

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

**Das Dhh1 Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* -  
funktionelle Untersuchungen einer putativen DEAD Box  
RNA Helikase**

von

Karsten Beck

aus

Frankfurt am Main

**München 2002**

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. E.-L. Winnacker betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 31. Oktober 2002

Karsten Beck

Dissertation eingereicht am 31.10.2002

1. Gutachter Prof. Dr. E.-L. Winnacker

2. Gutachter Prof. Dr. H. Domdey

mündliche Prüfung am 18.12.2002

*für meine Eltern*

**„Was ich da sehe, ist nur eine Hülle. Das Eigentliche ist unsichtbar...“**

ANTOINE DE SAINT-EXUPERY

## **DANKSAGUNG**

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1998 bis Oktober 2002 am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker im Labor von Dr. Heidi Feldmann angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit, für die Aufnahme an seinem Institut und die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Genzentrum herzlich bedanken.

Frau Dr. Heidi Feldmann gilt mein besonderer Dank für die Vergabe dieses interessanten Themas, für ihre hervorragende Betreuung, sowie für die stets hilfreiche Unterstützung, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. H. Domdey danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens

Bei den Mitgliedern des Labors 4.55 (Dr. Karin Marbach, Dipl. biol. Andreas Uldschmid, Dipl. biochem. Renate Dombi, Sigrun Jaklin, Dr. Bettina Meier, Dr. Sabine Gauczynski und Regina Knapp) bedanke ich mich für die gute und kameradschaftliche Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Sigrun Jaklin für die Unterstützung bei den Quantifizierungs- und End-joining-Experimenten und die leckeren Eierlikörtorten.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Sigi Kastenmüller, die immer für die Verlängerung meines Vertrages Sorge getragen hat, sowie an Petra Fulde und Renate Schilling, die immer ein offenes Ohr hatten.

Bei Dr. Horst Ibelgaufts möchte ich mich für die vielen interessanten Gespräche und die moralische Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Bei meinen Praktikanten Christian Hellriegel und Inez Heise möchte ich mich für ihre engagierte und motivierte Mitarbeit bedanken.

Prof. Dr. W. Kolanus und besonders Dipl. biol. Bettina Kellersch danke ich für die Bereitstellung der siRNA Oligos und die Tips im Bezug auf RNA Experimente.

Prof. Dr. M. Meisterernst und besonders Gerhard Mittler danke ich für die Überlassung des Swi/Snf-Komplexes und die Hilfestellung bei den ATPase Experimenten.

Herrn Dr. Anton Meinhart danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Korrektur meiner Doktorarbeit

Dipl. biol. Andreas Uldschmid, Dipl. biochem. Karim Jean Armache, Dipl. biol. Luka Perabo und Regina Knapp möchte ich für die Freundschaft danken, die mich auch weit über den Laboralltag hinaus begleitet hat.

Dipl. biochem. Karim Jean Armache gilt ein besonderer Dank, da er meinen englischen Wortschatz wesentlich erweitert hat. Ich wünsche ihm, dass sein Deutsch einmal so gut wird, dass er diese Arbeit auch lesen kann.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir ermöglicht haben, in München zu studieren und die Hoffnung in mich nie aufgegeben haben.



---

# I. INHALTSVERZEICHNIS

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | RNA HELIKASEN IM RNA METABOLISMUS .....   | 1         |
| 1.2      | STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN VON HELIKASEN .....  | 3         |
| 1.3      | HELIKASEN ENTHALTEN ZUSÄTZLICHE STRUKTURMERKMALE ZU DEN FÜR DIE<br>CHARAKTERISIERUNG NÖTIGEN MOTIVEN..... | 6         |
| 1.4      | MECHANISMEN DER NUKLEINSÄURE-ENTWINDUNG .....   | 9         |
| 1.5      | ZELLULÄRE FUNKTIONEN VON RNA HELIKASEN.....   | 11        |
| 1.5.1    | RIBOSOM-BIOGENESE .....   | 13        |
| 1.5.2    | TRANSKRIPTION .....   | 13        |
| 1.5.3    | PRE-MRNA SPLICING.....  | 14        |
| 1.5.4    | RNA EXPORT .....  | 14        |
| 1.5.5    | TRANSLATION.....  | 15        |
| 1.5.6    | RNA ABBAU.....  | 16        |
| 1.6      | AUFGABENSTELLUNG .....  | 19        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL .....</b>   | <b>21</b> |
| 2.1      | BAKTERIENSTÄMME.....  | 21        |
| 2.2      | HEFESTÄMME.....   | 21        |
| 2.3      | PLASMIDE .....  | 23        |
| 2.4      | ENZYME .....  | 24        |
| 2.5      | CHEMIKALIEN.....  | 24        |
| 2.6      | OLIGONUKLEOTIDE .....   | 25        |
| 2.7      | GERÄTE.....   | 25        |
| 2.8      | VERBRAUCHSMATERIALIEN .....   | 26        |
| <b>3</b> | <b>METHODEN.....</b>  | <b>27</b> |
| 3.1      | KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN.....   | 27        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.1.1      | VERMEHRUNG IN FLÜSSIGKULTUR.....                                   | 27        |
| 3.1.2      | ANZUCHT AUF AGARPLATTEN.....                                       | 27        |
| 3.1.3      | STAMMHALTUNG.....  | 28        |
| <b>3.2</b> | <b>KLONIERUNG IN <i>E. COLI</i>.....</b>                           | <b>28</b> |
| 3.2.1      | HERSTELLUNG TRANSFORMATIONSKOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN..... | 28        |
| 3.2.1.1    | Herstellung chemisch-kompetenter E.coli-Zellen.....                | 28        |
| 3.2.1.2    | Herstellung elektrokompeter E.coli.....                            | 29        |
| 3.2.2      | TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> .....                    | 29        |
| 3.2.2.1    | Transformation chemisch-kompetenter E.coli.....                    | 29        |
| 3.2.2.2    | Transformation elektrokompeter E.coli.....                         | 30        |
| 3.2.3      | LIGATION.....  | 30        |
| 3.2.3.1    | Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....                       | 30        |
| 3.2.3.2    | Ligationen von PCR-Fragmenten in den Vektor pZerO™-2.....          | 31        |
| 3.2.4      | ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON PLASMIDEN AUS <i>E. COLI</i> .....    | 31        |
| 3.2.4.1    | Alkalischer Schnellaufschluß.....                                  | 31        |
| 3.2.4.2    | Schnellaufschluß durch Aufkochen (Holmes und Quigley, 1981).....   | 32        |
| 3.2.4.3    | Plasmidreinigung über Qiagen Plasmid Kits.....                     | 32        |
| <b>3.3</b> | <b>DNA-REINIGUNG UND ANALYSE.....</b>                              | <b>33</b> |
| 3.3.1      | REINIGUNG DURCH PHENOLEXTRAKTION.....                              | 33        |
| 3.3.2      | DNA-PRÄZIPITATION.....   | 34        |
| 3.3.2.1    | Ethanol-fällung.....   | 34        |
| 3.3.2.2    | Isopropanol-fällung.....   | 34        |
| 3.3.3      | KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA.....                              | 35        |
| 3.3.4      | AUFTRENNUNG VON DNA DURCH AGAROSE-GELELEKROPHORESE.....            | 35        |
| 3.3.5      | ELUTION VON DNA AUS AGAROSEGELEN.....                              | 36        |
| 3.3.5.1    | Zentrifugation durch Glaswolle.....                                | 36        |
| 3.3.5.2    | Elution der DNA mit dem Qiagen Gel Extraction Kit.....             | 36        |
| 3.3.6      | SEQUENZIERUNG VON DOPPELSTRÄNGIGER DNA.....                        | 37        |
| 3.3.6.1    | Durchführung der Sequenzierungs-Reaktion.....                      | 37        |
| 3.3.6.2    | Polyacrylamid-Sequenzgel-Elektrophorese.....                       | 38        |
| <b>3.4</b> | <b>ENZYMATISCHE REAKTIONEN AN DNA.....</b>                         | <b>39</b> |
| 3.4.1      | RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNA.....                                  | 39        |
| 3.4.2      | AUFFÜLLEN 5' ÜBERHÄNGENDER ENDEN MIT KLENOW DNA-POLYMERASE.....    | 40        |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.4.3      | HERSTELLUNG GLATTER ENDEN MIT T4 DNA-POLYMERASE.....                                  | 40        |
| 3.4.4      | DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE.....                           | 40        |
| 3.4.5      | PCR-AMPLIFIZIERUNG.....   | 41        |
| 3.4.6      | PCR BASIERTE MUTAGENESE VON DNA.....  | 42        |
| <b>3.5</b> | <b>RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA.....</b>  | <b>43</b> |
| 3.5.1      | MARKIERUNG DOPPELSTRÄNGIGER DNA-FRAGMENTE.....  | 43        |
| 3.5.2      | REINIGUNG ÜBER SEPHADEX G50-SÄULEN.....   | 43        |
| 3.5.3      | 5'-ENDMARKIERUNG MIT T4-POLYNUKLEOTIDKINASE.....                                      | 43        |
| <b>3.6</b> | <b>BLOTTING UND HYBRIDISIERUNGSVERFAHREN FÜR DNA.....</b>                             | <b>44</b> |
| 3.6.1      | TRANSFER VON DNA AUF TRÄGERMEMBRANEN.....   | 44        |
| 3.6.1.1    | Kapillar Blot.....  | 44        |
| 3.6.1.2    | Vakuum-Blot.....  | 44        |
| 3.6.2      | TELOMERBLOTS MIT GENOMISCHER HEFE-DNA.....  | 45        |
| 3.6.3      | HYBRIDISIERUNG NACH CHURCH.....   | 45        |
| <b>3.7</b> | <b>ANALYSE VON PROTEINEN.....</b>   | <b>46</b> |
| 3.7.1      | BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION.....  | 46        |
| 3.7.2      | AUFTRENNUNG VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS-POLYACRYLAMID-<br>GELEN.....         | 47        |
| 3.7.3      | WESTERN-BLOT.....   | 48        |
| <b>3.8</b> | <b>HEFEKULTUREN.....</b>  | <b>49</b> |
| 3.8.1      | HEFEMEDIEN.....   | 49        |
| 3.8.2      | ANZUCHT AUF AGARPLATTEN.....  | 50        |
| 3.8.3      | VERMEHRUNG IN FLÜSSIGKULTUR.....  | 50        |
| 3.8.4      | STAMMHALTUNG.....   | 50        |
| 3.8.5      | TROPFTITERTEST.....   | 51        |
| <b>3.9</b> | <b>GENETISCHE METHODEN ZUR KREUZUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON<br/>HEFEZELLEN.....</b> | <b>51</b> |
| 3.9.1      | KREUZUNG HAPLOIDER HEFEZELLEN.....  | 51        |
| 3.9.2      | SPORULATION DIPLOIDER ZELLEN.....   | 52        |
| 3.9.3      | SPORENFREISETZUNG.....  | 52        |
| 3.9.3.1    | Tetradenanalyse.....  | 53        |
| 3.9.4      | PARUNGSTYPBESTIMMUNG.....   | 53        |
| 3.9.5      | SENSITIVITÄTSBESTIMMUNGEN.....  | 53        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>3.10</b> | <b>TRANSFORMATION VON DNA IN HEFEZELLEN .....</b>   | <b>54</b> |
| 3.10.1      | TRANSFORMATION MIT LITHIUMACETAT .....  | 54        |
| 3.10.2      | HOCH-EFFIZIENTE TRANSFORMATIONSMETHODE NACH GIETZ .....                                     | 55        |
| <b>3.11</b> | <b>DNA-ISOLATION AUS HEFEN .....</b>  | <b>56</b> |
| 3.11.1      | ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS HEFEN .....  | 56        |
| 3.11.2      | ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA AUS HEFEN .....  | 57        |
| <b>3.12</b> | <b>PROTEINEXTRAKTE AUS SACCHAROMYCES CEREVISIAE .....</b>                                   | <b>57</b> |
| <b>3.13</b> | <b>PROTEINAUFREINIGUNG VON DHH1P .....</b>  | <b>58</b> |
| 3.13.1      | AUFREINIGUNG MIT DEM IMPACT-SYSTEM VON NEB .....  | 58        |
| 3.13.1.1    | Gelfiltration .....   | 59        |
| 3.13.2      | AUFREINIGUNG DURCH IMMUNOPRÄZIPITATION .....  | 60        |
| <b>3.14</b> | <b>HELIKASE-ASSAYS MIT DHH1P .....</b>  | <b>61</b> |
| 3.14.1      | DNA HELIKASE-ASSAY .....  | 61        |
| 3.14.2      | RNA-HELIKASE ASSAY .....  | 62        |
| <b>3.15</b> | <b>ATPASE-ASSAY MIT DHH1P .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>3.16</b> | <b>IMMUNOFLUORESCENZ .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>3.17</b> | <b>END-JOINING ASSAY .....</b>  | <b>65</b> |
| <br>        |   |           |
| <b>4</b>    | <b>ERGEBNISSE .....</b>   | <b>67</b> |
| <br>        |   |           |
| <b>4.1</b>  | <b>SEQUENZÄHNLICHKEIT DES DHH1 PROTEINS ZU SEINEN HOMOLOGEN IN ANDEREN ORGANISMEN .....</b> | <b>68</b> |
| <b>4.2</b>  | <b>HERSTELLUNG VON DHH1 DELETIONSMUTANTEN .....</b>   | <b>71</b> |
| <b>4.3</b>  | <b>PHÄNOTYPEN VON <i>DHH1</i>Δ-MUTANTEN .....</b>   | <b>74</b> |
| 4.3.1       | WACHSTUMSPHÄNOTYPEN .....   | 74        |
| 4.3.2       | TEMPERATURSENSITIVITÄT .....  | 74        |
| 4.3.3       | EINFLUSS DER <i>DHH1</i> DELETION AUF DIE TELOMERLÄNGE .....                                | 76        |
| 4.3.4       | DNA-REPARATUR PHÄNOTYPEN VON <i>DHH1</i> Δ STÄMMEN .....                                    | 78        |
| 4.3.4.1     | MMS und Bleomycin Sensitivität von <i>dhh1</i> Δ Mutanten .....                             | 78        |
| 4.3.4.2     | Sensitivität von <i>dhh1</i> Δ-Stämmen gegenüber γ-Strahlung .....                          | 82        |
| 4.3.4.3     | NHEJ Kapazität von <i>dhh1</i> Δ-Mutanten .....   | 83        |

---

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>4.4</b> | <b>KOMPLEMENTATIONSSTUDIEN VON <i>DHH1</i>Δ-STÄMMEN MIT DEM MRE11-KOMPLEX .....</b> | <b>86</b>  |
| <b>4.5</b> | <b>LOKALISATION DES DHH1 PROTEINS .....</b>   | <b>88</b>  |
| <b>4.6</b> | <b>ANALYSE DER FUNKTIONELLEN DOMÄNEN VON DHH1P .....</b>                            | <b>89</b>  |
| 4.6.1      | SPORULATIONSFÄHIGKEIT VERSCHIEDENER DHH1P-MUTANTEN .....                            | 94         |
| <b>4.7</b> | <b>IN VITRO ANALYSEN DES DHH1 PROTEINS .....</b>                                    | <b>96</b>  |
| 4.7.1      | AUFREINIGUNG DES DHH1 PROTEINS.....   | 96         |
| 4.7.2      | HELIKASE-AKTIVITÄT DES DHH1 PROTEINS.....   | 98         |
| 4.7.3      | ATP-HYDROLYSE.....  | 101        |
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION.....</b>  | <b>105</b> |
| <b>5.1</b> | <b>DHH1P, EIN REPARATURPROTEIN? .....</b>   | <b>106</b> |
| <b>5.2</b> | <b>FUNKTIONELLE KARTIERUNG VON DHH1P.....</b>                                       | <b>109</b> |
| 5.2.1      | DELETIONEN DES N- UND C-TERMINUS .....  | 110        |
| 5.2.2      | MUTATIONEN DER ATP-BINDESTELLE.....   | 111        |
| 5.2.3      | MUTATION DES SAT-MOTIVES .....  | 112        |
| 5.2.4      | MUTATION DER ATP-BINDESTELLE IN N- UND C-TERMINALEN DELETIONEN.....                 | 113        |
| 5.2.5      | SPORULATIONSFÄHIGKEIT DER VERSCHIEDENEN MUTANTEN .....                              | 114        |
| <b>5.3</b> | <b>IN VITRO ANALYSEN VON DHH1P.....</b>   | <b>115</b> |
| <b>5.4</b> | <b>EINE MÖGLICHE FUNKTION VON DHH1P .....</b>                                       | <b>116</b> |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>121</b> |
| <b>7</b>   | <b>ANHANG.....</b>  | <b>123</b> |
| <b>7.1</b> | <b>ACCESSION NUMBERS: .....</b>   | <b>123</b> |
| <b>7.2</b> | <b>VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE.....</b>  | <b>123</b> |
| <b>7.3</b> | <b>KLONIERUNG DER SINGLE-COPY EXPRESSIONEN DER VERKÜRZUNGEN VON DHH1P .....</b>     | <b>126</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>7.4 Klonierung der C-terminalen Intein Fusion von DHH1P mit dem Impact-System (NEB) .....</b> | <b>127</b> |
| <b>8 Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>129</b> |

## II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Abb. 1-1</b>  | RNA Chaperone destabilisieren Helices. Sie entfalten falsche RNA-Strukturen und geben der RNA mehr Möglichkeiten ihren nativen Zustand zu erreichen (nach Lorsch, 2002). ....  | 2  |
| <b>Abb. 1-2</b>  | Zelluläre Prozesse (rot), in die RNA Helikasen involviert sind (nach de la Cruz <i>et al.</i> , 1999). ....  | 3  |
| <b>Abb. 1-3</b>  | Molekulare Struktur der Kernbereiche von RNA Helikasen. Die konservierten Motive I, Ia, II, III, IV, V und VI und deren mögliche biologische Funktion sind in den farbigen Kästen dargestellt (abgeleitet von Untersuchungen am translation initiation factor eIF4A). Identische Reste sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Reste mit einer Konservierung von >50 % in Kleinbuchstaben. Variable Längen der N- und C-Termini sind angegeben. Die grauen Kästen zeigen ein Motiv, das in DEAD Box Proteinen konserviert, dessen biologische Funktion aber noch nicht geklärt ist (nach de la Cruz <i>et al.</i> , 1999). ....  | 4  |
| <b>Abb. 1-4</b>  | Kristallstruktur der HCV RNA Helikase NS3. (a)+(b) Frontansicht, (c) Seitenansicht. Die Domäne 1 ist in blau, Domäne 2 in grün dargestellt. Motiv III, welches eine sog. Scharnierfunktion ausübt, ist in orange dargestellt. Domäne 3, die vom Carboxy-Terminus des Proteins gebildet wird ist grau eingezeichnet (nach de la Cruz <i>et al.</i> , 1999). ....  | 5  |
| <b>Abb. 1-5</b>  | Rep-ähnliche und UvrD-ähnliche DNA Helikasen sind durch Insertionen charakterisiert, die als Domäne 1b und 2b bezeichnet werden. Zusätzlich findet sich das DNA Helikase spezifische Motiv IV* (Korolev <i>et al.</i> , 1998). ....  | 7  |
| <b>Abb. 1-6</b>  | Topologische Diagramme von DNA und RNA Helikasen. In gelb sind die konservierten RecA-ähnlichen „Kerne“ eingezeichnet. In rot variable Strukturelemente in Domänen mit einem RecA-ähnlichen Kern. Grün und blau sind zusätzliche strukturelle Domänen gekennzeichnet. Das Schema oben links fasst die Positionen der sieben konservierten Domänen nach Gorbalenya und Koonin, 1993, innerhalb der Topologie des RecA-ähnlichen Kerns zusammen. Zusätzliche Motive, die helikasespezifisch sind, sind in Klammern gezeigt (nach Caruthers und McKay, 2002). ....  | 8  |
| <b>Abb. 1-7</b>  | Schematische Darstellung der Helikase Motive in den Helikasen der Superfamilie 1 und 2. Es sind die Interaktionen der Motive untereinander und mit ATP bzw. dem Oligonukleotid gezeigt. Dicke Linien zeigen Interaktionen, die universell in diesen Familien sind. Die gepunkteten Pfeile zeigen Interaktionen von bestimmten Proteinen, die aber auch spezifisch für bestimmte Helikase Familien sein könnten (nach Caruthers und McKay, 2002). ....  | 9  |
| <b>Abb. 1-8</b>  | Mögliche Modelle für die Funktionsweise von Helikasen. Im „rolling model“ bindet eine oligomere Helikase abwechselnd an die einzel- und doppelsträngige Nukleinsäure. Dabei haben Proteine, an die ATP gebunden ist eine höhere Affinität für die doppelsträngige Nukleinsäure. Beim „snow-plough model“ (Schneepflug-Modell) wandert die RNA Helikase entlang der Gabel und benutzt dabei die Energie der NTP Hydrolyse, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäuren aufzuschmelzen. Beim „passive model“ kann die Denaturierung durch ein ssRNA bindendes Protein bewirkt werden, das die thermale Fluktuation der RNA fixiert. Die Bewegung des ssRNA bindenden Proteins entlang der einzelsträngigen Nukleinsäure würde dann in einer ATP-abhängigen Reaktion verlaufen (nach Linder und Daugeron, 2000). .... | 10 |
| <b>Abb. 1-9</b>  | Detailliertere Darstellung der Beteiligung von RNA Helikasen (gelb) an Prozessen aus Abb. 1-2. (a) Ribosomen Biogenese, (c) Splicing, (d) RNA Reifung, (e) RNA Export, (f) Translation, (g) RNA Abbau. Wichtige nicht Helikasen sind in grün oder blau dargestellt. MRP, RNase MRP; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; U1-U6, small nuclear RNAs. (b) basiert auf veralteten Daten (siehe Text) (nach de la Cruz <i>et al.</i> , 1999). ....   | 12 |
| <b>Abb. 1-10</b> | Kompartimentalisierung der RNA Helikasen Dob1p und Ski2p, die bei der 3'-5' exonukleolytischen Aktivität des Exosom-Komplexes im Kern bzw. Zytoplasma mitwirken. Beim Fehlen von Dob1p oder Ski2p akkumulieren die RNA Substrate, da der Exosom-Komplex durch die Sekundärstrukturen blockiert wird (nach de la Cruz <i>et al.</i> , 1999). ....   | 19 |
| <b>Abb. 4-1</b>  | Schematische Darstellung der konservierten Aminosäure Regionen der DEAD Proteinfamilie (Koonin, 1991; Schmid und Linder, 1992). Die hochkonservierten Regionen sind fett dargestellt. Die römischen Zahlen unter den Kästen geben die Nomenklatur nach Hodgman, 1988 an. X steht für eine beliebige Aminosäure. ....   | 68 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Abb. 4-2</b>  | Aminosäuresequenz des Dhh1 Proteins. Der hoch konservierte Kernbereich des Proteins ist in blau dargestellt. In rot sind die hochkonservierten RNA Helikase Motive gezeigt. Zur besseren Orientierung wurden die römischen Zahlen von Abb. 4-1 untergelegt. Die sich zu den Homologen aus <i>Xenopus laevis</i> , <i>Mus musculus</i> und <i>Homo sapiens</i> N-terminal und C-terminal unterscheidenden Aminosäuresequenzen sind in grün dargestellt. ....  | 69 |
| <b>Abb. 4-3</b>  | Alignment der Proteinsequenz von Dhh1p zu seinen homologen in <i>S. pombe</i> (Ste13p), <i>Drosophila melanogaster</i> (Me31B), <i>Xenopus laevis</i> (Xp54), <i>Mus musculus</i> (mmRCK) und <i>Homo sapiens</i> (hRCK). Das als Prototyp der DEAD Box Helikasen klassifizierte eIF4A ist mit aufgeführt. Mit blauem Hintergrund markiert sind die konservierten, in grau die homologen Motive dargestellt. Die für die Klassifikation als DEAD Box Helikase ausschlaggebenden Motive (rot) sind in allen Proteinen im Kernbereich gelegen. ....  | 70 |
| <b>Abb. 4-4</b>  | PCR gerichtete Gendeletion. Vom Plasmid wird das Marker-Gen mit zwei Primern, deren 3' Bereich homolog zum Plasmid und deren 5'-Bereich homolog zum Genom ist amplifiziert. Um die zum Hefegenom homologen Bereiche zu verlängern, wird das 1. PCR Produkt einer weiteren PCR unterzogen. ....   | 72 |
| <b>Abb. 4-5</b>  | Analytische PCR von <i>dhh1Δ</i> -Stämmen. <b>A:</b> Schematische Darstellung der Primer DHH1-ΔHis-Kontrolle und PCR-Kontrolle His3MX und deren Bindungsstellen in den jeweiligen Promotor- bzw. Markergenbereichen. Die zu erwartenden Fragmentgrößen des PCR-Produktes betragen im Falle des Wildtypstammes 0 Basenpaare, respektive 551 Basenpaare im Falle des deletierten Stammes <i>dhh1Δ</i> -His3MX. <b>B:</b> 1-8 Analyse der vier Sporen zweier Tetraden von CenPK2α bei denen jeweils ein Allel von <i>DHH1</i> mit His3MX deletiert wurde. 9-16 Analyse der vier Sporen zweier Tetraden von CenPK2αUαL. .... | 73 |
| <b>Abb. 4-6</b>  | Tetradenanalyse von heterozygoten <i>dhh1Δ</i> Stämmen. Das linke Bild zeigt <i>dhh1Δ</i> Mutanten, die im Stamm CenPK2, das rechte <i>dhh1Δ</i> Mutanten, die im Stamm W303 generiert wurden. Die haploiden <i>dhh1Δ</i> Mutanten sind deutlich durch die Ausbildung kleinerer Kolonien zu erkennen. ....   | 74 |
| <b>Abb. 4-7</b>  | Temperatursensitivität von <i>dhh1Δ</i> Mutanten. Das linke Bild zeigt Verdünnungsreihen der angezeichneten Stämme, die bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert wurden. Das rechte Bild zeigt die selben Stämme bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. ....   | 75 |
| <b>Abb. 4-8</b>  | Telomerblot von <i>dhh1Δ</i> -Stämmen. Alle Stämme wurden 15x umgestrichen, was einer Generationszahl von ~375 entspricht. Die <i>dhh1Δ</i> -Stämme sind mit Pfeilen am unteren Rand gekennzeichnet. Man kann deutlich erkennen, dass <i>dhh1Δ</i> -Stämme keine Verkürzung der Telomere zeigen. Am linken Rand sind sog. Y'-Elemente, ein repetetiver Bereich in der subtelomeren Region, mit einem Pfeil markiert. Links unten sind die GT-Repeats markiert, die ein Maß für die Länge der Telomere darstellen. Am Beispiel des W303yku-Stammes ist die Y'-Amplifikation sehr gut zu erkennen. ....                    | 78 |
| <b>Abb. 4-9</b>  | Tropftitertest von <i>dhh1Δ</i> -Stämmen auf YPD-Platten, die die DNA schädigenden Substanzen Bleomycin und MMS in den angegeben Konzentrationen enthielten. ....  | 79 |
| <b>Abb. 4-10</b> | Quantifizierung der Sensitivitäten von <i>dhh1Δ</i> -Stämmen gegenüber Bleomycin und MMS. Die <i>dhh1Δ</i> -Stämme zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Bleomycin und MMS verglichen mit dem Wildtyp und dem <i>yku70</i> -Stamm. Bei der <i>dhh1Δ/yku70</i> Doppelmutante ist ein additiver Effekt zu beobachten. ....  | 80 |
| <b>Abb. 4-11</b> | Quantifizierung der Sensitivitäten von <i>dhh1Δ</i> -Stämmen gegenüber UV-Strahlung. Die <i>dhh1Δ</i> -Stämme zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Strahlung verglichen mit dem Wildtyp und dem <i>yku70</i> -Stamm. Bei der <i>dhh1Δ/yku70</i> Doppelmutante ist hier kein additiver Effekt zu beobachten. ....  | 81 |
| <b>Abb. 4-12</b> | Bestrahlung von <i>dhh1Δ</i> Mutanten mit γ-Strahlung. Die obere Reihe zeigt logarithmisch wachsende Ausgangsstämme, die untere Reihe zeigt Stämme, die bis zur stationären Phase wachsen gelassen wurden, bevor sie bestrahlt wurden. Die linke Spalte ist die unbestrahlte Kontrolle, die rechte zeigt Stämme, die mit 500 Gy bestrahlt wurden. <i>dhh1Δ</i> Stämme zeigen keine Sensitivität gegenüber γ-Strahlung. ....  | 83 |
| <b>Abb. 4-13</b> | Schematische Darstellung der Vorgänge beim NHEJ. In das Plasmid pRS314 wurde ein Ura3-Gen aus <i>Candida albicans</i> kloniert und mit <i>EcoRI</i> im Ura3-Gen linearisiert. Durch die Wahl dieses Marker-Gens kann die Hefe das Plasmid nicht über homologe Rekombination reparieren. Ist der NHEJ-Apparat intakt, wird ein solches linearisiertes Plasmid fehlerfrei und mit nahezu 100 % Effizienz repariert. Ist der NHEJ-Apparat defekt, findet ein sogenannter  |    |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
|                  | „error-prone“ Reparaturweg statt. Mit Hilfe dieses Systems kann man die Auswirkungen einer Deletions- oder Punktmutante auf das NHEJ untersuchen. ....  | 84 |
| <b>Abb. 4-14</b> | Ergebnis des End-joining Assays. <i>dhh1</i> Δ-Mutanten zeigen eine deutliche Reduktion in der Effizienz der Rezirkularisierung eines linearisierten Plasmids. Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm beträgt die Effizienz bei der W303 <i>dhh1</i> Δ Mutante nur 19,2 %. Beim CenPK2 <i>dhh1</i> Δ Stamm beträgt sie 17,1 %. Die als Vergleich mitgeführte W303 <i>yku70</i> Mutante zeigt nur eine Effizienz von 6,4 % .....   | 85 |
| <b>Abb. 4-15</b> | Überexpression des Mre11-Komplexes und seiner Untereinheiten in <i>dhh1</i> Δ-Stämmen. Die verwendeten Abkürzungen sind wie folgt: <b>M</b> : pAU Mre11, <b>R</b> : pAT Rad50, <b>X</b> : pAL Xrs2 und ihre Kombinationen. Die Überexpression von Rad50 und Xrs2 hat einen negativen Effekt auf die Sensitivitäten von <i>dhh1</i> Δ-Stämmen gegenüber den DNA-schädigenden Substanzen Bleomycin und MMS. Exprimiert man Rad50 zusammen mit Mre11, ist die Sensitivität ähnlich der alleinigen Rad50 Überexpression. Wird Rad50 zusammen mit Xrs2 überexprimiert, heben sich die Effekte wieder auf. Alle anderen Kombinationen haben keinen Einfluss auf die Sensitivität des <i>dhh1</i> Δ-Stammes..... | 87 |
| <b>Abb. 4-16</b> | Western-Blot Analyse des Dhh1-13myc Fusionsproteins. Es wurden vier unabhängige Klone untersucht. Als Kontrolle diente der Yku80-13myc Stamm, sowie ein Wildtyp-Stamm. Das Yku80-13myc Protein und das Dhh1-13myc Protein sind mit einem Pfeil markiert. Der Blot wurde mit dem anti-myc Antikörper 9E10 inkubiert und die Banden durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.....  | 88 |
| <b>Abb. 4-17</b> | Immunofluoreszenz von 13-myc getagtem Dhh1p. In der oberen Reihe sind Zellen, in denen chromosomal mit einem am C-Terminus fusionierten 13-myc Tag versehenes Dhh1p exprimiert wurde. Das erste Bild zeigt die Zellen mit einem anti-myc Antikörper (9E10) abgegriffen. Im zweiten Bild ist die DNA mit Propidiumjodid angefärbt. Das dritte Bild zeigt die Überlagerung der beiden ersten. In der zweiten Reihe ist die selbe Anordnung für den Wildtyp-Stamm ohne getagtes Dhh1p gezeigt. Man kann erkennen, dass Dhh1p nicht im Zellkern lokalisiert ist.....  | 89 |
| <b>Abb. 4-18</b> | Schematische Darstellung der verschiedenen Deletionen und Punktmutationen, die von Dhh1p generiert wurden. <b>N60</b> : N-terminale Verkürzung um 60bp, entspricht 20 AA, <b>C244</b> : C-terminale Verkürzung um 244bp, entspricht 80 AA, <b>N60 C244</b> : Kombination aus beiden, <b>K96R</b> : Mutation des Lys96 in Arg96, <b>K96N</b> : Mutation des Lys96 in Asn96, <b>AAA</b> : Mutation des SAT-Motivs in AAA. Alle Mutanten wurden sowohl single-copy in den pRS315 Vektor unter eigenem Promotor, als auch überexprimiert in den pAL Vektor unter Kontrolle des ADH-Promotors kloniert.....  | 90 |
| <b>Abb. 4-19</b> | Komplementation der Sensitivitäten von <i>dhh1</i> Δ-Stämmen mit N-, C- und N-C-terminal trankiertem Dhh1p. <b>A</b> : Komplementation mit dem Wildtyp-Gen, sc: single-copy, <b>ÜE</b> : Überexpression, <b>B</b> : Expression der Trankierungen unter DHH1 eigenem Promotor. <b>C</b> : Überexpression der Trankierungen unter dem ADH-Promotor.....   | 91 |
| <b>Abb. 4-20</b> | Komplementation der Sensitivitäten von <i>dhh1</i> Δ-Stämmen mit ATPase A-Mutanten. <b>A</b> : Komplementation mit dem Wildtyp-Gen, sc: single-copy, <b>ÜE</b> : Überexpression, <b>B</b> : Expression der K96N (gelb) und K96R (rot) Punktmutation unter DHH1 eigenem Promotor. <b>C</b> : Überexpression der K96R Punktmutation unter dem ADH-Promotor. ....  | 92 |
| <b>Abb. 4-21</b> | Komplementation der Sensitivitäten von <i>dhh1</i> Δ-Stämmen mit N, C, NC- und ATPase A-Mutanten. <b>A</b> : Komplementation mit dem Wildtyp-Gen, sc: single-copy, <b>ÜE</b> : Überexpression, <b>B</b> : Expression der DHH1 N60K96R, K96RC244 und N60K96RC244 Doppelmutationen unter DHH1 eigenem Promotor. <b>C</b> : Überexpression der unter B erwähnten Doppelmutationen unter dem ADH-Promotor.....  | 93 |
| <b>Abb. 4-22</b> | Komplementation der Sensitivitäten von <i>dhh1</i> Δ-Stämmen mit der AAA-Mutante. <b>A</b> : Komplementation mit dem Wildtyp-Gen, sc: single-copy, <b>ÜE</b> : Überexpression, <b>B</b> : Expression der DHH1 AAA Mutante unter DHH1 eigenem Promotor. ....   | 94 |
| <b>Abb. 4-23</b> | Analyse der Auswirkung einer Mutation im Dhh1 Protein auf die Fähigkeit zur Sporulation diploider homozygoter <i>dhh1</i> Δ-Stämme.....   | 95 |
| <b>Abb. 4-24</b> | Schematische Darstellung der Aufreinigung mit dem IMPACT-System. In dieser Arbeit wurde nur die C-terminale Fusion verwendet. (Quelle: www.neb.com).....  | 97 |
| <b>Abb. 4-25</b> | <b>A</b> : 12 %iges Polyacrylamidgel zur Analyse der Aufreinigung von rekombinantem Dhh1p mit dem IMPACT-System aus einer mit 0,5 mM IPTG induzierten <i>E.coli</i> TOP10F'-Kultur. Es wurden 20 µl der Fraktionen von der Chitin-Sepharose aufgetragen. <b>M</b> : Größenmarker, die   |    |

Größen sind links angegeben, S: Auftrag der Chitin-Sepharose vor der Elution. **B**: 12 %iges Polyacrylamidgel der Gelfiltration der vereinten Fraktionen von Dhh1p aus A. Es wurden jeweils 20 µl der angegebenen Fraktion aufgetragen. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt..... 98

**Abb. 4-26** Schematische Darstellung der Substratentwindung beim DNA Helikase Assay. Durch die Zugabe der Helikase wird das am 5'-Ende mit <sup>32</sup>P markierte 17-mer von der M13-ssDNA entwunden. Dies kann durch PAA-Gelelektrophorese und anschließende Autoradiographie (rechts) sichtbar gemacht werden. .... 99

**Abb. 4-27** Helikase-Aktivität von Dhh1p auf dsDNA. A: Bestimmung der Protein- und Magnesiumchlorid Mengen. B: Helikase Assay mit dem Leervektor (\*: nachdem kein Protein nachweisbar war, wurden in den Versuch die gleichen Volumina eingesetzt, wie bei der das Protein enthaltenden Fraktion). C: Helikase Assay mit durch Gelfiltration gereinigtem Dhh1p..... 100

**Abb. 4-28** Analyse der RNA-Helikase Aktivität von Dhh1p. A: Untersuchung des siRNA Substrats auf Vollständigkeit der Hybridisierung. (AS: <sup>32</sup>P-markiertes anti-sense Oligonukleotid alleine (500 fmol), AS-S: Mit dem sense Oligonukleotid hybridisiertes AS Oligonukleotid (2 pmol), AS-S 90°C: AS-S Duplex vor dem Auftrag 5 min bei 90° denaturiert (2 pmol)) **B**: RNA-Helikase Assay mit steigenden Mengen an Dhh1p aus der IMPACT-Reinigung. K0: Kontrolle ohne Protein, K98: Hitze denaturierte siRNA. Es wurden jeweils 2 pmol Substrat eingesetzt. .... 101

**Abb. 4-29** Western-Blot der Immunopräzipitation von 13-myc getagtem Dhh1p. Es wurden jeweils 20 µl der Sepharose-Beads auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen, das Gel geblottet und die Membran mit einem anti-myc Antikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits von NEB. -AK Dhh1p C-13myc: 13-myc getagter Dhh1p Rohextrakt mit Sepharose-Beads ohne Antikörper inkubiert, -AK Dhh1p wt: Wildtyp Rohextrakt mit Sepharose-Beads ohne Antikörper inkubiert, +AK -Rohextrakt: Mit Antikörper beladene Sepharose-Beads alleine. .... 102

**Abb. 4-30** ATPase-Assays: A: FPLC gereinigte Proteine, K0: Kontrolle ohne Protein, Kontrolle Dhh1p C-13myc: Kontrolle mit Protein ohne Nukleinsäure, KdsDNA, KssDNA, KRNA: Kontrollen ohne Protein nur mit den entsprechenden Nukleinsäuren, K+: Kontrolle mit dem Transkriptionsfaktor. B: Durch Immunopräzipitation aufgereinigte Proteine, die Kontrollen sind identisch zu A, -AK Dhh1p wt: Wildtyp Rohextrakt mit Sepharose-Beads ohne Antikörper inkubiert, -AK Dhh1p C-13myc: 13-myc getagter Dhh1p Rohextrakt mit Sepharose-Beads ohne Antikörper inkubiert. Es wurden jeweils 2 µl des Reaktionsansatzes auf die DC Platte aufgetropft. In keinem der beiden Versuche konnte eine ATPase Aktivität des Dhh1 Proteins festgestellt werden. .... 103

**Abb. 5-1** Eine mögliche Funktion von Dhh1p. Dhh1p als Bestandteil des Deadenylierungskomplexes interagiert nach Beendigung der Deadenylierung mit dem Decapping Protein Dcp1p und aktiviert dadurch die Abspaltung der 5' Cap-Struktur. **A**: Durch räumliche Interaktion **B**: Durch einen Dissoziations-Assoziations-Mechanismus. Möglicherweise wird die Aktivierung durch die Interaktion mit den *trans* agierenden Aktivatoren Pat1p und Lsm1p-Lsm7p verstärkt (grüne Pfeile). Nähere Erläuterungen siehe Text..... 118

**Abb. 7-1** Klonierung der single-copy Trankierungen am Beispiel von C244. Der DHH1-Promotor (blau) wurde mit den Primern Dhh1/1 und DHH1/2 amplifiziert, die eine 5'-*Xho*I und 3'-*Sma*I Schnittstelle anhängen. Dieses Fragment wurde über die *Xho*I und *Sma*I Schnittstellen des pRS315 Vektors kloniert. Die DHH1 C244 Trankierung (grün) wurde durch die Primer DHH1-*Nde*I-FOR und DHH1C244-*Xba*I-REV amplifiziert und dann in die *Sma*I und *Xba*I Schnittstellen des pRS315 DHH1 Promotor Plasmids kloniert. .... 126

**Abb. 7-2** Der DHH1 ORF (blau) wurde mit den Primern DHH1-*Nde*I-FOR und DHH1-*Sma*I-Rev in einer PCR amplifiziert, wobei die *Nde*I und *Sma*I Schnittstelle angehängt wurden. Dieses Fragment wurde über die *Nde*I und *Sma*I Schnittstelle in den Vektor pCYB2 (NEB) kloniert, woraus eine in frame Fusion mit dem Intein (rot) entstand. .... 127

### III. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

|        |  |
|--------|--|
| °C     | Grad in Celsius                                  |
| µg     | Mikrogramm                                       |
| µl     | Mikroliter                                       |
| Amp    | Ampicillin                                       |
| APS    | Ammoniumperoxodisulfat                           |
| AS     | Aminosäure                                       |
| ATP    | Adenosin-5'-triphosphat                          |
| BCIP   | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-1-phosphat            |
| bp     | Basenpaare                                       |
| BPB    | Bromphenolblau                                   |
| BSA    | Rinderserumalbumin                               |
| Ci     | Curie (1 Ci = 3,7 x 10 <sup>10</sup> Bequerel)   |
| CIA    | Chloroform/Isoamylalkohol                        |
| cpm    | Zerfälle pro Minute                              |
| dNTP   | Desoxynukleotid-5'-triphosphat                   |
| DTT    | Dithiothreitol                                   |
| EDTA   | Ethylendiamintetraessigsäure                     |
| EtOH   | Ethanol  |
| fmol   | Femtomol   |
| g      | Gramm  |
| Gy     | Gray   |
| h/Std. | Stunde   |
| HEPES  | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure |
| kb     | Kilobasenpaare                                   |
| kDa    | Kilodalton                                       |
| M      | Mol/Liter  |
| mA     | Milliampere                                      |
| mg     | Milligramm                                       |
| min    | Minute   |
| ml     | Milliliter                                       |

|       |   |
|-------|---|
| mM    | millimolar                                      |
| MOPS  | 3-N-Morpholino-Propan-sulfonsäure               |
| NBT   | Nitroblau-Tetrazolium                           |
| ng    | Nanogramm                                       |
| nm    | Nanometer                                       |
| NP 40 | Nonidet-P40                                     |
| nt    | Nukleotide                                      |
| OD    | Optische Dichte                                 |
| PAA   | Polyacrylamid                                   |
| PEG   | Polyethylenglykol                               |
| pfu   | "Plaque forming unit"                           |
| PIPES | Piperazin-N,N'-[2-ethansulfonsäure]             |
| pmol  | Pikomol   |
| PMSF  | Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid                  |
| RT    | Raumtemperatur                                  |
| SDS   | Natrium-Dodecylsulfat                           |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin                |
| TMB   | Tetramethylbenzidin                             |
| Tris  | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan                |
| Upm   | Umdrehungen pro Minute                          |
| UV    | Ultraviolett                                    |
| V     | Volt  |
| XC    | Xylencyanol                                     |
| X-Gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-b-D-Galakto-pyranosid |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 RNA Helikasen im RNA Metabolismus

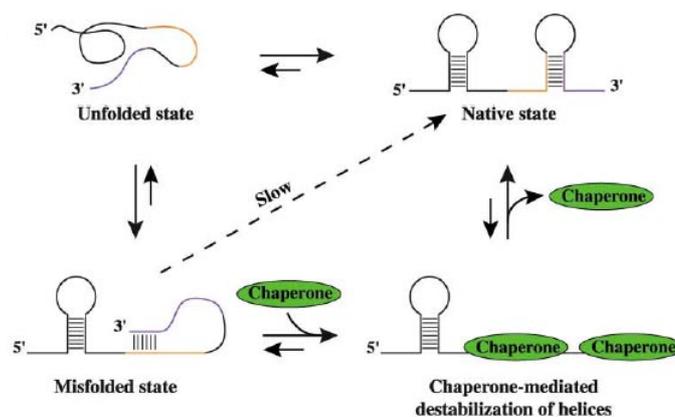
„RNA has a problem.“ (Lorsch, 2002) Dieser Satz ist mittlerweile zum Mantra der stetig wachsenden Gemeinschaft von Forschern geworden, die sich mit Sekundärstrukturen von RNA beschäftigen.

RNA Moleküle haben informative, strukturelle und katalytische Funktionen. Abhängig von ihrer speziellen zellulären Aufgabe können sie als langkettige Einzelstränge vorliegen oder spezielle tertiäre Strukturen annehmen. Darin liegt das oben genannte Problem. Aufgrund der einfachen Zusammensetzung von RNA Molekülen ist es für sie einfach, Strukturen auszubilden. Um eine doppelhelikale Region zu formen, ist lediglich eine kurze Abfolge von Basen, die eine Watson-Crick Paarung eingehen können nötig. Die einfache Zusammensetzung von RNA erhöht die Chancen, bestimmte komplementäre Bereiche zu einer gewissen Basenabfolge zu finden. Diese steigen mit der Länge des RNA Moleküls.

Da RNA auch andere als Watson-Crick Paare ausbilden kann, besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, stabile Strukturen auszubilden. Dies führt zu einer strukturellen Verworrenheit und dadurch sind RNA Moleküle geneigt in kinetische Fallen zu tappen, wenn sie die Struktur mit der niedrigsten Energie ausbilden (Treiber und Williamson, 2001). Diese kinetischen Fallen sind alternierende sekundär (oder tertiär) Strukturen, die, wegen der Energie die nötig ist, die falschen (nicht-nativen) Basenpaare aufzubrechen, eine lange Lebenszeit haben (Abb. 1-1). Diesen Effekt kann man sowohl bei kleinen RNA Molekülen wie tRNAs (Herschlag, 1995) als auch bei größeren RNAs wie z.B. Gruppe I Intron-RNAs beobachten (Treiber und Williamson, 2001; Woodson, 2000).

Damit RNAs nicht die thermodynamisch stabilste, sondern ihre native Struktur ausbilden können, müssen Proteine mitwirken. Proteine, können die RNA Strukturausbildung erleichtern, indem sie falsche Strukturen verhindern oder umkehren (Lorsch, 2002) (Abb. 1-1). Karpel *et al.* führten (1982) Experimente durch, die zeigten, dass bestimmte Proteine *in vitro* RNAs, die eine falsche Struktur ausgebildet hatten, entfalten konnten. Das aus Kalbsthymus gewonnene UP1 Protein, z.B. destabilisierte RNA Strukturen und induzierte die Bildung von einzelsträngigen Bereichen. Daher wurden Proteine dieser Art als Nukleinsäure-Helix destabilisierende

Proteine bezeichnet. Wenn ein solches Protein die einzelsträngige Region wieder verlässt, hat die RNA eine neue Möglichkeit, sich in ihre native Struktur zu falten. Dieser Mechanismus ist ähnlich dem der Protein Chaperone.

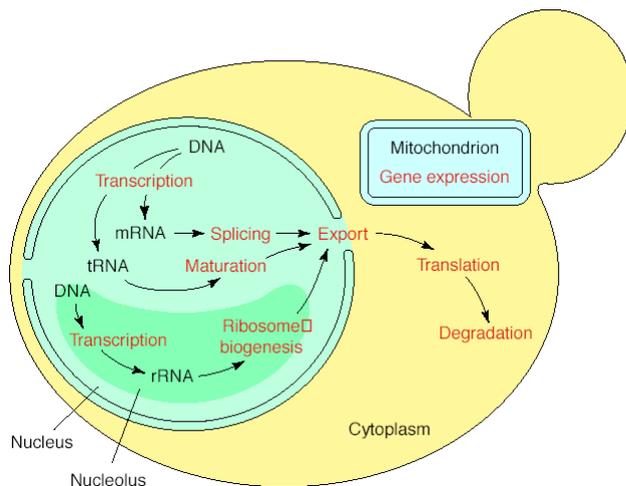


**Abb. 1-1** RNA Chaperone destabilisieren Helices. Sie entfalten falsche RNA-Strukturen und geben der RNA mehr Möglichkeiten ihren nativen Zustand zu erreichen (nach Lorsch, 2002).

Neuere Ergebnisse, mit denen gezeigt wurde, dass Proteine, wie z.B. hnRNP A1 *in vivo* als RNA Chaperone fungieren bestätigen diese Annahme (Herschlag, 1995). Die Analogie zwischen putativen RNA Chaperonen und Protein Chaperonen ist erkennbar: Beide Klassen von Chaperonen binden an das ungefaltete Molekül und verhindern dadurch eine falsche intra- oder intermolekulare Strukturausbildung.

Später wurde die DEAD Box Familie der RNA abhängigen ATPasen entdeckt, deren Mitglieder an fast jedem biologischen Prozess im RNA Metabolismus beteiligt sind (Staley und Guthrie, 1998; Tanner und Linder, 2001). Diese Proteine werden als RNA Helikasen bezeichnet, obwohl nicht sicher ist, dass alle Mitglieder dieser Familie auch wirklich RNA Duplices entwinden.

Die Proteinklasse der RNA Helikasen wird in allen zellulären Organismen und viralen Genomen gefunden und übt essentielle Funktionen im RNA Metabolismus aus wie z.B. Transkription, Splicing, Biogenese von Ribosomen, Kerntransport, Translation, RNA Abbau und Genexpression in Organellen (de la Cruz *et al.*, 1999) (Abb. 1-2).



**Abb. 1-2** Zelluläre Prozesse (rot), in die RNA Helikasen involviert sind (nach de la Cruz *et al.*, 1999).

## 1.2 Strukturelle Eigenschaften von Helikasen

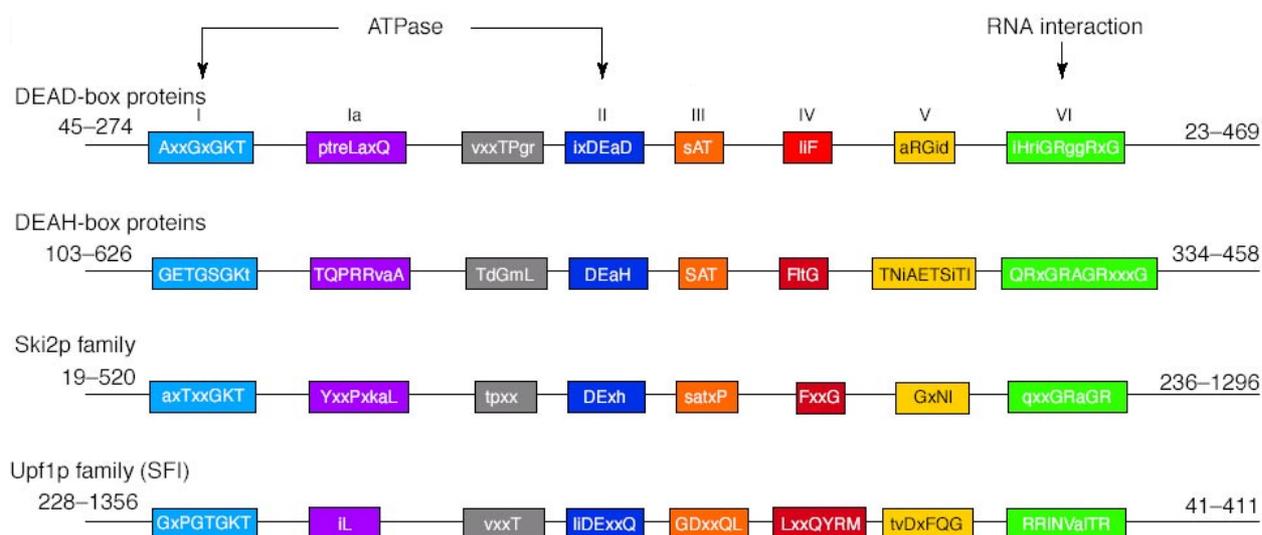
Auf Sequenzebene lassen sich RNA Helikasen aufgrund von sieben bis acht konservierten Motiven identifizieren. Diese Motive sind für die Bindung von NTP, meistens ATP, und deren Hydrolyse notwendig. Neuere Studien, besonders die Bestimmung der Kristallstrukturen verschiedener DNA und RNA Helikasen, haben gezeigt, dass ein enger Zusammenhang zwischen den konservierten Domänen und der dreidimensionalen Struktur der enzymatischen Kernbereiche besteht. Dies lässt annehmen, dass die Kernbereiche der Proteine funktionell und mechanistisch gleichbedeutend sind, obwohl sie verschiedene biologische Aktivitäten und Substrate haben.

Gorbalenya und Koonin (1993) waren die ersten, die systematisch die Beziehung zwischen verschiedenen DNA und RNA Helikasen definiert haben. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten einiger hundert Proteine, die zu dieser Zeit zugänglich waren, haben sie RNA und DNA Helikasen in verschiedene Superfamilien unterteilt.

Sie entwickelten eine generelle Klassifikation von Helikasen in fünf Hauptgruppen. Diese unterscheiden sich durch die Anzahl distinkter Motive, die innerhalb einer Gruppe gefunden werden und aufgrund der Unterschiede in den konservierten Sequenzen der Motive, die von mehr als einer Gruppe geteilt werden.

Die zwei größten Gruppen von DNA und RNA Helikasen werden als Superfamilie 1 und 2 bezeichnet. Diese beiden Superfamilien umfassen eine große Anzahl von DNA und RNA Helikasen von Viren, *Archae* Bakterien, Eubakterien, bis hin zu Eukaryonten. Die Motiv basierte Unterteilung in diese beiden Superfamilien ist unabhängig von der Art des Substrats (DNA

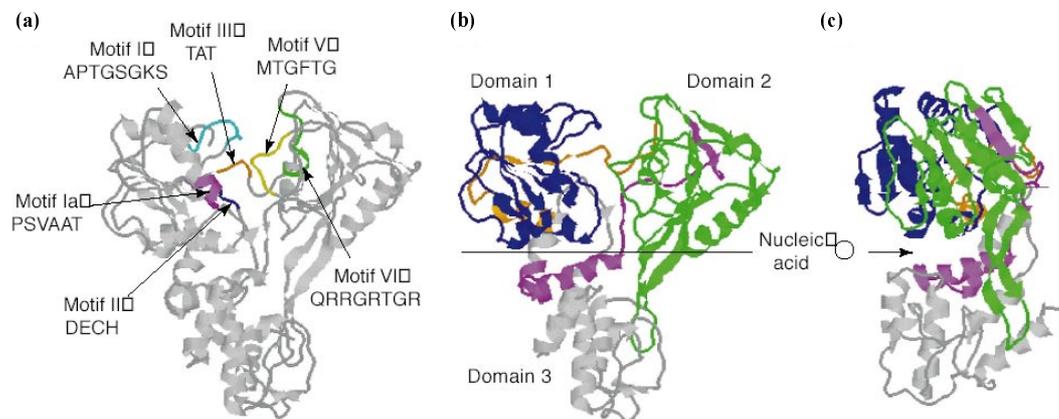
oder RNA), des Stammbaumes oder der Entwindungsrichtung. Allerdings gehören RNA Helikasen meistens zur Superfamilie 2. In Abb. 1-3 ist die modulare Struktur der Kernbereiche von RNA Helikasen gezeigt. DEAD- und DEAH-ähnliche RNA Helikasen gehören zur Superfamilie 2. Die Ski2p Familie stellt eine Subfamilie der Superfamilie 2 der RNA Helikasen dar, während die Upf1p Familie eine Subfamilie der Superfamilie 1 repräsentiert. Das Upf1 Protein besitzt 5'-3' Helikaseaktivität sowohl auf DNA- als auch RNA-Substraten (Czaplinski *et al.*, 2000). Die *E.coli* DnaB und Rho Helikasen gehören zur Superfamilie 4 bzw. 5. Viele virale RNA Helikasen werden in die Superfamilie 1 eingeordnet. Alle Proteine binden ATP und besitzen daher ein Walker A und B Motiv (Caruthers und McKay, 2002). Diese beiden Motive sind nötig, aber nicht ausreichend für eine Definition als Helikase (Tanner und Linder, 2001).



**Abb. 1-3** Molekulare Struktur der Kernbereiche von RNA Helikasen. Die Konservierten Motive I, Ia, II, III, IV, V und VI und deren mögliche biologische Funktion sind in den farbigen Kästen dargestellt (abgeleitet von Untersuchungen am translation initiation factor eIF4A). Identische Reste sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Reste mit einer Konservierung von >50 % in Kleinbuchstaben. Variable Längen der N- und C-Termini sind angegeben. Die grauen Kästen zeigen ein Motiv, das in DEAD Box Proteinen konserviert, dessen biologische Funktion aber noch nicht geklärt ist (nach de la Cruz *et al.*, 1999).

Der Kernbereich von RNA Helikasen zeichnet sich vor allem durch ein Merkmal aus: Er besteht aus zwei Domänen, die mit einem flexiblen Linker (Motiv III) miteinander verbunden sind. Es bildet sich eine Furche zwischen den beiden Domänen aus, in der das NTP binden kann. Die konservierten Motive sind alle in diese Furche orientiert und sind beteiligt an Substratbindung, NTP-Bindung und Koordination zwischen NTP-Hydrolyse und Helikase- und

Translokationsaktivitäten. Anhand der Kristallstruktur des Hepatitis C Virus (HCV) NS3 Proteins (Yao *et al.*, 1997), einer RNA Helikase, lässt sich dies sehr gut erkennen (Abb. 1-4)



**Abb. 1-4** Kristallstruktur der HCV RNA Helikase NS3. (a)+(b) Frontansicht, (c) Seitenansicht. Die Domäne 1 ist in blau, Domäne 2 in grün dargestellt. Motiv III, welches eine sog. Scharnierfunktion ausübt, ist in orange dargestellt. Domäne 3, die vom Carboxy-Terminus des Proteins gebildet wird ist grau eingezeichnet (nach de la Cruz *et al.*, 1999).

Die Motive Ia, Ib, IV und V sind wahrscheinlich an der Substratbindung beteiligt, während die Motive III und VI die Bindung und Hydrolyse des NTPs mit Konformationsänderungen, die nötig sind für die Helikaseaktivität, verbinden. Mutationen in Motiv III können die NTP Hydrolyse von der Helikaseaktivität entkoppeln (Pause und Sonenberg, 1992; Schwer und Meszaros, 2000). Von Motiv VI wurde ursprünglich vermutet, dass es die Bindestelle für das Substrat darstellt. Dies basierte auf Mutationsanalysen dieses Motivs, die die RNA Bindung beeinflussten (Pause *et al.*, 1993). Durch die Kristallstruktur von NS3 konnte dies mittlerweile widerlegt werden (Cho *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1997).

Vielmehr scheint es Kontakt zu den Phosphaten des an Motiv I und II gebundenen NTPs zu haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mutationen in Motiv VI in NPH-II zwar die ATP Hydrolyse beeinflussen, nicht aber die Bindung von RNA (Gross und Shuman, 1996). NPH-II ist ein Protein des vaccinia Virus und wird vom I8R Gen des dsDNA Genoms dieses Virus kodiert. Das NPH-II Protein ist sehr stark verwandt mit zellulären DEAH Box Proteinen und es wurde gezeigt, dass es eine 3'-5' RNA Entwindungsaktivität hat (Shuman, 1993).

Die starke strukturelle Konservierung impliziert auch eine starke funktionelle Konservierung. Dass dies jedoch nicht der Fall ist, zeigt die Beteiligung von RNA Helikasen an vielen unter-

schiedlichen Prozessen in der Zelle. Dies führt zu der Annahme, dass die Spezifität einzelner Proteine vielleicht in den Eigenschaften zusätzlicher, eventuell familien-spezifischer Sequenzen (interne oder externe), zu suchen sind. Daher hat man eine Minimalstruktur gesucht, die konsistent mit der Helikase Aktivität aller DEAD Box Proteine ist.

### **1.3 Helikasen enthalten zusätzliche Strukturmerkmale zu den für die Charakterisierung nötigen Motiven**

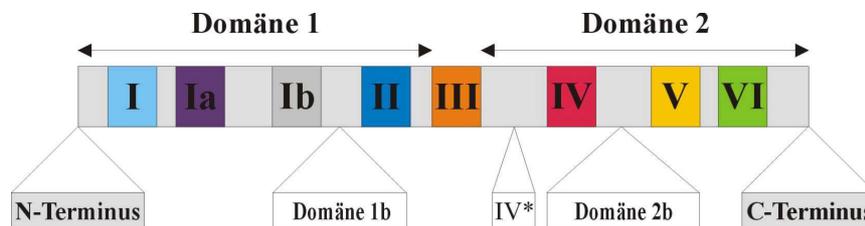
Die Datenbanksuche ergab, dass eIF4A-ähnliche DEAD Box Proteine die kleinsten Proteine sind, die alle Helikase Motive in sich vereinen. Sie enthalten nur ca. 45 Aminosäuren N-terminal des Motivs I und ca. 40 Aminosäuren C-terminal von Motiv VI.

Der eukaryontische Translations Initiations-Faktor eIF4A ist momentan das kleinste Protein, das *in vitro* RNA Entwindungsaktivität zeigt und stellt somit den minimalen Helikase Kernbereich dar (Rogers *et al.*, 2001; Rozen *et al.*, 1990). Daher wird es auch als der Prototyp der DEAD Box Proteine bezeichnet. Es ist von der Größe her ähnlich dem kürzlich kristallisierten DEAD Box Protein aus *M. jannaschii* (MjDEAD) (Story *et al.*, 2001), dessen biologische Funktion jedoch noch nicht charakterisiert ist.

Die Annahme, dass eIF4A-ähnliche DEAD Box Proteine eine Minimalstruktur darstellen wird unterstützt von der *in vitro* RNA Helikase Aktivität von Prp22p. Das *PRP22* Gen kodiert für eine DEAH Box RNA Helikase mit einer Länge von 1145 Aminosäuren. Im N-terminalen Bereich können größere Deletionen vorgenommen werden, ohne die *in vivo* Aktivität zu beeinflussen. So zeigt die Deletion der Aminosäuren 1-261 keinen Effekt auf die Funktion von Prp22p *in vivo*. Eine Deletion von 350 Aminosäuren ist nur noch bei Überexpression *in vivo* funktionell. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass die Deletion von 465 Aminosäuren am N-Terminus, was einem Rest von 46 Aminosäuren N-terminal von Motiv I entspricht, RNA entwinden kann. Zwar ist Prp22p(466-1145) *in vivo* nicht funktionell, doch kann diese Funktionalität wieder hergestellt werden, wenn man den N-Terminus, Prp22p(1-465), separat co-exprimiert. Dies zeigt, dass Protein-Domänen in RNA-Helikasen *trans* fungieren können (Schneider und Schwer, 2001).

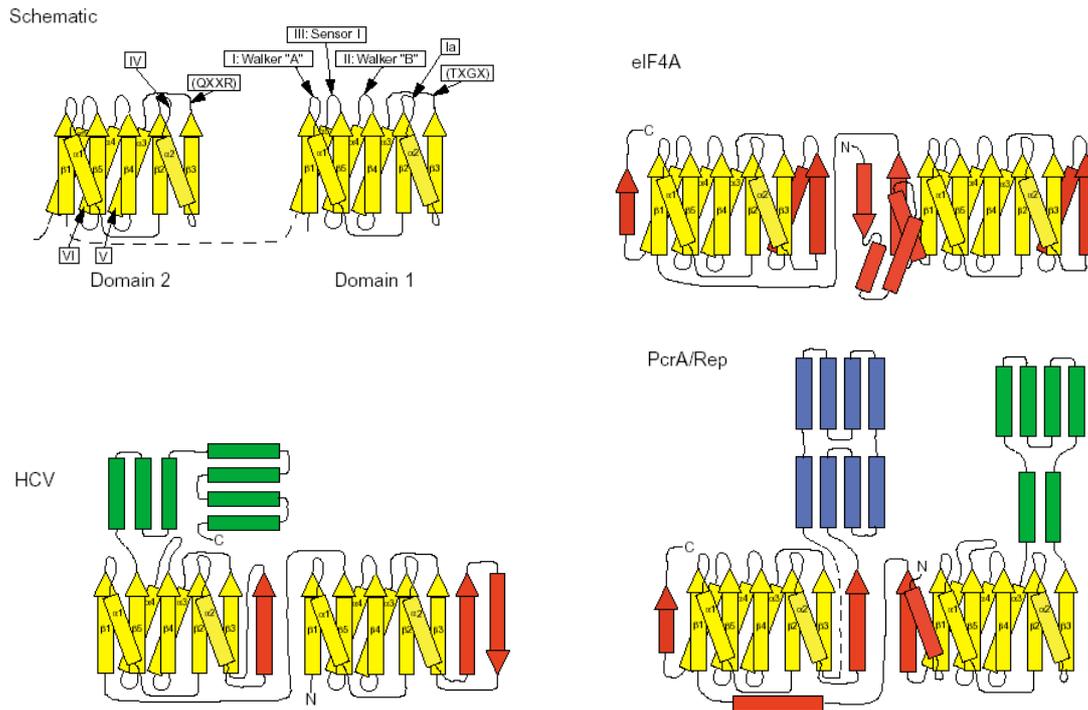
RNA Helikasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie, im Vergleich zu DNA Helikasen, sehr stark verlängerte amino- oder carboxy-terminale Bereiche haben. Diese Extensionen können über 500 Aminosäuren lang sein (Tanner und Linder, 2001).

Rep-ähnliche und UvrD-ähnliche DNA Helikasen neigen im Gegensatz dazu, größere Insertionen in den Domänen 1 und 2 zu besitzen, welche dann als Domänen 1b und 2b bezeichnet werden (Abb. 1-5 und Abb. 1-6).



**Abb. 1-5** Rep-ähnliche und UvrD-ähnliche DNA Helikasen sind durch Insertionen charakterisiert, die als Domäne 1b und 2b bezeichnet werden. Zusätzlich findet sich das DNA Helikase spezifische Motiv IV\* (Korolev *et al.*, 1998).

Betrachtet man die Kristallstruktur der HCV NS3 RNA Helikase (Abb. 1-4), kann man erkennen, dass der Carboxy-Terminus eine Art Domäne 3 ausbildet. Die bei DNA Helikasen beobachteten Domänen 1b und 2b besetzen eine Position in der Struktur, die mehr oder weniger identisch ist mit der vom NS3 Carboxy-Terminus gebildeten Domäne 3 (Tanner und Linder, 2001). Ein Beispiel dafür ist die Struktur von PcrA, einer DNA Helikase aus *Bacillus stearothermophilus*. Die Struktur von PcrA war die erste Helikase-Struktur, die gelöst wurde (Subramanya *et al.*, 1996). Das PcrA Protein ist eine DNA Helikase der Superfamilie 1. In Abb. 1-6 ist die Topologie von PcrA im Vergleich zu eIF4A und HCV NS3 gezeigt. Vergleicht man die Topologie von eIF4A mit der von PcrA oder HCV NS3, kann man deutlich die Insertion zweier Sequenzen bei PcrA erkennen. Es ist auch gut zu erkennen, dass die Sequenz, die bei HCV NS3 Domäne 3 ausbildet, C-terminal „angehängt“ und nicht inseriert ist. Aus der Position der beiden inserierten Domänen im Topologie-Diagramm von PcrA kann man schließen, dass diese eine Position ähnlich der der C-terminalen Domäne von NS3 besetzen. Man vermutet, dass diese zusätzlichen Domänen die Funktionalität des Proteins dahingehend verändern, dass es möglicherweise prozessiver wird oder die Denaturierung von doppelsträngigen Regionen vereinfacht wird (Soulтанas und Wigley, 2000).



**Abb. 1-6** Topologische Diagramme von DNA und RNA Helikasen. In gelb sind die konservierten RecA-ähnlichen „Kerne“ eingezeichnet. In rot variable Strukturelemente in Domänen mit einem RecA-ähnlichen Kern. Grün und blau sind zusätzliche strukturelle Domänen gekennzeichnet. Das Schema oben links fasst die Positionen der sieben konservierten Domänen nach Gorbalenya und Koonin, 1993, innerhalb der Topologie des RecA-ähnlichen Kerns zusammen. Zusätzliche Motive, die helikase-spezifisch sind, sind in Klammern gezeigt (nach Caruthers und McKay, 2002).

Ein weiterer Hinweis dafür ist, dass in bestimmten Familien von RNA Helikasen Domäne 3 strukturell konserviert zu sein scheint und in einigen Fällen eine Deletion hierin größere Auswirkungen *in vivo* auf die Zellen zeigt, als Deletionen im Bereich des N-Terminus. Eine Deletion von 87 Aminosäuren des 334 Aminosäuren langen C-Terminus von Prp22p hebt seine *in vivo* Funktionalität auf (Schwer und Gross, 1998). Die Deletion von 461 Aminosäuren des N-Terminus beeinflusst die *in vivo* Funktionalität kaum. Dies macht die Bedeutung der C-terminal gelegenen Domäne 3 in Prp22p deutlich.

Trotzdem gibt es viele DEAD Box Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* bei denen man den C-Terminus entfernen kann, ohne die *in vivo* Aktivität zu beeinflussen. Die Länge dieser Domäne variiert beträchtlich zwischen verschiedenen RNA Helikasen und ihre Funktion ist noch spekulativ.

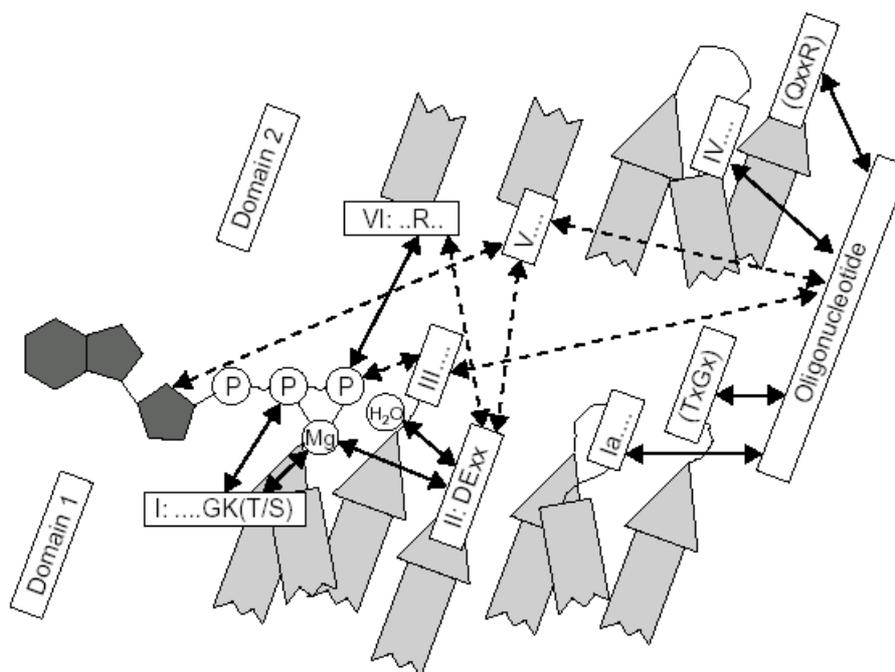
Proteine, die solche Domänen nicht aufweisen, können möglicherweise ihre Aktivität durch Assoziation mit anderen Faktoren steigern. So steigt z.B. die Entwindungsaktivität von eIF4A

durch Zugabe von eIF4B (Rozen *et al.*, 1990). eIF4B könnte in diesem Falle als eine Art intermolekulare Domäne 3 fungieren.

Den N-terminalen Bereichen von RNA Helikasen werden meist andere Aktivitäten wie Kernlokalisation oder Vermittlung von Spezifität durch die Interaktion mit anderen Proteinen oder Faktoren zugesprochen (Schneider und Schwer, 2001; Wang und Guthrie, 1998).

## 1.4 Mechanismen der Nukleinsäure-Entwindung

Die für DEAD Box Helikasen charakteristischen Motive enthalten hoch konservierte Aminosäuren. Einen Überblick über diese und deren Interaktionen gibt Abb. 1-7. Sie interkalieren oder binden an die Basen des gebundenen Substrats und halten es fest in Position. Der Abstand zwischen diesen Aminosäure-„Zähnen“ kann mit dem NTP abhängigen Schließen und Öffnen der Furche zwischen Domäne 1 und 2 variieren und stellt somit ein interessantes Modell für die Helikase Aktivität dar. Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen, die zeigten, dass die Hydrolyse von ATP zu ADP die Affinität des Proteins gegenüber ssRNA reduziert (Jankowsky *et al.*, 2000).

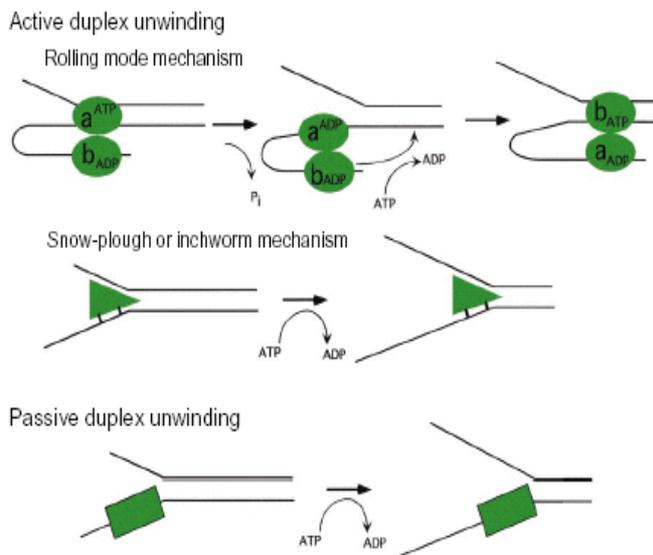


**Abb. 1-7** Schematische Darstellung der Helikase Motive in den Helikasen der Superfamilie 1 und 2. Es sind die Interaktionen der Motive untereinander und mit ATP bzw. dem Oligonucleotide gezeigt. Dicke Linien zeigen Interaktionen, die universell in diesen Familien sind. Die gepunkteten Pfeile zeigen Interaktionen von bestimmten Proteinen, die aber auch spezifisch für bestimmte Helikase Familien sein könnten (nach Caruthers und McKay, 2002).

Die Aktivität von Helikasen ist gekoppelt mit der Hydrolyse eines Nucleosid-Triphosphats (NTP), in der Regel ATP. In den meisten Fällen ist die NTPase Aktivität abhängig von bzw. wird durch die Nucleinsäure stimuliert. Im Gegensatz zu DNA Helikasen, die lange dsDNA Bereiche prozessiv entwenden (Lohman und Bjornson, 1996), können die meisten RNA Helikasen wahrscheinlich nur kurze Duplexregionen entwenden.

Für die Entwindung langer Duplexregionen besteht in der Regel keine Notwendigkeit, da, anders als z.B. während der DNA-Replikation, RNA selten als kontinuierlicher Duplex vorliegt. Eine mögliche Ausnahme liegt in viralen Helikasen. Die sich bei der Transkription oder Replikation viraler RNA bildenden dsRNA Zwischenprodukte müssen möglicherweise von einer RNA Helikase entwunden werden (Kadare und Haenni, 1997).

Man nimmt an, dass die ATP Hydrolyse die Furche zwischen Domäne 1 und 2 öffnet, ADP dissoziiert und sich das Protein einige Basen auf der ssRNA entlang bewegt. Enthält die RNA Sekundärstrukturen, würde diese aktive, NTP-abhängige, Translokation zu einer Entwindung dieser führen (Kim *et al.*, 1998). Diese zyklischen Konformationsänderungen könnten ebenso zu Umlagerungen von RNA-Protein oder sogar Protein-Protein Interaktionen führen (Lorsch und Herschlag, 1998). Verschiedene momentan diskutierte Modelle, wie RNA Helikasen dsRNA entwenden könnten, sind in Abb. 1-8 gezeigt.



**Abb. 1-8** Mögliche Modelle für die Funktionsweise von Helikasen. Im „rolling model“ bindet eine oligomere Helikase abwechselnd an die einzel- und doppelsträngige Nucleinsäure. Dabei haben Proteine, an die ATP gebunden ist eine höhere Affinität für die doppelsträngige Nucleinsäure. Beim „snow-plough model“ (Schneepflug-Modell) wandert die RNA Helikase entlang der Gabel und benutzt dabei die Energie der NTP Hydrolyse, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nucleinsäuren aufzuschmelzen. Beim „passive model“ kann die Denaturierung durch ein ssRNA bindendes Protein bewirkt werden, das die thermale Fluktuation der RNA fixiert. Die Bewegung des ssRNA bindenden Proteins entlang der einzelsträngigen Nucleinsäure würde dann in einer ATP-abhängigen Reaktion verlaufen (nach Linder und Daugeron, 2000).

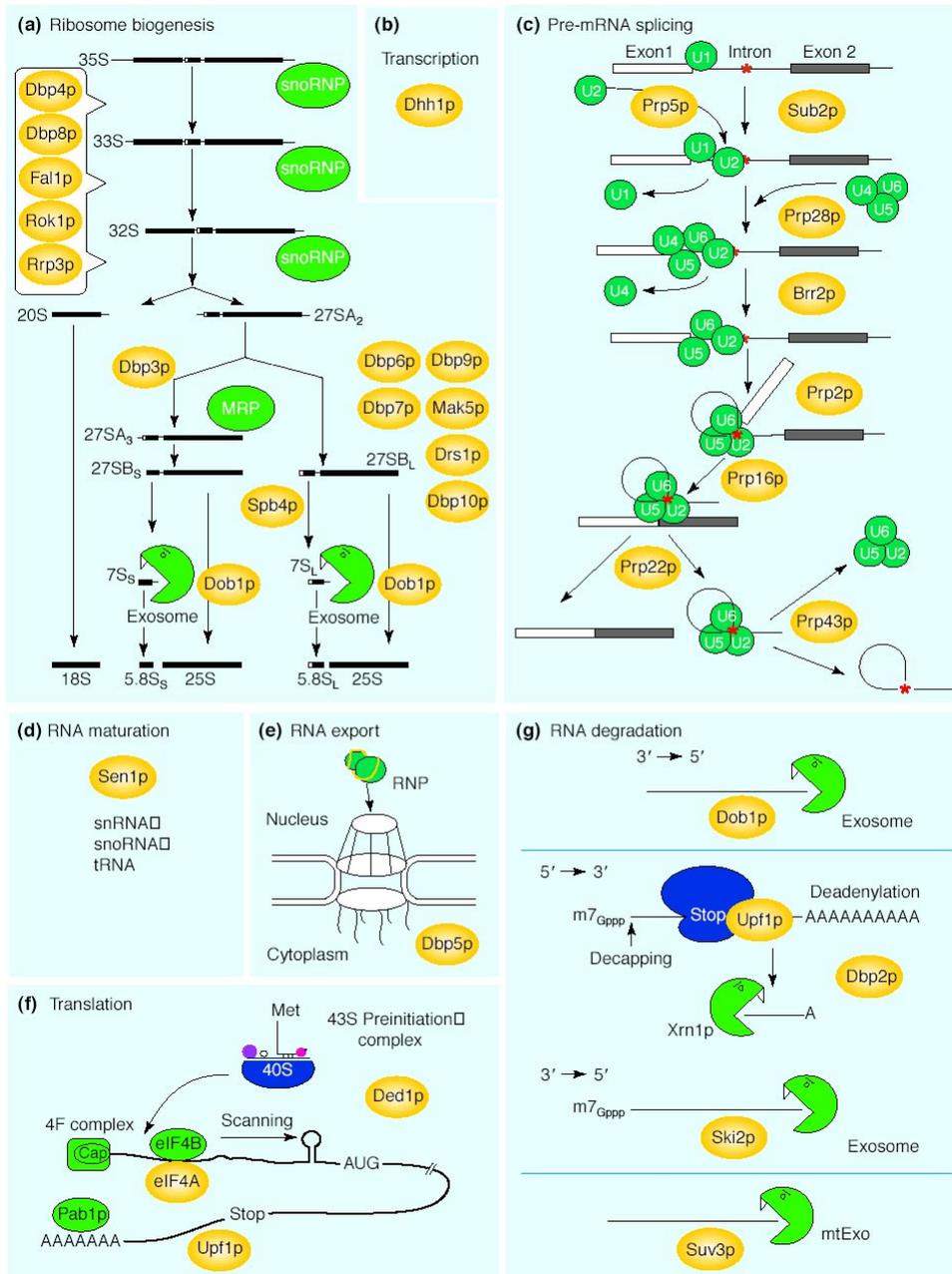
Das Schneepflug-Modell wird durch neuere Untersuchungen von Jankowsky *et al.* (2000) unterstützt, die intensive Studien mit dem oben erwähnten NPH-II Protein durchgeführt haben. Sie konnten zeigen, dass die durchschnittliche Schrittweite bei der Entwindung von dsRNA ~6 bp beträgt, was im Wert ähnlich dem der UvrD DNA Helikase ist. Sie stellten ebenso fest, dass das NPH-II Protein prozessiv arbeitet und nicht schrittweise. Dies wurde untersucht durch Zugabe eines hohen Überschusses an unspezifischer RNA. Die Zugabe hatte jedoch keinen Einfluss auf die Entwindungsraten. Lediglich bei wachsender Länge der dsRNA stieg die Dissoziationsrate des NPH-II Proteins, was aber nach den oben erwähnten Daten zu erwarten war. Zusätzlich konnten Jankowsky *et al.* zeigen, dass die Prozessivität des NPH-II Proteins von der Menge zur Verfügung stehendem ATPs abhängig war. Bei limitierenden Mengen an ATP hatte das Protein die Tendenz, vom Substrat zu dissoziieren. Bei hohen ATP-Mengen arbeitete das Protein bis zum Ende. Dies lässt den Schluss zu, dass ATP einen regulatorischen Faktor für die RNA Helikase Aktivität in der Zelle darstellen könnte.

Neueste Studien dieser Gruppe haben gezeigt, dass NPH-II in der Lage ist, Proteine von RNA zu dissoziieren (Jankowsky *et al.*, 2001). Dazu haben sie ein Substrat generiert, bei dem die RNA eine Affinitätsregion für das dsRNA bindende U1A Protein innerhalb eines Duplex enthielt. NPH-II war in der Lage diesen Duplex zu entwinden, unabhängig davon, ob U1A gebunden war oder nicht. Kinetische Analysen zeigten, dass das NPH-II Protein zwar „ins Stottern geriet“, wenn es auf das U1A Protein stieß, aber seine Prozessivität beibehielt. Die Frage ist, ob man aufgrund dieses *in vitro* Experimentes diese RNPase Aktivität dem funktionellen Repertoire der DEAD Box Helikasen zuordnen kann, zumal dies für noch kein weiteres DExH/D Box Protein gezeigt werden konnte. Diese RNPase Aktivität könnte aber Hinweise darauf geben, wie andere DExH/D Box Proteine beim Aufbau von Ribonukleoprotein Komplexen wie z.B. dem Spliceosom wirken könnten.

## **1.5 Zelluläre Funktionen von RNA Helikasen**

Die meisten Ergebnisse über die Beteiligung und Funktion von RNA Helikasen stammen aus dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*. Daher beziehen sich die im Folgenden gezeigten Ergebnisse auf Untersuchungen in *S. cerevisiae*. Ergebnisse aus anderen Organismen werden entsprechend erwähnt. Das *S. cerevisiae* Genom kodiert für 26 DEAD Box Proteine.

Durch die stetig wachsende Wichtigkeit und universelle Verteilung von DEAD Box Proteinen und ihren Verwandten sind mittlerweile schon viele Prozesse an denen RNA Helikasen beteiligt sind bekannt (Abb. 1-9).



**Abb. 1-9** Detailliertere Darstellung der Beteiligung von RNA Helikasen (gelb) an Prozessen aus Abb. 1-2. (a) Ribosomen Biogenese, (c) Splicing, (d) RNA Reifung, (e) RNA Export, (f) Translation, (g) RNA Abbau. Wichtige nicht Helikasen sind in grün oder blau dargestellt. MRP, RNase MRP; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; U1-U6, small nuclear RNAs. (b) basiert auf veralteten Daten (siehe Text) (nach de la Cruz *et al.*, 1999).

Im Folgenden werden die Prozesse, an denen RNA Helikasen im RNA Metabolismus beteiligt sind, genauer dargestellt.

### 1.5.1 Ribosom-Biogenese

Aus der Familie der DEAH Box Proteine sind zwei, Dhr1p und Dhr2p, an der Biogenese von Ribosomen beteiligt. Werden diese Proteine deletiert, werden frühe Prozessierungsreaktionen inhibiert und es kommt zu einem Mangel an 40S ribosomalen Untereinheiten. Für Dhr1p ist gezeigt, dass es mit U3 snoRNA (small nucleolar RNA) co-immunopräzipitiert und somit eine physikalische Interaktion eingeht (Colley *et al.*, 2000). Man geht momentan davon aus, dass RNA Helikasen drei Rollen im Bereich der Ribosom-Biogenese spielen könnten. Einerseits könnte die Entwindungsaktivität von RNA Helikasen für die Bildung und/oder Dissoziation von snoRNA-pre-rRNA Basenpaaren nötig sein. Zweitens könnten RNA Helikasen die Aktivitäten von Endo- und Exonukleasen unterstützen. Dies wird z.B. für Dbp3p und Dob1p/Mtr4p angenommen (Weaver *et al.*, 1997). Drittens könnten RNA Helikasen *trans*-agierende Faktoren und ribosomale Proteine innerhalb der pre-ribosomalen Partikel rekrutieren, re-arrangieren oder separieren, indem sie während der Prozessierung und Assemblierung Reaktionen spezifischer intramolekularer rRNA, rRNA-Protein oder sogar Protein-Protein Interaktionen modulieren.

### 1.5.2 Transkription

In Abb. 1-9 wird Dhh1p eine Rolle bei der Transkription zugeschrieben. Dies basiert auf Daten, in denen Dhh1p, ein Mitglied der DEAD Box Superfamilie 2, genetisch und physikalisch mit Pop2p, einer Komponente des transkriptionsregulierenden Komplexes Ccr4 interagiert (Hata *et al.*, 1998). Pop2p wird als genereller Transkriptionsfaktor angesehen. Diese Daten wurden durch die Interaktion von Dhh1p mit dem N-Terminus von Not1p, dem einzigen essentiellen Protein des Ccr4-Not Komplexes, bestärkt (Maillet und Collart, 2002). Laut Hefedatenbanken (z.B. MIPS) ist Not1p kernlokalisiert. Allerdings haben neuere Studien gezeigt, dass der Ccr4-Komplex der hauptsächliche Deadenylierungskomplex ist (Coller *et al.*, 2001; Fischer und Weis, 2002), was eine zytoplasmatische Lokalisation voraussetzt. Daher sind diese Daten über Dhh1p widersprüchlich. In dieser Arbeit und in Fischer und Weis (2002) konnte die zytoplasmatische Lokalisation des Dhh1 Proteins gezeigt werden. Daher ist eine direkte

Rolle von Dhh1p in der Transkription (Abb. 1-9) oder ihrer Aktivierung eher unwahrscheinlich.

### 1.5.3 Pre-mRNA Splicing

Die bei der Transkription gebildete pre-mRNA wird in einem Reifeprozess an ihrem 5'-Ende mit einer Cap-Struktur versehen, das 3'-Ende polyadenyliert und Introns durch Splicen entfernt. Mittlerweile sind in der Bäckerhefe acht RNA Helikasen bekannt, die am Prozess des pre-mRNA-Splicens beteiligt sind (Staley und Guthrie, 1998). Jedes dieser Proteine stellt einen essentiellen Faktor dar und fungiert bei einem anderen Schritt der Bildung und des Abbaus des Spliceosoms. Die DEAD Box Proteine Prp5 und Prp28, sowie das DExH Box Protein Brr2 bringen die verschiedenen Komponenten des Spliceosoms zusammen. Prp5p aktiviert das U2 snRNP in einem frühen Stadium. Es könnte RNA Helikase Aktivität und/oder Protein-RNA trennende Aktivität haben. Prp28p wird für die ATP-abhängige Dissoziation von U1snRNA und die Substitution von U1 snRNA durch U6 snRNA an der 5'-Splicestelle benötigt (Staley und Guthrie, 1999). Das Brr2 Protein ist an der Dissoziation der U4 snRNA von der U6 snRNA und dem Spliceosom, welches vor der ersten katalytischen Reaktion gebildet wird, beteiligt (Ragunathan und Guthrie, 1998). Man nimmt an, dass die anderen, hier nicht erwähnten, DEAH Proteine an konformellen Umlagerungen der spliceosomalen RNAs (mRNA und snRNAs) beteiligt sind.

### 1.5.4 RNA Export

Eine weitere wichtige Funktion der DEAD Box RNA Helikasen stellt ihre Beteiligung am RNA Export dar. Nach der Prozessierung im Zellkern liegen reife mRNAs in Form von Ribonukleotid-Proteinen (RNP) vor und werden zusammen mit tRNAs und Ribosomen durch den Nuklearen Poren-Komplex (NPC) ins Zytoplasma transportiert. Eine mögliche Funktion für eine kernlokalisierte RNA Helikase könnte ihre Beteiligung an der Konformations- und/oder Kompositionsveränderung von RNPs für ihren Transit durch den NPC sein. Eine zytoplasmatische RNA Helikase könnte dann für die Restrukturierung oder Entpackung des RNP notwendig sein. Ebenso könnte sie bei der Ablösung von Shuttle-Proteinen beteiligt sein, damit sie in den Kern zurückkehren können. Genauso könnte sie den RNA Export an die Translations Initiation koppeln.

Bis vor kurzem war das einzige DEAD Box Protein, von dem eine Funktion im Kerntransport bekannt war, das Dbp5 Protein. Eine Deletion von *DBP5* führt zur Akkumulation von poly(A)<sup>+</sup> mRNA im Kern. Dbp5p wird zur zytoplasmatischen Seite des NPC rekrutiert, wo es mit Nup159p interagiert. Man nimmt an, dass es in einem terminalen Schritt des Exports fungiert (Schmitt *et al.*, 1999; Snay-Hodge *et al.*, 1998). Mittlerweile haben zusätzliche Studien in *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* und Säugerzellen weitere Beispiele der Kopplung von pre-mRNA Splicing und RNA Export aufgezeigt. Vom Säuger-Protein UAP56 und seinem Hefehomologen Sub2p wurde gezeigt, dass sie in einem frühen ATP-abhängigen Schritt des pre-mRNA Splicens benötigt werden (Fleckner *et al.*, 1997; Kistler und Guthrie, 2001; Libri *et al.*, 2001; Zhang und Green, 2001). Fehlt das funktionelle UAP56/Sub2p ist der RNA Export gravierend beeinflusst. Obwohl diese beiden Proteine für das korrekte Splicen benötigt werden, ist bei einer Deletion von UAP56/Sub2p auch der Export von RNAs, die von intronfreien Genen kodiert werden, betroffen. UAP56/Sub2p ist ein Mitglied der DEAD Box Familie der vermeintlichen RNA Helikasen (de la Cruz *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Familie enthalten die Proteine UAP56/Sub2p aus anderen Organismen ein DECD Motiv an Stelle des DEAD Motivs.

poly(A)<sup>+</sup> RNA akkumuliert auch im Zellkern von Stämmen, bei denen Mutationen von Dob1p (auch als Mtr4p charakterisiert) exprimiert werden. Dob1p wird als das Kernhomologe von Ski2p, einer RNA Helikase der Ski2 Subfamilie, angesehen. Daher wird eine Beteiligung von Dob1p/Mtr4p am RNA Export angenommen.

### 1.5.5 Translation

Der Prototyp der DEAD Box Proteine ist der Translations-initiations Faktor eIF4A (eukaryotic Initiation Factor 4A). In der Bäckerhefe wird er von zwei fast identischen Genen, *TIF1* und *TIF2*, die aus Genduplikation entstanden sind, kodiert. Das eIF4A Protein stellt eine RNA-abhängige ATPase dar, die zusammen mit eIF4B als RNA Helikase fungiert. eIF4A entwindet Sekundärstrukturen im 5'-untranslatierten Bereich von mRNAs. Dieser Vorgang ist nötig, damit die kleine ribosomale Untereinheit binden und die RNA nach dem Initiations-Codon absuchen kann. In Eukaryonten wird die 40S ribosomale Untereinheit durch Interaktionen mit Initiationsfaktoren an das 5'-Ende der mRNA rekrutiert. Danach scannt diese Untereinheit die mRNA nach ihrem Initiations-Codon ab, dann wird die 60S ribosomale Untereinheit rekrutiert und die Translation beginnt. Aufgrund der ausgiebigen Sekundärstrukturen in dem 5'-

untranslatierten Bereich der mRNA ist eine Beteiligung von RNA Helikasen bei diesem Prozess sehr wahrscheinlich (de la Cruz *et al.*, 1999). Man nimmt an, dass sich diese Aktivität im eukaryontischen Initiationsfaktor 4A (eIF4A) manifestiert.

Mittlerweile weiß man, dass eIF4A wahrscheinlich nicht die einzige RNA Helikase ist, die für die Translations-Initiation benötigt wird. Bei einem Screening auf genetische Interaktoren von eIF4A konnte ein weiteres DEAD Box Protein isoliert werden, Ded1p. Kürzlich wurde gezeigt, dass das *DED1* Gen eine Rolle in der Translations-Initiation spielt (Chuang *et al.*, 1997; de la Cruz *et al.*, 1997). Das Ded1 Protein zeigt RNA-abhängige ATPase Aktivität, ATP-abhängige RNA Helikase Aktivität und bindet ssRNA in An- und Abwesenheit von Nukleotiden. dsRNA wird von Ded1p aber nur in Anwesenheit von ATP (nicht ADP) gebunden (Iost *et al.*, 1999). Analysen mit Deletionsmutanten und temperatursensitive Mutanten zeigten, dass Ded1p einen generellen Translations-Initiationsfaktor darstellt (Chuang *et al.*, 1997; de la Cruz *et al.*, 1997). Weitergehende Experimente in *Schizosaccharomyces pombe* zeigten, dass ein normaler Expressionslevel von Ded1p für die Translation von einigen Zellzyklus regulierenden Proteinen notwendig ist (Grallert *et al.*, 2000).

In der Tat sind die meisten Ergebnisse über den Aufbau und die Funktionsweise von DEAD Box Proteinen durch Untersuchungen des eIF4A bekannt geworden. Neuere Ergebnisse aus dem Labor von N. Sonenberg bestätigen die Theorie, dass die Sekundärstrukturen im 5'-untranslatierten Bereich die Bindung von Ribosomen beeinflussen. Dort verwendete man dominant-negative Mutanten von eIF4A in einem zellfreien System. Die Untersuchungen ergaben, dass die Translations-Initiation empfindlich auf den Grad der Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA reagiert (Svitkin *et al.*, 2001). Trotzdem gibt es noch keinen Beweis für die Entwindungsaktivität von eIF4A *in vivo*.

### 1.5.6 RNA Abbau

Der letzte Prozess im Lebenszyklus von RNA ist deren Abbau. Auch daran sind RNA Helikasen beteiligt. Der Abbau von RNA stellt einen wichtigen Prozess dar, da die Konzentration von bestimmten Proteinen, z.B. Zellzyklus regulierenden Faktoren, genau reguliert werden muss. Werden RNAs von solchen Genen nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt abgebaut, kann dies zu gravierenden Zellzyklusstörungen und eventuell zum Zelltod führen. Außerdem können falsche RNAs, also solche mit nicht gespliceten Introns, oder internen Stopcodons die Ri-

bosomen unnötig blockieren. Daher ist es notwendig, solche RNAs möglichst schnell zu entfernen.

Den Prozess des RNA Abbaus kann man in zwei Bereiche unterteilen. Den einen Bereich stellt der „normale“ Abbau von mRNA nach der Translation dar, den anderen die programmierte Zerstörung von RNAs, die „nonsense Codons“ enthalten - der sogenannte „Nonsense mediated Decay“ (NMD).

Beim ersteren beginnt der Abbau der mRNA prinzipiell mit der Entfernung des 3' poly(A) Bereiches. Dies ist der initiale Schritt sowohl in Hefe, als auch in höheren Eukaryonten. Den meisten Einblick in diesen Mechanismus haben Studien in *S. cerevisiae* erbracht. In der Hefe wurden zwei unterschiedliche Deadenylierungsmechanismen identifiziert. Der eine wird durch Pan2/Pan3-Komplex repräsentiert, der vom poly(A)-bindenden Protein (Pab)1 abhängt. Von diesem Komplex nimmt man an, dass er naszierende poly(A) Bereiche im Kern trimmt, bevor die mRNA exportiert wird. Er ist aber wahrscheinlich auch an der Deadenylierung im Zytoplasma beteiligt (Boeck *et al.*, 1996; Brown und Sachs, 1998; Tucker *et al.*, 2001).

Der zweite Deadenylierungsmechanismus besteht aus den zwei Transkriptionsregulatoren Ccr4 und Caf1. Der Ccr4/Caf1 Komplex stellt *in vivo* und *in vitro* den vorrangigen Deadenylierungskomplex dar. Allerdings muss man beide Komplexe, sowohl den Pan2/Pan3, als auch den Ccr4/Caf1 Komplex disruptieren, um einen Effekt auf die Deadenylierung *in vivo* zu sehen (Tucker *et al.*, 2001).

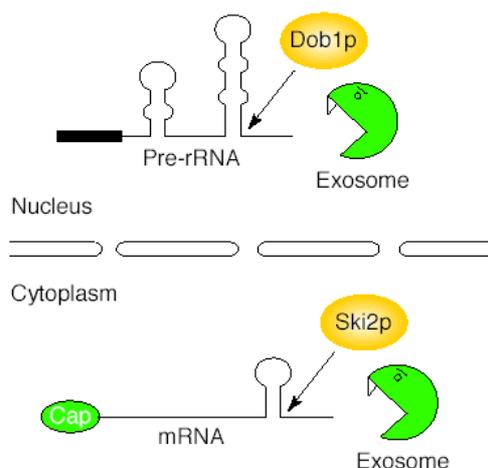
Die Deadenylierung induziert eine relativ schnelle Abspaltung der 5' Cap-Struktur durch das decapping Enzym Dcp1p (Beelman *et al.*, 1996; LaGrandeur und Parker, 1998). Fischer und Weis (2002) konnten zeigen, dass Dhh1p die decapping-Aktivität von Dcp1p *in vitro* stimuliert. Durch biochemische und genetische Studien wurden mittlerweile mehrere Faktoren identifiziert, die am Decapping beteiligt sind, wie z.B. Dcp2 (Dunckley und Parker, 1999), Vps16 (Zhang *et al.*, 1999), Pat1 (Bonnerot *et al.*, 2000; Hatfield *et al.*, 1996) und die Lsm Proteine (Bouveret *et al.*, 2000; Tharun *et al.*, 2000). Nach der Entfernung der Cap-Struktur wird der verbleibende mRNA Rest durch die 5' Exonuklease Xrn1p abgebaut (Hsu und Stevens, 1993). In der Hefe sind auch 3' Exonukleaseaktivitäten vorhanden, die aber bei dem normalen mRNA Abbau eher eine untergeordnete Rolle spielen (Jacobs *et al.*, 1998).

Nachdem die mRNA Synthese einen Multistep-Prozess darstellt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass un- oder fehlgesplicete RNAs, RNAs mit unnatürlich langen 3'-untranslatierten Regionen oder RNAs mit falschen oder fehlenden Stopcodons entstehen. Diese sogenannten „nonsense“ RNAs werden durch den NMD abgebaut. Neueste Studien haben gezeigt, dass

auch innerhalb des NMD Unterschiede in der Art des Substrats gemacht werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass eukaryontische RNAs ohne Stopcodon, sogenannte „nonstop“ RNAs sehr schnell abgebaut werden (Frischmeyer *et al.*, 2002).

In der Hefe sind drei *trans*-agierende Faktoren für den NMD essentiell, Upf1p, Upf2p und Upf3p (Leeds *et al.*, 1991). Upf1p gehört zur Superfamilie 1 der RNA Helikasen und ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert. Das Upf1 Protein zeigt nukleinsäureabhängige ATPase Aktivität und besitzt eine 5'-3' Helikase Aktivität sowohl auf DNA wie RNA Substraten.

Interessanterweise wird „nonstop“ RNA in *upf1Δ*-Stämmen nicht stabilisiert, was eine Unterscheidung zwischen dem Abbau von RNA, die kein Terminations-Codon enthält und dem NMD zeigt (Frischmeyer *et al.*, 2002). Wie oben beschrieben, benötigt der normale Abbau von RNA eine Deadenylierung gefolgt von einer Dcp1p-vermittelten Entfernung der 5' Cap-Struktur und dem 5'-3' Abbau durch Xrn1p. mRNA im NMD wird ohne vorherige Deadenylierung abgebaut (Muhlrad und Parker, 1994). Nonstop Transkripte hingegen werden aber sowohl in *xrn1Δ*, *dcp1* und *ccr4Δ* Stämmen abgebaut. Daraus lässt sich ableiten, dass nonstop RNA weder durch den NMD noch durch den normalen Abbau von mRNA beseitigt wird. Neue Studien haben gezeigt, dass nonstop RNA vom Exosom-Komplex in 3'-5' Richtung abgebaut wird (van Hoof *et al.*, 2002). Der Exosom-Komplex besteht aus den Proteinen Ski3p, Ski8p und der putativen RNA Helikase Ski2p (Jacobs *et al.*, 1998). Ski2p stellt auch das zytoplasmatische Homologe von Dob1p dar (siehe oben). Somit kann man ähnliche Mechanismen bei der Rekrutierung und Funktion von Ski2p und Dob1p/Mrt4p bei der Unterstützung des Exosom-Komplexes annehmen. Es ist anzunehmen, dass die oben erwähnte Akkumulation von poly(A)<sup>+</sup> RNA im Zellkern in *dob1*-Stämmen eher eine Konsequenz der Effekte auf den kernbasierten RNA Turnover als den RNA Export ist (Abb. 1-10).



**Abb. 1-10** Kompartimentalisierung der RNA Helikasen Dob1p und Ski2p, die bei der 3'-5' exonukleolytischen Aktivität des Exosom-Komplexes im Kern bzw. Zytoplasma mitwirken. Beim Fehlen von Dob1p oder Ski2p akkumulieren die RNA Substrate, da der Exosom-Komplex durch die Sekundärstrukturen blockiert wird (nach de la Cruz *et al.*, 1999).

Aus dieser kurzen Einführung in den Aufbau, die Funktion und die Beteiligung von RNA Helikasen kann man erkennen, dass RNA Helikasen eine Gruppe von Proteinen darstellen, die eine hohe biologische Wichtigkeit besitzen. RNA Helikasen sind an vielen unterschiedlichen Prozessen beteiligt, weshalb das Fehlen einer oder mehrerer dieser Proteine weitläufige Auswirkungen auf die Funktionen innerhalb der Zelle haben kann. Daher stellen diese Proteine, ein hochinteressantes Forschungsgebiet dar, das gerade in jüngerer Zeit immer mehr an Bedeutung gewinnt.

## 1.6 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine mögliche Beteiligung des Dhh1 Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* an DNA Reparatur Vorgängen untersucht werden. Dazu sollten die Auswirkungen einer Deletion von *DH1* in den Hefestämmen W303-1A und CenPK2 auf die Sensitivitäten gegenüber Bleomycin, MMS, UV-Strahlung und  $\gamma$ -Strahlung untersucht werden. Außerdem sollte die Auswirkung einer *DH1* Deletion auf die Effizienz und Genauigkeit des Non-homologous End-joining Reparaturwegs untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten funktionelle Domänen des Dhh1 Proteins *in vivo* charakterisiert werden. Dazu sollten N- und C-terminale Verkürzungsmutanten hergestellt werden sowie Mutationen in das ATPase Motiv und in das sogenannte SAT-Motiv eingeführt werden um deren Wichtigkeit für die *in vivo* Funktion des Dhh1 Proteins zu prüfen. Die Funktionalität der verschiedenen Dhh1 Mutanten sollte mit einem geeigneten Testsystem qualitativ untersucht werden.



## 2 MATERIAL

### 2.1 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden aus der Stammsammlung der Abteilung Prof. E.-L. Winnacker entnommen.

| Stamm                      | Genotyp   | Referenz                                       |
|----------------------------|---|--|
| E.coli sure                | E14 <sup>-</sup> ( <i>mcrA</i> ), $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )117, <i>sbcC</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>unuC::Tn5</i> (kan <sup>r</sup> ), <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <i>thi-1</i> , <i>endA1</i> , <i>uvrC</i> [F <sup>'</sup> <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15, Tn10(Tet <sup>r</sup> )] | Greener, 1990;<br>Doherty <i>et al.</i> , 1993 |
| E.coli TOP10F <sup>'</sup> | F <sup>'</sup> { <i>lacI<sup>q</sup>Tet<sup>R</sup></i> }, <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>                                 | Invitrogen BV<br>Niederlande                   |
| E.coli XL1Blue             | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F <sup>'</sup> <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15, Tn10(tet <sup>r</sup> )]   | Bullock <i>et al.</i> , 1987                   |

### 2.2 Hefestämme

| Stamm                 | Genotyp   | Referenz                     | Quelle                 |
|-----------------------|---|------------------------------|------------------------|
| W303-1A               | Mat $\underline{a}$ , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>his3-11</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3,2-112</i> , <i>can1-100</i> , <i>rad5-535</i>                      | Thomas und Rothstein, 1989   | Prof. Bandlow, München |
| W303-1B               | Mat $\alpha$ , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>his3-11</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3,2-112</i> , <i>can1-100</i> , <i>rad5-535</i>                             | Thomas und Rothstein, 1989   | Prof. Bandlow, München |
| W303 $\underline{aL}$ | Mat $\underline{a}$ , <i>yku70::LEU2</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>his3-11</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3,2-112</i> , <i>can1-100</i> , <i>rad5-535</i> | Feldmann und Winnacker, 1993 | Arbeitskreis           |
| W303 $\alpha L$       | Mat $\underline{a}$ , <i>yku70::LEU2</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>his3-11</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3,2-112</i> , <i>can1-100</i> , <i>rad5-535</i> | Feldmann und Winnacker, 1993 | Arbeitskreis           |

Material

|                             |   |                                 |                          |
|-----------------------------|---|---------------------------------|--------------------------|
| W303 <u>a</u> U             | Mat <u>a</u> , <i>yku70::URA3, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,2-112, can1-100, rad5-535</i>                  | Feldmann und Winnacker, 1993    | Arbeitskreis             |
| W303 <u>a</u> h2            | Mat <u>a</u> , <i>yku80::KanMX, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,2-112, can1-100, rad5-535</i>                 | Feldmann <i>et al</i> , 1996    | Arbeitskreis             |
| W303 <u>a</u> Lh2           | Mat <u>a</u> , <i>yku70::LEU2, yku80::KanMX, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,2-112, can1-100, rad5-535</i>    | Feldmann <i>et al</i> , 1996    | Arbeitskreis             |
| W303 <u>a</u> $\alpha$      | Mat <u>a</u> , Mat $\alpha$ , <i>ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,2-112, can1-100, rad5-535</i>                |                                 | Arbeitskreis             |
| W303 <u>a</u> U $\alpha$ L  | W303 <u>a</u> U x W303 $\alpha$ L   | Driller <i>et al</i> , 1999     | Arbeitskreis             |
| W303 <u>a</u> $\Delta$ DH   | Mat <u>a</u> , <i>DHH1::HIS3, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,2-112, can1-100, rad5-535</i>                   | diese Arbeit                    | Arbeitskreis             |
| W303 <u>a</u> $\Delta$ DK   | Mat <u>a</u> , <i>dhh1::KanMX, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,2-112, can1-100, rad5-535</i>                  | diese Arbeit                    | Arbeitskreis             |
| W303 $\alpha$ $\Delta$ DH   | Mat $\alpha$ , <i>dhh1::HIS3, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,2-112, can1-100, rad5-535</i>                   | diese Arbeit                    | Arbeitskreis             |
| W303 <u>a</u> L $\Delta$ DH | Mat <u>a</u> , <i>yku70::LEU2, dhh1::HIS3, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,2-112, can1-100, rad5-535</i>      | diese Arbeit                    | Arbeitskreis             |
| IL993-5C                    | Mat $\alpha$ , <i>ilv5</i>  | Wolf <i>et al.</i> , 1973       | Prof. K. Wolf, Mainz     |
| KL114-4A                    | Mat <u>a</u> , <i>his1, trp2</i>  | Wolf <i>et al.</i> , 1973       | Prof. K. Wolf, Mainz     |
| CenPK2 <u>a</u>             | Mat <u>a</u> , <i>leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-<math>\Delta</math>1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i>              | Prof. K.-D. Entian, Frankfurt/M | Prof. H. Domdey, München |
| CenPK2 $\alpha$             | Mat $\alpha$ , <i>leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-<math>\Delta</math>1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i>              | Prof. K.-D. Entian, Frankfurt/M | Arbeitskreis             |
| CenPK2aL                    | Mat <u>a</u> , <i>yku70::LEU2, leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-<math>\Delta</math>1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i> |                                 | Arbeitskreis             |
| CenPK2 $\alpha$ L           | Mat $\alpha$ , <i>yku70::LEU2, leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-<math>\Delta</math>1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i> |                                 | Arbeitskreis             |

|                               |   |                                 |                          |
|-------------------------------|---|---------------------------------|--------------------------|
| CenPK2 <u>a</u> U             | Mat <u>a</u> , <i>yku70::URA3, leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i>       |                                 | Arbeitskreis             |
| CenPK2 <u>a</u> h2            | Mat <u>a</u> , <i>yku80::KanMX, leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i>      |                                 | Arbeitskreis             |
| CenPK2 <u>a</u> α             | Mat <u>a</u> , Mat α, <i>leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i>             | Prof. K.-D. Entian, Frankfurt/M | Prof. H. Domdey, München |
| CenPK2 <u>a</u> UαL           | CenPK2 <u>a</u> U x CenPK2αL  | Driller <i>et al</i> , 1999     | Arbeitskreis             |
| CenPK2 <u>a</u> h2αh2         | CenPK2 <u>a</u> h2 x CenPK2αh2  | Driller <i>et al</i> , 1999     | Arbeitskreis             |
| CenPK2 <u>a</u> ΔDH           | Mat <u>a</u> , <i>dhh1::HIS3, leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i>        | diese Arbeit                    | Arbeitskreis             |
| CenPK2αΔDH                    | Mat α, <i>dhh1::HIS3, leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL</i>                | diese Arbeit                    | Arbeitskreis             |
| CenPK2 <u>a</u><br>DHH1 C-myc | Mat <u>a</u> , <i>leu2-3,112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL, DHH1 C-myc HIS3MX</i> | diese Arbeit                    | Prof. H. Domdey, München |

## 2.3 Plasmide

Beschreibungen und Ursprung der verwendeten Plasmide sind in nachfolgender Tabelle angegeben.

| Plasmidbezeichnung                      | Genbank Accession Number | Referenz                              | Quelle                |
|---|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| pGEM-4Z                                 | X65305                   | Promega Cooperation Technical Service | Arbeitskreis          |
| pBluescript II KS(+)                    | X52327                   | Alting-Mees und Short, 1989           | Prof. Lipp, Berlin    |
| pZero <sup>TM</sup> -2                  | kein Eintrag             | Invitrogen Cooperation, 1995          | Arbeitskreis          |
| pRS313,<br>pRS314,<br>pRS315,<br>pRS316 | U03440<br><br>U03442     | Sikorski und Hieter, 1989             | Prof Bandlow, München |

|                             |              |  |                     |
|-----------------------------|--------------|--|---------------------|
| pAU,<br>pAH,<br>pAT,<br>pAL | kein Eintrag |  | Mai, Bernd, München |
|-----------------------------|--------------|--|---------------------|

## 2.4 Enzyme

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| Amersham/Pharmacia                   | Thermosequenase-Kit   |
| DuPont                               | Glusulase   |
| MBI Fermentas                        | <i>Taq</i> DNA-Polymerase<br>Restriktionsenzyme   |
| New England Biolabs                  | Klenow-Fragment DNA-Polymerase I ( <i>E. coli</i> )<br>Restriktionsenzyme               |
| Roche Diagnostics GmbH               | <i>Pwo</i> DNA-Polymerase<br>Lysozym<br>RNase A<br>Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP) |
| Sigma Chemie München                 | Lytikase  |
| Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg | Zymolyase   |

## 2.5 Chemikalien

|   |                |
|---|----------------|
| Acrylamid:Bisacrylamid (19:1) 20 %                                    | Biozym Accugel |
| Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8) 30 %                                  | Biozym Accugel |
| Agarose „LE“  | SeaKem         |
| Ammoniumacetat (NH <sub>4</sub> OAc)                                  | Merck          |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)  | Merck          |
| Ampicillin  | Sigma          |
| Bacto Agar  | Difco          |
| Bacto Trypton   | Difco          |
| Bacto Peptone   | Difco          |
| Bacto Hefe Extrakt  | Difco          |
| Bromphenolblau  | Sigma          |
| Chloroform  | Riedel de Haen |
| Dinatrium-hydrogenphosphat, p. a. (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | Merck          |
| Essigsäure  | Roth           |
| Ethanol >99,8 %, p.a.   | Roth           |

|  |                              |
|--|------------------------------|
| Ethanol 99 %, vergällt mit 1 % MEG.                                  | Graen                        |
| Ethidiumbromid (100 mg/ml)   | Roth                         |
| Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA, TitriplexIII)                 | Merck                        |
| Glycerin p.a.  | Roth                         |
| Glycin >99,7 %, p.a.   | Roth                         |
| Harnstoff, p.a.  | Roth                         |
| Isopropanol >99,7 %, p.a.  | Roth                         |
| Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )                                | Merck                        |
| Natriumacetat (NaOAc)  | Merck                        |
| Natriumchlorid (NaCl)  | Merck                        |
| Natrium-dihydrogenphosphat, p. a (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | Merck                        |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)   | ICN Biomedicals GmbH         |
| Natriumhydroxid-Plätzchen  | Roth                         |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)                           | Roth                         |
| Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)                                    | Roth                         |
| Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)                          | Sigma                        |
| Salzsäure (HCl) 37 %   | Roth                         |
| TEMED  | Serva                        |
| Trishydroxymethylaminomethan (Tris)                                  | Merck                        |
| Wasser (Reinstwasser), ultrafiltriert                                | Millipore Reinstwasseranlage |

## 2.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden bei den Firmen Metabion und MWG-Biotech bestellt.

## 2.7 Geräte

|  |   |
|--|---|
| Filmentwicklermaschine   | Amersham, Hyperprocessor                          |
| Gelelektrophorese-Apparaturen:<br>horizontal<br>Sequenzgele (vertikal) | BioRad; Harnischmacher<br>BioRad                  |
| Hybridisierungs-ofen   | Bachofer  |
| PCR Thermocycler   | Biometra (Biometra Trio Thermoblock)              |
| Phosphor-Imager  | Molecular Dynamics, Storm 860                     |
| Phosphor-Screen  | Kodak Storage Phosphor Screen                     |
| Schüttelinkubatoren  | Ikamag IKA-Vibrax-VXR,                            |
| Spannungsgeräte  | Consort E321, 433, 734                            |
| Thermomixer  | Eppendorf-Thermomixer 5436                        |
| Tischzentrifuge  | Eppendorf-Zentrifuge 5417                         |
| Ultraschall-Gerät  | Branson Sonifier 250                              |
| UV-Crosslinker   | Spectrolinker XL-1500 UV, Spectronics Corporation |

## Material

---

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| UV-Illuminatoren, 245 und 366 nm  | Bachofer  |
| Vakuum-Konzentrator („speed-vac“) | Bachofer  |
| Vakuumofen                        | Heraeus   |
| Vortex                            | Vortex-Genie, Scientific Industries   |
| Zentrifugen                       | Sorvall RMC 14, Rotor: Sorvall FA-Micro<br>Centrifuge 5417, Eppendorf<br>GS-15 R, Beckmann<br>RC 26 Plus, Sorvall |

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| Blotting-Papiere                    | Schleicher & Schuell, GB 001 und GB 004 |
| Kunststoffolie                      | Saran Wrap, Dow                         |
| Membranfilter, 0,2 µm               | Schleicher & Schuell NL 17              |
| Nylonmembranen                      | Hybond N <sup>+</sup> , Amersham        |
| Parafilm                            | American National Can                   |
| Pipettenspitzen                     | Eppendorf Crystal, Gilson               |
| Reaktionsgefäße 2ml, 1,5 ml, 0,5 ml | Eppendorf Safe-Lock                     |
| Röntgenfilme                        | Kodak X-omat                            |
| Spritzenaufsatzfilter, 0,22 µm      | Millipore Millex-GP                     |

## 3 METHODEN

### 3.1 Kultivierung von Bakterien

#### 3.1.1 Vermehrung in Flüssigkultur

Die Aufzucht von Flüssigkulturen erfolgte in sterilem LB-Medium zusammen mit dem entsprechenden Antibiotikum, das entweder mit einer Impföse aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer Platte beimpft wurde. Die Kulturen wurden mindestens 6 Stunden, meist aber über Nacht, bei 37°C in einem Schüttler (200 UPM) inkubiert. Die Bakterien-dichte wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt ( $1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8$  Zellen).

**LB-Medium:** 10 g Bacto Trypton  
5 g Hefe Extract  
5 g NaCl  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest

Eingesetzte Antibiotika:

Ampicillin 100 µg/ml Stocklösung 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O  
Kanamycin 100 µg/ml Stocklösung 500 mg/ml in H<sub>2</sub>O

#### 3.1.2 Anzucht auf Agarplatten

Bakterien aus einer Glycerin- oder Flüssigkultur wurden mit einem Drygalski-Spatel, Glaskugeln oder einer Impföse auf sterile LB-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dem Medium war nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55°C das jeweilige Antibiotikum zugesetzt worden.

**LB-Agar:** 15 g Agar  
10 g Bacto Trypton  
5 g Hefe Extract  
5 g NaCl  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest.

### 3.1.3 Stammhaltung

Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurden mit Parafilm verschlossene Platten mit dem Deckel nach unten bei 4°C für mehrere Wochen gelagert. Für Dauerkulturen wurden 5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (5000 Upm/5 min, Heraeus) und in 1 ml 50 % LB/50 % Glycerin aufgenommen und bei - 80°C gelagert.

## 3.2 Klonierung in *E.coli*

### 3.2.1 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

#### 3.2.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli*-Zellen

Nach einem unveröffentlichten Protokoll von M. Scott wurde der Stamm XL1 Blue transformationskompetent gemacht.

Die Bakterien wurden auf einer LB-Agarplatte vereinzelt und eine Kolonie in 20 ml TYM bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0,2$  bis 0,8 vermehrt. Die Bakteriensuspension wurde zu 100 ml TYM gegeben und erneut bis zu einem  $OD_{600}$ -Wert von 0,6 vermehrt. Man verdünnte auf 500 ml mit TYM. Nachdem erneut eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht war, wurde der Kolben rasch in einem Eis/Kochsalz-Bad auf 0°C abgekühlt. Die Bakteriensuspension zentrifugierte man im GSA-Rotor 15 min bei 4000 Upm (4°C) ab. Das Pellet suspendierte man vorsichtig in 100 ml Tfb I (gekühlt) und ließ es für 15 min bei 0°C stehen. Danach zentrifugierte man erneut ab (3800 Upm/5 min/4°C, GSA). Das Pellet wurde in 20 ml Tfb II (gekühlt) resuspendiert, in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert (je 200 µl) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots konnten bei - 80°C mehrere Monate gelagert werden.

Die Kompetenz der Bakterien wurde durch Transformation mit einer bekannten Menge Plasmid getestet. 100 µl einer kompetenten Bakterien-Suspension wurden mit 10 ng pGEM4Z-DNA transformiert. 1, 10, 25 und 50 µl des Transformationsansatzes wurden auf  $LB_{Amp}$ -Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus der Anzahl der erhaltenen Kolonien pro µl des Transformationsansatzes lässt sich die Anzahl der Transformanden pro µg DNA bestimmen.

**TYM:** 20 g Bacto Trypton  
 5 g Hefe Extrakt  
 5,84 g NaCl  
 2,46 g MgSO<sub>4</sub>  
 ad 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest

**TfB I:** 30 mM KOAc  
 50 mM MnCl<sub>2</sub>  
 100 mM CaCl<sub>2</sub>  
 15 % Glycerin

**TfB II** 10 mM MOPS/NaOH, pH 7.0  
 75 mM CaCl<sub>2</sub>  
 10 mM KCl  
 15 % Glycerin

MnCl<sub>2</sub> wurde aus einer getrennt steril filtrierten Stocklösung (1 M) zu Puffer TfBI gegeben, da Mn(II) sonst beim Autoklavieren oxidiert wird.

### 3.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Übernachtskultur wurde 1 l LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bei 37°C geschüttelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (4500 Upm, 10 min, 4°C). Die folgenden 3 Waschschrte wurden im Kühlraum auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden die Bakterien mit 1 Volumen, dann mit 0,5 Volumina und zuletzt mit 50 ml kaltem Wasser gewaschen. Dann wurde das Pellet in 2-3 ml 10 % Glycerin aufgenommen, zu 40 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die elektrokompetenten Bakterien konnten bei -80°C aufbewahrt werden.

## 3.2.2 Transformation kompetenter *E. coli*

### 3.2.2.1 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*

Zur Transformation von 5 bis 20 µl eines Ligationsansatzes wurde ein 100 µl Aliquot kompetenter Bakterien verwendet. Dazu wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut (ca. 10 Minuten) und dann zu dem entsprechenden Volumen des Ligationsansatzes hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, 2 Minuten auf 42°C gestellt (Hitzeschock) und anschließend sofort wieder 10 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Transformationsansatz 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Ein Aliquot des Ansatzes (100-300 µl) wurde auf LB<sub>Amp</sub>-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert (mit sterilen Glasperlen) und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.2.2.2 Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Die Elektroporationen der Bakterien wurden in 0,1 mm Küvetten bei 1,25 kV in einem Gene Pulser (Biorad) durchgeführt.

Zu den 40 µl Bakterien-Aliquots wurde 1 µl DNA pipettiert und dieser Ansatz in kalte Küvetten überführt. Nach dem erfolgten Puls wurde sofort 1 ml eiskaltes SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) zugegeben und der Ansatz wieder in Eppendorf-Gefäße überführt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurden 10 µl und 100µl Aliquots auf LB Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

**SOC-Medium:**

- 2 % Bacto Trypton/NaOH, pH 7,0
- 0,5 % Bacto Hefe Extract
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- ad 980 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

nach dem Autoklavieren ad 1000 ml mit einer 20 %-igen Glukoselösung.

Das SOC-Medium wurde aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.3 Ligation

#### 3.2.3.1 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Für Klonierungen wurde ein DNA-Fragment in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor (50-100 ng) ligiert. Dazu wurde in der Regel ein molares Verhältnis von 1:3 von Vektor zu Fragment gewählt. Die Ligationen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Zusatz von 1 µl T4-DNA-Ligase (4 Units) und 2 µl 10x Ligase-Puffer bei 16°C über Nacht.

**10x Ligase-Puffer**

- 500 mM Tris/HCl (pH 7,6)
- 100 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM ATP
- 10 mM DTT

### 3.2.3.2 Ligationen von PCR-Fragmenten in den Vektor pZErO<sup>TM</sup>-2

DNA-Fragmente, die mit Hilfe einer PCR amplifiziert wurden, sind an ihrem 5'-Ende nicht phosphoryliert. Für die Ligation in einen Vektor darf dieser nach der Linearisierung nicht dephosphoryliert werden. Die Religation des Vektors würde gegenüber der Ligation des Fragmentes überwiegen.

Durch die Verwendung des Vektors pZErO<sup>TM</sup>-2 wird bei der Religation des Vektors die Expression des letalen Gens *ccdB* induziert. Bei erfolgreicher Ligation des PCR-Produktes in den Vektor wird der Leserahmen dieses Gens unterbrochen, so dass die transformierten Bakterien überleben können.

Für die Ligation wurde 1 µg Vektor mit maximal 10 Units *EcoRV* für 10-30 min gespalten. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung (20 min, 80°C) des Enzyms gestoppt. Man setzte sofort 50 ng des linearisierten Vektors mit mindestens der äquimolaren Menge an PCR-Produkt in die Ligation ein. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht. Der gesamte Ligationansatz wurde in chemisch kompetente TOP10F'-Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden auf LB-Platten, die Kanamycin und IPTG zur Selektion bzw. Induktion enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 3.2.4 Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E.coli*

### 3.2.4.1 Alkalischer Schnellaufschluß

Das Protokoll von Birnboim und Doly (1979) für die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde folgendermaßen modifiziert.

5 ml einer Übernachtskultur oder eine 1,5 ml Kultur der Bakterien die für 4-6 Stunden gewachsen war wurde abzentrifugiert (4000 Upm/10 min/RT, Heraeus). Das Bakterienpellet wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Dann wurden 300 µl Puffer P2 zugegeben und die Mischung vorsichtig geschwenkt (nicht vortexen !). Danach wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben, gemischt und der entstandene Niederschlag bei 14000 Upm (20 min/Raumtemperatur; Eppendorf) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid DNA mit Isopropanol (0,7 Volumen) gefällt. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und an Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl TE-

Puffer oder sterilem Wasser aufgenommen und in dieser Form für Restriktionsspaltungen bzw. zum Sequenzieren eingesetzt.

**Puffer P1:** 50mM Tris HCl pH 8.0  
10 mM EDTA pH 8.0

**Puffer P1+RNase A:** 100 µg/ml RNase A

**Puffer P2** 200 mM NaOH  
1 % SDS

**Puffer P3:** 2.55 M KOAc pH 4.8

**RNase A-Stammlösung:** 10 mg/ml RNase A  
10 mM Tris/HCl, pH 7,5  
15 mM NaCl

Die RNase A Lösung wurde 15 min aufgekocht, langsam abgekühlt und aliquotiert aufbewahrt.

### 3.2.4.2 Schnellaufschluß durch Aufkochen (Holmes und Quigley, 1981)

Plasmid DNA kann auch durch das Aufkochen der Bakterienzellen isoliert werden. Dazu wurden die geernteten Zellen einer 3 ml Übernachtskultur in 350 µl STET Puffer resuspendiert und mit 25 µl Lysozym (1 mg/ml in Tris-HCl pH 8,0) versetzt. Anschließend wurden die Zellen 40 sec in siedendes Wasser getaucht und der entstandene flockige Niederschlag bei 12.000 xg abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet konnte mit einer Impföse entfernt werden. Die DNA wurde durch Zugabe von 400 µl Isopropanol bei 12.000 xg (Eppendorf, 4°C, 10 min) gefällt. Der Überstand wurde abgossen und das DNA Pellet in 20 µl Wasser gelöst.

**STET-Puffer** 0,1 M NaCl  
10 mM Tris-HCl pH 8,0  
1 mM EDTA pH 8,0  
5 % Triton X-100

### 3.2.4.3 Plasmidreinigung über Qiagen Plasmid Kits

Die Reinigung erfolgte über Anionenaustauschersäulen aus einem kommerziellen Plasmid-Kit der Firma Qiagen. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Je nach gewünschter DNA-Menge wurden Mini-, Midi- oder Maxi-Säulen verwendet.

| Präparation | Menge an <i>E. coli</i><br>Übernachtskultur | Maximale<br>DNA-Ausbeute |
|-------------|---|--------------------------|
| Mini        | 3-5 ml                                      | 10 µg                    |
| Midi        | 50-100 ml                                   | 50 µg                    |
| Maxi        | 100-300 ml                                  | 500 µg                   |

Für die Qiagenminipräparation wurde zunächst analog dem alkalischen Schnellaufschluß verfahren, jedoch der klare Überstand nach dem Aufschluss mit den Puffern P1-P3 und Zentrifugation auf eine mit 1 ml Puffer QBT äquilibrierte Minisäule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml QC-Waschpuffer, wurde die DNA mit 0,8 ml Puffer QF eluiert und mit 0,6 ml Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation (14.000 UPM, 20 min, RT) wurde ein DNA-Pellet erhalten, das mit 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet wurde. Das trockene Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer oder sterilem Wasser aufgenommen.

Die Midi-, und Maxipräparation erfolgte analog, jedoch in größeren Puffermengen (siehe unten).

|            | Minipräparation: | Midipräparation: | Maxipräparation |
|------------|------------------|------------------|-----------------|
| Puffer P1  | 300 µl           | 4 ml             | 10 ml           |
| Puffer P2  | 300 µl           | 4 ml             | 10 ml           |
| Puffer P3  | 300 µl           | 4 ml             | 10 ml           |
| Puffer QBT | 1 ml             | 10 ml            | 10 ml           |
| Puffer QC  | 2 x 1 ml         | 2 x 10 ml        | 3 x 30 ml       |
| Puffer QF  | 0,8 ml           | 5 ml             | 15 ml           |

**Puffer QBT:** 750 mM NaCl  
50 mM MOPS pH 7.0  
15 % EtOH  
0,15 % Triton X 100

**Puffer QC:** 1 M NaCl  
50 mM MOPS pH 7.0  
15 % EtOH

**Puffer QF:** 1.2 M NaCl  
50 mM MOPS pH 8,5  
15 % EtOH

### 3.3 DNA-Reinigung und Analyse

#### 3.3.1 Reinigung durch Phenolextraktion

Um DNA von Proteinen zu befreien wurde sie durch Phenolextraktion abgetrennt. Dazu wurde die wässrige DNA-Lösung mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) (Phenol/CIA) versetzt, gut gemischt und die Phasen durch Zentrifugation (14.000 UPM, 10 min, RT) getrennt. Dabei sammeln sich die Proteine in der Interphase, während die obere wässrige

Phase die DNA enthält. Diese wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut mit 1 Vol Phenol/CIA versetzt und die Prozedur wiederholt. Um das restliche Phenol zu entfernen, wurde die wässrige Phase zuletzt mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, CIA) vermischt und abzentrifugiert. Aus der oberen Phase wurde die DNA gefällt.

### 3.3.2 DNA-Präzipitation

#### 3.3.2.1 Ethanolfällung

Aus wässrigen Lösungen kann DNA zur Konzentrationserhöhung präzipitiert, und in einem kleineren Volumen sterilem Wasser oder TE-Puffer aufgenommen werden.

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 100 %igem eiskaltem Ethanol versetzt, gemischt und für mindestens 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  (14.000 UPM, 20 min) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei RT zentrifugiert (14.000 UPM, 10 min). Danach wurde die DNA an der Luft getrocknet und im gewünschten Volumen sterilem Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

#### 3.3.2.2 Isopropanolfällung

Bei großen Volumina an DNA-Lösung bietet sich die DNA-Präzipitation mit Isopropanol an. Außerdem können alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden und man spart sich die Inkubationszeit bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und benötigt keine Kühlzentrifuge. Analog zur Ethanolfällung wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Vol. 3M Natriumacetat und 0,7 Vol. Isopropanol versetzt, gemischt und für 20 Minuten bei 14.000 Upm gefällt. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (14.000 Upm, 10 min, RT) und an der Luft getrocknet. Die so präzipitierte DNA wurde in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

### 3.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Durch Messung der  $OD_{260}$  konnte die Konzentration einer DNA-Lösung in TE bestimmt werden. Es wurden Quarzküvetten verwendet, der Leerwert war reines TE. Dabei gilt folgende Abschätzung:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml DNA.}$$

Zur Bestimmung von Oligonukleotiden lässt sich die Konzentration über eine Inkrementrechnung der molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{260}$  genau bestimmen:

|                                  |                                   |                                   |                                   |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| $\epsilon_{260}(\text{A})=0,015$ | $\epsilon_{260}(\text{C})=0,0074$ | $\epsilon_{260}(\text{G})=0,0118$ | $\epsilon_{260}(\text{T})=0,0088$ |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|

$$c\left(\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}}\right) = \frac{\text{gemessener } OD_{260} \text{ Wert}}{\sum \{n(X) \cdot \epsilon_{260}(X)\}}$$

$n(X)$  : Anzahl des Nukleotids X im Oligonukleotid

### 3.3.4 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA wurde durch horizontale Gelelektrophorese in 0,8 – 2,0 %igen Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt.

Die Agarose wurde eingewogen, in 1x TBE-Puffer suspendiert und im Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid in einer Verdünnung von 1:20000 zugegeben und das Gel in eine Horizontalapparatur mit entsprechender Form gegossen. Die in TE oder Wasser gelöste DNA wurde mit 0.2 Vol. Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Spannungen von 5-10 V/cm (Gellänge) in TBE-Puffer (mit Zusatz einer 1:20000 Verdünnung von Ethidiumbromid) zusammen mit einem Größenstandard (*Eco*130I geschnittene  $\lambda$ -DNA) durchgeführt. Die DNA konnte anschließend durch Fluoreszenzanregung des interkalierten Ethidiumbromids im UV-Durchlicht bei 254-366 nm sichtbar gemacht werden.

|                      |  |                            |   |
|----------------------|--|----------------------------|---|
| <b>1xTBE-Puffer:</b> | 100 mM Tris<br>83 mM Borsäure<br>1 mM EDTA | <b>DNA-Auftragspuffer:</b> | 10 mM Tris HCl pH 8.0<br>50 mM EDTA pH 8.0<br>10 % Ficoll<br>10 % Glycerin<br>0.01 % Bromphenolblau<br>0,01 % Xylencyanol |
|----------------------|--|----------------------------|---|

### 3.3.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

#### 3.3.5.1 Zentrifugation durch Glaswolle

Zunächst wurde ein Eppendorfgesäß mit einer Kanüle im Boden durchbohrt und dann mit silikonisierter Glaswolle etwa zu einem Drittel gefüllt. Auf die Glaswolle wurde das Gelstückchen, aus dem die DNA isoliert werden sollte, gelegt. Dieses Eppendorfgesäß wurde dann auf ein zweites gesteckt und zentrifugiert (6000 Upm, 5 min, RT). Im unteren Gefäß befand sich nach der Zentrifugation die wässrige DNA-Lösung, die dann zur weiteren Verwendung phenolisiert und gefällt werden konnte.

#### 3.3.5.2 Elution der DNA mit dem Qiagen Gel Extraction Kit

DNA konnte auch mit einem handelsüblichen Kit der Firma Qiagen aus Agarosegelen extrahiert werden. Dazu wurde das die DNA enthaltende Gelstück ausgeschnitten und gewogen. Dann wurden 3 Volumen Puffer QG hinzugegeben und das Gel bei 50°C gelöst. Die Lösung wurde auf Qiagen Spin Columns gegeben und zentrifugiert (14000 UPM/1 min/RT/ Eppendorf). Überstieg das Lösungsvolumen das Fassungsvermögen der Säule wurde mehrmals auf die Säule aufgetragen (DNA-Binde-Kapazität der Säulen: 10 µg). Das Zentrifugat wurde verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen (14000 UPM/ RT/ 1 min/ Eppendorf). Um Ethanolreste zu entfernen wurde noch einmal zentrifugiert (14000 UPM/ RT/ 1 min/ Eppendorf). Zur Elution der DNA von der Säule wurden 30 µl Puffer EB in die Mitte der Säule pipettiert und der Puffer 1 min einwirken gelassen. Die DNA wurde dann durch Zentrifugation (14000 UPM/ RT/ 1 min/ Eppendorf) eluiert. Mit Hilfe dieses Kits konnten auch bei geringen DNA-Mengen sehr gute Ausbeuten erzielt werden.

### 3.3.6 Sequenzierung von doppelsträngiger DNA

Die Didesoxy-Sequenzierung doppelsträngiger DNA nach *Sanger et al.* (1977) beruht auf der basenspezifischen Termination von enzymatisch katalysierter DNA-Verlängerung an spezifischen Primern mit Hilfe von Thermo Sequenase™.

Es wurden vier verschiedene Reaktionen durchgeführt, die jeweils ein unterschiedliches Didesoxynukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) enthielten. Der Einbau des Didesoxynukleotids führt zum Abbruch der DNA-Polymerisation und repräsentiert das entsprechende Desoxynukleotid in der Sequenz (durch ein Sequenzgel bestimmt). Hierzu wurde ein kommerzieller Sequenzkit (Thermo Sequenase™ Kit, usb) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Reaktion verläuft in mehreren Schritten:

#### 3.3.6.1 Durchführung der Sequenzierungs-Reaktion

Der Kit enthielt einen sogenannten Terminations Master Mix. Von diesem wurden 2 µl pro Reaktion vorgelegt und die finalen Terminationsmische durch Zugabe von 0,5 µl des entsprechenden  $\alpha$ -<sup>33</sup>P markierten Didesoxynukleotids ([ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]ddATP, [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]ddCTP, [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]ddGTP, [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]ddTTP) hergestellt.

| (Vol. in µl)                       | A   | C   | G   | T   |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Terminations Master-Mix            | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| [ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]ddATP | 0,5 |     |     |     |
| [ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]ddCTP |     | 0,5 |     |     |
| [ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]ddGTP |     |     | 0,5 |     |
| [ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]ddTTP |     |     |     | 0,5 |
| Gesamtvolumen                      | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |

Parallel dazu wurde der Reaktionsmix nach folgendem Schema hergestellt:

|                                  |                   |
|----------------------------------|-------------------|
| Reaktions Puffer                 | 2 µl              |
| DNA                              | x µl (max. 10 µl) |
| Primer                           | x µl              |
| Wasser                           | x µl              |
| Thermo Sequenase™ DNA-Polymerase | 2 µl              |
| Gesamtvolumen                    | 20 µl             |

Von dem Reaktionsmix wurden dann jeweils 4,5µl zu dem entsprechenden Terminationsmix pipettiert und in einem Thermocycler einer PCR-Reaktion unterzogen. Die Zyklen sind im Folgenden angegeben:

|        |              |              |             |
|--------|--------------|--------------|-------------|
| 30-60x | 95°C, 30 sec | 55°C, 30 sec | 72°C, 1 min |
|--------|--------------|--------------|-------------|

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Stop-Lösung gestoppt und wenn nicht gleich auf das Sequenzgel aufgetragen, bei -20°C gelagert.

Vor dem Auftrag auf das Sequenzgel wurden die Proben für 5 Minuten bei 98°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgeschreckt.

### 3.3.6.2 Polyacrylamid-Sequenzgel-Elektrophorese

Die Auftrennung der einzelnen Sequenzreaktionen erfolgte auf 0.2 mm dicken denaturierenden Polyacrylamid(PAA)-Harnstoffgelen, wie bei Heinrich (1986) beschrieben. Beide Glasplatten wurden gründlich gesäubert und mit Ethanol nachgereinigt. Auf die kleinere Glasplatte wurden 5 ml einer 5 %igen Dichlordimethylsilanlösung in Chloroform verteilt und gleichmäßig poliert. Nach 5 minütigem Trocknen wiederholte man die Behandlung. Die größere Glasplatte behandelte man einmal mit 5 ml Silliconlösung (Serva) in analoger Weise. Die 0.2 mm dicken Spacer legte man zwischen die Glasplatten, die anschließend durch die Apparatur (BioRad) zusammengehalten wurden. Die Gellösung wurde durch einen Membranfilter filtriert und mit den Radikalstartern (TEMED und APS) versetzt. Dann wurde sie möglichst ohne Luftblasen zwischen die Glasplatten gegossen, die Kämme gesteckt und mindestens 1 h bei Raumtemperatur polymerisiert.

**5 %ige PAA-Harnstoff-Lösung:**     42 g Harnstoff  
   10 ml Long Range Lösung  
   12 ml 10 x TBE  
   ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Das polymerisierte Gel wurde in die Apparatur eingespannt und bei 45 mA/80 Watt in 0,6 x TBE elektrophoretisiert, bis die Geltemperatur 45 - 50°C betrug. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Kammtaschen gut mit 0,6 x TBE gespült, um den angesammelten Harnstoff zu entfernen.

Es wurden 1,5 bzw. 4,5  $\mu\text{l}$  der Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 mA und 90-110 Watt ca. 3 h durchgeführt. Die Zeit wurde variiert, um unterschiedliche Leseweiten zu erhalten.

Nach der Gelelektrophorese wurde die obere, kleinere Platte abgenommen. Anschließend übertrug man das Gel vorsichtig auf ein, auf Gelgröße zugeschnittenes, 3 MM Whatman-Papier und deckte das Gel mit Haushaltsfolie ab. Das Gel trocknete man bei 80°C 1h auf dem Geltrockner unter Vakuum und exponierte 1-2 Tage bei Raumtemperatur.

Im späteren Verlauf dieser Arbeit etablierte sich ein von Dr. Helmut Blum geleiteter Sequenzierservice, bei dem fortan sequenziert wurde.

### 3.4 Enzymatische Reaktionen an DNA

#### 3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wird DNA an spezifischen Sequenzen gespalten. Gereinigte DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Enzymen in ihrem Reaktionspuffer gespalten, wobei die Enzymmenge höchstens 1/10 des Endvolumens betragen darf, um wegen des Glyceringehaltes des Enzymaufbewahrungspuffers vollständige Enzymaktivität zu erhalten. Hauptsächlich wurden die für die entsprechenden Enzyme vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffer verwendet. Gegebenenfalls wurde 0,1 Vol. einer BSA-Stammlösung (10 mg/ml) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte meistens bei 37°C für mindestens 2 Stunden. Bei quantitativer Spaltung von größeren DNA Mengen oder von genomischer DNA wurden die Restriktionsansätze über Nacht inkubiert. Die vollständige Spaltung der DNA wurde auf Agarosegelen überprüft.

Im Falle von Doppelspaltungen wurden bei nicht kompatiblen Pufferbedingungen der beiden verwendeten Enzyme Einzelspaltungen durchgeführt. Zwischen den beiden Restriktionen wurde ggf. das geschnittene Fragment aus einem Agarosegel isoliert oder die DNA durch Isopropanolfällung präzipitiert (3.3.2)

Ein Standardreaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 - 50  $\mu\text{l}$  enthielt:

|                          |  |
|--------------------------|--|
| X $\mu\text{l}$          | DNA (in H <sub>2</sub> O oder TE-Puffer) |
| 1/10 Volumen             | 10x Restriktionsenzympuffer              |
| 1/10 Volumen             | 10x BSA (vom Enzym abhängig)             |
| 1-5 U/ $\mu\text{g}$ DNA | Restriktionsenzym                        |

### 3.4.2 Auffüllen 5' überhängender Enden mit Klenow DNA-Polymerase

Durch die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen können 5'-, 3'-überhängende oder glatte Enden der DNA entstehen. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms, das aus der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I besteht, können 5'-überhängende Enden aufgefüllt werden. Die DNA wurde dabei in Gegenwart von 500  $\mu$ M Desoxynukleotidtriphosphaten (pH 7,0) mit 5 Units Enzym für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der große Überschuss der Desoxynukleotidtriphosphate und das Arbeiten bei niedriger Temperatur ist notwendig, um die 3'-5' Exonukleaseaktivität der Klenow Polymerase zu unterdrücken. Die Klenow DNA-Polymerase wurde durch 20 minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert.

**5 x Klenow-Puffer:** 250 mM Tris-HCl, pH7,5  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT

### 3.4.3 Herstellung glatter Enden mit T4 DNA-Polymerase

Aufgrund ihrer starken Exonukleaseaktivität können mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase 3'-überhängende Enden in glatte Enden übergeführt werden. Unter geeigneten Bedingungen können 5'-überhängende Enden aufgefüllt werden.

Maximal 2  $\mu$ g DNA wurden in 1x T4-Puffer mit 500  $\mu$ M dNTPs und 7 Units T4 DNA-Polymerase bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die Polymerase wurde durch Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

**5x T4-Puffer:** 250 mM Tris-HCl, pH 8,8  
250 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT  
50  $\mu$ g/ml BSA

### 3.4.4 Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Die mit Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA wurde mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Roche) behandelt, um bei Ligase-Reaktion unerwünschte Rezirkulierungen des Vektors zu verhindern. 1  $\mu$ l linearisierte Plasmid-DNA (50 ng/ $\mu$ l) wurden mit 0,9  $\mu$ l SAP-Puffer, 1  $\mu$ l SAP und 6,1  $\mu$ l Wasser versetzt und bei 37°C inkubiert. Bei überhängenden Enden reichte eine Inkubationszeit von 10 min., bei glatten Enden musste eine Stunde inkubiert wer-

den. Die SAP wurde durch Inkubation für 20 min bei 65°C inaktiviert. Eine Phenolisierung zum Entfernen der SAP war nicht nötig. Ein solcher Dephosphorylierungsansatz konnte direkt in die Ligase-Reaktion (3.2.4) eingesetzt werden.

**10 x SAP-Puffer:** 100 mM Tris/HCl, pH8,5  
50 mM MgCl<sub>2</sub>

### 3.4.5 PCR-Amplifizierung

Die Methode der enzymatischen Amplifikation von DNA-Abschnitten unter Verwendung spezifischer Polymerisationsstarter („Primer“) wurde von Saeki *et al.* (1985, 1988) entwickelt und verbessert. Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die selektive Anreicherung eines DNA-Fragments unter Verwendung von zwei synthetischen Oligonukleotiden, die spezifisch an je ein Ende der zu untersuchenden DNA-Region hybridisieren („Annealing“) und als Primer für die DNA-Synthese durch thermostabile Polymerase dienen.

Die PCR wurde angewendet, um DNA-Fragmente zu vervielfältigen, Disruptionskonstrukte oder Fragmente mit spezifischen Restriktions-Schnittstellen für gerichtete Voll- oder Teildisruptionen oder Klonierungen zu erhalten.

Als Polymerasen eignen sich Taq-, Vent- oder Pwo-Polymerase. Letztere garantiert eine nahezu fehlerfreie Amplifikation des DNA-Fragmentes und ermöglicht unter anderem die Analyse von Punktmutationen.

Die PCR besteht aus drei Schritten, die als Zyklen 30-40 mal wiederholt werden.

1. Hitzedenaturierung der DNA für 1 min bei 96°C.
2. Annealing der Primer für 45 sec bei der berechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide, die gegebenenfalls variiert wurde (+/- 2°C).
3. Polymerisationsreaktion („Elongation“) für 2 min bei 72°C.

Nach dem letzte Zyklus wurde die Elongationszeit auf 10 min verlängert, um noch unvollständige DNA-Fragmente aufzufüllen.

Der 100 µl Reaktionsansatz enthielt 50 ng – 1 µg Template DNA, 20 pmol jedes Primers, 5 mM je dNTP, 1x Polymerase-Puffer mit MgSO<sub>4</sub> und 2,5 Units Polymerase. Die Polymerase wurde erst nach 5 minütigem Aufkochen des Ansatzes bei 96°C zugegeben („hot start“). Da

der Thermocycler über eine beheizbare Deckelplatte verfügte musste der Ansatz nicht mit Mineralöl überschichtet werden.

Die Überprüfung der PCR erfolgte durch Auftrennung der Ansätze in einem Agarosegel.

### 3.4.6 PCR basierte Mutagenese von DNA

Um Punktmutationen in Plasmid-DNA einzuführen wurde der kommerziell erhältliche Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Dabei wurde laut Herstellerangaben verfahren.

|       |                        |
|-------|------------------------|
| 1 µl  | Plasmid-DNA (50 ng/µl) |
| 5 µl  | 10x Reaktionspuffer    |
| 1 µl  | Primer 1 (125 ng/µl)   |
| 1 µl  | Primer 2 (125 ng/µl)   |
| 1 µl  | dNTP-Mix (10 mM)       |
| 1 µl  | Pfu-DNA-Polymerase     |
| 40 µl | Wasser                 |

PCR-Zyklen:

| Wiederholungen | Denaturierung | Hybridisierung | Elongation  |
|----------------|---------------|----------------|-------------|
| 1x             | 95°C 30 sec   |                |             |
| 16x            | 95°C 30 sec   | 55°C 1 min     | 68°C 18 min |
| 1x             |               |                | 68°C 10 min |
|                | dann 4°C      |                |             |

Bei der PCR-Reaktion handelt es sich um eine Standardreaktion, bei der immer die selbe Hybridisierungstemperatur verwendet wird. Lediglich die Elongationszeit richtet sich nach der Anzahl der zu amplifizierenden Basenpaare (2 min/kb Plasmidlänge). Die Anzahl der Wiederholungen ist gegeben durch die Art der Mutagenese ( Punktmutationen 12, einfache Aminosäure Austausche 16, mehrere Aminosäure Deletionen oder Insertionen 18). Die Templat-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl *DpnI* und Verdau bei 37°C für eine Stunde entfernt. Von diesem verdauten PCR-Ansatz wurden 20µl in chemisch kompetente *E. coli* wie in 3.2.2.1 beschrieben transformiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Die Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert.

### 3.5 Radioaktive Markierung von DNA

#### 3.5.1 Markierung doppelsträngiger DNA-Fragmente

Für die Markierung linearer DNA-Fragmente (50 ng) wurde ein kommerzieller Kit der Firma Gibco, BRL verwendet. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 98°C für 10 min wurden Hexanukleotide („random primer“) zugegeben, die durch ihre Zufallssequenzen an einzelsträngige DNA hybridisieren und so als Primer für die folgende Polymerisation dienen. Die Polymerisation fand im speziellen Puffer für 1 h bei 37°C unter Zugabe von je 1 mM dNTPs, wovon eines mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] markiert war, und 5 Units Klenow-Polymerase statt. Danach wurde die markierte DNA sofort über Sephadex G50-Säulen (3.5.2) von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt.

**Ansatz:** 23  $\mu$ l DNA in Wasser  
15  $\mu$ l Random Primer Puffer-Mix (je 2  $\mu$ l dCTP, dGTP, dTTP (0,5 mM)  
5  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (3000 Ci/mmol)  
1  $\mu$ l Klenow-Polymerase (5 Units/ $\mu$ l)

#### 3.5.2 Reinigung über Sephadex G50-Säulen

Um markierte DNA von freien [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dNTPs abzutrennen, wurde an die Polymerisationsreaktion eine Gelfiltration über Sephadex G50-Säulen angeschlossen. Der Markierungsansatz wurde auf die mit 1x TE-Puffer äquilibrierten Säulen (Pasteurpipetten, am unteren Ende mit einer Glaskugel verschlossen und mit gequollenem Sephadex G50-Material gefüllt) pipettiert und mit 1-2 ml 1x TE-Puffer gewaschen. Sobald der erste Tropfen DNA-Lösung, der radioaktive Strahlung emittierte, eluierte, wurden 4-5 Fraktionen à 100  $\mu$ l gesammelt. Der Rest wurde verworfen. Die Fraktionen wurden mit einem Zählrohr nachgemessen und die drei stärksten Fraktionen vereinigt.

#### 3.5.3 5'-Endmarkierung mit T4-Polynukleotidkinase

Synthetische Oligonukleotide wurden durch 5'Phosphorylierung mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP und T4-Polynukleotidkinase endmarkiert. In einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l wurden 10 pmol Oligonuklotid in 1x Kinasepuffer mit 5  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP (3000 Ci/mmol) und 1 Unit

T4-Polynukleotidkinase für 1 h bei 37°C inkubiert. Die so markierten Oligonukleotide wurden über Sephadex G50-Säulen gereinigt (3.5.2).

### 3.6 Blotting und Hybridisierungsverfahren für DNA

#### 3.6.1 Transfer von DNA auf Trägermembranen

##### 3.6.1.1 Kapillar Blot

Die Übertragung von DNA aus Agarosegelen auf Hybond-N<sup>+</sup>-Nylonmembranen wurde nach einem modifizierten Verfahren nach Reed und Mann (1985) durchgeführt.

Das Gel wurde zunächst zur Depurinierung für 20 Minuten in 0,25 N HCl geschwenkt und dann für 20 Minuten mit 0,4 N NaOH denaturiert. Anschließend wurde das Gel auf zwei Lagen 3 MM Whatmanpapier, die mit 0,4 N NaOH getränkt waren, gelegt. Diese befanden sich auf einem Schwamm, der ebenfalls mit 0,4 N NaOH getränkt war. Auf das Gel wurde nun die mit 5x SSC angefeuchtete, auf das Gel zugeschnittene Membran luftblasenfrei gelegt und nach zwei weiteren Lagen Whatmanpapieren wurden ca. 10 cm hoch Papiertücher aufgestapelt, die gleichmäßig beschwert wurden. Um einen Kurzschluss des Schwammes mit den Papiertüchern zu vermeiden, wurde der Rand des Schwammes mit Parafilm abgedeckt.

Die Transferzeit betrug 12-16 Stunden (über Nacht). Danach wurde die Membran kurz in 5x SSC geschwenkt, um eventuelle Gelrückstände zu entfernen und dann an der Luft getrocknet. Die DNA wurde an der Membran durch UV-Licht („optimal crosslink“, Stratalinker) fixiert. Die so geblottete DNA konnte anschließend mit einer spezifischen und markierten Sonde durch Hybridisierung detektiert werden.

##### 3.6.1.2 Vakuum-Blot

Eine kürzere Transferzeit (1-1,5 Stunden) für DNA auf Nylonmembranen erzielt man mit dem Vakuum-Blot.

Das Gel wurde wie unter 3.6.1.1 beschrieben depuriniert und denaturiert. Während der Denaturierung wurde die Apparatur vorbereitet.

Die Hybond-N<sup>+</sup>-Nylonmembran wurde zugeschnitten, angefeuchtet und auf die Kunststoffunterlage der Vakuumkammer gelegt. Darüber kam eine Kunststoffmaske, die nur den Transfer

auf die Membran erlaubte. Dann wurde das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt, die Kammer geschlossen und das Gel vorsichtig mit dem Transferpuffer (0,4 N NaOH) überschichtet. Nach dem Anschalten der Vakuumpumpe und Einstellen des Unterdrucks auf 55 mbar wurde die DNA innerhalb von 90 Minuten auf die Nylonmembran transferiert. Zum Beenden des Blottens wurde zunächst die Pumpe von der Kammer getrennt, bevor sie ausgeschaltet wurde. Die Membran wurde weiter wie unter 3.6.1.1 beschrieben behandelt.

### 3.6.2 Telomerblots mit genomischer Hefe-DNA

Für einen Telomerblot wurde die nach 3.11.2 hergestellte DNA über Nacht mit *XhoI* gespalten:

36  $\mu$ l DNA  
6  $\mu$ l 10x Puffer R<sup>+</sup> (Fermentas)  
6  $\mu$ l Rnase A  
6  $\mu$ l *XhoI*  
6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Vom Spaltansatz wurde 1/10 Volumen auf einem Agarosegel aufgetrennt und quantifiziert. Dann wurden äquivalente Mengen DNA auf ein 1 %iges Maxi-TAE-Agarosegel aufgetragen und für 36 Std. im Kühlraum bei 75V mit umgepumpten Laufpuffer aufgetrennt. Danach wurde das Gel wie unter 3.6.1.1 beschrieben auf eine Nylonmembran geblottet und nach 3.6.3 hybridisiert. Das Oligonukleotid wurde für die Hybridisierung folgendermaßen markiert:

1  $\mu$ l TEL-Oligonukleotid (10 pmol/ $\mu$ l)  
11  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
2  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase-Puffer  
5  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP  
1  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase

Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und das markierte Oligo nach 3.5.2 gereinigt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Phosphorscreen oder durch Auflegen eines Filmes.

### 3.6.3 Hybridisierung nach Church

Nach einem modifizierten Protokoll von Church und Gilbert (1984) wurden die angefeuchteten Membranen (TE oder 5x SSC) 1h mit mindestens 150 ml Church-Puffer bei 65°C in Plas-

tikwannen prähybridisiert. Anschließend wurde der Puffer durch frischen vorgewärmten Church-Puffer ersetzt und die radioaktiv markierte Sonde nach 10-minütigem Aufkochen bei 95°C zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Ab hier wurde das Protokoll auf das in unserem Labor verwendete TEL-Oligonukleotid optimiert. Für alle anderen Oligonukleotide muss das Protokoll entsprechend angepasst werden.

Am nächsten Tag wurden die Membranen bei Raumtemperatur 2x mit 0,2x SSC/ 0,1 % SDS Puffer gewaschen. Dabei wurde zwischen jedem Waschschrift kurz mit obigem Puffer gespült. Zur Autoradiographie wurden die Membranen auf PVC-Platten aufgespannt und luftblasenfrei mit Frischhaltefolie abgedeckt. Die Exposition erfolgte über Nacht auf einen Film oder Phosphorscreen.

|                      |                                   |                              |   |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------------|---|
| <b>Church-Puffer</b> | 1 mM EDTA                         | <b>1 M NaHPO<sub>4</sub></b> | 134 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O |
|                      | 0,5 M NaHPO <sub>4</sub> (pH 7,2) |                              | 4 ml 85 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                  |
|                      | 1 % BSA                           |                              | ad 1000 ml  |
|                      | 7 % SDS                           |                              |   |

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| <b>0,2 x SSC:</b> | 15 mM NaCl           |
|                   | 1,5 mM Natriumcitrat |

### 3.7 Analyse von Proteinen

#### 3.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt von Lösungen wurde mit dem Biorad-Assay bestimmt. Dieser Test beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blau G-250 nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Zuerst wurde eine Eichkurve mit 1-20 µg Rinderserumalbumin (BSA) erstellt, indem zu 800 µl Proteinlösung 200 µl der Biorad-Farbstofflösung zugegeben wurden. Nach gründlichem Mischen wurde der Extinktionswert bei 595 nm gegen den Leerwert (800 µl Wasser + 200 µl Farbstoff) gemessen und die Absorptionen gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Aus der Eichgeraden konnte dann direkt aus den gemessenen Werten bei 595 nm die Proteinkonzentration der Proben abgelesen werden.

### 3.7.2 Auftrennung von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen

Mit dieser von Laemmli (1970) beschriebenen Methode lassen sich Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Das negativ geladene SDS lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an und kompensiert dadurch die Oberflächenladungen des Proteins, d.h. die Wanderungsgeschwindigkeit ist nur noch von der Größe des Proteins abhängig.

Die Verwendung eines zweigeteilten Gels in Sammelgel zur Probenaufkonzentration und Trenngel zur Probenauftrennung ergibt schärfere Proteinbanden.

Es wurden die Miniprotean II-Gelkammern von Biorad verwendet. Zuerst wurde ein 12 %iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Kante zum Sammelgel zu erhalten. Nachdem das Trenngel vollständig auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen und mit Wasser nachgespült. Dann wurde das 4 %ige Sammelgel darüber geschichtet und der Kamm gesteckt.

Das nach 1 h vollständig polymerisierte Gel wurde in die Gelkammer eingespannt und mit SDS-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/5 Vol. 5x SDS-Auftragspuffer versetzt, vor dem Auftragen 5 min auf 95°C erhitzt und in die gespülten Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 200 V durchgeführt, bis der Blaumarker die untere Kante des Gels erreicht hatte.

|                          |  |                           |  |
|--------------------------|--|---------------------------|--|
| <b>Acrylamid-Lösung:</b> | 30 % Acrylamid<br>0,8 % N,N'-Methylen-Bisacrylamid<br>in H <sub>2</sub> O filtriert  | <b>APS-Lösung:</b>        | 10 % Ammoniumperoxo-<br>disulfat in H <sub>2</sub> O   |
| <b>Sammelgel:</b>        | 1 ml Acrylamidlösung (30:0,8)<br>0,75 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8)<br>65 µl 10 % SDS<br>4,1 ml H <sub>2</sub> O<br>100 µl 10 % APS<br>7 µl TEMED | <b>Laufpuffer:</b>        | 25 mM Tris<br>192 mM Glycin<br>0,1 % SDS   |
| <b>Trenngel:</b>         | 5 ml Acrylamidlösung (30:0,8)<br>4,75 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8)<br>125 µl 10 % SDS<br>3 ml H <sub>2</sub> O<br>150 µl 10 % APS<br>15 µl TEMED | <b>5x Auftragspuffer:</b> | 10 % SDS<br>25 % β-Mercaptoethanol<br>30 % Glycerin<br>312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8)<br>0,01 % Bromphenolblau<br>0,01 % Xylencyanol |

### 3.7.3 Western-Blot

Zum Nachweis bestimmter Proteine durch Antikörper wurden die Proteine auf SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membranen transferiert, um sie dann mit dem entsprechenden Antikörper zu inkubieren. Der entstandene Protein-Antikörper-Komplex wurde dann mit einem zweiten Antikörper, an den alkalische Phosphatase oder Peroxidase gekoppelt war, inkubiert. Durch eine enzymatische Farbreaktion der alkalischen Phosphatase bzw. Peroxidase konnten die Komplexe detektiert werden oder mittels Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden.

0,005-25 µg Protein wurden im SDS-Gel (3.7.2) aufgetrennt und diese anschließend bis zu 60 min in Renaturierungspuffer geschwenkt. Währenddessen wurde die PVDF-Membran zugeschnitten, in 100 % Ethanol befeuchtet, mit viel Wasser gespült und für ca. 45 min im Western-Blot Puffer geschwenkt. Das Gel wurde auf zwei Lagen Whatman-Papier, die mit Blot-Puffer getränkt waren, gelegt. Danach wurde die befeuchtete Membran blasenfrei auf dem Gel platziert und mit zwei weiteren Lagen getränktem Whatman-Papier bedeckt. Dieser Aufbau wurde in der entsprechenden Biorad-Western-Blot Apparatur über Nacht bei 150 mA im Kühlraum geblottet. Durch das Auftreten von hohen Strömen war eine Kühlung des Blottes notwendig. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut und die Membran an der Luft getrocknet. Die trockene Membran wurde in TBST-Puffer, dem 10 % fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt war, für 60 min geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen, bevor sie für mindestens 1 h (oder über Nacht) mit dem ersten, spezifischen Antikörper inkubiert wurde. Je nach Spezifität, Affinität und Konzentration des Antikörpers wurden Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:10000 in TBST mit 10 % FCS verwendet. Vor Zugabe des zweiten Antikörpers wurde erneut mindestens dreimal mit TBST gewaschen. Der Blot wurde dann mit dem zweiten Antikörper der gegen die konservierte Domäne des ersten Antikörpers gerichtet war in einer Verdünnung von 1:3000 bzw. 1:10000 in TBST mit 10 % FCS für 1 h inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde der Blot im Dunkeln mit alkalischer Phosphatase Puffer sowie 3 µl BCIP und 6 µl NBT entwickelt, sofern der sekundäre Antikörper mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war.

Für die Chemilumineszenz-Detektion wurde ein sekundärer Antikörper, an den Peroxidase gekoppelt war, verwendet. Zur Detektion wurden die beiden Reagenzien des Chemilumineszenz-Kits (NEN) 1:1 gemischt und die Membran für 1 min darin geschwenkt. Die Flüssigkeit wurde

mit Whatman-Papier abgetupft, die Membran in Folie eingepackt und zur Detektion auf Bio-Max-Röntgenfilmen für 5 sec bis 5 min exponiert.

|                              |  |                        |  |
|------------------------------|--|------------------------|--|
| <b>Renaturierungspuffer:</b> | 50 mM Tris/HCl (pH 7,5)<br>20 % Glycerin                         | <b>10x Blotpuffer:</b> | 8,4 g NaHCO <sub>3</sub><br>3,2 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub><br>lösen auf 1 Liter Volumen in H <sub>2</sub> O |
| <b>TBST-Puffer:</b>          | 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)<br>150 mM NaCl<br>5 mM MgCl <sub>2</sub> |                        |  |

**NBT:** Nitoblau-Tetrazolium

**BCIP:** 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphat

### 3.8 Hefekulturen

#### 3.8.1 Hefemedien

##### Vollmedium YPD (Sherman *et al.*, 1986)

- 1 % Hefeextrakt
- 2 % Bactopepton
- 2 % Glucose (getrennt autoklaviert als 10x Stammlösung)
- 2 % Bacto-Agar (für Platten)

Zur Selektion auf das Kanamycin-Gen als Selektionsmarker für Plasmide und Disruptionen wurden dem Vollmedium 300 µg/ml aktives Geneticin (G418) zugesetzt.

##### SC-Medium (Guthrie und Fink, 1991):

- 0,67 % Hefe Nitrogen Base w/o Aminoacids
- 2 % Glucose (getrennt autoklaviert)
- 2 % Bacto-Agar (bei Platten)
- + 2,0 g/l Aminosäuren und Nukleoside, die eingewogen, gemörsert und als fertiges Pulver aufbewahrt wurden:

|               |       |                    |       |
|---------------|-------|--------------------|-------|
| Adeninsulfat* | 0,5 g | L-Leucin*          | 4,0 g |
| L-Alanin      | 2,0 g | L-Lysin            | 2,0 g |
| L-Arginin     | 2,0 g | L-Methionin        | 2,0 g |
| L-Asparagin   | 2,0 g | p-Aminobenzoesäure | 0,2 g |
| L-Aspartat    | 2,0 g | L-Phenylalanin     | 2,0 g |
| L-Cystein     | 2,0 g | L-Prolin           | 2,0 g |
| L-Glutamin    | 2,0 g | L-Serin            | 2,0 g |

|              |       |  |               |       |
|--------------|-------|--|---------------|-------|
| L-Glutamat   | 2,0 g |  | L-Threonin    | 2,0 g |
| Glycin       | 2,0 g |  | L-Tryptophan* | 2,0 g |
| L-Histidin*  | 2,0 g |  | L-Tyrosin     | 2,0 g |
| myo-Inositol | 2,0 g |  | Uracil*       | 2,0 g |
| L- Isoleucin | 2,0 g |  | L-Valin       | 2,0 g |

\*wurden je nach Transformationsansatz nicht zugegeben, um auf das entsprechende Plasmid selektionieren zu können

### 3.8.2 Anzucht auf Agarplatten

Aus Glycerin- oder Flüssigkulturen wurden mit einer sterilen Impföse die Hefen auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen. Flüssigkulturen konnten nach geeigneter Verdünnung auch direkt ausplattiert werden. Die Platten wurden bei 30°C für 2-10 Tage inkubiert. Für die Bestimmung der Temperatursensitivität wurden die Platten 2-3 Tage bei 37°C inkubiert.

### 3.8.3 Vermehrung in Flüssigkultur

5-20 ml des entsprechenden Mediums wurden mit einer Einzelkolonie von einer Kulturplatte angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in frischem Medium auf eine  $OD_{600} \leq 0,2$  verdünnt und unter Schütteln (~ 200 Upm, aerobe Bedingungen) weiter bei 30°C inkubiert. Entsprechend der weiteren Verwendung der Hefen wurden sie bei unterschiedlichen OD-Werten geerntet. Für Transformationen sollten sich die Stämme in der frühen logarithmischen Wachstumsphase befinden, d.h. sie wurden bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0,6 und 0,8 geerntet. Für Proteinextrakte konnten sie bis zu einer  $OD_{600}$  von 3 wachsen.

### 3.8.4 Stammhaltung

Übernachtskulturen der verschiedenen Stämme wurden mit einem Volumen 50 %igem Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren. Glycerinkulturen können auch von Plattenkulturen angelegt werden. Dazu wurden die Hefen auf einer YPD-Platte dicht ausgestrichen. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C wurde der Zellrasen abgeschabt, in 50 % Glycerin suspendiert und bei -80°C eingefroren. Glycerinkulturen sind bei -80°C für mehrere Jahre haltbar.

Plattenkulturen konnten, mit Parafilm umwickelt, bei 4°C für mehrere Wochen gelagert werden.

### 3.8.5 Tropftitertest

Eine Einzelkolonie von einer frisch inkubierten Kulturplatte (nach ca. 2-3 Tagen) wurde mit einer Impföse abgenommen und in 100 µl Wasser resuspendiert. Um die Bildung von Zellklumpen zu vermeiden, wurde die Hefesuspension intensiv durch Vortexen gemischt. Von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-5}$  angelegt; dazu wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und zu 90 µl Wasser pipettiert. Jede Verdünnungsstufe wurde gut gemischt bevor für die nächste Verdünnungsstufe 10 µl der Zellsuspension entnommen wurden. Von den Verdünnungsstufen wurden je 5 µl auf markierte Stellen einer Wachstumsplatte aufgetropft. Nachdem die Zellsuspension eingetrocknet war wurden die Platten bei der gewünschten Temperatur (30 oder 37°C) für 2-3 Tage inkubiert.

## 3.9 Genetische Methoden zur Kreuzung und Charakterisierung von Hefezellen

### 3.9.1 Kreuzung haploider Hefezellen

Haploide Hefen unterscheiden sich in ihrem Paarungstyp, d.h. in MAT<sub>a</sub>- und MAT<sub>α</sub>-Zellen. Nur Zellen entgegengesetzten Paarungstyps können zu einer Zygote fusionieren, aus der eine diploide Hefezelle hervorgeht. Wie haploide können sich diese diploiden Hefezellen mitotisch teilen und vermehren. Unter Stickstoffmangelbedingungen können sich diploide Zellen auch meiotisch teilen und bringen dann vier haploide Sporen hervor, die wiederum zu vegetativ wachsenden haploiden Hefezellen auskeimen können. Die Diploidisierung leitet damit die sexuelle Fortpflanzung ein und ist bei gezielter Kreuzung zweier haploider Stämme das Mittel zur Generierung von Nachkommen mit einer neuen Kombination der Gene aus beiden Elternstämmen.

Zur Kreuzung werden Suspensionen aus logarithmischen Kulturen auf Selektionsplatten, auf denen die haploiden Ausgangsstämme nicht wachsen können, aufeinander getropft. Dies setzt voraus, dass sich die beiden Stämme in jeweils einem Selektionsmarker unterscheiden, der durch die Diploidisierung vom jeweiligen Allel des Partners komplementiert wird. Zur Kontrolle werden die haploiden Stämme ebenfalls auf die gleichen Selektionsplatten getropft. Diploidisierung wird durch das Wachsen kleiner Einzelkolonien im Bereich der eingetrockneten Suspensionstropfen angezeigt.

Die Kreuzungen lassen sich auch in YPD-Medium durchführen. Dazu werden die beiden haploiden Stämme in YPD-Flüssigmedium übereinander geschichtet und für einen Tag bei RT oder 30°C inkubiert. Dann werden Verdünnungen auf YPD ausplattiert und bei 30°C für 2 Tage inkubiert. Die ersten größeren Einzelkolonien müssen dann auf Einzelkoloniedichte Verdünnt und auf Sporulationsfähigkeit getestet werden.

### 3.9.2 Sporulation diploider Zellen

Die Sporulation diploider Hefestämme wurde in Flüssig- oder auf Festmedium durchgeführt. Eine diploide Hefekultur wurde über Nacht in Flüssigkultur bei 30°C angezogen, dann abzentrifugiert und einmal mit Wasser gewaschen. Die Zellen wurden dann in 200 µl Minimal-Sporulationsmedium aufgenommen und entweder direkt auf eine Minimal-Sporulationsplatte getropft oder in 20 ml Medium im Schüttler bei 30°C für 5 Tage inkubiert. Danach konnte die Bildung von Asci unter dem Mikroskop überprüft werden.

Bei Hefestämmen, die schwer sporulierten, wurden die Hefen zunächst für 1-2 Tage in Präsporulationsmedium inkubiert und dann entweder in Sporulationsmedium oder auf Minimal-Sporulationsplatten transferiert. Zusätzlich wurden dann zu allen Medien die Aminosäuren der nicht komplementierten Auxotrophiemarker des Stammes zugesetzt (25 % der empfohlenen Menge für Minimalmedium (3.8.1)).

**Minimal-Sporulationsmedium:** 1 % KOAc (pH 7,6)

**Präsporulationsmedium:** 0,8 % Hefeextrakt  
0,3% Bacto-Pepton  
0,1 % Glucose

**Sporulationsmedium:** 1 % KOAc (pH 7,6)  
0,1 % Hefeextrakt  
0,05 % Glucose oder Galactose

### 3.9.3 Sporenfreisetzung

Nach der Sporulation von diploiden Hefezellen liegen die Sporen nicht frei vor, sondern als Viererverbände (Tetraden), die von einer Ascuswand umschlossen sind. Die Ascuswand wird zur Freisetzung der Sporen enzymatisch mit Glusulase oder Zymolyase behandelt. Zur gezielten Analyse der Sporen können Tetraden gelegt werden.

### 3.9.3.1 Tetradenanalyse

Für die Tetradenanalyse wurden die Sporen von einer Platte in 100 µl Wasser resuspendiert und für 5 min mit 5-10 µl Glusulase bei RT inkubiert. Nach der enzymatischen Reaktion wurden die Sporen zweimal gewaschen und dann auf einer YPD-Platte ausgestrichen. Am Mikromanipulator wurde eine einzelne Tetrade mit der Nadel aufgenommen und auf eine bestimmte Stelle auf der Platte gelegt. Dort wurde der Ascusverband aufgebrochen und jede der vier Sporen auf einen Punkt in einem Raster, das der Mikromanipulator vorgab, gelegt. Die Platte wurde markiert, so dass nachvollziehbar war, wie sie in den Mikromanipulator eingespannt war. Nach einigen Tagen Inkubation bei 30°C konnte das Keimen der Sporen und die Ausbildung von Zellverbänden beobachtet werden.

### 3.9.4 Paarungstypbestimmung

Jeder haploide Hefeklon, der durch Kreuzung erzeugt wurde, muss neben seinen phänotypisch erfassbaren genetischen Markern auch hinsichtlich seines Paarungstyps charakterisiert werden. Für diese Analyse stehen Testerstämme zur Verfügung, die die Detektion des Paarungstyps auf Platten ohne Zusatz jeglicher Aminosäuren oder Nukleoside ermöglichen. Üblicherweise wurden die Stämme KL14-4: MAT<sub>a</sub> und IL993-5C: MAT<sub>α</sub> als Testerstämme verwendet.

Zur Paarungstyp Bestimmung wurden logarithmisch wachsende Kulturen der Testerstämme auf OM-Medium ausplattiert. Frische Einzelkolonie-Ausstriche der zu definierenden Stämme wurden mittels Replikaplattierung auf beide Teststämme überstempelt und die Platten für 3 – 5 Tage bei 30°C inkubiert. Die Diploidisierung sollte nur mit einem der beiden Teststämme erfolgt sein, d.h. der zu definierende Stamm hat dann den entgegengesetzten Paarungstyp.

**OM-Medium:**    0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids  
                      2 % Glucose (getrennt autoklaviert)  
                      2 % Bacto-Agar

### 3.9.5 Sensitivitätsbestimmungen

Um den Phänotyp verschiedener Hefestämme zu bestimmen, wurden sie auf ihre Sensitivität gegenüber UV-Strahlung, dem alkylierenden Agens Methansulfonsäuremethylester (MMS), dem Radiomimetikum Bleomycin und erhöhter Temperatur getestet.

Die Tests wurden auf YPD-Platten durchgeführt, die für den MMS-Test zwischen 0,005 und 0,040 % und für den Bleomycin Test zwischen 0,5 und 4,0 µg pro ml enthielten. Die Hefen wurden in Verdünnungsreihen aufgetropft.

Die MMS- und Bleomycin-haltigen Platten wurden bei 30°C inkubiert, für den Temperaturtest wurde eine Referenzplatte bei 30°C und die andere bei 37°C inkubiert.

Für den Test gegenüber UV-Strahlung wurden die Platten zunächst für 1 h bei 30°C inkubiert und dann mit verschiedenen Dosen UV-Strahlung im Bereich von 0 – 30 mJ/cm<sup>2</sup> (Stratalinker) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Platten im Dunkeln weitere 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

### 3.10 Transformation von DNA in Hefezellen

#### 3.10.1 Transformation mit Lithiumacetat

Nach einer von Ito *et al.* (1983) beschriebenen Methode lassen sich Hefezellen durch die Behandlung mit Lithium-Ionen besonders gut transformations-kompetent machen. Es wurde ein modifiziertes Protokoll von Schiestl und Gietz (1992) angewendet.

Die Hefen wurden in ihrem Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag in 50 ml YPD-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 bis 0,2 eingestellt und für 4 –5 h bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6–0,7 vermehrt.

Die Zellen wurden in sterilen Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (Heraeus, RS 5315, 3500 Upm, 20 °C, 10 min) in 10 ml sterilem Wasser durch schwenken gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Lithiumacetat Lösung aufgenommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Zellen wurden pelletiert (14000 Upm, RT, 15 sec, Eppendorf). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 400 µl Lithiumacetat Lösung resuspendiert (vorsichtiges Auf- und Abpipettieren). Pro Transformationsansatz wurden je 100 µl Zellsuspension in sterilen Eppendorfgefäßen mit 1-5 µg DNA, sowie 10 µg Carrier-DNA (maximales Volumen 15 µl) vermischt und 750 µl PEG-Lösung zugegeben. Die Suspension wurde durch Vortexen gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem 20 minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 Upm, RT, 15 sec, Eppendorf), der Transformationsmix vollständig entfernt und die Zellen in 1 ml 1M Sorbitol aufgenommen. Es wurden je 200 µl und der Rest eines Transformationsansatzes auf entsprechende

Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Es ist entscheidend, daß absolut steril gearbeitet wird, da ohne Antibiotika-Selektion Bakterien sehr leicht anwachsen. Die Zugabe der Carrier-DNA ist nur für sehr hohe Transformationseffizienzen nötig.

|   |   |                         |  |
|---|---|-------------------------|--|
| <b>TE (autoklaviert):</b>                   | 10 mM Tris/HCl, pH 7,5<br>1 mM EDTA                         | <b>PEG Lösung:</b>      | 100 mM Lithiumacetat<br>10 mM Tris/HCl, pH 7,5<br>1 mM EDTA<br>40 % PEG 3500 |
| <b>Lithiumacetat-Lösung (autoklaviert):</b> | 100 mM Lithiumacetat<br>10 mM Tris/HCl, pH 7,5<br>1 mM EDTA |                         |  |
| <b>Lithiumacetat-Stammlösung:</b>           | 1 M Lithiumacetat, pH 7,2                                   | <b>PEG-Stammlösung:</b> | 50 % PEG 3500<br>in H <sub>2</sub> O (w/v)                                   |
| <b>10 x TE:</b>                             | 100 mM Tris, pH 7,5<br>10 mM EDTA                           |                         |  |

Die Lithiumacetat-Lösung sowie die PEG-Lösung wurden jeweils frisch aus den Stammlösungen hergestellt.

**Carrier-DNA:** 200 mg hochmolekularer Lachs-Sperma DNA (Deoxyribonukleotidsäure Natrium Salz Type III aus Lachshoden, Sigma D1626) werden in 100 ml TE Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,0 mM EDTA) entweder durch auf und ab Pipettieren oder durch Rühren auf einem Magnetrührer (2-3 Std.) vollständig gelöst. Anschließend wird die DNA in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei –20°C weggefroren. Vor der Benutzung muss die Carrier-DNA für 5 Min. in einem kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt werden. Die so denaturierte DNA kann 3-4 mal verwendet werden.

### 3.10.2 Hoch-effiziente Transformationsmethode nach Gietz

1996 wurde von Gietz und Schiestl auf ihrer Homepage eine modifizierte Methode der Lithiumacetat-Transformation (Gietz und Schiestl, 1995) präsentiert, die eine sehr hohe Effizienz ermöglicht (<http://www.umanitoba.ca/academic/faculties/medicine/biochem/gietz/Trafo.html>).

Die Hefen werden über Nacht in Voll- oder Selektionsmedium bei 30°C angeimpft und am nächsten Tag in 50 ml YPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt. Nach ca. 4h Inkubation wurden die Hefen bei einer OD<sub>600</sub> = 0,6-0,7 abzentrifugiert, einmal mit sterilem Wasser gewaschen, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat pH 8,0 resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in einem Endvolumen von 500 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Die Hefesuspension wurde zu 50 µl aliquo-

tiert und bei 14000 Upm für 15 Sek. abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 240 µl 50 % PEG überschichtet. Darauf wurden 36 µl 1M Lithiumacetat, 50 µl Carrier-DNA und 34 µl DNA-Lösung (2-5 µg DNA in Wasser) pipettiert. Das Pellet wurde auf dem Vortexer für ca. 1 min resuspendiert und die Suspension für 30 min bei 30°C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 min bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Hefen bei nicht mehr als 8000 Upm in der Eppendorffzentrifuge pelletiert, der Transformationsmix gründlich entfernt und die Zellen in 500 µl 1M Sorbitol oder Wasser aufgenommen. Es wurden jeweils 100 µl und 400 µl auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Nach 2 – 4 Tagen Inkubation bei 30°C konnten Einzelkolonien von den Platten umgestrichen oder verwendet werden.

### 3.11 DNA-Isolation aus Hefen

#### 3.11.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Aus 10 ml Übernachtskultur transformierter Hefen konnte genügend Plasmid-DNA isoliert werden, um sie für weitere Analysen in Bakterien zu retransformieren.

Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (4000 Upm, 10 min), mit Wasser gewaschen und in 5 Vol. des Pellets in Lysispuffer resuspendiert. Es wurde eine Konzentration von 100 µM β-Mercaptoethanol eingestellt und 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 2 Vol. Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 Units Lytikase wurden die Zellen für 45-60 min bei 37°C inkubiert. Zwischendurch wurden die Zellen immer wieder gemischt. Sobald die Suspension durch die Lyse der Zellen viskos wurde, wurde der Ansatz mit 1/10 Vol. 10 % SDS versetzt, gemischt und für 15 min bei 65°C inkubiert. Mit 3 Vol. 5 M KOAc pH 4,8 wurden die Proteine aus dem Ansatz gefällt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde abzentrifugiert (14.000 Upm, 15 min, RT) und aus dem klaren Überstand die DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt (14.000 Upm, 20 min, RT).

Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30 µl 1x TE gelöst.

**Lysis-Puffer:** 100 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM EDTA

### 3.11.2 Isolierung von genomischer DNA aus Hefen

Von einer Übernachtskultur wird die genomische DNA mit Hilfe eines DNA Preparationskits (Nucleon Yeast Extraction Kit, Amersham) isoliert. Dazu wurden 10 ml der Kultur abzentrifugiert (4000 Upm/ RT/ 10 min/ Hettich) und anschließend in 5 ml Wasser gewaschen. Vom erhaltenen Zellpellet wurden jeweils 50 µl in Eppendorf Gefäße überführt und kurz abzentrifugiert (14000 Upm/ RT/ 15 sec/ Eppendorf). Das überstehende Wasser wurde entfernt. Das Zellpellet wurde in 540 µl der in dem Kit enthaltenen Lösung A resuspendiert und mit 60 µl Lösung B versetzt. Danach wurde das Gemisch für 30 Sekunden gevortext und anschließend 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Dann wurden 300 µl Lösung C zugegeben, vorsichtig gemischt (nicht mehr vortexen) und die Proteine bei 14.000 Upm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 600 µl Isopropanol gegeben. Die DNA wurde dann bei 14.000 Upm für 10 Minuten gefällt und der Überstand verworfen. Zuletzt wurde die DNA mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und an Luft getrocknet. Am Ende wurde die DNA in 20 µl Wasser bei 70°C gelöst und weiter verwendet. Um genügend DNA für Telomerblots zu erhalten wurden Doppelproben angefertigt.

### 3.12 Proteinextrakte aus *Saccharomyces cerevisiae*

Um Proteine aus Hefezellen aufzureinigen, wurden aus 50 ml logarithmisch wachsender Hefekulturen bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7-1,2 durch mechanischen Aufschluss mit Glasperlen vom Durchmesser 0,5-0,7 mm Rohextrakte hergestellt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (4500 Upm, 10 min) und mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 Volumen eiskaltem Aufschlusspuffer aufgenommen. In einem 2 ml Eppendorf-Gefäß wurden ca. 2 ml Glasperlen vorgelegt und 200 µl Zellsuspension sowie 200 µl Aufschlusspuffer zugegeben. Das Gefäß wurde in die Schwingmühle eingespannt und bei voller Leistung 20 min geschüttelt. Anschließend wurde das Eppendorf-Gefäß am Boden mit einer Kanüle angestochen und in ein 15 ml Rundboden-Röhrchen eingesetzt. Der Proteinextrakt wurde durch Zentrifugation bei 1500 Upm für 1 min aus den Glasperlen eluiert. Die Glasperlen wurden einmal mit 200 µl Aufschlusspuffer gewaschen, das Eluat vereinigt und bei 20.000 Upm für 20 min (4°C) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde als Rohextrakt abgenommen und bei -80°C gelagert.

**Aufschlusspuffer (Schwingmühle):** 500 mM NaCl  
50 mM HEPES/NaOH pH 7,9  
5 mM DTT  
1 mM EDTA  
10 % Glycerin

### 3.13 Proteinaufreinigung von Dhh1p

#### 3.13.1 Aufreinigung mit dem IMPACT-System von NEB

Das IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) System ist eine einfache Methode um rekombinante Proteine aus *E. coli* mit einem chromatografischen Schritt aufzureinigen. Das System benutzt ein Protein-Splicing Element, Intein, aus dem *S. cerevisiae* VMA1 Gen, das dahingehend modifiziert wurde, dass es ein Selbstsplicing an seinem N-terminus bei niedrigen Temperaturen und in Anwesenheit von Thiolen, wie z.B. DTT, durchführt. Das Ziel-Protein wird in die Multiple Kloning Site eines pCYB Vektors kloniert, um eine Fusion zwischen dem C-Terminus des Ziel-Proteins und dem N-Terminus des Inteins herzustellen. An den C-Terminus des Inteins ist eine kleine 5 kDa Chitin Bindedomäne (CBD) aus *Bacillus circulans* für die Affinitätsreinigung kloniert. Wenn man Zellrohextrakte aus einem induzierbaren *E. coli* Stamm auf eine Chitin-Säule gibt, bindet das Fusionsprotein an die Chitin-Säule, während alle anderen Verunreinigungen durch die Säule gewaschen werden. Das Fusionsprotein wird dann bei 4°C über Nacht mit DTT inkubiert und vollzieht eine Intein-vermittelte Selbstspaltung. Das Ziel-Protein wird eluiert, während die Intein-CBD Fusion an der Säule gebunden bleibt.

Das System birgt drei Vorteile:

- I. Einfache und schnelle Reinigung eines nativen Proteins,, ohne Affinitäts-Tag, der die Eigenschaften des Proteins verändern könnte
- II. Abspaltung vom Fusionspartner am C-Terminus ohne die Verwendung von teuren Proteasen
- III. Die Möglichkeit, den C-Terminus des Ziel-Proteins zu markieren

Der *DHHL* ORF wurde in den mit dem Kit mitgelieferten Vektor pCYB2 über eine 5' *NdeI* und 3' *SmaI* Schnittstelle kloniert und in *E. coli* transformiert. Von dem so erhaltenen *E. coli* Stamm wurde eine Übernachtskultur in 20 ml LB<sub>Amp</sub> Medium angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 1 l LB<sub>Amp</sub> Medium überimpft und bis zu einer

OD<sub>600</sub> von ~0,6 inkubiert. Dann wurde die Kultur mit 0,5 mM IPTG induziert und für 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in 10 ml Säulen-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Wasserbad bei RT wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurden die Zellen mit dem Sonifier (20 Pulse, Cycle 30, Output 7) aufgeschlossen. Die unlöslichen Proteine und Zellfragmente wurden bei 10.000 Upm (4°C, 15 min, SS-34 Rotor) abzentrifugiert. Währenddessen wurden 2 ml Chitin-Sepharose dreimal mit 10 ml Säulen-Puffer gewaschen indem sie resuspendiert und dann bei 1000 Upm (4°C) abzentrifugiert wurde. Der aus der Zentrifugation erhaltene Proteinrohextrakt wurde auf die Chitin-Sepharose gegeben und 1 Stunde im Kühlraum (Überkopf-Schüttler) inkubiert. Danach wurde die Chitin-Sepharose erneut dreimal mit 10 ml Säulen-Puffer gewaschen (wie oben) und mit dem letzten Waschschrift in Plastik Säulchen überführt. Zur Abtrennung eventueller unspezifischer Bindungen von Proteinen wurde die Säule einmal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, mit 1 Vol. Cleavage-Puffer gespült und dann mit 1 Vol. Cleavage-Puffer überschichtet. Die Säulen wurden im Kühlraum über Nacht inkubiert um eine möglichst vollständige Spaltung zu erzielen. Am nächsten Tag wurden die Säulen eluiert, wobei der Auslauf das erste Eluat darstellte und in der Regel dreimal mit 1 Vol. Cleavage-Puffer eluiert wurde.

Die einzelnen Eluate wurden auf einem SDS-Polyacrylamid Gel überprüft.

|                       |  |                         |  |
|-----------------------|--|-------------------------|--|
| <b>Säulen-Puffer:</b> | 20 mM Na-Hepes pH 7,5<br>500 mM NaCl<br>0,1 mM EDTA<br>0,1 % Triton X-100            | <b>Cleavage-Puffer:</b> | 20 mM Tris/HCl pH 8,0<br>0,1 mM EDTA<br>500 mM NaCl<br>50 mM DTT |
| <b>Waschpuffer:</b>   | 20 mM Na-Hepes pH 7,5<br>1 M NaCl<br>0,1 mM EDTA<br>0,5 % Triton X-100<br>0,5 % NP40 |                         |  |

### 3.13.1.1 Gelfiltration

Um das Protein in einem möglichst hohen Reinheitsgrad zu erhalten, wurde das mit dem INTEIN-System gereinigte Protein anschließend noch über eine Gelfiltrations-Säule (Superdex 75) von Verunreinigungen befreit. Alle Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C an einer FPLC durchgeführt.

Die Säule wurde mit Laufpuffer equilibriert, bis sich eine stabile Basislinie ergab und dann das Protein aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Es wurden einzelne Fraktionen á 250 µl gesammelt. Ein an die FPLC angeschlossenes Photometer zeigte bei proteinhaltigen Fraktionen einen Ausschlag an. Die Fraktionen vor, in und nach dem Peak wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

Von den saubersten Fraktionen wurde der Proteingehalt bestimmt und die entsprechende Menge Protein in den verschiedenen Assays eingesetzt.

|                   |        |              |
|-------------------|--------|--------------|
| <b>Laufpuffer</b> | 20 mM  | HEPES pH 7,5 |
|                   | 1 mM   | EDTA         |
|                   | 1 mM   | DTT          |
|                   | 200 mM | NaCl         |
|                   | 10 %   | Glycerin     |

### 3.13.2 Aufreinigung durch Immunopräzipitation

Bei einer Immunopräzipitation wird das gewünschte Protein aus dem Rohextrakt eines Zellaufschlusses mit Hilfe von spezifischen Antikörpern isoliert. Nachdem es nicht für alle Proteine bereits spezifische Antikörper gibt, kann man sich auch durch einen sogenannten Tag helfen, der an das Protein entweder C- oder N-terminal angehängt werden kann. Im Falle von Dhh1p wurde ein 13myc-Tag chromosomal C-terminal integriert.

Der Proteinextrakt wurde, wie unter 3.12 beschrieben, angefertigt. Die benötigte Menge Protein-A Sepharose wurde in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und 5 sec. bei 1000 Upm zentrifugiert (Eppendorf, RT). Der Überstand wurde abgenommen, 1 ml 1x PBS zugegeben und erneut wie oben zentrifugiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Am Ende wurde die Protein-A Sepharose in 1 Volumen 1x PBS resuspendiert. In einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden 50 µl 1x PBS vorgelegt und dann 30 µl der vorbehandelten Protein-A Sepharose hinzupipettiert. Anschließend wurden 5 µg Antikörper zugegeben und eine Stunde auf dem Vortex inkubiert. Danach wurde 4x mit 1 ml 1x PBS/BSA (5mg/ml) gewaschen (1000 UPM, RT, 1 Min.), wobei nach dem letzten Waschschrift der Überstand vollständig abgesaugt wurde. Das Eppendorf-Gefäß wurde ca. 5 Min. auf Eis gestellt und dann der Proteinextrakt (500 µg Protein) zugegeben. Anschließend wurde eine Stunde auf dem Vortex im Kühlraum inkubiert. Danach wurde zweimal mit 1ml NP40-Puffer und dreimal mit 1ml 1x PBS wie oben gewaschen. Für den Western-Blot wurden zu der Protein-A Sepharose 20 µl SDS-Auftragspuffer gegeben und die Proben 10 Min. bei 98°C aufgekocht, für die ATPase- und Helikase-Assays wurden 35 µl

ATPase-Puffer bzw. Helikase-Puffer zugegeben und jeweils 10 µl Sepharose in den Versuch eingesetzt.

**NP40-Puffer:** 1 M NaCl  
1 % NP40  
1 % Triton X-100

### 3.14 Helikase-Assays mit Dhh1p

#### 3.14.1 DNA Helikase-Assay

Für den DNA Helikase Assay wurde ein zur Phagen-DNA M13mp19 komplementäres, <sup>32</sup>P-markiertes, 17-mer Oligonukleotid (Hel1) an diese hybridisiert, um einen partiellen Duplex zu generieren. Dazu wurden 10 pmol des Hel1 Oligonukleotids in einer T4-Polynukleotid Kinase-Reaktion (3.5.3) am 5'-Ende mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP markiert. Nach einer Reaktionszeit von 1 h bei 37°C wurde der Ansatz für 20 min auf 95°C erhitzt, um die Reaktion zu stoppen. Zum Ansatz wurden 7,5 µl M13mp19 DNA und 3 µl Annealing-Puffer gegeben und die Mischung für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz in ein 60°C Wasserbad gestellt und über Nacht langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nicht hybridisiertes Oligonukleotid wurde durch Gelfiltration durch Sepharose 4B Säulen mit Elutions-Puffer abgetrennt

**Annealing-Puffer:** 400 mM Tris, pH 7,5  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
1000 mM NaCl  
10 mM DTT

**Elutions-Puffer :** 10 mM HEPES, pH7,4  
100 mM NaCl  
1 mM EDTA

**10x Helikase-Puffer :** 250 mM HEPES pH 7,5  
500 mM NaCl  
10 mM DTT  
20 mM MgCl<sub>2</sub>

**Stopp-Puffer:** 30 % Glycerin  
150 mM EDTA  
0,01% Bromphenolblau

Für die Untersuchungen mit verschiedenen MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen wurde ein Helikase-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> angesetzt. Ein typischer Ansatz für den Helikase-Assay enthielt folgende Zusammensetzung:

2 µl 10x Helikase-Puffer  
2 µl 20 mM ATP  
2 µl 10x BSA  
1 µl Substrat (Menge nicht definiert)  
2 µl Protein (in verschiedenen Konzentrationen)  
11 µl Wasser

Die Reaktion erfolgte bei 30°C für 30 min und wurde durch Zugabe von 2 µl Stop-Puffer gestoppt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 8 %igen Polyacrylamid-Gel (Vorlauf: 30 min, 80V, Einlauf: 100V, Hauptlauf: ~130V, 1,5-2 h). Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe ohne Zugabe von Protein und eine Probe, die vor dem Auftrag 5 min bei 95°C aufgeköcht wurde, aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte durch Exposition auf einen Phosphorscreen.

### 3.14.2 RNA-Helikase Assay

Als Substrat für den RNA-Helikase Assay wurde ein siRNA Duplex verwendet (mit freundlicher Unterstützung von B. Kellersch, AG Kolanus). Dieser bestand aus einem sense- und einem antisense-Strang, von denen der antisense-Strang mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP in einer Polynukleotidkinase-Reaktion (3.5.3) radioaktiv markiert wurde und die beiden RNA-Moleküle anschließend hybridisiert wurden (Sequenz im Anhang). Die Konzentration des Duplex wurde auf 2 pmol/µl eingestellt.

**Kinasierung:**

- 1 µl AS-Oligonukleotid (10 pmol/µl)
- 2 µl 10x PNK-Puffer
- 5 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP
- 1 µl T4-Polynukleotidkinase
- 11 µl Wasser

1 Std. bei 37°C, dann Reinigung über G50-Sepharose Spincolumns

**Annealing-Reaktion:**

- 20 µl AS-Oligonukleotid (<sup>32</sup>P-markiert) (500 fmol/µl)
- 10 µl S-Oligonukleotid (10 pmol/µl)
- 10 µl 5x Annealing-Puffer
- 10 µl Wasser

1 Min. bei 95°C, dann 1 Std. bei 37°C

Für den Helikase-Assay wurde 1 µg Dhh1p mit einem Mikroliter RNA-Substat (2 pmol/µl), 1/10 Vol. 10x RNA-Helikase Puffer und 1 mM ATP in einem Reaktionsvolumen von 40 µl für 30 Min. bei 30°C inkubiert. Zum Schutz vor RNA Degradation wurden jeweils 40 U RNase Inhibitor zugegeben. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1/8 Vol. Stopp-Puffer und auf einem 15 % PAA-TBE Gel analysiert.

|                                |                        |                     |                       |
|--------------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| <b>10x RNA-Helikase Puffer</b> | 200 mM Tris-HCl pH 7,5 | <b>Stopp-Puffer</b> | 30 % Glycerin         |
|                                | 700 mM KCl             |                     | 150 mM EDTA           |
|                                | 5 mM Magnesiumacetat   |                     | 0,01 % Brompehnolblau |
|                                | 15 mM DTT              |                     |                       |

### 3.15 ATPase-Assay mit Dhh1p

Um die Aktivität des Dhh1 Proteins im Bezug auf die Fähigkeit der ATP Hydrolyse zu untersuchen, wurden ATPase-Assays durchgeführt. In diesem Versuch wird  $^{32}\text{P}$  markiertes  $\gamma$ -ATP als Substrat für das Protein eingesetzt und durch Dünnschichtchromatographie getestet, ob das  $\gamma$ -Phosphat abgespalten wird. Dies ist leicht daran zu erkennen, dass es im Dünnschichtchromatogramm wesentlich schneller, bzw. näher an der Lauffront, läuft, als das an das ATP gebundene Phosphat. Für den Versuch wurden 200 ng Protein mit 1x ATPase-Puffer und 1,1  $\mu\text{l}$  ATP-Mix unter Zugabe von 4  $\mu\text{g/ml}$  Nukleinsäure bei 30°C für zwei Stunden inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 2  $\mu\text{l}$  auf eine mit 0,5 M LiCl/1 M Ameisensäure equilibrierte 20x20 cm PEI-Cellulose DC Platte aufgetropft. Als Laufmittel diente ebenfalls 0,5 M LiCl/1 M Ameisensäure. Die Platte wurde so lange laufen gelassen, bis die Lauffront die obere Kante erreicht hatte. Nachdem die DC Platte getrocknet war, wurde sie autoradiographiert.

|                          |                                   |                |   |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------|---|
| <b>10x ATPase-Puffer</b> | 75 mM Tris-HCl pH 7,5             | <b>ATP-Mix</b> | 10 mM ATP   |
|                          | 750 mM KCl                        |                | 20 mM $\text{MgCl}_2$                               |
|                          | 7,5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol   |                | 0,1 $\mu\text{l}$ [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP |
|                          | 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA |                |   |

### 3.16 Immunofluoreszenz

Für die zelluläre Lokalisation von Dhh1p wurde das Protein genomisch C-terminal mit einem 13myc-Tag versehen, um es mit einem Antikörper detektieren zu können.

Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C in 10 ml YPD-Medium inkubiert, am nächsten Morgen auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 in 20 ml YPD-Medium verdünnt und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1/10 Volumen 37 % Formaldehydlösung versetzt und für eine weitere Stunde bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml der Zellen geerntet (Heraeus, 4500 Upm, 10 min). Das Zellpellet wurde mit einem Milliliter Spheroblasting-Puffer in ein Eppendorf-Gefäß überführt und noch zweimal mit diesem Puffer gewaschen (Eppendorf, 14.000 Upm, 10 sec). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand komplett entfernt und das Zellpellet auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurden 100  $\mu\text{g}$  Lytikase (gefriergetrocknet) in 1 ml Spheroblasting-Puffer gelöst und mit 2  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Das Zellpellet wurde in 300  $\mu\text{l}$  dieser Lytikaselösung resuspendiert und 17 min bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (Eppendorf, 3000 Upm, 3 min) und einmal mit

Spheroblasting-Puffer nachgewaschen. Am Ende wurde das Zellpellet in 100-500 µl Spheroblasting-Puffer aufgenommen, je nach Menge der Zellen, so dass eine nicht zu dichte Suspension entstand.

Ein Multiwell-Objektträger wurde mit 0,02 % Poly-L-Lysine beschichtet, indem 10 µl der 0,02 %igen Poly-L-Lysine Lösung aufgetropft und für ca. 5 min inkubiert wurden. Danach wurde einmal kurz mit Wasser abgewaschen und der Vorgang einmal wiederholt. Dann wurde ein Tropfen der Zellsuspension auf den Objektträger aufgebracht und für 10 min inkubiert. Um nicht gebundene Zellen zu entfernen wurde der Objektträger anschließend einmal mit PBS/BSA/Na-Azid Puffer gewaschen.

Auf die so fixierten Zellen wurde der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:2000 in PBS/BSA/Na-Azid Puffer aufgebracht und für 2 Stunden inkubiert. Dabei wurde der Objektträger auf einem feuchten Küchentuch gelagert und abgedeckt, damit die Lösungen nicht eintrockneten. Nach Ablauf der Zeit wurde der Objektträger dreimal mit PBS/BSA/Na-Azid/Triton Puffer gewaschen und dann der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in PBS/BSA/Na-Azid Puffer appliziert und für eine Stunde inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Antikörper keinem Licht ausgesetzt war, um das Fluorophor nicht zu zerstören. Danach wurde erneut dreimal mit PBS/BSA/Na-Azid/Triton Puffer gewaschen. Dann wurde mit je einem Tropfen 1xPBS+50 µg/ml Propidiumjodid für 5 min inkubiert, um die DNA im Mikroskop sichtbar zu machen und einmal mit 1xPBS nachgewaschen. Die Zellen wurden in 90 % Glycerin/0,1x PBS gemountet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Visualisierung erfolgte in einem konfokalen Lasermikroskop.

|                               |   |                                       |   |
|-------------------------------|---|---------------------------------------|---|
| <b>Spheroblasting-Puffer:</b> | 1,2 M Sorbitol<br>0,1 M KPO <sub>4</sub> -Puffer pH 7,5<br>0,5 mM MgCl <sub>2</sub> | <b>PBS/BSA/Na-Azid-Puffer:</b>        | 0,04 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>1 % BSA<br>0,15 M NaCl<br>0,05 % NaN <sub>3</sub>                       |
| <b>Mounting-Puffer:</b>       | 80 % Glycerin<br>1x PBS   | <b>PBS/BSA/Na-Azid/Triton-Puffer:</b> | 0,04 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>1 % BSA<br>0,15 M NaCl<br>0,05 % NaN <sub>3</sub><br>0,1 % Triton X-100 |

### 3.17 End-Joining Assay

Hefezellen reparieren DNA-Doppelstrangbrüche normalerweise durch homologe Rekombination. Zusätzlich dazu ist die Hefe auch in der Lage, nichthomologe kohesive DNA-Enden ohne Verlust an Nukleotiden exakt wieder zu verbinden, ein Prozess, der als „Non-homologous End-joining“ (NHEJ) bezeichnet wird.

Um den Einfluss des Dhh1 Proteins auf das NHEJ zu untersuchen, wurde ein pRS314-ura Plasmid generiert, bei dem ein Ura-Gen aus *Candida albicans* in das *CEN/ARS* Plasmid pRS314 kloniert wurde. Das Plasmid wurde mit *EcoRI* linearisiert, welches einmal im Ura-Gen schneidet und kohesive Enden produziert. Hefezellen können solche linearisierten Plasmide nicht replizieren, wodurch die Rezirkularisierung des Plasmids notwendig wird, damit sich Kolonien formen können. Das linearisierte Plasmid wurde parallel zum ungeschnittenen „supercoiled“-Plasmid transformiert. Die transformierten Stämme wurden auf  $\text{Trp}^-$  und  $\text{Ura}^-$  / $\text{Trp}^-$  Platten ausplattiert. Zellen, die in der Lage sind, die Enden korrekt zu religieren, können auf beiden Platten wachsen. Sind die Zellen defizient im NHEJ, verlieren sie meistens bei der Religation genetische Information an den DNA-Enden, was in diesem Falle in einem funktionsunfähigen Ura-Gen resultieren würde. Dadurch können solche Zellen nicht mehr auf  $\text{Ura}^-$  / $\text{Trp}^-$  Platten wachsen. Die Transformationen wurden für fünf Tage bei 30°C inkubiert und dann ausgezählt. Die Verhältnisse wurden an dem parallel transformierten Wildtyp-Stamm bemessen.

Von den auf  $\text{Trp}^-$  gewachsenen Kolonien wurden jeweils 50 noch einmal auf  $\text{Ura}^-$  / $\text{Trp}^-$  Platten umgestrichen, um einen Überblick über die Genauigkeit der Reparatur zu erhalten.



## 4 ERGEBNISSE

Das Dhh1 Protein wurde in unserem Arbeitskreis in einem Screen auf Komplementation der Temperatursensitivität von *yku70* defizienten Hefestämmen isoliert. W303*yku*-Stämme sind temperatursensitiv, sie wachsen nicht bei 37°C. Um zu untersuchen, welche Proteine bei Überexpression diese Sensitivität komplementieren können, wurden W303*yku*-Stämme mit einer „multi-copy“ Genbank aus *S. cerevisiae* transformiert und die Plasmide aus den Klonen isoliert, die bei 37°C Wachstum zeigten. Dabei wurden zwei verschiedene Klone identifiziert. Einer kodiert für die katalytische Untereinheit der Telomerase, Est2p, der Zweite für das Dhh1 Protein.

Das Yku Protein ist charakterisiert als dsDNA-Enden bindendes Protein. Es ist am Erhalt der Telomere beteiligt und ein essentieller Faktor für das Nicht-homologe End-Joining (NHEJ). Während die Isolierung der katalytischen Untereinheit der Telomerase, EST2, als ein die Temperatursensitivität komplementierender Faktor nicht unerwartet war, stellte Dhh1p, als Protein, das von seiner Sequenz her keinerlei Beziehung zu bekannten DNA-Reparatur oder telomerbindenden Proteinen aufweist, einen interessanten Faktor dar, der vielleicht einen weiteren Einblick in diese Thematik geben könnte.

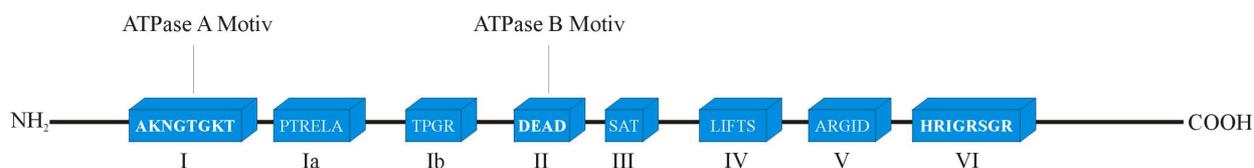
Das *DHHL* Gen wurde 1993 von Strahl-Bolsinger und Tanner isoliert und sequenziert. Der *DHHL* ORF ist 1521 bp lang und kodiert für ein 57 kDa Protein. Aufgrund seiner Sequenzhomologie wurde das Protein in die Klasse der ATP abhängigen RNA-Helikasen eingeordnet. Der Name *DHHL* leitet sich von „DEAD Box Helicase Homolog“ ab. Mittlerweile wird das Protein aufgrund seiner Sequenzhomologien in die DEAD Box Protein Familie (DEAD = Asp-Glu-Ala-Asp) eingeordnet.

In der Literatur werden verschiedene Phänotypen für *dhh1* Mutanten beschrieben, unter anderem sind *dhh1*Δ Zellen sporulationsdefizient (Moriya und Isono, 1999), zeigen eine Veränderung der Zellmorphologie, die aus einer möglichen Beteiligung von Dhh1p an der Zellwand-Integrität resultieren könnte (Moriya und Isono, 1999) und eine Verringerung der zellulären Lebensfähigkeit. Betrachtet man *dhh1*Δ Zellen unter dem Mikroskop kann man verstärkt elongierte Zellen, Zellen mit unnatürlich langgezogener Knospe oder Zellen mit einer Granulat ähnlichen Struktur beobachten. Ebenso ist die Bildung des roten Pigments, das aus dem *ade2* Defekt im Stamm W303-1A resultiert, gestört (Hata *et al.*, 1998).

#### 4.1 Sequenzähnlichkeit des Dhh1 Proteins zu seinen Homologen in anderen Organismen

Das Dhh1 Protein wird aufgrund von acht hoch konservierten Sequenzmotiven der Superfamilie II der RNA Helikasen oder RCK/p54 Familie, benannt nach dem menschlichen Protein (Akao *et al.*, 1992; Lu und Yunis, 1992) zugeordnet (Abb. 4-1). Von vier dieser konservierten Elemente (I, II, III und VI) ist die biologische Funktion bekannt. Dies ist zum einen ein im N-terminalen Bereich liegendes ATPase A Motiv ( $^{90}\text{AKNGTGKT}^{97}$ ; Walker *et al.*, 1982), das in vielen Nukleotid bindenden Proteinen zu finden ist und laut Röntgen-Strukturanalyse einen Phosphat bindenden Loop (P-loop) ausbildet (Fry *et al.*, 1986; Saraste *et al.*, 1990; Story und Steitz, 1992). Das Motiv II ist ein ATPase B Motiv (DEAD). In anderen Helikase Familien findet man auch die Sequenzen DEAH oder DEXH. Das DEAD Motiv wird auch als Variante des Walker ATPase B Motivs (Linder *et al.*, 1989) geführt. Röntgen-Strukturanalyse zeigte, dass der erste Aspartat Rest strukturell nahe beim Walker A Motiv liegt und  $\text{Mg}^{2+}$  über ein Wassermolekül bindet.

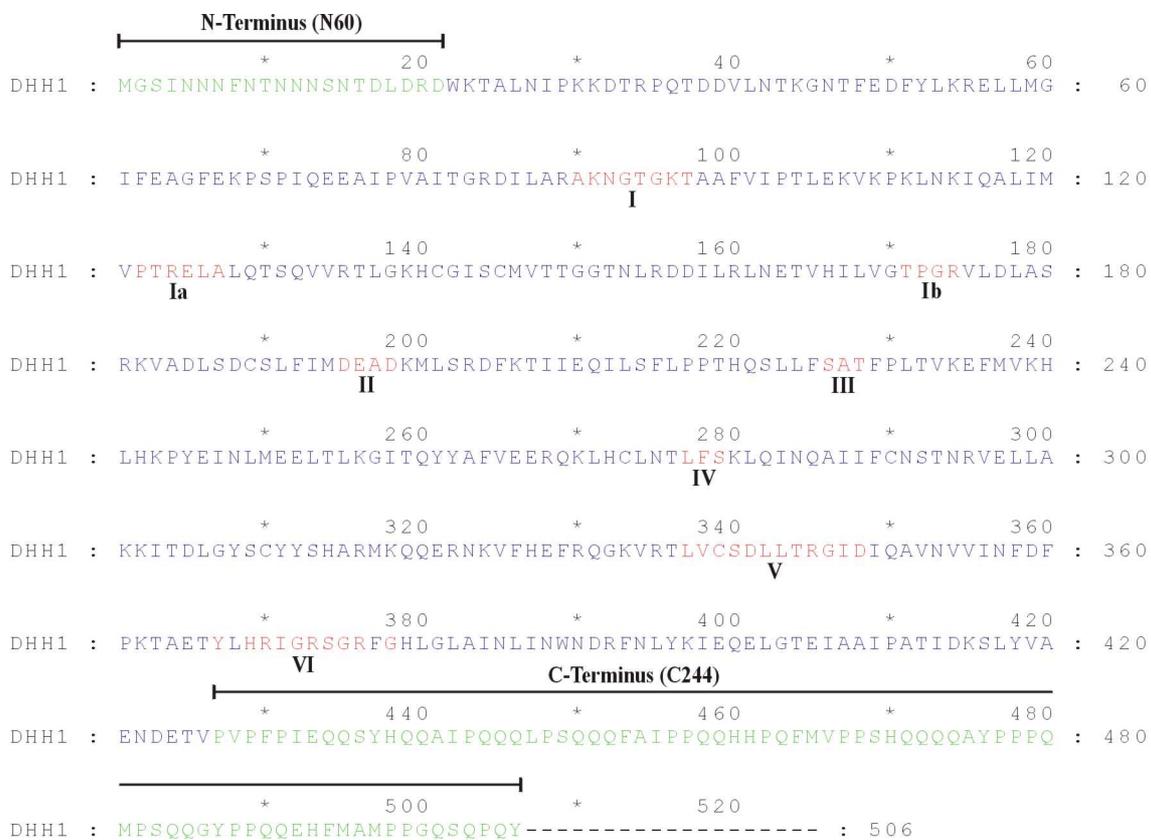
Im C-terminalen Bereich des Proteins befindet sich ein SAT-Motiv. Ursprünglich wurde dieses Motiv als ein RNA Entwindungsmotiv charakterisiert (Pause und Sonenberg, 1992). Mittlerweile wird dem Bereich um das SAT-Motiv eine Art Scharnierfunktion für die Domänen 1 und 2 zugewiesen (siehe Einleitung 1.2, de la Cruz *et al.*, 1999). Ebenso ist im C-terminalen Bereich ein RNA Bindemotiv (HRIGRSGR) (Pause *et al.*, 1993) zu finden. Das DEAD Motiv findet sich immer in Verbindung mit HRIGRSGR, während die Sequenz QRXGRSGR mit dem DEAH/DEXH Motiv zu finden ist (Pause und Sonenberg, 1992).



**Abb. 4-1** Schematische Darstellung der konservierten Aminosäure Regionen der DEAD Proteinfamilie (Koonin, 1991; Schmid und Linder, 1992). Die hochkonservierten Regionen sind fett dargestellt. Die römischen Zahlen unter den Kästen geben die Nomenklatur nach Hodgman, 1988 an. X steht für eine beliebige Aminosäure.

Der nicht konservierte N-Terminus (AS 1-16) von Dhh1p ist reich an Asparaginen (50 %). Der ebenfalls nicht konservierte C-Terminus (AS 427-506) ist Prolin und Glutamin reich (Prolin 22 %, Glutamin 29 %). Asparagin reiche bzw. Prolin/Glutamin reiche Domänen werden oft in

Transkriptionsfaktoren gefunden. Einen Überblick über die in der Aminosäuresequenz enthaltenen Motive gibt Abb. 4-2.

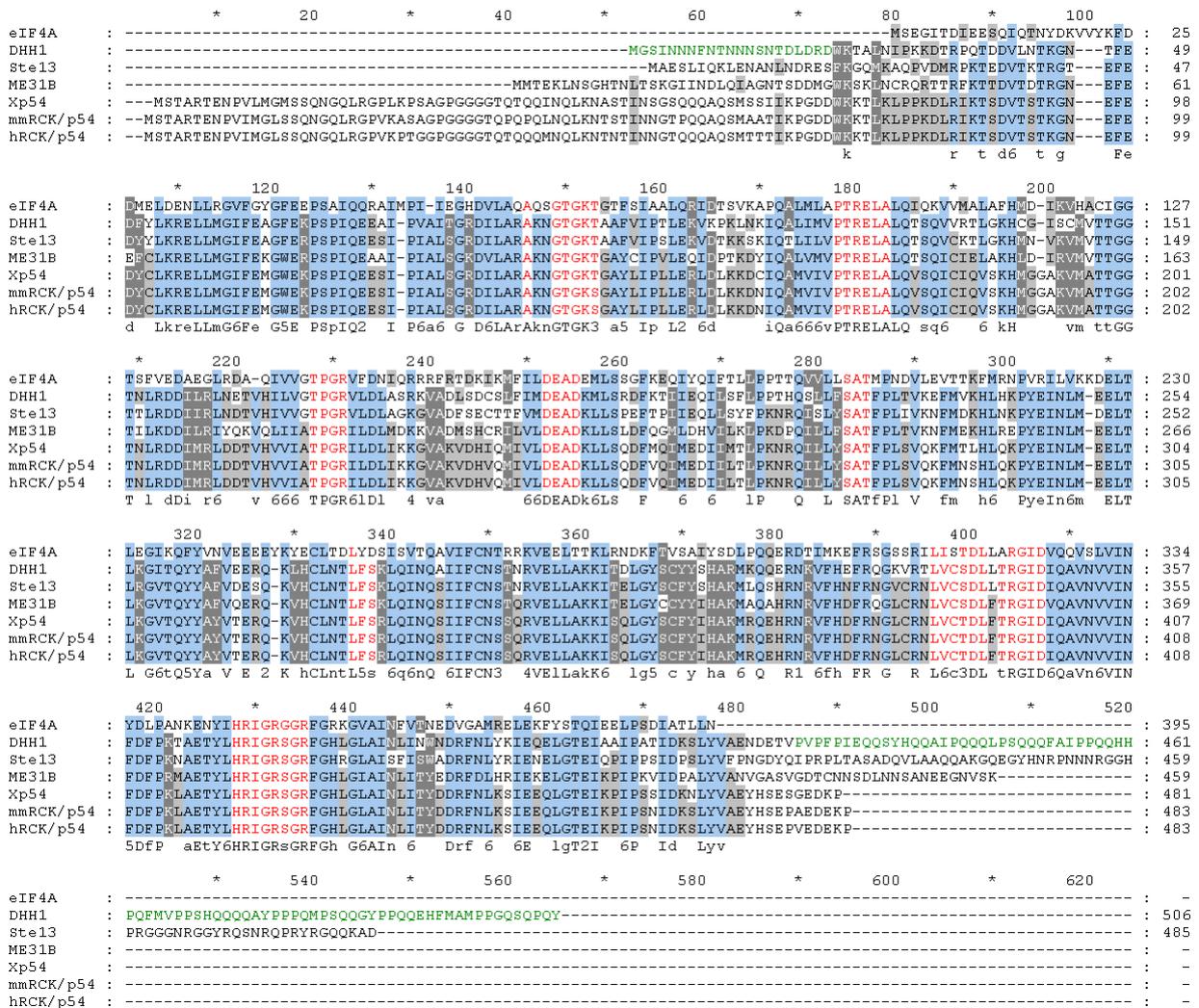


**Abb. 4-2** Aminosäuresequenz des Dhh1 Proteins. Der hoch konservierte Kernbereich des Proteins ist in blau dargestellt. In rot sind die hochkonservierten RNA Helikase Motive gezeigt. Zur besseren Orientierung wurden die römischen Zahlen von Abb. 4-1 untergelegt. Die sich zu den Homologen aus *Xenopus laevis*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* N-terminal und C-terminal unterscheidenden Aminosäuresequenzen sind in grün dargestellt.

In den letzten Jahren konnte wiederholt gezeigt werden, dass Proteine evolutionär zwischen Säugern und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konserviert sind. Durch Datenbankrecherche mit dem BLASTP-Algorithmus wurden Aminosäuresequenzen gefunden, die eine starke Sequenzähnlichkeit zu dem zu untersuchenden Dhh1p aus *S. cerevisiae* aufweisen.

Dhh1p ist ein sehr stark konserviertes DEAD Box Protein (Fischer und Weis, 2002). Es wurden Sequenzomologe in *S. pombe* (Ste13p, Identität 73 %, Homologie 83 %; Maekawa *et al.*, 1994), *Drosophila melanogaster* (ME31B, Identität 69 %, Homologie 82 %; de Valoir *et al.*, 1991), *Xenopus laevis* (DDX6, Identität 68 %, Homologie 82 %; Lodomery *et al.*, 1997), *Mus musculus* (RCK/p54, Identität 68 %, Homologie 82 %; Seto *et al.*, 1995) und *Homo sapiens*

(RCK/p54, Identität 68 %, Homologie 82 %; Akao *et al.*, 1992) identifiziert. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Dhh1p homologen RNA-Helikasen aus den oben angeführten Organismen ist in Abb. 4-3 wiedergegeben.



**Abb. 4-3** Alignment der Proteinsequenz von Dhh1p zu seinen homologen in *S. pombe* (Ste13p), *Drosophila melanogaster* (Me31B), *Xenopus laevis* (Xp54), *Mus musculus* (mmRCK) und *Homo sapiens* (hrCK). Das als Prototyp der DEAD Box Helikasen klassifizierte eIF4A ist mit aufgeführt. Mit blauem Hintergrund markiert sind die konservierten, in grau die homologen Motive dargestellt. Die für die Klassifikation als DEAD Box Helikase ausschlaggebenden Motive (rot) sind in allen Proteinen im Kernbereich gelegen.

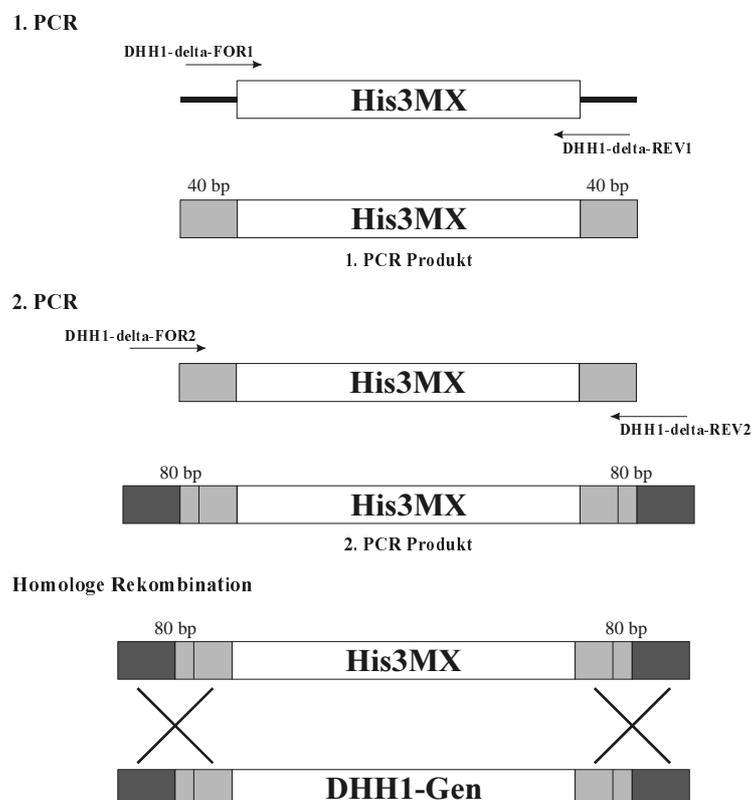
Betrachtet man den Kernbereich der Proteine, so ist deutlich zu erkennen, dass alle acht DEAD Box Helikase Motive vollständig konserviert sind. Daneben ist aber auch eine sehr hohe Konservierung der übrigen Aminosäuren im Kernbereich der Proteine zu erkennen. Auffallend ist, dass Dhh1p gegenüber dem menschlichen Homologen einen verkürzten N-Terminus aufweist,

hingegen der C-Terminus länger ist. Analog verhält sich dies im *S. pombe* Protein. Das die Klassifikation als Prototyp der DEAD Box Helikasen von eIF4A eine gute Annäherung ist, lässt sich aus dem Alignment gut erkennen, da er den Kernbereich aller aufgelisteten Proteine repräsentiert.

## 4.2 Herstellung von DHH1 Deletionsmutanten

Zur Analyse der Phänotypen von DHH1 wurde eine Deletion des *DHH1* ORFs in den Stämmen W303 1A und CenPK2 durchgeführt. Dabei wurde die Methode von (Longtine *et al.*, 1998) angewendet, die auf einer PCR-basierten Gendeletion beruht. Longtine *et al* haben hierfür einen Satz an Plasmiden hergestellt, der es ermöglicht mit vier verschiedenen Primersätzen sowohl Konstrukte für die Gendisruption, als auch Konstrukte für C- oder N-terminale Tags herzustellen. Diese können durch homologe Rekombination in das Hefegenom integriert werden.

Für die Herstellung des DHH1-Deletionskonstruktes wurde von dem Plasmid pFA6a His3MX mit den Primern DHH1- $\Delta$ His-FOR1 und DHH1- $\Delta$ His-REV1 das Marker-Gen amplifiziert (Abb. 4-4).



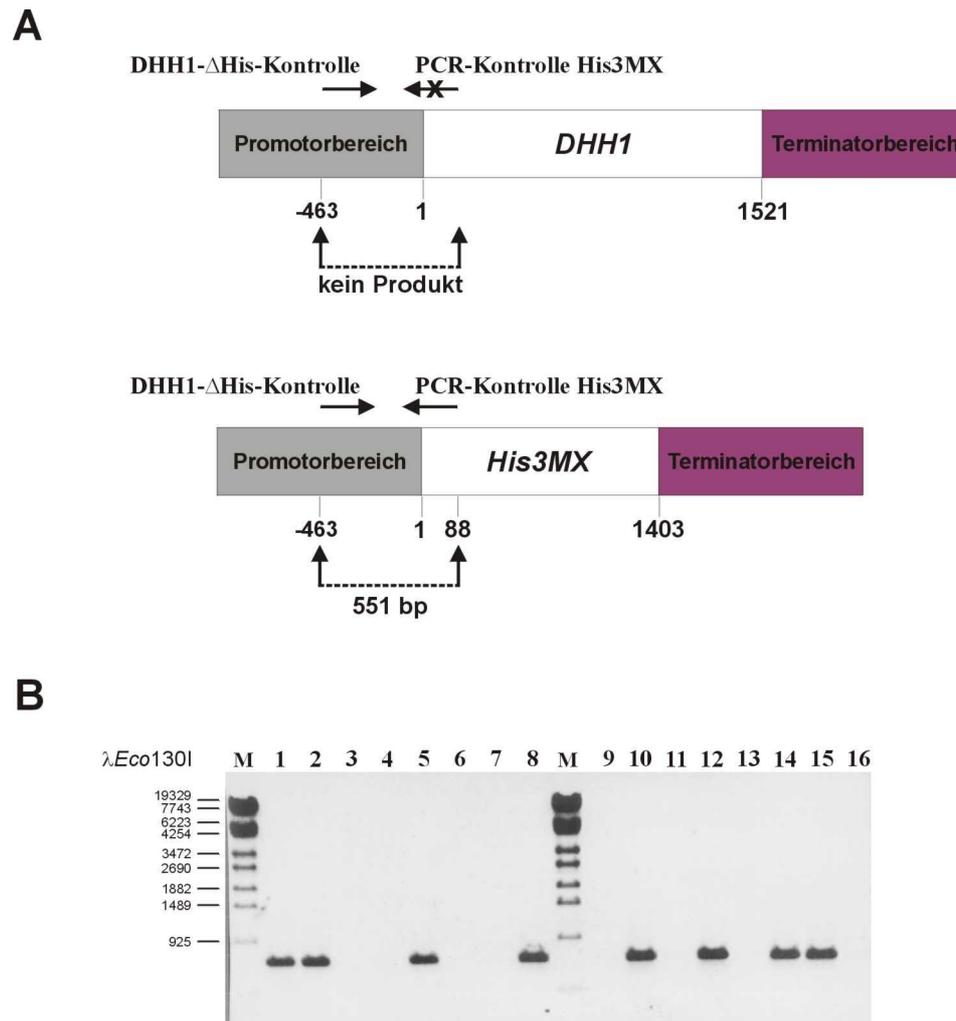
**Abb. 4-4** PCR gerichtete Gendeletion. Vom Plasmid wird das Marker-Gen mit zwei Primern, deren 3' Bereich homolog zum Plasmid und deren 5'-Bereich homolog zum Genom ist amplifiziert. Um die zum Hefegenom homologen Bereiche zu verlängern, wird das 1. PCR Produkt einer weiteren PCR unterzogen.

---

---

Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sie an ihrem 3'-Ende jeweils sequenzhomolog zu dem entsprechenden Bereich am Plasmid waren und am 5'-Ende Homologie zu dem Bereich im Hefegenom aufwiesen, zwischen den das Marker-Gen positioniert werden sollte. So wurde ein Konstrukt erzeugt, das aufgrund homologer Rekombination nach Transformation selbstständig und ohne Subklonierung von einer Hefezelle in ihr Genom eingebaut werden kann und dabei den entsprechenden Bereich zwischen den homologen Enden deletiert. Da der Stamm W303 1A für eine optimale Integration eine Homologie von mindestens 50-60 Basenpaaren benötigte, wurden die bei der ersten PCR gebildeten homologen Bereiche (40 bp) generell durch eine zweite PCR mit den Primern DHH1- $\Delta$ His-FOR2 und DHH1- $\Delta$ His-REV2 auf 80 bp verlängert.

Die PCR-Produkte wurden jeweils über ein Agarosegel gereinigt. Das Produkt der zweiten PCR wurde mit der „High-Efficiency“ Methode (Gietz *et al.*, 1992) in verschiedene Hefestämme transformiert. Durch Plattieren der Hefen unter Selektionsdruck auf den entsprechenden Marker wurde auf diejenigen Hefenzellen selektiert, die die homologe Rekombination erfolgreich durchgeführt hatten. Nach einem Umstrich auf die entsprechende Selektionsplatte wurde der Einbau des Marker-Gens an der richtigen Stelle durch analytische PCR verifiziert (Abb. 4-5).



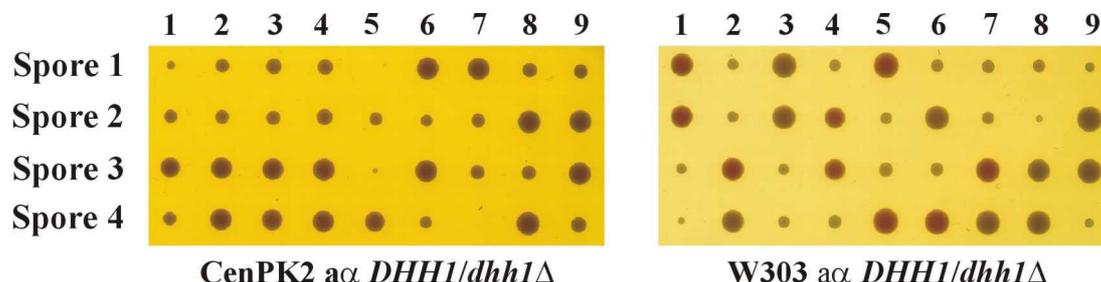
**Abb. 4-5** Analytische PCR von *dhh1Δ*-Stämmen. **A:** Schematische Darstellung der Primer DHH1-ΔHis-Kontrolle und PCR-Kontrolle His3MX und deren Bindungsstellen in den jeweiligen Promotor- bzw. Markergenbereichen. Die zu erwartenden Fragmentgrößen des PCR-Produktes betragen im Falle des Wildtypstammes 0 Basenpaare, respektive 551 Basenpaare im Falle des deletierten Stammes *dhh1Δ*-His3MX. **B:** 1-8 Analyse der vier Sporen zweier Tetraden von CenPK2α bei denen jeweils ein Allel von *DHH1* mit His3MX deletiert wurde. 9-16 Analyse der vier Sporen zweier Tetraden von CenPK2αUαL.

Nach dieser Methode wurden *dhh1Δ* Einzelmutanten in verschiedenen Wildtyp-Stämmen und *yku70/dhh1Δ* Doppelmutanten hergestellt. Für die Analyse diploider Stämme wurden entsprechende Mat<sub>α</sub> und Mat<sub>α</sub> Stämme gekreuzt.

### 4.3 Phänotypen von *dhh1*Δ-Mutanten

#### 4.3.1 Wachstumsphänotypen

Haploide *dhh1*Δ Mutanten zeigen ein verlangsamtes Wachstum bei 30°C (Strahl-Bolsinger und Tanner, 1993), was auch bei den in dieser Arbeit hergestellten Stämmen erkennbar war. In Abb. 4-6 ist eine Tetradenanalyse diploider Stämme gezeigt, die nach 4.2 erzeugt wurden. Da bei dieser Methode jeweils nur ein Allel deletiert wird, waren die in die Sporulation eingesetzten Stämme heterozygot für *DHH1*. Bei der Tetradenanalyse werden die durch Ausbringen der Stämme auf Sporulationsmedium entstandenen Asci, die vier haploide Sporen enthalten, mit Glusulase angedaut, auf eine YPD-Vollmedium Platte ausgebracht, mit einer feinen Glasnadel aufgebrochen und die vier Sporen auf einem vom Mikromanipulator vorgegeben Raster ausgelegt. Die Platten wurden dann 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass *dhh1*Δ Stämme unter gleichen Bedingungen gegenüber dem Wildtyp ein verlangsamtes Wachstum zeigten, was sich in der Ausbildung kleinerer Kolonien manifestierte.



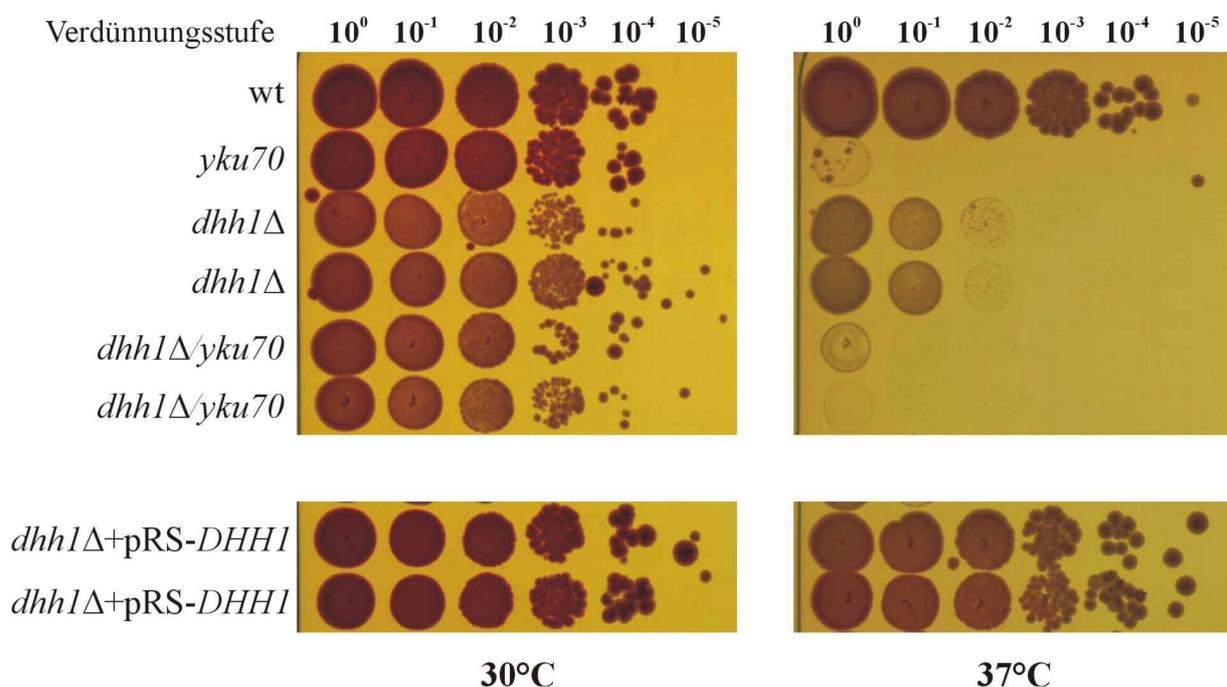
**Abb. 4-6** Tetradenanalyse von heterozygoten *dhh1*Δ Stämmen. Das linke Bild zeigt *dhh1*Δ Mutanten, die im Stamm CenPK2, das rechte *dhh1*Δ Mutanten, die im Stamm W303 generiert wurden. Die haploiden *dhh1*Δ Mutanten sind deutlich durch die Ausbildung kleinerer Kolonien zu erkennen.

#### 4.3.2 Temperatursensitivität

Ebenfalls in der Literatur beschrieben wurde ein Temperatur sensibler Wachstumsphänotyp für *dhh1*Δ Mutanten (Hata *et al.*, 1998). Plattiert man *dhh1*Δ-Stämme in Einzelkoloniedichte auf YPD Platten und inkubiert sie bei 37°C wachsen auch nach mehren Tagen keine Kolonien auf der Platte. Um zu untersuchen, ob die *dhh1*Δ Mutanten diesen Phänotyp auch in den von uns verwendeten Stämmen zeigen, wurden Tropftiterests durchgeführt. Dazu wurden Verdünnungsreihen einer Suspension der zu untersuchenden Hefen auf YPD-Platten aufgetropft und

bei 30°C und 37°C für 3-5 Tage inkubiert. Nach diesem Zeitraum konnte man bei normalem Zellwachstum an den Auftropfstellen je nach Verdünnungsstufe die Hefen als dichten Zellrasen oder als Einzelkolonie erkennen.

Es wurden zwei unabhängig generierte haploide *dhh1Δ*-Stämme mit dem haploiden Wildtyp-Stamm W303a verglichen. Um zu untersuchen, ob die *DHH1* Deletion einen zusätzlichen Effekt auf den Phänotypen von *yku70* defiziente Zellen hat, wurden außerdem zwei unabhängige *dhh1Δ/yku70* Stämme und der als ts charakterisierte *yku70* defiziente Stamm W303aL (Feldmann und Winnacker, 1993) aufgetropft (Abb. 4-7). Bei allen Stämmen ist bei 30°C Kolonienbildung bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-4}$  zu erkennen. Während der Wildtyp auch bei 37°C bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-4}$  Kolonien bildet, wächst der *dhh1Δ*-Stamm selbst bei einer Verdünnung von  $10^{-2}$  nur noch sehr schwach. Der *yku*-Stamm zeigte bei 37°C erwartungsgemäß kein Wachstum, ebenso ist für die Doppelmutanten kein Wachstum mehr erkennbar. Es ist gut zu erkennen, dass die Doppelmutanten, wie die *yku* Einzelmutante, nicht mehr wachsen. Transformiert man einen *dhh1Δ*-Stamm mit einem *DHH1*-Expressionsplasmid pRS-*DHH1* wird die Temperatursensitivität komplementiert und die Hefen wachsen wieder bei 37°C.



**Abb. 4-7** Temperatursensitivität von *dhh1Δ* Mutanten. Das linke Bild zeigt Verdünnungsreihen der angezeichneten Stämme, die bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert wurden. Das rechte Bild zeigt die selben Stämme bei einer Inkubationstemperatur von 37°C.

### 4.3.3 Einfluss der *DHH1* Deletion auf die Telomerlänge

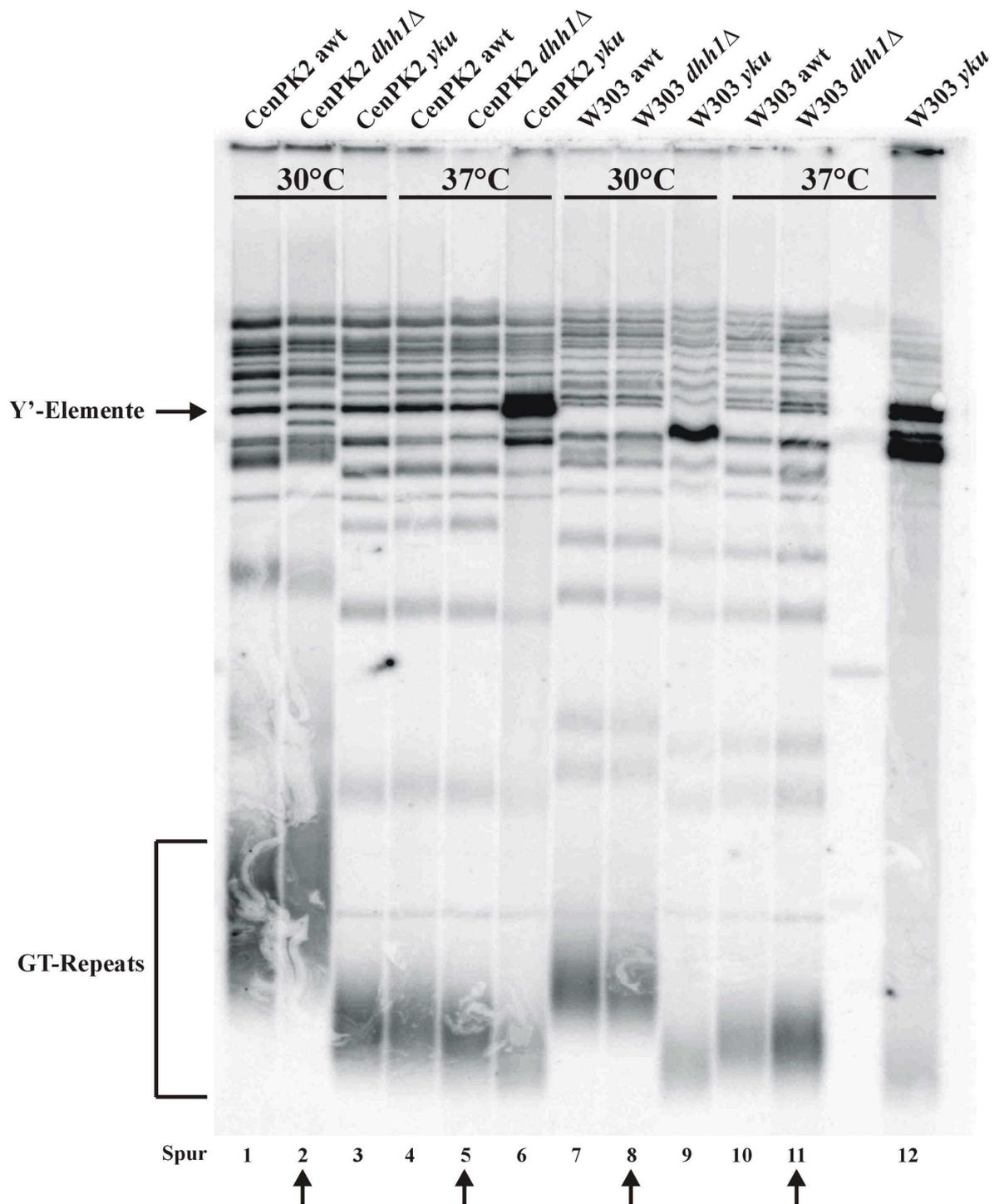
Eine wichtige Funktion des Yku Heterodimers liegt in der Aufrechterhaltung der Telomerlänge. Yku defiziente Zellen haben bei normalen Wachstumstemperaturen (30°C) stabil verkürzte Telomere (~30 % der Wildtyplänge) (Boulton und Jackson, 1998). Wachstum bei erhöhten Temperaturen (37°C) führt zu einer weiteren, letalen Verkürzung der Telomere. Durch Amplifikation der subtelomeren Y'-Elemente über einen homologen Rekombinationsmechanismus können einige *yku* defiziente Zellen ihre Telomerlänge stabilisieren und bei 37°C überleben (Fellerhoff *et al.*, 2000). Dieser sogenannte „Survivor“-Phänotyp ist auch für Telomerase defiziente Hefen beobachtet worden.

Um zu untersuchen, inwieweit die *DHH1* Deletion die Telomerlänge beeinflusst, wurden Telomerblots angefertigt. Hierzu wurden die *dhh1Δ* Stämme über 375 Generationen (15 Umstriche) auf YPD-Platten umgestrichen und bei 30°C inkubiert. Als Vergleich wurden der entsprechende Wildtyp-Stamm und der *yku* Stamm mitgeführt. Der Versuch erfolgte in zwei Stammhintergründen, CenPK2 und W303-1A. Nach dem letzten Umstrich wurden Übernachtkulturen angefertigt und die genomische DNA nach (3.11.2) isoliert. Die gereinigte DNA wurde mit *XhoI* quantitativ gespalten, quantifiziert und identische Mengen an DNA auf einem 1 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde auf eine Nylonmembran geblottet und die Membran mit einer <sup>32</sup>P-markierten oligo(GT)<sub>20</sub> Sonde hybridisiert. Die Autoradiographie der Hybridisierung ist in Abb. 4-8 gezeigt. Die Deletion von *DHH1* hat keinen Einfluss auf die Telomerlänge des entsprechenden Stammes bei 30°C (Spur 2 und Spur 8).

Außerdem wurde untersucht, ob Wachstum bei 37°C die Telomerlänge in *dhh1Δ* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beeinflusst. Dazu wurden die Stämme für 750 Generationen auf YPD-Platten bei 37°C umgestrichen. Die DNA wurde analog isoliert, gespalten, geblottet und die Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten oligo(GT)<sub>20</sub> Sonde autoradiographiert. Die Autoradiographie ist in Abb. 4-8 gezeigt. Auch hier ist kein Unterschied zwischen der Telomerlänge des *dhh1Δ* Stammes und des Wildtyps zu erkennen.

Zu beobachten ist, dass bei 30°C die Telomerlänge des *dhh1Δ* Stammes im CenPK2 Hintergrund länger zu sein scheint, als die des Wildtyps (Spur 2). Nachdem dies aber im W303 Hintergrund nicht zu beobachten ist, und sich auch nicht in weiteren Experimenten zeigte, wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um ein Artefakt handelt. Bei 37°C ist eine deutliche Verkürzung der Telomerlänge im Wildtyp zu beobachten, es zeigt sich aber kein Unterschied zwischen Wildtyp und *dhh1Δ* Stamm. Der CenPK2yku70 Stamm zeigt eine weitere Verkür-

zung der Telomerlänge und eine Y'-Amplifikation bei 37°C. Im W303yku70 Stamm ist nur noch die Y'-Amplifikation zu erkennen, da die weitere Verkürzung der Telomere nicht mehr detektierbar ist. Aus den gezeigten Daten ist deutlich zu erkennen, dass die Deletion von *DHH1* keinen Einfluss auf die Telomerlänge hat.



**Abb. 4-8** Telomerblot von *dhh1Δ*-Stämmen. Alle Stämme wurden 15x umgestrichen, was einer Generationszahl von ~375 entspricht. Die *dhh1Δ*-Stämme sind mit Pfeilen am unteren Rand gekennzeichnet. Man kann deutlich erkennen, dass *dhh1Δ*-Stämme keine Verkürzung der Telomere zeigen. Am linken Rand sind sog. Y'-Elemente, ein repetetiver Bereich in der subtelomeren Region, mit einem Pfeil markiert. Links unten sind die GT-Repeats markiert, die ein Maß für die Länge der Telomere darstellen. Am Beispiel des W303yku-Stammes ist die Y'-Amplifikation sehr gut zu erkennen.

---

---

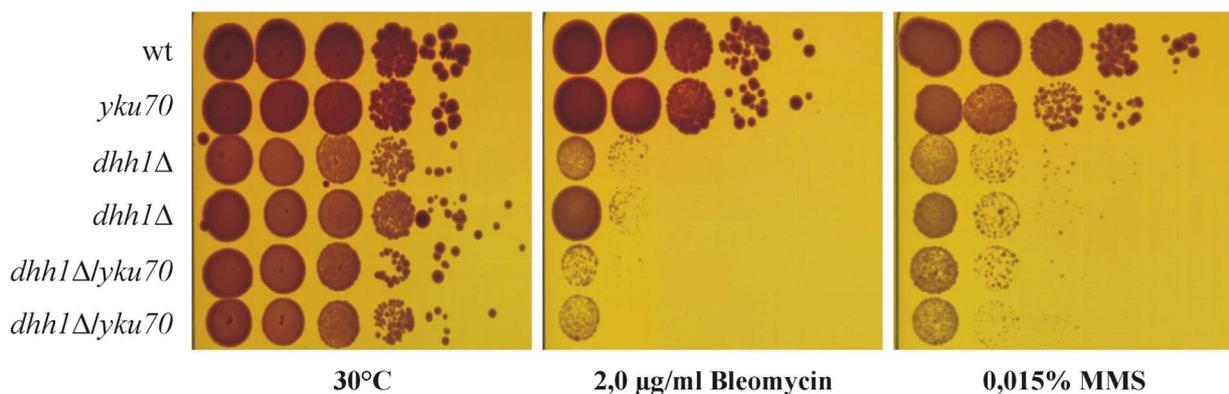
### 4.3.4 DNA-Reparatur Phänotypen von *dhh1Δ* Stämmen

Durch äußere Einflüsse sind Organismen einer permanenten Schädigung ihrer Erbsubstanz ausgesetzt. Da solche Schäden zum Zelltod, oder bei mehrzelligen Organismen auch zu Krebs führen können, bedürfen sie einer effizienten und genauen Kontrolle und Reparatur. Eine sehr schwerwiegende Schädigung der DNA sind Doppelstrangbrüche (DSBs). In *Saccharomyces cerevisiae* werden solche DSBs vorwiegend über homologe Rekombination mit einem Schwester Chromosom repariert. In humanen Zellen überwiegt ein zweiter Mechanismus DSBs zu reparieren: Dieser Mechanismus wird als „Non-homologous End-joining“ (NHEJ) bezeichnet und das hKu Protein spielt in diesem Reparaturweg eine essentielle Rolle. Bei der Reparatur von DSBs durch NHEJ werden die DNA Enden in der Regel ohne Verlust an genetischer Information religiert. Der NHEJ-Mechanismus ist von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert und das Yku Protein spielt beim NHEJ in der Hefe eine ähnlich essentielle Rolle, wie das hKu Protein in menschlichen Zellen. Yku Mutanten sind NHEJ defizient und sensitiv gegenüber Bleomycin und Methansulfonsäuremethylester (MMS). MMS ist ein stark alkylierendes Agens, das aber auch zu DNA DSBs führt. Neben ionisierender Strahlung können Doppelstrangbrüche auch durch Behandlung mit dem Radiomimetikum Bleomycin (BLM) in DNA eingeführt werden (Steighner und Povirk, 1990; Ward, 1990). Obwohl *yku* Mutanten sensitiv gegenüber Bleomycin sind, zeigen sie kaum Sensitivität gegenüber  $\gamma$ -Strahlung.

#### 4.3.4.1 MMS und Bleomycin Sensitivität von *dhh1Δ* Mutanten

Es sollte untersucht werden, inwieweit sich die *DHHL* Deletion auf die Sensitivität von Hefezellen gegenüber MMS und BLM auswirkt. Dazu wurden zwei unabhängig generierte haploide *dhh1Δ*-Stämme mit dem haploiden Wildtyp-Stamm W303a, dem *yku*-Stamm und zwei unabhängig generierten Doppelmutanten *dhh1Δ/yku* verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-9 gezeigt. Der *yku70*-Stamm zeigt bei den verwendeten Mengen von BLM und MMS keine bzw.

kaum Sensitivität. Der *dhh1* $\Delta$ -Stamm zeigt eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber den DNA schädigenden Substanzen als der Wildtyp-Stamm. Er wächst um den Faktor 100-1000fach schlechter. Zwischen der *dhh1* $\Delta$ -Einzel- und der *dhh1* $\Delta$ /*yku70* Doppelmutante ist kein Unterschied zu erkennen. Analoge Analysen wurden auch im CenPK2 Hintergrund durchgeführt (ohne Abbildung). Nachdem die Sensitivitäten im CenPK2 Hintergrund zwar geringer, die Tendenzen aber identisch waren, wurde wenn nicht anders erwähnt im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch mit den im W303 Hintergrund generierten Stämmen gearbeitet.

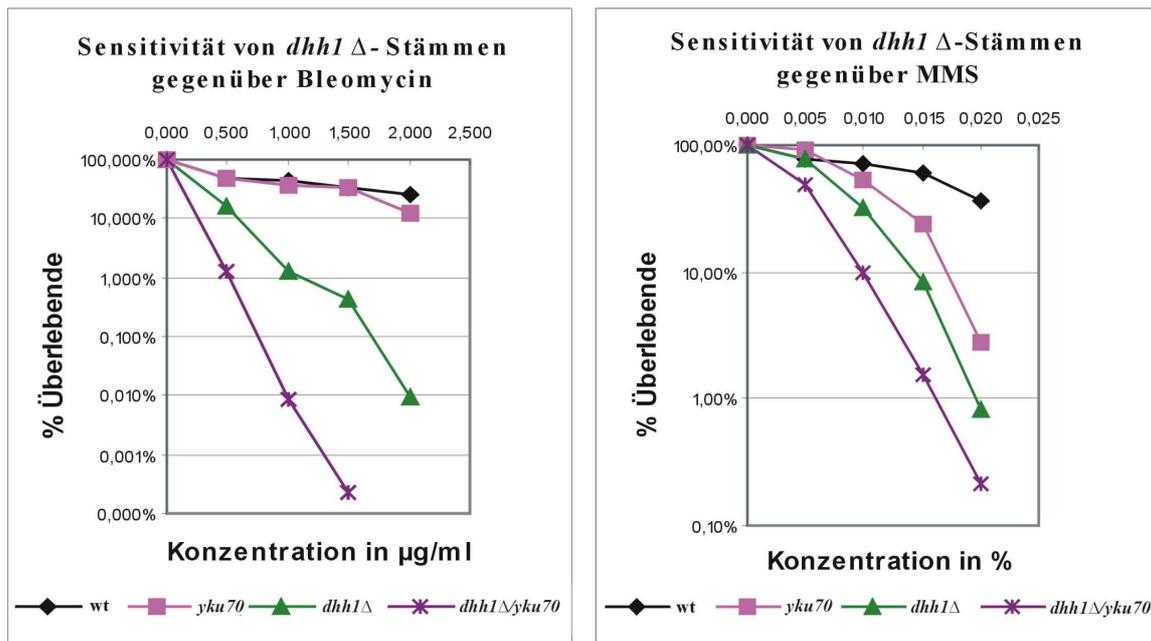


**Abb. 4-9** Tropftitertest von *dhh1* $\Delta$ -Stämmen auf YPD-Platten, die die DNA schädigenden Substanzen Bleomycin und MMS in den angegebenen Konzentrationen enthielten.

Um genauere Aussagen über die Sensitivitäten von *dhh1* $\Delta$ -Stämmen treffen zu können, wurde eine Quantifizierung der MMS- und Bleomycin-Sensitivität durchgeführt (Abb. 4-10). Für die Quantifizierung wurden die entsprechenden Stämme frisch aus einer Glycerinkultur auf YPD-Platten ausgestrichen und eine Übernachtskultur angeimpft. Am nächsten Tag wurden die Zellen verdünnt und bei einer  $OD_{600}$  von 0,8-1,0 auf YPD-Platten mit steigenden Konzentrationen an Bleomycin und MMS ausplattiert. Als Vergleich diente jeweils eine YPD-Platte ohne Zusätze. Es wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

Bei der Quantifizierung der Bleomycin-Sensitivität zeigte der *yku70*-Stamm kaum eine erhöhte Sensitivität, erst bei 2,0  $\mu$ g/ml wird eine schwache Sensitivität sichtbar. Der *dhh1* $\Delta$ -Stamm zeigte bei 2,0  $\mu$ g/ml eine um den Faktor 5000 erhöhte Sensitivität gegenüber dem Wildtyp-Stamm. Die *dhh1* $\Delta$ /*yku70* Doppelmutante zeigte bei 2,0  $\mu$ g/ml keine messbare Überlebensrate mehr, bei 1,5  $\mu$ g/ml war die Sensitivität schon um den Faktor 100 000 höher, als beim Wildtyp-Stamm. Es hat den Anschein, dass die Deletion von *DHHL1* im *yku70* Hintergrund einen synergistischen Effekt zeigt.

Bei der Quantifizierung der MMS-Sensitivität war auch eine erhöhte Sensitivität des *yku70*-Stammes zu beobachten. Bei 0,02 % MMS (v/v) zeigte er eine Erhöhung der Sensitivität um den Faktor 50. Auch hier war der *dhh1Δ*-Stamm deutlich sensitiver, als der *yku70*-Stamm (Faktor 100 im Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm). Die *dhh1Δ/yku70* Doppelmutante zeigt bei der Sensitivität gegenüber MMS eher einen additiven, als synergistischen Effekt.

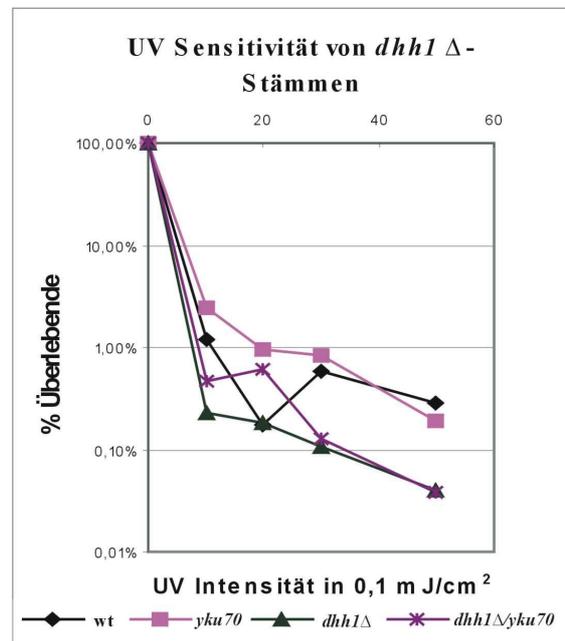


**Abb. 4-10** Quantifizierung der Sensitivitäten von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber Bleomycin und MMS. Die *dhh1Δ*-Stämme zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Bleomycin und MMS verglichen mit dem Wildtyp und dem *yku70*-Stamm. Bei der *dhh1Δ/yku70* Doppelmutante ist ein additiver Effekt zu beobachten.

Durch den synergistischen Effekt der *dhh1Δ/yku70* Mutante bei der Quantifizierung der Bleomycin-Sensitivität könnte man annehmen, dass durch die Deletion von *DHH1* im *yku70* Hintergrund ein zusätzlicher Reparaturweg ausgeschaltet wurde.

Aufgrund der oben erwähnten möglichen Beteiligung von Dhh1p an der Integrität der Zellwände, könnte die erhöhte Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen auch aufgrund einer erhöhten Aufnahme der Chemikalien bedingt sein. Man spricht in diesem Falle von einem sogenannten „uptake“-Phänotyp. Um dieser Frage nachzugehen, wurden *dhh1Δ*-Stämme mit UV-Strahlung behandelt und diese Sensitivität analog der gegenüber Bleomycin und MMS quantifiziert (Abb. 4-11).

UV-Strahlung erzeugt keine Doppelstrangbrüche, sondern führt zur Bildung von Thymidin-Dimeren in der DNA. Diese Schäden werden durch den sogenannten „Nucleotide-Excision-Pathway“ repariert. Es kann aber auch zu einer Dimerisierung von Thyminen in zwei verschiedenen Strängen kommen. Dies kommt einem cross-linking der DNA-Stränge gleich und kann unter Umständen zu DSBs führen. Als Strahlung stellt sie aber eine Schädigung dar, die unabhängig von der Beschaffenheit der Zellmembranen stattfindet, somit sollte eine UV-Sensitivität unabhängig von der Integrität der Zellmembranen sein. Für die Quantifizierung der UV-Sensitivität wurde eine Übernachtkultur in YPD-Medium verdünnt und bei einer  $OD_{600}$  von 0,8-1,0 100  $\mu$ l Aliquots auf YPD-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden eine Stunde bei 30°C inkubiert und dann in einem Crosslinker mit der entsprechenden Dosis an UV-Strahlung behandelt. Als Vergleich diente jeweils eine YPD-Platte, die nicht bestrahlt wurde. Auch hier wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Bei diesem Versuch zeigte der *yku70*-Stamm erwartungsgemäß keine Sensitivität gegenüber UV-Strahlung. Der *dhh1* $\Delta$ -Stamm zeigt eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber dem Wildtyp-Stamm. Es sind aber keine additiven Effekte bei der *dhh1* $\Delta$ /*yku70* Doppelmutante zu beobachten.



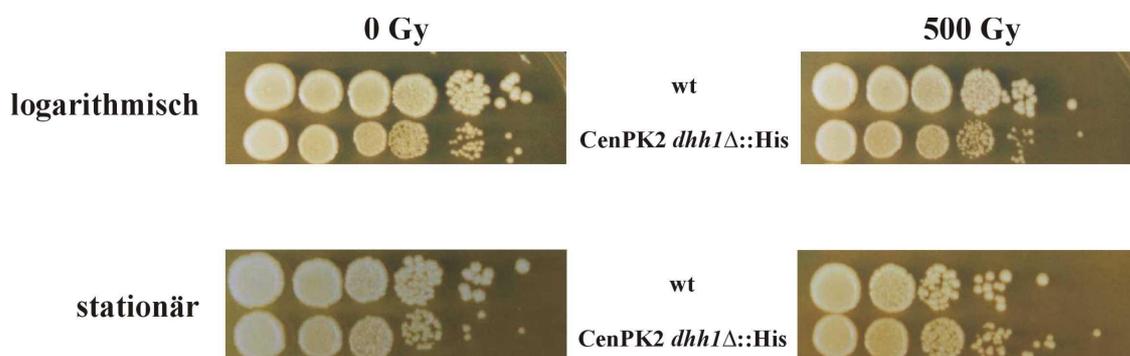
**Abb. 4-11** Quantifizierung der Sensitivitäten von *dhh1* $\Delta$ -Stämmen gegenüber UV-Strahlung. Die *dhh1* $\Delta$ -Stämme zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Strahlung verglichen mit dem Wildtyp und dem *yku70*-Stamm. Bei der *dhh1* $\Delta$ /*yku70* Doppelmutante ist hier kein additiver Effekt zu beobachten.

4.3.4.2 Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber  $\gamma$ -Strahlung

Bei der Quantifizierung der Sensitivitäten von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber Bleomycin und MMS fällt auf, dass diese Stämme fast so sensitiv gegenüber diesen Substanzen sind, wie eine *rad52* Mutante (Mages *et al.*, 1996). *RAD52* ist ein essentielles Gen für die homologe Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Man vermutet, dass das *RAD52* Genprodukt für nahezu alle DSB-Reparatur Vorgänge benötigt wird. *rad52* Zellen haben Defekte in der korrekten Verteilung von Chromosomen in der Meiose und sind defizient in allen mitotischen Rekombinationsvorgängen.

Wenn das Dhh1 Protein einen wichtigen Faktor für die Doppelstrangbruch-Reparatur durch homologe Rekombination darstellt, dann sollten *dhh1Δ*-Stämme gegenüber  $\gamma$ -Strahlung sensitiv sein. Daher wurde die Strahlungssensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber  $\gamma$ -Strahlung an der GSF Neuherberg unter Anleitung von Frau Dr. Anna Friedl bestimmt. Es wurden sowohl logarithmisch wachsende, wie auch stationäre Zellen bestrahlt. Logarithmische Zellen wurden verwendet, da sich bei teilungsaktiven Kulturen die meisten Zellen in der S- oder G2-Phase befinden. Das bedeutet, dass die Zellen durch die gerade replizierte DNA in einer Art pseudodiploidem Zustand vorliegen. Es liegt ein homologes Allel für die Reparatur vor und die Zellen können Doppelstrangbrüche durch homologe Rekombination reparieren. Stationäre Zellen befinden sich primär in der G0-Phase mit einem haploiden Chromosomensatz, weshalb ihnen die Möglichkeit zur homologen Rekombination fehlt.

In Abb. 4-12 sind die bestrahlten Stämme in Verdünnungsreihen auf YPD-Platten aufgetropft gezeigt. Man kann erkennen, dass weder der stationäre noch der logarithmisch wachsende Stamm eine Sensitivität gegenüber  $\gamma$ -Strahlung zeigen. Daraus kann man folgern, dass es sich bei den Sensitivitäten gegenüber Bleomycin und MMS wahrscheinlich doch um den schon erwähnten „uptake“-Phänotyp handelt.



---

**Abb. 4-12** Bestrahlung von *dhh1Δ* Mutanten mit  $\gamma$ -Strahlung. Die obere Reihe zeigt logarithmisch wachsende Ausgangsstämme, die untere Reihe zeigt Stämme, die bis zur stationären Phase wachsen gelassen wurden, bevor sie bestrahlt wurden. Die linke Spalte ist die unbestrahlte Kontrolle, die rechte zeigt Stämme, die mit 500 Gy bestrahlt wurden. *dhh1Δ* Stämme zeigen keine Sensitivität gegenüber  $\gamma$ -Strahlung.

---

---

#### 4.3.4.3 NHEJ Kapazität von *dhh1Δ*-Mutanten

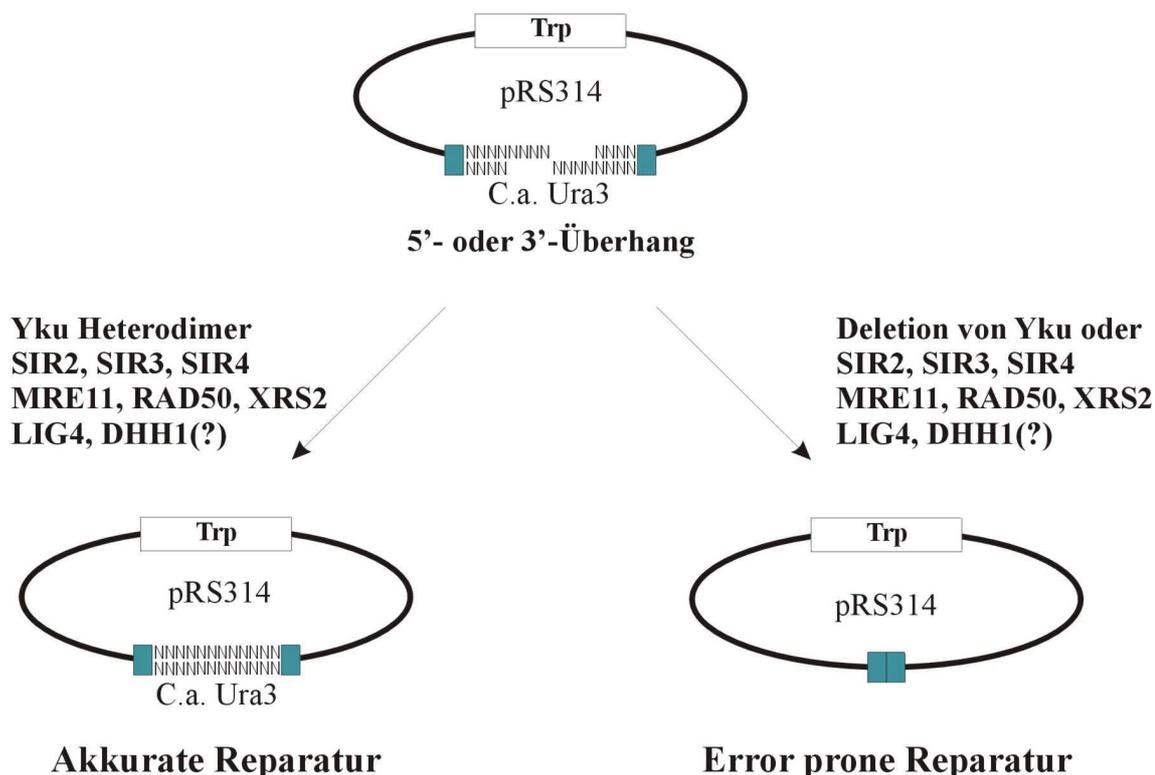
Wie schon erwähnt, ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage, Doppelstrangbrüche in ihrer DNA auf mindestens zwei verschiedenen Arten zu reparieren. Der in der Hefe dominante Weg der DNA-Reparatur ist die homologe Rekombination. Eine Wildtyp-Hefe repariert ihre DNA zu nahezu 100 % auf diese Weise. Dies steht im Gegensatz zu humanen Zellen, bei denen die homologe Rekombination eine untergeordnete Rolle spielt. Sie reparieren ihre DNA durch das nicht homologe End-joining (NHEJ). Das NHEJ kann in der Bäckerhefe induziert werden, vor allem, wenn die Zelle keine Möglichkeit hat, einen homologen Partner für das defekte DNA-Fragment zu finden. Wenn Proteine, die essentiell für homologe Rekombination sind, deletiert werden (z.B. *RAD52*), ist ebenfalls der homologe Rekombinationsmechanismus ausgeschaltet und die Hefe kann nur noch über das NHEJ Doppelstrangbrüche reparieren.

Boulton und Jackson haben 1996 eine Methode vorgestellt, wie man den Einfluss von Proteinen auf das NHEJ in Hefe untersuchen kann (Boulton und Jackson, 1996). In dieser Arbeit wurde eine abgewandelte Form des publizierten Plasmids verwendet, das erlaubt, gleichzeitig auf Effizienz und Genauigkeit der Doppelstrangbruch-Reparatur zu untersuchen (Abb. 4-13).

Bei dieser Methode wurde ein Hefeselektionsplasmid verwendet, in das ein heterologes Marker-Gen kloniert war. Das Plasmid wurde in diesem heterologen Marker-Gen linearisiert. Nachdem für diesen heterologen Marker kein Pendant im Hefegenom existiert, kann dieser Doppelstrangbruch nicht über homologe Rekombination repariert werden. Das verwendete Plasmid enthält in seinem Vektorrückrad zusätzlich einen homologen Hefemarker, auf den ebenfalls selektiert werden kann. Die Selektion auf den homologen Marker im Vektorrückrad stellt ein Maß für die Rezirkularisierung des Vektors dar und korreliert somit direkt mit der NHEJ-Effizienz. Die Selektion auf das heterologe Marker-Gen, in dem linearisiert wurde, erlaubt nur Zellen Kolonien zu bilden, die den Doppelstrangbruch exakt repariert haben, so dass das heterologe Marker-Gen auch exprimiert werden kann.

Um die NHEJ Kapazität in *dhh1Δ*-Stämmen zu untersuchen, wurde der *dhh1Δ*-Stamm zusammen mit dem entsprechenden Wildtyp-Stamm mit einem pRS314-Plasmid, in das ein hete-

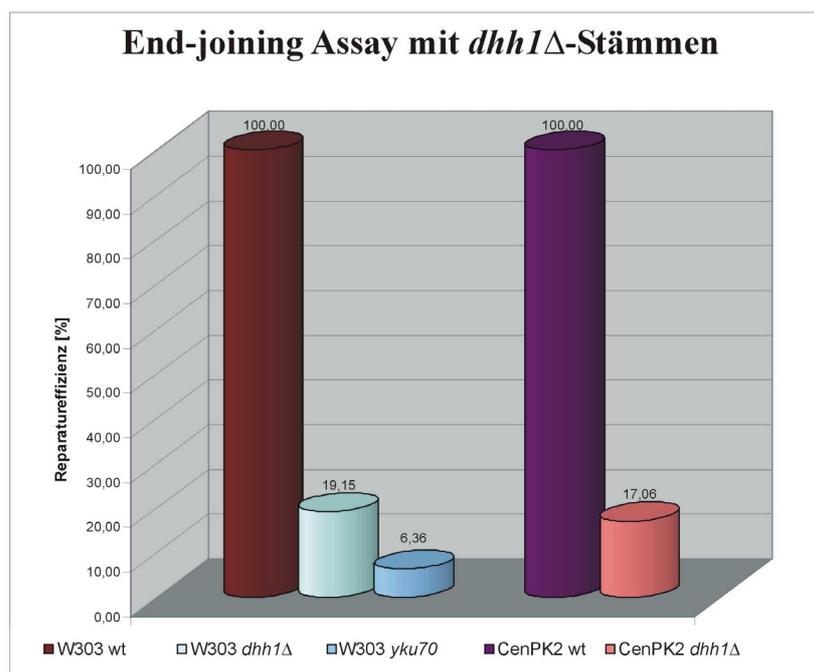
rologes Ura3-Gen aus *Candida albicans* kloniert war, transformiert. Das Plasmid wurde in identischen Mengen einmal ungeschnitten (supercoiled) und einmal mit *EcoRI* im Ura3-Gen linearisiert transformiert. Als Vergleich wurde in diesem Versuch eine *yku70*-Mutante mitgeführt, von der publiziert ist, dass die NHEJ Effizienz auf 1 % reduziert ist und diese Rezirkularisierung zu nahezu 100 % nach einem „error-prone“ Mechanismus unter Verlust genetischer Information verläuft (Boulton und Jackson, 1996).



**Abb. 4-13** Schematische Darstellung der Vorgänge beim NHEJ. In das Plasmid pRS314 wurde ein Ura3-Gen aus *Candida albicans* kloniert und mit *EcoRI* im Ura3-Gen linearisiert. Durch die Wahl dieses Marker-Gens kann die Hefe das Plasmid nicht über homologe Rekombination reparieren. Ist der NHEJ-Apparat intakt, wird ein solches linearisiertes Plasmid fehlerfrei und mit nahezu 100 % Effizienz repariert. Ist der NHEJ-Apparat defekt, findet ein sogenannter „error-prone“ Reparaturweg statt. Mit Hilfe dieses Systems kann man die Auswirkungen einer Deletions- oder Punktmutante auf das NHEJ untersuchen.

Die Transformationen wurden in verschiedenen Verdünnungen auf Trp<sup>-</sup> Platten in Sätzen zu drei Platten plattiert. Nachdem die Platten für 5 Tage bei 30°C inkubiert waren, wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die NHEJ-Effizienz wurde aus dem Verhältnis von gewachsenen Kolonien der mit dem supercoiled Plasmid transformierten Stämme und gewach-

senen Kolonien der mit dem linearisierten Plasmid transformierten Stämme berechnet. Dabei wurde das Ergebnis auf den Wildtyp normalisiert. Zeigte der Wildtyp-Stamm eine Reparatur-effizienz von <80 %, wurde der Versuch wiederholt. Von den auf Trp<sup>-</sup>/Ura<sup>-</sup>-Medium gewachsenen Kolonien wurden jeweils 50 auf Trp<sup>-</sup>/Ura<sup>-</sup> Platten umgestrichen um neben der Effizienz auch die Genauigkeit der Reparatur zu bestimmen. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse ist in (Abb. 4-14) gegeben.



**Abb. 4-14** Ergebnis des End-joining Assays. *dhh1*Δ-Mutanten zeigen eine deutliche Reduktion in der Effizienz der Rezirkularisierung eines linearisierten Plasmids. Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm beträgt die Effizienz bei der W303*dhh1*Δ Mutante nur 19,2 %. Beim CenPK2*dhh1*Δ Stamm beträgt sie 17,1 %. Die als Vergleich mitgeführte W303*yku70* Mutante zeigt nur eine Effizienz von 6,4 %.

Es konnte gezeigt werden, dass die Effizienzen der *dhh1*Δ-Mutanten sowohl im W303 Stammhintergrund (19,2 %) als auch im CenPK2 Stammhintergrund (17,1 %) um den Faktor fünf herabgesetzt waren, jeweils verglichen mit dem auf 100 % normierten, korrespondierenden Wildtyp. Die als Kontrolle mitgeführte *yku70*-Mutante zeigte nur eine Reparatureffizienz von 6,4 %. Zwar war die Effizienz des NHEJ in den *dhh1*Δ-Mutanten herabgesetzt, das Umstreichen auf Trp<sup>-</sup>/Ura<sup>-</sup> Platten zeigte aber, dass der Anteil an Plasmiden, die repariert wurden, genau repariert wurde.

#### 4.4 Komplementationsstudien von *dhh1*Δ-Stämmen mit dem Mre11-Komplex

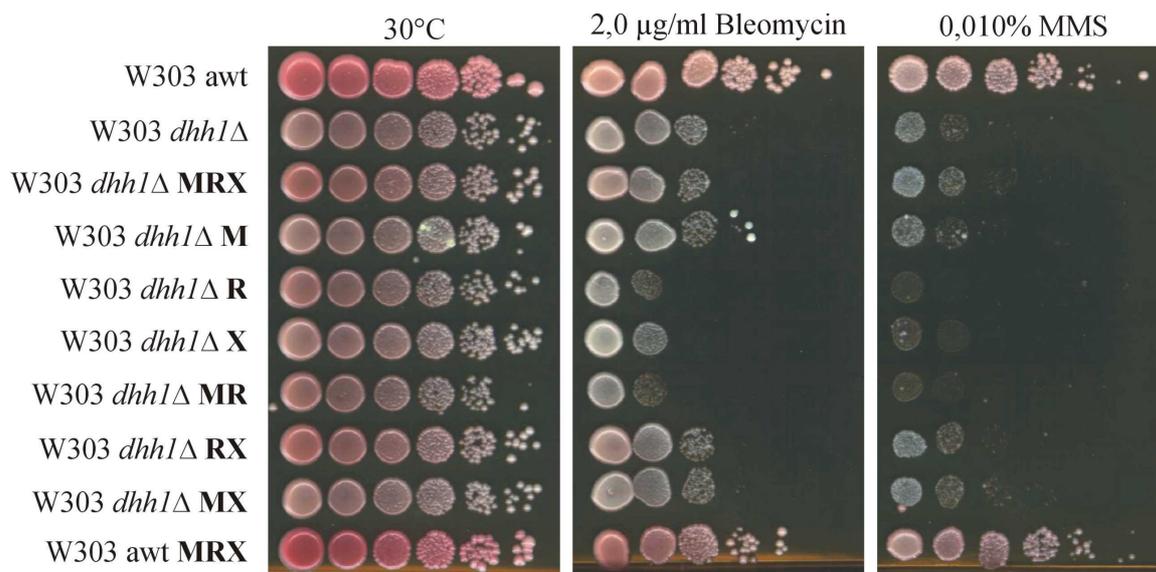
Der Mre11-Komplex besteht aus den Proteinen Mre11p und Rad50p und ist unter anderem an der Reparatur von DNA DSBs beteiligt. Homologe von Mre11p und Rad50p wurden in nahezu allen Organismen gefunden. Daher nimmt man an, dass der Mre11-Komplex eine fundamentale Rolle bei der Aufrechterhaltung genomischer Stabilität spielt (Aravind *et al.*, 1999). In eukaryontischen Zellen enthält der Mre11-Komplex eine weitere, weniger konservierte Komponente. In *S. cerevisiae* wird diese als Xrs2p, in höheren Eukaryonten als Nbs1p bezeichnet (Carney *et al.*, 1998; Tauchi *et al.*, 2001; Varon *et al.*, 1998). Genetische Studien haben gezeigt, dass der Mre11-Komplex eine Vielzahl von Funktionen als Antwort auf DSBs ausübt (Haber, 1998). So spielt der Mre11-Komplex sowohl eine Rolle bei der meiotischen Doppelstrangbruch-Bildung und Prozessierung (Ogawa *et al.*, 1995; Tsubouchi und Ogawa, 1998), als auch bei der Erkennung von DNA-Schäden (D'Amours und Jackson, 2001; Grenon *et al.*, 2001). Außerdem ist der Mre11-Komplex an der Aufrechterhaltung der Telomere (Chamankhah *et al.*, 2000; Kironmai und Muniyappa, 1997), der homologen Rekombination und dem NHEJ in *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt (Moore und Haber, 1996).

Wie in Abb. 4-13 gezeigt, stellt neben dem Mre11-Komplex auch das Yku Protein einen essentiellen Faktor für das NHEJ in der Bäckerhefe dar. Beide Proteine zeigen bei der Disruption eine verringerte Effizienz beim NHEJ (Boulton und Jackson, 1998; Boulton und Jackson, 1996). Der wesentliche Unterschied liegt aber darin, dass die Disruption von *YKU* zu Nukleotidverlust oder -addition führt („error-prone“), die Disruption von einem der drei Gene, die für den Mre11-Komplex kodieren jedoch nicht (Boulton und Jackson, 1998). Im letzteren Fall werden die Plasmide mit geringerer Effizienz, aber akkurat ligiert.

Ein analoger Phänotyp, reduzierte Effizienz des NHEJ, aber genaue Reparatur der rezirkularisierten Plasmide, konnte auch bei der Deletion von *DHH1* beobachtet werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass Dhh1p einen ähnlichen Einfluss auf das NHEJ hat, wie der Mre11-Komplex. Sollten der Mre11-Komplex und Dhh1p redundant in ihrer Funktion beim NHEJ sein, oder gemeinsam an einem Schritt während des NHEJ Prozesses wirken, könnte die Überexpression des Mre11-Komplexes in *dhh1*Δ-Stämmen deren Phänotypen im Bezug auf DNA-Reparatur eventuell komplementieren. Um dies näher zu untersuchen wurden die einzelnen Untereinheiten des Mre11-Komplexes in die Überexpressions-Plasmide pAL, pAU und pAT kloniert. Dies erlaubte die Überexpression des ganzen Komplexes, sowie die der einzelnen

Komponenten. Außerdem wurden noch die Paare Mre11/Rad50, Mre11/Xrs2 und Rad50/Xrs2 getestet.

Die transformierten *dhh1*Δ-Stämme wurden in Verdünnungsreihen auf YPD Platten, die Bleomycin und MMS in verschiedenen Konzentrationen enthielten aufgetropft und für drei Tage bei 30°C inkubiert (Abb. 4-15).



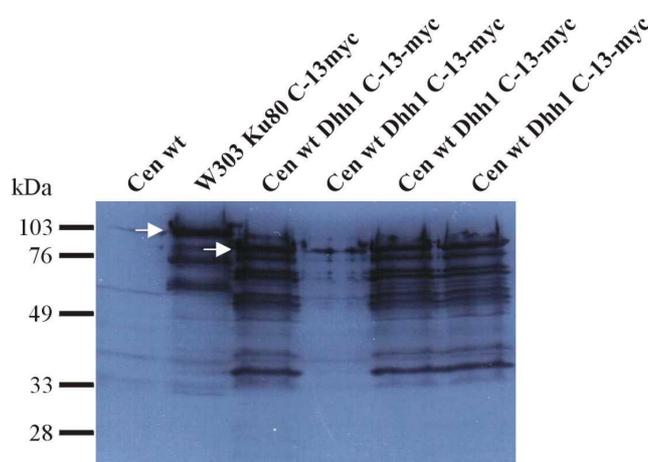
**Abb. 4-15** Überexpression des Mre11-Komplexes und seiner Untereinheiten in *dhh1*Δ-Stämmen. Die verwendeten Abkürzungen sind wie folgt: **M**: pAU Mre11, **R**: pAT Rad50, **X**: pAL Xrs2 und ihre Kombinationen. Die Überexpression von Rad50 und Xrs2 hat einen negativen Effekt auf die Sensitivitäten von *dhh1*Δ-Stämmen gegenüber den DNA-schädigenden Substanzen Bleomycin und MMS. Exprimiert man Rad50 zusammen mit Mre11, ist die Sensitivität ähnlich der alleinigen Rad50 Überexpression. Wird Rad50 zusammen mit Xrs2 überexprimiert, heben sich die Effekte wieder auf. Alle anderen Kombinationen haben keinen Einfluss auf die Sensitivität des *dhh1*Δ-Stammes.

Überraschenderweise wurde die Sensitivität der *dhh1*Δ-Stämme gegenüber Bleomycin und MMS durch die Überexpression einiger Komponenten des Mre11-Komplexes verstärkt. Die Überexpression von Rad50p bzw. Xrs2p alleine führt zu einer deutlich höheren Sensitivität gegenüber Bleomycin und MMS. Auch die Überexpression von Mre11p und Rad50p zusammen erhöht die Sensitivität. Alle anderen möglichen Kombinationen und auch die Überexpression des gesamten Mre11-Komplexes zeigen keine Auswirkungen.

Der Wildtyp-Stamm zeigt eine leichte Erhöhung der Sensitivität gegenüber Bleomycin und MMS bei der Überexpression des Mre11-Komplexes. Dies wurde in unserem Labor schon mehrfach beobachtet. Die Ursache dafür ist allerdings noch nicht geklärt.

#### 4.5 Lokalisation des Dhh1 Proteins

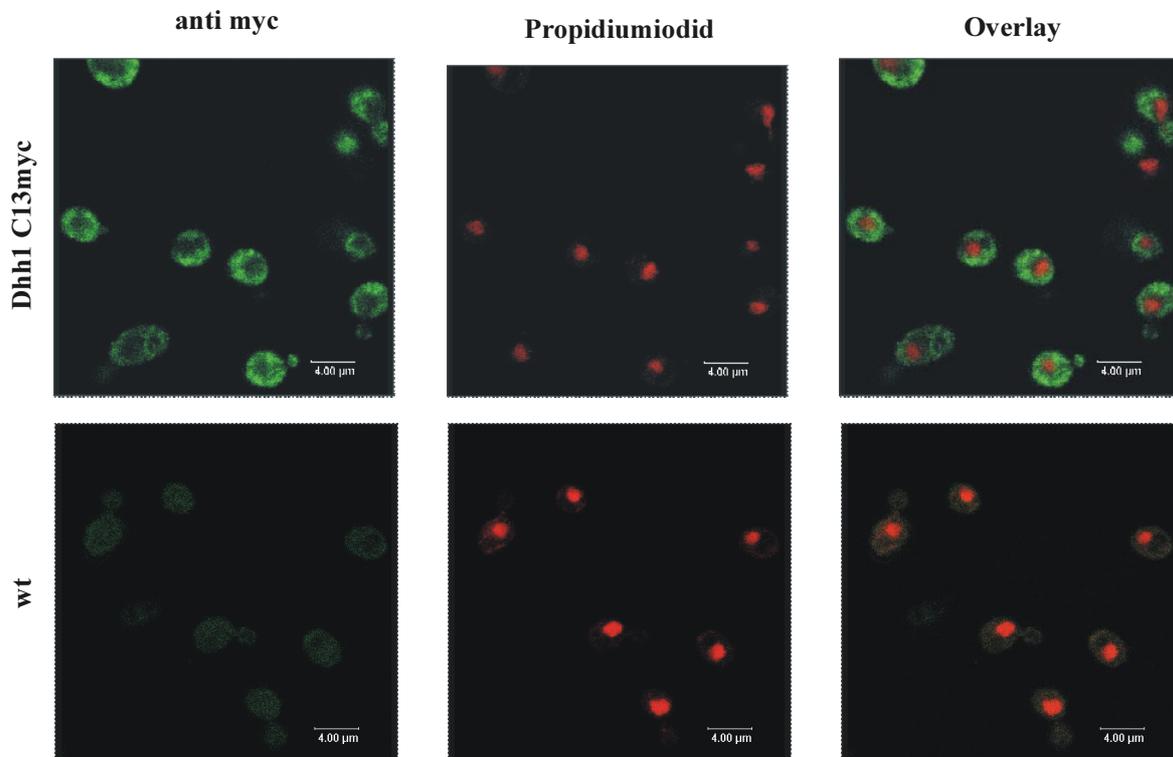
Die Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle kann hilfreiche Information bezüglich seiner Funktion geben. So sind Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind wie z.B. das Yku-Heterodimer im Zellkern angesiedelt (Martin *et al.*, 1999). Um die Lokalisation von Dhh1p in der Zelle zu untersuchen, wurde an das Protein C-terminal ein 13myc-Tag fusioniert. Die Sequenz für den Tag wurde mit Hilfe der unter 4.2 beschriebenen Methode chromosomal in das Hefegenom eingeführt. Ob das Fusionsprotein in der Zelle exprimiert wird, wurde durch Western-Blot Analyse von vier unabhängigen Klonen, die in der analytischen PCR positiv waren, untersucht (Abb. 4-16). Als Kontrollen diente ein bereits charakterisierter Yku80-13myc Stamm, sowie der Wildtyp-Stamm



**Abb. 4-16** Western-Blot Analyse des Dhh1-13myc Fusionsproteins. Es wurden vier unabhängige Klone untersucht. Als Kontrolle diente der Yku80-13myc Stamm, sowie ein Wildtyp-Stamm. Das Yku80-13myc Protein und das Dhh1-13myc Protein sind mit einem Pfeil markiert. Der Blot wurde mit dem anti-myc Antikörper 9E10 inkubiert und die Banden durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Durch die Fusion eines Proteins mit einem 13-myc Tag kann man die Lokalisation innerhalb der Zelle durch Immunofluoreszenz nachweisen. Dazu werden die Zellen permeabilisiert und mit dem Antikörper 9E10 (Maus) inkubiert (siehe 3.16). Durch die Inkubation mit einem zweiten Antikörper, der gegen die schwere und leichte Kette von 9E10 gerichtet ist und einen Fluoreszenz-Marker trägt (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, Molecular Probes) kann die Lokalisation des Proteins in der Zelle in einem Fluoreszenz- bzw. Konfokalen-Mikroskop sichtbar gemacht werden. Mit einem im Western-Blot positiven Stamm wurde die Dhh1p Lokalisation durch Immunofluoreszenz untersucht. Die Zellen wurden in einem konfokalen Lasermikroskop betrachtet (Abb.

4-17). Es ist deutlich zu erkennen, dass das Dhh1 Protein zytoplasmatisch lokalisiert ist. Dies bedeutet, dass Dhh1p auf keinen Fall direkt an DNA-Reparatur Prozessen beteiligt sein kann.

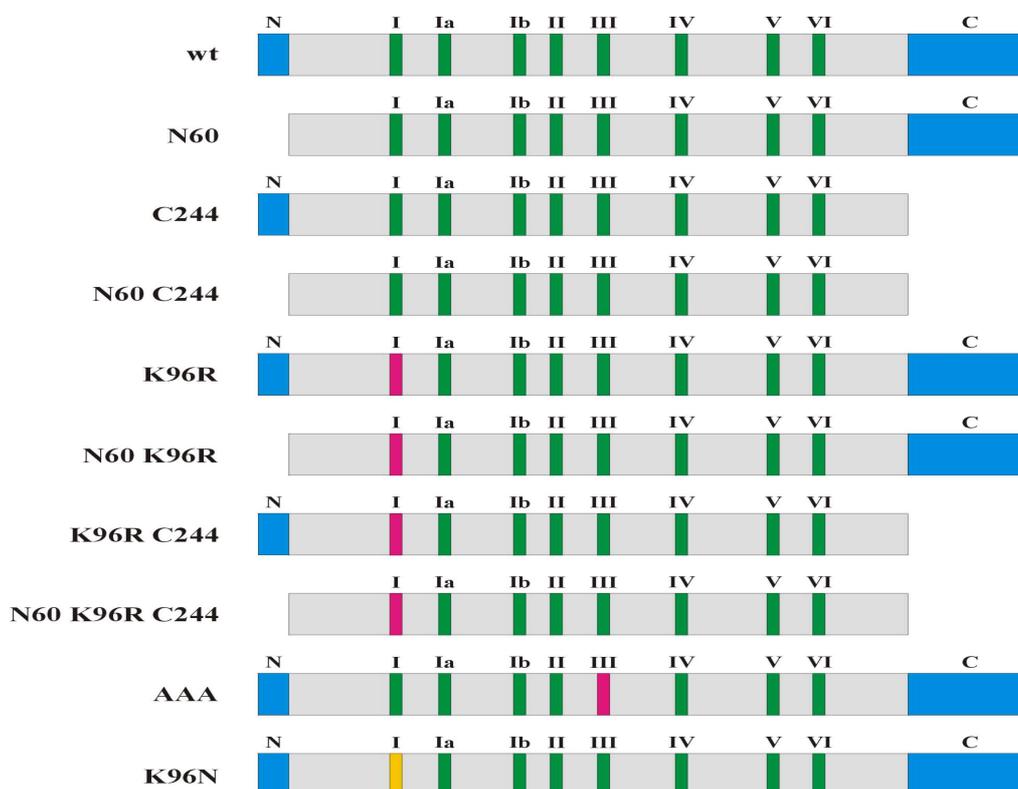


**Abb. 4-17** Immunofluoreszenz von 13-myc getagtem Dhh1p. In der oberen Reihe sind Zellen, in denen chromosomal mit einem am C-Terminus fusionierten 13-myc Tag versehenes Dhh1p exprimiert wurde. Das erste Bild zeigt die Zellen mit einem anti-myc Antikörper (9E10) abgegriffen. Im zweiten Bild ist die DNA mit Propidiumjodid angefärbt. Das dritte Bild zeigt die Überlagerung der beiden ersten. In der zweiten Reihe ist die selbe Anordnung für den Wildtyp-Stamm ohne getagtes Dhh1p gezeigt. Man kann erkennen, dass Dhh1p nicht im Zellkern lokalisiert ist.

#### 4.6 Analyse der funktionellen Domänen von Dhh1p

Wie bereits unter 4.1 beschrieben, lässt sich das Dhh1 Protein in verschiedene Bereiche unterteilen. Die für die Charakterisierung entscheidenden Motive befinden sich alle im sog. Kernbereich des Proteins. Aufgrund der unter Kap. 1.1 beschriebenen möglichen Funktionen des N- und C-Terminus könnte man diese jeweils als eigenen Bereich des Proteins ansehen. Daher wurde das Protein in drei Bereiche unterteilt: N-Terminus, Kernbereich, C-Terminus. Inwieweit diese drei Bereiche des Dhh1 Proteins für seine zelluläre Funktion relevant sind, wurde in Mutagenesestudien, bei denen der N-, der C-Terminus bzw. beide deletiert wurden getestet.

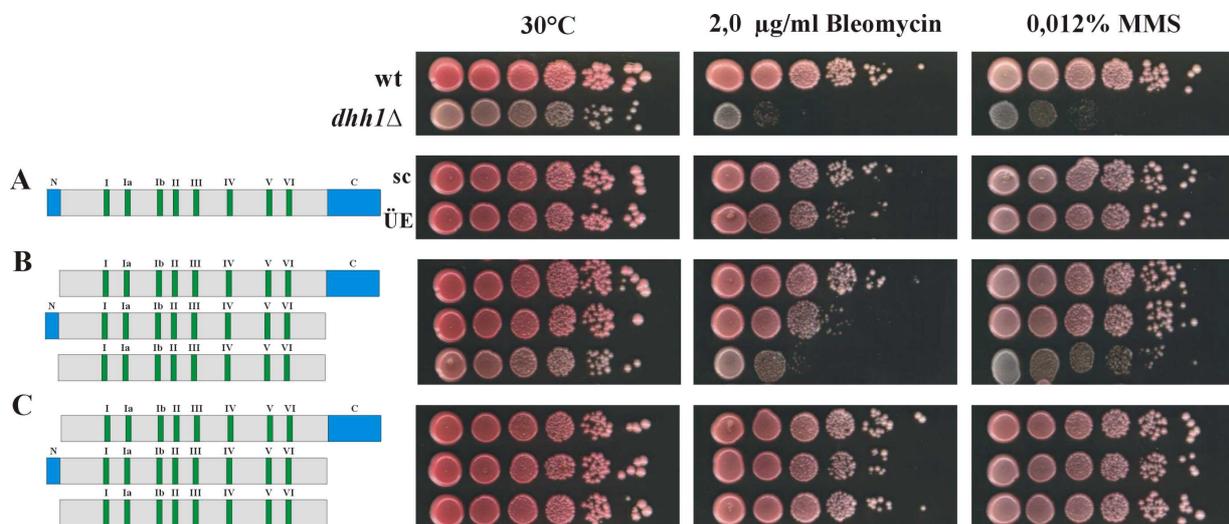
Zusätzlich wurde das Walker A Motiv (AXXGTGKT) zu AXXGTGRT bzw. AXXGTGNT und das SAT-Motiv in AAA mutiert. Mit diesen Mutanten wurde in Komplementationstudien untersucht, ob sie noch in der Lage sind, den Null Phänotyp des Proteins aufzuheben. Die in dieser Arbeit generierten Verkürzungen und Mutationen sind in Abb. 4-18 gezeigt.



**Abb. 4-18** Schematische Darstellung der verschiedenen Deletionen und Punktmutationen, die von Dhh1p generiert wurden. *N60*: N-terminale Verkürzung um 60bp, entspricht 20 AA, *C244*: C-terminale Verkürzung um 244bp, entspricht 80 AA, *N60 C244*: Kombination aus beiden, *K96R*: Mutation des Lys96 in Arg96, *K96N*: Mutation des Lys96 in Asn96, *AAA*: Mutation des SAT-Motivs in AAA. Alle Mutanten wurden sowohl single-copy in den pRS315 Vektor unter eigenem Promotor, als auch überexprimiert in den pAL Vektor unter Kontrolle des ADH-Promotors kloniert.

Nachdem der Kernbereich des Proteins eine starke Konservierung zu den Homologen aus anderen Organismen aufweist (siehe Abb. 4-3) wurde zuerst untersucht, ob der N- oder C-Terminus einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben. Dazu wurden Mutanten generiert, bei denen am N-Terminus 20 Aminosäuren, am C-Terminus 80 Aminosäuren und beide Termini deletiert wurden. Diese Mutanten wurden sowohl in den single-copy Vektor pRS315 unter Kontrolle des *DHH1* Promotors, als auch in den Überexpressions-Vektor pAL unter Kon-

trolle des ADH-Promotors kloniert und die so generierten Transformanten in Tropftitertests auf ihre Sensitivitäten gegenüber Bleomycin und MMS getestet (Abb. 4-19).



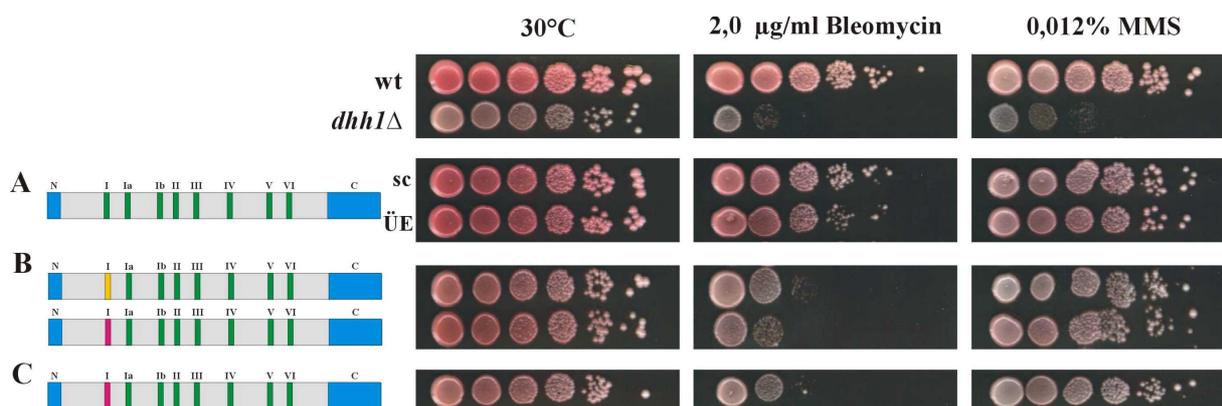
**Abb. 4-19** Komplementation der Sensitivitäten von *dhh1Δ*-Stämmen mit N-, C- und N-C-terminal trankiertem Dhh1p. **A:** Komplementation mit dem Wildtyp-Gen, sc: single-copy, ÜE: Überexpression, **B:** Expression der Trankierungen unter DHH1 eigenem Promotor. **C:** Überexpression der Trankierungen unter dem ADH-Promotor.

Die single-copy Expression der N60 Mutante ist in der Lage die Bleomycin Sensitivität von *dhh1Δ*-Mutanten nahezu auf Wildtyp Niveau zu reduzieren. Die C244 Mutante ist dazu nicht mehr in der Lage. Bei der N60/C244 Doppeltrankierung befindet sich der *dhh1Δ*-Stamm im Bezug auf die Sensitivität gegenüber Bleomycin fast auf *dhh1Δ*-Niveau. Die MMS Sensitivitäten werden sowohl von der N60 als auch der C244-Mutante auf Wildtyp-Niveau komplementiert, lediglich die N60/C244 Doppelmutante wächst etwas schlechter.

Bei den Überexpressionen verhält sich dies anders. Hier werden die Sensitivitäten des *dhh1Δ*-Stammes von allen Konstrukten komplementiert, was sowohl für Bleomycin als auch MMS gilt.

Pause und Sonenberg (1992) haben durch Mutationsanalysen gezeigt, dass im eukaryontischen Elongationsfaktor eIF-4A eine Mutation von Lys82 zu Asparagin einen totalen Verlust der ATP-Bindungsaktivität und damit der Helikaseaktivität bewirkt. Die Aminosäuresequenz des eIF4A ist stark homolog zum Kernbereich des Dhh1 Proteins. Deshalb wurde untersucht, ob die selbe Mutation in Dhh1p einen Einfluss auf die DNA-Reparatur Sensitivitäten hat. Von

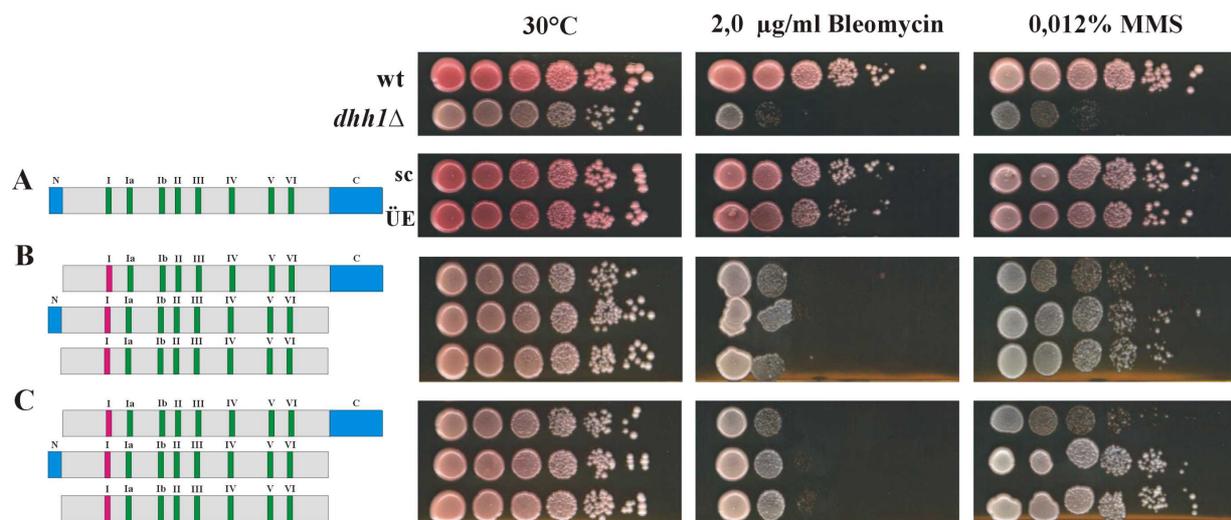
Sung *et al.* (1988) wurde publiziert, dass eine Mutation von Lysin zu Arginin im ATPase Motiv A im Rad3 Protein von *Saccharomyces cerevisiae* nicht die ATP-Bindung verhindert, wohl aber die ATP Hydrolyse. Dies führt ebenfalls zu einem Verlust der Helikase-Aktivität des Proteins. Auch diese Mutation wurde in Dhh1p eingeführt und mit der K96N Mutation in Tropftiterests verglichen (Abb. 4-20).



**Abb. 4-20** Komplementation der Sensitivitäten von *dhh1Δ*-Stämmen mit ATPase A-Mutanten. **A:** Komplementation mit dem Wildtyp-Gen, sc: single-copy, ÜE: Überexpression, **B:** Expression der K96N (gelb) und K96R (rot) Punktmutation unter DHH1 eigenem Promotor. **C:** Überexpression der K96R Punktmutation unter dem ADH-Promotor.

Die single-copy Expression der K96N Mutante ist nicht in der Lage die Bleomycin Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen zu komplementieren. Die mit der K96N Mutante transformierten Stämme wachsen lediglich zwei Verdünnungsstufen besser, als der mit dem Leerplasmid transformierte Deletionsstamm. Ähnlich verhält es sich mit der K96R Mutante. Diese wächst nur eine Verdünnungsstufe besser als der *dhh1Δ*-Stamm. Dies ändert sich auch nicht, wenn man die K96R Mutante überexprimiert. Anders ist es bei den Sensitivitäten gegenüber MMS. Diese werden sowohl von der K96N als auch der K96R Mutante als single-copy und Überexpression auf Wildtyp-Niveau komplementiert.

Nachdem die Trankierungen einen anderen Phänotyp zeigten als die ATPase A-Mutanten, wurde untersucht, inwieweit sich eine Kombination dieser beiden Mutationen verhält. Es wurden N-terminale, C-terminale und NC-terminale Deletionen der K96R Mutante hergestellt und in *dhh1Δ*-Stämmen single-copy und überexprimiert. Die so generierten Transformanden wurden ebenfalls in Tropftiterests auf die Sensitivität gegenüber Bleomycin und MMS untersucht.



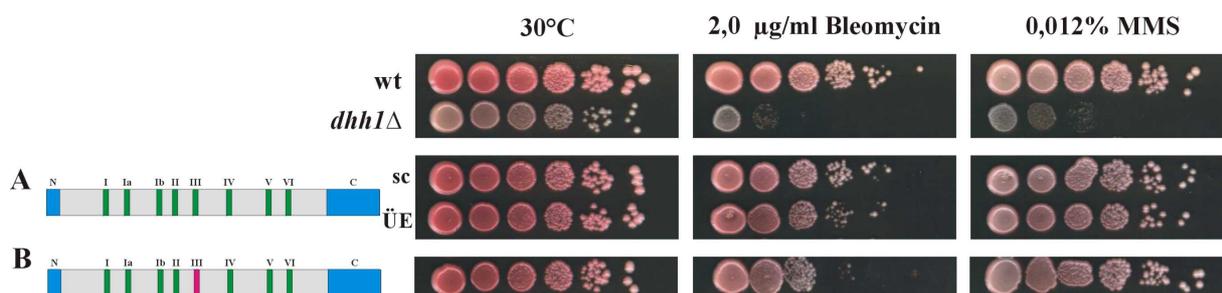
**Abb. 4-21** Komplementation der Sensitivitäten von *dhh1Δ*-Stämmen mit N, C, NC- und ATPase A-Mutanten. **A:** Komplementation mit dem Wildtyp-Gen, sc: single-copy, ÜE: Überexpression, **B:** Expression der DHH1 N60K96R, K96RC244 und N60K96RC244 Doppelmutationen unter DHH1 eigenem Promotor. **C:** Überexpression der unter B erwähnten Doppelmutationen unter dem ADH-Promotor.

Die Doppelmutanten zeigen sowohl in der single-copy als auch in der Überexpression keinen additiven Effekt bei der Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber Bleomycin. Doch zeigen sich hier Effekte bei der Sensitivität gegenüber MMS. Während die jeweilige Einzelmutanten die MMS Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen komplementieren, zeigt die N60/K96R Mutante eine um fast zwei Verdünnungsstufen höhere Sensitivität als die korrespondierenden Einzelmutanten. Auch die K96R/C244 und N60/K96R/C244 Doppelmutanten wachsen etwas schlechter als ihre entsprechenden Einzelmutanten. Dies ist sowohl bei der single-copy als auch bei der Überexpression der Fall.

Es hat den Anschein, dass die ATPase-Funktion im Vergleich mit der Funktion der Termini die dominantere ist. Dies ist sehr deutlich bei der Sensitivität gegenüber Bleomycin zu erkennen. Im Gegensatz zu den einzelnen Mutationen, zeigt aber die N60/K96R Mutante auch einen deutlichen Effekt im Bezug auf die MMS Sensitivität und dies sowohl für die single-copy als auch für die Überexpression.

Nachdem die ATPase-Funktion eine dominantere Rolle zu spielen scheint, als die Termini, wurde noch eine vierte Mutante (AAA) erzeugt. Älteren Untersuchungen nach wurde das SAT-Motiv aufgrund von Experimenten mit eIF4A als RNA-Entwindungsmotiv charakterisiert (Pause und Sonenberg, 1992). Durch den Austausch von Ser226 und Thr228 zu Alanin in eIF4A wird die Fähigkeit des Proteins zur Entwindung von RNA komplett aufgehoben (Pause

und Sonenberg, 1992). Nach neuerer Literatur bildet der Bereich um das SAT-Motiv eine Art Scharnier zwischen den Domänen 1 und 2, das es erlaubt, dass sich diese beiden Domänen relativ zueinander bewegen können (de la Cruz *et al.*, 1999). Die eigentliche Funktion dieses Motivs ist allerdings bislang noch nicht verstanden (Caruthers und McKay, 2002). Um den Einfluss einer Mutation in diesem Bereich auf die Funktionalität des Dhh1 Proteins zu untersuchen wurden mit den AAA-Mutanten Tropftiterests auf Bleomycin und MMS Platten durchgeführt.



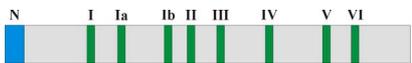
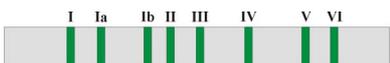
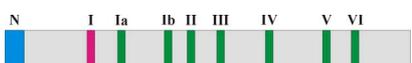
**Abb. 4-22** Komplementation der Sensitivitäten von *dhh1Δ*-Stämmen mit der AAA-Mutante. **A:** Komplementation mit dem Wildtyp-Gen, sc: single-copy, ÜE: Überexpression, **B:** Expression der DHH1 AAA Mutante unter DHH1 eigenem Promotor.

Die AAA-Mutante hat den selben Einfluss auf die Sensitivität der *dhh1Δ*-Stämme gegenüber Bleomycin wie die C244-Mutante. Die Zellen wachsen ungefähr zwei Verdünnungsstufen besser, als der mit dem Leerplasmid transformierte *dhh1Δ*-Stamm. Bei der Sensitivität gegenüber MMS wird der *dhh1Δ*-Phänotyp wieder komplementiert. Nachdem die Mutation des ATPase Motiv A bei der Sensitivität gegenüber Bleomycin die Deletionen der Termini dominiert und die AAA-Mutante einen Effekt ähnlich der Deletion des C-Terminus zeigt, kann man annehmen, dass für die Funktionalität des Dhh1 Proteins bei Effekten, die durch Bleomycin hervorgerufen werden die ATPase Funktion den wichtigsten Faktor darstellt.

#### 4.6.1 Sporulationsfähigkeit verschiedener Dhh1p-Mutanten

Der Literatur nach zeigen homozygote diploide *dhh1Δ*-Stämme einen Sporulationsdefekt (Moriya und Isono, 1999). Daher wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Sensitivitätstests untersucht, inwieweit die verschiedenen Dhh1-Mutanten die Sporulationsfähigkeit

diploider homozygoter *dhh1Δ*-Stämme wieder herstellen können. Es wurden die in Abb. 4-18 gezeigten Konstrukte in *dhh1Δ/dhh1Δ*-Stämmen sowohl single-copy als auch überexprimiert. Die so transformierten Stämme wurden auf Sporulations-Medium ausgebracht und nach vier Tagen unter dem Lichtmikroskop die Sporulation qualitativ überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 4-23 dargestellt.

| Mutation      | Konstrukt   | single-copy | multi-copy |
|---------------|---|-------------|------------|
| wt            |    | +           | +          |
| N60           |    | +           | +          |
| C244          |    | +           | +          |
| N60 C244      |    | +           | +          |
| K96R          |  | -           | -          |
| N60 K96R      |  | -           | -          |
| K96R C244     |  | -           | -          |
| N60 K96R C244 |  | -           | -          |
| K96N          |  | -           | -          |
| AAA           |  | +           | +          |

**Abb. 4-23** Analyse der Auswirkung einer Mutation im Dhh1 Protein auf die Fähigkeit zur Sporulation diploider homozygoter *dhh1Δ*-Stämme.

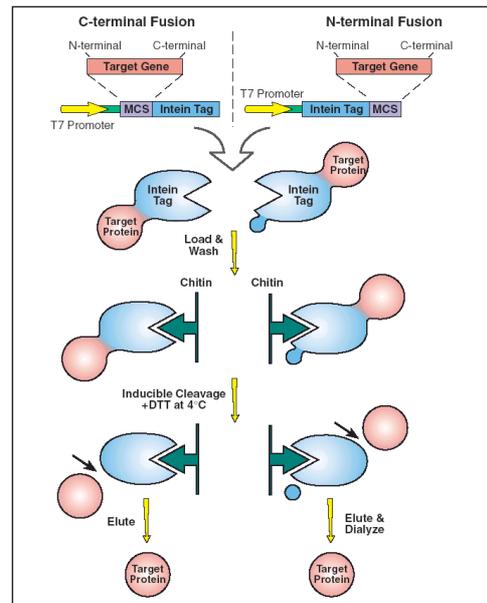
Die Effekte der verschiedenen Mutationen des Dhh1 Proteins im Bezug auf die Sporulationsfähigkeit diploider homozygoter *dhh1Δ*-Stämme korreliert mit den Effekten dieser Konstrukte im Bezug auf die Funktionalität des Proteins bei der Komplementation der Sensitivität gegenüber Bleomycin. So zeigen die terminalen Trunkierungen (N60, C244 und N60/C244) keinen

Einfluss auf die Sporulationsfähigkeit. Sobald allerdings das ATPase A-Motiv mutiert wird, ist das Konstrukt nicht mehr in der Lage die Sporulationsdefizienz der *dhh1* $\Delta$ -Stämme zu komplementieren. Die AAA-Mutante verhält sich bei diesem Versuch analog der C244 Mutante und ermöglicht die Sporulation. Man muss allerdings berücksichtigen, dass es sich bei diesen Untersuchungen um einen rein qualitativen Versuch gehandelt hat und somit partielle Effekte eventuell nicht beobachtet werden konnten.

## 4.7 In vitro Analysen des Dhh1 Proteins

### 4.7.1 Aufreinigung des Dhh1 Proteins

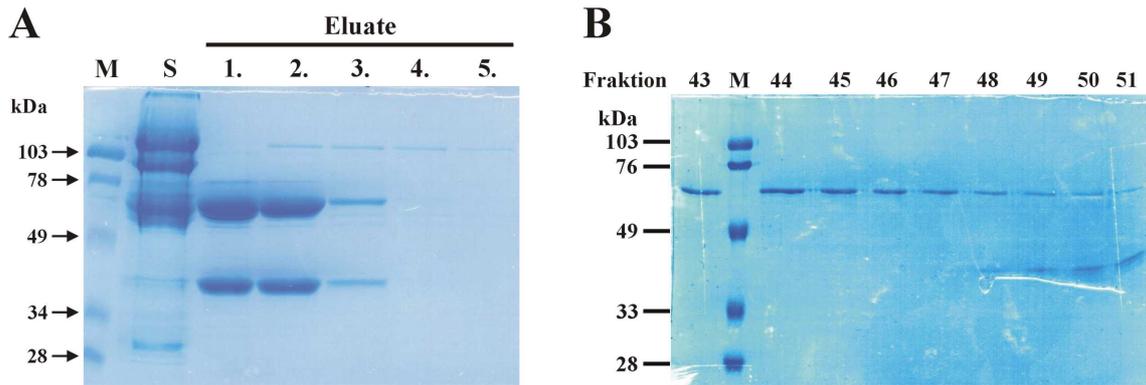
Das Dhh1 Protein wurde mit dem IMPACT-System der Firma NEB aufgereinigt (siehe 3.13.1) Wie in Abb. 4-24 gezeigt, wurde der Intein-Tag C-terminal an das Dhh1 Protein durch Klonierung des *DHHL* ORF in den Vektor pCYB2 fusioniert. Der pCYB2 Vektor ist ein *E.coli* Plasmid, das eine IPTG induzierbaren Promotor enthält. Durch die Transformation des Fusionskonstruktes in *E.coli* und anschließende Induktion der Expression durch IPTG können relativ hohe Mengen an Fusionsprotein exprimiert werden. Aus dem durch Lyse der Zellen gewonnenen Rohextrakt kann man das Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie mit Chitin-Sepharose in einem Reinigungsschritt gewinnen. Die an den Intein-Tag fusionierte Chitin-Bindedomäne (CBD) bindet spezifisch an die Chitin-Sepharose. Durch Waschen wird das Fusionsprotein von Verunreinigungen gereinigt. Intein zeichnet sich dadurch aus, dass es bei der Behandlung mit reduzierenden Substanzen eine Intein-vermittelte proteolytische Spaltung durchführt. Dabei werden spezifische Aminosäuresequenzen vom Intein erkannt und innerhalb dieser gespalten. Eine solche Erkennungssequenz ist in der MCS des pCYB2 Vektors bereits vorgegeben, so dass das Zielprotein durch Inkubation mit 50 mM DTT bei 4°C über Nacht vom Intein-Tag abgespalten werden konnte. Das Zielprotein kann dann eluiert werden, während das Intein über die CBD auf der Sepharose verweilt.



**Abb. 4-24** Schematische Darstellung der Aufreinigung mit dem IMPACT-System. In dieser Arbeit wurde nur die C-terminale Fusion verwendet. (Quelle: www.neb.com)

Um möglichst viel Protein von der Chitin-Sepharose zu eluieren, wurde die Sepharose drei bis fünf Mal mit 1 Vol. Cleavage-Puffer eluiert (Abb. 4-25A).

Bei dieser Art der Aufreinigung war immer eine zweite, kleinere Protein-Bande im SDS-Gel zu beobachten, bei der es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein spezifisches Abbauprodukt des Dhh1 Proteins handelt (Abb. 4-25A). Dies wurde angenommen, da beim Auftrag der Chitin-Sepharose vor der Elution zwei distinkte Banden beobachtet werden konnten, die nach Abspaltung des Intein-Tags wahrscheinlich in die Banden, die bei den Eluatzen beobachtet wurden aufspalten. Die ersten *in vitro* Analysen wurden mit den unbehandelten Fraktionen der IMPACT-Reinigung durchgeführt. Aufgrund der unten aufgeführten Effekte im Helikase Assay wurden später die Fraktionen aus der IMPACT-Reinigung von Dhh1p vereint und über eine Gelfiltration (siehe 3.13.1.1) weiter aufgereinigt. Auf diese Weise konnte Dhh1p von dem kleineren Protein abgetrennt werden (Abb. 4-25B).

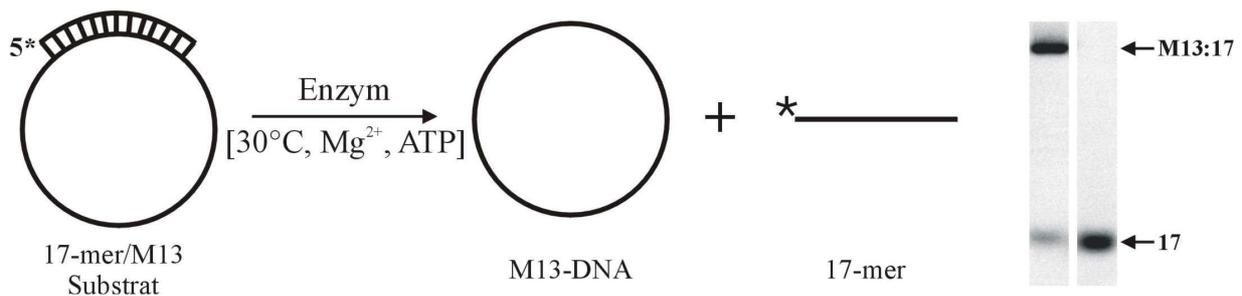


**Abb. 4-25** A: 12 %iges Polyacrylamidgel zur Analyse der Aufreinigung von rekombinantem Dhh1p mit dem IMPACT-System aus einer mit 0,5 mM IPTG induzierten *E.coli* TOP10F<sup>-</sup>-Kultur. Es wurden 20 µl der Fraktionen von der Chitin-Sepharose aufgetragen. M: Größenmarker, die Größen sind links angegeben, S: Auftrag der Chitin-Sepharose vor der Elution. B: 12 %iges Polyacrylamidgel der Gelfiltration der vereinten Fraktionen von Dhh1p aus A. Es wurden jeweils 20 µl der angegebenen Fraktion aufgetragen. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

#### 4.7.2 Helikase-Aktivität des Dhh1 Proteins

Aufgrund der Klassifizierung von Dhh1p als ATP abhängige RNA-Helikase wurde getestet, ob das mit Hilfe des IMPACT-Systems aufgereinigte Protein in der Lage ist, Nukleinsäuren *in vitro* zu entwinden. Dabei wurde zuerst auf eine weitere Reinigung des aus der Intein-Spaltung erhaltenen Dhh1 Proteins verzichtet.

In einem ersten Ansatz wurde getestet, ob das Dhh1 Protein in der Lage ist, einen DNA Duplex zu entwinden. Um dies zu testen, wurde ein DNA Helikase Assay durchgeführt. Das Substrat für diesen Versuch besteht aus einem DNA Duplex, der durch Hybridisierung eines am 5'-Ende mit <sup>32</sup>P markierten 17-mer Oligonukleotids (Hel1) an M13-DNA (ssDNA) hergestellt wurde (siehe 3.14.1). Wenn das Protein in der Lage ist, diesen Duplex zu entwinden, kann man dies durch PAA-Gelelektrophorese und anschließende Autoradiographie sichtbar machen, da das einzelsträngige Oligonukleotid niedriger läuft, als der DNA Duplex (Abb. 4-26).



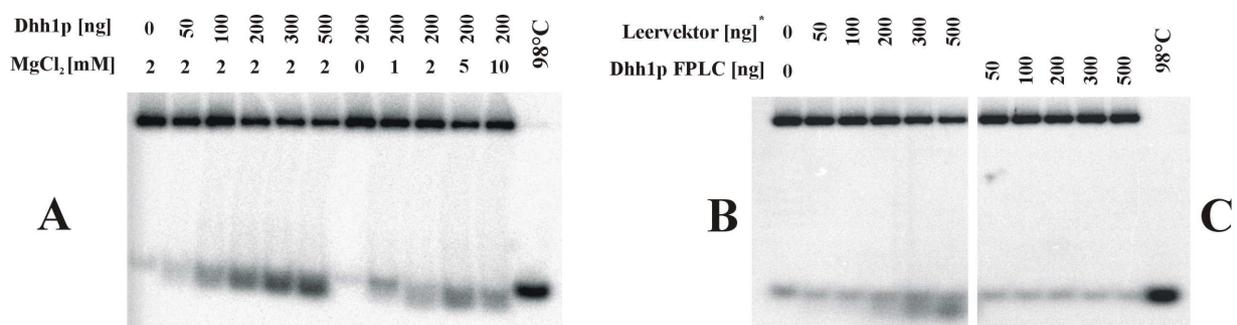
**Abb. 4-26** Schematische Darstellung der Substratentwindung beim DNA Helikase Assay. Durch die Zugabe der Helikase wird das am 5'-Ende mit  $^{32}\text{P}$  markierte 17-mer von der M13-ssDNA entwunden. Dies kann durch PAA-Gelelektrophorese und anschließende Autoradiographie (rechts) sichtbar gemacht werden.

Das so hergestellte DNA Substrat wurde mit dem Dhh1 Protein inkubiert. Dabei wurden Versuchsbedingungen gewählt, die aus verschiedenen Laborprotokollen abgeleitet wurden. Die Reaktion erfolgte bei einem physiologischen pH-Wert von 7,5. Es wurde darauf geachtet, dass eine niedrige Salzkonzentration vorhanden war, da sich eine hohe Salzkonzentration negativ auf die Helikase Aktivität eines Proteins auswirken kann. Bei der Elution von der Chitin-Sepharose wurden hohe Salzkonzentrationen (500 mM NaCl) verwendet, deshalb wurde das Protein vor Einsatz im Helikase Assay dialysiert (25 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % Glycerin). Um die optimalen Versuchsbedingungen für das Dhh1 Protein zu finden, wurden die Magnesium-Ionen (Abb. 4-27A) und ATP-Konzentrationen (ohne Abbildung) variiert. Dabei konnte eine scheinbare Entwindungsaktivität von Dhh1p beobachtet werden. Nachdem aber diese Aktivität bei nahezu allen ATP-Konzentrationen und auch bei Verwendung verschiedener Nukleoside als Energiequelle auftrat, könnte es sich bei der beobachteten Entwindungsaktivität auch um eine Nukleaseaktivität handeln.

Um auszuschließen, dass die beobachtete Aktivität aufgrund von Verunreinigungen aufgetreten ist, wurde eine IMPACT-Reinigung mit dem Leervektor durchgeführt. Bei den so erhaltenen Fraktionen konnte im Coomassie-Gel kein Protein detektiert werden (Abb. 4-25A).

Wurde das DNA Substrat mit steigenden Volumina der Leervektor Reinigung inkubiert, konnte eine ähnliche Entwindungsaktivität beobachtet werden, wie beim IMPACT-gereinigten Dhh1 Protein (Abb. 4-27B).

Aufgrund dieser Daten wurde das IMPACT-gereinigte Dhh1 Protein weiter über eine Gelfiltration gereinigt. Danach zeigte es keine Aktivität mehr (Abb. 4-27C).



**Abb. 4-27** Helikase-Aktivität von Dhh1p auf dsDNA. A: Bestimmung der Protein- und Magnesiumchlorid Mengen. B: Helikase Assay mit dem Leervektor (\*: nachdem kein Protein nachweisbar war, wurden in den Versuch die gleichen Volumina eingesetzt, wie bei der das Protein enthaltenden Fraktion). C: Helikase Assay mit durch Gelfiltration gereinigtem Dhh1p.

---

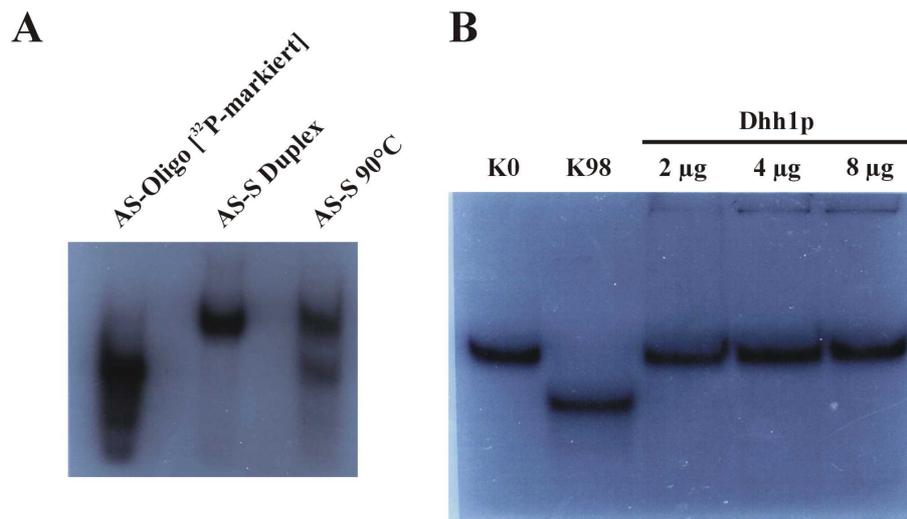
---

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die beobachtete Helikase-Aktivität des Dhh1 Proteins durch Verunreinigungen verursacht wurde. Diese Verunreinigungen scheinen durch das IMPACT-System an sich bedingt zu sein, da sie auch bei der Reinigung mit dem Leervektor auftraten. Da nicht auszuschließen war, dass diese Verunreinigung DNA spezifisch war und für Dhh1p eher eine RNA Helikase Aktivität angenommen werden muss, wurde der Versuch mit doppelsträngiger RNA wiederholt.

Es wurde eine siRNA (short interfering RNA) verwendet (mit freundlicher Unterstützung von B. Kellersch, AG Kolanus) (Sequenz im Anhang). siRNAs sind kurze RNA Duplices von 21-23 Nukleotiden Länge. RNA interference (RNAi) stellt ein antivirales System von Pflanzen und Tieren dar und basiert auf langen doppelsträngigen RNA Molekülen. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass „interference“ RNA in der Zelle in 21-23 Nukleotide große Stücke gespalten wird, die dann mit der mRNA interagieren und deren Spaltung bewirken. Diese Interaktion basiert auf Sequenzhomologien. Diese 21-23 Nukleotide großen Stücke werden dann als „short interfering“ RNAs bezeichnet. siRNA kann mittlerweile auch synthetisch hergestellt werden. Sie besteht aus einem sense (S) und einem anti-sense (AS) Strang, an denen sich jeweils am 3'-Ende Deoxynukleotide befinden.

Für die Herstellung des Substrats für den RNA Helikase Assay wurde der anti-sense (AS, 21 nt) Strang mit  $^{32}\text{P}$  markiert und anschließend an den sense (S, 21 nt) Strang hybridisiert. Zuerst wurde kontrolliert, ob die Hybridisierung vollständig war (Abb. 4-28A). Die so erzeugte siRNA wurde dann in den Helikase Assay eingesetzt und mit steigenden Mengen an Protein inkubiert (Abb. 4-28B). Es ist zu erkennen, dass Dhh1p bei diesem Substrat keine Helikase-Aktivität zeigt.

Wahrscheinlich stellt siRNA kein geeignetes Substrat für eine RNA-Helikase dar. Dies kann daran liegen, dass siRNA eine Struktur besitzt, die keinen Einzelstrang-Überhang aufweist. Vielleicht benötigt eine RNA-Helikase einen gewissen einzelsträngigen Bereich, um an die RNA zu binden. Hinzu kommt, dass die Enden des Substrats je zwei Deoxynukleotide (dTTP) aufweisen. Möglicherweise ist das Substrat deshalb nicht zugänglich für eine RNA-Helikase.



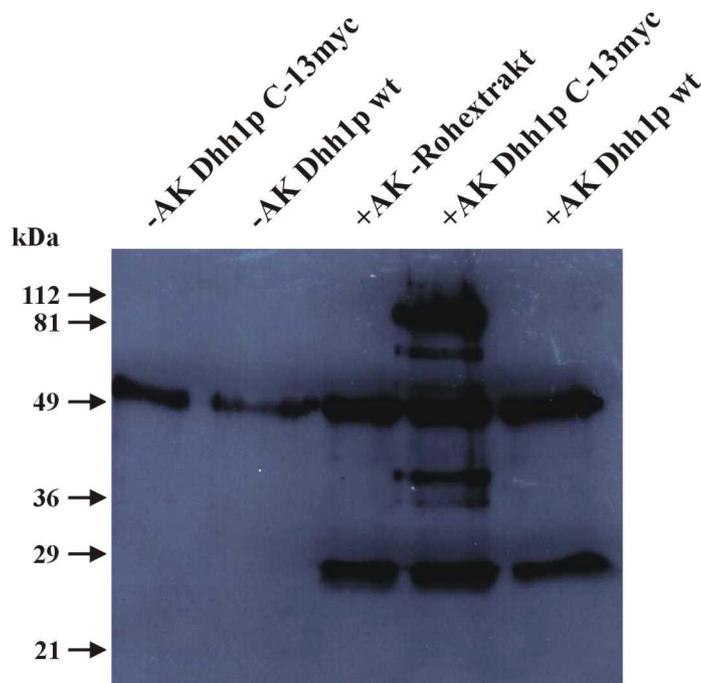
**Abb. 4-28** Analyse der RNA-Helikase Aktivität von Dhh1p. **A:** Untersuchung des siRNA Substrats auf Vollständigkeit der Hybridisierung. (AS: <sup>32</sup>P-markiertes anti-sense Oligonukleotid alleine (500 fmol), AS-S: Mit dem sense Oligonukleotid hybridisiertes AS Oligonukleotid (2 pmol), AS-S 90°C: AS-S Duplex vor dem Auftrag 5 min bei 90° denaturiert (2 pmol)) **B:** RNA-Helikase Assay mit steigenden Mengen an Dhh1p aus der IMPACT-Reinigung. K0: Kontrolle ohne Protein, K98: Hitze denaturierte siRNA. Es wurden jeweils 2 pmol Substrat eingesetzt.

### 4.7.3 ATP-Hydrolyse

Wie unter 4.1 beschrieben enthält das Dhh1 Protein die stark konservierten Motive GXXGXGKT/S (ATPase Motiv A) und DXXD (ATPase Motiv B). Daher wurde untersucht, ob Dhh1p *in vitro* in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren. Die Motive SAT und KRIGRXXR (RNA Bindung) könnten auf eine RNA Abhängigkeit der ATP Hydrolyse hinweisen. Allerdings wurde das Dhh1 Protein nur aufgrund seiner Sequenzhomologie als RNA-abhängig klassifiziert. Neben RNA als möglichem Cofaktor wurde zusätzlich getestet, ob Dhh1p ATP in Anwesenheit von doppelsträngiger DNA (dsDNA) und einzelsträngiger DNA (ssDNA) ATP hydrolysieren kann. Als Kontrolle diente der humane Swi/Snf-Komplex (auch als BAF-Komplex bekannt) von dem bekannt war, dass er ATP hydrolysiert (mit freundlicher Unterstützung von G. Mittler, AG Meisterernst). Als negativ Kontrolle wurde jeweils die K96R Mutante eingesetzt, bei der die ATP-Hydrolyse durch den Austausch von Lys96 durch Arginin inhibiert sein sollte. In einem ersten Ansatz wurden 200 ng mit dem IMPACT-System aufgereinigtes Dhh1p mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 2 Std. bei 30°C inkubiert und anschließend 2 µl dieses Ansatzes auf einer PEI-Cellulose DC Platte analysiert. Dabei konnte keine ATPase Aktivität nach-

gewiesen werden (Abb. 4-30A). Die Positiv Kontrolle (K+) zeigte unter den gewählten Versuchsbedingungen Aktivität.

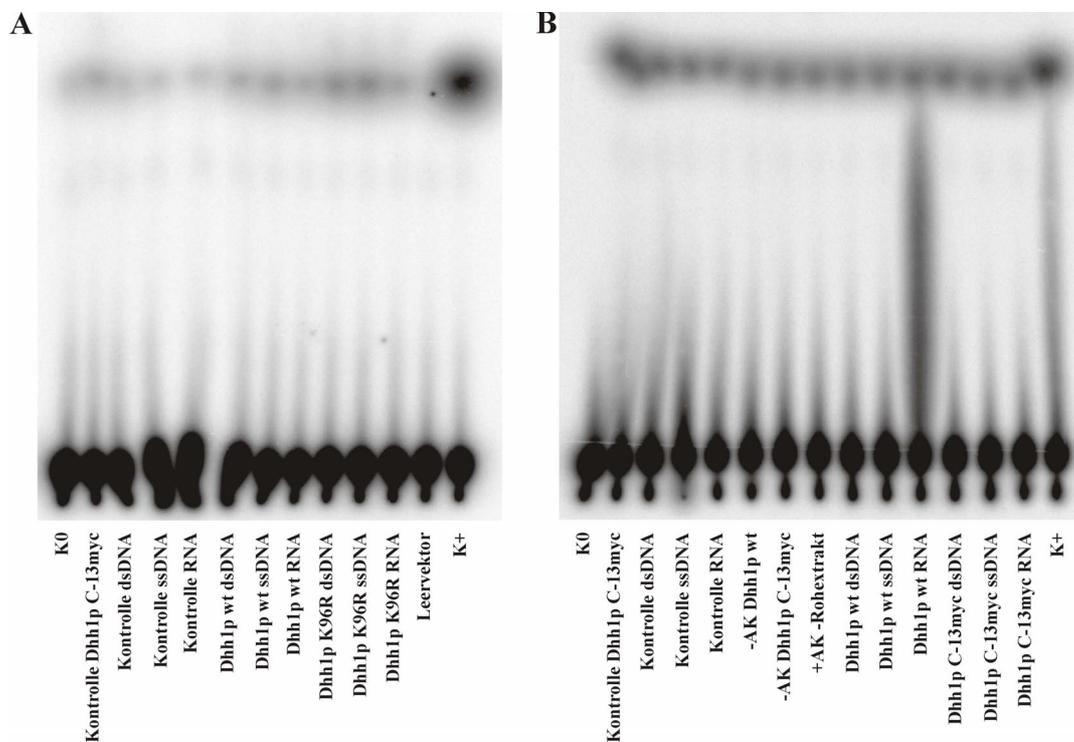
Laut verschiedener Publikationen (Fischer und Weis, 2002; Maillet und Collart, 2002; Coller *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 1998) interagiert das Dhh1 Protein mit unterschiedlichen Proteinen. Es ist möglich, dass diese Interaktion(en) für die enzymatische Aktivität von Dhh1p notwendig sind. Daher wurde das Dhh1 Protein durch Immunopräzipitation aus Heferohextrakten aufgereinigt, um zu versuchen, einen aktiven Dhh1p-Komplex zu erhalten. Für die Immunopräzipitation wurde an das Dhh1 Protein C-terminal chromosomal ein 13-myc Tag fusioniert. Aus einer Übernachtskultur wurden Proteinrohextrakte angefertigt. Aus diesen Rohextrakten wurde das Dhh1 13-myc Protein mit Hilfe von an Sepharose-Beads gekoppelten anti-myc Antikörpern immunopräzipitiert (Abb. 4-29).



**Abb. 4-29** Western-Blot der Immunopräzipitation von 13-myc getagtem Dhh1p. Es wurden jeweils 20 µl der Sepharose-Beads auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen, das Gel geblottet und die Membran mit einem anti-myc Antikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits von NEB. -AK Dhh1p C-13myc: 13-myc getagter Dhh1p Rohextrakt mit Sepharose-Beads ohne Antikörper inkubiert, -AK Dhh1p wt: Wildtyp Rohextrakt mit Sepharose-Beads ohne Antikörper inkubiert, +AK -Rohextrakt: Mit Antikörper beladene Sepharose-Beads alleine.

Parallel wurde als Kontrolle der Rohextrakt von ungetagtem Protein verwendet. Von dem Immunopräzipitat wurden 10 µl der Sepharose-Beads in den ATPase Assay eingesetzt und 2

Stunden bei 30°C inkubiert (siehe 3.15). Davon wurden 2 µl auf einer PEI-Cellulose DC Platte analysiert (Abb. 4-30). Als Laufmittel diente 0,5 M LiCl/1 M Ameisensäure.



**Abb. 4-30** ATPase-Assays: A: FPLC gereinigte Proteine, K0: Kontrolle ohne Protein, Kontrolle Dhh1p C-13myc: Kontrolle mit Protein ohne Nukleinsäure, KdsDNA, KssDNA, KRNA: Kontrollen ohne Protein nur mit den entsprechenden Nukleinsäuren, K+: Kontrolle mit dem Transkriptionsfaktor. B: Durch Immunopräzipitation aufgereinigte Proteine, die Kontrollen sind identisch zu A, -AK Dhh1p wt: Wildtyp Rohextrakt mit Sepharose-Beads ohne Antikörper inkubiert, -AK Dhh1p C-13myc: 13-myc getagter Dhh1p Rohextrakt mit Sepharose-Beads ohne Antikörper inkubiert. Es wurden jeweils 2 µl des Reaktionsansatzes auf die DC Platte aufgetropft. In keinem der beiden Versuche konnte eine ATPase Aktivität des Dhh1 Proteins festgestellt werden.

Sowohl bei dem FPLC, als auch bei dem durch Immunopräzipitation gereinigten Protein konnte keine ATPase Aktivität beobachtet werden. Die *in vivo* Untersuchungen mit der K96R bzw. K96N Mutation weisen aber mit Sicherheit auf eine ATPase Aktivität von Dhh1p hin. Wahrscheinlich konnten jedoch in diesem Versuch die Reaktionsbedingungen für eine ATPase Aktivität von Dhh1p nicht hinreichend hergestellt werden (siehe Diskussion). Es könnte gut möglich sein, dass das Dhh1 Protein einen bestimmten Co-Faktor benötigt, der nicht mit gereinigt werden konnte, um funktionell zu sein. Die Frage, ob es sich bei Dhh1p wirklich um eine RNA Helikase handelt kann durch diese Ergebnisse nicht zufriedenstellend geklärt werden.



## 5 DISKUSSION

Die DNA Reparatur stellt einen wichtigen Vorgang in lebenden Zellen dar. Da die DNA der Träger der Erbsubstanz ist, können Schäden in diesem Molekül nicht nur direkte Auswirkungen auf die Zelle, sondern auch auf jede nachfolgende Generationen haben. Dies ist zwar ein Prinzip der Evolution, doch kann es auch zur Entstehung von Erbkrankheiten oder zu Krebs führen.

Nachdem wir auch durch die steigende Umweltverschmutzung in zunehmendem Maße Erbgut schädigenden Substanzen ausgesetzt sind (z.B. erhöhte UV-Strahlung durch Verringerung der schützenden Ozon Schicht, erhöhten Schadstoffausstoß durch Verkehr und Industrie, Rauchen, etc.), steigen die Risiken, die zelleigenen Reparaturmechanismen zu überfordern und z.B. an Krebs zu erkranken. Neben äußeren Einflüssen können auch vom Körper selbst produzierte Stoffe, wie z.B. freie Radikale zu DNA Schäden führen. Daher haben alle Organismen komplexe und effektive Mechanismen entwickelt, die sicherstellen, dass die DNA möglichst fehlerfrei an die nächste Generation weitergegeben wird.

Für die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB), einer der schwerwiegendsten Formen der DNA Schädigung, stehen eukaryontischen Zellen mindestens zwei Mechanismen zur Verfügung, die homologe Rekombination und das Nicht-Homologe End-Joining (non-homologous end-joining, NHEJ). Beide Mechanismen sind von der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bis hin zum Menschen hoch konserviert.

Das Dhh1 Protein wurde in unserem Labor in einem Screen identifiziert, der nach komplementierenden Faktoren für die Temperatursensitivität von *yku*-Stämmen suchte. Das Ergebnis dieses Screens war sehr spezifisch; es wurden nur zwei Faktoren identifiziert, *EST2* und *DHHL1*. Die Isolation des *EST2* Gens in diesem Screen war nicht unerwartet, da die Temperatursensitivität von *yku*-Stämmen eine Folge der starken Verkürzung ihrer Telomere darstellt und das Est2 Protein als katalytische Untereinheit der Telomerase einen naheliegenden Faktor darstellt, um diesen Effekt umzukehren.

Die Isolation von *DHHL1* war eher erstaunlich, da das Protein eine hohe Homologie zu der DEAD Box Familie der RNA Helikasen aufweist, einer Gruppe von Proteinen, denen weder

beim Erhalt der Telomere, noch in der DNA-Reparatur bisher eine Funktion zugewiesen werden konnte.

In späteren Experimenten zeigte sich, dass die Isolation von *DHH1* als komplementierender Faktor der Temperatursensitivität von *yku*-Mutanten ein Artefakt darstellte. Da die *dhh1Δ*-Mutanten aber eine extreme Sensitivität gegenüber den DNA schädigenden Chemikalien Bleomycin und Methyl-Methan-Sulfonat (MMS) zeigten, wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob Dhh1p tatsächlich direkt an der Reparatur von DNA Schäden beteiligt ist.

### 5.1 Dhh1p, ein Reparaturprotein?

In qualitativen Tropf-Titer Experimenten zeigten *dhh1Δ*-Stämme eine ungewöhnlich hohe Sensitivität gegenüber den DNA schädigenden Chemikalien Bleomycin und MMS. Bleomycin ist ein sogenanntes Radiomimetikum, das Doppelstrangbrüche in der DNA durch einen konzentrierten Angriff von freien Radikalen, meist an benachbarten Zuckerresten, bewirkt (Schwartz, 1989). MMS ist ein methylierendes Agens, das Addukte an der DNA bildet und zu Depurinierung dieser führt. Dies kann zur Bildung von DNA Einzelstrang und Doppelstrangbrüchen führen (Martin *et al.*, 1999; Schwartz, 1989). Die Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber Bleomycin und MMS ist in Tropf-Titer Tests um den Faktor 1000 höher, als die von *yku*-Stämmen, bei denen der NHEJ Reparaturmechanismus von DNA Doppelstrangbrüchen defekt ist (siehe Abb. 4-13). Die Sensitivität der *dhh1Δ*-Stämme konnte in quantitativen Experimenten bestätigt werden. Dabei zeigten *dhh1Δ*-Stämme eine um den Faktor 5000 höhere Sensitivität gegenüber Bleomycin, verglichen mit dem Wildtyp-Stamm (siehe Abb. 4-10). Verglichen mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe sind *dhh1Δ*-Stämme nahezu so sensitiv gegenüber Bleomycin wie ein isogener *rad52*-Stamm (Mages *et al.*, 1996). In *rad52*-Stämmen ist der Hauptmechanismus der DNA Reparatur in Hefen, die homologe Rekombination, ausgeschaltet (Mages *et al.*, 1996). Die extreme Hypersensitivität von *yku70/dhh1Δ* Doppelmutanten gegenüber Bleomycin (siehe Abb. 4-10) ist ebenfalls mit der von *yku70/rad52* Stämmen zu vergleichen (Mages *et al.*, 1996). Daher könnte die Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber dem Radiomimetikum Bleomycin ein Hinweis darauf sein, dass das Dhh1 Protein an der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Wenn das Dhh1 Protein wirklich an der DNA Doppelstrangbruch Reparatur beteiligt sein sollte, weist der synergisti-

sche Anstieg der Sensitivität bei der *yku70/dhh1Δ* Doppelmutante darauf hin, dass Dhh1p nicht am NHEJ Reparaturweg beteiligt ist. Würden beide Proteine am selben Reparaturweg beteiligt sein, sollte die Deletion beider keinen Effekt zeigen (Epistasie), da nur ein Reparaturweg ausgeschaltet ist. Synergistische Effekte ergeben sich nur dann, wenn in Doppelmutanten zwei unabhängige oder teilweise redundante Reparaturwege gleichzeitig ausgeschaltet werden. Dies würde aber bedeuten, dass das Dhh1 Protein am homologen Rekombinations Mechanismus der DNA Doppelstrangbruch Reparatur beteiligt ist. Diploide homozygote *dhh1Δ* Zellen sind sporulationsdefizient (siehe 4.6.1 und Moriya und Isono, 1999). Diese Sporulationsdefizienz könnte bei der Einschätzung der Ergebnisse als Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von Dhh1p an der homologen Rekombination gedeutet werden, da Hefen, die defizient in Rekombinations-Prozessen sind auch sporulationsdefizient sind. Es wäre allerdings erstaunlich, wenn ein Protein mit einem scheinbar so hohen Einfluss auf die DNA Doppelstrangbruch Reparatur nicht schon in früheren Screenings gefunden worden wäre.

Die extreme Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber DNA schädigenden Chemikalien lässt sich aber auch unabhängig von Reparatur-Effekten erklären. Durch Defekte im Aufbau der Zellmembran könnte eine deutlich höhere Aufnahme der Chemikalien stattfinden. Ein solcher sogenannter „uptake“ Phänotyp würde, bedingt durch die erhöhte Konzentration der die DNA schädigenden Chemikalien in der Zelle, eine erhöhte Sensitivität bzw. einen DNA Reparatur Defekt nur vortäuschen. In der Literatur zu Dhh1p gibt es einige Hinweise, die auf einen solchen Membrandefekt hinweisen. Demnach zeigen *dhh1Δ*-Stämme auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Chemikalien, die nicht DNA-schädigend sind, wie z.B. Staurosporin (Hata *et al.*, 1998), einem Inhibitor der Hefe PKC und SDS (Moriya und Isono, 1999).

*dhh1Δ*-Stämme zeigen nur schwache Sensitivität gegenüber UV-Strahlung. Dies deutet darauf hin, dass die Sensitivität gegenüber Bleomycin eher durch Defekte der Membran, als durch einen Ausfall eines DNA Reparaturmechanismus bedingt sein könnte. UV-Strahlung bedingt eine direkte Schädigung der DNA und sollte daher unabhängig von der Beschaffenheit der Zellmembran wirken. UV-Strahlung erzeugt, anders als Bleomycin und MMS, keine Doppelstrangbrüche in der DNA sondern führt primär zur Bildung von Pyrimidin-Dimeren. In manchen Fällen kann es zu einer Dimerisierung von Thyminen in zwei verschiedenen Strängen kommen, was unter Umständen zu DNA Doppelstrangbrüchen führen kann. Schäden durch UV-Strahlung werden vor allem durch den sogenannten „Nucleotide-Excision-Pathway“ repariert.

Bei der Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlung zeigen *dhh1* $\Delta$ -Stämme Wildtyp Verhalten. Dies zeigt eindeutig, dass *dhh1* $\Delta$  Zellen keinen signifikanten Defekt in der DNA Doppelstrangbruch Reparatur aufweisen.  $\gamma$ -Strahlung führt primär zu Doppelstrangbrüchen in der DNA. Durch die hohe Energie dieser Strahlung sollte ihr Effekt nahezu unabhängig von der Beschaffenheit der Zellmembran sein.

Einen weiteren Hinweis, dass Dhh1p nicht direkt an der Reparatur von DNA Schäden beteiligt ist, gab die gegen Ende dieser Arbeit gelungene intrazelluläre Lokalisation des Dhh1 Proteins. Demnach ist Dhh1p eindeutig im Zytoplasma lokalisiert (siehe Abb. 4-17), was durch die vor kurzem erschienene Publikation von Fischer und Weis (2002) bestätigt wird. Für Proteine, die an der DNA Reparatur direkt beteiligt sind ist es aber eine Notwendigkeit, dass sie kernlokalisiert vorliegen.

Obwohl die schwache Sensitivität von *dhh1* $\Delta$ -Stämmen gegenüber UV-Strahlung und das Wildtyp-Verhalten gegenüber  $\gamma$ -Strahlung einen deutlichen Hinweis darauf geben, dass die Bleomycinsensitivität auf einem „uptake“ Phänotyp beruht, wurde noch ein drittes, von der Membranbeschaffenheit unabhängiges, System zur Untersuchung möglicher Reparaturdefekte verwendet. Im sogenannten „End-joining Assay“ werden Plasmide, die mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurden, in die Hefe transformiert und die Fähigkeit der Zellen, dieses lineare Plasmid zu rezirkularisieren durch die Anzahl gewachsener Kolonien bestimmt. Durch die Verwendung geeigneter Plasmide kann man mit dieser Methode direkt die Funktionalität des sogenannten Non-homologous End-joining Reparaturwegs testen. Da die Rezirkularisierungseffizienz gegen die Transformations-Effizienz mit einem zirkulären Plasmid normiert wird, kommen mögliche „uptake“ Effekte bei der Auswertung nicht zum Tragen.

Interessanterweise zeigten *dhh1* $\Delta$  Mutanten in diesem „End-joining Assay“ eine deutlich Verringerung der Rezirkularisierungseffizienz auf 20 % des Wildtyp Niveaus. Durch die Lokalisation des Dhh1 Proteins im Zytoplasma kann diese Verringerung der End-joining Effizienz aber nicht direkter Natur sein, sondern muss auf Sekundäreffekten beruhen.

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Dhh1 Protein am mRNA „turnover“ beteiligt ist. Dabei scheint es eine wichtige Rolle bei der Abspaltung der 5' Cap-Struktur zu spielen. Die Deletion von Dhh1p führt zur Stabilisierung und Akkumulation von deadenylierter Reporter-RNA, die aber eine noch intakte 5' Cap-Struktur besitzt (Coller *et al.*, 2001; Fischer und Weis, 2002). Das Decapping stellt aber einen wichtigen Schritt für den endgültigen Abbau

der mRNA dar (Larimer und Stevens, 1990). Als mögliche Folge eines gestörten mRNA Abbaus in *dhh1Δ* Zellen könnte man ein Ungleichgewicht in der Expression verschiedenster, auch am NHEJ Reparaturweg beteiligter, Proteine annehmen. Die Untersuchung der Proteinkonzentration des Yku Heterodimers, eines der für den NHEJ Reparaturweg essentiellen Proteine, zeigte keine Veränderung im Vergleich von Wildtyp Zellen mit *dhh1Δ* Zellen (ohne Abbildung). Am End-joining sind aber eine Reihe weiterer Proteine beteiligt (wie z.B. Mre11p, Rad50p, Xrs2p, Lig4p und Lif1p; Schiestl *et al.*, 1993; Schiestl und Petes, 1991; Schiestl *et al.*, 1994; Tsukamoto *et al.*, 1997; Herrmann *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1997), deren Proteinkonzentrationen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten. Daher ist zur Zeit nicht auszuschließen, dass eine Verschiebung von Proteinkonzentrationen, bedingt durch einen gestörten mRNA Abbau, der Grund für die verringerte End-joining Effizienz in *dhh1Δ* Zellen ist. Dieser Effekt könnte sich auch auf Proteine auswirken, die die am End-joining beteiligten Proteine modifizieren und/oder aktivieren. In diesem Fall wäre der Einfluss einer Deletion des Dhh1 Proteins tertiärer Natur. Um diese Theorie zu verifizieren, müssen aber noch weitere Experimente, die diese Vorgänge näher untersuchen, durchgeführt werden.

## 5.2 Funktionelle Kartierung von Dhh1p

Dhh1p ist ein hoch konserviertes DEAD Box Protein. Diese Konservierung beschränkt sich nicht nur auf die acht charakteristischen RNA Helikase Motive. Die Homologie zwischen Dhh1p und seinen möglichen Orthologen aus *S. pombe* (Ste13p), *Drosophila melanogaster* (ME31B), *Xenopus laevis* (DDX6), *Mus musculus* (RCK/p54) und *Homo sapiens* (RCK/p54) liegt für den Kernbereich der Proteine bei ca. 83 %. Lediglich die N- und C-terminalen Bereiche der Proteine unterschieden sich deutlich (siehe 4.1).

Dies weist darauf hin, dass der hoch homologe Kernbereich eine konservierte Funktion ausübt. Die Funktion der nicht konservierten Termini könnte in der Vermittlung der Spezifität liegen. Möglicherweise werden durch die Termini spezifische Protein-Protein Interaktionen vermittelt, die es Dhh1p als vermeintliche RNA Helikase erlauben ihre Aufgabe in genau einem bestimmten Prozess auszuüben.

Um die Wichtigkeit von N- und C-Terminus für die Funktionalität des Dhh1 Proteins zu untersuchen wurden N- und C-terminale Deletionen hergestellt und in *dhh1Δ*-Stämmen exprimiert. Außerdem wurden Mutationen in der ATP Bindestelle (Motiv I) eingeführt und das SAT-

Motiv zwischen Domäne 1 und 2 (siehe 1.2) mutiert. Dadurch sollten Hinweise auf die Wichtigkeit der postulierten enzymatischen Aktivitäten von Dhh1p – ATP Bindung/Hydrolyse und RNA Entwindung – erhalten werden. Die Konstrukte wurden alle als single-copy Plasmide, von denen Dhh1p unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimiert wurde, transformiert. Außerdem wurden die meisten DHH1 Mutanten auch unter Kontrolle des starken, konstitutiven ADH1 Promotors kloniert, um eine Überexpression zu ermöglichen. Die extreme Sensitivität von *dhh1Δ*-Stämmen gegenüber Bleomycin und MMS wurde als sensibles Testsystem für die Untersuchung der verschiedenen Mutanten verwendet.

### 5.2.1 Deletionen des N- und C-Terminus

Die Deletion der nicht konservierten N-terminalen Aminosäuren 1-20 hat fast keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins. Wird ein *dhh1Δ*-Stamm mit der N-terminalen Deletion in einem single-copy Plasmid transformiert, wächst er auf Bleomycin fast bis auf Wildtyp Niveau. Die Deletion des C-Terminus führt dagegen zu einer deutlichen Sensitivität der Zellen gegenüber Bleomycin. Allerdings ist der Effekt nicht so stark ausgeprägt, wie bei den *dhh1Δ* Mutanten. Erstaunlicherweise zeigen weder die N- noch C-terminal verkürzten Mutanten einen Wachstumsdefekt auf MMS-haltigem Medium. Erst die gleichzeitige Deletion von N- und C-Terminus führt zu einem schwach ausgeprägten Wachstumsdefekt auf MMS. Bei Wachstum auf Bleomycin zeigt sich die N60/C244 Doppelverkürzung fast so sensitiv, wie der Deletionsstamm (siehe Abb. 4-19).

Bei Überexpression durch den ADH-Promotor können alle drei Deletionsmutanten den *dhh1Δ*-Phänotyp sowohl auf Bleomycin, als auch auf MMS bis auf Wildtyp-Niveau komplementieren. Dies unterstützt die Annahme, dass der N- und C-Terminus eventuell wichtige Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Der Literatur nach interagiert Dhh1p mit verschiedenen Proteinen der mRNA Degradations-Maschinerie. Dazu zählen sowohl Dcp1p, neben Dcp2p das einzige Protein, das für das Decapping benötigt wird (Coller *et al.*, 2001; Dunkley und Parker, 1999), Lsm1p und Pat1p, den Decapping Aktivatoren (Bouveret *et al.*, 2000; Tharun *et al.*, 2000), und Xrn1p, der hauptsächlichen 5'-3' RNA-Exonuklease der Hefe (Fischer und Weis, 2002; Hsu und Stevens, 1993; Larimer und Stevens, 1990). Außerdem wurde für Dhh1p eine Interaktion mit Pop2p, einem Protein des Deadenylierungskomplexes gezeigt (Hata *et al.*, 1998; Tucker *et*

*al.*, 2001). Möglicherweise wird durch die Deletion des N- oder C-Terminus die Interaktion mit einem oder mehreren dieser Proteine gestört.

Dass die Deletion des N-Terminus keinen Einfluss hat, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Interaktionen, die direkt über den N-Terminus vermittelt werden eher eine sekundäre Rolle spielen. Dhh1p co-immunopräzipitiert mit den Decapping Aktivatoren Pat1p und Lsm1p. Möglicherweise ist diese Interaktion über den N-Terminus vermittelt und nicht essentiell für die Funktion des Komplexes, da die Interaktion von Pat1p oder Lsm1p nur in *trans* mit Dcp1p und Dcp2p stattfindet (Coller *et al.*, 2001).

Die Deletion des C-Terminus wirkt sich entschieden schwerwiegender auf die Funktionalität von Dhh1p aus. Es wurde gezeigt, dass Dhh1p sowohl mit dem Deadenylierungs-, als auch dem Decapping-Komplex physikalisch interagiert (Coller *et al.*, 2001). Möglicherweise ist diese Interaktion über den C-Terminus vermittelt, weshalb eine Deletion des C-Terminus einen größeren Einfluss auf den mRNA „turnover“ hat. Dies könnte bedeuten, dass Dhh1p an der Vermittlung zwischen mehr als zwei Komplexen beteiligt sein könnte, denen jedoch eine unterschiedliche Wertigkeit zukommt. Bei der Deletion beider Termini ist diese Vermittlerrolle komplett aufgehoben und die Zellen wachsen ähnlich wie die Deletionsmutante. Die Interaktionen könnten dann durch die Überexpression des Proteins durch Titrationseffekte möglicherweise wieder hergestellt werden.

Aus der Struktur bekannter, zu Dhh1p homologer RNA Helikasen lässt sich eine weitere mögliche Erklärung für die Effekte der Deletionen ableiten. Der C-Terminus von Dhh1p könnte eventuell eine Domäne 3 bilden, wie man sie auch in NS3 findet (Yao *et al.*, 1997). Diese Domäne 3 könnte die Aktivität oder Prozessivität von Dhh1p steigern. Durch Überexpression könnte der durch die Deletion des C-Terminus verursachte Aktivitätsverlust durch die höhere Proteinkonzentration ausgeglichen werden.

Eine eindeutige Aussage, auf welche Weise die verschiedenen Deletionen die Funktionalität des Dhh1 Proteins beeinflussen, ist mit den vorliegenden Daten nicht möglich. Weitere Experimente, wie z.B. Co-Immunopräzipitationen mit potentiellen Interaktoren von Dhh1p könnten aber weitere Aufschlüsse liefern.

### 5.2.2 Mutationen der ATP-Bindestelle

Die Funktion von RNA Helikasen ist im allgemeinen abhängig von der Hydrolyse eines Nukleosid-triphosphates. Wie wichtig die Bindung bzw. Hydrolyse von ATP für die Funktio-

nalität von Dhh1p ist, sollte durch Mutationen in der ATP Bindestelle (Motiv I) untersucht werden. Es wurden zwei verschiedene Mutationen in die ATP-Bindestelle eingeführt: Zunächst wurde Lys96 in Asparagin (K96N) mutiert. Diese Mutation sollte zu einer Inhibition der ATP-Bindung führen (Pause und Sonenberg, 1992). Es ist allerdings nicht bekannt, ob die ATP Bindung an sich, oder die ATP Hydrolyse wichtig für die Funktionalität des Dhh1 Proteins ist. Möglicherweise führt die ATP Bindung alleine, unabhängig von der Hydrolyse schon zu konformellen Änderungen im Dhh1 Protein, die die Interaktion mit anderen Proteinen oder die Bindung an RNA und somit die Funktionalität von Dhh1p erst ermöglicht. Deshalb wurde außerdem eine Lys96 zu Arginin (K96R) Mutante hergestellt. Diese Mutation sollte lediglich die ATP-Hydrolyse, aber nicht die Bindung von ATP verhindern (Sung *et al.*, 1988) und daher zwar eine mögliche enzymatische Aktivität inhibieren, aber nicht zu einschneidenden Konformationsänderungen führen.

Bei endogener Expression (single-copy Plasmid, *DHH1* Promotor) der K96R bzw. K96N Mutante zeigen sich die Zellen auf Bleomycin nahezu so sensitiv wie *dhh1Δ* Zellen. Auf MMS-haltigen Platten zeigen beide Mutationen keinen Phänotyp. Die Überexpression der K96R Mutante führte nicht zu einer Verringerung der Sensitivität gegenüber Bleomycin.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die ATP Hydrolyse ein essentieller Schritt für die Funktion des DHH1 Proteins ist. Aus diesen Daten kann man aber nicht ableiten, ob es sich bei Dhh1p wirklich um eine RNA Helikase handelt, da die ATP Hydrolyse zwar notwendig für eine RNA Helikase ist, aber nicht hinreichend für ihre Charakterisierung. Dafür ist die Hydrolyse von ATP in zellulären Vorgängen zu ubiquitär.

### 5.2.3 Mutation des SAT-Motives

Älteren Untersuchungen nach wurde das SAT-Motiv als RNA Entwindemotiv charakterisiert (Pause und Sonenberg, 1992). Durch Experimente mit dem eIF4A Protein wurde gezeigt, dass Mutationen in diesem Motiv die Fähigkeit von eIF4Ap, RNA *in vitro* zu entwinden, aufheben. Pause und Sonenberg (1992) haben auch gezeigt, dass die ATP Hydrolyse durch Mutationen in Motiv III (SAT-Motiv) von der RNA Entwindung entkoppelt werden kann. Eine AAA-Mutation in eIF4A ist zwar nicht mehr in der Lage, RNA *in vitro* zu entwinden, doch ist ihre Fähigkeit ATP zu hydrolysieren um den Faktor zwei höher, als beim Wildtyp Protein. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen der DEXH Box Helikase Prp22p bestätigt (Schwer

und Meszaros, 2000). Neuere Literatur weist der Region um das SAT-Motiv eher eine strukturelle Funktion zu. Demnach scheint ihre Aufgabe darin zu liegen, eine Bewegung der Domänen 1 und 2 relativ zueinander zu ermöglichen (de la Cruz *et al.*, 1999). Möglicherweise dient die SAT-Region dazu, die Bindung und Hydrolyse eines NTPs mit konformellen Änderungen, die für die Helikase Aktivität nötig sind zu koppeln (Tanner und Linder, 2001). Die eigentliche Funktion dieser Region ist aber bislang noch nicht geklärt (Caruthers und McKay, 2002).

Daher könnte die Untersuchung des SAT-Motivs in Dhh1p eventuell einen Hinweis liefern, ob Dhh1p eine RNA Helikase Funktion ausübt. Es wurden Ser226 und Thr228 in Motiv III zu Alanin mutiert. Bei der Expression von einem single-copy Plasmid unter *DHH1* eigenem Promotor der AAA Mutante zeigen sich die Zellen auf Bleomycin so sensitiv wie die C244 Mutante. Auf MMS-haltigen Platten zeigt die Mutation keinen Phänotyp.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die SAT Region eher eine strukturelle Funktion ausübt, als eine enzymatische Funktion. Wenn die essentielle Funktion der SAT Region die enzymatische RNA Entwindung darstellt, dann sollte sich eine AAA-Mutante wie eine K96R bzw. K96N Mutante verhalten. Ein struktureller Effekt hätte keinen so schwerwiegenden Einfluss, da durch die Mutationen S226A und T228A die Funktion nur eingeschränkt sein könnte. Die Bewegung der Domänen 1 und 2 relativ zueinander wäre noch möglich. Daher könnten sie noch - wenn vermutlich auch eingeschränkt - ihre Funktion ausüben. Wahrscheinlich ist diese eingeschränkte Funktion der Grund für das schlechtere Wachstum der AAA Mutanten auf Bleomycin. Unter Umständen muss die chemische Energie durch Hydrolyse eines NTPs nutzbar gemacht werden. Die SAT Region könnte eine essentielle Rolle bei der Kopplung der NTP Hydrolyse mit der Helikase Aktivität spielen. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei Dhh1p wirklich um eine RNA Helikase handelt relativ hoch.

#### 5.2.4 Mutation der ATP-Bindestelle in N- und C-terminalen Deletionen

In die N- und C-terminalen Deletionsmutanten wurde zusätzlich die K96R Mutation eingeführt, um eine mögliche „Separation of Function“ zu untersuchen. Möglicherweise könnte durch die zusätzliche Deletion eines oder mehrerer Termini und die damit verbundene fehlende Interaktion mit möglichen anderen Proteinen, die ATP Hydrolyse von der Interaktion entkoppelt werden.

Die Sensitivität der K96R Mutante wird jedoch durch die zusätzliche Deletion des N- oder C-Terminus bzw. beider nicht verstärkt. Dies weist darauf hin, dass durch die Inhibition der ATP

Hydrolyse eine wichtige Funktion des Dhh1 Proteins vollständig ausgeschaltet ist. Allerdings zeigt keine der Einzel- bzw. Mehrfachmutanten die Stärke in der Sensitivität gegenüber Bleomycin, wie der Deletionsstamm. Möglicherweise hat das Dhh1 Protein neben einer enzymatischen Funktion, welche mit der Inhibition der ATP Hydrolyse ausgeschaltet wird, auch eine rein strukturelle Funktion. Eine solche strukturelle Funktion könnte z.B. in der Stabilisierung oder im Zusammenbau eines Proteinkomplexes liegen. Die geringe Sensitivität der Mutanten gegenüber MMS im Vergleich mit dem Deletionsstamm gibt Anlass zu der Annahme, dass der konservierte Kernbereich neben enzymatischen Funktionen weitere, nicht unwesentliche, strukturelle Funktionen ausüben könnte.

### 5.2.5 Sporulationsfähigkeit der verschiedenen Mutanten

Nachdem bekannt ist, dass homozygote diploide *dhh1*Δ-Stämme einen Sporulationsdefekt aufweisen (Moriya und Isono, 1999), wurde untersucht, inwieweit die verschiedenen Mutanten in der Lage sind, diesen zu komplementieren. Es zeigte sich, dass alle Mutanten, bei denen die ATP Hydrolyse durch die Mutation von Lys96 zu Arginin inhibiert wurde, nicht mehr in der Lage sind zu sporulieren.

Durch die Untersuchungen der DNA Reparatur Phänotypen von *dhh1*Δ-Stämmen konnte festgestellt werden, dass es sich sehr wahrscheinlich nicht um einen Reparatur-, sondern um einen auf Membran Defekten basierten „uptake“-Phänotyp handelt. Dies war durch die Bestrahlung von *dhh1*Δ-Stämmen mit  $\gamma$ -Strahlung (Abb. 4-12) deutlich zu erkennen. Bei der Sporulation von diploiden Hefezellen stellt die Bildung und der Aufbau der Sporenwände einen wichtigen Schritt dar.

Die reife Sporenwand besteht aus vier Membranschichten, von denen der Aufbau der beiden innersten sich nicht von der normalen vegetativen Zellwand unterscheidet (Briza *et al.*, 1988). Die äußerste Membranschicht besteht aus einer unlöslichen vernetzten Dityrosin-Schicht, die die Sporen resistent gegenüber degradierenden Enzymen und organischen Lösungsmitteln macht (Briza *et al.*, 1990; Briza *et al.*, 1994; Briza *et al.*, 1990). Die Bildung der Sporenwände vollzieht sich erst nach erfolgreicher Meiose. Währenddessen bleibt die Kernmembran intakt. Die haploiden Kerne werden dann in die Presporen-Membran verpackt, die als Gerüst für die eigentliche Sporenhülle dient. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass durch Membrandefekte in

*dhh1*Δ-Stämmen auch die Bildung oder Zusammensetzung dieser Membranen beeinflusst sein könnte.

Verschiedene Studien haben aber ergeben, dass zwischen 1000 und 1600 verschiedene Gene Änderungen in ihrem Expressionsmuster während der Sporulation durchlaufen, auch wenn nicht alle davon essentiell für die Sporulation sind (Burns *et al.*, 1994; Nag *et al.*, 1997; Ross-Macdonald *et al.*, 1999).

Wenn Dhh1p wie unter 5.4 beschrieben zu einem gestörten Abbau von mRNA führt und dadurch, als sekundärem Effekt, zu Veränderungen in der Expression von verschiedenen Proteinen, dann könnten die Effekte sich auf jedes dieser Proteine auswirken. Das würde bedeuten, dass neben dem geordneten Aufbau der Sporenwände auch das damit verbundene Signalling, Phosphorylierungen, Transportmechanismen, etc. betroffen sein könnten und sich die Sporulationsdefizienz nicht nur auf einen reinen Membrandefekt beschränken müsste.

Warum sich die verschiedenen Mutanten unterschiedlich in der Sensitivität gegenüber Bleomycin und MMS verhalten, kann hier noch nicht befriedigend erklärt werden. Möglicherweise werden von den einzelnen Mutanten unterschiedliche Membrandefekte komplementiert. Dabei könnte sich die Permeabilität der Zellmembran verändern und die Aufnahme von MMS beeinflusst werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist aber auszuschließen, dass die Sensitivitäten gegenüber Bleomycin und die Sporulationsdefizienz auf einem Defekt in der homologen Rekombination von *dhh1*Δ-Stämmen beruhen.

### **5.3 *in vitro* Analysen von Dhh1p**

Die Untersuchungen der verschiedenen *DHHL* Mutanten weist darauf hin, dass ATP Bindung und Hydrolyse wichtig für die Funktionalität des Dhh1 Proteins ist. Allerdings lässt sich aus diesen Daten nicht die Frage beantworten, ob Dhh1p in der Zelle wirklich eine Helikase Funktion ausübt.

Um eine mögliche ATPase bzw. Helikase Aktivität von Dhh1p zu untersuchen, wurde das IMPACT Expressions- und Reinigungssystem (NEB) in der Gruppe etabliert. Dieses System ermöglichte es, Dhh1p in größeren Mengen und ohne Fusionsanteil aus *E.coli* zu reinigen. In den *in vitro* Analysen mit *E.coli* exprimiertem Protein konnte allerdings keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Als mögliche Ursachen hierfür könnten vor allem fehlende

posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung und das Fehlen von möglichen Interaktionen mit anderen Proteinen in Frage kommen. Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass das in *E.coli* exprimierte Protein trotz seiner guten Expression und Löslichkeit nicht in seiner nativen, funktionellen Form aufgereinigt werden konnte.

Eine weitere Ursache für die fehlende *in vitro* Aktivität von Dhh1p könnte in den Versuchsbedingungen an sich liegen. Möglicherweise benötigt das Dhh1 Protein ein spezielles Kation (z.B.  $Mn^{2+}$  oder  $Co^{2+}$ ), ein spezifisches Substrat oder einen bestimmten Co-Faktor für seine ATPase bzw. mögliche RNA Helikase Funktion.

Der Literatur nach ist Dhh1p an verschiedenen Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt. Dies weist darauf hin, dass Dhh1p in der Zelle innerhalb eines größeren Protein Komplexes wirkt. Aus diesem Grund wurden die ATPase Experimente auch mit immunopräzipitiertem Dhh1 Protein aus Heferohextrakten durchgeführt. Hierbei konnte ebenfalls keine enzymatische Aktivität von Dhh1p festgestellt werden, obwohl die *in vivo* Experimente einen eindeutigen Hinweis auf die ATPase Aktivität gaben. Die Ursachen hierfür könnten ähnlich den oben genannten sein. Möglicherweise waren die Assay Bedingungen nicht optimal, um eine Aktivität des Dhh1 Proteins zu zeigen. Es kann aber auch sein, dass die Bedingungen für die Immunopräzipitation von Dhh1p nicht optimal für die Isolation eines funktionellen Komplexes gewesen sind.

### 5.4 Eine mögliche Funktion von Dhh1p

Es wurde gezeigt, dass Dhh1p physikalisch und genetisch mit Pop2p, einem Mitglied des Ccr4 Komplexes, interagiert (Hata *et al.*, 1998). Der Pop2-Ccr4 Komplex wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor identifiziert (Liu *et al.*, 1998). Mittlerweile wurde gezeigt, dass Pop2p und Ccr4p Teil des Deadenylierungskomplexes im Zytoplasma sind (Tucker *et al.*, 2001).

In Co-immunoprecipitationsanalysen wurde gezeigt, dass Dhh1p physikalisch mit dem am Decapping beteiligten Enzym Dcp1p interagiert (Coller *et al.*, 2001). In der Hefe sind nur zwei Proteine, Dcp1p und Dcp2p, am Decapping von mRNA beteiligt (Dunckley und Parker, 1999). Deren Funktion wird durch mehrere *trans*-agierende Faktoren beeinflusst. Diese Faktoren beinhalten Pat1p/Mrt1p, den Lsm-Komplex (bestehend aus Lsm1p-Lsm7p), Vps16p, Edc1p und Edc2p (Hatfield *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999). Es gibt neun Lsm Proteine in der Hefe, die zwei bestimmte, aus sieben Proteinen bestehende, Ringstrukturen ausbilden. Diese beiden

Strukturen haben verschiedene Funktionen. Die Lsm2-Lsm8 Proteine assoziieren im Zellkern und sind im U6 snRNA Metabolismus beteiligt. Lsm1p-Lsm7p assoziieren im Zytoplasma und beeinflussen das Decapping (Bouveret *et al.*, 2000; Mayes *et al.*, 1999).

Dhh1p ist in seiner Funktion bislang insofern einzigartig, da es sowohl mit dem Deadenylierungskomplex, als auch mit Komponenten des Decapping-Komplexes interagiert. (Coller *et al.*, 2001). Zusätzlich interagiert Dhh1p mit den *trans* agierenden, das Decapping aktivierenden Faktoren Pat1p und Lsm1p. Daher könnte man annehmen, dass Dhh1p eine Art Vermittlerrolle zwischen der Deadenylierung und dem Decapping hat. Das Decapping erfolgt erst nach abgeschlossener Deadenylierung. Die Deadenylierung ist aber in *dhh1Δ*-Stämmen nicht beeinträchtigt. Daher akkumuliert in *dhh1Δ*-Stämmen deadenylierte mRNA (Fischer und Weis, 2002). Möglicherweise bindet Dhh1p über Pop2p an den Deadenylierungskomplex und aktiviert nach erfolgreicher Deadenylierung das Decapping Enzym Dcp1p. Diese Aktivierung könnte von Dhh1p alleine, oder durch die Interaktion mit Pat1p und/oder Lsm1p vermittelt sein. Nachdem die Interaktion von Dhh1p mit den Proteinen des Deadenylierungs- und Decapping-Komplexes nicht durch RNA vermittelt wird (Coller *et al.*, 2001), kann man annehmen, dass Dhh1p eine Art Sensor-Funktion ausübt.

Aus den vorhandenen Daten lassen sich zwei Modelle ableiten: Im ersten wäre das Dhh1 Protein an den Deadenylierungskomplex über Pop2p gebunden. Wenn der Deadenylierungskomplex das Ende des Poly(A)-Tails erreicht hat, könnte es sein, dass eine Konformationsänderung stattfindet, die das Dhh1 Protein für andere Interaktionen zugänglich macht. Durch ein Ausloopen der RNA könnte dann die Interaktion mit Dcp1p stattfinden und das Decapping initiiert werden (Abb. 5-1A).

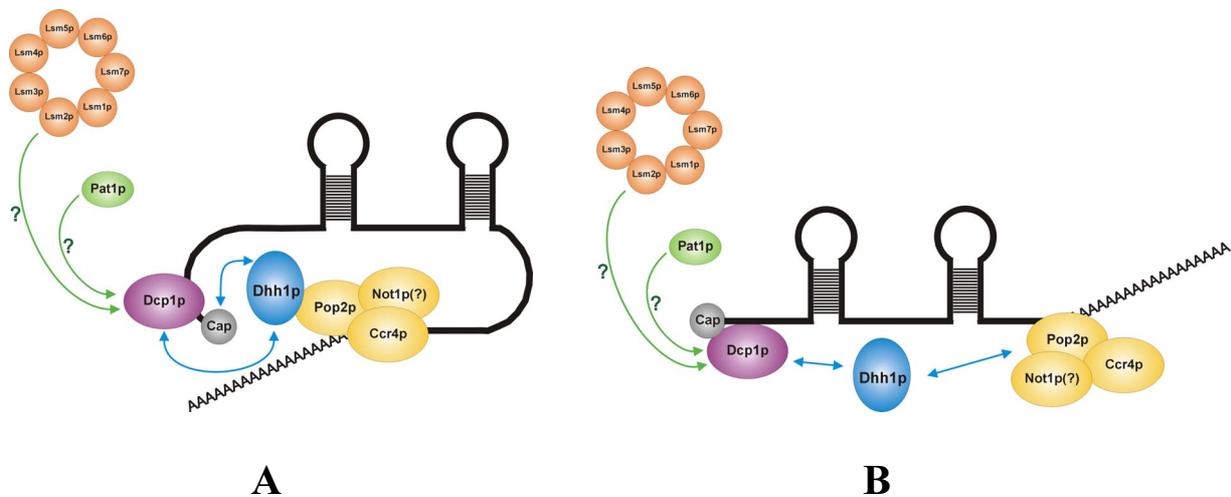
Beim zweiten Modell wäre Dhh1p ebenfalls über Pop2p an den Deadenylierungskomplex gebunden, nur dass Dhh1p bei Beendigung der Deadenylierung von Pop2p dissoziiert und dann unabhängig vom Deadenylierungskomplex mit Dcp1p interagiert (Abb. 5-1B).

Möglicherweise findet die entscheidende Interaktion mit Pop2p und/oder Dcp1p über den C-Terminus von Dhh1p statt, da bei der Deletion des C-Terminus ein deutlicherer Phänotyp zu beobachten war, als bei der Deletion des N-Terminus (siehe Abb. 4-19).

Die Mutation von Lys96 zu Arginin bzw. Asparagin zeigt einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die Funktionsweise von Dhh1p, als die Deletion des C-Terminus. Es ist unwahrscheinlich, dass durch die Mutation einer einzelnen Aminosäure die strukturellen Eigenschaften des Proteins so gravierend beeinflusst werden, wie es z.B. bei der Deletion eines größeren Bereiches

wie des C-Terminus zu erwarten ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass neben der strukturellen Funktion von Dhh1p auch die enzymatische Aktivität eine wesentliche Bedeutung hat. Die offensichtlich durch ATP Hydrolyse vermittelte enzymatische Aktivität von Dhh1p könnte dazu dienen, Sekundärstrukturen im Bereich der 5'-Cap-Struktur der RNA zu entwinden. Dadurch könnte der Angriff für Dcp1p und somit das Decapping initiiert werden.

Damit hätte Dhh1p beim Abbau von mRNA nicht nur eine strukturelle, sondern auch eine enzymatische Funktion.



**Abb. 5-1** Eine mögliche Funktion von Dhh1p. Dhh1p als Bestandteil des Deadenylierungskomplexes interagiert nach Beendigung der Deadenylierung mit dem Decapping Protein Dcp1p und aktiviert dadurch die Abspaltung der 5' Cap-Struktur. **A:** Durch räumliche Interaktion **B:** Durch einen Dissoziations-Assoziations-Mechanismus. Möglicherweise wird die Aktivierung durch die Interaktion mit den *trans* agierenden Aktivatoren Pat1p und Lsm1p-Lsm7p verstärkt (grüne Pfeile). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Mit der Deregulation des mRNA Abbaus ließe sich der eher unspezifische Phänotyp von *dhh1Δ* Mutanten erklären:

Da erst das Decapping den Abbau der mRNA initiiert, besteht die Möglichkeit, dass deadenylierte mRNA immer noch von den Ribosomen translatiert wird, insbesondere da die 5'-Cap Struktur, die für eine korrekte Bindung der ribosomalen Untereinheiten nötig ist, noch in Takt ist.

Dies würde aber zwangsläufig zu zwei Effekten führen. Der erstere wäre eine Überproduktion von Proteinen, deren Synthese vielleicht schon längst hätte eingestellt werden sollen und der zweite wäre eine Blockade der Ribosomen für andere, neu synthetisierte mRNAs. Auch könnte sich durch die verlängerte Halbwertszeit der mRNA das Gleichgewicht zugunsten von sonst

nur schwach transkribierten Genen verschieben. Dadurch würden ansonsten nur wenig in der Zelle exprimierte Proteine vermehrt gebildet. Dies könnten Faktoren sein, die den Proteinhaushalt der Zelle stören und dadurch einen „multi Phänotyp“ induzieren.

Die bislang publizierten Daten über Dhh1p weisen darauf hin, dass die Membrandefekte in *dhh1Δ*-Stämmen sich in einem „multi Phänotyp“ äußern. Die erhöhten Sensitivitäten gegenüber SDS, Staurosporin, Glycerin, sowie die veränderte Morphologie der Zellen (Hata *et al.*, 1998; Moriya und Isono, 1999), aber auch die in dieser Arbeit beobachteten erhöhten Sensitivitäten gegenüber Bleomycin und MMS sind ein deutlicher Hinweis dafür.

Die Defizite im End-joining oder die Temperatursensitivität lassen sich allerdings nicht mit Membrandefekten erklären. Obwohl offensichtlich durch die Deletion von *DHHI* der Aufbau der Zellwand bzw. der Zellmembran am stärksten betroffen ist, kann man nicht ausschließen, dass durch eine *DHHI* Deletion und die durch das fehlende Decapping von mRNAs resultierende gestörte Expression von Proteinen weitaus mehr Prozesse in der Zelle betroffen sein könnten, als nur die, die zu einem Defekt der Zellmembranen führen.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Dhh1 Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* ist aufgrund von acht hoch konservierten Aminosäure-Motiven als putative RNA Helikase klassifiziert. In *S. pombe* (Ste13p), *Drosophila melanogaster* (ME31B), *Xenopus laevis* (Xp54), *Mus musculus* (mmRCK) und *Homo sapiens* (hRCK/p54) findet man Proteine, die zu Dhh1p eine sehr hohe Konservierung von bis zu 83 % aufweisen. Lediglich der N- und C-Terminus dieser Proteingruppe ist nicht konserviert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Deletion von *DHHL1* in *Saccharomyces cerevisiae* auf verschiedene Aspekte der DNA Schädigung und Reparatur, sowie die Funktionalität verschiedener Domänen von Dhh1p durch Mutationsanalysen untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde das *DHHL1* Gen in verschiedenen Hefestämmen deletiert und die Auswirkungen von DNA schädigenden Substanzen auf diese Mutanten untersucht. Die Deletion von *DHHL1* führte zu einer starken Erhöhung der Sensitivität von Hefezellen sowohl gegenüber Bleomycin als auch gegenüber MMS. Allerdings zeigten *dhh1Δ*-Zellen nur eine schwache Sensitivität gegenüber UV-Strahlung und keine Sensitivität gegenüber  $\gamma$ -Strahlung. Dies weist sehr stark darauf hin, dass die beobachteten Sensitivitäten auf einem eventuell durch Membrandefekte verursachten, sogenannten „uptake“-Phänotyp beruhen. In „uptake“-unabhängigen Experimenten wurde die Funktionalität des Non-homologous End-joining Reparaturweges der Hefe untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass *dhh1Δ*-Stämme eine um den Faktor fünf reduzierte Effizienz in der Rezirkularisierung linearisierter Plasmide zeigen. Allerdings ist nur die Effizienz, nicht die Genauigkeit des End-joining in *dhh1Δ*-Stämmen betroffen – die rezirkularisierten Plasmide wurden zu 100 % genau repariert. Dies weist darauf hin, dass die Deletion sich auf mehr als nur einen einzelnen Aspekt zellulärer Vorgänge auswirkt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die extreme Sensitivität der *dhh1Δ*-Stämme gegenüber Bleomycin und MMS als Testsystem für die funktionelle Charakterisierung verschiedener Dhh1p Domänen verwendet. Dabei zeigte sich, dass eine Deletion des N-Terminus von Dhh1p kaum Einfluss auf die Funktionalität des Proteins hat. Die Deletion des C-Terminus führt zu einer deutlichen Sensitivität der Zellen gegenüber Bleomycin. Bei Deletion beider Termini wachsen

die Zellen auf Bleomycin nur noch geringfügig besser als der *dhh1Δ*-Stamm. Diese Effekte werden durch Überexpression der verkürzten Proteine aufgehoben. Keine der drei Verkürzungen hat Einfluss auf das Wachstum auf MMS-haltigen Platten.

Die Mutation der ATPase Domäne (Walker A Motiv) hebt die Funktion des Proteins fast vollständig auf. Diese Mutanten sind nahezu so sensitiv gegenüber Bleomycin, wie *dhh1Δ* Zellen. Die Überexpression der ATPase Mutante führt im Gegensatz zu den Verkürzungen zu keiner Verringerung der Sensitivität gegenüber Bleomycin. Die zusätzliche Entfernung der Termini in der ATPase Mutante führt nicht zu einer Erhöhung der Bleomycin-Sensitivität. Allerdings zeigt die Dreifachmutante deutlich schlechteres Wachstum auf MMS-haltigen Platten. Die Mutation des SAT-Motives in AAA führt ebenfalls zu einer deutlichen Bleomycin-Sensitivität. Der Phänotyp ist vergleichbar mit den Auswirkungen der Deletion des C-Terminus. Das ursprünglich als RNA Entwindemotiv charakterisierte SAT-Motiv wird mittlerweile eher als eine Art „Scharnier“ angesehen, das eine Bewegung der Domänen 1 und 2 im Dhh1 Protein relativ zueinander ermöglicht. Die Auswirkung der Mutation des SAT-Motivs in AAA im Vergleich zu den Verkürzungen und den ATPase Mutanten weist auf eine eher strukturelle Rolle des SAT-Motives in Dhh1p hin. Aus diesen Daten ließ sich ein vorläufiges Modell über die Funktionsweise des Dhh1 Proteins ableiten.

In *in vitro* Experimenten wurde mit dem IMPACT-System aufgereinigtes Dhh1 Protein auf seine Fähigkeit hin untersucht, DNA und RNA zu entwinden. Für die verwendeten Substrate konnte keine *in vitro* Helikase Aktivität festgestellt werden. Zur Analyse der ATPase Aktivität wurde IMPACT-gereinigtes Dhh1p und durch Immunopräzipitation aus Heferohextrakten gewonnenes Protein eingesetzt. In beiden Fällen konnte keine ATP Hydrolyse beobachtet werden, obwohl die Mutationsanalyse eindeutig darauf hinweist, dass die ATPase Aktivität essentiell für die Funktion des Dhh1 Proteins ist.

## 7 ANHANG

### 7.1 Accession Numbers:

| Genbank    | Accession Number |
|------------|------------------|
| GenBank    | CAA98734.1       |
| SWISS-PROT | P39517           |
| SGD        | S0002319         |
| MIPS(PIR)  | S31229           |

### 7.2 Verwendete Oligonukleotide

#### Oligonukleotide für die PCR-basierte Gendisruption:

DHH1-ΔHis-FOR1: 5'-TTA GCC CTT TTA TTT CTT CAT AAC CGC ATC GCC ATT  
CGC ATA CGC TGC AGG TCG ACG GAT C-3'

DHH1-ΔHis-FOR2: 5'-TTA TTC CTA ATA GAA AGA TAG ACG CAG AAA ATT CTT  
ACT TTT AGC CCT TTT ATT TCT TCA TAA CCG-3'

DHH1-ΔHis-REV1: 5'-CAC AAA AAA AGC GTA TCT CAC CAC AGT AGT TAT TTT  
TTC TTA GCC GCA TAG GCC ACT AGT GGA TC-3'

DHH1-ΔHis-REV2: 5'-TGG AGA TTT GAA AAA AGA TAA AAA TAA TCG ACG ATT  
AGA TCA CAA AAA AAG CGT ATC TCA CC-3'

#### Oligonukleotide für die Kontrolle der Gendisruption:

DHH1-ΔHis-Kontrolle-FOR: 5'-CAT TAT TGC CCA CAT CTG GGT GC-3'

pFA6a-Kan-Kontrolle-REV: 5'-TAT ATT TCT CTA CAG GGG CGC GG-3'

pFA6a-Trp-Kontrolle-REV: 5'-TCT GCA AGC CGC AAA CTT TCA CC-3'

#### Oligonukleotide für die Insertion eines C-terminalen 13-myc Tags:

DHH1-C-myc-FOR1: 5'-AGG AAC ATT TCA TGG CGA TGC CAC CTG GTC AGT CAC  
AAC CCC AGT ATC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'

DHH1-C-myc-FOR2: 5'-CCA CCG CAA ATG CCA TCG CAG CAG GGG TAT CCT CCA

CAG CAG GAA CAT TTC ATG GCG ATG CC-3'  
DHH1-C-myc-Kontrolle: 5'-GAG CTA TCA TCA ACA AGC GAT ACC-3'

**Oligonukleotide für die Mutation der ATP-Bindestelle:**

**K96R:**

DHH1-Lys-Arg-FOR: 5'-GCA AAG AAT GGT ACA GGT AGG ACA GCC GCA  
TTT GTT ATT CC-3'

DHH1-Lys-Arg-REV: 5'-GGA ATA ACA AAT GCG GCT GTC CTA CCT GTA CCA  
TTC TTT GC-3'

**K96N:**

DHH1-Lys-Asn-FOR: 5'-GCA AAG AAT GGT ACA GGT AAC ACA GCC GCA  
TTT GTT ATT CC-3'

DHH1-Lys-Asn-REV: 5'-GGA ATA ACA AAT GCG GCT GTG TTA CCT GTA CCA  
TTC TTT GC-3'

**Oligonukleotide für die Mutation des SAT-Motivs:**

DHH1-SAT-AAT-FOR: 5'-CAC CAA TCT TTA TTA TTT GCG GCT ACT TTC CCA  
CTA ACG G-3'

DHH1-SAT-AAT-REV: 5'-CCG TTA GTG GGA AAG TAG CCG CAA ATA ATA  
AAG ATT GGT G-3'

DHH1-AAT-AAA-FOR: 5'-CAC CAA TCT TTA TTA TTT GCG GCT GCC TTC CCA  
CTA ACG G-3'

DHH1-AAT-AAA-REV: 5'-CCG TTA GTG GGA AGG CAG CCG CAA ATA ATA  
AAG ATT GGT G-3'

**Oligonukleotide für die Amplifikation des DHH1-Promotors:**

DHH1/1: 5'-ACG TCT CGA GAG ATC TGC TGC GGC TGG CG-3'

DHH1/2: 5'-ACG CCG GGT TTC TTT CTT GTC GTA TTT TAG GCC TGG G-3'

**Oligonukleotide für die Amplifikation der Verkürzungen:**

DHH1-N60-FOR: 5'-ACG TCG AGC TCC ATA TGT GGA AAA CTG CAT TGA ATA  
TTC CC-3'

DHH1-C244-SmaI-REV: 5'-TCC CCC GGG TAC CGT TTC GTC ATT TTC AGC C-3'

DHH1-C244-PstI-REV: 5'-AAA ACT GCA GTT ATA CCG TTT CGT CAT TTT CAG  
CC-3'

DHH1/4-XbaI: 5'-CTA GTC TAG ACG AAA GTG TCG ATG AAA CTG GGC-3'

DHH1-C244-*SacI*: 5'-ACG TCG AGC TCT TAT ACC GTT TCG TCA TTT TCA GCC-3'

**Oligonukleotide für die Klonierung von DHH1 in den Vektor pCYB2:**

DHH1-*NdeI*-FOR: 5'-GGA ATT CCA TAT GGG TTC CAT CAA TAA TAA CTT CAA  
C-3'

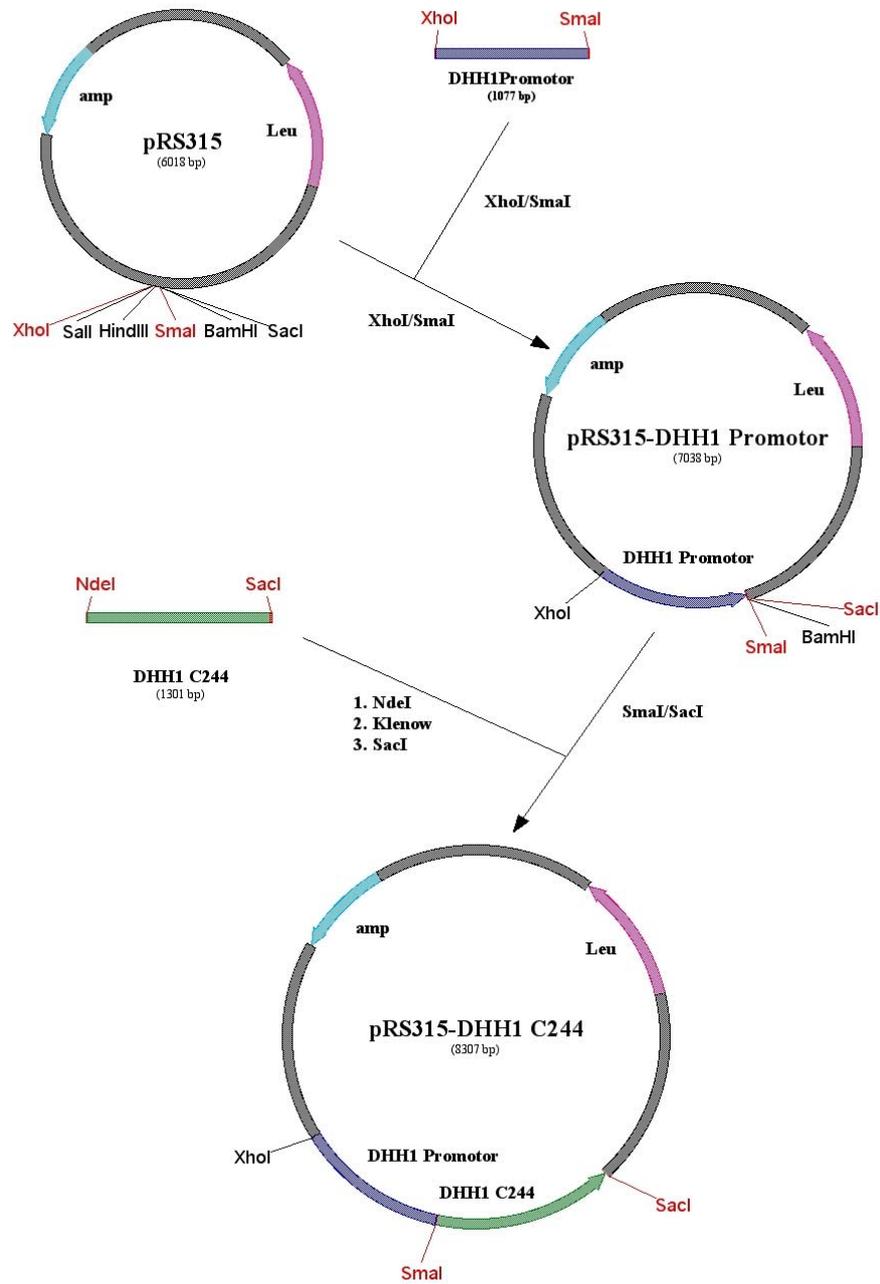
DHH1-*SmaI*-REV: 5'-TCC CCC GGG ATA CTG GGG TTG TGA CTG ACC-3'

**siRNA Oligonukleotide:**

AS: 5'-UGU CAG CCA GCA GCU CCU GdTdT

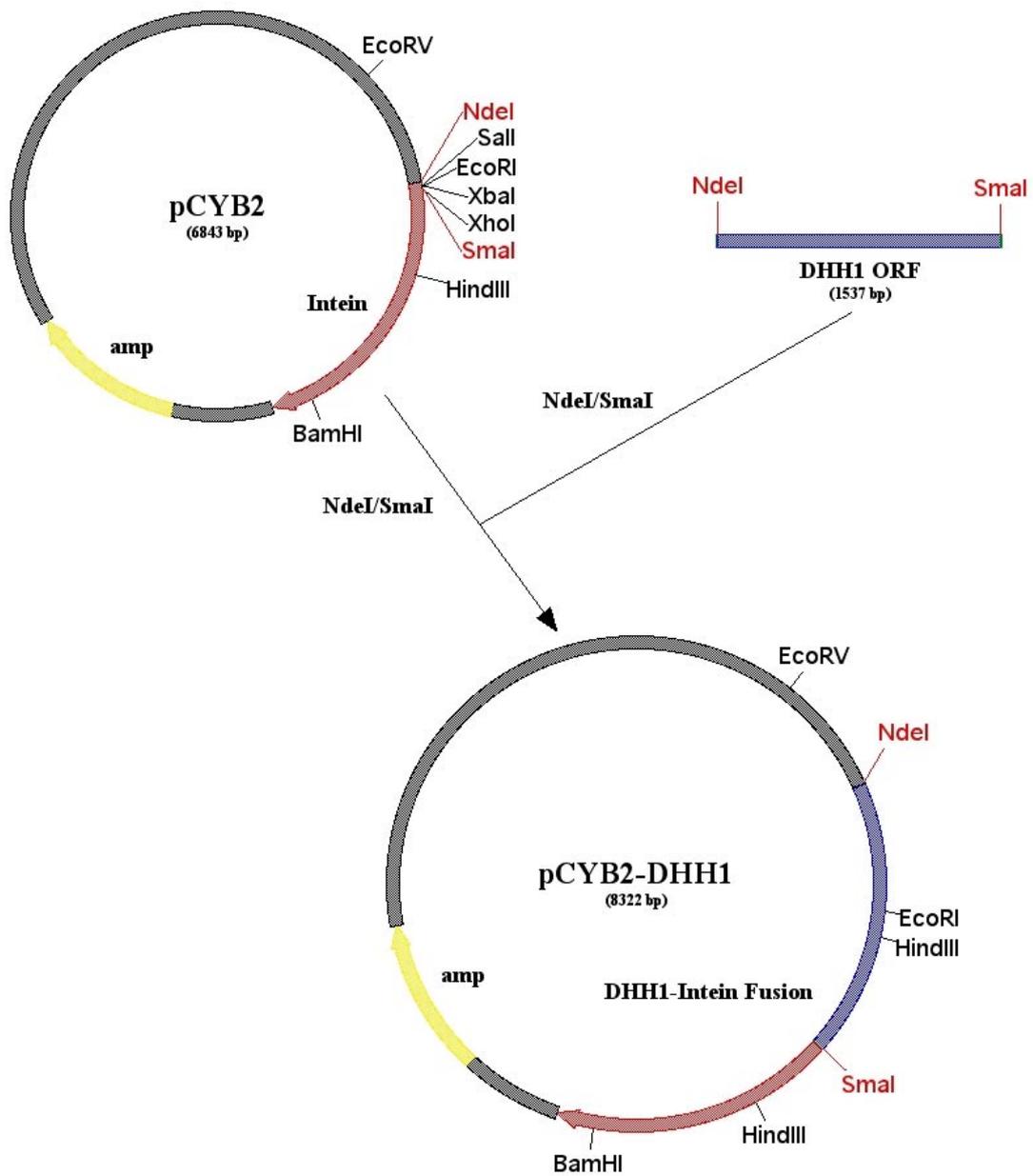
S: 5'-CAG GAG CUG CUG GCU GAC AdTdT

### 7.3 Klonierung der single-copy Expressionen der Verkürzungen von Dhh1p



**Abb. 7-1** Klonierung der single-copy Trankierungen am Beispiel von C244. Der DHH1-Promotor (blau) wurde mit den Primern Dhh1/1 und DHH1/2 amplifiziert, die eine 5'-*XhoI* und 3'-*SmaI* Schnittstelle anhängten. Dieses Fragment wurde über die *XhoI* und *SmaI* Schnittstellen des pRS315 Vektors kloniert. Die DHH1 C244 Trankierung (grün) wurde durch die Primer DHH1-*NdeI*-FOR und DHH1C244-*XbaI*-REV amplifiziert und dann in die *SmaI* und *XbaI* Schnittstellen des pRS315 DHH1 Promotor Plasmids kloniert.

## 7.4 Klonierung der C-terminalen Intein Fusion von Dhh1p mit dem IMPACT-System (NEB)



**Abb. 7-2** Der DHH1 ORF (blau) wurde mit den Primern DHH1-*NdeI*-FOR und DHH1-*SmaI*-Rev in einer PCR amplifiziert, wobei die *NdeI* und *SmaI* Schnittstelle angehängt wurden. Dieses Fragment wurde über die *NdeI* und *SmaI* Schnittstelle in den Vektor pCYB2 (NEB) kloniert, woraus eine in frame Fusion mit dem Intein (rot) entstand.



## 8 LITERATURVERZEICHNIS

**Akao, Y., Seto, M., Yamamoto, K., Iida, S., Nakazawa, S., Inazawa, J., Abe, T., Takahashi, T., and Ueda, R.** (1992). The RCK gene associated with t(11;14) translocation is distinct from the MLL/ALL-1 gene with t(4;11) and t(11;19) translocations. *Cancer Res* 52, 6083-7.

**Aravind, L., Walker, D. R., and Koonin, E. V.** (1999). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* 27, 1223-42.

**Beelman, C. A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrandeur, T. E., Hatfield, L., Fortner, D. M., and Parker, R.** (1996). An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* 382, 642-6.

**Boeck, R., Tarun, S., Jr., Rieger, M., Deardorff, J. A., Muller-Auer, S., and Sachs, A. B.** (1996). The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J Biol Chem* 271, 432-8.

**Bonnerot, C., Boeck, R., and Lapeyre, B.** (2000). The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. *Mol Cell Biol* 20, 5939-46.

**Boulton, S. J., and Jackson, S. P.** (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J* 17, 1819-28.

**Boulton, S. J., and Jackson, S. P.** (1996). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* 24, 4639-48.

**Boulton, S. J., and Jackson, S. P.** (1996). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *Embo J* 15, 5093-103.

**Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M., and Seraphin, B.** (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *Embo J* 19, 1661-71.

**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

**Briza, P., Breitenbach, M., Ellinger, A., and Segall, J.** (1990). Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 4, 1775-89.

**Briza, P., Eckerstorfer, M., and Breitenbach, M.** (1994). The sporulation-specific enzymes encoded by the DIT1 and DIT2 genes catalyze a two-step reaction leading to a soluble LL-dityrosine-containing precursor of the yeast spore wall. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4524-8.

**Briza, P., Ellinger, A., Winkler, G., and Breitenbach, M.** (1990). Characterization of a DL-dityrosine-containing macromolecule from yeast ascospore walls. *J Biol Chem* 265, 15118-23.

**Briza, P., Ellinger, A., Winkler, G., and Breitenbach, M.** (1988). Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *J Biol Chem* 263, 11569-74.

**Brown, C. E., and Sachs, A. B.** (1998). Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol Cell Biol* 18, 6548-59.

**Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P. B., Choi, E. Y., Finberg, K., Roeder, G. S., and Snyder, M.** (1994). Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8, 1087-105.

**Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates, J. R., 3rd, Hays, L., Morgan, W. F., and Petrini, J. H.** (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-86.

**Caruthers, J. M., and McKay, D. B.** (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 12, 123-33.

**Chamankhah, M., Fontanie, T., and Xiao, W.** (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* mre11(ts) allele confers a separation of DNA repair and telomere maintenance functions. *Genetics* 155, 569-76.

**Cho, H. S., Ha, N. C., Kang, L. W., Chung, K. M., Back, S. H., Jang, S. K., and Oh, B. H.** (1998). Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. *J Biol Chem* *273*, 15045-52.

**Chuang, R. Y., Weaver, P. L., Liu, Z., and Chang, T. H.** (1997). Requirement of the DEAD-Box protein ded1p for messenger RNA translation. *Science* *275*, 1468-71.

**Church, G.M., and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* *81*, 1991-5

**Coller, J. M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., and Parker, R.** (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *Rna* *7*, 1717-27.

**Colley, A., Beggs, J. D., Tollervey, D., and Lafontaine, D. L.** (2000). Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. *Mol Cell Biol* *20*, 7238-46.

**Czaplinski, K., Majlesi, N., Banerjee, T., and Peltz, S. W.** (2000). Mtt1 is a Upf1-like helicase that interacts with the translation termination factors and whose overexpression can modulate termination efficiency. *Rna* *6*, 730-43.

**D'Amours, D., and Jackson, S. P.** (2001). The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* *15*, 2238-49.

**de la Cruz, J., Iost, I., Kressler, D., and Linder, P.** (1997). The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5201-6.

**de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P.** (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* *24*, 192-8.

**de Valoir, T., Tucker, M. A., Belikoff, E. J., Camp, L. A., Bolduc, C., and Beckingham, K.** (1991). A second maternally expressed *Drosophila* gene encodes a putative RNA helicase of the "DEAD box" family. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 2113-7.

**Dunckley, T., and Parker, R.** (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *Embo J* 18, 5411-22.

**Feldmann, H., and Winnacker, E. L.** (1993). A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268, 12895-900.

**Fellerhoff, B., Eckardt-Schupp, F., and Friedl, A. A.** (2000). Subtelomeric repeat amplification is associated with growth at elevated temperature in *yku70* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 1039-51.

**Fischer, N., and Weis, K.** (2002). The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *Embo J* 21, 2788-97.

**Fleckner, J., Zhang, M., Valcarcel, J., and Green, M. R.** (1997). U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. *Genes Dev* 11, 1864-72.

**Frischmeyer, P. A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerio, A. L., Parker, R., and Dietz, H. C.** (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295, 2258-61.

**Fry, D. C., Kuby, S. A., and Mildvan, A. S.** (1986). ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 907-11.

**Gietz, R.D., and Schiestl, R. H.** (1995). Transforming yeast with DNA. *Methods Mol Cell Biol* 5, 255-69

**Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20, 1425.

**Gorbalenya, A. E., and Koonin, E. V.** (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr Opin Struct Biol.* 3, 419-29

**Grallert, B., Kearsey, S. E., Lenhard, M., Carlson, C. R., Nurse, P., Boye, E., and Labib, K.** (2000). A fission yeast general translation factor reveals links between protein synthesis and cell cycle controls. *J Cell Sci* 113, 1447-58.

- Grenon, M., Gilbert, C., and Lowndes, N. F.** (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol* 3, 844-7.
- Gross, C. H., and Shuman, S.** (1996). The QRxGRxGRxxxG motif of the vaccinia virus DExH box RNA helicase NPH- II is required for ATP hydrolysis and RNA unwinding but not for RNA binding. *J Virol* 70, 1706-13.
- Guthrie, C., and Fink, G. R.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* 194, 12-7.
- Haber, J. E.** (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell* 95, 583-6.
- Hata, H., Mitsui, H., Liu, H., Bai, Y., Denis, C. L., Shimizu, Y., and Sakai, A.** (1998). Dhh1p, a putative RNA helicase, associates with the general transcription factors Pop2p and Ccr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 571-9.
- Hatfield, L., Beelman, C. A., Stevens, A., and Parker, R.** (1996). Mutations in trans-acting factors affecting mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 5830-8.
- Herrmann, G., Lindahl, T., and Schar, P.** (1998). *Saccharomyces cerevisiae* LIF1: a function involved in DNA double-strand break repair related to mammalian XRCC4. *Embo J* 17, 4188-98.
- Herschlag, D.** (1995). RNA chaperones and the RNA folding problem. *J Biol Chem* 270, 20871-4.
- Hodgman, T. C.** (1988). A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333, 22-3.
- Holmes, D. S., and Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114, 193-7.
- Hsu, C. L., and Stevens, A.** (1993). Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Mol Cell Biol* 13, 4826-35.
- Iost, I., Dreyfus, M., and Linder, P.** (1999). Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem* 274, 17677-83.

**Ito, H., Fukuda, Y, Murata, K., and Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* *153*, 163-8

**Jacobs, J. S., Anderson, A. R., and Parker, R. P.** (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *Embo J* *17*, 1497-506.

**Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S., and Pyle, A. M.** (2001). Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science* *291*, 121-5.

**Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S., and Pyle, A. M.** (2000). The DExH protein NPH-II is a processive and directional motor for unwinding RNA. *Nature* *403*, 447-51.

**Kadare, G., and Haenni, A. L.** (1997). Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* *71*, 2583-90.

**Karpel, R. L., Miller, N. S., and Fresco, J. R.** (1982). Mechanistic studies of ribonucleic acid renaturation by a helix- destabilizing protein. *Biochemistry* *21*, 2102-8.

**Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C., and Caron, P. R.** (1998). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* *6*, 89-100.

**Kironmai, K. M., and Muniyappa, K.** (1997). Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* *2*, 443-55.

**Kistler, A. L., and Guthrie, C.** (2001). Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes Dev* *15*, 42-9.

**Koonin, E. V.** (1991). Similarities in RNA helicases. *Nature* *352*, 290.

**Korolev, S., Yao, N., Lohman, T. M., Weber, P. C., and Waksman, G.** (1998). Comparisons between the structures of HCV and Rep helicases reveal structural similarities between SF1 and SF2 super-families of helicases. *Protein Sci* *7*, 605-10.

- Ladomery, M., Wade, E., and Sommerville, J.** (1997). Xp54, the *Xenopus* homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. *Nucleic Acids Res* 25, 965-73.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- LaGrandeur, T. E., and Parker, R.** (1998). Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *Embo J* 17, 1487-96.
- Larimer, F. W., and Stevens, A.** (1990). Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'----3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. *Gene* 95, 85-90.
- Leeds, P., Peltz, S. W., Jacobson, A., and Culbertson, M. R.** (1991). The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 5, 2303-14.
- Libri, D., Graziani, N., Saguez, C., and Boulay, J.** (2001). Multiple roles for the yeast SUB2/yUAP56 gene in splicing. *Genes Dev* 15, 36-41.
- Linder, P., and Daugeron, M. C.** (2000). Are DEAD-box proteins becoming respectable helicases? *Nat Struct Biol* 7, 97-9.
- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P. P.** (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121-2.
- Liu, H. Y., Badarinarayana, V., Audino, D. C., Rappsilber, J., Mann, M., and Denis, C. L.** (1998). The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *Embo J* 17, 1096-106.
- Lohman, T. M., and Bjornson, K. P.** (1996). Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu Rev Biochem* 65, 169-214.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R.** (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-61.

**Lorsch, J. R.** (2002). RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* 109, 797-800.

**Lorsch, J. R., and Herschlag, D.** (1998). The DEAD box protein eIF4A. 2. A cycle of nucleotide and RNA-dependent conformational changes. *Biochemistry* 37, 2194-206.

**Lu, D., and Yunis, J. J.** (1992). Cloning, expression and localization of an RNA helicase gene from a human lymphoid cell line with chromosomal breakpoint 11q23.3. *Nucleic Acids Res* 20, 1967-72.

**Maekawa, H., Nakagawa, T., Uno, Y., Kitamura, K., and Shimoda, C.** (1994). The *ste13+* gene encoding a putative RNA helicase is essential for nitrogen starvation-induced G1 arrest and initiation of sexual development in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 244, 456-64.

**Mages, G. J., Feldmann, H. M., and Winnacker, E. L.** (1996). Involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* HDF1 gene in DNA double-strand break repair and recombination. *J Biol Chem* 271, 7910-5.

**Maillet, L., and Collart, M. A.** (2002). Interaction between Not1p, a component of the Ccr4-not complex, a global regulator of transcription, and Dhh1p, a putative RNA helicase. *J Biol Chem* 277, 2835-42.

**Martin, S. G., Laroche, T., Suka, N., Grunstein, M., and Gasser, S. M.** (1999). Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* 97, 621-33.

**Mayes, A. E., Verdone, L., Legrain, P., and Beggs, J. D.** (1999). Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *Embo J* 18, 4321-31.

**Moore, J. K., and Haber, J. E.** (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 2164-73.

**Moriya, H., and Isono, K.** (1999). Analysis of genetic interactions between DHH1, SSD1 and ELM1 indicates their involvement in cellular morphology determination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 481-96.

**Muhlrad, D., and Parker, R.** (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370, 578-81.

**Nag, D. K., Koonce, M. P., and Axelrod, J.** (1997). SSP1, a gene necessary for proper completion of meiotic divisions and spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 7029-39.

**Ogawa, H., Johzuka, K., Nakagawa, T., Leem, S. H., and Hagihara, A. H.** (1995). Functions of the yeast meiotic recombination genes, MRE11 and MRE2. *Adv Biophys* 31, 67-76.

**Pause, A., Methot, N., and Sonenberg, N.** (1993). The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol* 13, 6789-98.

**Pause, A., and Sonenberg, N.** (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *Embo J* 11, 2643-54.

**Ragunathan, P. L., and Guthrie, C.** (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr Biol* 8, 847-55.

**Rogers, G. W., Jr., Lima, W. F., and Merrick, W. C.** (2001). Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J Biol Chem* 276, 12598-608.

**Ross-Macdonald, P., Coelho, P. S., Roemer, T., Agarwal, S., Kumar, A., Jansen, R., Cheung, K. H., Sheehan, A., Symoniatis, D., Umansky, L., Heidtman, M., Nelson, F. K., Iwasaki, H., Hager, K., Gerstein, M., Miller, P., Roeder, G. S., and Snyder, M.** (1999). Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature* 402, 413-8.

**Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C., and Sonenberg, N.** (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol* 10, 1134-44.

**Sambrook, J., Maniatis, T., and Fritsch, E. F.** (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd Edition (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

**Saraste, M., Sibbald, P. R., and Wittinghofer, A.** (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* *15*, 430-4.

**Schiestl, R. H., Dominska, M., and Petes, T. D.** (1993). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with nonhomologous DNA: illegitimate integration of transforming DNA into yeast chromosomes and in vivo ligation of transforming DNA to mitochondrial DNA sequences. *Mol Cell Biol* *13*, 2697-705.

**Schiestl, R. H., and Petes, T. D.** (1991). Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 7585-9.

**Schiestl, R. H., Zhu, J., and Petes, T. D.** (1994). Effect of mutations in genes affecting homologous recombination on restriction enzyme-mediated and illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *14*, 4493-500.

**Schmid, S. R., and Linder, P.** (1992). D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol* *6*, 283-91.

**Schmitt, C., von Kobbe, C., Bachi, A., Pante, N., Rodrigues, J. P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Seraphin, B., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E.** (1999). Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *Embo J* *18*, 4332-47.

**Schneider, S., and Schwer, B.** (2001). Functional domains of the yeast splicing factor Prp22p. *J Biol Chem* *276*, 21184-91.

**Schwartz, J. L.** (1989). Monofunctional alkylating agent-induced S-phase-dependent DNA damage. *Mutat Res* *216*, 111-8.

**Schwer, B., and Gross, C. H.** (1998). Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre- mRNA splicing. *Embo J* *17*, 2086-94.

**Schwer, B., and Meszaros, T.** (2000). RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing. *Embo J* *19*, 6582-91.

- Seto, M., Yamamoto, K., Takahashi, T., and Ueda, R.** (1995). Cloning and expression of a murine cDNA homologous to the human RCK/P54, a lymphoma-linked chromosomal translocation junction gene on 11q23. *Gene* 166, 293-6.
- Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B.** (1986). Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Shuman, S.** (1993). Vaccinia virus RNA helicase. Directionality and substrate specificity. *J Biol Chem* 268, 11798-802.
- Snay-Hodge, C. A., Colot, H. V., Goldstein, A. L., and Cole, C. N.** (1998). Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *Embo J* 17, 2663-76.
- Soultanas, P., and Wigley, D. B.** (2000). DNA helicases: 'inching forward'. *Curr Opin Struct Biol* 10, 124-8.
- Staley, J. P., and Guthrie, C.** (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-26.
- Staley, J. P., and Guthrie, C.** (1999). An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol Cell* 3, 55-64.
- Steighner, R. J., and Povirk, L. F.** (1990). Bleomycin-induced DNA lesions at mutational hot spots: implications for the mechanism of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8350-4.
- Story, R. M., Li, H., and Abelson, J. N.** (2001). Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1465-70.
- Story, R. M., and Steitz, T. A.** (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* 355, 374-6.
- Strahl-Bolsinger, S., and Tanner, W.** (1993). A yeast gene encoding a putative RNA helicase of the "DEAD"-box family. *Yeast* 9, 429-32.

**Subramanya, H. S., Bird, L. E., Brannigan, J. A., and Wigley, D. B.** (1996). Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature* 384, 379-83.

**Sung, P., Higgins, D., Prakash, L., and Prakash, S.** (1988). Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP. *Embo J* 7, 3263-9.

**Svitkin, Y. V., Pause, A., Haghghat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G. J., and Sonenberg, N.** (2001). The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *Rna* 7, 382-94.

**Tanner, N. K., and Linder, P.** (2001). DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* 8, 251-62.

**Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., Matsuura, S., Nakamura, A., Shiraishi, T., Ito, E., Masnada, D., Delia, D., and Komatsu, K.** (2001). The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[middle dot]hMRE11[middle dot]NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* 276, 12-5.

**Tharun, S., He, W., Mayes, A. E., Lennertz, P., Beggs, J. D., and Parker, R.** (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* 404, 515-8.

**Treiber, D. K., and Williamson, J. R.** (2001). Beyond kinetic traps in RNA folding. *Curr Opin Struct Biol* 11, 309-14.

**Tsubouchi, H., and Ogawa, H.** (1998). A novel mre11 mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* 18, 260-8.

**Tsukamoto, Y., Kato, J., and Ikeda, H.** (1997). Budding yeast Rad50, Mre11, Xrs2, and Hdf1, but not Rad52, are involved in the formation of deletions on a dicentric plasmid. *Mol Gen Genet* 255, 543-7.

**Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L., and Parker, R.** (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 377-86.

**van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., and Parker, R.** (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295, 2262-4.

**Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K. M., Chrzanowska, K. H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanova, E., Cooper, P. R., Nowak, N. J., Stumm, M., Weemaes, C. M., Gatti, R. A., Wilson, R. K., Digweed, M., Rosenthal, A., Sperling, K., Concannon, P., and Reis, A.** (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93, 467-76.

**Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1, 945-51.

**Wang, Y., and Guthrie, C.** (1998). PRP16, a DEAH-box RNA helicase, is recruited to the spliceosome primarily via its nonconserved N-terminal domain. *Rna* 4, 1216-29.

**Ward, J. F.** (1990). The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int J Radiat Biol* 57, 1141-50.

**Weaver, P. L., Sun, C., and Chang, T. H.** (1997). Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3. *Mol Cell Biol* 17, 1354-65.

**Wilson, T. E., Grawunder, U., and Lieber, M. R.** (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining [see comments]. *Nature* 388, 495-8.

**Woodson, S. A.** (2000). Recent insights on RNA folding mechanisms from catalytic RNA. *Cell Mol Life Sci* 57, 796-808.

**Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A. D., Le, H. V., and Weber, P. C.** (1997). Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol* 4, 463-7.

**Zhang, M., and Green, M. R.** (2001). Identification and characterization of yUAP/Sub2p, a yeast homolog of the essential human pre-mRNA splicing factor hUAP56. *Genes Dev* 15, 30-5.

**Zhang, S., Williams, C. J., Hagan, K., and Peltz, S. W.** (1999). Mutations in VPS16 and MRT1 stabilize mRNAs by activating an inhibitor of the decapping enzyme. *Mol Cell Biol* *19*, 7568-76.

## CURRICULUM VITAE

Name: Karsten Beck  
Geburtsort: Frankfurt/M  
Geburtsdatum: 17.01.1970  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung:

1976-1980 Grundschole Frankfurt/M Oberrad  
1980-1990 Schiller-Gymnasium, Frankfurt/M  
06/1990 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

1990-1991 Studium Maschinenbau an der TU München  
1991-1998 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
11/1994 Vordiplomprüfung  
07/1997 Diplomprüfung  
  
09/1997-03/1998 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Horst Domdey am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Thema: Entwicklung und Optimierung einer Methode zur Untersuchung differenzieller Genexpression in subtraktiven cDNA-Banken am Beispiel von humanen Knochenzellen  
  
06/1998-10/2002 Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Thema: Das Dhh1 Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* -funktionelle Untersuchungen einer putativen DEAD Box RNA Helikase