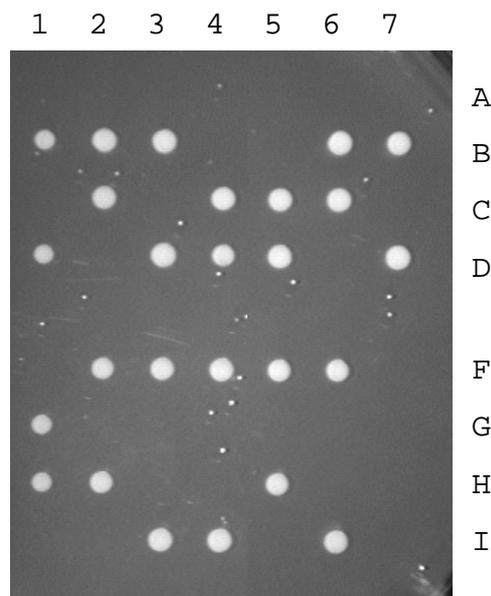


Abb. 23B: Tetradenanalyse des YSN378 *br5::LEU* Stammes, in den das Plasmid pRS316 *BRR5ΔZflank* transformiert wurde. Im Gegensatz zu dem Plasmid pRS316 *BRR5flank* fehlen dieser Mutante 90 Nukleotide am 3'-Ende (siehe Abb. 23A). Die vier Sporen (A-D und F-I) von 13 unabhängigen Tetraden (1-7 und 1-6) wurden auf einer YPD-Platte vereinzelt. Nach einer Inkubation von zwei Tagen konnten die Sporen visuell untersucht werden.

3.7.3 Konstruktion eines chimären *BRR5/YOR179c*-Gens durch Austausch der sequenzähnlichen Bereiche

Die meisten der bisher entdeckten mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren in *S. cerevisiae* besitzen ein sequenzhomologes Gegenstück in höheren Organismen, wie z.B. die beiden Untereinheiten des „Cleavage/Polyadenylation Factor IA“ (CF IA) Rna14 und Rna15 (Takagaki und Manley, 1994) oder die größte Untereinheit des „Cleavage Factor II“ (CF II)

Cft1 (Stumpf und Domdey, 1996). Um zu zeigen, dass die Proteine nicht nur auf Sequenzebene verwandt sind, sondern auch eine analoge Funktion besitzen, wurde in der Hefe das Gen von Interesse zerstört und durch das entsprechende Gen aus dem höheren Organismus, welches auf einem Expressionsplasmid lokalisiert war, ersetzt. Allerdings zeigten diese Experimente keine positiven Ergebnisse (W. Keller, persönliche Mitteilung). Diese Idee wurde dennoch in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen.

Die Sequenzhomologie des Yor179c- und des Brr5-Proteins ist zwar auf das Hefesystem beschränkt, dennoch bestand die Möglichkeit, dass die sequenzähnlichen Bereiche funktionell redundant sind. Ziel war es, durch Komplementationsversuche mit einem chimären Brr5/Yor179c-Protein (Abb. 24 und 26) festzustellen, ob Yor179c auch die Funktion des analogen Teils in Brr5 ersetzen kann (ausführliche Klonierungsstrategie siehe Anhang).

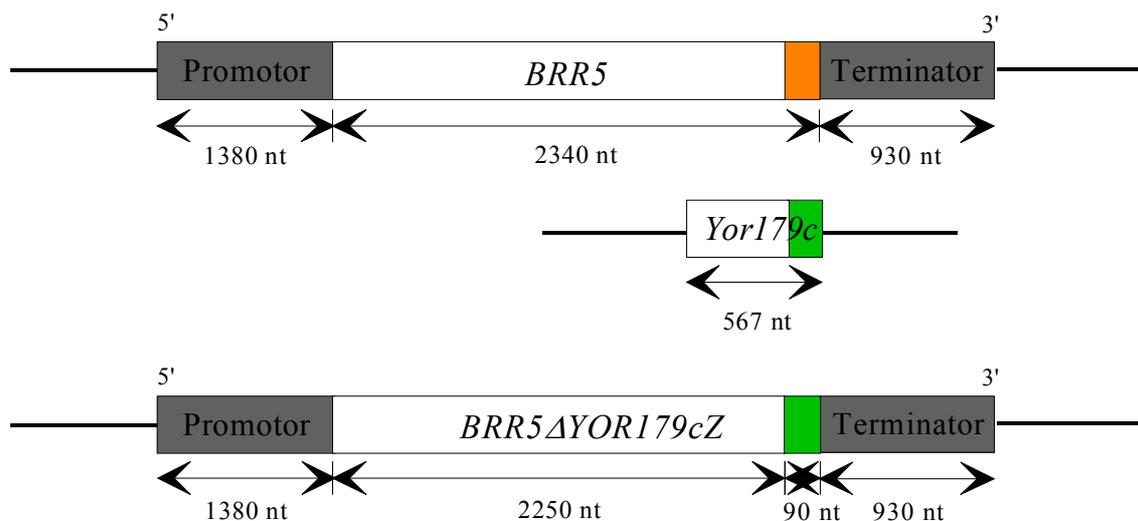


Abb. 24: Konstruktion der Hybridmutante *BRR5ΔYOR179cZ* durch Austausch der potentiellen Leucin-Zipper-Domäne. Durch „Megaprimer“-PCR-Methode wurde der entsprechende Bereich des offenen Leserahmens *YOR179c* aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert. Dieser wurde so in das Plasmid pRS316 *BRR5*flank kloniert (dieses beinhaltet nicht nur das komplette *BRR5*-Gen, sondern auch dessen Promotor und Terminator-Bereich), dass das entstandene Konstrukt nun den 5'-terminalen Bereich des *BRR5*-Gens besitzt, dessen Aminosäure-Sequenz keine Homologien zu *Yor179c* aufweist, sowie die am 3'-Ende gelegenen 90 Nukleotide des *YOR179c*-Gens.

Dieses Konstrukt (pRS316 *BRR5ΔYOR179cZ*) wurde in den YSN378 *brr5::LEU2*-Stamm transformiert und eine Tetradenanalyse durchgeführt (Abb. 25). Die Ausbildung einer 3:1 bzw. einer 4:0 Verteilung der ausgekeimten Sporen zeigte, dass mit dem Hybriden der letale Phänotyp des YSN378 *brr5::LEU2*-Stammes komplementiert werden konnte.

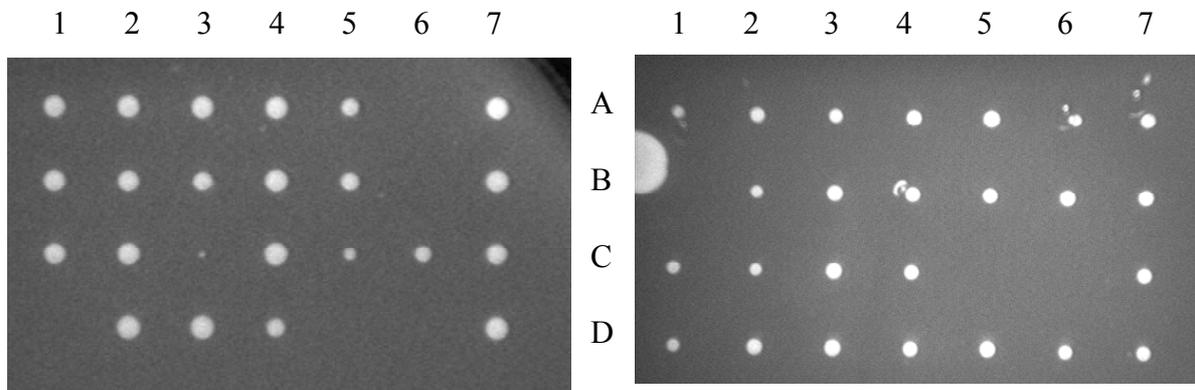


Abb. 25: Tetradenanalyse des YSN378-Stammes, in den das Plasmid pRS316 *BRR5ΔYOR179cZ* transformiert wurde. Dieses Plasmid enthält ein Hybriden, welches sich aus dem 5'-terminalen Bereich des *BRR5*-Gens, sowie den letzten 90 Nukleotiden des *YOR179c*-Gens zusammensetzt (s. Abb. 24). 14 voneinander unabhängige Tetraden (2 x 7) wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators von A-D vereinzelt. Nach einer zweitägigen Inkubation konnten die ausgekeimten Sporen mit bloßem Auge analysiert werden.

Basierend auf diesen Resultaten wurde ein zweites chimäres Molekül konstruiert, wobei der gesamte sequenzähnliche Bereich von 480 Nukleotiden ausgetauscht wurde (Abb. 26, ausführliche Klonierungsstrategie siehe Anhang).

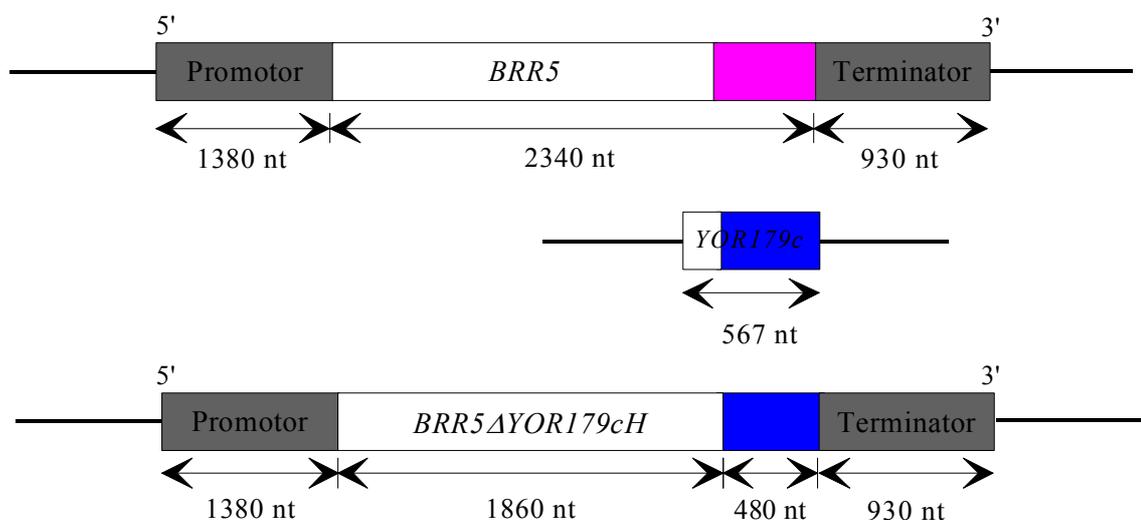


Abb. 26: Konstruktion des Hybridgens *BRR5ΔYOR179cH* durch Austausch des sequenzähnlichen Bereichs der beiden Gene *BRR5* (pink) und *YOR179c* (blau). Durch Polymerase-Ketten-Reaktion wurde die sequenzähnliche Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens *YOR179c* aus genomischer DNA amplifiziert und in das Plasmid pRS316 *BRR5*flank kloniert (dieses Plasmid enthält das vollständige *BRR5*-Gen zusammen mit dem ihm eigenen Promotor und Terminator). Das entstandene Konstrukt setzt sich aus dem 5'-terminalen Bereich des *BRR5*-Gens, sowie dem 3'-terminalen, 480 Basenpaare umfassenden Bereich des *YOR179c*-Gens zusammen.

Auch dieses Konstrukt (pRS316 *BRR5ΔYOR179cH*) wurde in den YSN378 *brr5::LEU2*-Stamm transformiert, um seinen Einfluß auf den letalen Phänotyp dieses Stammes zu analysieren. In Abb. 27 ist eine deutliche 3:1 respektive 4:0 Verteilung der Sporen zu erkennen; daraus wurde gefolgert, dass auch aus dieser Chimäre ein funktionsfähiges Protein erzeugt wurde, welches die Funktionsweise des Wildtyp *Brr5*-Proteins in der 3'-Prozessierung übernehmen konnte.

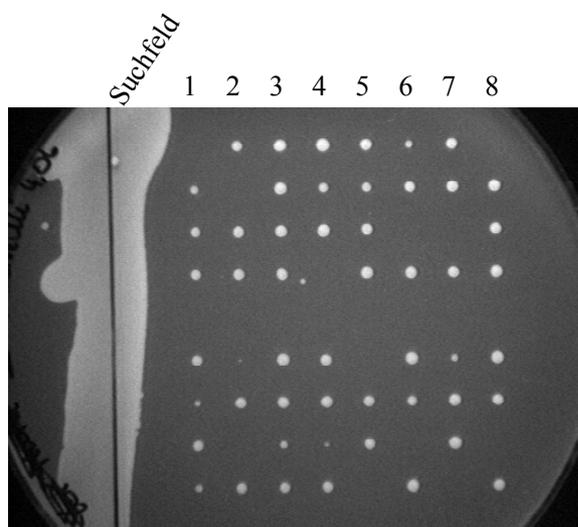


Abb. 27: Tetradenanalyse des YSN378 *brr5::LEU2* Stammes, in den das Plasmid pRS316 *BRR5ΔYOR179cH* transformiert wurde. Auf dem Plasmid lokalisiert war ein „Hybridgen“, das den 5'-terminalen Bereich des *BRR5*-Gens, sowie den 3'-terminalen, sequenzähnlichen Bereich des *YOR179c*-Gens beinhaltet (s. Abb. 26). Die vier Sporen (A-D und F-I) von 16 unabhängigen Tetraden (2x 1-8) wurden auf einer YPD-Platte vereinzelt. Nach einer Inkubation von zwei Tagen bei 30°C konnten die ausgekeimten Sporen mit bloßem Auge ausgewertet werden. Im Suchfeld wurden die voneinander unabhängigen Tetraden mit dem Mikroskop des Mikromanipulators ausgewählt und aufgenommen.

Zusammenfassend läßt sich aus oben angeführten Versuchen schlußfolgern, dass der C-terminale Bereich des *Brr5*-Proteins essentiell für dessen korrekte Wirkungsweise ist und dass schon die 3'-terminale Deletion eines 90 Nukleotide großen Fragments zum kompletten Funktionsverlust des Genprodukts führt. Außerdem konnte der sequenzähnliche Bereich vollständig durch denjenigen des *YOR179c*-Gens ersetzt werden, ohne dass ein Funktionsverlust auftrat. Dies bedeutet, dass die erwähnte Sequenzähnlichkeit aufgrund funktioneller Redundanz ein entscheidender Faktor in der Aufklärung der Wirkungsweise des *YOR179c*-Gens sein könnte.

3.7.3 Mutation der p-loop-Domäne innerhalb des C-terminalen Bereichs des *BRR5*-Gens

Wie schon in Kapitel 3.1 erwähnt, ist am C-terminalen Ende des Brr5-Proteins nicht nur ein potentiell Leucin-Zipper-Motiv, sondern möglicherweise auch eine p-loop-Domäne lokalisiert. P-loop-Domänen werden in der Literatur als ATP- oder GTP-bindende Aminosäuresequenzen beschrieben, die in ganz unterschiedlichen Proteinen lokalisiert sein können, wie z.B. in G-Proteinen, Elongationsfaktoren der Translation, K^+/Na^+ -Pumpen usw. (Saraste *et al.*, 1990). Da bekannt war, dass sowohl für die *in vitro* Polyadenylierung, als auch für die Bindung von Cft2 (eines weiteren 3'-Prozessierungsfaktors) an RNA, ATP benötigt wird (Butler und Platt, 1988; Zhao *et al.*, 1997), schien es vernünftig, dieses Motiv mit der Möglichkeit einer ATP-Bindung in Zusammenhang zu bringen. Um eine möglicherweise essentielle Rolle der p-loop-Domäne für die Funktion des Brr5-Proteins aufzudecken, sollte diese Sequenz einer Mutation unterzogen werden.

Da in den verschiedenen Proteinfamilien, die das p-loop-Motiv tragen, vor allem die Aminosäure Lysin (K) konserviert ist, sollte das hierfür codierende Triplet so verändert werden, dass es für eine andere Aminosäure codiert (Abb. 28A und B). Mit Hilfe einer mutagenen PCR-Reaktion wurde das Triplet AAA zu GAC verändert. Diese neue Dreierkombination codiert für Asparaginsäure, d. h. es wurde eine basische Aminosäure durch eine saure substituiert. Im zweiten Fall ersetzte CAC die Sequenz AAA, dies bedeutete für die neu synthetisierte Aminosäuresequenz, dass der Lysinrest durch einen Histidinrest, also eine andere basische Aminosäure ersetzt wurde. Allerdings besitzt Histidin eine sterisch voluminösere Seitenkette (Imidazolgruppe) als Lysin (-NH₂-Gruppe). Zusätzlich wurde noch die Sequenz ACC innerhalb des p-loop-Motivs, die für die Aminosäure Threonin codiert und nicht zu den konservierten Aminosäuren der bisher bekannten Proteinfamilien zählt, aber in beiden p-loop-Domänen der Proteine Brr5 und Yor179c zu finden ist, durch ein Triplet, welches für die Aminosäure Valin (V) codiert, ersetzt (Abb. 28 C). In diesem Fall wurde also die hydrophile Aminosäure Threonin durch eine Aminosäure mit einer hydrophoben Seitenkette ausgetauscht.

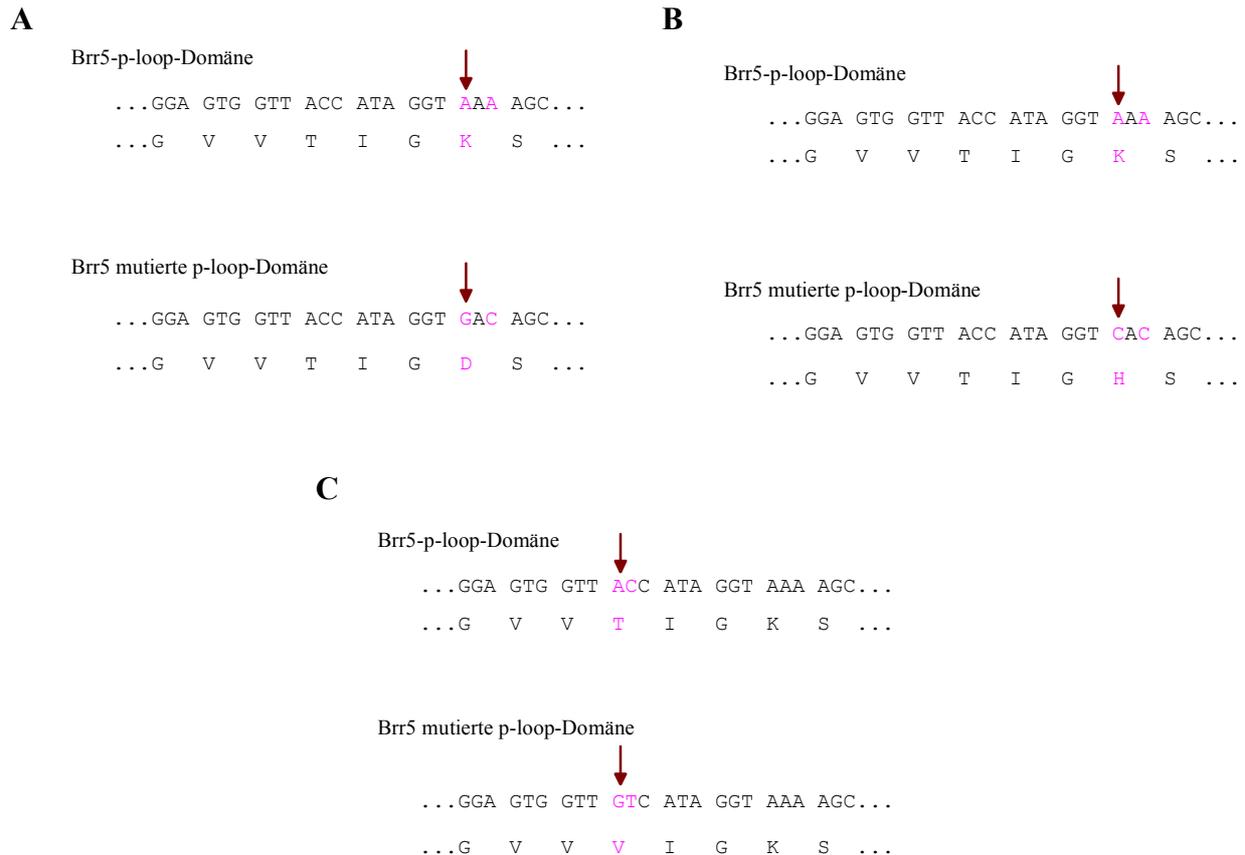


Abb. 28: Darstellung der Mutagenesen in der p-loop-Domäne im *BRR5*-Gen und die daraus resultierenden Aminosäure-Sequenzen

- A) Das innerhalb 7 verschiedener Proteinfamilien hochkonservierte Lysin (K) wurde durch die Aminosäure Asparaginsäure (D) ersetzt. Hierfür wurde das Triplet A des Wildtyp-Gens durch GAC ersetzt, welches für die Aminosäure Asparaginsäure codiert. Dadurch wurde die basische –NH₂-Gruppe des Lysins durch die saure Carboxylgruppe (–COOH) der Asparaginsäure substituiert.
- B) Eine zweite Mutation führte zum Ersatz des Triplets AAA durch die Sequenz CAC. Hierdurch wurde in die neu-synthetisierte Aminosäurekette Histidin (H) an Stelle von Lysin eingebaut. Histidin verfügt wie Lysin über eine basische Seitenkette, allerdings ist der Imidazolring des Histidins sterisch viel weniger zugänglich als die offene –NH₂-Gruppe des Lysins und sollte die Bindungsfähigkeit der p-loop-Domäne reduzieren.
- C) Die Nukleotide A und C im Wildtyp-Allel, die zusammen mit einem weiteren Cytidin für die Aminosäure Threonin (T) codieren, wurden in der mutierten Variante durch ein G und T ersetzt, die mit dem Cytidin des Wildtyp-Allels nun für die Aminosäure Valin (V) codieren. Statt der hydrophilen –OH-Gruppe des Threonins befindet sich nun in der p-loop Domäne die hydrophobe Alkylgruppe des Valins.

Der Austausch der Aminosäuren erfolgte durch die Megaprimer-Methode (Seraphin und Kandels-Lewis, 1996; genaue Mutationsstrategie siehe Anhang). Nach Klonierung der mutierten DNA in den pRS316 *BRR5*flank-Vektor wurden die neu entstandenen

Nukleotidsequenzen mittels einer Sequenzierreaktion analysiert, um den korrekten Leserahmen, der Voraussetzung für ein sinnvoll translatiertes Protein ist, zu überprüfen (Abb. 29).

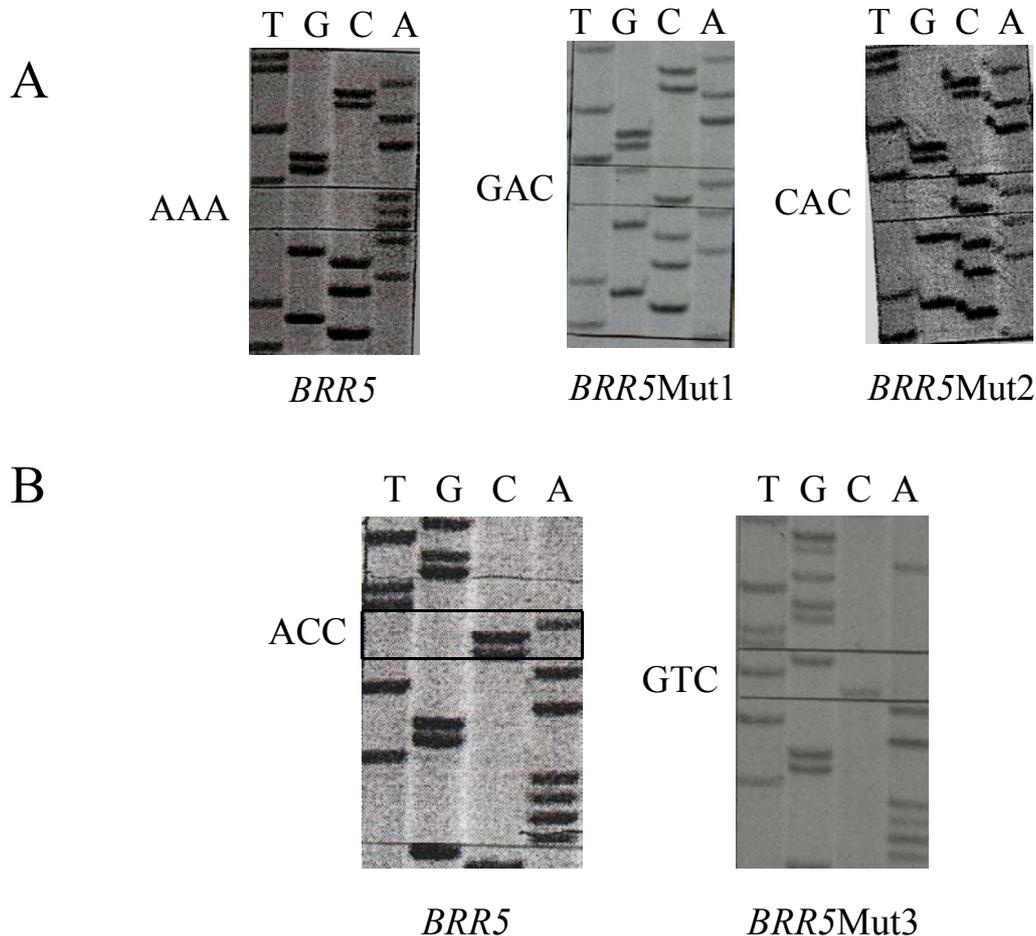


Abb. 29: A) Sequenzanalyse der Nukleotidsequenz der p-loop-Domäne des *BRR5* Wildtyp-Gens, sowie der Mutanten *BRR5Mut1* und *BRR5Mut2*. Anstelle des ursprünglichen Triplets AAA, welches für die Aminosäure Lysin codiert, wurde in der Mutante 1 die Sequenz GAC, welche für Asparaginsäure codiert, sowie in der Mutante 2 die Sequenz CAC, welche für die Aminosäure Histidin codiert, eingeführt.

B) Sequenzanalyse der Nukleotidsequenz der p-loop-Domäne des *BRR5* Wildtyp-Gens, sowie der Mutante *BRR5Mut3*, die statt der Nukleotide ACC, die für die Aminosäure Threonin codieren, die Nukleotide GTC enthält. Dieses Triplett codiert für die Aminosäure Valin.

Anschließend wurden die Plasmide mit den verschiedenen mutierten *BRR5*-Genen unabhängig voneinander in den YSN378 *brr5::LEU2*-Stamm transformiert und nach Wachstum auf Sporulationsmedium die entstandenen Tetraden vereinzelt. Die beiden Mutationen, die die Aminosäure Lysin betrafen (*BRR5Mut1* und *Mut2*), verhielten sich wie das Wildtyp-Gen und waren demzufolge funktionell, denn es konnte sich ebenfalls eine 3:1

respektive eine 4:0 Verteilung entwickeln (Daten nicht gezeigt). Die Variante *BRR5Mut3* jedoch, in der die hydrophile, funktionelle -OH- Gruppe des Threonins durch die hydrophobe Alkylgruppe des Valins ersetzt wurde, zeigte eine 2:2 Verteilung der Tetraden (Abb. 30). Diese Mutation führte also zu einem physiologisch nicht funktionellen Protein, das den letalen Phänotyp des YSN378 *brr5::LEU2*-Stammes nicht komplementierten konnte.

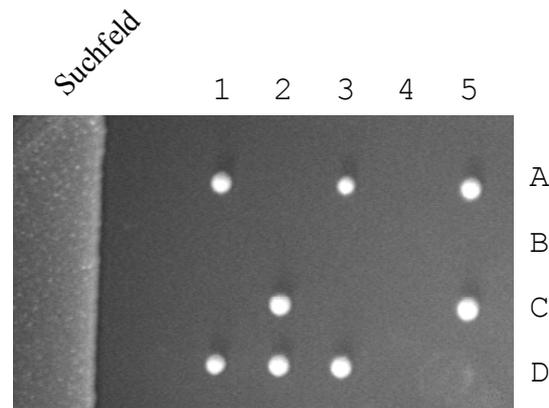


Abb. 30: Tetradenanalyse des diploiden YSN378 *brr5::LEU2* Hefestammes, in dem eine Kopie des *BRR5*-Gens vollständig zerstört wurde, der aber das Plasmid pRS316 *BRR5Mut3* enthält. Dieses Plasmid trägt das gesamte *BRR5*-Gen, inklusive seines Promotors und Terminators. Die p-loop-Domäne am C-Terminus wurde jedoch auf Nukleotidebene mutiert und enthält nun die Aminosäure Valin, im Gegensatz zum Wildtyp-Allel, das über die Aminosäure Threonin verfügt. Vier Sporen (A-D) von fünf unabhängigen Tetraden (1-5) wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators vereinzelt und nach zweitägigem Wachstum bei 30°C photographiert.

Aus diesen Ergebnissen konnte resümiert werden, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure in der potentiellen p-loop-Domäne des Brr5-Proteins das gesamte Protein funktionsunfähig macht. Erstaunlicherweise handelte es sich allerdings nicht um das innerhalb der p-loop-Domänen hochkonservierte Lysin, sondern um das nur innerhalb der beiden Proteine Yor179c und Brr5 homologe Threonin. Damit ist noch nicht der endgültige Beweis erbracht, dass es sich hier tatsächlich um eine p-loop-Domäne und nicht um ein nur zufällig sequenzgleiches Aminosäuremotiv handelt. Da aber gezeigt werden konnte, dass das C-terminale Ende des Brr5-Proteins für dessen Funktionalität von entscheidender Bedeutung ist, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob dieser sequenzähnliche Bereich das Yor179c-Protein eventuell zu einer Interaktion an der 3'-Prozessierung befähigt.

3.8 Identifizierung von Brr5 als Interaktionspartner von Yor179c

In den vorausgegangenen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass der C-terminale Bereich des Brr5-Proteins von entscheidender Bedeutung für dessen Funktionalität ist. Da dieser Teil ein potentiell Leucin-Zipper-Motiv enthält und dieses wiederum eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne darstellt, wurde im Folgenden untersucht, ob Yor179c mit Brr5 interagieren kann. Eine Interaktion könnte eventuell durch die den beiden Proteinen eigene Leucin-Zipper-Domäne ermöglicht werden. Zum Nachweis einer solchen Interaktion wurde eine Coimmunpräzipitation durchgeführt. Die benötigten funktionellen Proteine Yor179c und Brr5 wurden mit Hilfe eines kombinierten Transkriptions- und Translationssystems in einem Retikulozytenlysat hergestellt. Für die Expression wurde das in Kapitel 3.3 beschriebene Plasmid pET15b *YOR179c*, sowie das im Arbeitskreis vorhandene Plasmid pET15b *BRR5* verwendet. Die Kontrolle der korrekt synthetisierten Proteine zeigt die in Abb. 31 dargestellte Autoradiographie eines SDS-PAGE Gels.

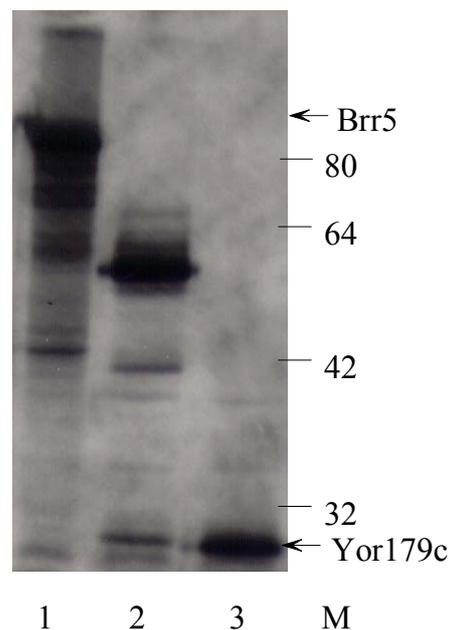


Abb. 31: 10 %ige SDS-PAGE der *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Proteine Yor179c (Spur 3), sowie Brr5 (Spur 1), deren entsprechende DNA in den Expressionsvektor pET15b kloniert wurde. Die erwarteten Fragmentgrößen betragen für das Yor179c-Protein 21 kDa, für das Brr5-Protein 100 kDa. M bezeichnet den Kaleidoskop-Proteinlängenstandard, dessen Fragmentgrößen in kDa seitlich angegeben sind. (In Spur 2 wurde ein Protein aufgetragen, das für einen anderen Versuch benötigt wurde und für dieses Experiment nicht von Interesse ist).

Die errechneten Molekulargewichte der *in vitro* translatierten Proteine stimmten mit den beobachteten Banden überein. Zusätzlich wurden die beiden Proteine für die anschließende Coimmunpräzipitation auch ohne Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin translatiert. In Abb. 32 ist die Variante der Coimmunpräzipitation, die in dieser Arbeit verwendet wurde, schematisch dargestellt.

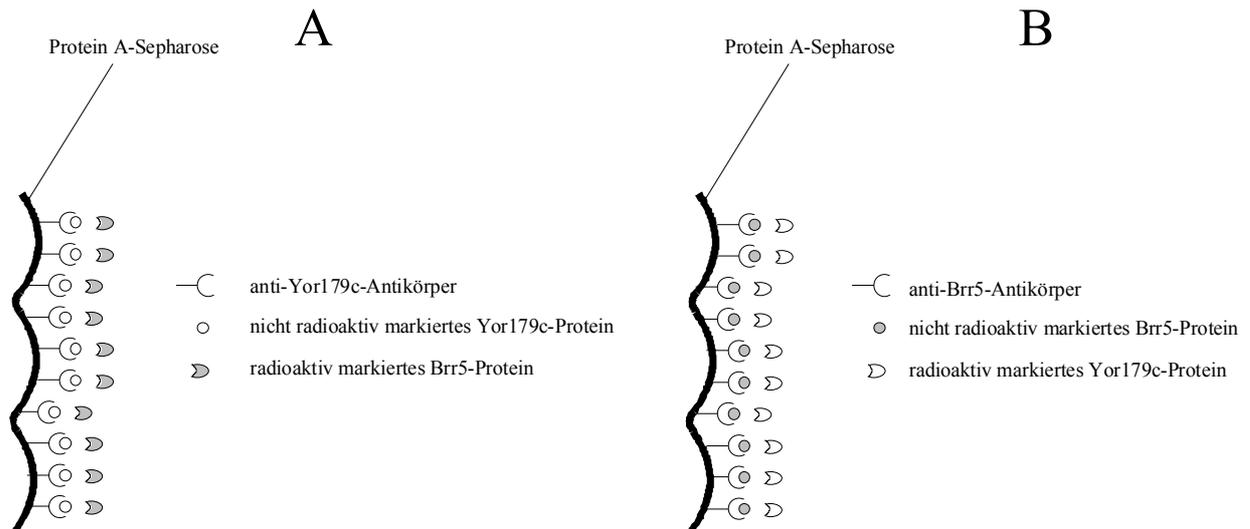


Abb. 32: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit angewandten Coimmunpräzipitation.

- Nachweis der Yor179c-Brr5-Interaktion: An das Säulenmaterial Protein A-Sepharose wurde der polyklonale anti-Yor179c-Antikörper gekoppelt. Nach Bindung des nicht radioaktiv markierten Yor179c-Proteins an diesen Komplex wurde dieser mit dem durch ^{35}S -Methionin radioaktiv markierte Brr5-Protein inkubiert.
- Hier wurde der polyklonale anti-Brr5-Antikörper an Protein A-Sepharose gekoppelt. Nach Bindung von *in vitro* translatiertem Brr5 an diesen Komplex, wurde dieser mit radioaktiv markiertem Yor179c-Protein inkubiert.

Ein Antikörper gegen das Yor179c-Protein wurde über seine Fc-Region an Protein A-Sepharose gebunden. Hieran wurde das nicht radioaktiv markierte Yor179c-Protein gekoppelt. Das zugegebene radioaktiv markierte Brr5-Protein sollte, falls es ein Interaktionspartner von Yor179c ist, an diesen Komplex binden (Abb. 32A). Dieses Experiment wurde ebenfalls in umgekehrter Reihenfolge mit einem anti-Brr5-Antikörper, nicht radioaktiv markiertem Brr5, sowie dem mit radioaktivem ^{35}S -Methionin markierten Yor179c-Protein wiederholt (Abb. 32B). Nachdem die Kopplungsreaktion beendet war, wurde das Säulenmaterial in einem SDS-Auftragspuffer aufgekocht und die daran gebundenen Proteine über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Abb. 33 zeigt das autoradiografierte SDS-PAGE-Gel der durchgeführten Coimmunpräzipitation. Um

zu kontrollieren, ob bereits das radioaktiv markierte Brr5- bzw. Yor179c Protein unspezifisch an das Säulenmaterial band, wurde Protein A-Sepharose zusammen mit radioaktiv markiertem Brr5-, respektive mit radioaktiv markiertem Yor179c-Protein inkubiert und dieser Reaktionsansatz aufgetragen (Spur 1, respektive Spur 2). Als weitere Negativkontrolle wurde die Coimmunpräzipitation auch mit den entsprechenden Präimmunsereen durchgeführt (Spur 3, prä-Yor179c, Spur 4, prä-Brr5). Wie zu erwarten, konnten hier keine Proteine detektiert werden. Deutlich sind jedoch Banden in den Spuren 5 und 6 zu erkennen, die hinsichtlich ihrer Größe mit derjenigen des *in vitro* translatierten Brr5-Proteins in Abb. 31 übereinstimmen. Dies bestätigte die Annahme, dass die beiden Proteine tatsächlich miteinander interagieren. Die beiden Reaktionsansätze der Spuren 5 und 6 unterscheiden sich nur durch den Einsatz unterschiedlicher Mengen an Antikörper. Auch im umgekehrten Fall konnte das radioaktiv markierte Yor179c-Protein erfolgreich an Brr5 gekoppelt werden (Spuren 7 und 8).

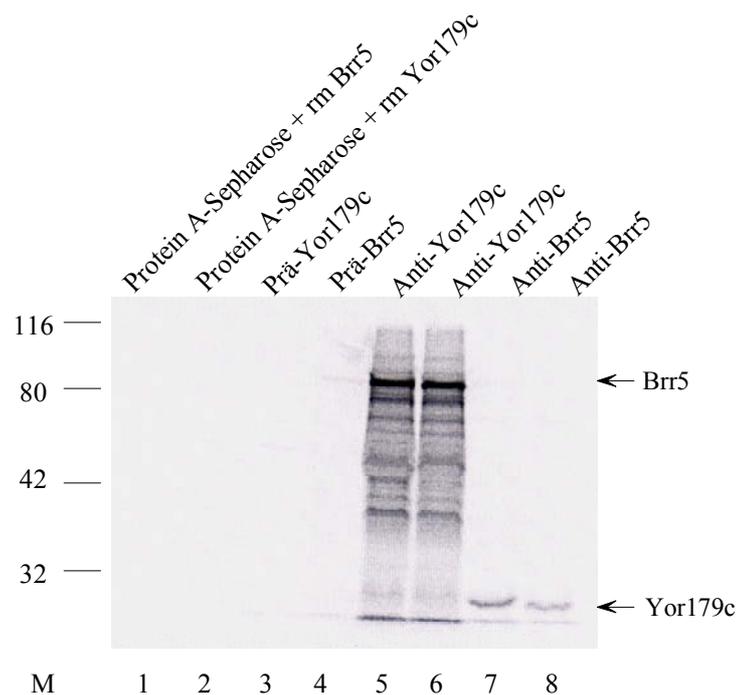


Abb. 33: Coimmunpräzipitation des Brr5- bzw. des Yor179c- Proteins durch Antikörper gegen das Yor179c- bzw. gegen das Brr5-Protein. Nicht radioaktiv markiertes *in vitro* translatiertes Yor179c-Protein wurde an eine Protein A-Sepharose-Säule gekoppelt, die zuvor mit Yor179c-spezifischem Antiserum (Spuren 5 und 6, diese unterscheiden sich durch die Menge an verwendetem Antikörper 5 bzw. 50 μ l) oder mit dem entsprechenden Präimmunsereum (Spur 3) beladen worden war. Nach Zugabe des radioaktiv markierten, ebenfalls *in vitro* translatierten Prozessierungsfaktors Brr5 wurde das Affinitätssäulenmaterial abgetrennt und in 5x SDS-Auftragungspuffer aufgenommen. Das über das Yor179c-Protein an die Säule gebundene Brr5 wurde von der Säulenmatrix eluiert, über eine SDS-

PAGE (12 %) aufgetrennt und anschließend via Autoradiografie analysiert. In Spur 2 wurde eine Kontrolle aufgetragen, bei der das Säulenmaterial zusammen mit dem radioaktiv markierten Yor179c-Protein inkubiert wurde, ohne die vorherige Bindung an Brr5 zu ermöglichen. Die Spuren 1,4,7 und 8 zeigen denselben Versuch, jedoch wurde hier das *in vitro* translatierte Brr5-Protein allein an die Säulenmatrix (Spur 1), an Säulenmaterial das zuvor mit dem entsprechenden Prä-(Spur 4), bzw. dem Antiserum (Spuren 7 und 8, 5 µl bzw 50 µl Antiserum) behandelt worden war, gebunden und anschließend mit dem radioaktiv markierten Yor179c-Protein inkubiert. M bezeichnet den Kaleidoskop-Proteinlängenstandard, der durch Übereinanderlegen des Röntgenfilms mit dem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel lokalisiert wurde; die Fragmentgrößen wurden seitlich in kDa angegeben; rm steht für „radioaktiv markiert“.

Dieses Ergebnis kann und darf allerdings nicht auf die tatsächliche Situation *in vivo* extrapoliert werden. Auch bildet es nicht den Nachweis, dass die Interaktion der beiden Proteine Yor179c und Brr5 über ihre beiden C-terminalen Enden vollzogen wird. Aber es bestätigt die Vermutung, dass diese beiden Proteine zumindest *in vitro* in der Lage sind, ein heterodimeres Molekül auszubilden. Da es sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen in der Mehrzahl um *in vitro* Studien handelte, war dieses Ergebnis also hinreichend zum Verständnis der weiteren Experimente.

3.9 Charakterisierung von Yor179c als redundanter Polyadenylierungsfaktor

3.9.1 Vergleich der 3'-Prozessierungsaktivität von Hefeextrakten, die aus einem Wildtyp- und dem USY3-Stamm hergestellt worden sind

Seit 1988 ist bekannt, dass die mRNA-3'-Prozessierungsreaktion *in vitro* durchgeführt werden kann (Butler und Platt, 1988). Man benötigt hierfür als wichtigste Komponenten einen Hefe-Ganzzellextrakt, sowie ein radioaktiv markiertes Transkript. Prinzipiell sind zwei Untersuchungsmethoden zu unterscheiden. Es können je nach Wahl des Puffers und des Substrates sowohl eine gekoppelte Reaktion, bestehend aus endonukleolytischem Schnitt und nachfolgender Polyadenylierung, als auch beide Vorgänge getrennt voneinander untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die zweite Variante angewandt, wobei zuerst der endonukleolytische Schnitt, der den ersten Schritt bei der 3'-Prozessierung von Vorläufer-mRNA darstellt, untersucht wurde. Um eine Beteiligung des Yor179c-Proteins an der

3'-Prozessierung aufzudecken, wurden zwei Strategien verfolgt: Zum einen wurde der diploide homozygote USY3-Stamm auf seine Fähigkeit untersucht, ein radioaktiv markiertes Transkript im Vergleich zu einem Wildtyp-Stamm zu prozessieren. Zum anderen wurde ein Hefe-Ganzzellextrakt, extrahiert aus einem Wildtyp-Stamm, mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein depletiert und ebenfalls in eine *in vitro* 3'-Prozessierungsreaktion eingesetzt.

Abb. 34 zeigt das Ergebnis der ersten Fragestellung: Hefe-Ganzzellpräparationen, isoliert aus drei verschiedenen Stämmen, wurden auf ihre Fähigkeit, ein vorgegebenes Transkript endonukleolytisch zu schneiden, getestet. Bei den verwendeten drei Stämmen handelte es sich um den haploiden CEN PK2 *yor179c::KAN* (Spuren 3 und 4), den hieraus konjugierten homozygoten USY3-Stamm (Spuren 5 und 6), der wie auch der haploide Stamm über keine intakte Kopie des *YOR179c*-Gens mehr verfügt, sowie als Positivkontrolle den CEN PK2-Wildtyp-Stamm (Spuren 1 und 2). Diese drei Extrakte wurden sowohl unbehandelt (Spuren 1, 3 und 5) als auch als Präzipitat einer 40 %igen Ammoniumsulfatfällung (Spuren 2, 4 und 6) in eine *in vitro* 3'-Prozessierungsreaktion mit *CYCI*-spezifischen RNA-Transkripten eingesetzt. In Spur 5 wurde der Extrakt aufgetragen, der aus dem USY3-Stamm präpariert worden war, in Spur 6 derselbe Extrakt, der jedoch mit Ammoniumsulfat gefällt worden war. Man kann hier zwar ein schwächer ausgeprägtes 5'-Schneideprodukt erkennen als das in Spur 2, welches demjenigen des Wildtyp-Extraktes entspricht, aber der USY3-Stamm ist ganz offensichtlich zu einem endonukleolytischen Schnitt eines mRNA-Transkriptes befähigt.

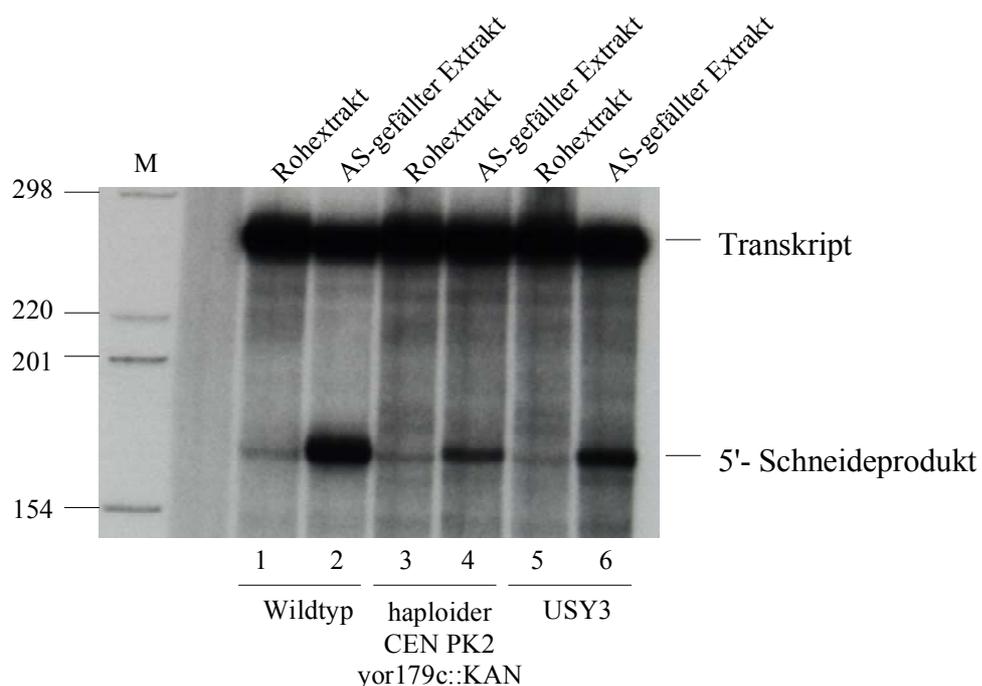


Abb. 34: Test der Hefe-Ganzzellextrakte eines Wildtyp-Stammes, sowie eines haploiden und eines diploiden Yor179c-defizienten Stammes auf ihre Fähigkeit *CYC1*-spezifische RNA-Transkripte in ein 5' und 3'-Produkt zu schneiden. Die Spuren 2, 4 und 6 bezeichnen den mit 40% Ammoniumsulfat gefällten Extrakt, bei den Spuren 1, 3 und 5 hingegen handelt es sich um den unbehandelten Rohextrakt. In Spur 1 und 2 ist zum Vergleich ein CEN PK2-Wildtyp-Extrakt aufgetragen, für die Spuren 3 und 4 wurde der haploide CEN PK2 yor179c::KAN-Stamm verwendet, der auch das Ausgangsmaterial für den in den letzten beiden Spuren verwendeten USY3-Stamm war. M, Molekulargewichtsstandard mit vier seitlich angegebenen Fragmentgrößen (1 kb-DNA-Leiter).

3.9.2 Inaktivierung der 3'-Prozessierungsaktivität eines Hefeextraktes durch Immundepletion mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein

Die zweite Strategie hatte die Entfernung des Yor179c-Proteins mit anti-Yor179c-Antikörpern aus einem mit 40 % Ammoniumsulfat gefällten Hefe-Ganzzellextrakt und dessen anschließende Verwendung in einer *in vitro* 3'-Prozessierungsreaktion mit *CYC1*-spezifischen RNA-Transkripten zum Ziel. Die Inkubation des Antikörpers mit dem Extrakt erfolgte dabei für 4 Stunden und wurde nach Zugabe von frischem Antikörper einmal wiederholt. Nach erfolgter Depletion wurde dieser Extrakt zuerst auf Anwesenheit von Yor179c mit dem entsprechenden Antiserum in einer Western-Blot-Analyse getestet (Abb. 35). Hierbei war das für das Yor179c-Protein spezifische Signal nicht mehr nachweisbar (Spur 4). Bei der Vorbehandlung des Extraktes mit Präimmunerum (Spur 3), sowie auch in einem unbehandelten Extrakt (Spur 2) ist das Yor179c-spezifische Signal bei einer Größe von rund 21 kDa im Western-Blot deutlich zu erkennen. Diese Western-Blot-Analyse bestätigte damit die Spezifität der Immundepletion.

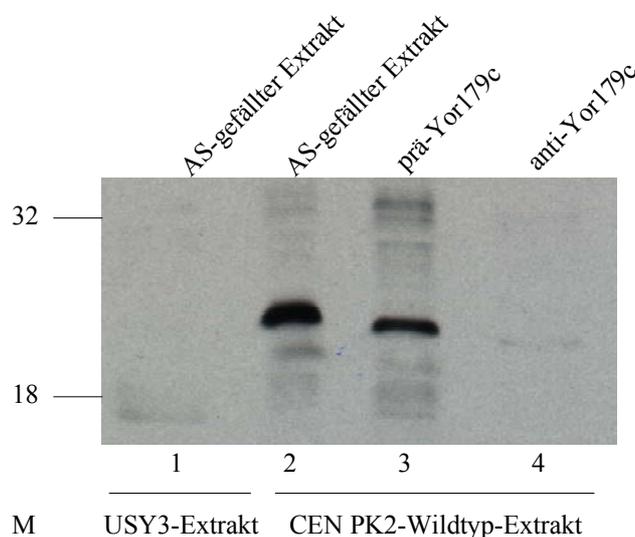


Abb. 35: Western Blot-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Yor179c-Protein. Verwendet wurde ein Hefe-Ganzzellextrakt, der mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt worden war (Spur 2, CEN PK2-Wildtyp, mit Ammoniumsulfat gefällt). Dieser Extrakt wurde vorher für 8 Stunden mit Prä- bzw. Antiserum gegen das Yor179c-Protein depletiert (Spuren 3 und 4). Ein Extrakt des diploiden Hefestammes USY3, der für das *YOR179c*-Gen defizient ist, wurde ebenfalls aufgetragen (Spur 1, USY3-Stamm, Ammoniumsulfat-gefällt). M bezeichnet den Kaleidoskop-Proteinlängenstandard; zwei Fragmente dieses Standards wurden seitlich in kDa angegeben.

Dieser immundepletierte Extrakt wurde nun ebenfalls in einer *in vitro* Reaktion auf seine 3'-Prozessierungsfähigkeit (Abb. 36) getestet. Nach einer ersten, 4-stündigen Depletion konnte hierbei eine deutlich erkennbare Verringerung der Schneideaktivität beobachtet werden (vergleiche Spuren 2 und 3), während eine 8-stündige Depletion zu einer vollständigen Inhibierung (vergleiche Spuren 3 und 5) führte. Derselbe Extrakt wurde parallel hierzu als Kontrolle auch mit Prä- und Antiimmunserum gegen das Ptf1-Protein behandelt (Hani *et al.*, 1999; Hani *et al.*, 1995), von dem bekannt ist, dass es *in vitro* keinen Effekt auf die 3'-Prozessierung hat (Spuren 8 und 9, Dissertation Gabriele Stumpf 1997). Hier ist kein Unterschied zwischen einer Inkubation mit Prä- und Antiimmunserum zu erkennen. In Spur 11 wurde zusätzlich der mit Ammoniumsulfat gefällte USY3-Extrakt aufgetragen. Auch dieser war zuvor mit Prä- und Antiimmunserum gegen das Yor179c-Protein inkubiert worden (Spur 10 und 12).

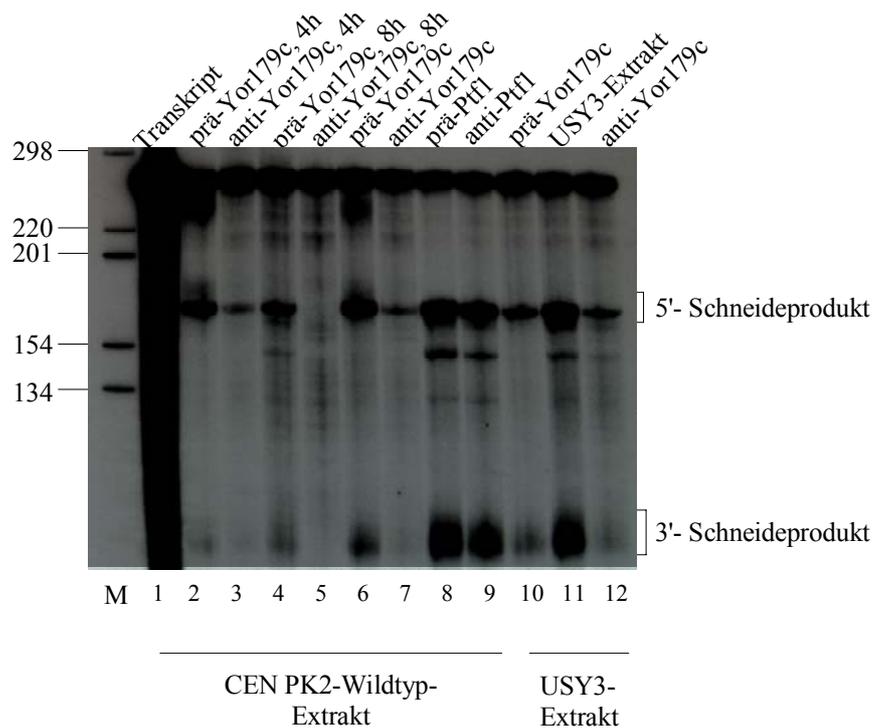


Abb. 36: Verringerung der 3'-Prozessierungsaktivität eines Hefe-Ganzzellextraktes durch Immundepletion mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein. *CYC1*-spezifische RNA-Transkripte (Spur 1) wurden auf den endonukleolytischen Schnitt unter Standard-Prozessierungsbedingungen getestet. Der mit 40 % Ammoniumsulfat gefällte Extrakt wurde für 4 Stunden mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein (Spur 3) bzw. mit dem entsprechenden Präimmunserum (Spur 2) depletiert. Spuren 4 und 5 zeigen die Reaktion mit denselben Extrakten, allerdings nach 8-stündiger Depletion mit anti-Yor179c-Antikörpern, bzw. mit Präimmunserum. Die Spuren 6 und 7 zeigen eine 4-stündige Depletion, jedoch mit einer zweiten Extraktpräparation. Als Kontrollen dienten ein Antiserum (Spur 9), sowie dessen entsprechendes Präimmunserum (Spur 8) gegen das Ptf1-Protein, einer PPIase, die auf eine derartige *in vitro* Prozessierungsreaktion keinen Einfluß hat. Zusätzlich aufgetragen wurde der Extrakt eines USY3-Stammes, der ebenfalls mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein behandelt worden war (Spur 12). Spur 10 zeigt das Ergebnis der Depletion mit dem Präimmunserum und in Spur 11 ist die Reaktion mit dem unbehandelten Rohextrakt eines USY3-Stammes zu sehen. M, Molekulargewichtsstandard (1 kb-DNA-Leiter).

Dieses im Hinblick auf die Schneidefähigkeit des USY3-Stammes zunächst erstaunlich anmutende Ergebnis läßt sich durch die Annahme erklären, dass das Yor179c-Protein in einen Komplex von Proteinen integriert ist, die an der 3'-Prozessierung beteiligt sind, die jedoch mit dem Antiserum gegen das Yor179c-Protein zusammen mit diesem aus dem Extrakt entfernt wurden und nun nicht mehr zur Verfügung stehen. Da der für Yor179c-defiziente Stamm aber keinen Einfluß auf den endonukleolytischen Schnitt zeigte (Abb. 36 Spuren 5 und 6), kann dies bedeuten, dass das Yor179c-Protein zwar in einen prozessierungsaktiven Komplex eingebettet, aber für die Reaktion selbst nicht unbedingt erforderlich ist, also eine redundante Funktion innehat.

3.9.3 Inhibierung der spezifischen Polyadenylierung von vorgeschchnittener prä-mRNA in einem mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein depletierten Hefe-Ganzzellextrakt (AS-gefällt)

Als nächstes sollten die im vorherigen Versuch verwendeten Extrakte auf ihre Polyadenylierungsfähigkeit getestet werden. Wie in Abb. 37 zu sehen, konnte bereits nach 4-stündiger Depletion ein drastischer Effekt beobachtet werden. Das zu erwartende polyadenylierte Produkt ist unter diesen Bedingungen ungefähr 70 Nukleotide oberhalb des eingesetzten RNA-Transkriptes (Spur 2, Wildtyp-Extrakt) zu erkennen. In dem mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein depletierten CEN PK2-Wildtyp-Extrakt (Spur 4) ist im Gegensatz zum unbehandelten Wildtyp-Extrakt, sowie zu dem mit Präimmunserum

behandelten Extrakt (Spur 3), ein deutlich erkennbarer Rückgang des polyadenylierten Produktes zu erkennen. Anders als im Falle des endonukleolytischen Schnittes ist hier die Polyadenylierungsfähigkeit im unbehandelten USY3-Extrakt (Spur 7), sowie im USY3-Extrakt, der mit Präimmunserum (Spur 8) bzw mit anti-Yor179c-Antiserum (Spur 9) behandelt worden war, vollständig inhibiert.

Daraus wurde gefolgert, dass Yor179c ein essentieller Bestandteil des Polyadenylierungsmaschinerie ist. Er ist also Teil eines Komplexes, der, wie in der Literatur beschrieben (Zhao *et al.*, 1999), zusammen mit Proteinaktivitäten, die für einen korrekten endonukleolytischen Schnitt verantwortlich sind, verbunden ist.

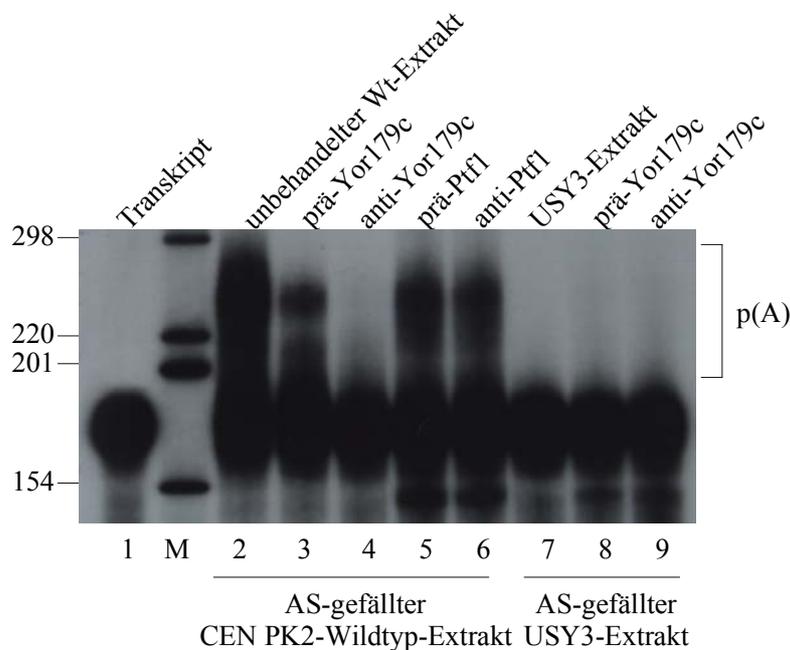


Abb. 37: Inaktivierung der spezifischen Polyadenylierungsaktivität zweier Hefe-Ganzzellextrakte, CEN PK2 und USY3 durch Immundepletionen mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein. *CYC1*-spezifische prä-mRNA-Transkripte (Spur 1) wurden auf ihre Polyadenylierungsfähigkeit unter Standardbedingungen getestet. Als Kontrolle wurde ein Wildtyp-Extrakt, der mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt worden war, (Spur 2) aufgetragen. Der Wildtyp-Extrakt wurde für 4 Stunden mit Antikörpern gegen das Yor179c-Protein (anti-Yor179c, Spur 4) sowie mit dem entsprechenden Präimmunserum (prä-Yor179c, Spur 3) depletiert. Ebenso wurde der für das Yor179c-Protein defiziente Stamm USY3 behandelt. (Spur 7, 8 und 9). Als Kontrolle diente ein Antikörper gegen das Ptf1-Protein, das nicht in diese *in vitro* Polyadenylierungsreaktion involviert ist (anti-Ptf1, Spur 6), sowie dessen Präimmunserum (prä-Ptf1, Spur 5). Der Bereich der polyadenylierten RNA [p(A)] ist gekennzeichnet. M, Molekulargewichtsstandard (1 kb-DNA-Leiter).

3.9.4 Rekonstitution der spezifischen Polyadenylierung mittels extrachromosomal exprimiertem Yor179c-Protein

Falls sich die beobachtete Inhibierung der spezifischen Polyadenylierung im Ammoniumsulfat-gefällten USY3-Extrakt tatsächlich auf die Abwesenheit des Yor179c-Proteins allein zurückführen ließe, müßte sich dieser Effekt durch exogene Zugabe von Yor179c wieder rekonstituieren lassen. Dies sollte durch die Einführung eines Expressionsplasmids pAH^+ *YOR179c* erreicht werden, in dem das *YOR179c*-Gen unter die konstitutive Kontrolle des ADH-Promotors gesetzt wurde (genaue Klonierungsstrategie siehe Anhang). Nach Transformation des Plasmids in den USY3-Stamm und Herstellung eines Proteinextraktes wurde zunächst mittels Western-Blot-Analyse untersucht, ob das Yor179c-Protein korrekt exprimiert wurde (Abb. 38, Spur 1). Als Kontrollen wurden ein Ammoniumsulfat-gefällter Extrakt des CEN PK2-Wildtyp-Stammes (Spur 3), sowie ein ebenfalls gefällter Extrakt des USY3-Stammes (Spur 2) aufgetragen. Nur in dem Ammoniumsulfat-gefällten USY3-Extrakt, der zusätzlich über das pAH^+ *YOR179c*-Plasmid verfügte, konnte eine Bande von ungefähr 21 kDa identifiziert werden, die dasselbe Laufverhalten zeigte, wie diejenige des Wildtyps.

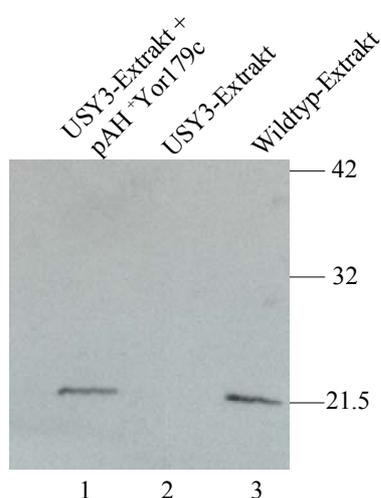


Abb. 38: Western-Blot-Analyse zur Identifizierung des Yor179c-Proteins in verschiedenen, mit 40% Ammoniumsulfat gefällten Hefe-Ganzzellextrakten. Spur 3 zeigt den zur Kontrolle aufgetragenen Extrakt eines CEN PK2 Wildtyp-Stammes. In der mittleren Spur wurde der für das Yor179c-Protein defiziente Stamm USY3 getestet. Spur 1 zeigt denselben USY3-Stamm, in den jedoch das Plasmid pAH^+ *YOR179c* transformiert wurde, welches das *YOR179c*-Gen, sowie den konstitutiv exprimierenden *ADH*-Promotor enthält. Seitlich sind die Molekulargewichte des vorgefärbten Kaleidoskop-Proteinlängenstandards in kDa angegeben.

Daraufhin wurden diese drei Extrakte in eine spezifische Polyadenylierungsreaktion eingesetzt. Wie Abb. 39 deutlich zeigt, ist ein USY3-Extrakt (Spur 3) durch die eingeführte Kopie des *YOR179c*-Gens, im Gegensatz zu einem USY3-Extrakt ohne zusätzliches

YOR179c-Gen (Spur 4), wieder in der Lage, AMP-Moleküle an vorgeschchnittene, *CYC1*-spezifische Transkripte zu addieren.

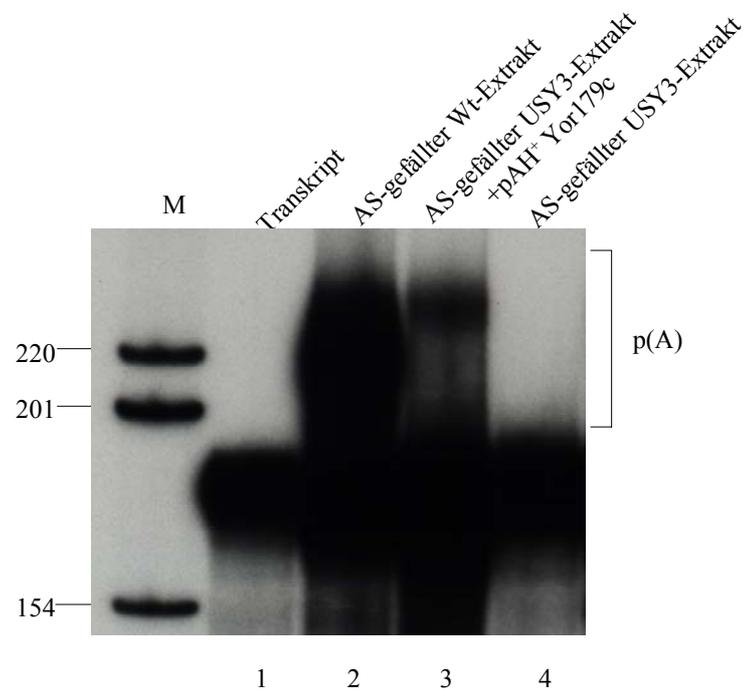


Abb. 39: Rekonstitution der Polyadenylierung eines Hefe-Ganzzellextraktes eines USY3-Stammes durch Einführung des Plasmids pAH⁺ *YOR179c*. *CYC1*-spezifische prä-mRNA Transkripte (Spur 1) wurden auf ihre Fähigkeit zur Polyadenylierung getestet. Spur 2 zeigt als Kontrolle einen CEN PK2-Wildtyp-Extrakt, der mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt wurde. Mit einem USY3-Extrakt, der für das Yor179c-Protein defizient ist, wurde ebenso verfahren (Spur 4). Der in Spur 3 verwendete USY3-Extrakt enthält im Gegensatz zu dem in Spur 4 verwendeten noch das Plasmid pAH⁺ *YOR179c*. Der Bereich der polyadenylierten mRNA [p(A)] ist angegeben. M, Molekulargewichtsstandard (1 kb-DNA-Leiter).

Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass das Yor179c-Protein tatsächlich ein Faktor des Polyadenylierungskomplexes in *S. cerevisiae* ist, wobei es innerhalb dieses Prozesses tatsächlich aktiv an der Polyadenylierungsreaktion beteiligt ist, wenn auch nur als nicht essentieller Bestandteil.

3.9.5 Test auf Anwesenheit der Poly(A)-Polymerase in einem mit Ammoniumsulfat gefällten USY3-Extrakt

Eine Inhibierung der Polyadenylierungsfähigkeit eines Hefe-Ganzzellextraktes ließe sich auch mit einem Fehlen des für diesen Vorgang verantwortlichen Enzyms, der Poly(A)-Polymerase (Pap1), erklären. Dies könnte durch einen Systemfehler bei der Präparation des

Extraktes verursacht worden sein. Dieser Fehler ist nicht sehr wahrscheinlich und wurde auch in der Literatur noch nicht beobachtet.

Um dennoch auszuschließen, dass die fehlerhafte Polyadenylierungsfähigkeit eines USY3-Extraktes durch eine mißglückte Extraktpräparation verursacht worden war, wurde die Gegenwart der Pap1 im Ammoniumsulfat-gefällten USY3-Extrakt anhand einer Western-Blot-Analyse getestet. Das Ergebnis dieser Analyse zeigt Abb. 40.

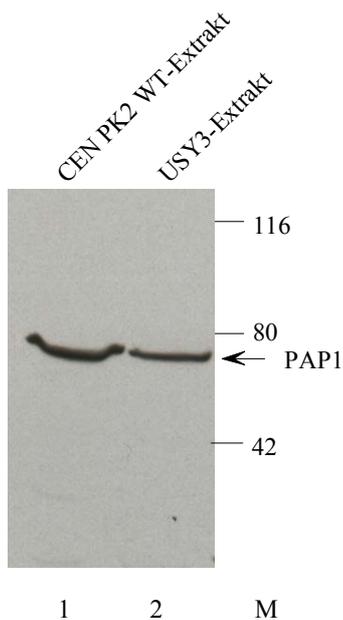


Abb. 40: Western-Blot-Analyse zur Kontrolle verschiedener Extrakte auf die Anwesenheit der Poly(A)-Polymerase mit Antikörpern gegen das Pap1-Protein. In den Spuren 1 und 2 wurden die Niederschläge einer 40 %igen Ammoniumsulfat-Fällung der Proteinextrakte eines Wildtyp- und eines USY3-Stammes, der für das *YOR179c*-Gen defizient ist, aufgetragen. M bezeichnet den Kaleidoskop-Proteinlängenstandard, dessen Fragmentgrößen seitlich in kDa angegeben sind.

Es wurde sowohl eine Wildtyp- (Spur 1), als auch eine USY3-Extraktpräparation (Spur 2) aufgetragen. Das Molekulargewicht der Poly(A)-Polymerase wird in der Literatur mit 64 kDa angegeben, was derjenigen in Abb. 41 auftretenden Bande in den Spuren 1 und 2 entspricht. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die Poly(A)-Polymerase in dem USY3-Stamm, der für das *YOR179c*-Gen defizient ist, vorhanden war.

3.9.6 *In vivo* Analyse des Polyadenylierungspotentials eines USY3-Stammes

In vitro Untersuchungen sind oft hilfreich, einen komplexen biochemischen Vorgang im Labor leichter analysieren und damit auch verstehen zu können. Allerdings können sie nicht den Anspruch erheben, ein korrektes Bild des realen, in der Natur ablaufenden biochemischen Vorgangs wiederzugeben. Dies wurde zum Anlaß genommen, die bisher

erzielten Ergebnisse auch *in vivo* zu analysieren. Mit dieser Untersuchung sollten subtilere Effekte beobachtet werden können. Falls das Yor179c-Protein tatsächlich ein essentieller Faktor der Polyadenylierung wäre, sollte man dessen Einfluß auch anhand der Poly(A)-Schwanzlänge von RNA-Molekülen, die aus Hefe isoliert worden waren, erkennen können.

Um polyadenylierte mRNA *in vivo* untersuchen zu können, muß zuerst Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae* isoliert werden. Diese wird an ihrem 3'-Ende radioaktiv markiert und anschließend durch Ribonuklease A abgedaut (Brown *et al.*, 1996). Diese hydrolysiert spezifisch die einem Pyrimidin folgende Phosphodiester-Bindung. Daher bleibt, neben einigen anderen kurzen Oligonukleotiden, nur der polyadenylierte Anteil der mRNA zurück. Dieser wird über ein hochprozentiges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die einzelnen Adeninbausteine präsentieren sich auf der Autoradiographie wie eine Leiter (Abb. 41).

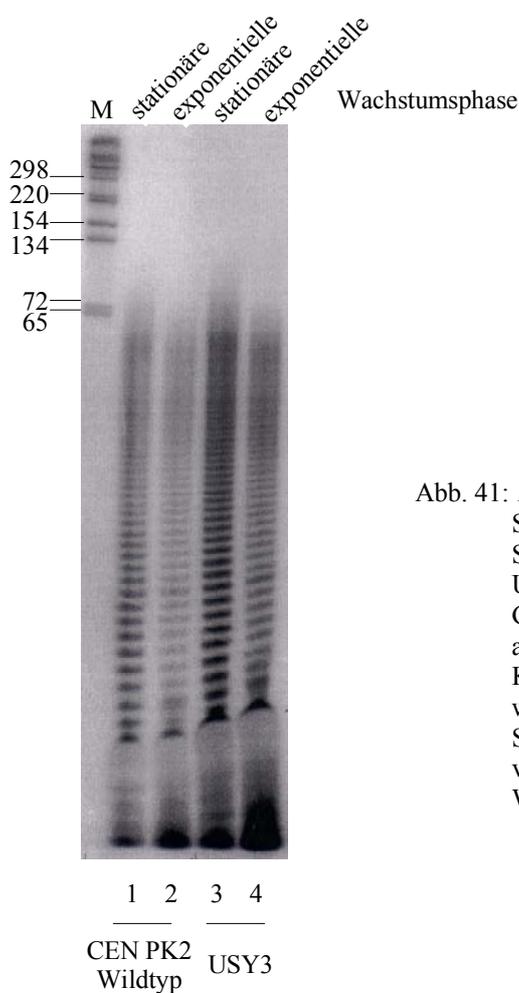


Abb. 41: *In vivo* Experiment zur Analyse der Poly(A)-Schwanzlängen. Es wurde die Gesamt-RNA des Wildtyp-Stammes CEN PK2 (Spuren 1 und 2), sowie diejenige des USY3-Stammes (Spuren 3 und 4), der für das *YOR179c*-Gen defizient ist, auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die mRNA der Spuren 1 und 3 stammt aus Kulturen, die sich in der stationären Phase befanden und wurde bei einer OD_{600} von 1,2 isoliert; die mRNA der Spuren 2 und 4 wurde aus Kulturen isoliert, die eine OD_{600} von 0,4 besaßen, sich also in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. M, 1 kb-DNA-Leiter.

In den Spuren 2 und 4 wurde Gesamt-RNA aus Kulturen eines CEN PK2-Wildtyp-Stammes sowie eines USY3-Stammes aufgetragen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Bei den beiden anderen Spuren handelt es sich ebenfalls um diese zwei Stämme, die jedoch bereits die stationäre Phase des Wachstums erreicht hatten.

Wie deutlich in Abb. 41 zu erkennen ist, kann der USY3-Stamm auch ohne das Yor179c-Protein Adenosinreste an mRNA addieren. Auffällig ist jedoch der Unterschied in den Intensitäten der beiden Adenosinleitern. Diese Divergenz ist sowohl während der exponentiellen, als auch bei den Poly(A)-Schwänzen, die sich bei Isolierung in der stationären Wachstumsphase befanden, zu beobachten.

3.9.7 Rekonstitution der spezifischen Polyadenylierung mittels des Überstandes einer Ammoniumsulfatfällung des USY3-Stammes

Alle bisherigen *in vitro* Versuche, den endonukleolytischen Schnitt und die Polyadenylierung betreffend, wurden mit Extrakten durchgeführt, die zuvor mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt worden waren. Die Ammoniumsulfatfällung eines Hefe-Ganzzellextraktes führt zu einer ersten Fraktionierung: Es werden dabei alle an der mRNA-3'-Prozessierung beteiligten Faktoren gefällt und Aktivitäten, die diesen Vorgang destabilisieren könnten, gelangen in den Überstand der Fällung (Butler *et al.*, 1990). Es könnte nun aber sein, dass im Falle des USY3-Extraktes, Faktoren die *in vivo* kompetitieren, durch diese Fällung getrennt werden. Anders als im Wildtyp gelangen die für eine Polyadenylierungsreaktion essentiellen Faktoren dann nicht mehr in den Ammoniumsulfat-Niederschlag. Deshalb wurde versucht, sowohl einen unbehandelten Rohextrakt, als auch einen gefällten Extrakt, der mit „seinem“ Ammoniumsulfatüberstand vereinigt worden war, auf ihre Polyadenylierungsfähigkeit zu untersuchen. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Abb. 42.

Erstaunlicherweise ist der USY3-Rohextrakt (Spur 2) - im Gegensatz zu dem mit Ammoniumsulfat gefällten USY3-Extrakt (Spur 3) - in der Lage, das Transkript zu polyadenylieren und zwar mit vergleichbarer Effizienz wie ein Wildtypextrakt (Spur 1). Die weiteren Spuren zeigen das Ergebnis der Rekonstitutionsversuche mit verschiedenen Ammoniumsulfatüberständen.

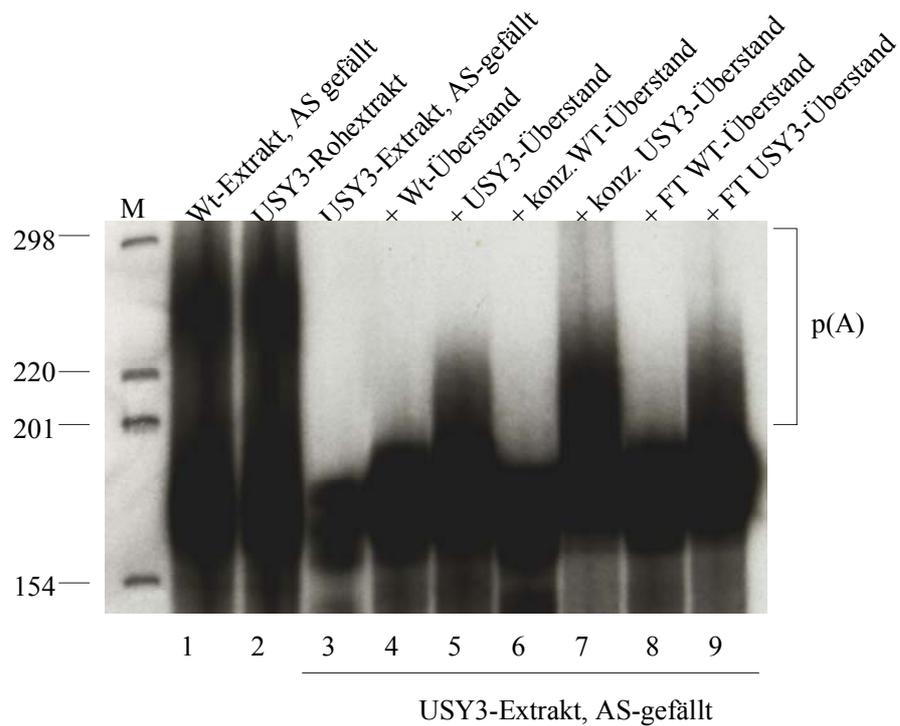


Abb. 42: Rekonstitution der spezifischen Polyadenylierung von vorgeschchnittener *CYC1*-spezifischer prä-mRNA in einem USY3-Rohextrakt, der mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt wurde. Die vorgeschchnittene mRNA (Transkript) wurde auf spezifische Polyadenylierung getestet. Als Kontrolle diente ein CEN PK2 Wildtyp-Stamm (Spur 1), der ebenfalls mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt wurde. Auch ein USY3-Rohextrakt (nicht AS-gefällt, Spur 2) wurde untersucht. Spur 3 zeigt denselben Rohextrakt, nach Fällung mit Ammoniumsulfat. Die folgenden Spuren 4-9 beinhalten ebenfalls diesen Ammoniumsulfat-gefällten USY3-Extrakt, allerdings wurde diesem zusätzlich der Überstand einer Ammoniumsulfatfällung eines Wildtyp- (Spur 4) respektive eines USY3-Extraktes beigemischt (Spur 5). Diese Überstände wurden außerdem über eine Säule konzentriert (konz. WT-Überstand, Spur 6; konz. USY3-Überstand, Spur 7), wobei auch der erhaltene Durchlauf (Flow through, FT-Wt-Überstand, Spur 8; FT-USY3-Überstand, Spur 9) getestet wurde. M, 1 kb-DNA-Leiter

Zum Vergleich wurde auch der Überstand einer Wildtyp-Fällung in das Experiment mit einbezogen. Diese Überstände wurden auf den Verdacht hin, zu stark verdünnt zu sein, mit Hilfe einer Ultrafiltrationssäule konzentriert. Es wurden sowohl der unbehandelte Überstand (Spuren 4 und 5), das Konzentrat (Spuren 6 und 7), sowie der Durchlauf (Flow through, Spuren 8 und 9) zu einem Reaktionsansatz mit gefällttem USY3-Extrakt hinzugefügt. Im Gegensatz zu den verschiedenen Wildtyp-Überständen (Spuren 4, 6 und 8) sind nur die USY3-Überstände (Spuren 5, 7 und 9) in der Lage, die Polyadenylierungsfähigkeit des Ammoniumsulfat-gefällten USY3-Extraktes zu rekonstituieren.

3.9.8 Identifizierung des Polyadenylierungsfaktors Fip1 als Interaktionspartner von Yor179c

Mit dem vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe allein der USY3-Überstände einer Ammoniumsulfatfällung zu ihrem Niederschlag die Polyadenylierungsaktivität wieder hergestellt werden kann. Dieser Befund ist konsistent mit der Annahme, dass einer der für die Polyadenylierung essentiellen Faktoren (ungewöhnlicherweise) im Überstand verbleibt. Die Tatsache, dass der USY3-Stamm nur ein Defizit in der Polyadenylierung, nicht aber hinsichtlich des endonukleolytischen Schnittes aufwies, grenzte die Suche nach dem potentiellen Interaktionspartner auf Polyadenylierungsfaktoren, die nicht am Schnitt beteiligt sind, ein. Auch die Poly(A)-Polymerase schied als Interaktionspartner aus, denn diese konnte im Ammoniumsulfatgefällten USY3-Extrakt eindeutig nachgewiesen werden (Abschnitt 3.8.5). Es standen also noch drei reine Polyadenylierungsfaktoren als mögliche Interaktionspartner zur Auswahl: Pab1, Fip1, Pfs1. Da Antikörper gegen das Fip1-Protein im Labor zur Verfügung standen, wurde zunächst eine Western-Blot-Analyse mit diesem Antiserum durchgeführt.

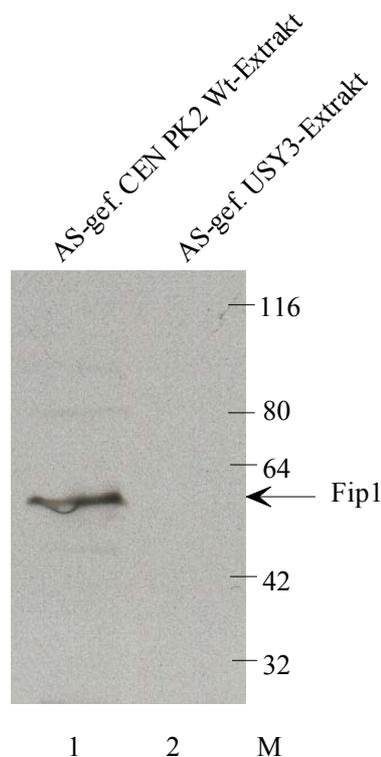


Abb. 43: Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen das Fip1-Protein. Aufgetragen wurde der Niederschlag eines mit 40 % Ammoniumsulfat gefällten Extraktes des Wildtyps CEN PK2 (Spur 1), sowie das Präzipitat eines ebenfalls mit 40 % Ammoniumsulfat gefällten Extraktes des USY3-Stammes (Spur 2). Die Molekulargewichte des vorgefärbten Kaleidoskop-Proteinmarkers (M), sind seitlich in kDa angegeben.

Abb. 43 zeigt den Western-Blot, der mit einem anti-Fip1-Antikörper durchgeführt wurde. Als Kontrolle wurde ein CEN PK2-Wildtyp-Extrakt verwendet (Spur 1). In Spur 2 wurde der mit 40 % Ammoniumsulfat gefällte USY3-Extrakt aufgetragen. Nur in dem CEN PK2-Wildtyp-Extrakt ist eine Bande von ungefähr 50 kDa zu erkennen, die dem Fip1-Protein entspricht, dessen Molekulargewicht 35 kDa beträgt, welches aber ein apparentes Laufverhalten von 55 kDa zeigt (Zhao *et al.*, 1999). Dies legte die Vermutung nahe, dass Fip1 ein weiterer Interaktionspartner ist, der nur durch Vermittlung von Yor179c in den Prozessierungskomplex aufgenommen und mit diesem gefällt werden kann.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde eine Coimmunpräzipitation mit *in vitro* translatierten Proteinen durchgeführt. Für die *in vitro*-Translation in einem Retikulozytenlysat und gleichzeitige radioaktive Markierung mit der Aminosäure ^{35}S -Methionin, wurden die im Lauf dieser Arbeit hergestellten Expressionsplasmide pET15b *FIP1* und pET15b *YOR179c* verwendet, mit deren Hilfe die Expression der rekombinanten Proteine mit einem aminoterminal angefügten Hexahistidinrest erfolgte. Zur Überprüfung des korrekten Molekulargewichtes der *in vitro* translatierten Proteine wurden diese über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend via Autoradiographie analysiert (Abb. 44).

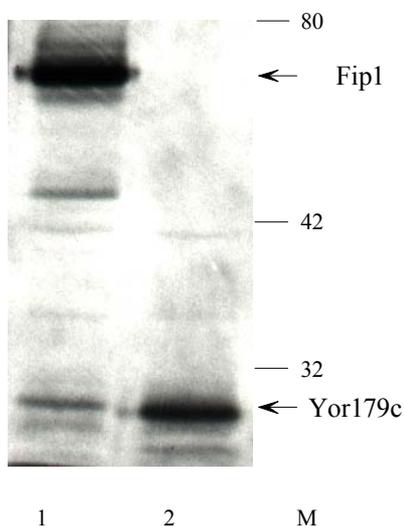


Abb. 44: SDS-Polyacrylamidgel der *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Proteine Fip1 (Spur 1), sowie Yor179c (Spur 2), deren korrespondierende DNA-Sequenz in den Expressionsvektor pET15b kloniert worden waren. Die erwarteten Fragmentgrößen betragen für das Fip1-Protein 55 kDa, für das Yor179c-Protein 21 kDa. M bezeichnet den Kaleidoskop-Proteinlängenstandard, dessen Fragmentgrößen in kDa seitlich angegeben sind.

Die berechneten Molekulargewichte für die *in vitro* translatierten Proteine stimmten mit den beobachteten Größen überein. Zusätzlich wurden beide Proteine für die anschließende Coimmunpräzipitation auch noch ohne Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin translatiert. Dieser Versuch wurde analog der Coimmunpräzipitation, die in Kapitel 3.8

beschrieben wurde, durchgeführt. An Stelle des *in vitro* translatierten Brr5-Proteins, wurde nun das Fip1-Protein verwendet. Die veränderte Situation wird in Abb. 45 nochmals schematisch dargestellt.

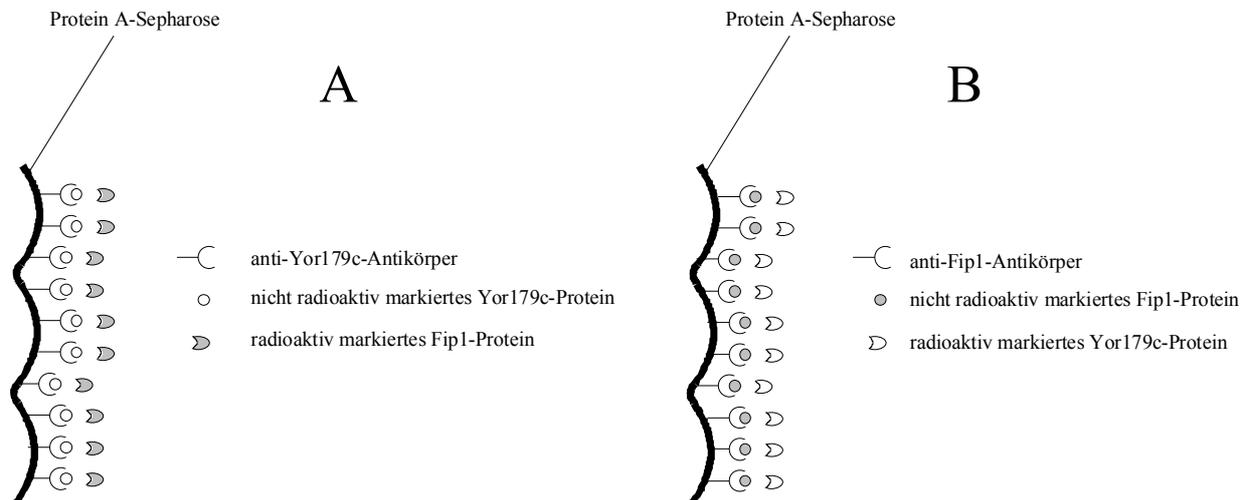


Abb. 45: Schematische Darstellung der Coimmunpräzipitation.

- A) Nachweis der Yor179c- Fip1-Interaktion: An das Säulenmaterial Protein A-Sepharose wurde der polyklonale anti-Yor179c-Antikörper gekoppelt. Nach Bindung des nicht radioaktiv markierten Yor179c-Proteins an diesen Komplex wurde dieser mit dem durch ^{35}S -Methionin radioaktiv markiertem Fip1-Protein inkubiert.
- B) Hier wurde der polyklonale anti-Fip1-Antikörper an Protein A-Sepharose gekoppelt. Nach Bindung von *in vitro* translatiertem Fip1 an diesen Komplex, wurde dieser mit radioaktiv markiertem Yor179c-Protein inkubiert.

Ein Antikörper gegen das Yor179c-Protein wurde über seine Fc-Region an Protein A-Sepharose gebunden. Hieran wurde das nicht radioaktiv markierte Yor179c-Protein gekoppelt. Das zugegebene radioaktiv markierte Fip1-Protein sollte als potentieller Interaktionspartner an diesen Komplex binden. Dieses Experiment wurde ebenfalls in umgekehrter Reihenfolge mit einem anti-Fip1-Antikörper, nicht radioaktiv markiertem Fip1, sowie dem mit radioaktivem ^{35}S -Methionin markiertem Yor179c-Protein wiederholt. Das autoradiografierte SDS-PAGE-Gel der durchgeführten Coimmunpräzipitation zeigt Abb. 46. Zur besseren Kontrolle der Molekulargewichte wurden die bereits in Abb. 44 gezeigten *in vitro* translatierten Proteine in den Spuren 1 und 6 nochmals aufgetragen. Um zu kontrollieren, ob das radioaktiv markierte Yor179c- bzw. das radioaktiv markierte

Fip1-Protein bereits unspezifisch an das Säulenmaterial binden, wurde Protein A-Sepharose mit radioaktiv markiertem Yor179c, respektive mit radioaktiv markiertem Fip1 inkubiert und dieser Reaktionsansatz aufgetragen (Spuren 2 und 7). Als weitere Negativkontrolle wurde die Coimmunpräzipitation auch mit den entsprechenden Präimmunsereen durchgeführt (Spur 3, prä-Yor179c; Spur 8, prä-Fip1). Wie man Abb. 46 entnehmen kann, konnte hier keine Bande detektiert werden. Deutlich ist jedoch eine Bande in Höhe des *in vitro* translatierten Fip1-Proteins in den Spuren 4 und 5 zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass die beiden Proteine zumindest *in vitro* interagieren. Die beiden Reaktionsansätze, die in den Spuren 4 und 5 aufgetrennt wurden, unterscheiden sich nur durch den Einsatz unterschiedlicher Mengen an Antikörper. Auch im umgekehrten Fall konnte das radioaktiv markierte Yor179c-Protein an Fip1 gekoppelt werden (Spuren 9 und 10).

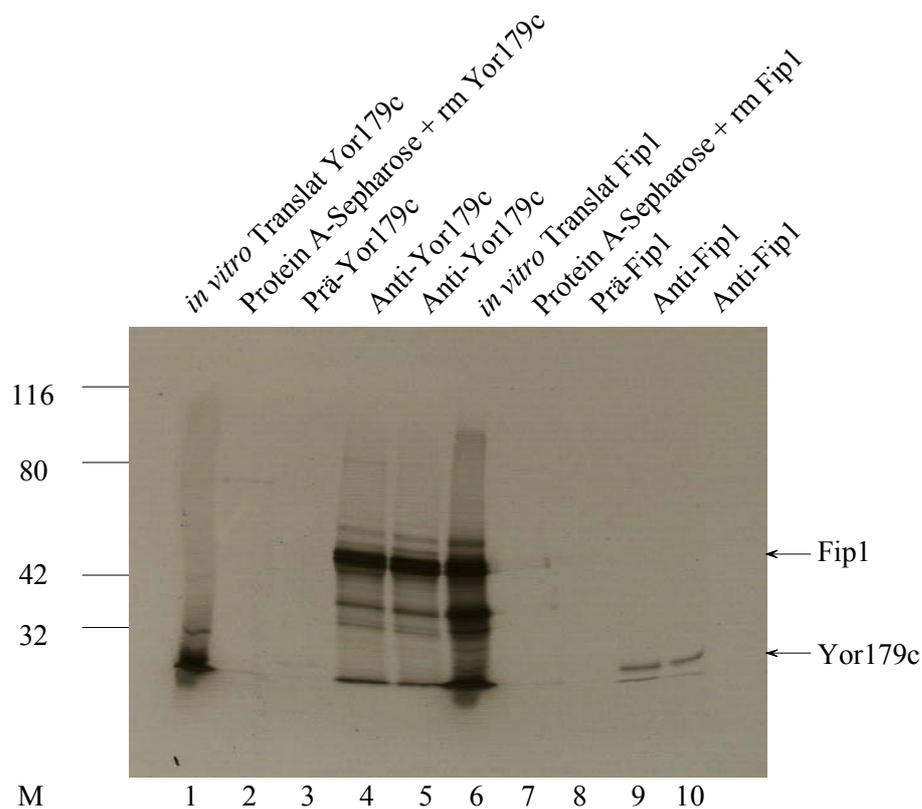


Abb. 46: Coimmunpräzipitation des Fip1- bzw. des Yor179c- Proteins durch Antikörper gegen das Yor179c- bzw. gegen das Fip1-Protein. Nicht-radioaktiv-markiertes, *in vitro* translatiertes Yor179c-Protein wurde an eine Protein A-Sepharose-Säule gekoppelt, die zuvor mit Yor179c-spezifischem Antiserum (Spur 4, 5 µl; Spur 5, 50µl) oder mit dem entsprechenden Präimmunsereum (Spur 3) beladen worden war. Nach Zugabe des radioaktiv markierten, ebenfalls *in vitro* translatierten Polyadenylierungsfaktors Fip1 wurde das Affinitätsäulenmaterial abgetrennt und in 5x SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Das über das Yor179c-Protein an die Säule gebundene Fip1-Protein wurde von der Säulenmatrix eluiert, über ein SDS-Polyacrylamidgel (12 %) aufgetrennt und anschließend via Autoradiographie analysiert. In Spur 2

wurde eine Kontrolle aufgetragen, bei der das Säulenmaterial zusammen mit dem radioaktiv markierten Fip1-Protein inkubiert wurde. Die Spuren 6-10 zeigen denselben Versuch, jedoch wurde hier das *in vitro* translatierte Fip1-Protein an die Säulenmatrix, die zuvor mit dem entsprechenden Prä-(Spur 8), bzw. dem Antiserum (Spuren 9 und 10, 5 µl bzw 50 µl Antiserum) behandelt worden war, gebunden und anschließend mit dem radioaktiv markierten Yor179c-Protein inkubiert. In den Spuren 1 und 6 wurden die *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Proteine zur Kontrolle der Fragmentgrößen aufgetragen (Spur 1, Yor179c \approx 21 kDa; Spur 6, Fip1 apparentes Molekulargewicht von 55 kDa). M bezeichnet den Kaleidoskop-Proteinlängenstandard, der durch Übereinanderlegen des Röntgenfilms mit dem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel lokalisiert wurde, rm steht für radioaktiv markiert.

Dieser Nachweis einer Protein-Protein-Wechselwirkung von Yor179c mit Fip1, belegt, dass das Yor179c-Protein ein bisher nicht beschriebener, allerdings redundanter mRNA-3'-Prozessierungsfaktor in *S. cerevisiae* ist, der in einem Komplex, assoziiert an das Fip1- und/oder das Brr5-Protein, vorliegt.

4 Diskussion

4.1 Homologievergleich von mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren in *S. cerevisiae* und höheren Eukaryonten

In den letzten Jahren ist wiederholt gezeigt worden, dass die mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und höherer Eukaryonten erstaunlich hohe Sequenzhomologien aufweisen (Preker *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997; Barabino *et al.*, 1997). Trotz vieler funktioneller Gemeinsamkeiten bei der Bildung der mRNA-3'-Enden in *S. cerevisiae* und Säugetieren ist diese hohe strukturelle Konservierung der trans-agierenden Faktoren doch überraschend, da sich die Signalsequenzen der prä-mRNA (cis-agierende Faktoren) innerhalb dieser beiden Arten stark unterscheiden. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte ein trans-agierender Faktor, das Cft1-Protein, als strukturhomolog zu der größten Untereinheit des „Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor“ (CPSF) der Säugetiere identifiziert werden. Diese Untereinheit ist in Säugerzellen für die Erkennung der hochkonservierten AAUAAA-Sequenz verantwortlich (Jenny *et al.*, 1994; Keller *et al.*, 1991), die in Hefe jedoch nicht konserviert ist und, sofern vorhanden, nur in vereinzelt Genen eine Bedeutung besitzt. Daher mußte angenommen werden, dass neben den homologen Proteinfaktoren noch weitere, jedoch speziesspezifische Aktivitäten an der mRNA-3'-Prozessierung beteiligt sind. In *S. cerevisiae* hat beispielsweise der „Cleavage and Polyadenylation Factor IB“ (CF IB), der nur über eine einzige Untereinheit (Hrp1) verfügt, kein homologes Gegenstück in höheren Eukaryonten (Kessler *et al.*, 1997). Auch der Prozessierungsfaktor Pta1, der ebenso wie Hrp1 ein essentielles Protein in der Hefe darstellt und eine Untereinheit des „Cleavage and Polyadenylation Factor II“ (CF II_y wobei „y“ das englische „yeast“ bezeichnet, im Unterschied zum Säugersystem, welches das Suffix „m“ für „mammals“ aufweist) ist, zählt hierzu (O'Connor und Peebles, 1992). Ebenso sind im Säugersystem Faktoren bekannt, die an der 3'-Prozessierung beteiligt sind, denen jedoch kein entsprechendes Protein in der Hefe zugeordnet werden kann. So finden sich keine homologen Entsprechungen für alle drei Untereinheiten des „Cleavage Factor I_m“ (Ruegsegger *et al.*, 1996; Ruegsegger *et al.*, 1998).

Um weitere homologe mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren zu identifizieren, wurde eine Datenbanksuche mit den Aminosäuresequenzen aller bis dahin bekannten

3'-Prozessierungsfaktoren aus *S. cerevisiae* durchgeführt. Auf diese Weise wurde ein offener Leserahmen gefunden, YOR179c, der eine auffallende Ähnlichkeit über beinahe den gesamten Sequenzbereich zu dem 3'-Prozessierungsfaktor Brr5 aufwies (37,1 % Identität, 52 % verwandte Aminosäuren), jedoch keine Entsprechungen in höheren Eukaryonten zeigte (eine kürzlich wiederholte Datenbank-Suche bestätigte die Tatsache, dass bis zu diesem Zeitpunkt noch keine weiteren sequenzähnlichen Proteine zu YOR179c gefunden werden konnten). Brr5 („bad response to refrigeration“) wurde ursprünglich bei einem genetischen Screening entdeckt, das zum Ziel hatte, Proteine, die in den Spleißvorgang von prä-mRNA involviert sind, zu identifizieren (Noble und Guthrie, 1996). Im gleichen Jahr konnte von derselben Arbeitsgruppe dann auch die Beteiligung des Brr5-Proteins an der mRNA-3'-Prozessierung und die Homologie zu der 73 kDa-Untereinheit von CPSF aufgedeckt werden (Chanfreau *et al.*, 1996; Jenny *et al.*, 1996). Ein weiteres Element von CPSF und zwar die 100 kDa-Untereinheit ist „überraschenderweise“ (Wahle und Ruegsegger, 1999) ebenfalls zu dieser 73 kDa-Untereinheit homolog.

Damit stellte sich also die Frage, ob man anhand von Sequenzhomologien zweier Hefeproteine eine Aussage über deren gemeinsame Beteiligung im gleichen biologischen Prozeß treffen kann - ähnlich der Funktionen der homologen 73 und 100 kDa-Untereinheiten von CPSF in Säugetierzellen - oder ob diese Ähnlichkeiten nur zufällig auftreten.

Die Ergebnisse der Datenbankanalyse zeigten, dass die Ähnlichkeit der Yor179c- zur Brr5-Proteinsequenz sich nur auf die C-terminalen 200 Aminosäuren des Brr5-Proteins beschränkte. Die N-terminalen 500 Aminosäuren sind hingegen zu der oben bereits erwähnten 73 kDa-Untereinheit von CPSF homolog (Chanfreau *et al.*, 1996). Ein ähnliches Phänomen ist bereits bei der Identifizierung der Hefe-Poly(A)-Polymerase beschrieben worden. Auch hier ist nur der N-terminale Bereich zum Rinder-Äquivalent zu 47% identisch, wohingegen die C-terminalen Regionen der beiden Enzyme nicht verwandt sind. Lingner vermutete, dass eben diese C-terminalen Bereiche Interaktionsdomänen für nicht-konservierte Faktoren sein könnten, die für die Spezifität der Poly(A)-Polymerase verantwortlich sind (Lingner *et al.*, 1991b; Raabe *et al.*, 1991).

4.2 Strukturelemente des Yor179c-Proteins

Mit Hilfe eines Domänensuchprogramms konnte sowohl im Brr5-, als auch im Yor179c-Protein am äußersten C-Terminus ein „p-loop“-Motiv sowie eine charakteristische Anhäufung von vier Leucinresten, die dem „Leucin-Zipper“ DNA-bindender Transkriptionsfaktoren gleicht, identifiziert werden. Dieses Strukturelement setzt sich aus einer basischen Domäne, bestehend aus mehreren Arginin- und Lysinresten, die die Bindungsstelle mit der DNA bilden, sowie mindestens vier Leucinresten, die im Abstand von jeweils sechs anderen Aminosäuren auftreten, zusammen. Aufgrund dieser Aminosäuresequenz bildet sich eine α -Helix aus, wobei die Leucin-Reste als hydrophobe Seitenketten auf einer Seite konzentriert sind. Dieser hydrophobe Bereich stellt die Kontaktfläche zwischen den beiden Proteinen dar, wobei sich theoretisch Homo- oder Heterodimere ausbilden können. In Tabelle 3 sind die Aminosäuresequenzen verschiedener Transkriptionsfaktoren mit ihren typischen Leucin-Anhäufungen, die einen Leucin-Zipper bilden, aufgelistet. Zum Vergleich wurden die Sequenzen von Yor179c und Brr5 eingefügt.

Quelle	Protein	Aminosäure-Sequenz		
		DNA-bindender Bereich	Bindeglied aus 6 AS	Leucin-Zipper
Säuger	JUN	SQERIKAEER KKRM RIAA SKCR KK	LERIAR	LEEKVKT L LKAQNS E LASTAN M LTEQVA Q L K Q
	FOS	EERRRIRRT RRER KMAAA KCR NR	RELTDT	LQAETD Q LEDKK S AL Q TEIAN L LLKEKE L E F
	CREB	AARKREV RLM K RE AA RECR KKK	EYVKC	LENRVAV L ENQ N KT L IEEL K AL K LDLY C H K
	C/EBP	RRER NNIK V KS R DKAK Q FN V ET	QQKVLE	LTSDND R LRKR L EQ L S R ELDT L RGI F R Q L
Hefe	Gcn4	PESSDPAAL KRA R TE AAR RS RA RK	LQRMQ	LEDK V E L L S KN Y H L ENE V AR L KK L V G ER
Konsensus-Molekül		RR R R R R		L L L L L
Oder		KK K K K K		
	Brr5	DEYAS N KEETITGVV TIG STAK	FNNMKI	LECNS N PL K GR V ES L LNIG G N L GT P LC
	Yor179c	IDE G IK K EN V K G SV TIG SK	FSTMKL	IDCNS N PL K GR V ES I LSIG Q K L TT P LC

Abb. 47: Vergleich der Aminosäuresequenzen mehrerer Transkriptionsfaktoren mit Yor179c und Brr5. In Rot hervorgehoben sind die Leucin-Reste, die ein Leucin-Zipper-Motiv bilden. In diesem Dimerisierungsbereich ist an jeder siebten Stelle ein Leucin-Rest lokalisiert. Eine basische Domäne, an der die DNA-Bindung erfolgt, enthält eine Gruppe von Lysin (K)- und Arginin (R)-Resten (blau). Ein invariantes Asparagin wurde grün unterlegt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Sequenzen des Brr5- und Yor179c-Proteins ebenfalls aufgelistet worden.

Während die Leucin-Reste im Brr5-Protein exakt wie in der Literatur gefordert an jeder siebten Stelle auftreten, tritt im Yor179c-Protein an dessen Stelle ein mit Isoleucin alternierendes Motiv auf. Eine derartige Abweichung von der üblichen Sequenz ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Landschulz geht davon aus, dass ein Isoleucin-Rest sterisch zu groß für die korrekte Verknüpfung eines Leucin-Zippers ist (Landschulz *et al.*, 1988). Neuere Daten konnten aber seine Ansicht widerlegen, dass die Leucin-Reste ineinandergreifen (daher auch der Name „Zipper“ = Reißverschluss). Vielmehr legen sich die Leucin-Reste Seite an Seite und die α -Helices winden sich umeinander (s. Abb. 48, nach Lehninger/Nelson/Cox, „Prinzipien der Biochemie“ und (McKnight, 1991).

Die Existenz eines Strukturmotivs, das in DNA-bindenden Proteinen gefunden wurde, erscheint innerhalb der Sequenz eines potentiellen mRNA-3'-Prozessierungsfaktors auf den ersten Blick als nicht sinnvoll. Zu bedenken ist jedoch, dass ein weiteres DNA-bindendes Strukturmotiv, der „Zinkfinger“, sowohl im Zusammenhang mit DNA-, als auch RNA-Bindung erwähnt wurde (Theunissen *et al.*, 1992). In neuesten Untersuchungen wurde außerdem das hnRNP C-Protein welches über ein „Leucin-Zipper-ähnliches“ Motiv verfügt, als ein Tetramer identifiziert, welches an RNA bindet (Shahied *et al.*, 2001; Tan Jh *et al.*, 2001). Allerdings wurde in dieser Struktur eine ausgedehnte RNA-bindende Domäne gefunden. UV-crosslinking-Experimente, die eine Bindung von Brr5 oder Yor179c mit der RNA bestätigen sollten, zeigten allerdings kein positives Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Derartige Protein-RNA-Bindungen sind jedoch – wie im Säugersystem an der CPSF160-Untereinheit beispielhaft gezeigt - meist allein nicht stabil und nur sehr schwach ausgeprägt (Murthy und Manley, 1995), erst durch Interaktion des Proteins mit weiteren Proteinen, in oben erwähntem Beispiel mit CstF-77, wird die RNA-Bindung stabilisiert (Murthy und Manley, 1992).

Es könnte sich bei dieser ungewöhnlichen Anhäufung von Leucinresten aber auch um eine reine Protein-Protein-Interaktionsdomäne handeln, in der das entstandene Heterodimer keine zusätzliche Nukleinsäure-bindende Funktion aufweist. Mögliche Interaktionspartner wären zum einen das sequenzähnliche Brr5-Protein, sowie der 3'-Prozessierungsfaktor Pcf11, der ebenfalls über ein Leucin-Zipper-Motiv verfügt. Ein durchgeführter two-hybrid-screen, der potentielle Bindungspartner von Yor179c identifizieren sollte, war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Eine Coimmunpräzipitation hingegen mit *in vitro* translatiertem Brr5 und Yor179c zeigte, daß diese beiden Proteine tatsächlich *in vitro* interagieren können. Dies

wurde durch Coimmunpräzipitation eines mit 40 % Ammoniumsulfat gefällten Hefeganzzellextraktes bestätigt. Eine Suche nach potentiell synthetisch letalen Interaktoren könnte Aufschluß über die tatsächliche *in vivo* Situation geben.

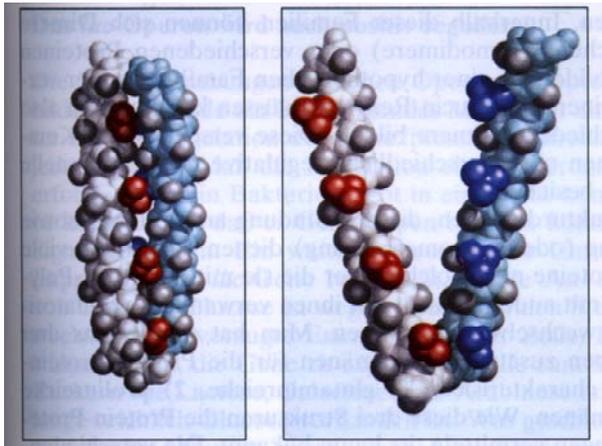


Abb.: 48 Kalottenmodell des Leucin-Zippers aus dem Aktivatorprotein Gen4 aus *S. cerevisiae*.

- A) Es sind nur die von verschiedenen Untereinheiten des dimeren Proteins stammenden α -Helices mit den „Reißverschlußhälften“ (weiß und hellblau) gezeigt. Die miteinander wechselwirkenden Leucin-Reste sind rot und dunkelblau. Alle anderen Seitenketten der Aminosäuren sind als graue Kugeln dargestellt, um die Leucin-Leucin-Wechselwirkungen herauszustellen.
- B) In dieser Darstellung wurde der in A) gezeigte Reißverschluß geöffnet, um die Anordnung der Leucin-Reste in jeder α -Helix sichtbar zu machen.

(Nach Lehninger/Nelson/Cox, „Prinzipien der Biochemie“)

Natürlich ist es keineswegs sicher, dass es sich im vorliegenden Fall um echte Leucin-Zipper handelt. Dennoch ist es bemerkenswert, dass eine Brr5-Deletionsmutante, bei der die letzten 30 Aminosäuren (und damit dieses Motiv) fehlten, nicht in der Lage war, den letalen Phänotyp eines Brr5-defizienten Stammes aufzuheben.

Die ebenfalls durch Domänensuche identifizierte potentielle „p-loop“-Domäne stellt ein ATP- bzw. GTP-bindendes Motiv dar. P-loop-Domänen sind in sieben Proteinfamilien anzutreffen, beispielsweise sind dies die Familie der G-Proteine (Takai *et al.*, 1992), die, membranständig, unter ATP-Verbrauch an Signalübertragungswegen der Zelle beteiligt sind, sowie verschiedene Protein-Kinasen. Anhand von Mutationen innerhalb der potentiellen p-loop-Domäne des Brr5-Proteins, konnte die konservierte Aminosäure Threonin als essentiell für die Hefe *S. cerevisiae* identifiziert werden. Nach Substitution derselben durch die Aminosäure Valin konnte das so entstandene Brr5Mut3-Protein seine Funktion innerhalb der Zelle nicht mehr ausüben, es resultierte ein letaler Phänotyp. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte eine möglicherweise an der freien Hydroxylgruppe des Threonins stattfindende Phosphorylierung sein, die für dessen Funktionsweise notwendig ist. Kein negativer Effekt auf das Hefewachstum konnte allerdings bei Mutation der Aminosäure

Lysin, die befähigt ist, Wasserstoffbrückenbindungen zu den β - bzw γ -ständigen Phosphatgruppen des Adenosin- oder Guanosintriphosphats einzugehen (Saraste *et al.*, 1990) und die in p-loop-Domänen aller bisher beschriebenen Proteine hoch konserviert ist, beobachtet werden. Es wurde allerdings nur auf einen Wachstumsphänotyp getestet. Mutationsstudien in höheren Organismen zeigten in diesem Zusammenhang ebenfalls keine negativen Auswirkungen auf das Überleben des jeweiligen Organismus (Reinstein *et al.*, 1990; Tian *et al.*, 1990). Eine Mutation dieser Aminosäure innerhalb der p-loop-Domäne des p21 ras-Proteins zeigte lediglich eine reduzierte Affinität zu Guanosintriphosphat (Sigal *et al.*, 1986). Experimente, die möglicherweise auf eine eingeschränkte Polyadenylierung hinweisen konnten, wurden nicht durchgeführt. Aus diesem Grund sind weitere Studien, insbesondere die Bindung von Nukleotiden an dieses potentielle p-loop-Motiv betreffend, nötig.

4.3 Mutationsexperimente zur Identifizierung essentieller Bereiche innerhalb des *BRR5*-Gens

Wie in Abschnitt 4.1 bereits erwähnt, zeigt nur der C-terminale Bereich des Brr5-Proteins zu Yor179c Sequenzähnlichkeiten. Andererseits sind die N-terminalen 500 Aminosäuren homolog zu einem Vertebraten-Protein, der 73 kDa-Untereinheit von CPSF. Es stellte sich die Frage, inwieweit eine hohe Konservierung der Primärstruktur auch mit einer „homologen“ Funktionsweise der betreffenden Proteine einhergeht. Im Hefesystem kann diese Fragestellung sehr einfach getestet werden. Hierzu wird das heterologe Gen, das für das zu untersuchende Protein codiert, in einen Hefestamm eingebracht, der für das homologe Wirtsgen defizient ist und einen erkennbaren Phänotyp aufweist. Wird durch die Manipulation dieser Phänotyp komplementiert, ist die funktionelle Übereinstimmung des heterologen Genprodukts nachgewiesen. Für Brr5 und die 73 kDa-Untereinheit von CPSF ist dies bereits versucht worden (Jenny *et al.*, 1996). In diesem Fall konnten jedoch weder das aus einem Rinder-Proteinextrakt isolierte 73 kDa-Protein alleine noch Hybridkombinationen zwischen diesem und Brr5 das Wildtypprotein ersetzen. Auch eine C-terminal verkürzte Form von Brr5 war dazu nicht in der Lage. Jenny und Mitarbeiter schlossen hieraus, dass anscheinend gerade der nichthomologe Teil des Brr5-Proteins essentiell für dessen Funktionsweise sein muß (Jenny *et al.*, 1996). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden

Substitutionsversuche durchgeführt. Dabei wurden ebenfalls C-terminal-verkürzte Brr5-Deletionsmutanten (160 und 30 Aminosäuren), sowie Hybrid-Proteine eingesetzt, in der der fehlende C-terminale Bereich von Brr5 durch den entsprechenden Anteil von Yor179c ersetzt worden war (s. Abb 22A/23A). Die verwendeten Hybrid-Proteine setzten sich aus den N-terminalen 500 Aminosäuren von Brr5, sowie den C-terminalen 200 Aminosäuren, respektive den letzten 30 Aminosäuren des Yor179c-Proteins zusammen. Diese 30 Aminosäuren beinhalten aber das konservierte Motiv des „Leucin-Zippers“. Diese beiden Hybridgene konnten das Wildtypgen ersetzen, der letale Phänotyp eines diploiden Brr5-defizienten Hefestammes wurde komplementiert. Sieht man von der theoretischen Möglichkeit ab, dass ein verkürztes Brr5-Protein eventuell nicht stabil ist, bestätigten diese Ergebnisse die Hypothese Jennys, dass der nicht evolutionär konservierte C-terminale Bereich von Brr5 eine elementare Funktion innehat und dass diese von Yor179c zwar nicht in *trans*, dafür aber in *cis*, als Teil eines chimären Proteinmoleküls übernommen werden kann.

Dieses Experiment ist ebenfalls konsistent mit der Annahme, dass Brr5 und Yor179c nicht nur in ihrer Sequenz, sondern auch hinsichtlich ihrer Funktionalität ähnlich sind. Die Tatsache, dass die Disruption des *BRR5*-Gens einen letalen Phänotyp aufweist und dieser Phänotyp nicht von Yor179c suprimiert werden kann, könnte auf der Unfähigkeit von Yor179c beruhen, aufgrund seiner Größe ($\frac{1}{4}$ des Brr5-Proteins) eine dem Brr5-Protein äquivalente, funktionelle dreidimensionale Struktur einzunehmen. Diese Argumentation schließt die Vermutung ein, dass das Brr5-Protein via seines N-terminalen Bereichs befähigt ist, zusätzliche spezifische Funktionen zu übernehmen. Bisher wurde in der Literatur noch keine N-terminal verkürzte Brr5-Mutation auf ihre Fähigkeit getestet, das Wildtyp-Gen zu ersetzen.

4.4 Der offene Leserahmen YOR179c codiert für ein nicht-essentielles Protein

Durch die in jüngster Zeit mehrfach durchgeführten Gendisruptionsexperimente in *S. cerevisiae* (Dardalhon *et al.*, 2000; Esser *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 1998), die die Funktion von bisher noch uncharakterisierten Hefegenen aufdecken sollten, wurde entdeckt, daß viele dieser potentiellen Gene keinen erkennbaren Wachstums-Phänotyp aufweisen (Winzeler *et al.*, 1999).

Auch das in dieser Arbeit untersuchte Yor179c-Protein zeigte bei Disruptionsanalysen keinen erkennbaren Phänotyp. Dies war umso erstaunlicher, da vermutet worden war, dass es aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu dem mRNA-3'-Prozessierungsfaktor Brr5 in diesen Prozess involviert sein könnte. Der überwiegende Anteil der bisher identifizierten mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren aus *S. cerevisiae* zeigte jedoch nach Disruption einen letalen Phänotyp. Allerdings existieren in der Hefe durchaus Beispiele für nicht-essentielle mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren, die bemerkenswerterweise hauptsächlich als additive (redundante) Faktoren der Polyadenylierungsreaktion, seltener der Schneidereaktion identifiziert wurden. Exemplarisch angeführt werden soll hier die von dem Poly(A)-bindenden Protein abhängige Nuklease PAN mit ihren beiden Untereinheiten Pan2 und Pan3, die an der Ausbildung gleich langer Poly(A)-Schwänze von rund 70 Nukleotiden beteiligt sind (Boeck *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). Ein weiteres Beispiel ist Ref2 sowie dessen Interaktionspartner Fir1. Ref2 ist für eine effiziente Prozessierung von schwachen Polyadenylierungsstellen verantwortlich (Rusznak *et al.*, 1995), Fir1 wurde als dessen Interaktionspartner in einem two-hybrid-screen identifiziert (Rusznak *et al.*, 1996). Bei simultaner Zerstörung der *REF2*- und *FIR1*-Gene, kann eine Verstärkung des Ref2-Phänotyps beobachtet werden (Rusznak *et al.*, 1996). Für solche Faktoren muß es also entweder andere Proteine geben, die ihre Rolle in der Zelle übernehmen können, oder ihre Funktion ist für den Organismus von Vorteil, ohne dass ein Wegfallen dieser Funktion die Lebensfähigkeit der Hefe unter Laborbedingungen beeinträchtigte.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang eine Veröffentlichung von Tautz, in der er sich auf die bereits erwähnten Gendisruptionssexperimente bezieht (Tautz, 2000; Dardalhon *et al.*, 2000; Esser *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 1998). Nur 30 % der mit dieser Methode analysierten offenen Leserahmen konnten als essentiell für das Überleben der Hefe identifiziert werden. Tautz zog daraus jedoch nicht den Schluss, dass diese Gene etwa zufällig vorhanden sind, oder dass sich dieses Phänomen allein durch das Auftreten von Redundanz erklären ließe. Vielmehr vertritt er den Standpunkt, dass es oftmals zeitlich und technisch einfach (noch) nicht möglich ist, sämtliche experimentellen Bedingungen zu untersuchen, um mögliche Phänotypen aufzudecken. Tautz schließt dabei auch die Möglichkeit nicht aus, dass die routinemäßig untersuchten Stress-Konditionen wie Hitze- oder Kälteschock, osmotischer Druck oder Wachstum auf Minimalmedien nur ein geringer Teil der Herausforderungen ist, denen sich die Hefe ausgesetzt sehen könnte, handelt es sich doch ursprünglich um Hefepilze,

deren natürliche Lebensweise völlig verschieden ist zu derjenigen in einem biochemischen Labor.

Gerade im Hinblick auf die Ansichten Tautz' sollte dennoch versucht werden, die Hypothese zu untermauern, dass Yor179c aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu Brr5 an der mRNA-3'-Prozessierung beteiligt ist. Dies sollte durch konkrete *in vitro* 3'-Prozessierungsassays untersucht werden.

4.5 Yor179c ist ein Faktor im mRNA-3'-Prozessierungsapparat von *S. cerevisiae*

Eine *in vitro* 3'-Prozessierungsreaktion kann in zwei nacheinander ablaufende Prozesse, die unabhängig voneinander untersucht werden können, getrennt werden: den endonukleolytischen Schnitt sowie die anschließende Polyadenylierung. Hierfür werden ein radioaktiv markiertes Transkript sowie ein mit 40 % Ammoniumsulfat gefällter Hefeganzzellextrakt verwendet (Butler *et al.*, 1990).

Die Immundepletion eines Wildtyp-Extraktes mit einem anti-Yor179c-Antikörper zeigte eine zeitabhängige Inhibierung der Schneidereaktion, die nach 8-stündiger Inkubation des Extraktes mit dem Antikörper sogar als vollständig bezeichnet werden kann (s. Abb. 36). Da dieser Yor179c-depletierte Extrakt auch in einer anschließend untersuchten Polyadenylierungsreaktion keine Aktivität zeigte (s. Abb. 37), wurde gefolgert, dass Yor179c im Wildtyp-Extrakt in einem Komplex mit Brr5 und/oder anderen essentiellen 3'-Prozessierungsfaktoren vorlag, der durch Copräzipitation gemeinsam mit Yor179c dem Extrakt entzogen worden war. Dies bestätigte nicht nur die *in vitro* Coimmunpräzipitationsdaten mit Brr5, sondern es reihte Yor179c zweifelsfrei in die Reihe der mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren in *S. cerevisiae* ein.

Überraschend waren im Anschluß die Ergebnisse, die mit einem Ammoniumsulfat-gefällten Extrakt aus dem homozygoten, Yor179c-defizienten USY3-Stamm erzielt wurden. *In vivo* hatte dieser Stamm kein Wachstumsdefizit im Vergleich mit einem Wildtyp-Stamm gezeigt. Die Fähigkeit dieses Extraktes zur Durchführung des endonukleolytischen Schnittes war einem parallel untersuchten Wildtyp-Extrakt ebenfalls vergleichbar (s. Abb. 36). Die spezifische Polyadenylierungsaktivität hingegen war vollständig inhibiert (s. Abb. 37). Der Nachweis, dass diese Inaktivität tatsächlich mit der Abwesenheit des Yor179c-Proteins in den

Zellen erklärt werden kann, wurde mit einem Extrakt erbracht, der ebenfalls aus USY3-Zellen stammte, in denen jedoch *YOR179c* extrachromosomal auf einem Plasmid exprimiert worden war. In diesem Extrakt war die Fähigkeit, ein gegebenes Substrat spezifisch zu polyadenylieren, wiederhergestellt (s. Abb. 39). Die Ursache dieses Phänomens war neben dem Fehlen von *Yor179c* auch die Abwesenheit des Polyadenylierungsfaktors Fip1. Fip1 („Factor interacting with Poly(A)-Polymerase“) wurde über einen two-hybrid-screen mit der Poly(A)-Polymerase als „bait“ gefunden (Preker *et al.*, 1995). Temperatursensitive *fip1-1* Mutanten zeigen eine dem Wildtyp vergleichbare Schneideaktivität, andererseits jedoch einen Defekt in der Polyadenylierung von vorgeschrittenen prä-mRNA-Molekülen. Während bei einer 40 %igen Fraktionierung eines Hefe-Ganzzellextraktes mit Ammoniumsulfat normalerweise alle für die 3'-Prozessierung notwendigen Faktoren im Niederschlag gefunden werden (Butler *et al.*, 1990), war im Falle des USY3-Extraktes Fip1 dort nicht nachweisbar (s. Abb. 43). Im Einklang mit dieser Beobachtung war, dass sowohl der unfraktionierte Rohextrakt eines USY3-Stammes, wie auch die Kombination der Sediment- und Überstandsfraction aus einer Ammoniumsulfatfällung, in der Lage waren, die spezifische Polyadenylierungsreaktion adäquat zu katalysieren.

Die erstaunliche Beobachtung, dass in Abwesenheit von *Yor179c* Fip1 nicht im Niederschlag der 40 %igen Ammoniumsulfat-Fraktionierung zu finden ist (Abb. 44), könnte damit erklärt werden, dass Fip1 einer der 3'-Prozessierungsfaktoren ist, mit dem *Yor179c* im Wildtyp-Extrakt komplexiert. Darüberhinaus ist offensichtlich diese Bindung dafür verantwortlich, dass Fip1 „üblicherweise“ in den Niederschlag einer Ammoniumsulfat-Fällung „gezogen“ wird. Diese postulierte Interaktion konnte tatsächlich für das *in vitro* translatierte Fip1- und *Yor179c*-Protein durch Coimmunpräzipitationsversuche nachgewiesen werden und zwar unabhängig davon, gegen welches der beiden Proteine der Antikörper gerichtet war (s. Abb. 46). Interaktionsexperimente mit isolierten Proteinen, wie zum Beispiel Coimmunpräzipitationen, oder two-hybrid-Analysen, sind sicherlich mit gewissen Vorbehalten zu betrachten, da in der Zelle eine mögliche Assoziation der Interaktionspartner der Konkurrenz einer Vielzahl potentieller weiterer und anderer Bindungspartner ausgesetzt ist. Dennoch sprechen alle bisherigen Ergebnisse dafür, dass *Yor179c* seine Funktion als Teil des mRNA-3'-Prozessierungskomplexes *in vivo* über eine Interaktion mit Fip1 ausübt.

Ein weiterer Interaktionspartner von Fip1 ist Rna14, eine Untereinheit des „Cleavage and Polyadenylation Factor IA“ (CF IA), dem eine wichtige Rolle während des endonukleolytischen Schnittes zukommt (Preker *et al.*, 1995). Yor179c ist in diesem Kontext also ebenfalls mit Rna14 verbunden, was den zunehmenden Verlust der Schneideaktivität eines mit einem anti-Yor179c-Antikörper depletierten Wildtyp-Extraktes erklären kann.

4.6 Ist Yor179c für die Aufhebung der Fip1-vermittelten Inhibierung der Poly(A)-Polymerase verantwortlich?

Einer der interessantesten Aspekte dieser Arbeit ist wohl, dass Yor179c mit Fip1, einem ebenfalls Hefe-spezifischen Polyadenylierungsfaktor, eine Bindung eingehen kann. Im März dieses Jahres erschien eine Veröffentlichung aus der Arbeitsgruppe von C. Moore, in der weitere Interaktionen von Fip1 mit anderen Faktoren des Polyadenylierungskomplexes beschrieben wurden (Helmling *et al.*, 2001). Einen besonderen Stellenwert nimmt dabei die Bindung von Fip1 an die Poly(A)-Polymerase Pap1 ein, die eine Hemmung dieses Enzyms in der unspezifischen Polyadenylierung zur Folge hat. Die Autoren mutmaßen, dass Fip1 mit dieser Bindung die wichtige regulatorische Funktion übernimmt, Pap1 an der Polyadenylierung von RNA-Molekülen zu hindern, die keine Substrate für eine derartige Modifikation darstellen. Beispiele hierfür sind small nuclear- und small nucleolar-RNAs (sn- und snoRNAs), die zwar ebenfalls von der RNA-Polymerase II synthetisiert werden, jedoch nicht für Proteine codieren, sondern in prä-mRNA-Spleißreaktionen (Konarska, 1998; Newman, 1994; Staley und Guthrie, 1998) bzw. bei der Reifung und Modifizierung von rRNAs eine Rolle spielen (Bachellerie *et al.*, 1995; Lafontaine und Tollervey, 1998; Maxwell und Fournier, 1995). Erst kürzlich ist gezeigt worden, dass zumindest in *S. cerevisiae* zur Prozessierung von bestimmten snoRNAs auch die mRNA-3'-Prozessierungsfaktoren benötigt werden (Fatica *et al.*, 2000). Die Vermutung, dass Yor179c an einer Fip1-Pap1-Wechselwirkung beteiligt sein könnte, wurde durch ein Experiment bestärkt, das die Längen der Poly(A)-Schwänze der mRNAs eines USY3-Extraktes im Vergleich zu denjenigen eines Wildtyp-Extraktes bestimmen sollte (s. Abb. 42). In diesem Experiment konnte reproduzierbar eine erhöhte Polyadenylierungsrate des USY3-Stammes, der kein Yor179c-Protein mehr synthetisieren kann, im Vergleich zu einem Wildtyp-Stamm nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis, dass in Abwesenheit von Yor179c unspezifisch auch

andere RNA-Spezies polyadenyliert werden können. In Wildtyp-Hefezellen sind diese unspezifischen Polyadenylierungen durch eine harmonische Wechselwirkung von Yor179c, Fip1 und Pap1 unterbunden.

Der Faktor, der die notwendige Aufhebung der Pap1-Aktivitätshemmung bei der spezifischen Polyadenylierung bewerkstelligt, konnte bis jetzt noch nicht gefunden werden. Als Bindungsort für diesen mutmaßlichen „Derepressor“ konnten jedoch die 107 C-terminalen Aminosäuren von Fip1 identifiziert werden (Helmling *et al.*, 2001). Unter der Annahme, dass auch der zweite Interaktionspartner von Yor179c, Brr5, eine Rolle in diesem Szenario spielt und im Hinblick auf den Befund, dass Yor179c den ihm strukturell verwandten C-Terminus von Brr5 ohne Funktionsverlust ersetzen kann, wäre es durchaus denkbar, dass auch Brr5 mit seinem C-Terminus Fip1 bindet, sehr wahrscheinlich an gleicher Stelle wie Yor179c. Das würde wiederum bedeuten, dass Yor179c mit Brr5 um die Bindungsdomäne an Fip1 konkurrieren würde. Allerdings ist nur Yor179c und nicht Brr5 befähigt, Fip1 zusammen mit den anderen 3'-Prozessierungsfaktoren in den Niederschlag einer 40 %igen Ammoniumsulfatfällung zu „ziehen“. Es könnte sich also bei dem gesuchten „Derepressor“ der Fip1-vermittelten Pap-Aktivität um Brr5 handeln. Während Yor179c zusammen mit Fip1 die Poly(A)-Polymerase in einem inhibierten Zustand hält („Stand-by Form“), wird Brr5 erst durch mRNA-spezifische, cis-agierende Signalelemente auf der prä-mRNA in den Polyadenylierungskomplex rekrutiert, in dem es dann Yor179c aus der Bindung mit Fip1 verdrängt und wahrscheinlich unter Beteiligung seines evolutionär konservierten N-terminalen Bereichs die Poly(A)-Polymerase aktiviert. In Abwesenheit dieser Signale, also während der Synthese von sn- oder snoRNAs, bleibt Yor179c an Fip1 gebunden, und die Poly(A)-Polymerase damit inaktiv: Eine Polyadenylierung dieser RNA-Moleküle unterbleibt. Dieser Hypothese wird in Abb. 49 Rechnung getragen, in der das in der Einleitung dargestellte Modell der interagierenden Faktoren um Yor179c erweitert und der Poly(A)-Schwanz entfernt wurde.

Die persönliche Mitteilung Claire Moore's, dass Yor179c erst kürzlich über Massenspektroskopie eindeutig als Bestandteil eines über zwei Affinitätssäulen gereinigten Komplexes, der dem CPF-Faktor entspricht, identifiziert werden konnte, bestätigt nachdrücklich die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde. Der CPF-Proteinkomplex ist sowohl für den endonukleolytischen Schnitt, als auch für eine effiziente Polyadenylierung notwendig.

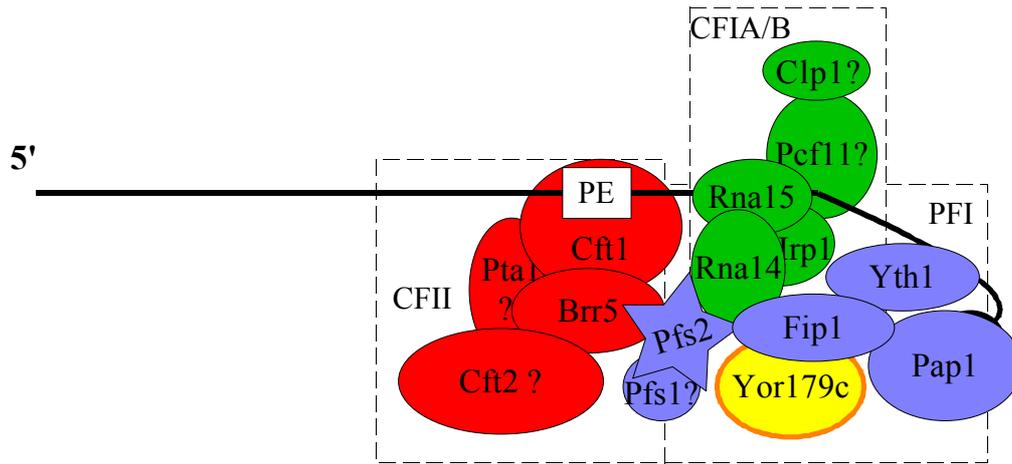


Abb. 49: Schematische Darstellung des mRNA-Polyadenylierungskomplexes. Yor179c wurde als Interaktionspartner von Fip1 dargestellt. Die Verbindung mit Brr5 wurde nicht berücksichtigt.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur funktionellen Genomforschung in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Ein bei der Sequenzierung des Hefegenoms identifizierter offener Leserahmen, YOR179c, zeigte im Rahmen einer Datenbankanalyse eine erstaunliche Sequenzähnlichkeit zu dem bereits bekannten mRNA-3'-Prozessierungsfaktor Brr5. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei dem noch nicht näher charakterisierten Leserahmen ebenfalls um ein Gen handeln könnte, das für einen mRNA-3'-Prozessierungsfaktor codiert.

Zunächst wurde durch eine Northern-Blot-Analyse eine dem Leserahmen entsprechende mRNA nachgewiesen. Des Weiteren konnte auch ein Protein der erwarteten Größe anhand von polyklonalen Antikörpern, die gegen Yor179c gerichtet waren, detektiert werden. Diese Resultate belegen, dass es sich bei dem offenen Leserahmen YOR179c tatsächlich um ein exprimiertes Gen handelt. Eine Beteiligung des Yor179c-Proteins an der 3'-Prozessierung von mRNA-Vorläufern konnte anschließend anhand folgender Kriterien nachgewiesen werden:

- Das Yor179c-Protein wurde als Fusionskonstrukt mit dem „*green fluorescent protein*“ im Kern lokalisiert, in dem Zellkompartiment, in dem auch der Prozess der mRNA-3'-Prozessierung abläuft.
- Der letale Phänotyp eines Brr5-defizienten Hefestammes konnte durch Expression eines chimären *Brr5/Yor179c*-Gens, in dem der sequenzähnliche Bereich von Brr5 durch denjenigen von Yor179c ersetzt worden war, aufgehoben werden.
- Ein *in vivo* Vergleich der Poly(A)-Schwänze eines Wildtyp und eines USY3-Stammes, der kein Yor179c-Protein mehr synthetisieren konnte, ergab eine erhöhte Polyadenylierungseffizienz des USY3-Stammes.
- Immunochemische Analysen zeigten, dass nach Entfernung von Yor179c aus einem Hefe-Ganzzellextrakt dieser nicht mehr fähig war, eine mRNA-3'-Prozessierungsreaktion durchzuführen.
- Dieser mRNA-3'-Prozessierungsdefekt eines depletierten Wildtyp-Extraktes konnte durch Expression eines extrachromosomal eingeführten *YOR179c*-Gens in den Wildtyp-Stamm komplementiert werden.

-Durch Coimmunpräzipitationen wurde nachgewiesen, dass Yor179c mit dem mRNA-3'-Prozessierungsfaktor Brr5 und dem Polyadenylierungsfaktor Fip1 *in vitro* interagiert.

Nachdem es sich bei Yor179c um ein Protein handelt, das für die Überlebensfähigkeit der Hefe nicht essentiell ist und ein Yor179c-defizienter Hefestamm ein vorgegebenes Substrat unter bestimmten Bedingungen durchaus prozessieren kann, muss zwar eine elementare Beteiligung von Yor179c an der mRNA-3'-Prozessierung ausgeschlossen werden, insgesamt kann jedoch aus den erhaltenen Daten gefolgert werden, dass Yor179c sowohl am Proteinkomplex, der den endonukleolytischen Schnitt katalysiert, als auch an der anschließenden Polyadenylierungsreaktion beteiligt ist. Die Ergebnisse sind konsistent mit der Vermutung, dass Yor179c eine Rolle bei der Ausbildung und Stabilisierung dieser Proteinkomplexe spielt.

Diese Schlussfolgerungen konnten in jüngster Zeit durch weiterführende Experimente in einem kooperierenden US-amerikanischen Labor, dem unser Material zur Verfügung gestellt wurde, untermauert und bestätigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abe, A., Y. Hiraoka, et al. (1990).** "Signal sequence for generation of mRNA 3' end in the *Saccharomyces cerevisiae* GAL7 gene." Embo J 9(11): 3691-7.
- Adesnik, M. und J. E. Darnell (1972).** "Biogenesis and characterization of histone messenger RNA in HeLa cells." J Mol Biol 67(3): 397-406.
- Adesnik, M., M. Salditt, et al. (1972).** "Evidence that all messenger RNA molecules (except histone messenger RNA) contain Poly (A) sequences and that the Poly(A) has a nuclear function." J Mol Biol 71(1): 21-30.
- Alting-Mees, M. A. und J. M. Short (1989).** "pBluescript II: gene mapping vectors." Nucleic Acids Res 17(22): 9494.
- Amatruda, J. F. und L. I. Zon (1999).** "Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish." Dev Biol 216(1): 1-15.
- Amrani, N., M. Minet, et al. (1997).** "PCF11 encodes a third protein component of yeast cleavage and polyadenylation factor I." Mol Cell Biol 17(3): 1102-9.
- Aranda, A., J. E. Perez-Ortin, et al. (1998).** "The yeast FBP1 poly(A) signal functions in both orientations and overlaps with a gene promoter." Nucleic Acids Res 26(20): 4588-96.
- Audibert, A. und M. Simonelig (1998).** "Autoregulation at the level of mRNA 3' end formation of the suppressor of forked gene of *Drosophila melanogaster* is conserved in *Drosophila virilis*." Proc Natl Acad Sci U S A 95(24): 14302-7.
- Bachellerie, J. P., B. Michot, et al. (1995).** "Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA." Trends Biochem Sci 20(7): 261-4.
- Balajee, A. S., A. Machwe, et al. (1999).** "The Werner syndrome protein is involved in RNA polymerase II transcription." Mol Biol Cell 10(8): 2655-68.
- Ballester, R., D. Marchuk, et al. (1990).** "The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins." Cell 63(4): 851-9.
- Barabino, S. M., W. Hubner, et al. (1997).** "The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins." Genes Dev 11(13): 1703-16.
- Barabino, S. M., M. Ohnacker, et al. (2000).** "Distinct roles of two Yth1p domains in 3'-end cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNAs." Embo J 19(14): 3778-87.

- Barnes, W. M. (1994).** “PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates.” Proc Natl Acad Sci U S A 91(6): 2216-20.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979).** “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.” Nucleic Acids Res 7(6): 1513-23.
- Boeck, R., S. Tarun, Jr., et al. (1996).** “The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein- stimulated poly(A)-nuclease activity.” J Biol Chem 271(1): 432-8.
- Botstein, D., S. A. Chervitz, et al. (1997).** “Yeast as a model organism.” Science 277(5330): 1259-60.
- Botstein, D. und G. R. Fink (1988).** “Yeast: an experimental organism for modern biology.” Science 240(4858): 1439-43.
- Bradford, M. M. (1976).** “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” Anal Biochem 72: 248-54.
- Brais, B., J. P. Bouchard, et al. (1998).** “Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy.” Nat Genet 18(2): 164-7.
- Brockhaus, M., J. Grunberg, et al. (1998).** “Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and NOTCH signaling.” Neuroreport 9(7): 1481-6.
- Brown, C. E., S. Z. Tarun, Jr., et al. (1996).** “PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*.” Mol Cell Biol 16(10): 5744-53.
- Bureik, M., A. Jungbluth, et al. (1997).** “Human p53 restores DNA synthesis control in fission yeast.” Biol Chem 378(11): 1361-71.
- Busch, S. J. und P. Sassone-Corsi (1990).** “Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains.” Trends Genet 6(2): 36-40.
- Butler, J. S. und T. Platt (1988).** “RNA processing generates the mature 3' end of yeast CYC1 messenger RNA in vitro.” Science 242(4883): 1270-4.
- Butler, J. S., P. P. Sadhale, et al. (1990).** “RNA processing in vitro produces mature 3' ends of a variety of *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs.” Mol Cell Biol 10(6): 2599-605.
- Chanfreau, G., S. M. Noble, et al. (1996).** “Essential yeast protein with unexpected similarity to subunits of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF).” Science 274(5292): 1511-4.
- Chen, B. P. und T. Hai (1994).** **Chen, E. Y. und P. H. Seeburg (1985).** “Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA.” Dna 4(2): 165-70.

- Chen, J. und C. Moore (1992).** "Separation of factors required for cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNA." Mol Cell Biol 12(8): 3470-81.
- Church, G. M. und W. Gilbert (1984).** "Genomic sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A 81(7): 1991-5.
- Dardalhon, M., N. Magana-Schwencke, et al. (2000).** "Disruption and functional analysis of six ORFs on chromosome IV: YDR013w, YDR014w, YDR015c, YDR018c, YDR020c, YDR021w (FAL1)." Yeast 16(3): 267-76.
- de Vries, H., U. Ruedegger, et al. (2000).** "Human pre-mRNA cleavage factor II(m) contains homologs of yeast proteins and bridges two other cleavage factors." Embo J 19(21): 5895-904.
- Doktycz, M. J., F. W. Larimer, et al. (1998).** "Comparative analyses of the secondary structures of synthetic and intracellular yeast MFA2 mRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A 95(25): 14614-21.
- Dower, W. J., J. F. Miller, et al. (1988).** "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res 16(13): 6127-45.
- Eckner, R., W. Ellmeier, et al. (1991).** "Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus." Embo J 10(11): 3513-22.
- Elble, R. (1992).** "A simple and efficient procedure for transformation of yeasts". *Biotechniques*, **13**, 18-20.
- Esser, K., B. Scholle, et al. (1999).** "Disruption of six open reading frames on chromosome X of *Saccharomyces cerevisiae* reveals a cluster of four essential genes." Yeast 15(10B): 921-33.
- Fairhead, C., A. Thierry, et al. (1998).** "'Mass-murder' of ORFs from three regions of chromosome XI from *Saccharomyces cerevisiae*." Gene 223(1-2): 33-46.
- Fatica, A., M. Morlando, et al. (2000).** "Yeast snoRNA accumulation relies on a cleavage-dependent/polyadenylation-independent 3'-processing apparatus." Embo J 19(22): 6218-29.
- Feldmann, H. und E. L. Winnacker (1993).** "A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem 268(17): 12895-900.
- Feinberg, A. P. und B. Vogelstein (1984).** "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum." Anal Biochem 137(1): 266-7.
- Graber, J.H., Cantor, C.R., Mohr, S.C. und Smith, T.F. (1999a)** "Genomic detection of new yeast pre-mRNA 3'-end-processing signals". *Nucleic Acids Res*, **27**, 888-94.

- Graber, J.H., Cantor, C.R., Mohr, S.C. und Smith, T.F. (1999b)** "In silico detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14055-60.
- Greider, C. W. (1998)**. "Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future." *Curr Biol* 8(5): R178-81.
- Groner, B. und S. L. Phillips (1975)**. "Polyadenylate metabolism in the nuclei and cytoplasm of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 250(14): 5640-6.
- Gross, S. und C. Moore (2001)**. "Five subunits are required for reconstitution of the cleavage and polyadenylation activities of *Saccharomyces cerevisiae* cleavage factor I." *Proc Natl Acad Sci U S A* 8: 8.
- Guthrie, C. und G.R. Fink**. "Guide to yeast genetics and molecular biology." *Methods Enzymol.* 194: 12-17, Academic Press, San Diego
- Guarente, L. (1988)**. "UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals." *Cell* 52(3): 303-5.
- Gumport, R. I. und O. C. Uhlenbeck (1981)**. "T4 RNA ligase as a nucleic acid synthesis and modification reagent." *Gene Amplif Anal* 2: 313-45.
- Guo, Z., P. Russo, et al. (1995)**. "Redundant 3' end-forming signals for the yeast CYC1 mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4211-4.
- Guo, Z. und F. Sherman (1995)**. "3'-end-forming signals of yeast mRNA." *Mol Cell Biol* 15(11): 5983-90.
- Guo, Z. und F. Sherman (1996)**. "3'-end-forming signals of yeast mRNA." *Trends Biochem Sci* 21(12): 477-81.
- Hani, J., B. Schelbert, et al. (1999)**. "Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 274(1): 108-16.
- Hani, J., G. Stumpf, et al. (1995)**. "PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases." *FEBS Lett* 365(2-3): 198-202.
- Harlow, B. L., N. S. Weiss, et al. (1988)**. "Case-control study of borderline ovarian tumors: reproductive history and exposure to exogenous female hormones." *Cancer Res* 48(20): 5849-52.

- Heidmann, S., C. Schindewolf, et al. (1994).** "Flexibility and interchangeability of polyadenylation signals in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol 14(7): 4633-42.
- Helmling, S., A. Zhelkovsky, et al. (2001).** "Fip1 regulates the activity of Poly(A) polymerase through multiple interactions." Mol Cell Biol 21(6): 2026-37.
- Henikoff, S., J. D. Kelly, et al. (1983).** "Transcription terminates in yeast distal to a control sequence." Cell 33(2): 607-14.
- Higgs, D. R., S. E. Goodbourn, et al. (1983).** "Alpha-thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation." Nature 306(5941): 398-400.
- Hochuli, E., H. Dobeli, et al. (1987).** "New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues." J Chromatogr 411: 177-84.
- Holmes, D. S. und M. Quigley (1981).** "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." Anal Biochem 114(1): 193-7.
- Horii, A., H. J. Han, et al. (1994).** "Cloning, characterization and chromosomal assignment of the human genes homologous to yeast PMS1, a member of mismatch repair genes." Biochem Biophys Res Commun 204(3): 1257-64.
- Huang, Y. und G. C. Carmichael (1996).** "Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA." Mol Cell Biol 16(4): 1534-42.
- Hughes, T. R., M. J. Marton, et al. (2000).** "Functional discovery via a compendium of expression profiles." Cell 102(1): 109-26.
- Hyman, L. E., S. H. Seiler, et al. (1991).** "Point mutations upstream of the yeast ADH2 poly(A) site significantly reduce the efficiency of 3'-end formation." Mol Cell Biol 11(4): 2004-12.
- Irniger, S., C. M. Egli, et al. (1991).** "Different classes of polyadenylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol 11(6): 3060-9.
- Jenny, A., H. P. Hauri, et al. (1994).** "Characterization of cleavage and polyadenylation specificity factor and cloning of its 100-kilodalton subunit." Mol Cell Biol 14(12): 8183-90.
- Jenny, A., L. Minvielle-Sebastia, et al. (1996).** "Sequence similarity between the 73-kilodalton protein of mammalian CPSF and a subunit of yeast polyadenylation factor I [see comments]." Science 274(5292): 1514-7.
- Jeyaprakash, A., R. Das Gupta, et al. (1996).** "*Saccharomyces cerevisiae* pms2 mutations are alleles of MLH1, and pms2-2 corresponds to a hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma-causing missense mutation." Mol Cell Biol 16(6): 3008-11.

- Kataoka, T., S. Powers, et al. (1985).** "Functional homology of mammalian and yeast RAS genes." Cell 40(1): 19-26.
- Keller, W., S. Bienroth, et al. (1991).** "Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA." Embo J 10(13): 4241-9.
- Keller, W. und L. Minvielle-Sebastia (1997).** "A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing." Curr Opin Cell Biol 9(3): 329-36.
- Kessler, M. M., M. F. Henry, et al. (1997).** "Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast." Genes Dev 11(19): 2545-56.
- Kessler, M. M., J. Zhao, et al. (1996).** "Purification of the *Saccharomyces cerevisiae* cleavage/polyadenylation factor I. Separation into two components that are required for both cleavage and polyadenylation of mRNA 3' ends." J Biol Chem 271(43): 27167-75.
- Köhler, K. und H. Domdey (1991).** "Preparation of high molecular weight RNA." Methods Enzymol 194: 398-405.
- Konarska, M. M. (1998).** "Recognition of the 5' splice site by the spliceosome." Acta Biochim Pol 45(4): 869-81.
- Kumar, A. und M. Snyder (2001).** "Emerging technologies in yeast genomics." Nat Rev Genet 2(4): 302-12.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(259): 680-5.
- Lafontaine, D. L. und D. Tollervey (1998).** "Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs." Trends Biochem Sci 23(10): 383-8.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, et al. (1988).** "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." Science 240(4860): 1759-64.
- Lin, R. J., A. J. Newman, et al. (1985).** "Yeast mRNA splicing in vitro." J Biol Chem 260(27): 14780-92.
- Lingner, J., Kellermann, J. und Keller, W. (1991a)** "Cloning and expression of the essential gene for poly(A) polymerase from *S. cerevisiae*". *Nature*, **354**, 496-8.
- Lingner, J., Radtke, I., Wahle, E. und Keller, W. (1991b)** "Purification and characterization of poly(A) polymerase from *Saccharomyces cerevisiae*". *J Biol Chem*, **266**, 8741-6.

- Lopez, M. C., M. Sanchez, et al. (1998).** "Disruption of six *Saccharomyces cerevisiae* genes from chromosome IV and basic phenotypic analysis of deletion mutants." Yeast 14(13): 1199-208.
- Martin, G. und W. Keller (1996).** "Mutational analysis of mammalian poly(A) polymerase identifies a region for primer binding and catalytic domain, homologous to the family X polymerases, and to other nucleotidyltransferases." Embo J 15(10): 2593-603.
- Maxwell, E. S. und M. J. Fournier (1995).** "The small nucleolar RNAs." Annu Rev Biochem 64: 897-934.
- McKnight, S. L. (1991).** "Molecular zippers in gene regulation." Sci Am 264(4): 54-64.
- Melton, D. A., P. A. Krieg, et al. (1984).** "Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter." Nucleic Acids Res 12(18): 7035-56.
- Minvielle-Sebastia, L., K. Beyer, et al. (1998).** "Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by a yeast hnRNP." Embo J 17(24): 7454-68.
- Minvielle-Sebastia, L., P. J. Preker, et al. (1997).** "The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation." Proc Natl Acad Sci U S A 94(15): 7897-902.
- Moore, C. L., J. Chen, et al. (1988).** "Two proteins crosslinked to RNA containing the adenovirus L3 poly(A) site require the AAUAAA sequence for binding." Embo J 7(10): 3159-69.
- Moore, C. L. und P. A. Sharp (1985).** "Accurate cleavage and polyadenylation of exogenous RNA substrate." Cell 41(3): 845-55.
- Mumberg, D., R. Muller, et al. (1994).** "Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression." Nucleic Acids
- Murthy, K. G. und J. L. Manley (1992).** "Characterization of the multisubunit cleavage-polyadenylation specificity factor from calf thymus." J Biol Chem 267(21): 14804-11.
- Murthy, K. G. und J. L. Manley (1995).** "The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation." Genes Dev 9(21): 2672-83.
- Myers, L. C. und R. D. Kornberg (2000).** "Mediator of transcriptional regulation." Annu Rev Biochem 69: 729-49.

- Newman, A. (1994).** “Small nuclear RNAs and pre-mRNA splicing.” Curr Opin Cell Biol 6(3): 360-7.
- Niedenthal, R. K., L. Riles, et al. (1996).** “Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast.” Yeast 12(8): 773-86.
- Noble, S. M. und C. Guthrie (1996).** “Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations.” Genetics 143(1): 67-80.
- Ohnacker, M., S. M. Barabino, et al. (2000).** “The WD-repeat protein pfs2p bridges two essential factors within the yeast pre-mRNA 3'-end-processing complex.” Embo J 19(1): 37-47.
- Olempska-Beer, Z. (1987).** “Current methods for *Saccharomyces cerevisiae*. II. Sporulation.” Anal Biochem 164(2): 278-86.
- Orkin, S. H., T. C. Cheng, et al. (1985).** “Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human beta-globin gene.” Embo J 4(2): 453-6.
- Pelham, H. R. und R. J. Jackson (1976).** “An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.” Eur J Biochem 67(1): 247-56.
- Peterson, J. A. und A. M. Myers (1993).** “Functional analysis of mRNA 3' end formation signals in the convergent and overlapping transcription units of the *S. cerevisiae* genes RHO1 and MRP2.” Nucleic Acids Res 21(23): 5500-8.
- Preker, P. J., J. Lingner, et al. (1995).** “The FIP1 gene encodes a component of a yeast pre-mRNA polyadenylation factor that directly interacts with poly(A) polymerase.” Cell 81(3): 379-89.
- Preker, P. J., M. Ohnacker, et al. (1997).** “A multisubunit 3' end processing factor from yeast containing poly(A) polymerase and homologues of the subunits of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor.” Embo J 16(15): 4727-37.
- Raabe, T., F. J. Bollum, et al. (1991).** “Primary structure and expression of bovine poly(A) polymerase.” Nature 353(6341): 229-34.
- Rief, N., H. Herges, et al. (2000).** “Binding of the growth suppressor p53 protein to the cell cycle regulator phosphatase cdc25C.” Int J Oncol 17(1): 189-95.
- Ruegsegger, U., K. Beyer, et al. (1996).**
- Russnak, R., K. W. Nehrke, et al. (1995).** “REF2 encodes an RNA-binding protein directly involved in yeast mRNA 3'- end formation.” Mol Cell Biol 15(3): 1689-97.

- Russnak, R., S. Pereira, et al. (1996).** "RNA binding analysis of yeast REF2 and its two-hybrid interaction with a new gene product, FIR1." Gene Expr 6(4): 241-58.
- Russo, P., W. Z. Li, et al. (1993).** "Signals that produce 3' termini in CYC1 mRNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol 13(12): 7836-49.
- Russo, P., W. Z. Li, et al. (1991).** "Distinct cis-acting signals enhance 3' endpoint formation of CYC1 mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J 10(3): 563-71.
- Sachs, A. und E. Wahle (1993).** "Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes." J Biol Chem 268(31): 22955-8.
- Sachs, A. B., P. Sarnow, et al. (1997).** "Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes." Cell 89(6): 831-8.
- Sadhale, P. P. und T. Platt (1992).** "Unusual aspects of in vitro RNA processing in the 3' regions of the GAL1, GAL7, and GAL10 genes in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol 12(10): 4262-70.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988).** "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-91.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977).** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
- Saraste, M., P. R. Sibbald, et al. (1990).** "The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins." Trends Biochem Sci 15(11): 430-4.
- Schiestl, R. H. und R. D. Gietz (1989).** "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier." Curr Genet 16(5-6): 339-46.
- Schindewolf, C. A. und H. Domdey (1995).** "Splicing of a circular yeast pre-mRNA in vitro." Nucleic Acids Res 23(7): 1133-9.
- Seraphin, B. und S. Kandels-Lewis (1996).** "An efficient PCR mutagenesis strategy without gel purification [correction of purification] step that is amenable to automation." Nucleic Acids Res 24(16): 3276-7.
- Shahied, L., E. H. Braswell, et al. (2001).** "An Antiparallel Four-helix Bundle Orients the High-affinity RNA Binding Sites in hnRNP C: A Mechanism for RNA Chaperonin Activity." J Mol Biol 305(4): 817-828.
- Sharp, P. A. (1988).** "RNA splicing and genes." Jama 260(20): 3035-41.
- Sherman, F. und J. Hicks (1991).** "Micromanipulation and dissection of asci." Methods Enzymol 194: 21-37.

- Sinclair, D., Mills, K. und Guarente, L. (1998a)** "Aging in *Saccharomyces cerevisiae*". *Annu Rev Microbiol*, **52**, 533-60.
- Sinclair, D.A., Mills, K. und Guarente, L. (1998b)** "Molecular mechanisms of yeast aging". *Trends Biochem Sci*, **23**, 131-4.
- Southern, E. M. (1975)**. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol* 98(3): 503-17.
- Staley, J. P. und C. Guthrie (1998)**. "Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things." *Cell* 92(3): 315-26.
- Studier, F. W. und B. A. Moffatt (1986)**. "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* 189(1): 113-30.
- Stumpf, G. und H. Domdey (1996)**. "Dependence of yeast pre-mRNA 3'-end processing on CFT1: a sequence homolog of the mammalian AAUAAA binding factor [see comments]." *Science* 274(5292): 1517-20.
- Takagaki, Y., J. L. Manley, et al. (1990)**. "A multisubunit factor, CstF, is required for polyadenylation of mammalian pre-mRNAs." *Genes Dev* 4(12A): 2112-20.
- Takagaki, Y. und J. L. Manley (1994)**. "A polyadenylation factor subunit is the human homologue of the *Drosophila* suppressor of forked protein." *Nature* 372(6505): 471-4.
- Takagaki, Y. und J. L. Manley (1998)**. "Levels of polyadenylation factor CstF-64 control IgM heavy chain mRNA accumulation and other events associated with B cell differentiation." *Mol Cell* 2(6): 761-71.
- Tan Jh, J., Y. Kajiwara, et al. (2001)**. "The bZIP-like Motif of hnRNP C Directs the Nuclear Accumulation of Pre- mRNA and Lethality in Yeast." *J Mol Biol* 305(4): 829-838.
- Tarun, S. Z., Jr. und A. B. Sachs (1996)**. "Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G." *Embo J* 15(24): 7168-77.
- Tautz, D. (2000)**. "A genetic uncertainty problem." *Trends Genet* 16(11): 475-7.
- Theunissen, O., F. Rudt, et al. (1992)**. "RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA." *Cell* 71(4): 679-90.
- Wach, A. (1996)**. "PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*." *Yeast* 12(3): 259-65.
- Wahle, E. und U. Ruesegger (1999)**. "3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes." *FEMS Microbiol Rev* 23(3): 277-95.

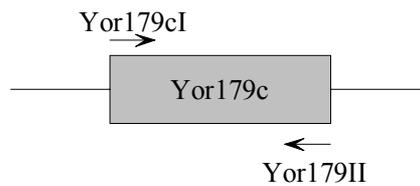
- Wickner, R. B. (1994).** “[URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*.” Science 264(5158): 566-9.
- Wickner, R. B. (1998).** “This year in Yeast.” Yeast 14(16): 1437-8.
- Wickner, R. B., H. K. Edskes, et al. (1999).** “Prions of yeast and fungi. Proteins as genetic material.” J Biol Chem 274(2): 555-8.
- Wilmzig (1985).** “LiCl-boiling method for plasmid mini-preps.” Trends Genet. 1: 158.
- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, et al. (1999).** “Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis.” Science 285(5429): 901-6.
- Wittenburg, N., S. Eimer, et al. (2000).** “Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in *C. elegans*.” Nature 406(6793): 306-9.
- Xu, G. F., B. Lin, et al. (1990).** “The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements *ira* mutants of *S. cerevisiae*.” Cell 63(4): 835-41.
- Zhao, J., Hyman, L. und Moore, C. (1999a)** "Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis". *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 405-45.
- Zhao, J., Kessler, M., Helmling, S., O'Connor, J.P. und Moore, C. (1999b)** "Pta1, a component of yeast CF II, is required for both cleavage and poly(A) addition of mRNA precursor". *Mol Cell Biol*, **19**, 7733-40.
- Zhao, J., M. M. Kessler, et al. (1997).** “Cleavage factor II of *Saccharomyces cerevisiae* contains homologues to subunits of the mammalian Cleavage/ polyadenylation specificity factor and exhibits sequence-specific, ATP-dependent interaction with precursor RNA.” J Biol Chem 272(16): 10831-8.
- Zhelkovsky, A., S. Helmling, et al. (1998).** “Processivity of the *Saccharomyces cerevisiae* poly(A) polymerase requires interactions at the carboxyl-terminal RNA binding domain.” Mol Cell Biol 18(10): 5942-51.

7 Anhang

7.1 Klonierung von Yor179c in pET15b-Vektor

(Beschreibung zu Kapitel 3.3)

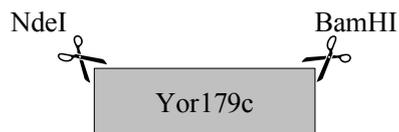
1. Herstellung eines PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden: Yor179cI und II,



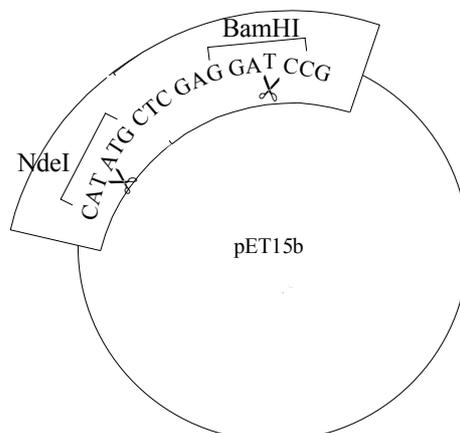
Bedingungen:

Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer	Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	2 min	30 sek	94°C	30 sek	30 sek
48°C	30 sek	30 sek	54°C	30 sek	30 sek
68°C	2 min	2 min	68°C	2 min	10 min
	1 Zyklus	5 Zyklen		25 Zyklen	1 Zyklus

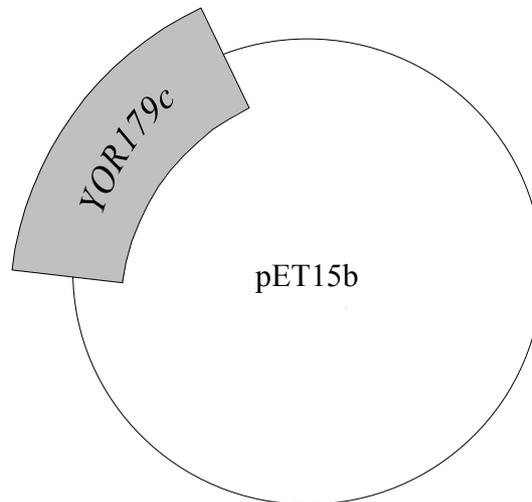
2. Aufreinigung des PCR-Produkts durch Phenolisierung und Fällung
3. Restriktionsverdau des PCR-Produkts mit den Enzymen NdeI und BamHI



4. Restriktionsverdau des Vektors pET15b mit den Enzymen NdeI und BamHI

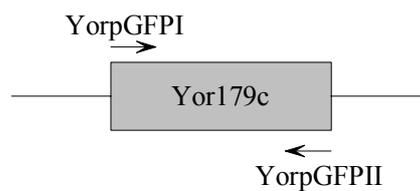


5. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese der beiden DNA-Fragmente aus Punkt 3 und 4
6. Ligation der ausgeschnittenen Gelstücke



7.2 Klonierung von Yor179c in pGFP-Vektor (Beschreibung zu Kapitel 3.4)

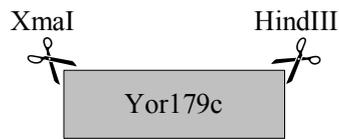
1. Herstellung eines PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden: YorpGFPI und II



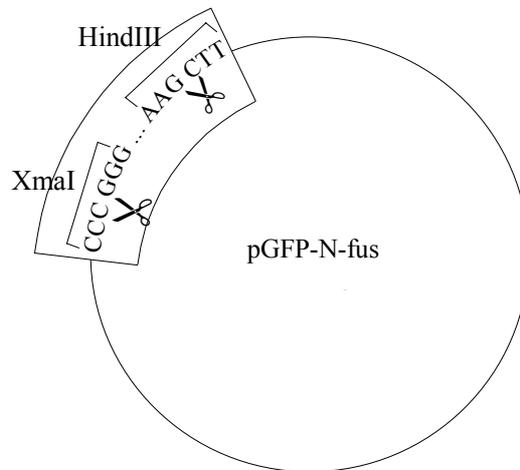
Bedingungen:

Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	2 min	30 sek	30 sek
55°C	30 sek	30 sek	30 sek
68°C	2 min	2 min	10 min
	1 Zyklus	30 Zyklen	1 Zyklus

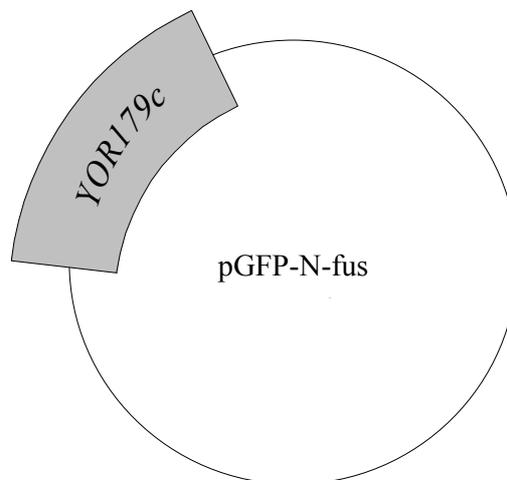
2. Aufreinigung des PCR-Produkts durch Phenolisierung und Fällung
3. Restriktionsverdau des PCR-Produkts mit den Enzymen XmaI und HindIII



4. Restriktionsverdau des Vektors pGFP mit den Enzymen XmaI und HindIII



5. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese der beiden DNA-Fragmente und anschließendes Ausschneiden aus dem Gel
6. Ligation der ausgeschnittenen Gelstücke



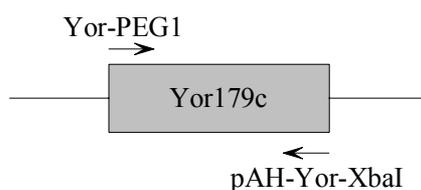
7.3 Gendisruption von Yor179c

(Beschreibung zu Kapitel 3.5 siehe Diplomarbeit Ute Schultheiss)

7.4 Klonierung von Yor179c in den pAH⁺-Vektor

(Beschreibung zu Kapitel 3.8.3)

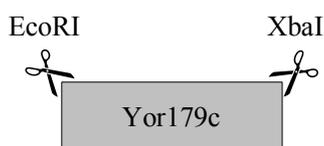
1. Herstellung eines PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden: Yor-PEG1 und pAH-Yor-XbaI



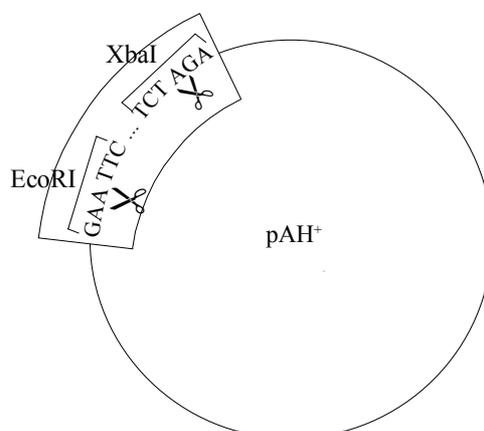
Bedingungen:

Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	2 min	30 sek	30 sek
54°C	30 sek	30 sek	30 sek
68°C	2 min	2 min	10 min
	1 Zyklus	30 Zyklen	1 Zyklus

2. Aufreinigung des PCR-Produktes durch Phenolisierung und Fällung
3. Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit den Enzymen EcoRI und XbaI



4. Restriktionsverdau des Vektors pAH⁺ mit den Enzymen EcoRI und XbaI



5. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese der beiden DNA-Fragmente und anschließendes Ausschneiden aus dem Gel
6. Ligation der ausgeschnittenen Gelstücke

7.5 Klonierung von Brr5flank, sowie die hieraus resultierenden C-terminalen Mutanten

(Beschreibung zu Kapitel 3.7)

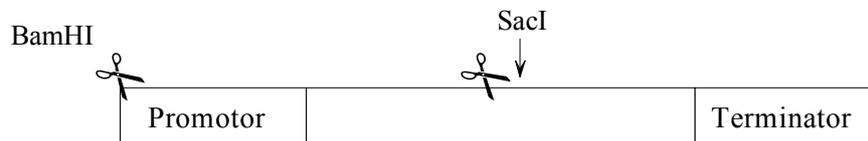
Klonierung in zwei Teilen:

1. Herstellung eines PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Flank BRR5-XhoI und Flank BRR5-BamHI in zwei Ansätzen

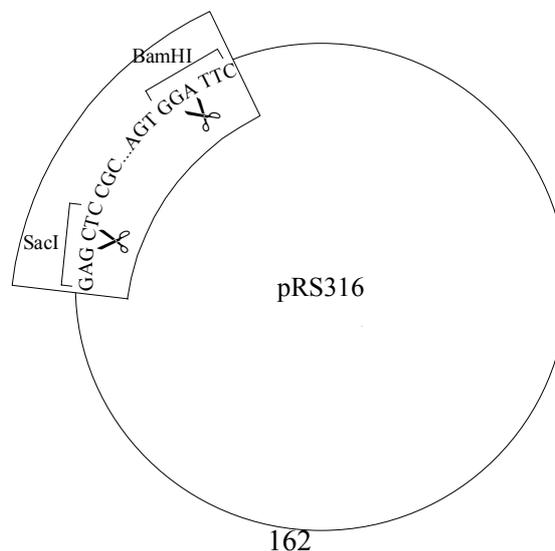
Bedingungen:

Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	30 sek	30 sek
55°C	30 sek	30 sek
68°C	4,5 min	10 min
	30 Zyklen	1 Zyklus

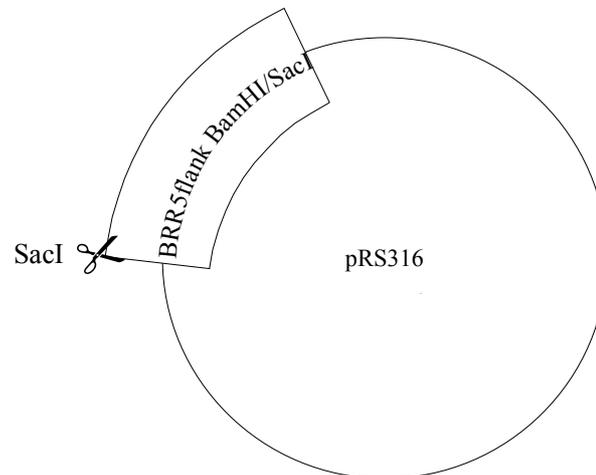
2. Aufreinigung der beiden erhaltenen PCR-Produkte durch Phenolisierung und Fällung
3. Restriktionsverdau des 1. Ansatzes mit den Enzymen BamHI und SacI



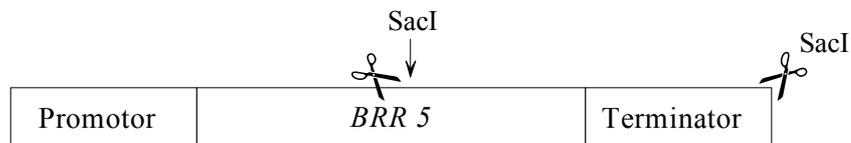
4. Restriktionsverdau des Vektors pRS316 mit den Enzymen BamHI und SacI



5. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese der beiden DNA-Fragmente aus Punkt 3 und 4; Ligation der ausgeschnittenen Gelstücke. Enstandener Klon = *BRR5*flank BamHI/SacI
6. Restriktionsverdau des *BRR5*flank BamHI/Sac-Fragment mit SacI



7. Restriktionsverdau des 2. PCR-Ansatzes (siehe Punkt 1) mit SacI



8. Ligation des *BRR5*flank BamHI/Sac-Fragments aus Punkt 6 mit dem 2. PCR-Produkt
9. Analyse der richtigen Orientierung des 2. PCR-Produktes

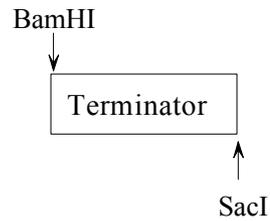
Klonierung der *BRR5* C-terminal verkürzten Mutanten

a) *BRR5 flankΔH*

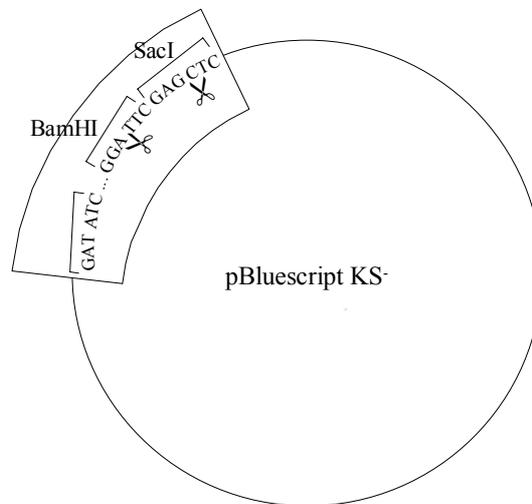
1. Herstellung zweier PCR-Produkte mit den Oligonukleotide Y100-3 und *brr5Mut2* (= *BRR5ΔH*), sowie *brr5Mut1* und *flankbrr5-Xho* (=Terminator)



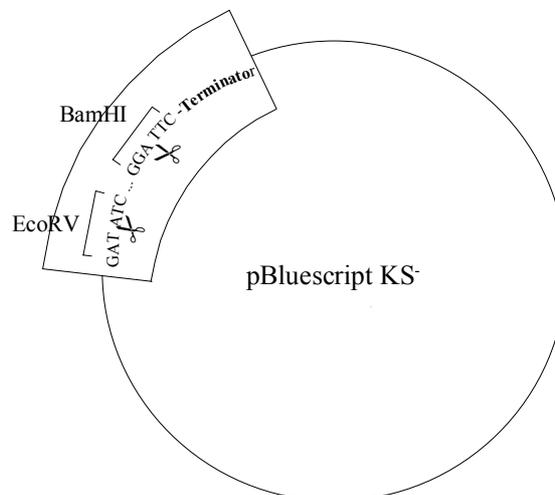
2. Restriktionsverdau des PCR-Produkts: Terminator mit BamHI und SacI



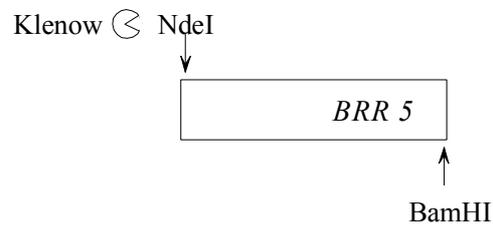
3. Restriktionsverdau des pBluescript-Vektors mit BamHI und SacI



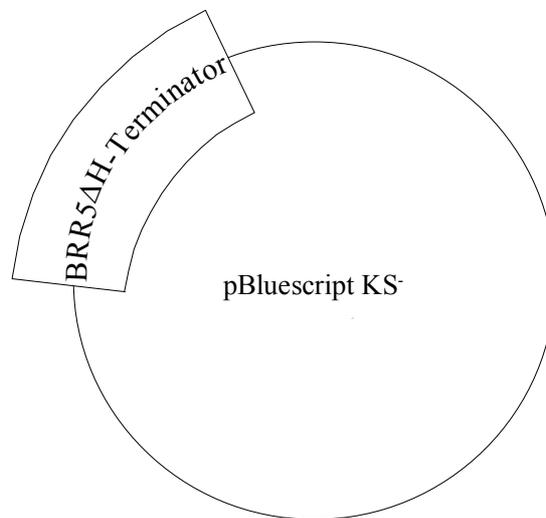
4. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese mit den beiden DNA-Fragmenten aus Punkt 2 und 3
5. Ligation der ausgeschnittenen Gelstücke
6. Restriktionsverdau des erhaltenen pBluescriptKS-Terminator-Plasmids mit BamHI und EcoRV



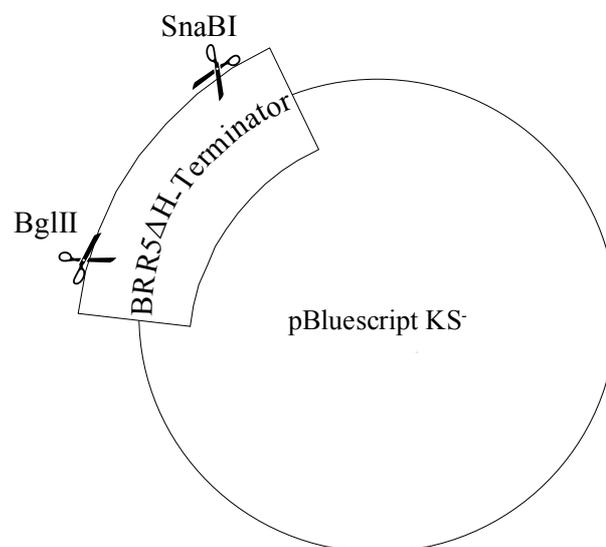
7. Restriktionsverdau des 2. PCR-Produktes *BRR5ΔH* mit NdeI. Klenow-Behandlung des Reaktionsansatzes und erneuter Restriktionsverdau mit dem Enzym BamHI.



8. Ligation des *BRR5ΔH*-PCR-Produktes in das pBluescript-Terminator-Plasmid



9. Restriktionsverdau des pBluescript-*BRR5ΔH*-Terminator mit BglII und SnaBI



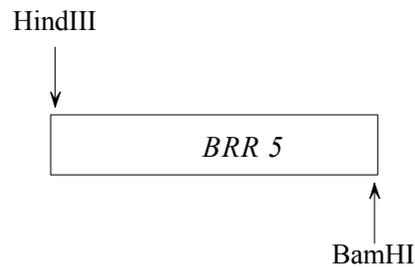
10. Restriktionsverdau des pRS316*BRR5*-flank-Plasmids mit BglIII und SnaBI
11. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese mit den aus Punkt 8 und 9 erhaltenen DNA-Fragmenten und anschließendes Ausschneiden der Gelstücke
12. Ligation der aus Punkt 10 erhaltenen Gelstücke

b) *BRR5 flankΔZ*

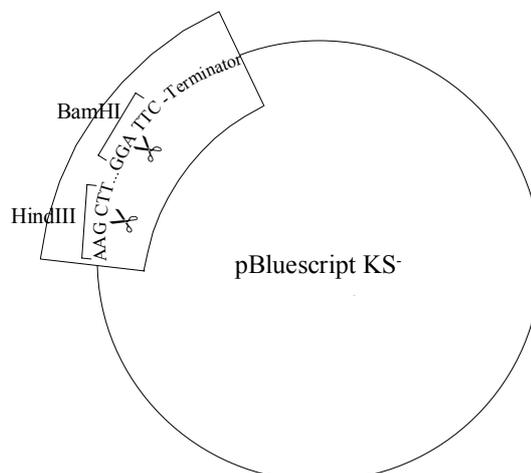
1. Herstellung des PCR-Produktes *BRR5ΔZ* mit den Oligonukleotide Y100-3 und Y100-5



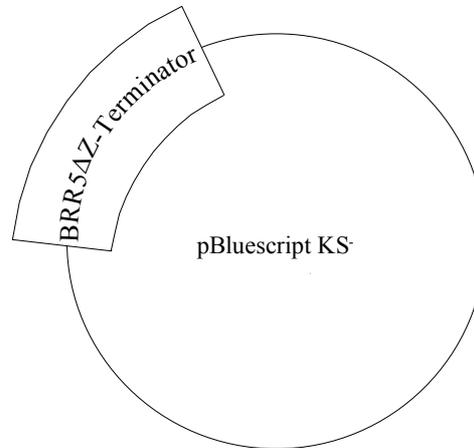
2. Restriktionsverdau des erhaltenen PCR-Produktes (= *BRR5ΔZ*) mit den Enzymen BamHI und HindIII



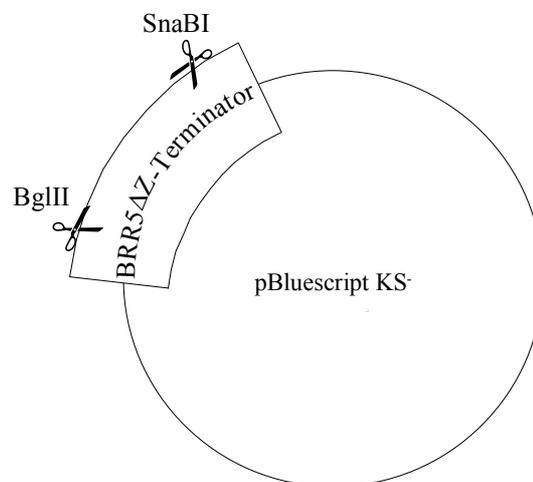
3. Restriktionsverdau des pBluescript-Terminator-Plasmids mit BamHI und HindIII (s. Punkt 7.4.5.).



4. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese der aus Punkt 2 und 3 erhaltenen DNA-Fragmente
5. Ligation der Gelstücke



6. Restriktionsverdau des aus Punkt 5 erhaltenen pBluescript-*BRR5* Δ*Z*-Terminator-Plasmids mit den Enzymen BglII und SnaBI

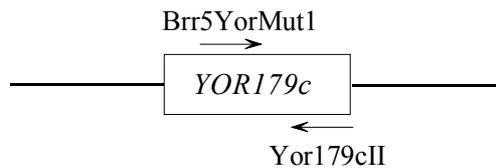


7. Restriktionsverdau des pRS316*BRR5*-flank-Plasmids mit BglII und SnaBI
8. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese mit den aus den Punkten 6 und 7 erhaltenen DNA-Fragmenten
9. Ligation der aus Punkt 8 erhaltenen Gelstücke

7.6 Klonierung der chimären Gene BRR5 Δ YOR179cH und BRR5 Δ YOR179cZ
(Beschreibung zu Kapitel 3.7.2)

a) *BRR5 Δ YOR179cH*

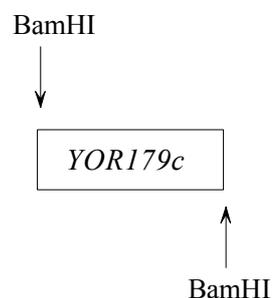
1. Erzeugung eines PCR-Produktes mit den beiden Oligonukleotiden Brr5YorMut1 und Yor179cII. Dieses PCR-Produkt umfasst den gesamten homologen Bereich des YOR179c-Gens.



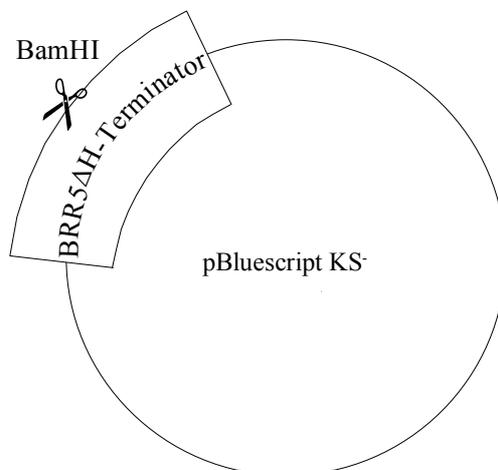
Bedingungen:

Temperatur	Zeitdauer	Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	2 min	94°C	30 sek	30 sek
50°C	30 sek	54°C	30 sek	30 sek
72°C	2 min	72°C	2 min	10 min
	1 Zyklus		30 Zyklen	1 Zyklus

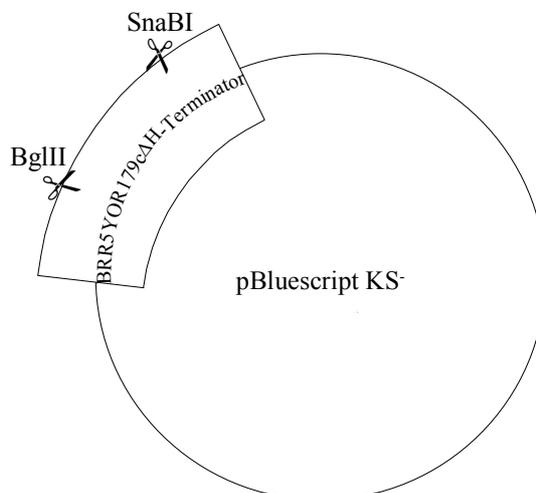
2. Aufreinigung des erhaltenen PCR-Produktes durch Phenolisierung und Fällung
3. Restriktionsverdau des so behandelten PCR-Produktes mit dem Enzym BamHI



- Restriktionsverdau des pBluescript-*BRR5ΔH*-Terminator-Plasmides mit dem Enzym BamHI



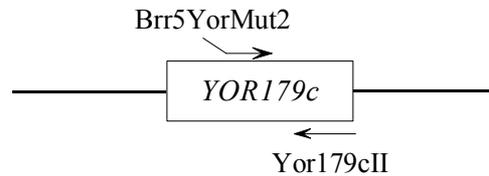
- Low-Melting-Agarosegelelektrophorese der aus Punkt 3 und 4 erhaltenen DNA-Fragmente
- Ligation der beiden Gelstücke
- Orientierungsanalyse des klonierten PCR-Produktes
- Restriktionsverdau des neu erhaltenen Plasmides pBluescript-*BRR5ΔYOR179cH* mit den Enzymen BglII und SnaBI



- Ligation in den pRS316*BRR5*-flank-Plasmid (siehe Punkt 7.4.b) 6)

b) *BRR5 ΔYOR179cZ*

- Herstellung eines PCR-Produktes aus genomischer DNA mit den beiden Oligonukleotiden Brr5YorMut2 und Yor179cII.



Bedingungen:

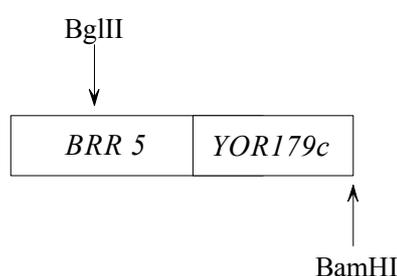
Temperatur	Zeitdauer	Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	2 min	94°C	30 sek	30 sek
50°C	30 sek	54°C	30 sek	30 sek
72°C	2 min	72°C	2 min	10 min
	1 Zyklus		30 Zyklen	1 Zyklus

Der abgeknickte Pfeil, der den Primer Brr5YorMut2 versinnbildlicht, soll andeuten, dass Brr5YorMut2 an seinem 5'-Ende zu dem 3'-Ende des *BRR5*-Gens komplementär ist. Dieser Primer ist also sowohl zu *YOR179c*, als auch zu *BRR5* komplementär. Das erhaltene PCR-Produkt enthält nur den Leucin-Zipper-Anteil des *YOR179c*-Gens.

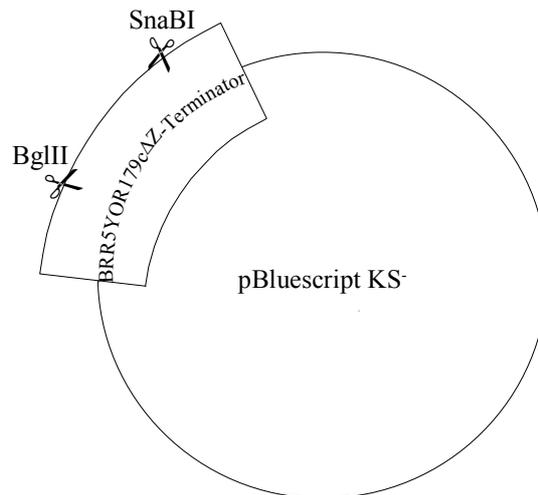
- PCR mit dem aus Punkt 1 erhaltenem DNA-Fragment als Megaprimer und einem weiteren Primer: Yor100-3

Temperatur	Zeitdauer	Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	2 min	94°C	30 sek	30 sek
54°C	30 sek	60°C	30 sek	30 sek
72°C	2 min	72°C	2 min	10 min
	1 Zyklus		30 Zyklen	1 Zyklus

- Restriktionsverdau des erhaltenen PCR-Produkts nach Phenolisierung und Fällung mit den Enzymen BglII und BamHI



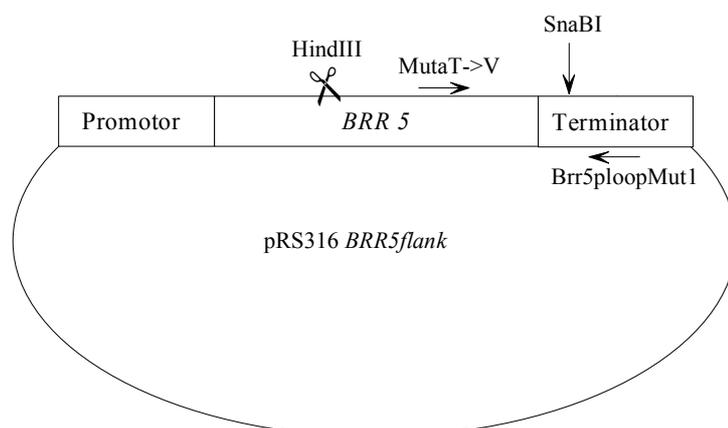
4. Restriktionsverdau des pBluescript-*BRR5ΔH*-Terminator-Plasmides mit den Enzymen BglII und BamHI
5. Nach Low-Melting-Gelelektrophorese des PCR-Produktes (Punkt 3) und des Plasmides pBluescript-*BRR5ΔH*-Terminator (Punkt 4), Ligation der ausgeschnittenen Gelstücke
6. Restriktionsverdau des so erhaltenen neuen Plasmides pBluescript-*BRR5ΔYOR179cZ* mit den Enzymen BglII und SnaBI



7. Ligation in das pRS316 *BRR5*-flank-Plasmid (siehe Punkt 7.4.b) 6)

7.7 Klonierung der Punktmutationen in der p-loop-Domäne des *BRR5*-Gens (Beschreibung des Kapitels 3.7.3)

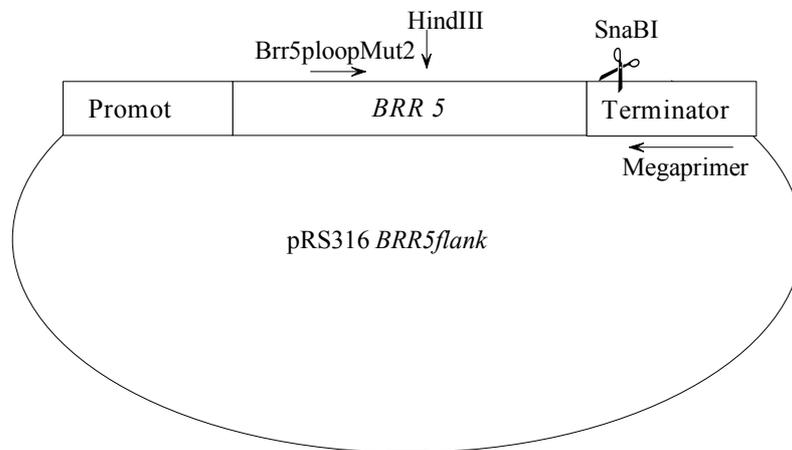
1. Herstellung eines PCR-Produktes mit den beiden Oligonukleotiden Brr5loopMut1 und MutaT->V (dieses enthält das veränderte Triplet) und dem Plasmid pRS316 *BRR5*-flank. Das Plasmid wurde zuvor mit dem Enzym HindIII inkubiert



Bedingungen:

Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	1 min	1 min
55°C	1 min	1 min
72°C	2 min	10 min
	30 Zyklen	1 Zyklus

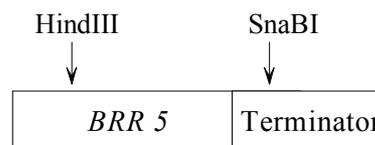
2. Herstellung eines zweiten PCR-Produktes mit dem aus Punkt 1 erhaltenen „Megaprimer“ einem weiteren Oligonukleotid: Brr5loopMut2, sowie dem pRS316*BRR5*-flank-Plasmid, das zuvor mit *Sna*BI inkubiert worden war.



Bedingungen:

Temperatur	Zeitdauer	Zeitdauer
94°C	1 min	1 min
50°C	1 min	1 min
72°C	2 min	10 min
	30 Zyklen	1 Zyklus

3. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde, nach Phenolisierung und Fällung, mit den Enzymen *Hind*III und *Sna*BI inkubiert.



4. Restriktionsverdau des pRS316 *BRR5*flank-Plasmids mit den Enzymen HindIII und SnaBI
5. Low-Melting-Agarosegelelektrophorese mit den aus Punkt 3 und 4 erhaltenen DNA-Fragmenten
6. Ligation der ausgeschnittenen Gelstücke

Mit den Oligonukleotiden MutaK->N, sowie MutaK->H wurden die beiden anderen Mutationsvarianten nach gleichem Schema kloniert

Abkürzungen

AEBSF	4-(2- <u>A</u> minoethyl)- <u>B</u> enzylsulfonylfluorid-Hydrochlorid
Amp	Ampicillin
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<u>C</u> alf <u>I</u> ntestinal <u>P</u> hosphatase)
cpm	gemessene Zerfälle pro Minute (<u>C</u> ounts <u>P</u> er <u>M</u> inute)
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid)
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser, bidestilliert
HEPES	N-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)piperazin-N'-(2- <u>e</u> thansulfonsäure)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<u>h</u> orseradish peroxidase)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	<u>K</u> ilodalton
l	Liter
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht (<u>m</u> olecular <u>w</u> eight)
NH ₃	Ammoniaklösung
mRNA	Boten-RNA (<u>m</u> essenger-RNA)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PEG	<u>P</u> olyethylenglykol

PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	T4-Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure (<u>ribo</u> nucleic <u>a</u> cid)
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>r</u> otations <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
Tris	<u>T</u> rihydroxymethyl-aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheit (<u>U</u> nits)
ÜN	über Nacht
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung (<u>v</u> olume per <u>v</u> olume)
Wasser	Wasser, bidestilliert
w/v	Gewichtsanteil eines Stoffes in einer Lösung (<u>w</u> eight per <u>v</u> olume)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
YPD	Hefe-Extrakt (<u>y</u> east <u>e</u> xtract), Pepton (<u>p</u> eptone), Dextrose

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Sterzer Ulrike
Geburtsort: Altötting
Geburtsdatum: 25. Januar 1971
Familienstand: ledig

Schulbildung:

Grundschule: Grundschule Hirschhorn und Wurmansquick 1977-1981
Gymnasium: Karl von Closen-Gymnasium Eggenfelden 1981-1990
Abschluß: allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung Staatliche Lehranstalt für Pharmazeutisch-technische-Assistenten 09/1990-04/1991

Hochschulstudium

Studium: Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München 05/1991-08/1995
Abschluß: 2. Pharmazeutisches Staatsexamen
Praktikum: -unter der Anleitung von Gabi Stumpf und Herrn Prof. Dr. H. Domdey am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München 11/1995-04/1996
-unter der Anleitung von Frau Angelika Huber in der Borstei-Apotheke, München 05/1996-10/1996
Abschluß: 3. Pharmazeutisches Staatsexamen
Promotion: Anfertigung der Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Domdey am Genzentrum der Ludwig-Maximilian-Universität München 02/1997-12/2000
Thema: „Yor179c – ein neuer mRNA-3'-Prozessierungsfaktor der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“